

日本解剖学会

第67回中国・四国支部学術集会

会 期：平成24年10月20日（土），21日（日）

会 場：山口大学医学部（小串キャンパス）

1 末梢神経損傷後の中枢神経における1次ニューロンの収斂投射の研究

大村晋司^{1,2)}、土屋泰規^{1,2)}、寺山隆司¹⁾、杉本朋貞¹⁾¹⁾岡山大学・院・医歯薬・口腔機能解剖学²⁾朝日医療専門学校岡山校

ラットの末梢感覚受容野に侵害刺激を加えると、その情報の伝達を受けた2次ニューロンにFosタンパク様免疫活性（Fos-LI、以下同様に略す）が誘発される。神経切断後の慢性期に刺激を行うと、切断神経の受容野の周囲からの侵害情報の伝達によるFos-LIの誘発が増強される。本研究では、ラットの一侧の下歯槽神経を切断し、2週間後に同側の舌粘膜に5%ホルマリン100 μ lを注射してFos-LIを誘発するとともに、第2の侵害受容ニューロン活動マーカーとして下歯槽神経の切断端にC-線維を興奮させるに足る強度の電気刺激（5mA, 5ms, 5Hz）を10分間加えることによってERKのリン酸化を誘発した。舌刺激の2時間後、下歯槽神経刺激完了の5分後に灌流固定を行い、三叉神経脊髄路核尾側亜核を含む延髄の50 μ m切片にFosとリン酸化ERK（p-ERK）の免疫2重染色を施した。下歯槽神経を切断した場合、偽手術を行った対象と比較して切断側の尾側亜核内のFos-LI陽性細胞数は約2倍、2重染色陽性細胞数は約3倍に増加し、p-ERK-LI陽性細胞数に変化はみられなかった。この結果は、神経切断によって受容野から隔離された2次ニューロンに対する周囲の非損傷1次ニューロンからの収斂投射が増強されたことを示しており、この現象は神経障害性疼痛の発症に関与するものと推測される。

2 高炭酸ガス負荷によって活性化されるマウス結合腕傍核ニューロンの呼吸関連領域への投射

○横田茂文^{1,2)}、S. Kaur²⁾、V.G. Vanderhorst²⁾、C.B. Saper²⁾、安井幸彦¹⁾、N.L. Chamberlin²⁾¹⁾島根大学医学部解剖学講座神経形態学²⁾ベスイスラエル病院・ハーバード医学校

橋の結合腕傍核は、高炭酸ガス症において呼吸促進反応を引き起こす重要な領域であると考えられているが、その神経機構については不明な点が多い。本研究では、まず、炭酸ガスによって活性化される結合腕傍核ニューロンの分布形態と化学的性質を、c-Fosに対する免疫組織化学と*in situ* hybridization法の併用により解析した。その結果、2時間の10%炭酸ガス負荷によって、結合腕傍核のKölliker-Fuse核（KF）、lateral crescent 亜核（cr）、central lateral 亜核およびexternal lateral 亜核に、コントロールと比較して優位的c-Fos陽性細胞の増加を認めた。また、これらのc-Fos陽性細胞の多くは、小胞性グルタミン酸輸送体2 mRNAに陽性を示した。次に、逆行性軸索輸送を利用した神経路標識法とc-Fosに対する免疫組織化学を併用して、延髄腹側呼吸性ニューロン群（VRG）、横隔神経核（PhN）および舌下神経核（HGN）へ投射する結合腕傍核ニューロンの高炭酸ガス負荷による活性化の解析を試みた。その結果、高炭酸ガス負荷によってVRGへ投射するKFニューロンとcrニューロン、およびHGNとPhNへ投射するKFニューロンにc-Fos発現の増加を認めた。これらの結果から、グルタミン酸作動性結合腕傍核ニューロンは高炭酸ガスによって活性化され、VRGニューロンとPhNニューロンを興奮させることによって呼吸の促進を引き起こすこと、ならびにHGNニューロンを興奮させることによって上気道の開通性を維持することが示唆された。

3 母仔分離ストレスが脳発達期の海馬GluR1発現/リン酸化へ及ぼす影響

太田健一、三木崇範、鈴木辰吾、矢倉富子、劉俊騫、玉井求宜、竹内義喜

香川大学 医学部 形態・機能医学講座 神経機能形態学

脳発達臨界期の母仔分離ストレス曝露は、成熟後の高次脳機能に様々な影響を与える事が報告されているが、その機序は不明である。脳発達臨界期は成熟後と比較して神経/シナプス可塑性が高く、神経回路網形成及び高次機能の獲得に重要な発達期間である。この時期、グルタミン酸受容体であるAMPA受容体のシナプス膜上の発現は大きく変化し、神経回路網形成に寄与していると考えられている。そこで本研究では、母仔分離が脳発達期の神経回路網形成に与える影響として、AMPA受容体の中でも特に変動の大きなGluR1サブユニットを中心とした解析を記憶・学習行動に関与が深い海馬で行った。生後2~20日の間、Sprague-Dawleyラット仔を母獣から個別に隔離し(6時間/日)、母仔分離曝露を行った。曝露期間中あるいはその後の海馬を採取しGluR1蛋白発現量とリン酸化状態を解析した。母仔分離曝露動物では、各日齢でのGluR1発現量に変化は見られなかったが、生後10日においてGluR1のリン酸化が有意に亢進していた。これはGluR1のシナプス膜上への過剰な移行状態を示唆する結果である。更に、成熟後の母仔分離曝露動物では八方向放射状迷路試験の成績が有意に低下しており、学習障害があることが示された。脳発達臨界期における適切なAMPA受容体の発現は、成熟後の学習能に関係すると考えられており、本研究で示されたような母仔分離曝露動物の学習障害は、脳発達臨界期におけるGluR1サブユニットの過剰なリン酸化に一部起因している可能性が考えられる。

4 概日リズム安定性と同調性を制御する新たなリン酸化酵素 SIK3

早坂直人^{1,2)}、徳田功³⁾、竹森洋⁴⁾、篠田晃¹⁾¹⁾山口大大学院医学研究科・機能神経解剖、²⁾JSTさきがけ、³⁾立命館大・理工・機械工学、⁴⁾医薬基盤研・代謝疾患関連タンパク探索

SIK(salt-inducible kinase)はAMPKファミリーに属し、3つのisoformが存在する。我々は、発現に概日振動を示すSIKに注目し、進化的保存性の高いSIK3の機能解析を行った。*Sik3*KOマウスは90%以上が生後すぐ死亡し、残りも骨形成異常、低脂血症、低血糖、胆汁鬱滞などの重篤な病状を呈する。加えて、このマウスは概日リズム異常も示し、代謝や摂食等の概日リズム位相が約6時間後退していた。また、夜行性は保持するが活動リズム位相は安定せず、明期の活動・摂食量の有意な上昇が観察された。恒暗条件下では活動周期に有意な延長を認め、恒暗から明暗条件に移すと、明暗サイクルに同調する活動リズムと自由継続するリズムの乖離も見られた。培養細胞では*Per2-luc*の不安定な周期変動が見られ、SCNスライスでも*Per2-luc*の位相波に異常を認めた。遺伝子発現比較解析から、以上の表現型は、SIKが抑制的に制御するco-repressor (HDAC Class IIa)や転写因子CREBのco-activator (TORC)を介した時計関連遺伝子の転写制御異常に起因することが示唆された。

本研究は、KO個体・細胞におけるリズムの脆弱性および非同調性の発見から、リズム制御の鍵となる新規リン酸化シグナルの存在を示唆するものである。同時に、代謝恒常性の破綻と睡眠・覚醒、摂食リズムの攪乱、SCN神経間相互作用(位相波)の乱れと概日リズム変容、といった知見から、リズム制御の新たな理解に向けた発展性を包含するものといえる。

5 脂肪酸結合タンパク質 (FABP5)は皮脂腺の後期分化調節に関与する

○山野 希, 徳田 信子, 安達 泰弘, 澤田 知夫, 大和田 祐二

(山口大学大学院医学系研究科器官解剖学分野)

皮脂腺から分泌される皮脂は、皮膚の保湿能力だけでなく、汗と乳化して形成する酸外套、遊離脂肪酸が誘導する抗菌物質など、外部からの侵襲に対する防御能力を持っている。遊離脂肪酸は皮脂の主要な成分だが、皮脂腺での脂肪酸代謝の分子メカニズムは未だ明らかにされていない。今回我々は、マウス皮脂腺において、細胞内で脂肪酸輸送とシグナル伝達を制御する表皮型脂肪酸結合タンパク質 (FABP5)の局在と機能を検討した。

免疫組織化学染色において、FABP5は成熟した皮脂腺の核に強く局在し、blimp1陽性の幹細胞や、c-myc陽性の分裂期の細胞には局在が見られなかった。FABP5KOマウスでは、皮脂腺の後期分化マーカーであるCRABP2の陽性細胞率が有意に増加したが、blimp1やc-myc陽性細胞では有意差が見られなかった。スダンⅢ染色において、FABP5KOマウスの皮脂腺の大きさは野生型と比較して約30%減少していた。更に、ガスクロマトグラフィーによる解析でも、FABP5KOマウスでは皮脂中の脂質組成に変化が見られた。これらの結果から、FABP5が皮脂腺の後期分化や皮脂生成過程の脂質代謝を制御していることが示唆された。

6 食道の後ろを通る左鎖骨下動脈を伴う右側大動脈弓の一例

黒田和宏、入江恭平、植崎正博、百田龍輔、小阪美津子、大塚愛二
岡山大・医・人体構成学

2012年度岡山大学医学部医学科系統解剖学実習の解剖体（82歳、男性）で、大動脈弓が左後方ではなく右後方に弯曲し、大動脈弓から分岐する血管系が通常と異なっている破格が認められたので報告する。
本例では、大動脈は、左心室大動脈口より起こり左右冠状動脈を通常通り分枝して上行し、心臓臓転部から上行しつつ右後方に向かってUターンし、脊椎の右前を下行する胸大動脈に移行していた。横隔膜の少し上から徐々に左側に走行し、横隔膜大動脈裂孔以下から通常の位置へ戻っていた。大動脈弓の上行部で左総頸動脈が分岐し、気管と食道の前を上行していた。左鎖骨下動脈は、大動脈弓の頂部後面から分岐し食道の後ろを左に走っていた。右総頸動脈と右鎖骨下動脈は独立して大動脈弓の前面から起こっていた。動脈管索は肺動脈から左鎖骨下動脈へ付いていた。迷走神経からの反回神経が、通常右：大動脈弓、左：右鎖骨下動脈を反回するのに対し、右：動脈管索（肺動脈→左鎖骨下動脈）左：大動脈弓を反回していた。本例は右側に大動脈弓が存在し、ここから左総頸動脈、左鎖骨下動脈、右総頸動脈、最終枝として右鎖骨下動脈の4本が分岐することから中川（1939）の大動脈弓の分岐様式におけるN型に相当し、発生時の動脈弓形成において下行大動脈になる背側大動脈の左右の消退・残存異常と考えられた。

7 多光子レーザー顕微鏡によるLIVEイメージング：アネキシンA4およびA7小胞による細胞膜修復

○松尾巴瑠奈¹、塚本真由¹、濱田 萌¹、三宅克也¹、松田知栄²、川合克久¹、江上洋平¹、林 由起子³、荒木伸一¹
¹香川大学医学部組織細胞生物学、²産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門、³国立精神・神経医療研究センター神経研究所
細胞膜は運動などの生理的物理負荷により常に傷ついている。この膜損傷部から流入するカルシウムイオンによって、細胞内小胞のエクソサイトーシスが瞬時に引き起こされ、この膜供給により損傷膜が修復される。この細胞膜修復に関わるタンパク質として、カルシウム依存性リン脂質結合タンパク質アネキシン（A1, A2, A5）が報告されているが、小胞が融合しながら膜修復をする瞬間をLIVEイメージングで捉えたという報告はない。近年、GaAsPなど、レーザー顕微鏡検出器が高感度に改良され、迅速精細な蛍光動画を得る事が可能となり、細胞内の素早い分子の動きまで解析ができるようになってきた。
本研究は、このGaAsPを搭載した高感度検出器と二光子および一光子を組み合わせた多光子レーザー顕微鏡を使用し、波長の異なるGFPタグを付けたアネキシンA4およびA7を同時に発現させた培養細胞(BS-C-1, C2C12)、ならびに生体内に近い筋線維を用いてLIVEイメージングを行った。その結果、GaAsP搭載型多光子顕微鏡によって、細胞内のアネキシンA4とA7が、カルシウム存在下の条件で、膜損傷部付近の同じ小胞膜上にほぼ同時に現れ、集まり融合しながら膜供給する決定的瞬間を捉える事に成功したのでここに報告する。

8 染色体15q11-13重複モデルマウスの形態学的解析

五林 優子、中井 信裕、福本 景太、渡辺 康仁、内匠 透・広島大学医学部統合バイオ

自閉症は社会的行動障害を生じる脳発達障害であり、その原因は遺伝的要因が大きいとされている。中でもヒト染色体15q11-13重複は自閉症患者の中で最も多く報告されている染色体異常であり、当研究室が作製した自閉症モデルマウス(patDp/+)は、15q11-13領域と相同性の高いマウス染色体7C領域の重複マウスである。patDp/+では、すでに行動異常や脳内セロトニン含量の減少が確認されているが、その脳発達障害の発症メカニズムには様々な要因が関与していると考えられる。
その一つとして、興奮性と抑制性神経の興奮・抑制バランスが脳発達障害に寄与する説がある。自閉症患者の約30%がてんかん発作を併発することやGABA合成酵素および受容体の発現量減少が報告されていることから、抑制性神経活動の異常が、興奮・抑制不均衡を誘発し、自閉症発症に繋がると考えられている。この点に注目し、patDp/+での興奮・抑制性神経の均衡性に異常があるか免疫組織学的手法を用いて調べたところ、内側前頭前野と海馬において興奮・抑制バランスの不均衡が確認された。また、patDp/+でのシナプス形成のターンオーバーが野生型に比べて速いことが確認されている。セロトニンは神経発達における重要な調節因子であるから、セロトニンの減少がスパインターンオーバーに影響した可能性がある。今後はセロトニン量を薬理学的に調節したマウスを解析することで、patDp/+における脳発達障害の発症メカニズムとして、セロトニンとシナプスターンオーバーの関与を調べていく予定である。

9 肩関節機能模型の製作

○高林加織¹、山本早紀¹、高木由真¹、木坂健志¹、下江幸司²、里田隆博²
¹広島大・歯・口腔保健学科・4年生
²広島大院・医歯薬保健・口腔健康科学講座

肩の動きは非常に複雑で、主に肩関節（肩甲上腕関節）および胸鎖関節の動きからなる。肩関節は可動域の大きい球関節であるが、この関節は大きな上腕骨頭と浅い関節窩よりなり、関節包は非常に緩い。この肩関節の周りには、棘上筋、棘下筋、肩甲下筋、小円筋の腱は回旋筋腱板（ローテーターカフ）を作っている。さらにこの関節の周りには、大円筋、三角筋、大胸筋、小胸筋、肩甲挙筋、僧帽筋、大小菱形筋、前鋸筋、広背筋などもある。今回、肩の動きおよびこれらの筋の機能の説明のために模型を作製した。本模型では、台となる板の上に脊柱となる支柱を立て、この支柱の周りに胸郭を作製して、上肢を付け加えた。上腕骨、橈骨、尺骨は木材を削り出すことにより作製した。肩甲骨は、あらかじめ針金にて大まかな外形を作り、白色のトレーゼンをつけることにより作製した。胸郭は、胸骨および脊柱を木材で、肋骨を針金で作製した。胸鎖関節は硬いパネを用いた。鎖骨は金属板をまげてその周りをレジンで固めた。肩甲上腕関節は、脱臼を表現するため、関節窩に磁石を埋め込み、関節頭は半球状の金属製のコーヒーマジャーカップを用い、はずれることができるようにした。この模型により、肩の動きをわかりやすく説明することできた。

10 オカダ酸によるMG63細胞のアポトーシス誘導とその機構

平島寛司、羽地達次
徳島大学大学院H B S 研究部・口腔組織学分野

【目的】我々は蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤の阻害剤であるオカダ酸がMG63細胞にアポトーシスを誘導するかどうかを調べ、オカダ酸誘導アポトーシスの機構をFas, Caspase, NF- κ Bに焦点をあて検討した。【材料と方法】実験にはヒト骨肉腫由来MG63細胞を用いた。MG63の細胞死は位相差顕微鏡による形態観察とミトコンドリアの活性をWST-8で定量的に測定して判定した。Caspase-3とCaspase-8の阻害剤には、z-DEVD-fmkとz-IETD-fmkをNF- κ Bの阻害剤にはPDTCを用いた。Caspase-3の活性は市販のアッセイキットを用いて測定した。細胞からDNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動を行い、DNAラダー形成を調べ、アポトーシスの検出を行った。mRNAの発現にはRT-PCR法を、蛋白質の検出にはWestern blot法を用いた。【結果と考察】オカダ酸はMG63に細胞死を誘導した。オカダ酸による細胞死は核の断片化とDNAラダー形成を伴う典型的なアポトーシスであった。この細胞死はCaspase-3とCaspase-8およびNF- κ Bの阻害剤を添加することにより部分的に回復した。オカダ酸はFasとFasLおよびCaspase-3のmRNAと蛋白質の発現を促進した。また、オカダ酸はI κ Bの発現、リン酸化、及び分解を促進し、さらにNF- κ Bのリン酸化を促進した。以上の結果よりオカダ酸はI κ B・NF- κ B・Fas/FasL・Caspase系を介してMG63細胞にアポトーシスを誘導すると考えられる。

11 新世界ザル副腎の組織学

尾崎 早百合、高島 大樹、杉 晋司、檜山 雅人、日下部 健、服部 正策¹、倉石 武¹、吉澤 緑²、甲斐 知恵子¹、木曾 康郎
山口大学、¹東京大学、²宇都宮大学

【目的】新世界ザルで唯一夜行性であるヨザル *Aotus lemurinus* はマラリアに感受性を持つため有用な実験動物用霊長類として期待されている。本研究では、ヨザルの内分泌系の特性に関する情報収集のため、副腎の形態学的特徴と血中コルチゾール濃度について検討した。【方法】副腎の形態学的調査と血中コルチゾール濃度の検査にはそれぞれヨザル5例と7例を用い、同じ新世界ザルであるリスザル3例と比較した。【結果】組織学的に副腎横断面を観察したところ、リスザルの副腎髄質はほぼ中央に位置しているのに対し、ヨザルの髄質は偏在していた。ヨザルの1例では異所性の副腎束状帯が見られ、他の2例では陥入による特徴的な皮質構造が見られた。副腎横断面で皮質が占める面積の割合はヨザルで約80%、リスザルで約70%であった。皮質における球状帯、束状帯、球状帯の割合はヨザルで約1:9:5、リスザルで約1:3:3であった。ヨザルの血中コルチゾール濃度の平均は57.2 $\pm$ 22.0 μ g/dlで、リスザルは129 $\pm$ 16.3 μ g/dlであった。【考察】ヨザル副腎は皮質の割合、特に束状帯の割合が大きく、半数以上で特徴的な皮質構造がみられた。また、ヨザルとリスザルの両方でヒトと比較して高い血中コルチゾール濃度が計測されたが、これは新世界霊長類にみられるグルココルチコイド抵抗性によるものであると考えられる。

12 新世界ザル雌性生殖器官の比較組織学

高島 大樹¹，日下部 健¹，加納 聖¹，服部 正策²，倉石 武²，
吉澤 緑³，甲斐 知恵子²，木曾 康郎¹

¹山口大学，²東京大学，³宇都宮大

新世界ザルはマラリアの感受性動物で，その中でも唯一夜行性であるヨザルは三日熱マラリア，同じオマキザル科に属するリスザルは熱帯熱マラリアに感受性を持つことから，有用な小型霊長類の実験動物として期待されているが，生物資源保存技術の確立にも必要となる解剖生理学的情報に乏しい。基礎的情報を収集するため，子宮，卵管，胎盤の形態学観察を行った。両者の子宮は典型的な単一子宮で，その腹側と背側に子宮内膜固有層の盛り上がった胎盤形成予定領域（胎盤床）が見られ，子宮腺はその領域を避けて，存在する傾向にあり，特にリスザルで顕著であった。子宮管腔上皮の先端側，腺上皮の腺腔側，卵管上皮において特徴的な 21 種類のレクチン結合パターンが認められ，Muc-1 抗体にも反応した。胎盤における絨毛の展開はヒト（絨毛性）とげっ歯類（迷路性）の中間型である柱状を呈した。子宮管腔上皮細胞は，ヨザルでは細胞質内に空胞が多く，核が深く切れ込んだ単層円柱上皮細胞で構成されていたが，リスザルでは空胞は少なく，切れ込みも小さく円形の核を持つ重層化した上皮細胞として観察された。子宮腺上皮はヨザルでは背の高い細長い腺細胞で構成されるのに対し，リスザルではやや円形の腺細胞が重層化して構成されていた。またヨザルの子宮腺腔内に少数の線毛が認められた。卵管膨大部の上皮は，どちらも線毛細胞と分泌細胞からなる単層円柱上皮であったが，ヨザル卵管では線毛はその長さも不均一で，分布も疎らであり，線毛細胞の核上部には空胞が見られたが，リスザル卵管では分泌細胞間に均一な長さの線毛を持った線毛細胞が分布していた。

13 就実大学薬学部生 4 名の解剖実習

○洲崎悦子¹，尾崎高寿¹，小田洋平¹，青井功恭¹，宗友真里¹，隅田 寛²，青山裕彦³
¹就実大学薬学部人体構成学，²広島国際大学保健医療学部診療放射線学科，³広島大学
医歯薬保健学研究科解剖学および発生生物学

昨年度に引き続き、就実大学薬学部 5 年生 4 名が、広島大学医学部で 3 日間の解剖実習を行った。薬学領域で特に認識をしておいてほしい自律神経系と腹部血管系を 2 体の御献体を用いて各々剖出し、実体を理解することを試みた。

自律神経系の剖出については、頸部で迷走神経を見つけ、胸部、腹部へと辿ることで、反回神経、食道神経叢、心臓枝、腹腔神経叢・神経節を剖出し、また、交感神経幹や星状神経節、大内臓神経が腹腔神経節へ至ることも確認した。腹部においては、肝臓や消化管を摘出した後に、腹大動脈や腎臓、副腎を剖出して観察した。

腹部血管系については、下腸間膜動脈、上腸間膜動脈、腹腔動脈及び静脈系について分岐を辿りながら確認していったが、今回の御献体では、教科書通りの血管走行であった。

学生達は諸先生方の指導を受けて、学びの多い解剖実習となった。また、2 体の御献体を使わせてもらったことにより、構造の見えやすさや解剖の進み具合も随分違うことを実感していた。解剖実習前後での実習に対する思いや考え方の違い、薬学領域での解剖実習の必要性についてどのように考えるか等、学生の感想についても併せて報告する。

14 厚生労働省「実践的な手術手技向上研修事業」の実施について

松田正司、下川哲哉、鍋加浩明、土居原 拓也、脇坂浩之、小林直人・愛媛大学医学部 解剖学・発生学

平成 20 年、21 年、22 年の厚生労働科学研究班による「サージカルトレーニングのあり方に関する研究」に引き続き、平成 24 年度に日本外科学会・日本解剖学会の「臨床医学の教育及び研究における死体解剖のガイドライン」が発表され、御遺体による手術手技研修への道が開かれた。さらに、厚生労働省は本年「実践的な手術手技向上研修を実施することとし、研修事業を実施する団体を選定するため実施団体を公募」した。中四国からの採択は 1 校のみとされていたが、中四国の地理的な不便性を考慮して頂き、中国地方では岡山大学、四国では愛媛大学が申請し内定を受けた。愛媛大学では現在外科系講座を中心に 10 講座が参加し、21 回 32 日、参加延べ人数 870 人となっている。しかし、本事業を実施するにあたっては多くの問題がある。愛媛大学ではコメディカル解剖を 10 年以上行ってきたが、そのために、医学生以外による解剖については 15 年前から白菊会総会や地区懇談会で説明し御理解を得てきた。同時に医師による臨床解剖に関しても御理解、ご協力を得ながら行ってきた。しかし、なお、今回の「御遺体による手術手技研修」の本格実施に際しての問題点は少なくはない。本発表では、倫理面、技術面、経済面等に分けて問題点を提示したい。

15 頸部体節と表皮外胚葉間の相互作用遮断による体節細胞の挙動

桂 由香理，青山 裕彦
広島大学大学院医歯薬保健学研究所 解剖学及び発生生物学研究室

哺乳類や鳥類の肋骨は胸部にのみ存在している。これは、もとは頸部から腰部の全体に存在していた肋骨が、進化の過程で胸部に限局したと考えられている。現生の哺乳類や鳥類の頸椎、腰/仙椎にも肋骨に相同な突起が存在するのである。ニワトリの肋骨は発生的に 2 つの区画に分けられる。脊索や底板に依存して発生する、小さな近位肋骨と、表皮外胚葉に依存して発生する、肋骨体の大部分を占める遠位肋骨である。肋骨の起源となる胸部体節と表皮外胚葉の間に非透過性のフィルムを挿入すると遠位肋骨が形成されない (Aoyama ら, 2005)。その際の体節細胞の挙動を組織学的に追跡した結果、体節はその外側部を欠いた短い皮筋板を形成し、以後、体壁葉内へ移動することなく、椎骨と近位肋骨のみを形成した。本研究では同様の実験を頸部でも行い、胸部との違いを検討した。頸部体節と表皮外胚葉との相互作用を遮断した場合でも短い皮筋板が観察されたが、椎骨と横突起の形態に異常は認められなかった。このことから、頸部・胸部体節は共に表皮外胚葉に依存して発生する皮筋板外側部をもつが、それが胸部では外側に移動して遠位肋骨形成に向かい、一方、頸部のものは移動しないと考えられる。今後、この違いが、皮筋板外側部の細胞に、部域特異的な運動能の違いによるものか、あるいは細胞増殖の差による組織の成長のちがいによるものか、など部域による細胞動態の違いを明らかにしていく。

16 Effects of the titanium inducing calcification and the Rhyolite ceramics radiating the far infrared ray (FIR) energy on the bone forming ability

○Dolgorsuren Aldartsogt, Kikuji Yamashita, Shine-Od Dalkhsuren, Kaori Sumida, Shinichiro Seki and Seichiro Kitamura
Department of Oral & Maxillofacial anatomy, Graduate School of Dentistry, University of Tokushima

[Objective] We aimed to make clear how the Rhyolite ceramics radiating FIR energy affected the new bone formation. [Materials and methods] MC3T3-E1 cells were cultured in the FIR CO₂ incubator with the Rhyolite ceramics radiating the FIR energy at wavelengths between 4 and 20 μm (maximum at 7-12 μm). Control group were maintained in the normal incubator. The proliferation and the gene expression were analyzed using the cell counts, the RT-PCR and the micro array analysis. Still more the titanium and Rhyolite compound were implanted under the periosteal of a rat skull by injection method. The samples were observed by the light microscope. [Results and discussion] It was made clear that the FIR energy radiation by the Rhyolite ceramics activated the new bone formation of the osteoblast-like MC3T3-E1 cells, by the results that the formation of calcified nodules and the gene expression of osteocalcin were promoted. Still more, the extensive bone formation induced by the FIR ceramic 75% with 25% titanium powder was strongly promoted by the FIR radiation. [Conclusion] The FIR energy radiation by the Rhyolite ceramics promoted the bone-forming activity of osteoblasts.

17 Involvement of Jmjd3 in osteoblast differentiation

Di Yang, Hirohiko Okamura, Yoshiki Nakashima, Tatsuji Haneji
Department of Histology and Oral Histology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School

Jmjd3 is involved in the histone demethylation of histone H3 lysine 27, which is a crucial point for gene expression in eukaryotic cells. However, the role of Jmjd3 on osteoblast differentiation remains unclear. In this study, we investigated the expression and localization of Jmjd3 during osteoblast differentiation. BMP-2 induced Jmjd3 expression in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells, as determined by real-time PCR, RT-PCR, and Western analysis. The increase in Jmjd3 expression was in parallel with the expressions of bone-related genes including Osterix, Runx2, Type I Collagen, and Osteopontin. Immunocytochemical study revealed that Jmjd3 was translocated from cytoplasm into nucleus during osteoblast differentiation. To further clarify the role of Jmjd3 on osteoblast differentiation, siRNA for Jmjd3 was transferred to MC3T3-E1 cells. Silencing of Jmjd3 expression reduced the expressions of bone-related genes and ALP activity in MC3T3-E1 cells. Our present results indicate that Jmjd3 plays an important role in osteoblast differentiation and the expressions of bone-related genes.

18 長管骨軟骨内骨化における RGD 配列を介したシグナルの関与の子宮外発生法を用いた解析

○井上 隆之, 橋本 龍樹, 松本 暁洋, Esrat Jahan, 大谷 浩
島根大学医学部解剖学講座発生生物学

長管骨の軟骨原基を構成する軟骨細胞は、軟骨内骨化の過程で増殖、分化、肥大化後細胞死し、破骨細胞に食食された後、骨芽細胞により骨が形成される。したがって軟骨細胞の増殖および分化過程の部位および時期特異的決定の調節は、正常な骨組織発生に必須である。本研究では、マウス子宮外発生法を用いて、長管骨軟骨内骨化に RGD 配列を介した細胞外マトリクスから細胞内へのシグナルがどのように関与するかを解析することを目的とした。胎生 15.5 日マウス胎児上肢に細胞外マトリクス接着抑制因子として Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) ペプチドを投与し (投与群), 24 時間後採材し、その影響を解析した。同濃度・量の対照ペプチドを投与した群と未処置群を対照群とした。細胞増殖について 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を母獣に投与して胎児細胞への取り込みを免疫染色にて調べた。その結果、対照群に比べて、投与群の投与肢は有意に短縮し、骨・軟骨染色により骨組織への置換の減少が認められた。投与群の上腕骨骨端軟骨において、BrdU 陽性細胞数が有意に減少していた。さらに肥大軟骨細胞マーカーである collagen X タンパク発現の減少が免疫染色およびウェスタンブロッティング法によって認められた。以上の結果から、RGDS 配列を介した細胞外-細胞内情報伝達経路が軟骨内骨化における軟骨細胞の増殖および分化調節に関与していることが示唆された。

19 マウス 4 倍体胚の着床後における発生について

加納 聖^{1,2}・久木友花³・藤井 渉³・内藤邦彦³・日下部 健²・木曾康郎²
1 山口大学共同獣医学部獣医学発生学分野
2 山口大学共同獣医学部獣医学解剖学研究室
3 東京大学大学院農学生命科学研究科応用遺伝学研究室

生物のゲノムを構成する染色体のセットが倍数化し、染色体数が 2 セット以上に変化した個体を多倍体という。生物は進化や種分化の手段として、この倍数化を有効に活用してきた。現存する多くの生物種で多倍体が確認されている一方、哺乳類での多倍体個体は生存している例がほとんどない。マウスにおいても、これまでの研究から 4 倍体胚が胎性致死であることは明らかとなっているが、その原因を 4 倍体胚が致死となる妊娠初期の胚を分子レベルで解析した報告はなく、4 倍体胚の致死原因は全く明らかとなっていない。そこで本研究では、マウス 4 倍体胚の発生過程を、4 倍体胚が致死となる着床後を中心に解析し、4 倍体胚に現れる最初の変化を調べることで、哺乳類 4 倍体胚の致死原因の解明を目指すこととした。なお、本研究では着床後にわたり均一に 4 倍体細胞を持った胚を作出できる最も確実な手法である電気融合法を用いて作出したマウス 4 倍体胚を解析の対象とした。まず、着床後 4 倍体胚の発生過程における形態を組織化学的に解析したところ、観察した 8.5 d.p.c. における全ての 4 倍体胚胎子において胚葉形成不全が認められた。そこで 7.5 d.p.c. において、胚葉マーカーの発現量を解析したところ、4 倍体胚における一部胚葉マーカーならびにその上流因子の発現量が 2 倍体胚の発現量と比較して顕著に低下しており、これらの胚葉形成に関わる因子の発現低下が 4 倍体胚形成不全の主な原因である可能性が示唆された。今回マウスを用いた実験において、ゲノムが倍数化することによって初期胚における特定因子の発現変化が個体発生に対して致死的に作用している可能性が示唆されたが、なぜ哺乳類においてのみ倍数体個体が生存できないかについて同時に考察したい。

20 マウス胎盤内 p53 の発現と動態

檜山 雅人・日下部 健・加納 聖・木曾 康郎 (山口大学大学院連合獣医学研究科)

癌抑制遺伝子の一つとして知られる p53 は癌抑制機能だけでなく、様々な生理活性に関与している。妊娠中での胎盤内でも発現が認められ、妊娠過程において重要な役割を持つことが予想される。妊娠過程における p53 の発現部位、発現量の変化を追い、その動態を解明することにより正常妊娠過程における p53 の役割を明らかにすることが本研究の目的である。妊娠 ICR マウスから、産栓確認日を D1 として、D10, D12, D14, D16, D19 の胎盤を採材した。パラフィン包埋後、p53 免疫染色、TUNEL 染色を施した。また、ウェスタンブロッティング法により、蛋白質総発現量を調べた。各胎盤から mRNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR 法を用いて p53 関連遺伝子の mRNA 量を測定した。p53 免疫染色で特に顕著であったのは栄養膜合胞体層、栄養膜巨細胞層での細胞質内発現である。これらはどのステージの胎盤でも同様に見られた。脱着膜細胞での核内発現も各ステージで見られたが、D19 で特に強く発現していた。TUNEL 法では、免疫染色のような部位特異的な局在性は観察されなかったため、p53 はアポトーシス以外の機構で働いているものと推察された。WB の結果より、妊娠が進行するにつれて p53 の発現量が増加していることが分かった。p53 の細胞質内発現はオートファジーに関わるという報告があること、および p53 関連遺伝子の mRNA 量の変化から、胎盤での p53 はオートファジーに関与していることが疑われた。

21 Protein phosphatase 2A は骨肉腫細胞の形態および増殖能を制御する。

岡村裕彦, Di Yang, 羽地達次
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・口腔組織学分野

Protein phosphatase 2A (PP2A) は、発生・分化および細胞内の様々なシグナル伝達系を制御する蛋白質酪リン酸化酵素である。PP2A は触媒サブユニット (PP2A Cα) を中心に三量体を形成し、様々な蛋白質の脱リン酸化に関与する。今回、高転移能・高遊走能をもつマウス由来骨肉腫細胞 (LM8) を用いて骨肉腫細胞の形態や機能における PP2A の役割について調べた。LM8 細胞では初代培養骨芽細胞に比べ、PP2A Cα 発現が増加し、PP2A 活性が亢進していた。LM8 細胞を PP2A 阻害剤 (オカダ酸) で処理すると濃度依存的に細胞活性が低下し、遊走能が抑制された。shRNA 法を用いて PP2A Cα 発現を特異的に抑制し、さらに恒常的にルシフェラーゼを発現する LM8 細胞 (LM8-Luc shPP2A) を樹立した。アクチン染色の結果、LM8-Luc shPP2A ではコントロールの細胞 (LM8-Luc shCont) に比べて、葉状・糸状仮足とみられる細胞突起形成の抑制と遊走能の低下が認められた。樹立した細胞をマウス背部皮下に移植したのち、ルシフェラーゼ基質を腹腔内投与し、発光を指標にインビボイメージング解析を行った。LM8-Luc shPP2A 移植群では、LM8-Luc shCont 移植群に比べ、腫瘍増殖能の著しい低下が認められた。以上の結果、PP2A Cα は骨肉腫細胞の形態および増殖能を制御する重要な因子である考えられる。

22 GaAsP 搭載型多光子レーザー顕微鏡による LIVE イメージング：イカ神経線維の細胞膜修復

○三宅克也¹, H. M. Fishman², H. C. Pant³, J. Zimmerberg³, 荒木伸一¹

¹香川大学医学部組織細胞生物学,
²米国テキサス大学医学部,
³米国国立衛生研究所

20 世紀初頭、ウニ卵を用いて、海水中のカルシウム (細胞外) が素早い細胞膜の修復に必要であるという現象が報告された。しかしながら、近年培養細胞などを用いてこの現象が再発見されるまで、この細胞膜修復現象は長い間忘れ去られていた。また、この細胞膜損傷修復は我々の体の中において生理的条件下で常におこっている現象であることも証明され、シナプスに見られる神経伝達物質放出機構と似た小胞輸送によって修復されることが考えられている。この膜修復は、上皮細胞、線維芽細胞、および筋細胞などについて多く報告されているが、神経細胞の膜修復については詳しい機構はわかっていない。本研究は、生きたイカ (Loligo pealei, Todarodes pacificus) を使い、多光子レーザー顕微鏡によって神経線維の膜修復をリアルタイムで観察した。膜修復マーカーとして、FM 試薬、カルセイン-AM, Rhodamin-dextran およびカルシウムインジケータ色素を用いた。その結果、一般の細胞は細胞外カルシウムが膜損傷部から細胞内に侵入することにより、細胞膜修復装置のスイッチが入り、小胞融合による膜修復が行われるの に比べ、イカ巨大神経内では、細胞外カルシウムをスイッチとしない非常にゆっくりとした小胞融合が観察された。一方、細いイカ神経線維内では、小胞が素早く膜損傷部に融合する様子を LIVE イメージングで捉えることができた。

23 タマネギ根端細胞におけるゴルジ装置の分裂過程の解析：走査電顕によるステレオ観察法の応用

名黒知徳、中根裕信、稲賀すみれ、亀家俊夫、海藤俊行
鳥取大学医学部 解剖学講座 形態医学分野

【目的】植物の根端細胞は細胞分裂が盛んなため、細胞質分裂の機序を解析する上で最適な研究対象の一つである。本研究では、細胞質分裂におけるゴルジ装置の分裂機構を明らかにするために、オスミウム浸軟処理を施した分裂期のタマネギ根端細胞を走査電顕で観察し、ステレオ画像で解析を行った。【材料および方法】タマネギ (*Allium cepa*) の根端約 3 mm を 1% グルタルアルデヒドと 1% 四酸化オスミウムの混合固定液 (0.1 M ショ糖を含む 1/15 M リン酸緩衝液 pH 7.2) で浸漬固定した。試料は、DMSO 凍結割断後、0.1% 四酸化オスミウム水溶液による浸軟処理 (1-2 日) を施し、1% タンニン酸と 1% 四酸化オスミウムによる導電染色、エタノール脱水、臨界点乾燥の後に、オスミウムを 1 nm 蒸着した (HCP-1S, 真空デバイス)。走査電顕観察 (日立 S-4500) は加速電圧 15 kV で行い、ステレオ撮影は試料傾斜角 ±6° に設定した。【結果と考察】根端の分裂細胞中には様々なゴルジ装置の分裂像が観察された。特に、ゴルジ装置の分裂過程で最もダイナミックであるゴルジ層板の部分的分離像を走査電顕で観察することに成功した。また、観察した様々なゴルジ装置の分裂像について、ステレオ写真の立体情報と従来の透過電顕像との比較を行い、ゴルジ装置の分裂の経時的進行過程を推測した。

24 Distinct species differences in androgen receptor expression in the preoptic and anterior hypothalamic areas of the adult rats and mice

Mir Rubayet Jahan, Keiji Kokubu, Ryutaro Fujinaga, Md. Nabiul Islam, Akie Yanai, Chikahisa Matsuo and Koh Shinoda.
Division of Neuroanatomy, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

Species difference has been suggested on androgen-induced functions of the preoptic and anterior hypothalamic areas (PO/AH). Using paraformaldehyde-fixed completely serial frozen sections, expression of androgen receptor (AR) was immunohistochemically compared in the PO/AH between adult male rats (Wistar, SD) and mice (C57BL/6, DBA/2j, Balb/c). In general, AR expression was stronger in mice than rats, particularly in the medial preoptic area (MPO), posterodorsal preoptic nucleus, dorsal PO/AH junction (DPAJ) and suprachiasmatic nucleus (SCN). Exceptionally, more AR-immunoreactive (AR-ir) cells were seen in the sexually dimorphic nucleus (SDN) of the MPO and periventricular zone of the AH in rats. Most strikingly, we discovered three new species-specific AR-ir cells cluster in the anterior hypothalamic region, which have never been reported. Among the newly discovered clusters, two are the rat-specific small AR-ir cells clusters and we named these two cluster as the “rostral nebular island (RNI)” and “caudal nebular island (CNI)” in the AH. The other one is a distinct mouse-specific AR-ir neuronal cluster in the AH that we termed as the “tear drop nucleus” (TDN) in the mice of both sexes. The TDN is also identified just dorsal to the SCN in Nissl staining like its dorsal extension, and the AR-ir cells in both nuclei are localized at the same rostrocaudal levels. The AR-ir cell cluster in the TDN, however, resembles those of the rat SDN or mouse putative SDN in terms of presence of the prominent calbindin-ir cells rather than the SCN where calbindin-ir cells are scarcely seen. The present data might explain distinct androgen-induced psychotic, behavioral and endocrinergic responses between the two rodents, warning that data cannot directly be applied each other.

25 ウサギ胎盤で見られた特徴的な血管構造

日下部 健、林 一彦、國吉信恵、加納 聖、木曾康郎
山口大学大学院連合獣医学研究科

ウサギは霊長類と同様の盤状・血絨毛胎盤を形成し、絨毛間腔はげっ歯類と同様の迷路状構造を呈する。ウサギ胎盤の固有の特徴としては、双胎盤性であり、母体動脈系に拡張した大型の動脈洞を有する。本研究では、ウサギ胎盤における血管構造について検討し、母子間の血液循環の特性について考察を行った。

非妊娠および妊娠 8~28 日の日本白色種から胎盤を採取し、ホルマリン固定から定法に従い光学顕微鏡標本を作成した。また、子宮動脈あるいは臍動・静脈からラテックス、またはメルコックス樹脂を注入して透明標本と血管鋳型標本を作成した。血管鋳型標本の超微形態は走査型電子顕微鏡で観察した。

ウサギ胎盤は子宮動脈に由来するラセン動脈が脱着膜に入り、母子境界部で最大直径約 3 mm の動脈洞を形成した。動脈洞からは 2~3 本の放射状動脈が伸長し、尿膜まで到達すると反転して分岐し、絨毛間腔となって迷路部全体に広がった。この経路は妊娠 13 日で基本構造が作られ、18 日にはほぼ完成していた。胎子側の臍動脈は、尿膜面から胎盤内に入ると直線的に進み、母子境界部付近で U ターンし、迷路部領域で房状の毛細血管網を形成した。毛細血管は部分的に環状に吻合し、絨毛間腔の周りを取り囲んだ。尿膜付近になると房状毛細血管網は収束して胎盤を出て、各双胎盤から出た血管は 1 本の細静脈にまとまった。

ウサギ胎盤の血液ガス交換様式は、提唱されている対向流型に加え、微小血管構造の特徴から交差流型の要素も備わっていることが考えられた。

26 Allogenic 交配の胎盤内における補体第二経路活性

武下愛¹、鳥海早紀²、吉田優司²、近藤友宏¹、加納聖²、木曾康郎²、岡田利也¹、日下部健²

¹大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科、²山口大学 共同獣医学部

CBA/J×DBA/2 マウスは、MHCクラスII抗原の違いにより自然流産を発症する (CBA/J; H-2^k, DBA/2; H-2^d)。胎盤内には補体C3 の沈着が認められ、らせん動脈再構築不全による高血圧や糸球体腎症を示す。しかし、補体の活性化経路については不明である。本研究では、CBA/J×DBA/2 マウスの胎盤内における補体沈着と第二経路活性の関連性について検討した。

CBA/J雌マウスをDBA/2 雄マウスと交配させ、妊娠 14.5 日目に子宮を採取し、吸収胎子または正常胎子を含む着床部位をそれぞれ流産部位、正常部位とし、流産率を算出した。また免疫染色およびwestern blottingによりC3 と補体第二経路活性化因子adipsinの発現変化を検討した。またBALB/c 雄マウス(H-2^b)と交配させたCBA/J雌マウスをコントロールとして用いた。

流産率は CBA/J×DBA/2 マウスが 23%、コントロール群が 12%となり、有意な上昇が見られた。CBA/J×DBA/2 マウスの正常胎盤では、間膜腺や迷路部栄養膜合体層、母体血漿で C3 および adipsin の陽性反応が認められた。コントロール群の正常部位でも同様の発現分布が見られたが、タンパク発現量は CBA/J×DBA/2 マウスの方が有意に高く、allogenic 交配では補体第二経路活性化により流産が引き起こされる可能性が示唆された。

27 骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞分化誘導に伴う石灰化機構の解析 -細胞死と活性酸素を中心として-

藤田洋史¹、佐々木順造²、大内淑代¹

¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞組織学、²新見公立大学

骨髄間葉系幹細胞から分化する骨芽細胞や軟骨細胞は、骨形成において重要なプロセスである石灰化を、調節することが明らかである。これまでに私たちは、骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞分化誘導において、細胞死が先行して誘導され、これが石灰化に関与することを示した。近年、軟骨内骨化における肥大軟骨細胞の分化と石灰化に、活性酸素が関与することが報告された。しかし、骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞分化誘導に伴う石灰化において、活性酸素が関与するかどうかは十分に明らかではない。本研究では、*in vitro* においてヒト骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞分化誘導を行い、活性酸素が誘導されるか、そして石灰化におけるこれらの重要性について解析した。ヒト骨髄間葉系幹細胞株 hMSC12 細胞を骨芽細胞分化培地で培養し、細胞死及び石灰化を誘導した。細胞遊走アッセイの培養プレートを応用して、死細胞をインサートに添加し、生細胞をウェル底で培養すると、主にインサートにおいて石灰化を誘導した。また、骨芽細胞分化誘導により、活性酸素蛍光プローブ hydroethidine の蛍光増加が認められ、細胞内活性酸素の生成が確認された。このとき誘導される細胞死は、スーパーオキシドスカベンジャー Tiron により抑制された。また、石灰化についても、Tiron および抗酸化物質 N-acetylcysteine により阻害された。さらに、光線力学的細胞障害によって局所的に活性酸素による細胞死を誘導すると、障害部位で石灰化が促進された。以上の結果は、骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞分化誘導に伴う細胞死に活性酸素が関与し、この死細胞が石灰化の核として働くことを示唆した。