

日本解剖学会

第73回中部支部学術集会

会 期：平成25年10月5日（土）、6日（日）
会 場：山梨大学甲府キャンパス

101 神経軸索ガイダンス因子 FLRT2 による視床大脳皮質経路の形成制御

山岸寛¹⁾、Ruediger Klein²⁾、佐藤康二³⁾

1) 浜松医大・解剖・神経機能、2) Max-Planck Institute, Munich, Germany

マウスに視床皮質路及び皮質視床路は胎生 12 日目頃から形成され始め、線条体でコリドー細胞がブリッジを形成する事により、それぞれの投射先である大脳皮質および視床へと到達する。視床からの軸索はコリドー領域で皮質からの軸索と交叉し、この領域を抜けて大脳皮質へと向かう。しかし、何故これらの軸索が誘引性ガイダンス因子 Netrin-1 に応答して線条体外側や内側へと曲がって行かないのか、反発因子の存在が提唱されているが、未だ明らかとなっていない。一方、我々が近年見出した反発性軸索誘導因子 FLRT2 は線条体において強く発現していることから、FLRT2 が未同定の反発因子である可能性について検証した。

FLRT2 は胎生中期の線条体領域にてグラジエントを形成して強く発現しているが、興味深い事に視床軸索が通過するコリドー領域では顕著に発現が低くなっていた。また、視床から培養した神経細胞は、FLRT2 に対して強い反発作用を示す事が明らかとなった。さらに、Dii を用いて視床大脳皮質路の可視化したところ、胎生15日齢 FLRT2 ノックアウトマウスにおいてミスプロジェクションが観察された。以上の結果から、FLRT2 は視床皮質路の形成において、反発性ガイダンス因子として機能している事を示唆している。

102 DNA メチル化酵素阻害剤投与による TGF β 3 ノックアウトマウスの口蓋裂軽症化に関する研究○ 滝川俊也、高木秀太、今井田千恵
朝日大学歯学部・口腔構造機能発育学講座・口腔解剖学分野

【目的】DNA メチル化酵素阻害剤の投与が口蓋裂発症モデルマウスである C57BL/6J 系統 TGF β 3 ノックアウト(KO)マウス胎児の口蓋突起内側縁上皮細胞(MEE 細胞)の上皮-間葉分化転換能力と口蓋裂表現型に及ぼす影響を調査した。

【方法】DNA メチル化酵素阻害剤(RG108)が C57BL/6J 系統 TGF β 3 KO マウスの MEE 細胞に与える影響を口蓋突起器官培養法により解析した。さらに、TGF β 3 KO マウスのヘテロ接合型の雌雄をそれぞれ交配し、妊娠 13-15 日目の母獣に RG108 (5 mg/kg/day) を 3 日間腹腔内投与して、DNA メチル化酵素阻害剤の投与が子宮内で発育するホモ接合型胎児の口蓋裂表現型に与える影響を調べた。

【結果】単一口蓋突起回転遊離培養法を用いた *in vitro* 解析により、DNA メチル化酵素阻害剤を培地に添加(5 μ M)すると、対照群では口蓋の癒合が起こらない C57BL6J 系統 TGF β 3KO マウスのホモ接合型胎児で MEE 細胞の上皮-間葉分化転換が促進されて部分的な口蓋突起の癒合が認められた (n=28/30; 奏効率 93.3 %)。さらに妊娠母獣に RG108 を腹腔内投与した場合、対照群では決してみられない不完全口蓋裂を呈するホモ接合型胎児が認められた (n=20/126; 奏効率 15.9 %)。

【結論】TGF β 3 KO マウスの口蓋裂表現型は TGF β 3 遺伝子の欠損だけで決まるのではなく、遺伝学的背景にある DNA メチル化状態との複合作用で決まる事が強く示唆された。また、DNA メチル化酵素阻害剤の投与は MEE 細胞の上皮-間葉分化転換を促進し、口蓋裂表現型を軽症化させる効果があることを初めて証明した。

103 発生期脳組織の力学特性計測

○ 長坂新、岡本麻友美、篠田友靖、宮田卓樹
名古屋大学大学院医学系研究科細胞生物学分野

【背景・目的】発生期の脳原基は時間が経つにつれて成長する。脳壁の apical 面付近で前駆細胞が分裂し、誕生したニューロンが basal 側へと蓄積していくことで脳壁の厚さが徐々に増していく。こうした細胞の分裂、運命決定、移動、層構造の形成といった複雑かつ秩序だった過程は細胞内外の様々なメカニズムで制御されていると考えられる。これらのメカニズムを解明するために、遺伝子の発現産物であるタンパク質の働きに注目したケミカルな視点での研究がこれまでに多くなされている。一方で、組織の構造や細胞としての機能に力学的な制御も深く関係していることが近年知られるようになってきた。発生期の脳原基においても、発生過程における様々なイベントをケミカルな視点のみで説明することは難しく、フィジカルな視点からのアプローチも重要であると思われる。しかし、組織や細胞が生み出す、もしくはそれらに影響を及ぼす物理的要因を定量的な値として知ることが容易ではないことなどから、これまで、フィジカルな視点での研究はなされてこなかった。

【材料と方法・結果・結論】そこで、本研究では任意の位置での力学特性を定量的な値として計測できる原子間力顕微鏡 AFM を用いて、発生期の脳組織の力学特性を計測した。AFM は微細な加工を施した探針カンチレバーを試料に押し込み、カンチレバーのたわみ量からカンチレバーと試料間にはたらく力を検出する装置である。この装置によって局所的な力学特性を生きた状態のままに計測することができる。試料として胎生期マウスの大脳スライス(0.3 mm 厚)を製作し力学特性の計測を行った結果、前駆細胞が多く存在する領域とニューロンが多く存在する領域では力学特性が異なることを示唆するデータが得られた。これは、各領域の大部分を構成する細胞の種類が組織の力学特性に大きく関与する可能性を示唆する。

【今後の展望】今後、脳原基壁の全体をカバーする硬度マッピング、ステージの異なる脳原基間での比較など、より詳細な力学特性の解析を行うとともに、局所細胞密度(混雑度)の変化などを促す実験的操作下での力学特性測定も予定している。先天性脳形成不全マウスモデル例に認められる病的細胞挙動が力学的状況の異常から説明できるかどうか、明らかにしたい。

104 マウスノードにおける 9+0 と 9+2 型の繊毛の分布について

山梨大学大学院医学工学総合研究部 解剖学講座細胞生物学教室
大館 徹、竹田 昂

マウスにおけるからだの左右非対称性は、脊索板後部に存在するノード内で繊毛が右から左への一方向性の流れを生じることによって決定される。当初、ノード内には軸糸構造が9+0の繊毛のみが存在すると考えられていた。しかしながらその後、9+2の軸糸構造をもつ繊毛の存在が報告された。これよりノード内に9+2と9+0の繊毛が混在する可能性が示されたが、その平面上の配置や数の違いなどについてはそれ以来報告がない。そこで我々はノードにおいて9+0、9+2の2種類の繊毛がどのように分布するのかについて、光学顕微鏡切片に電子顕微鏡で観察した繊毛の位置情報をプロットすることにより解析した。その結果、ノード内の繊毛のほとんどは9+0の軸糸構造を示し、ごく一部が9+2の軸糸構造を持つことが判明した。さらに、これら2種類の繊毛のノード内における分布には一貫した規則性が見られなかった。これより、いわゆるtwo cilia model で示されるノード内の機能的に異なる2種類の繊毛は、少なくともその軸糸構造においては差が見られないということが明らかになった。

105 慢性ストレスおよびチューイングによるストレス緩和によるマウス骨の構造変化

○ 陳 華岳¹、千田隆夫¹、久保金弥²
岐阜大学大学院医学系研究科解剖学分野¹、星城大学大学院健康支援学研究所²

【目的】慢性ストレスが骨粗鬆症の発症に関与し、ストレス負荷中に積極的に咬む動作(チューイング)はとストレス反応が緩和される。そこで、ストレス条件下でチューイングさせたマウスとチューイングさせなかったマウスにおける骨の構造変化、ストレス関連物質、骨代謝マーカー比較検討した。

【材料と方法】12 か月齢の雄性 ddY マウスを対照群、ストレス群、チューイング群に分けた。ストレス負荷は1 日に2 時間の拘束ストレスを5 週間継続した。チューイング刺激ではストレス負荷中に木製の爪楊枝を噛ませた。実験終了後に血中ストレスホルモンと骨代謝マーカーを測定し、骨標本をマイクロCT と顕微鏡で観察した。

【結果】対照群に比べ、ストレス群では血中コルチコステロン濃度と副腎重量が有意に上昇し、腰椎と大腿骨における海綿骨の骨量、骨量幅と骨梁数が有意に減少した。血中オステオカルシン濃度と骨形成速度が低下し、血中TRAP5b濃度とTRAP陽性破骨細胞数が増加した。ストレス群に比べ、チューイング群では血中コルチコステロン濃度が有意な低値を示し、海綿骨の骨量、骨量幅と骨梁数が有意に増加した。血中オステオカルシン濃度と骨形成速度が増加し、血中TRAP5b濃度とTRAP陽性破骨細胞数が低下した。

【考察】マウスに慢性ストレスをかけると、視床下部-下垂体-副腎系が活性化され、骨形成の抑制と骨吸収の促進により骨量が低下した。チューイングはストレス反応が緩和され、骨形成と骨吸収の動的バランスが改善され、ストレス性骨粗鬆症の抑制につながっているものと考えられる。

106

急速凍結固定軟骨基質における硫酸化複合糖質の超微可視化

小萱 康德、渡邊竜太、矢野 航、佐藤和彦、江尻貞一
朝日大学歯学部 口腔構造機能発育学講座 口腔解剖学分野

急速凍結固定した軟骨を LRWhite 包埋し、超薄切片を作製した後 HID-TCH-SP 染色を施して S-GCs の超微可視化を試みた。軟骨基質には直径 3nm~25nm の HID 染色顆粒がほぼ等間隔に分布し、しばしばこれら顆粒は数珠状に繋がって観察された。また、HID 染色に反応を示さない線維状構造の存在も確認出来た。軟骨基質内の S-GCs はコアタンパクに、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸といった S-GAGs 鎖が結合し所謂プロテオグリカン (PGs) を形成、さらに PGs はヒアルロン酸に結合し三次元的に広がる巨大分子 (aggrecan aggregate) を構成している。今回観察した HID-TCH-SP 染色顆粒の数珠状構造は、一本の S-GAGs 側鎖の一部を現し、さらに染色顆粒の大小は、S-GAGs 側鎖の物理的性質 (分子の長さ) や化学的性質 (硫酸基の数等) の違いを現しているものと想定された。また、HID 染色に反応を示さない線維状構造はヒアルロン酸もしくはコアタンパクを示しているものと思われるが、この点については今後免疫染色法等による確認が必要である。いずれにしても本法により、生体組織中において三次元的に展開する S-GAGs 側鎖の生体に近い状態での超微可視化が可能となった。

107

マウスおよびヒトメラノーマ株細胞とマウスメラノーマ皮下移植モデルにおける膜骨格蛋白 4.1 ファミリーの免疫組織化学的検討

寺田信生¹、齊藤百合花²、大野伸彦²、大野伸一²
信州大学医学部保健学科基礎作業療法科学講座¹、
山梨大学大学院解剖分子組織学教室²

プロテイン 4.1 ファミリーは細胞膜内蛋白と結合する膜骨格蛋白である。今回、メラノーマから樹立されたマウス B16-BL6、ヒト A375、および A2058 株を用いて、膜骨格蛋白の細胞内局在について免疫組織化学的に検討した。皮下移植モデルには、C57BL/6J マウスに B16-BL6 を皮下移植し、7 日後に生体内凍結一凍結置換固定標本を作製した。これらの標本をマウスもしくはヒトの 4.1G、4.1B、MPP6、CADM1、CADM4 の特異抗体を用いて免疫染色した。また 4.1B の cDNA 組込みアデノウイルスベクターを作製し、B16-BL6 に遺伝子導入して、その局在を検討した。ヒト末梢神経の検討には、インフォームドコンセントを得たヒト腕神経叢の病理固定標本を用いた。この免疫染色により、B16-BL6 の細胞間接着部位に 4.1G の局在を認め、免疫電顕でも細胞膜直下に確認できた。この細胞株に 4.1B は認めないが、遺伝子導入で 4.1B を強制発現させると、数日後に細胞膜直下に局在した。さらにこの細胞株には MPP6 と CADM1 も細胞膜に局在し、4.1G と MPP6 の複合体形成を免疫沈降法により確認した。皮下移植した B16-BL6 では、培養下と同様に細胞間接着部位に 4.1G が局在した。ヒト末梢神経において、ヒト特異抗体を用いた免疫染色により、4.1G と CADM4 が既報の齧歯類での結果と同様に、シュワン細胞のシュミット・ランターマン切痕に局在していた。さらにヒト A375 と A2058 では、4.1G に加えて 4.1B、CADM1 と CADM4 の細胞膜接着部への局在を認めた。以上より、マウスおよびヒトメラノーマ細胞における、4.1 や CADM ファミリーの細胞間接着への関与が示唆された。

108

エネルギーフィルター電子顕微鏡による歯石構成元素の検出

○ 盛口敬一¹、朝倉正紀²、高橋好文²、河合達志²、大野紀和¹
愛知学院大学 歯学部¹ 口腔解剖学講座² 歯科理工学講座

【目的】 エネルギーフィルター電子顕微鏡 (EFTEM), Carl-Zeiss (LEO LIBRA 120) は電子エネルギー損失分光法 (Electron Energy-Loss Spectroscopy: EELS) を搭載しており、組織切片上での元素分析、電子分光結像法 (Electron Spectroscopic Imaging: ESI) による元素マッピングが可能である。また EFTEM はエネルギー分散型 X 線分光法 (Electron Dispersive X-ray Spectroscopy Energy: EDS) による検出方法も異なる。オメガフィルターによる元素分析のため、軽元素検出を得意とするが、我々はタン、セリウム等の証明も行っている。そこで今回、歯石構成元素として知られている Ca, P, Na, Mg, O 等の元素について検出するとともに、JEOL-JXA-8530F による SEM-EDS による分析と比較することを目的とした。

【材料と方法】 歯石試料は採取後、2%pFA-2%GA 固定の後、1%OsO₄ 後固定を行い、上昇アルコールによる脱水の後 Quetol653 に包埋した。超薄切片を作製し EFTEM にて分析を行うと共に、ベースのゼラチンカプセル表面の歯石試料について JEOL-JXA-8530F による SEM-EDS 分析を行い比較した。

【結果と考察】 EFTEM による各元素の元素マッピングは容易であった。EELS による Ca と O についての検出、確認は行えたが、他の元素については明らかな証明はできなかった。一方 SEM-EDS による分析ではすべての元素について存在が証明された。以上の結果から、EFTEM では軽元素領域の元素であっても検出が難しい元素が存在することが明らかとなった。しかし元素マッピングについては SEM-EDS がその検出に電子線を走査する方式のため、観察には時間を要するのに対して、EFTEM では短時間に行え、その利便性は大きいと思われる。

109

SBF-SEM を用いた細胞の三次元超微構造観察

○ 森山陽介¹、白田信光¹、厚沢季美江、宮崎直幸²、村田和義²、深澤元晶¹
1 藤田保健衛生大学 医学部 解剖学 II 講座、
2 自然科学研究機構 生理学研究所 形態情報解析室

【目的】・・・細胞小器官の立体観察は、電子顕微鏡による細胞観察の究極目標である。これまで透過型電顕 (TEM) と走査型電顕 (SEM) について様々な工夫が行われてきた。本研究では SBF-SEM を使用し、樹脂包埋された試料をダイヤモンドナイフで連続的に薄く削りながらそのブロック表面に現れる構造を反射電子により順次記録して試料の超微細三次元構造の再構築を行った。この新しい三次元観察法について得られた経験を報告する。

【材料と方法】・・・ラット肝臓組織を固定後、カタラーゼ活性によりペルオキシソームを DAB で発色させたうえで導電染色し SBF-SEM 像とを得た。

【結果】・・・観察の際に試料のチャージアップを防ぐためには導電染色が有効であった。この染色法では、超薄切片を TEM 観察した像と SEM によるブロック表面の像はほぼ同一のものが得られた。また、肝質膜はコントラスト良く観察され、細胞質基質・細胞小器官の基質は中程度の電子密度であった。自動的に数百枚の連続表面を観察して得られた細胞超構造からはミトコンドリア全体の立体像を構築できた。また、DAB 反応によりペルオキシソームがオスミウムブラックとして染色された領域については画像上での自動セグメンテーションを行い、ペルオキシソームの分裂像を初めて立体的に得ることができた。

110

Bioimaging of fluorescence-labeled mitochondria in subcutaneously grafted murine melanoma cells by the “*in vivo* cryotechnique”

Zheng Huang¹, Nobuhiko Ohno¹, Ting Lei¹, Bao Wu¹, Takashi Sakoh¹, Yurika Saitoh¹, Ikuro Saiki² and Shinichi Ohno¹
Department of Anatomy and Molecular Histology, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi, Japan.

The microenvironments of animal organs with blood flow affect the metabolic profiles of proliferating tumor cells in metastatic tissues, which are influenced by mitochondrial functions. However, histopathological analyses of these aspects have been hampered by technical artifacts associated with conventional fixation and dehydration, including ischemic or anoxic alterations in morphology. We combined the *in vivo* cryotechnique (IVCT)-freeze-substitution (FS) with genetically prepared fluorescent protein expression, and examined tumor tissues from living melanoma-grafted mice and the distribution of mitochondria in tumor cells. MitoDsRed fluorescence was detected in scattering melanoma cells with IVCT-FS, and the total volume of mitoDsRed in these cells varied highly without being related to the distance from blood vessels. The IVCT combined with fluorescent protein expression is a useful approach to examine the behavior of fluorescence-labeled cells and organelles, indicating that both volume and distribution of mitochondria for energy demand are modulated to support the behavior of tumor cells in hypoxic microenvironments of metastatic tissues.

111

新規脂肪滴タンパク質 ELMOD2 の機能解析

鈴木倫毅、大崎雄樹、程晶磊、藤本豊士
名古屋大学大学院 医学系研究科 分子細胞学

脂肪滴に含まれるトリグリセリド分解の最初の段階に関わる ATGL の脂肪滴へのリクルートには Arf1-COPI 経路の関与が示唆されている。私たちは肝癌細胞由来の細胞株である Huh7 細胞を用いた脂肪滴分画の質量分析により、Arf1-GAP 活性を持つとされる ELMOD2 を同定した。肝癌細胞由来 Huh7 細胞と子宮頸癌由来 HeLa 細胞を OPT1-Prep を用いて遠心分画し、ウェスタンブロットで ELMOD2 が脂肪滴分画に存在することを確認した。GFP タグをつけた ELMOD2 の蛍光顕微鏡観察、および免疫電顕により、ELMOD2 は脂肪滴以外に小胞体、ミトコンドリアに局在していることが明らかになった。Huh7 細胞の脂肪滴分画およびミクロソーム画分を ①1% Triton X-100、②0.1 M Na₂CO₃ (pH 11)、③1 M NaCl で処理して調べたところ、両画分の ELMOD2 とも 1% Triton X-100 のみで可溶化し、ELMOD2 が内在性膜タンパク質の性質を持つことが示唆された。HeLa 細胞では ELMOD2 ノックダウンにより脂肪滴に含まれる ATGL は増加し、トリグリセリド量が減少した。

以上の結果は、ELMOD2 が脂肪滴近傍の Arf1 活性を調節することで、脂肪滴にリクルートされる ATGL の量を制御し、脂肪滴の代謝に関与していることを示唆している。ELMOD2 は脂肪滴、小胞体、ミトコンドリアに局在しているため、脂肪滴への ATGL リクルートに関与する機構については更なる検討が必要である。

112 ポリグリニン化修飾酵素 TTLL10 ノックアウトマウスの気道上皮纖毛運動解析

池上浩司¹, 政池知子², 西坂崇之³, 瀬藤光利¹

¹浜松医科大学解剖学講座 (細胞生物学分野)

²東京理科大学理工学部応用生物科学科

³学習院大学理学部物理学科

気道上皮の纖毛や精子の鞭毛には共通の構造である軸糸があり、その大部分はチューブリンで構成されている。軸糸を構成するチューブリンは非常に特徴的な翻訳後修飾であるポリグリニン化修飾を受ける。本研究では、纖毛に対するポリグリニン化修飾消失の影響を検証するために、ポリグリニン化酵素である TTLL10 (Tubulin Tyrosine Ligase-Like 10) をノックアウト (KO) したマウスを作製した。TTLL10-KO マウスの気道上皮纖毛の形態、運動性および機能について解析した。

TTLL10-KO マウスの気道上皮纖毛は正常に形成され、長さも正常であった。高速カメラを用い、単離した纖毛の運動性を解析した結果、TTLL10-KO マウスの纖毛では野生型の纖毛に比べ、纖毛運動の振幅と速度に僅かな増加傾向がみられた。一方、纖毛運動の周波数には差異は見られなかった。纖毛運動による液流速を解析した結果、TTLL10-KO マウスの気道上皮表面では液流の速度が僅かに増加していた。液体の粘性を高めると、その差はさらに顕著になった。

以上のことから、チューブリンポリグリニン化の消失はむしろ纖毛運動を活性化し、とりわけ高粘性条件下で纖毛運動による液流速を増加させることが明らかとなった。

113 象牙芽細胞における一次纖毛を介した WNT シグナルの生理機能の解析

○河田かずみ, 成田啓之, 竹田嗣

山梨大学大学院 医学工学総合研究部 解剖学講座細胞生物学教室

【目的】一次纖毛は細胞外環境を感知するセンサーとして機能することが知られており、象牙芽細胞を含む、体を構成する殆どの細胞に存在する。歯牙組織を形成する象牙芽細胞上の一次纖毛は象牙質側から歯髄側へ向かって存在することが報告されているが、その生理機能に関しては殆ど研究が進んでいない。今回、我々は、象牙芽細胞における一次纖毛の生理機能の一端を示す知見を得たので報告する。

【結果】①初代象牙芽細胞の分化の進行と共に一次纖毛を有する細胞数は一旦は上昇を見せるものの、次第に減少することが明らかとなった。②また、sh-*Irf8* KN-3 細胞において、象牙芽細胞分化マーカー遺伝子の発現の増加、ALP 活性の抑制が確認された。更に、細胞播種後 1 日では古典的 WNT シグナル活性に変動は認められなかったが、同 4 日では古典的 WNT シグナルが活性化されていることも明らかとなった。③この古典的 WNT シグナルを KN-3 細胞において活性化したところ、細胞播種後 1 日では変化が見られなかった有線毛率が、同 4 日では減少することが明らかとなった。その際の、象牙芽細胞分化マーカー遺伝子の発現、ALP 活性は *Irf8* ノックダウン時と同様の変動を示した。

【結論】以上の結果から、象牙芽細胞において、その分化制御が一次纖毛を介した古典的 WNT シグナルの受容を介する可能性が強く示唆された。更に、この経路の活性化が一次纖毛の形成、それ自体にも関与する可能性も示唆された。

114 出生前後の発生期における脈絡叢上皮細胞の纖毛運動の解析

¹山梨大学大学院 医学工学総合研究部 解剖学講座細胞生物学教室

²早稲田大学 先進理工学部 生命医科学科

○成田啓之¹, 野波祐太², 中村秀樹², 井上貴文², 竹田嗣¹

【目的】纖毛は人体を構成するほぼ全ての細胞に存在する細胞小器官で、一般に細胞のプロペラ・アンテナとしての機能を持つと言えるが、その構造と機能には多様性がある。我々は纖毛の多様性の分子基盤を解明するために、脳脊髄液の産生・分泌を担う脈絡叢上皮細胞 (CPECs) が持つ非典型的な纖毛の解析をおこなっているが、最近、この纖毛が出生直後に一時的に運動機能を獲得することを見出している。今回、様々な発達段階にあるマウス胎児および新生児 (E13~P14) 由来の側脳室脈絡叢を剖出して纖毛運動の経時変化を詳細に解析し、その生理的意義を検討した。【結果】側脳室脈絡叢の発生は E12 頃に始まるが、運動纖毛を持つ CPECs は E15 から出現が認められた。その数は胎児期を通して増え続け、P2 に最大値に達したのち減少し、P14 には全く認められなくなった。纖毛運動周波数 (CBF) も E15 では 5.2 ± 1.4 Hz であったが次第に増加し、P2 では 8.1 ± 2.4 Hz に達した。CPECs の細胞あたりの纖毛数は観察期間を通してほぼ一定 (10.3 ± 2.6 本) であった。一方、纖毛運動への関与が知られる *Dnahc11* の脈絡叢における発現レベルは E17 から P1 の間に著しく低下していた。

【結論】以上の結果から、CPECs の纖毛運動は P2 において組織レベルで最大となることが明らかとなった。しかし我々の以前の解析では、この絶頂期における纖毛運動も細胞外液の流れを生み出すには十分ではなかったため、CPECs の纖毛運動が脳脊髄液の循環に関与しているという可能性は極めて低いと考えられた。またこの一過性の運動機能獲得には *Dnahc11* などの遺伝子発現調節が関与していることが示唆された。

115 マウス顎下腺および舌下腺における α アミラーゼの発現と局在

山岸諒子¹ Kannika Adthapanyawanich² 仲田浩規¹ 山本美由紀¹ 若山友彦¹ 井関尚一¹
金沢大学医薬保健研究域医学系 組織発達構築学

マウスの三大唾液腺において、耳下腺の腺房細胞が消化酵素アミラーゼの主な産生部位であることが知られるが、顎下腺および舌下腺におけるアミラーゼの産生の程度や、産生を行う細胞の種類は、必ずしも明確となっていない。この問題を明らかにするため、雌雄のマウスの三大唾液腺における α アミラーゼの mRNA および蛋白質の発現と局在について、定量的方法および組織化学的方法により解析した。アミラーゼの mRNA 発現レベルは耳下腺、顎下腺、舌下腺の順に高かった。耳下腺と舌下腺においては mRNA 発現レベルに雌雄差はなかったが、雌の顎下腺における発現は雄の顎下腺のおよそ 30% しかなかった。遺伝子組織化学 (*in situ* hybridization) および免疫組織化学を用いると、アミラーゼの mRNA と蛋白質のシグナルは耳下腺の腺房細胞、舌下腺の漿液性半月細胞、および雄の顎下腺の顆粒性導管細胞に強く陽性、雌雄の顎下腺の腺房細胞 (漿粘液細胞として知られる) に弱く陽性で、舌下腺の粘液性腺房細胞には陰性であった。顆粒性導管細胞のマーカーである神経成長因子 (NGF) mRNA レベルの雌雄差との比較によっても、顎下腺におけるアミラーゼの一部は腺房細胞で産生されることが裏付けられた。これらの結果から、アミラーゼはマウスの顎下腺において主に顆粒性導管細胞により産生され、一部は腺房細胞で産生されることが、また舌下腺においては漿液性半月細胞でのみ産生されることが明らかになった。

116 ストレス誘発性機能性胃腸症モデルにおける CRF 受容体及び Urocortin の関与

○小酒井友、林功栄、堀紀代美、易勤、山口豪、白石昌武、中村恒夫、尾崎紀之
金沢大学医薬保健研究域医学系 機能解剖学分野

【目的】明らかな器質的病変が見られないにも関わらず痛みなどの上部消化管症状を呈する疾患として機能性胃腸症 (FD) がある。実験動物にストレスを加えると、腸の痛覚過敏を惹き起こし過敏性腸症候群 (IBS) のモデルとして提唱されている。本研究ではストレスを加えたときの胃の痛覚の変化を調べ、痛覚の亢進への副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (CRF) とその関連ペプチドである Urocortin (Ucn) 1/2 及び CRF2 受容体の関与を調べた。

【材料と方法】深麻酔下で、雄性ラットの胃にバルーンを、僧帽筋に筋電図測定用の電極を留置し、胃をバルーン伸展した時の筋電図の変化を胃の痛覚として測定した。1 日 1 時間の Water avoidance ストレス (WAS) を 10 日間反復して負荷し、経時的に胃の痛覚を評価した。また、胃粘膜での CRF、Ucn1/2、CRF2 受容体の発現を調べた。

【結果】WAS の反復負荷により胃の痛覚が亢進した。その時、胃粘膜に明らかな病変は見られなかった。WAS によって亢進した痛覚は CRF 拮抗薬及び CRF2 受容体拮抗薬で抑制された。胃粘膜には CRF・Ucn1・Ucn2 及び CRF2 受容体を発現した細胞が見られ、CRF2 受容体陽性細胞は WAS により増加した。

【結論】反復 WA ストレスは胃の痛覚を亢進させ、機能性胃腸症の動物モデルとして有用である。ストレスによる胃の痛覚過敏には CRF2 受容体が関与しており、機能性胃腸症のメカニズムへの関与が示唆された。

117 肝硬変モデルマウスの線維化に対するヒト羊膜間葉系幹細胞 (HAM α) の効果

○吉田佳奈美¹, 吉田淑子², 古市恵津子², Li Jiali², 岡部素典², 吉田 聡¹
¹ 富山大学医学部医学科, ² 富山大学大学院医学薬学研究部 再生医学講座

【目的】肝臓移植以外に満足のいく治療方法がない重篤な肝硬変患者に対し、自己の骨髄細胞を移植することで、良好な線維化の減少がみられることがマウスだけでなく、ヒトの臨床試験でも報告された。本研究では、ヒト羊膜間葉系幹細胞が、肝硬変によって生じた肝臓の線維化を改善する能力を有することを明らかにすることを目的とした。【材料と方法】6 週齢の ICR マウスに四塩化炭素 (CCl4) を一週間に 2 回腹腔に投与し、肝硬変モデルを作成した。使用した羊膜間葉系幹細胞は富山大学倫理委員会により承認されたヒト羊膜から採取し、当教室独自の方法で単離した羊膜間葉系幹細胞 (HAM α 細胞) である。本細胞を PKH (SIGMA-ALDRICH) でマークし、脾臓経路で一匹あたり 10^5 個投与した。投与後、3 日目および 1 週間目に血清、肺・肝臓・脾臓を採取し、HAM α 細胞の分布、周囲組織との関係および肝臓の線維化を組織学、免疫組織学的に検討した。

【結果】肝硬変モデルマウスでは、移植細胞が線維化の顕著なグリソン氏鞘に集約して存在するが、正常マウスでは、移植細胞は肝臓の辺縁に集約し壊死している像が観察された。細胞移植群と非移植群を比較すると、肝臓表面の凹凸が細胞投与群では滑らかになっており、膠原線維の量をイメージアナリシスにて解析した結果 (投与群が有意に減少する) と相関した。さらに、HAM α 細胞投与群では線維化に密接に関係する伊東細胞の活性が顕著に低下している像が観察された。

【結論】羊膜間葉系幹細胞 (HAM α 細胞) は、CCl4 で惹起された線維化を減少する能力を有する。

118 種々凍結技法によるマウス腸管上皮細胞の超微形態像および 粘膜内血清蛋白の免疫組織化学的解析

志茂 聡、齊藤成、齊藤百合花、大野伸彦、大野伸一

山梨大学 大学院医学工学総合研究部 解剖学講座分子組織学教室

生体内凍結技法 (IVCT)-凍結置換固定法 (FS) によるエポン包埋試料を用いて、マウス腸管粘膜の電顕的超微形態像を解析した。また、新鮮切除組織の急速凍結技法 (FT-QF-FS) および通常の固定法によるエポン包埋試料を用いて、マウス腸管粘膜組織の可溶性血清蛋白の免疫組織化学的局在を比較検討した。麻酔下マウスの空腸を露出し、(i) IVCT-FS、(ii) FT-QF-FS、(iii) 2.5%GA 浸漬固定-1%四酸化オスミウム後固定-アルコール脱水法 (IM-DH)、(iv) 2.5%GA 灌流固定-1%四酸化オスミウム後固定-アルコール脱水法 (PF-DH) を行いエポン包埋した。形態学的解析には、トリージンプール染色に対応した隣接超薄切片の電子染色後、電顕観察した。免疫組織化学的解析には、Sodium ethoxide で脱エポン処理後、オートクレーブにより抗原賦活化を行ない、ABC 法の後、DAB 染色して光顕観察した。IVCT-FS では、微絨毛細胞粘膜内葉および外葉が明瞭に観察でき、一部の微絨毛基部には陥凹構造とともに Terminal web には小胞が見られた。また、細胞質内には粗面小胞体や高電子密度のミトコンドリアを認めた。FT-QF-FS による IgA 免疫染色では、腸上皮細胞質における免疫染色性は明瞭であり、多くの顆粒状免疫反応産物と粘膜固有層の形質細胞に強い陽性像を認めた。IVCT-FS では、腸上皮細胞頂上部の微細構造は非常に良好であり、微絨毛や腸上皮細胞質内の細胞小器官を詳細に観察することが可能であった。また FT-QF-FS による IgA 免疫染色では、脱エポン処理とオートクレーブ抗原賦活化を行うことにより、腸管粘膜の IgA 産生細胞および可溶性血清蛋白の組織細胞内局在を可視化することができた。

119 Oligodendrocyte 分化における 精神疾患リスク因子 DISC1 の機能 解析

服部 剛志

金沢大学医薬保健研究域医学系神経分子標的学講座

統合失調症をはじめとする精神疾患の発症に関与する遺伝子 DISC1 はこれまでに神経細胞を中心に解析が行われてきた。しかしながら、患者死後能解析などから神経細胞だけでなくオリゴデンドロサイトの異常も報告されている。そこで、我々は DISC1 のオリゴデンドロサイトにおける機能解析を行った。まず、DISC1 はオリゴデンドロサイトが豊富に存在するマウス脳梁に発現し、培養オリゴデンドロサイトでも DISC1 の発現が認められた。また、培養オリゴデンドロサイトでは DISC1 の発現は発達とともに減少して行くことが明らかとなった。DISC1 の細胞内局在は神経細胞のそれと類似しており、細胞質に発現が強く、オリゴデンドロサイトの突起上にもその発現は認められた。次に我々は、DISC1 のオリゴデンドロサイト分化への影響を検討するために、DISC1 ノックダウンを行ったオリゴデンドロサイトの分化を観察した。その結果、DISC1 をノックダウンした細胞ではオリゴデンドロサイトの分化が異常に更新していることが明らかとなった。また、分化異常時の発現解析より、転写因子である Sox10 と Nkx2.2 の発現が有意に減少していた。よって、DISC1 は下流にある Sox10 と Nkx2.2 の発現を制御することにより、オリゴデンドロサイト分化を負に制御していることが本研究で明らかとなった。

120 施灸による c-Fos 発現の免疫組織化学的研究

○深澤元晶 1、白田信光 1、森山陽介 1、永津郁子 1、中原大一郎 2、厚沢季美江 1

1 藤田保健衛生大学医学部解剖学 II、2 浜松医科大学医学部心理学

【目的】施灸に対する生体反応を調べるため、動物に施灸を行い脳反応を解析した。
【材料と方法】〔刺激〕成体ラットの背部に施灸した。対照刺激として綿球によるシヤム刺激を行った。〔行動解析〕条件付け場所選好性試験：動物に連日施灸を行い条件付けをし、行動時間の変化を測定した。〔マイクロダイアリシス〕脳内にプローブを設置し、透析サンプル中の dopamine 量を測定した。〔免疫組織化学〕刺激開始後 90 分の動物において、c-Fos 抗体を用いた蛍光抗体法および酵素抗体法による染色を行った。〔リアルタイム PCR〕刺激開始後 1、2、3 時間で脳組織を採取し、c-Fos 遺伝子に対して半定量的 PCR を行った。
【結果】〔行動解析〕施灸に対して選好性を示し、報酬特性が示された。〔マイクロダイアリシス〕内側前頭前野、背側線条体、側坐核において dopamine 分泌増加が観察された。〔免疫組織化学〕施灸群では dopamine 神経系全体で c-Fos 陽性細胞数の密度が対照群に対して 2 倍程度に増加した。〔リアルタイム PCR〕c-Fos の遺伝子発現量は内側前頭前野、背側線条体、側坐核において施灸後 1 時間で増加した。
【結論】免疫組織化学およびリアルタイム PCR の結果から、施灸により c-Fos の発現がドパミン神経系で増加することが示された。施灸により脳内のドパミン分泌が増加し、また施灸が動物に対して報酬特性を示すという知見と合わせて、施灸はドパミン神経系を刺激する可能性が示唆された。

121 嗅覚識別に必要な大脳皮質の最小サイズに関する研究

平山周一、横内久美子、森泉哲次

信州大学 大学院医学系研究科 人体構造学講座

【目的】嗅球からの神経投射を受ける大脳皮質は一般に嗅皮質と呼ばれ、前嗅核 (AON)、嗅結節 (OT)、梨状皮質 (PC) からなり、脳底部で広大な領域を占める。嗅覚機能に必要な最小の大脳皮質のサイズを決定することを目的として研究を行った。
【材料と方法】(1) 成熟ラットの右嗅球を吸引除去し、水道水と Cycloheximide 溶液を嗅いで区別するように嗅覚学習させた。嗅覚学習後に、嗅球から離れた左側の外側嗅索を切断し、嗅覚機能が維持されていることを確認した。(2) 嗅覚検査後、神経細胞毒である 1% Ibotenic acid (IBO) 溶液を左嗅球と左外側嗅索切断部の間の嗅皮質に注入し、ニューロンを様々な程度で破壊した。IBO 注入ラットの嗅覚機能を調べて、嗅覚 (+) ラットと嗅覚 (-) ラットに分けた。(3) 脳と嗅球を採取し、ニューロンマーカーである NeuN の免疫染色を行った。(4) 嗅覚 (+) ラットで最小の NeuN 陽性ニューロンの総面積を求め、正常ラットと比較した。
【結果】嗅覚 (+) ラットの中で、総面積の小さい値を示したラットは以下の 3 匹であった。IBO 注入ラット 160 x 10⁴ μm² (AON: 0; OT: 123 x 10⁴; PC: 37 x 10⁴)・IBO 注入ラット 149 x 10⁴ μm² (AON: 40 x 10⁴; OT: 55 x 10⁴; PC: 54 x 10⁴)・IBO 注入ラット 136 x 10⁴ μm² (AON: 28 x 10⁴; OT: 40 x 10⁴; PC: 68 x 10⁴)。
【結論】嗅覚識別に必要な最小の大脳皮質の大きさは 1 側の嗅皮質の 13-15% であった。

122 Satellite glial cells: morphological alterations of microglial cells

矢倉 富子 愛知医科大学医学部解剖学講座

衛星細胞は、形態学的には不明な点が多く、特に神経節細胞と衛星細胞間の物質移動に関する相互作用については十分な解明がなされていない。本研究ではラット迷走神経下神経節を研究対象とし、衛星細胞の特定および物質間移動に伴う形態学的変化を明らかにし、脳機能に対する役割を解明することを目的として行われた。光顕的観察では、WGA で標識された神経節細胞を取り囲むように多数の衛星細胞が認められ、GFAP 発現陽性であった。また、Iba-1 発現陽性細胞も神経節細胞に接して存在したが、GFAP との重複発現はほとんど認められず、Iba-1 発現陽性細胞の一部が神経節細胞に向かって突起状に伸張し、細胞質内に入り込むという特異な構造を認めた。電子顕微鏡下にて、この突起状のものは、神経節細胞に接する Iba-1 発現陽性細胞に酷似した衛星細胞由来のものであった。更に、これらは HRP 反応産物を取り込み、食食様形態を示していた。対照実験として用いた動物においても同様の突起状伸張は認められたものの、その深度は WGA-HRP 注入例と比較すると浅いものであった。本研究で最も特徴的な所見である衛星細胞から神経節細胞へ伸びる突起状のものは、Iba-1 発現陽性細胞に起因していた。この衛星細胞は、ミクログリア細胞と考えられ、神経節細胞に深く突起を伸ばし、細胞質内にある HRP 反応産物を異物として取り囲み、取り込むという食食作用を持っていることが明らかになった。対照実験でも例外なく見られたが、特に神経節細胞に異物が存在する場合にはより強い現象として観察された。

123 ASIC2a 点変異トランスジェニックラットに認められた小脳変性の 解析

柴田 泰宏¹ 佐久間 英輔² 渡辺 正哉¹ 熊本 奈都子¹ 植田 高史¹ 鶴川 真也¹

¹ 名古屋市立大学大学院 医学研究科 機能組織学分野

² 名古屋市立大学大学院 医学研究科 機能解剖学分野

酸感受性イオンチャネル ASIC2a (acid-sensing ion channel-2a) は、degenerin (線虫の機械刺激受容チャネル) の哺乳類相同遺伝子であり、脳および脊髄の神経細胞に発現しているが、その生理的意義に関しては不明な点が多い。そこで、ASIC2a の gain-of-function ミュータント (G430F) を強制発現させたトランスジェニック (TG) ラットを作成し、病理学的側面から ASIC2a の機能を解析した。PCR 法を用いてトランスジェニックの挿入部位を調べたところ、第 18 番染色体長腕 12.3 に存在する PSTPIP2 遺伝子の第 1 イントロンに含まれていることがわかった。TG ラットには、劇的な小脳萎縮が認められ、酩酊様の歩行など、小脳性運動失調が観察された。パラフィン切片を作製し、小脳の組織学的変化を調べたところ、プルキンエ細胞と顆粒細胞の変性が認められた。透過型電子顕微鏡を用いてプルキンエ細胞の超微形態を観察したところ、ミトコンドリアの膨化などネクロシスを示唆する所見が得られた。小脳における ASIC2a の転写産物は、in situ hybridization 法では検出できなかったが、single-cell RT-PCR 法では大部分のプルキンエ細胞と顆粒細胞が ASIC2a を発現していると考えられた。これらの結果から、小脳のプルキンエ細胞と顆粒細胞が gain-of-function により死滅することで、特徴的な病態を引き起こしていると考えられた。導入した変異は、わずか一つのアミノ酸置換であり、変異遺伝子を受け継いだ個体全例に表現型の変化が認められたことから、これらの病態はヒトでも十分起こりうると考えられた。したがって、この TG ラットは、何らかの神経変性疾患モデル動物である可能性が高い。

201 行動ならびに c-Fos 発現の変化を指標とした Isoproterenol 投与による虚血性心臓痛モデルの有用性の検討

山口豪¹⁾、堀紀代美¹⁾、小酒井友¹⁾、白石昌武¹⁾、中村恒夫¹⁾、易勤²⁾、尾崎紀之¹⁾
1) 金沢大学医薬保健研究域医学系 機能解剖学分野
2) 首都大学東京人間健康科学研究科フロンティアヘルスサイエンス学域

【目的】isoproterenol (以下 ISO と略す) の皮下投与はラットにおいて虚血性心筋傷害を引き起こすが、ISO 投与時の疼痛に着目して解析した報告は無い。虚血時の心臓の痛みのメカニズムを解析するために、ISO 誘発性虚血性心筋傷害モデルが、心臓の虚血時の痛みのモデルとして有用かどうか、行動学的ならびに脊髄後角ニューロンにおける c-Fos 発現によって検討することを目的とした。【材料と方法】雄性 SD ラット (200-400 g) に 50 mg/kg の ISO を皮下投与し、投与前後の行動変化をビデオカメラを用いて撮影・記録した。この行動が心臓での疼痛に関連した行動なのかを確認するために、morphine を前投与し、ISO 投与後の行動変化を観察した。また ISO 投与後に 4 % PFA にて灌流固定を行い、脊髄後角ニューロンにおける c-Fos 発現の変化を免疫組織化学的に検索した。【結果】ISO 投与群では投与後、体幹を伸ばす姿勢や足を伸ばして横たわる姿勢をとり、その行動回数は投与 15-30 分後に多く、時間経過とともに減少した。ISO の対照として生理食塩水投与群では特異的な行動は見られなかった。特異的な行動は morphine 投与により抑制された。また、ISO 投与群では生理食塩水投与群に比べて脊髄後角における c-Fos 発現が増加していた。morphine 投与後に ISO を投与すると、c-Fos 発現は抑制されていた。【結論】ISO 虚血性心筋傷害モデル動物では、特異的な行動が見られ、脊髄後角ニューロンにおける c-Fos の発現が増加することがわかった。また、特異的な行動や c-Fos の発現は morphine によって抑制されたことから、ISO を用いた本モデルは心虚血時の疼痛モデルとして有用と考えられる。

202 種々伸展状態下マウス坐骨神経における機能的形態像および血清蛋白分布の3次元解析法

上條明生¹、齊藤百合花²、大野伸彦²、大野伸一²、寺田信生¹
1 信州大学大学院医学系研究科保健学専攻、2 山梨大学大学院解剖分子組織学教室

末梢神経系の機能的形態を検討するために、麻酔した C57BL/6J マウス坐骨神経を種々に伸展させた状態で液体窒素冷却した液化イソペンタン・プロパン混合寒剤 (-193°C) を直接かけて「生体内凍結技法」を行った。凍結した坐骨神経は、パラホルムアルデヒド含有アセトン中 (-80°C) で凍結置換固定後、パラフィン包埋切片を作製した。坐骨神経標本における、神経線維の形態解析にはヘマトキシリン・エオジン染色とシュミット・ランターマン切痕 (SLI) にある膜骨格蛋白 4.1G の免疫染色を、血清蛋白分布の解析には血清アルブミンの免疫染色を行い、光学顕微鏡と共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) で3次元に検討した。また、従来の灌流固定標本も作製して生体内凍結標本と比較した。伸展した坐骨神経では、神経線維の形態が数珠状に変化し、CLSM によって3次元の立体像が得られた。その神経線維の数珠状の形態変化に対応して、4.1G の免疫染色陽性 SLI の円錐台の高さは、統計学的に有意であった。またアルブミンの免疫局在は、坐骨神経の神経内膜と神経周膜に、血管内から間質まで認め、さらに有髄有鞘神経線維のランビエ絞輪部では、軸索の周囲にまで認めた。一方、灌流固定した標本では、アルブミン局在分布は、血管や間質に不均一であり、一部の軸索内に流入像を認めた。以上のように、生体内神経線維の伸展に対応した SLI の形態変化像より、この部位での機械的ストレスに抗する緩衝機能が示唆された。さらに生体内凍結技法によって、生きた機能状態を反映した末梢神経における血清アルブミン局在が、明らかとなった。

203 傍絞輪部蛋白 Caspr1 の末梢神経突起内ミトコンドリア局在に与える影響の検討

酒匂崇史、大野伸彦、大野伸一

山梨大学大学院医学工学総合研究部解剖学講座分子組織学教室

【目的】有髄神経線維の傍絞輪部には、軸索と髄鞘形成膠細胞の接合体複合体が局在し、イオンチャネル局在、早い跳躍伝導、軸索輸送の維持に重要な役割を果たす。本研究では、接合体複合体を構成する膜貫通蛋白 Contactin-associated protein 1 (Caspr1) が、神経伝達に必要なエネルギー産生を担う軸索内ミトコンドリア (Mit) の分布制御に関わる可能性を検討した。【材料と方法】①成体マウスを灌流固定後、尾神経組織の連続走査型電子顕微鏡 (SBF-SEM) 画像を取得し、有髄神経線維の Mit 局在を観察した。②神経成長因子処理で神経突起形成した培養 PC12 細胞に、Mit 局在蛍光蛋白と共に Caspr1 やその欠失変異体、Mit の分裂・融合関連蛋白 (Drp1, Mfn1, Mfn2 など) を強発現させ、神経突起内 Mit 蛍光の分布変化を共焦点レーザー走査型顕微鏡および蛍光顕微鏡で観察した。【結果】①正常傍絞輪部において、隣接する絞輪間部やランビエ絞輪と比較して、Mit 体積の減少が認められた。②Mit は PC12 細胞の神経突起には少なく、その分裂・融合関連蛋白や Caspr1 の単独発現では、PC12 細胞の神経突起における Mit 分布の増加は認めなかった。しかし Caspr1 と Drp1 による Mit 分裂を抑制するドミナントネガティブ変異蛋白 Drp1K38A を共発現すると Mit 分布の増加が認められた。一方、Caspr1 の細胞内ドメインの欠失変異体と Drp1K38A の共発現では、Mit 分布の増加は認められなかった。【結論】Caspr1 がその細胞内ドメインを介して有髄神経線維におけるミトコンドリア (Mit) の局在に影響を与える可能性が示唆された。

204 ヒト大腿骨頭靱帯の神経支配

健康科学大学理学療法学科
○坂本宏史、山本泰宏

【目的】成人の大腿骨頭靱帯の存在意義を明らかにするため、免疫組織化学的二重標識法を用いて、大腿骨頭靱帯に分布する神経線維および終末の分布、ならびにその神経の侵害受容性について調べた。

【材料と方法】股関節の整形外科的手術の際に摘出された、16 個の大腿骨頭靱帯 (男女、各 8、年齢 59 歳〜91 歳) を、ホルマリンで浸漬固定後、クリオスタットで線維方向の 40-50 μ m 厚切片にした。抗 PGP9.5 抗体を用いて神経要素を標識し、この神経要素が侵害受容性である可能性を、抗サブスタンス P 抗体を用いて調べた。

【結果】神経要素の多くは、神経束とそこから分かれた単純な終末 (自由神経終末) の形態を持っていた。神経線維の少数はサブスタンス P (SP) の免疫反応性を示し、侵害受容性と考えられた。

【結論】大腿骨頭靱帯には、神経線維ならびに神経終末が分布していたが、神経要素の多くは SP の免疫反応性を欠き、侵害受容以外の感覚や血管運動に関係すると考えられた。以上から大腿骨頭靱帯は、股関節の運動や安定性などに関与している可能性が示唆された。

205 副肝静脈の分布域に関する解剖学的研究 ―肝静脈との関連について―

愛知医科大学医学部解剖学講座
○齋藤敏之、國田佳子、浅本憲、中野隆

【目的】我々は先行研究において、副肝静脈を観察し、その分布領域は右・中・左肝静脈とは重複せず、かつ、交通枝も存在しないことを報告してきた。今回、副肝静脈と肝静脈との関連について、さらに検討を加えたので報告する。【材料と方法】東京医科大学および愛知医科大学において、解剖実習に供された遺体 43 体を対象とした。肝疾患の既往のある実習体は除外した。肝門索とともに肝臓を摘出し、肝実質を除去して副肝静脈および肝静脈を剖出した。各静脈の主幹において、直径 2mm 以上の部位から下大静脈流入部までの長さ、および下大静脈流入部における断面積を測定した。【結果】43 例中 34 例において、副肝静脈が存在した。尾状葉 (S₁) および方形葉 (S₄) に分布する短肝静脈を除いて、副肝静脈は、全例において S₆ または S₇ に分布していた。副肝静脈と右肝静脈の長さは、負の相関関係を示した。副肝静脈の断面積が大きい例においては右肝静脈の断面積が小さくなる傾向があった。【結論】短肝静脈を除く副肝静脈の分布域は、全例において S₆ または S₇ であった。副肝静脈と肝静脈との間に交通枝は存在しなかった。長さおよび断面積において、副肝静脈と右肝静脈は、負の相関あるいはその傾向を示した。したがって、副肝静脈と右肝静脈は、その分布域において拮抗関係にあることが示唆された。

206 右側大動脈弓の1例

金沢医科大学・医学部・解剖学 I
○東 伸明、島田ひろき、島村英理子、八田稔久

【目的】2013 年度金沢医科大学解剖学実習で 94 歳日本人女性に右側大動脈弓を認めた。【所見】大動脈弓の分枝は左腕頭動脈、右総頸動脈、右鎖骨下動脈の順に 3 枝であった。大動脈弓は、ほぼ正中に位置する気管と食道の右前方から右後上方へ走行し、その途中、第 2、3 胸椎位で左腕頭動脈、第 2 胸椎位で右総頸動脈、第 2 胸椎位で右鎖骨下動脈を分枝した。その後、第 2、3 胸椎位で弓を描き食道と胸椎体間もぐり込み、第 3 胸椎位で、食道後方の大動脈左壁と肺動脈間に動脈管索が見られた。その後、胸大動脈は、脊柱の右側を下りた。左反回神経は、左鎖骨下動脈の前を通り、第 3、4 胸椎位で動脈管索を後ろから前に反回した。右反回神経は、右鎖骨下動脈の前を下り、左側と同じ第 3、4 胸椎位付近で大動脈弓を前から後ろへ反回した。また、椎骨動脈は、左右とも第 6 頸椎横突孔から侵入した。胸管、奇静脈系、心臓とくに異常は認めなかった。【考察】右側大動脈弓は、その足立=Williams-中川分類で M、N 型に分類される。M 型は、標準的な大動脈弓の鏡像的な走行を示し、左腕頭動脈、右総頸動脈、右鎖骨下動脈の順に分枝する。これに対し N 型は、左鎖骨下動脈が最終枝となる右側大動脈弓で、一般に左総頸動脈、右総頸動脈、右鎖骨下動脈、左鎖骨下動脈の順に分枝することが多い。本学における右側大動脈の出現数および頻度は、946 例中 3 例 (0.3%) で、そのうち M 型が全内臓逆位の 1 例 (1980) と本例の 2 例 (0.2%) で、N 型が回旋型右側大動脈弓 (2012) の 1 例 (0.1%) である。また、小泉ら (1994) は、M 型をさらに動脈管索の位置により 3 型に分けている。その分類によると本例は、M2 型に属する。この M2 型の右側大動脈弓の発生学的形成過程は、右第 4 鰓弓動脈と右背側大動脈近位部が関与し、動脈管は、左第 6 鰓弓動脈の一部と左背側大動脈近位部が関与し、左鎖骨下動脈は、左第 4 鰓弓動脈と左背側大動脈近位部さらに第 7 節間動脈が関与したもので、左背側大動脈近位部分が重複して関与したと考えたい。

207 腎俞穴に関する解剖学的検討

○梅本佳納¹、齋藤敏之²、宮木孝昌^{2,3}、林知也¹、浅本憲²、中野隆²
¹ 明治国際医療大学スポーツ科学講座 ² 愛知医科大学医学部解剖学講座 ³ 東京医科大学人体構造学講座

【目的】腎俞穴（BL23, Shenshu）は、鍼灸の臨床において腰痛や頻尿等の症状に対して用いられる刺鍼部位である。一方、Bogdukらは1982年、腰神経後枝には外側枝、中間枝、内側枝の3枝が存在することを報告している。今回、腎俞穴の近傍の腰神経後枝を詳細に観察し、腎俞穴刺鍼の作用機序について検討した。【材料と方法】愛知医科大学において、教育研究に供された解剖用遺体4体を対象とした。腎俞穴に24G鍼を刺入し、腹部内臓を摘出後、第12胸椎・第1腰椎間ならびに第4・5腰椎間において体幹を切断して腰部後壁を取り出した。椎体を除去後、脊髄を露出した。次に腰神経本幹および後枝を剥出し、鍼先との位置関係を観察した。さらにCTおよびLaser scannerを用いて3次元画像を作成し、その位置関係を3次的に解析した。【結果】第2腰神経後枝は、外側枝、中間枝、内側枝に分枝していた。外側枝、中間枝、内側枝は、それぞれ腸肋筋、最長筋、椎間関節と多裂筋を支配していた。腎俞穴に刺入した鍼先は、中間枝の支配領域に観察された。さらに第2腰神経は、交感神経幹および上下腹神経叢との間に交通枝を形成していた。【結論】腎俞穴の近傍に分布する第2腰神経は、腰部脊柱起立筋を支配し、交感神経幹および上下腹神経叢との間に交通枝を形成している。したがって腎俞穴刺鍼は、第2腰神経後枝の中間枝を介して、第2腰神経知覚枝および交感神経系を刺激し、鎮痛作用や腰部脊柱起立筋の血流改善などの効果をもたらすことが示唆された。

208 人体構造を三次元的にイメージできる
新規解剖プロトコルの試行

○高橋 純^{1,2}、酒井隆行^{1,2}、千田隆夫²
¹岐阜大学医学部 学生（3年）、²岐阜大学大学院医学系研究科 解剖学分野

人体は様々な臓器、血管、神経、結合組織などで埋め尽くされた複雑な立体パズルであり、その構造を正確に理解するためには、平面に描かれた図や写真による学習のみでは限界がある。
そこで2年次に行った解剖実習を基礎として、「人体構造を3次的にイメージできるような剖出法の開発」をテーマに研究を進めてきた。今回、新たな方法で剖出を試みた箇所として、以下の3箇所を紹介した。
1. 脳底部の血管と神経
脳底部の血管と神経を頭蓋底側に残すように大腦だけを切除することで、血管の元々の位置を保持したまま観察することができた。また、脳を段階的に切除することで、脳神経の走行も確認できた。
2. 上・下腸間膜動脈の枝
腸間膜の脂肪を丁寧に取り除いていくことで、大動脈から腸管への血管分布と上下腸間膜動脈の吻合部を観察できた。
3. 手掌の筋・血管・神経
手掌面を6層に分けて剖出していくことで、筋・血管・神経の重なりがより理解しやすくなった。
以上の観察により、異なる視点からの解剖プロトコルによって、人体の3次的な理解をより深めることができたことがわかった。

209 手指の変形性関節症(OA)について（ご遺体の観察から）

稲村真子¹⁾、大柴和貴¹⁾、岡部祐哉¹⁾、佐野絵理¹⁾、川手豊子²⁾
健康科学大学 健康科学部 作業療法学科3年¹⁾ 作業療法学科²⁾

作業療法とは、主に手で行う「作業」を通して上肢の基本動作能力の回復、並びに認知障害・精神面のリハビリを行う療法である。高齢者が手作業を行う上で障害となるのは筋力低下と関節炎であることから、今回手の変形性関節症(OA)であるブシャール結節(Bouchard node) (PIP 関節) とヘバーデン結節(Heberden node) (DIP 関節) について、山梨大学医学部解剖学講座細胞生物学教室の協力を得てご遺体での観察を行った。PIP 関節3例、DIP 関節7例について肉眼的な観察を行ったところ、ほとんどの例に骨棘と滑膜の肥厚があり、橈屈或は尺屈変形の原因となっていた。DIP 関節は橈屈するものが多く、またPIP 関節が尺屈、DIP 関節が橈屈し指がジグザグ状になっているものも観察された。関節軟骨はざらついた状態ないしは潰瘍、出血を呈しており、滑液は多く白濁或は黄色粘稠性を呈した。更にDIP 関節2例では関節腔が消失して骨癒合を起こし、可動性が失われていた。手のPIP・DIP 関節は掌側に屈曲、背側に伸展を行う関節であるが、OA では橈屈或は尺屈変形を起こして通常の屈曲伸展は困難な状態になる。DIP 関節の橈屈は指の収束点が舟状骨付近であることが原因であると考えられる。近年、OA は老化に伴って起こるロコモティブシンドロームの一つとして注目されており、作業療法でもスプリント装着による痛みの改善などの取り組みがなされている。根本的な原因は明らかではないが、関節軟骨への最終糖化反応物 (AGEs) の蓄積が原因ではないかとされている。

謝辞：今回の報告にあたり、ご遺体の観察にご協力を頂いた山梨大学大学院医学工学総合研究部 解剖学講座細胞生物学教室 竹田扇教授、二俣晴雄技官のご厚意に感謝いたします。

210 ラット卵管における神経ペプチド・マンセリンの解析

○野村真希子、江藤みちる、大河原剛、成田正明
三重大学大学院 医学系研究科 発生再生医学

【目的】 マンセリンはラット脳から発見された神経ペプチドである。視床下部・下垂体・副腎髄質など神経内分泌系のほか、内耳・甲状腺にも局在している。しかし、その他の組織での局在やその生理機能については明らかになっていない。そこで本研究では生殖器に着目し解析を行った。
【材料と方法】 成獣メスWistarラットを4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した後、卵巢・卵管・子宮を摘出し、凍結切片を作製した。抗マンセリン抗体、抗β-tubulin IV 抗体(絨毛細胞マーカー)、抗oviductin 抗体(分泌細胞マーカー)を用いて蛍光免疫組織化学を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
【結果】 マンセリンは卵巢および子宮には局在せず、卵管の粘膜上皮、特に峡部に多く局在していた。卵管は漏斗・膨大部・峡部から構成され、漏斗の端は卵管索となっている。粘膜上皮は絨毛細胞・分泌細胞からなり、絨毛細胞は漏斗で多く、分泌細胞は峡部に多く存在している。マンセリンの局在を同定するため、マーカー抗体を用いてマンセリン抗体との二重染色を行ったところ、マンセリンはβ-tubulin IV とは共存せず oviductin と共存し、特に微絨毛が存在するアピカル面に局在することが明らかになった。
【結論】 ラット卵管において、マンセリンは卵管粘膜上皮の分泌細胞に局在し、分泌物の調節などの機能を担っていることが示唆された。

211 精子形成の定量的評価法の検討

仲田浩規、若山友彦、井関尚一
金沢大学医薬保健研究域医学系組織発達構築学

精子形成障害は、マーカー分子の発現の有無や形態学的方法により定性的に解析されている。精子形成障害を点数により評価する Johnsen’s score では、精子や造精細胞、セルトリ細胞の有無により点数化(1点から10点)するが、各細胞の数や質を問わないので、雌性不妊を示すKOマウスでも正常に近い高得点になることがある。したがって、精子形成障害の理解のためには、細胞の数と質を反映した精子形成の評価法が必要である。マウスの精子形成は、精細管の構成細胞により12のステージに分類される。精細管に存在する細胞の数は精子形成の質を反映するので、ステージの決定と構成細胞の同定が精子形成の評価に必須である。本研究では、ステージごとの細胞数を測定することで精子形成の定量的な評価方法の検討を目的とした。
マーカー抗体を用いて、正常マウスにおける精細管の各細胞数を定量することができた。また、ジョンセン・スコアで正常の精子形成と評価されるNectin-3欠損マウスにおいて、精子細胞の減少を定量的に示すことができた。

212 精子形成におけるBrdU陽性細胞の同定方法の検討

若山友彦、仲田浩規、井関尚一
金沢大学 医薬保健研究域医学系・組織発達構築学分野

精巣では、BrdUは有糸分裂と減数分裂のS期の細胞のDNAに取り込まれる。DNAに取り込まれたBrdUの検出には、抗BrdU抗体を用いた免疫組織化学が用いられるが、組織切片の前処理が必要である。前処理には、や酸処理がよく用いられているが、同時に他の分子の抗原性が失われ、マーカー抗体を用いた2重染色ができなくなる原因となる。したがって、本研究では、精子形成におけるBrdU陽性細胞を同定するための最適な前処理方法を検討する。10-15週令の雄マウスの腹腔内にBrdU溶液を投与し、2時間後にマウスを4%パラホルムアルデヒド/0.1M PB (pH7.4)で固定して精巣のパラフィン切片を作製した。切片の前処理として、熱処理による抗原賦活化を用いた。熱処理による抗原賦活化は、酸処理以上の感度と低バックグラウンドでBrdU陽性細胞を検出できた。また、ステージの決定に必要なレクチン組織化学の感度と特異性も熱処理による抗原賦活化で劇的に改善した。同様に、熱処理による抗原賦活化は、セルトリ細胞マーカーの抗Gata4抗体に対しては酸処理と同程度の反応性であったが、造精細胞マーカー抗体(抗Plzf抗体と抗Cadm1抗体)の反応性は著しく改善した。したがって、BrdU陽性細胞の検出と同時に免疫組織化学、レクチン組織化学を行う場合の最適な前処理は、熱処理による抗原賦活化であることが分かった。本研究により、BrdU投与後2時間の精巣において、分化型精祖細胞であるA1型精祖細胞から前細糸期の精母細胞にBrdUが取り込まれることが分かった。

213 生体内凍結技法による PAN 腎症ラット各ネフロン部位の免疫組織化学的解析

○河嶋英里^{1,2,3}、齋藤百合花²、寺田信生²、乾聖子³、吉村吾志夫³、大野伸一²
富士吉田市立病院内科¹、山梨大学大学院解剖分子組織学教室²、昭和大学藤が丘病院腎臓内科³

【目的】生体内凍結技法(In Vivo Cryotechnique; IVCT)は、生きた動物の血行動態を保ったままで切片標本作製をすることができるために、生体組織内血漿蛋白の免疫組織化学的解析には有用である。Puromycin Aminonucleoside (PAN) によるネフローズのモデルラットにおける腎組織内各ネフロン部位での血漿蛋白の経時的变化を IVCT を用いて解析した。【材料・方法】Sprague-Dawley ラットに PAN を腹腔内投与(各群 3 匹に 5, 10, 15mg/100g B.W. を 1 回)し、PAN 投与 3 日後と 9 日後、麻酔下で IVCT を行った。さらにドライアイス・アセトン(約 -80℃)冷却 2%パラホルムアルデヒド含有アセトン中で凍結置換固定を行い、光顕用標本を作製し、HE 染色と免疫染色(Albumin, IgG1)を行った。【結果】PAN 投与 3 日後より尿蛋白量は増加し、投与 9 日後には 15mg 投与群で 300mg/日以上排泄され、低 Albumin 血症と腎機能低下を認めた。HE 染色像では、対照群と比較し投与 3 日後は明らかに相違はなかったが、投与 9 日後に尿管腔内腔のエオジン好性円柱形成と糸球体毛細血管内に赤血球うっ滞を認めた。投与 3 日後の Albumin 免疫染色像では、糸球体足細胞側にその局在を認め、近位尿管管の上皮細胞内頂上部での再吸収像が著明に増加していた。投与 9 日後では、糸球体毛細血管内の Albumin 免疫染色性は低下し、尿管腔内円柱の免疫染色性が増強した。IgG1 免疫染色でも Albumin と同様の局在が観察された。【結論】IVCT を用いた PAN 腎症ラット各ネフロン部位の免疫組織化学的解析により血漿蛋白の局在を可視化することができた。

214 Image J を用いた画像解析の適応性

○吉田 聡¹、吉田淑子²、古市恵津子²、吉田佳奈美¹、岡部素典²、北島 薫³
1 富山大学医学部医学科、2 富山大学大学院医学薬学研究部 再生医学講座
3 富山大学医学部 臨床分子病態検査講座

【目的】近年デジタル技術の進歩に伴い、組織形態学分野においても大量の画像データを効率的に分析する画像解析のニーズが増大している。本研究では、一般的に安易に入手が可能なソフトウェアを用い、個々の実験条件に対応した画像解析が可能か検討した。【材料と方法】NIH によって開発された画像解析ソフトウェア Image J を利用した。解析材料；(1) マウス肝硬変モデルにおける肝線維化の解析。肝臓のパラフィン包埋切片の Sirius Red 染色像および Azan 染色像で、画像解析を行った。(2) 細胞外マトリックス関連レセプターの解析。β-ガラクトース側鎖、キトサン側鎖を有するスチレン誘導体の人工マトリックスポリマー(PVLA)上で培養したマウス肝細胞のアシアロ糖タンパク質レセプター(ASGP-R)の発現を解析した。発現部位の抽出に際し、人工像の混入を最大限削除する方法を検討し、計測した後、ピクセル単位で定量した。【結果】(1) 構造の違いにより生じる擬似的な発現は、連続切片の H-E 染色像と対比し、色閾値の設定を行うことで解消することが可能であった。その結果、肝硬変モデルマウスにおける線維化領域の数値化が可能となった。(2) ASGP-R の発現は、微弱で散在していたが、位相差像と対比することで、正確な発現点を取り出すことが可能となった。【結論】Image J に視覚的な操作を記録、追加することで、個々の実験条件に適した自動処理を実施させることが容易であり、本システムは種々の組織解析に有用な画像解析法である。

215 マウス筋における自家蛍光について

川手豊子
健康科学大学 健康科学部 作業療法学科

2 型糖尿病モデルマウス(ob/ob mouse)に運動負荷をかけ、筋衛星細胞の活性化を指標にして筋線維の変化を見るため、マウス腓腹筋のパラフィン切片を用いて蛍光抗体法を行った。その結果、特定の筋細胞が自家蛍光を発していることがわかったため、以下に報告する。2 型糖尿病モデルマウスと正常マウスはそれぞれ 2 群に分け、運動負荷(水泳)群と通常飼育群とし、約 2 週間飼育の後、4% パラホルムアルデヒドで灌流固定を行い、パラフィン切片を作成した。脱パラフィンを行った後、抗原賦活を行い、1 次抗体: anti-CD34 antibody (Rat Monoclonal Antibody) (筋衛星細胞マーカー) 2 次抗体: Cy3-conjugated donkey anti-rat IgG の組み合わせで免疫蛍光染色を行った。ob/ob マウスの腓腹筋と足底筋の染色切片を正立蛍光顕微鏡(OLYMPUS BX50)で観察したところ、Cy3 による赤色蛍光と共に緑色蛍光、紫外光(UV)による白色蛍光を発した筋細胞膜周囲と細胞核が観察された。緑色蛍光は弱かったが、紫外光(UV)による白色蛍光は強く、これらは自家蛍光であることが明らかであった。自家蛍光を発する筋細胞は骨側(深部)に多く見られ、筋の表層ではまばらで分布に差が見られた。この自家蛍光を発する筋細胞は Type 2a 線維(但しマウスの場合赤筋)であり(Jackson et al, 2004)、運動負荷で増えることが示唆されている。筋細胞の自家蛍光は NADH が UV(350nm)と 440-470nm で、flavin と flavin 含有タンパクが 488nm と 520-560nm の間で蛍光を発する。骨格筋は加齢や運動により筋タイプの移行が起こるが、筋肉研究においてこれら自家蛍光もマーカーとして利用できるかもしれない。

216 生体内凍結技法による生体マウス筋疲労モデルの組織化学的解析

深澤雄希¹、大野伸彦¹、齋藤百合花¹、三枝岳志²、有田順²、大野伸一¹
山梨大学大学院医学工学総合研究部¹解剖分子組織学教室、²生理学第 1 教室

【目的】本研究では、生体内凍結技法を用いることで、疲労による生体内筋組織の時間的・空間的变化を、光学顕微鏡により形態学および組織化学的に検討した。【材料と方法】麻酔下マウスで腓腹筋と坐骨神経を露出し、(i)非収縮状態、もしくは坐骨神経を電気刺激し腓腹筋を収縮させ、(ii)収縮開始直後、(iii)3 分後、(iv)10 分後に生体内凍結技法を行い、パラフィン包埋切片を作製した。一部のマウスでは張力測定装置にて、筋張力の変化を測定した。HE 染色による形態学の変化、PAS 染色によるグリコーゲン消費、免疫染色(albumin, fast-myosin)による可溶性血清蛋白やミオシン分子の分布変化について検討した。【結果】坐骨神経刺激により一過性に最大張力が得られたが、1 分程度で張力減少が認められた。HE 染色では、(i)と比較して(ii)で筋線維のたわみと毛細血管内の血流のうっ滞が確認された。これらの経時変化は、収縮時間の延長に伴い減少する傾向がみられた。fast-myosin 免疫染色で計測した筋節長/A 帯長の比は、(i)で最も大きく、(ii)と(iii)で減少するが、(iv)では(i)と有意差がなかった。PAS 染色では(iii)には、筋線維により染色性に差がみられたが、収縮時間の延長に伴い染色性は減弱した。albumin 免疫染色像は、(i)と比較して(ii)で筋線維の辺縁部に点状の分布が認められた。この分布は収縮を続けることで著明になり、(iv)ではのう胞状に認められた。【結論】坐骨神経刺激により、収縮した筋線維の形態変化は経時的に減弱し、筋線維内グリコーゲン減少や可溶性血清蛋白の筋線維内 T 細管への流入が明らかになった。

217 生体内凍結技法によるマウス癌肺転移モデル誘導性凝固亢進状態と血行動態の可視化法

○齋藤百合花¹、寺田信生^{1,2}、大野伸彦¹、大野伸一¹
¹山梨大学大学院 医学工学総合研究部 解剖学講座分子組織学教室
²信州大学 医学部 保健学科 基礎作業療法学講座

【目的】癌細胞によって誘導される肺血管内凝固亢進状態と血行動態を、生体内凍結肺組織切片標本上で解析した。【材料と方法】麻酔下 C57BL/6J マウスの呼吸状態を維持し、マウス悪性黒色腫細胞株(B16BL6)を右心室内に注入移植し、1 分あるいは 5 分後、量子ドット(QD)を右心室内に持続注入して 10 秒後に肺を生体内凍結した。肺組織試料は型のごとく凍結置換固定し、パラフィン包埋した。【結果】癌細胞移植後 1 分のマウス肺組織では、癌細胞が肺中隔壁毛細血管内に散在あるいは集合して認められ、血小板凝集が始まっていたが、QD は全ての血管内に局在した。移植後 5 分の肺組織では、多くの血小板凝集が認められ、腫瘍血栓形成が開始していた。QD 局在は血管により異なり、QD が見られない部位は塞栓や腫瘍血栓形成による初期段階の血行動態変化であると考えられた。癌細胞塊の周囲では、フィブリン免疫染色陽性であり、フィブリン形成過程が組織切片上で可視化できた。一方、血小板では Src tyrosine kinase の Y418 および Y527 がリン酸化されており、一部の血小板が活性化していた。【結論】生体内凍結技法と蛍光 QD 注入により、血行性癌転移における生体内癌細胞局在と肺血行動態変化、フィブリン形成過程、血小板活性化を同一組織切片上で、光イメージング法に対応する機能分子形態学的解析ができた。