

学会抄録

第 88 回北海道医学大会生理系分科会 (日本生理学会北海道地方会)

日時：平成 20 年 9 月 6 日 (土) 10:00~15:15

会場：北海道大学 歯学部講堂

当番幹事：北海道医療大学歯学部口腔生物学系生理学分野教授 和泉博之

参加者：40 名

演題数：15 題

日本生理学会北海道地方会は第 88 回北海道医学大会生理系分科会を兼ねて、上記の日程で開催されました。様々な分野から 15 の演題が発表され、各分野の参加者により、研究領域の垣根を越えた活発な質疑応答が行われ有意義な会となりました。その後、開催された懇親会では多数の方々へ出席していただき、地方会ならではの打ち解けた雰囲気で大いに交流を深めるものとなりました。本会にご参加いただいた皆様に深くお礼申し上げます。

0-1. 老齢雄マウス尿中に見られる揮発性誘引物質の同定

○長田 和実¹、和泉 博之¹

¹北海道医療大学 歯 口腔生物学系 生理学分野

【目的】多くの野生動物において、高齢の雄はしばしば同種の若齢動物よりも好ましい交配相手となる。本実験は雌マウスが高齢のマウスのおいを嗜好することを確かめ、その誘引物質を同定することを目的として行った。【方法】実験動物は、におい行動実験用のマウス（雌；2-5 ヶ月齢）、におい提供動物、(成体群；4-8 ヶ月齢、高齢群；15-20 ヶ月齢、老齢群；28 ヶ月齢いずれも雄)として C57BL/6J を用いた。サンプルは尿を用いた。におい行動実験は、ケージの両端に直径 1cm の穴を開け、そこから老若のにおいを提供し、雌マウスのおい嗅ぎ行動量の差を比較した。次にヘッドスペース固相マイクロ抽出法を用い、38℃で 30 分間におい物質を分離抽出した。化学分析には水素イオン交換検出器ガスクロマトグラフィーおよびガスクロマトグラフ-質量分析計を用いた。【結果と考察】行動実験の結果、高齢群に対するにおい嗅ぎ行動量が成体群に比べ有意に高かった。化学分析の結果、マウスのフェロモンである 2-sec-butyl-4,5-dihydrothiazole (BT), 3,4-dehydro-exo-brevicomine (DB) および 2-isopropyl-4,5-dihydrothiazole (IT) が老齢群で有意に高かった。これらの化合物を合成し、成体マウス尿中に添加すると、雌マウスは老齢マウス尿と同様に誘引された。本結果は、高齢雄マウス

は成体マウスよりも BT, DB, IT などのフェロモンを多く発し、その結果雌に対する高い誘引性を発揮していること示している。Osada K, Tashiro T, Mori K, Izumi H. Chem. Senses (2008) in press

0-2. 頸部迷走神経の求心性刺激によって誘発されるラット咀嚼筋の副交感神経性血管拡張反応

○石井 久淑¹、新岡 丈治¹、和泉 博之¹

¹北海道医療大学 歯学部 口腔生物学系 生理学分野

【目的】これまでに我々は顎・顔面領域の神経性血流調節機序に関する研究から、咀嚼筋（特に咬筋）における副交感神経性血管拡張線維の存在を生理学的及び組織学的手法を用いて証明した (J Physiol 569, 617-629, 2005)。この血管拡張線維は三叉神経（舌神経など）の求心性刺激により反射的に活性化されることから、脳神経を介する末梢からの求心性入力に咀嚼筋の血流維持に密接に関係していると考えられた。迷走神経は三叉神経と同様に循環器、呼吸器及び胃腸消化器系からの求心性線維を多数含んでいることが知られている。しかし、これら線維による求心性入力に咀嚼筋の血流動態との関連性は明らかにされていない。本研究は迷走神経を介する求心性入力に咀嚼筋の血流調節における役割を明らかにすることを目的とし、頸部迷走神経の求心性刺激が咀嚼筋の血流に及ぼす影響について検討した。【方法】実験には Wistar 雄性ラット (10-25 週齢) を用いた。ラットはウレタン麻酔下にてミオブロックで非動化し、

人工呼吸により管理した。大腿動脈及び大腿静脈にはカニューレを挿入し、体幹血圧の測定と薬物投与にそれぞれを用いた。両側の頸部交感神経と迷走神経は頸部で切断した。頸部迷走神経は双極電極により中枢性に電気刺激し、咬筋の血流変化はレーザードップラー血流計を用いて測定した。

【結果】咬筋の血流量は頸部迷走神経の電気刺激により刺激強度 (1-30 V) と刺激頻度 (1-30 Hz) に依存して両側性に増加した。この血流増加は血圧変動に非依存的に生じた。頸部迷走神経刺激 (20 V, 20 Hz, 20 s, 2 ms) により生じる咬筋の血流増加は、自律神経節遮断薬 (ヘキサメトニウム, 10 mg/kg) の投与によって可逆的に抑制された。【結論】頸部迷走神経の求心性刺激は反射的に咀嚼筋の副交感神経性血管拡張反応を誘発することが明らかとなり、循環器、呼吸器及び胃腸消化器系からの求心性入力が咀嚼筋の血流調節に重要な役割を果たしていることが示唆された。

0-3. 虚血時におけるアストロサイト・プリン受容体の活性化は虚血耐性効果を誘起する

○岩淵 禎弘¹、河原 剛一¹

¹北海道大学大学院 情報科学研究科 細胞情報工学研究室

【背景】アストロサイトは種々の神経栄養因子を産生し、神経細胞の生存・維持に関わっている。一般的に脳虚血などの障害時には反応性アストロサイトとなり、病態の修復に重要な役割を演じていると考えられている一方で、虚血の程度により再灌流時に反応性アストロサイトからグルタミン酸などが過剰に細胞外に放出され、神経細胞内 Ca²⁺濃度上昇が生じて神経細胞死が増強される、再灌流障害も報告されている。また、短時間の非致死的な虚血 (preconditioning: PC) 処置を致死的な虚血処置の前に施すと、虚血に対して抵抗性を獲得する (虚血耐性効果) ことが多数の虚血動物モデルで確認されているが、PC と反応性アストロサイトの関連性に関する詳細は不明な点が多い。【目的】本研究ではアストロサイト培養系における虚血耐性効果有無を確認し、ATP 感受性プリン受容体 (P2 receptors) を介した Ca²⁺情報伝達機構の変化を検討した。【結果】ラット大脳皮質由来アストロサイト培養系に対して 2 h の非致死的な虚血模擬 (脱酸素、脱グルコース: OGD) 処置 (PC 処置) を施した 1 日後に 8 h の致死的な OGD 処置を加えると、PC 処置群ではアストロサイトの生存率が非 PC 処置群と比較して有意に増加した。PC 処置再灌流早期では反応性アストロサイトの指標である GFAP 発現量が増加すると共に、細胞外 ATP 濃度、P2Y1、P2Y2 受容体の発現量も増加しており、その結果、細胞内 Ca²⁺振動が活発化していた。しかし、P2X7 受容体の PC 処置後の発現量に差は認められなかった。一方、8 h の OGD 処置後では、細胞外 ATP 濃度の増加は認められなかったが、P2Y1、P2Y2 受容体に加

えて P2X7 受容体の発現量が顕著に増加していた。

【考察・結論】反応性アストロサイトは虚血耐性を有しており、そのメカニズムの一つに P2Y 受容体の活性化が関連していることが分かった。ATP-P2Y 受容体シグナルの活性化は、その後の致死的な虚血に対する抵抗性を有するタンパク発現を亢進させる可能性が示唆された。

0-4. 胎仔ラットにおける心拍動開始時期の同定とカルシウム動態の検討

○小林 武志¹、前田 佐知子¹、一瀬 信敏¹、小林 貴法¹、谷本 勝正¹、白鳥 香理¹、當瀬 規嗣¹

¹札幌医科大学 医学部 細胞生理学講座

妊娠期間が約 21 日間のラットにおいては、胎生 9.5 日目から 10.5 日目の間で心拍動が開始する。この間の心臓発生領域 (cardiac crescent) の形態変化に関してのみの報告は多くなされているが、形態変化と心拍動が開始する時期との関連については、詳細な検討がなされていない。そこで、今回我々は CCD カメラを接続した顕微鏡を用い心拍動開始時期と形態学的変化との関連を検討した。胎生 9.5 日目から 10.5 日目の胚を子宮から取り出し、37°C のタイロード中で観察したところ、cardiac crescent の中央部が厚くなる胎生 10.00 日目から 10.15 日目の時期に、心拍動が開始した。拍動している領域は、心拍開始直後は cardiac crescent の一部分だけであり、その後時間とともに拍動範囲が cardiac crescent 全体に広がっていくのが観察された。つづいて、蛍光顕微鏡を用い心拍動開始後のカルシウムトランジェントの変化を観察した。カルシウムトランジェントの持続時間は心拍動開始直後では長く、成長に伴い短縮していくのが観察された。この変化は、以前報告を行った胎生 12.5 日目から成獣にかけての変化と同様であることが判明した。

0-5. カフェインはウシ毛様体筋細胞のムスカリン応答性の低コンダクタンス陽イオンチャネルを活性化する

○宮津 基¹、大日向 浩¹、高井 佳子²、高井 章¹

¹旭川医科大学 生理 自律機能、²名古屋 大学医学部 眼科

【目的】毛様体筋の持続的収縮に必要な細胞外からの Ca²⁺イオン流入経路として機能するムスカリン応答性の非選択性陽イオンチャネルの特性を解析するとともに、筋小胞体 (SR) の Ca²⁺貯蔵の枯渇がその活性化機構に関与しているか否かについて検討するために、毛様体筋におけるカフェインの効果について調べた。また、SR の Ca²⁺センサーの分子本体として注目される STIM1 蛋白質の存在を検討した。

【方法】細胞内 Ca^{2+} の変動は、同酵素処理で単離したウシ毛様体筋細胞を用い、Fluo-4 蛍光法により記録した。上記と同様のウシ単離毛様体筋細胞において電位固定法により全膜電流を記録。STIM1 の発現の検討には RT-PCR 法と免疫蛍光顕微鏡法とを併用した。

【結果】カフェイン (20 mM) により一過性の Ca^{2+} 上昇とそれに続く持続的な Ca^{2+} 上昇が観察された。細胞外液 Ca^{2+} フリーの状態下では、前者は観察されたが、後者は観察されなかった。カフェイン投与により -50 mV の膜電位で内向きのホールセル電流が観察された。この電流のノイズ解析から、カルバコールによって活性化される 2 種類の非選択性陽イオンチャネル [NSCCL (35 pS) と NSCCS (100 fS)] の中で、カフェインは NSCCS のみを開口させることがわかった。RT-PCR 法によりウシ毛様体筋組織から STIM1 の mRNA が検出された。短期培養した毛様体筋細胞を 0.0005 % の digitonin により形質膜の透過性処理後、STIM1 の特異抗体を用いて、IP3 レセプター-1 の特異抗体と 2 重免疫蛍光染色すると、細胞内に両者が球状に共局在した。

【結論】ウシ毛様体筋のムスカリン刺激により活性化される NSCCS (100 fS) は、SR の Ca^{2+} 貯蔵からの Ca^{2+} 放出を介して活性化される可能性が示唆された。また、SR に STIM1 の発現が確認された。

0-6. 毛様体筋収縮調節に関与する複数の Gq/11 共役経路

○高井 章¹、宮津 基¹

¹旭川医科大学 生理学講座 自律機能分野

【背景】毛様体筋の収縮は、伝達物質アセチルコリンによる M3 型ムスカリン受容体 (M3) の刺激により開始され保持される。一般に M3 の関与する反応は、Gq/11 蛋白 (Gq/11) に共役した信号伝達経路を介して現れるが、毛様体筋においてその下流に接続する系の本体については不明の点が多い。最近、YM-254890 (YM) という一種の depsipeptide が Gq/11 の特異的阻害剤であることが報告された。今回、ウシ毛様体筋においてカルバコール (CCh) で誘発される収縮、細胞内 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) 上昇および受容体作動性非選択性陽イオンチャネル (NSCC) 電流に対する YM の効果を検討した。

【方法】等尺性張力はウシ毛様体から摘出した平滑筋束より記録した。酵素処理で単離後、ガラス表面で 1-5 日培養した毛様体筋細胞を用い、Fluo-4 蛍光法により細胞内 Ca^{2+} の変動を膜電位固定法により全細胞膜電流を記録した。

【結果と考察】CCh (2 μ M) 投与により発生した収縮の持続相に YM (0.05 - 10 μ M) を投与すると、収縮は濃度依存性に抑制された。YM を除去すると CCh への反応性は時定数 140 h の指数関数的時間経過で回復した。 Ca^{2+} イオノフォアである ionomycin (1-10 μ M) も持続的収縮を起したが、それは CCh 刺激による収縮の 50-60% を超えなかった。

Ionomycin 存在下で CCh を添加すると張力は速やかに CCh による収縮のレベルにまで上昇したが、さらに YM (0.5 - 1 μ M) を加えると CCh 添加前のレベルまで戻った。単離細胞において、CCh は $[Ca^{2+}]_i$ の上昇と、二種類の NSCC 電流の活性化を起したが、YM (3 - 10 μ M) の細胞外投与は、それらの初期相、持続相とも完全に抑制した。毛様体筋の収縮調節には、Gq/11 に共役した複数の信号伝達経路が関与しているらしい。

0-7. 静的傾斜時における MST 野滑動性追跡眼球運動関連ニューロンの応答

○藤原 圭志^{1,2}、赤尾 鉄平¹、クルキン セルゲイ¹、福島 菊郎¹

¹北海道大学 大学院医学研究科 認知行動学分野、

²北海道大学 大学院院学研究科 耳鼻咽喉科頭頸部外科学分野

【背景】滑動性追跡眼球運動は網膜誤差速度情報を眼球運動情報に変換することで実行され、前庭系と密接に影響しあっている。MST 野は滑動性追跡眼球運動の開始や維持に必須の領域であり、MST 野ニューロンは、半規管を刺激する回転加速度刺激と、耳石器を刺激する直線加速度刺激の両方に応答すること、視覚対象物の動きの認知に関わる可能性が報告されている。しかし、MST 野ニューロンが眼球運動信号や視覚信号をどのような座標軸で再現しているかは不明である。本研究の目的は、滑動性追跡眼球運動およびそれに必須の視覚情報を、MST 野は頭部中心座標で再現するか、それとも重力中心座標で再現するかを明らかにすることである。【方法】2 頭のニホンザルを用い、覚醒下に全身を前額面で右あるいは左方向に 40 度傾けることにより静的傾斜を与え、重力中心座標と頭部中心座標を乖離させて、MST 野の単一ニューロン活動の視覚応答および滑動性追跡眼球運動関連応答の最適方向を同定し、正中立位と静的傾斜時と比較した。【結果】2 頭のサルの MST 野から 51 個の滑動性追跡眼球運動関連ニューロンの応答を記録した。35 個 (69%) のニューロンは、滑動性追跡眼球運動と optic flow による視覚刺激の両方に応答を示し、滑動性追跡眼球運動のみに応答を示したものが 19%、視覚刺激のみに応答を示したものが 10% であった。51 個のニューロンにおいて、眼球運動および視覚応答の最適方向を、直立位と静的傾斜位と比較したところ、大部分 (41/51=80%) のニューロンでは最適方向はほぼ一致していた。残りの 10 個では、静的傾斜によって眼球反対回旋から予想される範囲を越える最適方向の偏位がみられた。10 個の偏位の平均は 12.3 度で、重力中心座標で推定される 40 度よりも極めて少なかった。【結論】MST 野は頭部中心座標で滑動性追跡眼球運動およびそれに必須の視覚情報を再現していると考えられた。

0-8. 補足視野(SEF)における予測性眼球運動信号

○七戸 夏子^{1,2}、赤尾 鉄平¹、新田 卓也^{1,2}、クルキン セルゲイ¹、福島 菊郎¹

¹北海道大学大学院 医学研究科 生理学講座 認知行動学分野、²北海道大学大学院 医学研究科 感覚器病学講座 眼科学分野

【目的】ゆっくり動く対象を追視する時に、網膜上の対象像の運動が主要入力となって滑動性眼球運動が行われる。滑動性眼球運動は予測的にもおこる(e.g. Kowler & Steinman 1979)。対象の動きが予測可能な場合に応答を示す滑動性眼球運動関連ニューロンが SEF で報告されているが(Heinen & Liu 1997, de Hemptinne et al. 2008)、これらの研究では予測的な応答が、対象の視覚情報処理過程と、眼球運動の準備過程のどちらを反映したものか区別していない。これらを区別するため新しい眼球運動課題を行い、SEF のニューロン応答を調べた。【方法】2頭のニホンザルに以下の課題を訓練した。コンピュータディスプレイ上の固視点の周囲に一方方向に動くランダムドットを提示し(cue1)、遅延期間(delay1)の後、追視するか(go trial)固視するか(no-go trial)を指示する cue2 を提示した。さらに遅延期間(delay2)の後、固視点から cue1 と同一および反対方向に動く2つの視標と、静止視標の計3個を提示した。サルは delay2 まで固視点を注視し、3視標から正解を選び、追視または固視を行った。SEF から課題関連ニューロンを記録し、応答特性を調べた。【結果】課題関連ニューロンの大多数は cue2 および delay2 に応答し、方向特異性をもつものもみられた。また、no-go trial で特異的に応答するニューロンがみられた。【考察】cue2 および delay2 の応答は、滑動性眼球運動の準備を反映したものと考えられ、方向特異性をもつものは特に予測性の運動と関連が深いことが示唆される。また、no-go trial で特異的に応答するニューロンの存在は、SEF が運動を行うか否かの決定に関わることを示唆している。

0-9. 海馬 CA3-CA1 シナプスにおける伝達物質放出確率変化の光学的測定

○榎木 亮介^{1,2}、Alan Fine²

¹北海道大学大学院 医学研究科 神経生物学分野、²ダルハウジー大学医学部

シナプス長期可塑性(Long-Term Potentiation or Depression; LTP, LTD)は、脳の記憶学習の基礎過程と考えられているが、そのメカニズムについては未だ不明な点が多い。特に LTP/LTD の表出部位については、グルタミン酸受容体の数やスパインの形態変化などの「シナプス後側」の報告が数多くある一方、「シナプス前側」については測定方法の困難さを伴い、未だ議論が続いている。本研究

では、二光子レーザー顕微鏡と電気生理学的手法を持ちい、単一スパインのカルシウム上昇の出現確率がシナプス前末端からのグルタミン酸放出確率を反映することを利用して(Emptage et al., Neuron, 2003)、LTP/LTD に伴う伝達物質放出確率の変化を観察した。実験では、成獣ラットより厚さ 350 μ m の急性海馬スライスを作成し、顕微鏡下で同定した CA1 神経細胞に微小電極を刺入して電気応答を記録し、同時に細胞にカルシウム蛍光指示薬 Oregon-Green BAPTA-1 を導入した。細胞外電極によりシャーパー側枝を刺激してシナプス応答を惹起して電気応答を記録し、平行してカルシウム応答により活動する単一スパインを同定し、安定した電気応答とカルシウム応答を記録した後、スパイクタイミング(STDP)、又は高頻度刺激により LTP、LTD を惹起した。その結果、LTP/LTD が起きる際には、伝達物質放出確率が連続的(Graded)かつ両方向(Bidirectional)に変化することが分かった。この事は、シナプスは0か1かを遷移するコンピューター的なデジタル素子ではなく、多段階をとるアナログ素子であることを示している。また驚いたことに、この時シナプス後側変化は見られなかった。この事は、LTP/LTD にはシナプス前側と後側両方の変化があり、生後発達などの複数段階を経て表出部位が変化する可能性を示している。

0-10. GABA_A 受容体作動薬ムシモールは海馬苔状線維における伝導速度を促進する

○渡部 重夫¹、神谷 温之²

¹東京薬科大学 生命科学部 脳神経機能学、²北海道大学 医学研究科 神経生物学

イオンチャンネル型受容体である GABA_A 受容体が海馬苔状線維終末に存在し、抑制性介在ニューロンからの伝達物質漏出により異シナプス性に活性化されることが近年明らかとなったが、その機能的意義については不明な点が多い。今回我々は、GABA_A 受容体活性化が苔状線維軸索における興奮伝播の速度に及ぼす効果について検討した。生後 2 ないし 3 週齢のマウス海馬スライスにおいて、歯状回顆粒細胞を電気刺激し、苔状線維の走行する CA3 野透明層の離れた二点から軸索の集合活動電位を細胞外記録により同時記録した。GABA_A 受容体作動薬であるムシモール(1 μ M)を投与すると、軸索の集合活動電位の振幅が増加し、潜時が減少した。同様の効果が高カリウム液(8 mM)の投与でみられたことから、GABA_A 受容体の活性化は苔状線維軸索を脱分極させると考えられた。さらに、二本の記録電極間の距離と、集合活動電位波形の時間差から、苔状線維の伝導速度を求めた。ムシモールおよび高カリウム液の投与により、伝導速度は軽度増加した。以上の結果から、苔状線維シナプスのプレシナプス GABA_A 受容体は、苔状線維を脱分極することで興奮伝播の速度と発火タイミン

グを制御する機能を有することが示唆された。

0-11. 海馬苔状線維シナプス伝達のドーパミンによる増大と長期増強との共通性

○小原 修幸^{1,2}、福田 諭²、神谷 温之¹

¹北海道大学 大学院医学研究科 神経生物学分野、

²北海道大学 大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野

脳内の主要な神経調節物質であるドーパミンは、海馬 CA3 野苔状線維シナプス伝達を選択的に増大させることが最近明らかとなった。この際に、ドーパミンがシナプス前部の D1 様受容体を活性化し神経終末内 cAMP 濃度を上昇させて伝達物質放出を増大する、との機序が推定されている。また、苔状線維シナプスに高頻度の電気刺激（テタヌス刺激）を与えるとシナプス伝達の長期増強（long-term potentiation:LTP）を生じるが、この際にも同様に神経終末内 cAMP 濃度上昇が引き金となることが示されている。しかしながら、ドーパミンがテタヌス刺激による LTP と共通の細胞内機構を介して作用するか否かについては未だ明らかでない。本研究ではテタヌス刺激による LTP とドーパミン作用に関する実験を行い、両者の発現機構の共通性について検討した。

2ないし3週齢のマウスから海馬急性スライスを作成し、海馬歯状回顆粒細胞層に電気刺激を与え、CA3 透明層から興奮性シナプス電位（EPSP）を細胞外記録した。ドーパミン投与あるいはテタヌス刺激により苔状線維 EPSP はそれぞれ顕著に増強した。また、テタヌス刺激（100 Hz 1 秒×4 回）を与えた際の 60 分後の EPSP 増加率と、ドーパミン（100 μM）を先行投与した際に同様のテタヌス刺激を与えた際の EPSP 増加率とを比較すると、後者が有意に小さかった。これらの結果から、ドーパミンによる苔状線維シナプス伝達の増大は、テタヌス刺激による LTP と少なくとも一部は共通の発現機構を介すると考えられた。

0-12. 冬眠中の体液調節-体液プールとしての腸管

○北尾 直也¹、Osborne Peter¹、橋本 眞明¹

¹旭川医科大学 生理学講座 自律機能分野

体温 5°C 付近で冬眠中のゴールデンハムスターが覚醒する時、血液分布に大きな変化が起こる（Osborne et al. 2005 Am J Physiol）。血液自体の構成にも大きな変化が見られ、事前調査の結果は中途覚醒相（通常体温時）と比べ、冬眠相（低体温時）にヘマトクリット（Ht）が増加する可能性を示した。冬眠相では体外からの水分補給が無いことから、脱水が進行した結果とも考えられるが、冬眠相から中途覚醒した動物では飲水無しでも即座に Ht が通常レベルに回復する可能性も示唆された。そこで、本研究では、冬眠相に応じた Ht

の変化を確認し、その変化が血球の大きさ（MCV）の変化によるものか、血漿量の変化によるものかを明らかにし、さらにそのメカニズムを解明すべく企画された。中途覚醒相のゴールデンハムスター（n=7）をペントバルビタール麻酔下で、また冬眠相の動物（n=7）から心採血した。腹腔臓器を摘出後、腸間膜を剥離、十二指腸の頭側と回腸の尾側をクランプした後離断し、腸管内容物を採取した。遠心分離により固形成分と液体成分を得、質量もしくは体積を測定後、液体成分に関しては浸透圧測定と生化学検査に供した。全血の一部を赤血球数の計算に、血漿は浸透圧測定と生化学検査に供した。Ht は中途覚醒相の 50.43±1.52 % に対して冬眠相が 58.40±1.62 % と有意に高く、MCV は中途覚醒相の 60.8±9.1 f1 に対し、冬眠相が 56.8±3.7 f1 と有意な変化が無かった。冬眠相では血漿からの水の損失が疑われた。腸管内液量は中途覚醒相の 391.4±231.6 μl に比べ、冬眠相では 1232.9±597.7 μl と約3倍多かった。肉眼上、全ての個体で腹水の貯留は認められなかった。冬眠相の腸管内液の浸透圧および電解質組成は血漿のそれらと極めて類似したものであった。以上の結果は、冬眠すると水が一過性に血漿から腸管内へ移動し、腸管が体液プールとしての役割を担っている可能性を示唆する。

0-13. 心肥大に伴う左心室壁毛細血管網の変化

○小山 富安¹、高明¹

¹元北海道大学電子研

[背景] 大動脈や腎動脈狭窄、或いは何らかの遺伝的失調は、レニン・アンギオテンシン系の活性化を伴って、動脈圧の上昇と心肥大を引き起こす。もし心筋細胞の肥大に見合うだけの血管新生が進行しなければ、酸素と栄養の供給低下を免れない。臨床的にも本態性高血圧の成因と治療に関係するので、現在でも多くの研究が続けられている。Batra らは、5 日令のラットに大動脈起始部狭窄術を施行し、10 週経過後に CDA（毛細血管の責任領域）が、アルカリフォスファターゼ（ALP）の発現している細動脈性毛細血管でのみ拡大したこと、恐らく細静脈側では毛細血管新生が順調に進行するのであると報告した。しかし新生ラットでは適応力が大きいこと、大動脈狭窄では、冠動脈への血流配分が大きいこと、一般に高血圧は成人以降に発症することから、再検討を要すると考えて、再検討を行った。[方法] 6 週令ウイスター・ラットの左腎動脈にゴールドブラットの銀クリップをかけて一側腎動脈狭窄を作った。一部のラットには間隙の大きいクリップをかけて対照群とした。10 週令で血圧を測り、血圧上昇の確認された狭窄群のラットを 2 群に分けた。1 群には煮沸冷却水のみを与えて、実験群とした。2 群にはアンギオテンシン変換酵素の一つであるデラプリルを溶かした煮沸冷却水を与えた。21 週令時に断頭犠牲死させて、

定法により左室心筋壁の凍結横断切片を ALP と DPP4 について染色し、その内皮下層の毛細血管について計数した。[結果]、総毛細血管密度と DPP4 を発現する毛細血管は有意に減少し、ALP を発現する毛細血管は増加するものの、全域に亘って CDA は有意に増大していた。一側腎動脈狭窄では腎動脈への流入血液量の再配分が起こりにくい事と、週令が進むと適応が難しくなるものと思われる。

0-14. マウス視交叉上核リズムに対するタンパク合成阻害剤の影響

○西出 真也¹、本間 さと^{1,2}、山田 淑子²、本間 研一¹

¹北海道大学 大学院医学研究科 生理学講座 時間生理学分野、²北海道大学 大学院医学研究科 時間医学講座

ヒトの多くの生理現象には生体リズムが認められ、その中枢は視床下部視交叉上核 (SCN) に存在する。外界の明暗情報は網膜視床下部路を通じて SCN に送られ、SCN から様々な経路を通り全身の組織へ伝えられる。SCN はそれぞれ自律的に振動するニューロンの集合体であり、その振動メカニズムとして時計遺伝子およびタンパクによるネガティブフィードバックループモデルが提唱されている。本研究では、特定の時間帯のタンパク合成がリズム発振にどのような影響を及ぼすかを検討する目的で、培養マウス SCN 内のタンパク合成を一定期間阻害し、フィードバックループの構成要素である時計遺伝子の挙動を観察した。【方法】時計遺伝子 Bmal1 の発現を生物発光でモニターするトランスジェニックマウスの SCN を培養し、発光レベルの連続測定により遺伝子発現リズムを解析した。培養 5～6 日目に培養液中にタンパク合成阻害剤シクロヘキシミド (CHX) を滴下し、様々な期間経過後、培地全量交換により除去した。また、CHX 投与中および除去後の様々な時計遺伝子の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR 法にて測定した。【結果と考察】生物発光を用いて測定した Bmal1 発現は明瞭な概日リズムを示したが、CHX の投与により発光量は速やかに低下した。培地交換により発光量は一過性に上昇し、その後概日リズムが回復した。培地交換後の一過性発光上昇量、回復したリズムの位相および周期は CHX 投与期間により異なった。発光測定による Bmal1 発現および定量的 RT-PCR による各時計遺伝子発現量の解析結果から、タンパク合成阻害が哺乳類中枢時計に及ぼす影響を考察し、さらにフィードバックループモデルについてより詳細に議論する。

0-15. マウス培養視交叉上核における時計遺伝子 Per1 発現リズムの 1 細胞計測：概日リズムに対する蛋白合成阻害剤の異なる反応性

○小野 大輔¹、本間 さと¹、本間 研一¹

¹北海道大学大学院 医学研究科 時間生理学分野

【序論】哺乳類では、概日時計の中枢が視床下部視交叉上核 (SCN) に存在し、時計遺伝子と呼ばれるいくつかの遺伝子による転写・翻訳を介したフィードバックループが存在している。そのループ 1 回転に約 24 時間を要すると考えられており、内因性リズムの発振源とされている。本研究は、ホタルシフェラーゼ cDNA 上流に時計遺伝子 Per1 プロモーター領域を結合したトランスジェニックマウス (Per1-Luc マウス) を用い、SCN の組織および細胞レベルで Per1 発現リズムを解析すると同時に蛋白合成阻害剤により一時的にフィードバックループを停止させ SCN 内の個々の細胞の反応の違いを検証した。

【方法】Per1-Luc マウスの冠状断脳スライスを作成し、SCN を切り出し、培養用メンブレン上でシフェリン入りの培地にて気水界培養を行った。SCN スライス全体の Per1 発現リズムは、デッシュ型ルミノメーターを用い、SCN の細胞レベルの Per1 発現リズムは CCD カメラを用い測定した。そして、培養 4 日目のピークの 3 時間後に Cycloheximide (CHX) を 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 時間投与し、どのくらいの期間翻訳を阻害するとフィードバックループが停止するかを検証した。

【結果・考察】18 時間以上の CHX 投与群では、CHX 除去後約 28 時間に Per1 発現リズムの最初のピークが見られた。このことは、18 時間以上翻訳を停止させることでフィードバックループが停止することを示唆する。一方、CHX を 6 時間投与した群 (5/6)、12 時間投与群 (1/6) では CHX 除去後 2 峰性の Per1 発現リズムが確認された。二つのピークのうち小さなピーク位相は、CHX 18 時間以上投与群から得られた CHX 除去後最初のピーク位相の回帰直線の延長線上付近に認められた。1 細胞計測の結果この 2 峰性のリズムは、位相の異なる 2 つの細胞群によって形成されていることが証明され、これらの細胞群はそれぞれ異なる位相反応曲線を示した。この結果は SCN 内に 2 つの振動体が存在する事を示唆している。