日本解剖学会

第74回中部支部学術集会

会期：平成26年10月11日（土）、12日（日）
会場：金沢大学宝町キャンパス

101 不動化によって惹起される疼痛に対するホットパックの効果について

中川達貴^{1,2}、堀玲菜²、大竹晋平^{2,3}、菅谷和輝²、平賀慎一郎^{1,2}、村瀬詩織⁴、水村和枝⁴、尾崎紀之¹、肥田朋子²：金沢大学医薬保健研究域機能解剖学分野¹、名古屋学院大学リハビリテーション学部²、白山リハビリテーション病院³、中部大学生命健康科学部⁴

【目的】臨床では、麻痺などによる長期臥床や骨折などにより不動化状態に陥ることがあり、不動化に伴い疼痛が生じることが報告されている。我々はその疼痛に対してホットパックを行うことで治療できないかと考え、ホットパックが疼痛発生に及ぼす影響について行動評価と疼痛関連物質を指標として検討した。【材料と方法】対象は8週齢のWistar系雄ラット25匹で、無作為に通常飼育するNormal群(N群)、両側足関節をギプス固定するControl群(C群)、ギプス固定とホットパックを施行するHot pack群(H群)に分けた。C群、H群は足関節最大底屈位で4週間ギプス固定した。H群は、ホットパックを1日20分間、週5日施行した。行動評価として足底の皮膚痛覚閾値はvon Frey filamentを用いて、腓腹筋内側頭部の筋圧痛閾値はRandall-Selitto装置を用いて測定した。腓腹筋はELISA法により神経成長因子(NGF)を定量し、L4-6の後根神経節(DRG)では、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)の免疫染色を行った。【結果・考察】行動評価の結果から不動化により疼痛が生じ、ホットパックによる治療介入で疼痛発生の遅延がみられた。また、不動化に伴いCGRP含有細胞が小型細胞から中型細胞へと偏移し、腓腹筋でのNGF含有量が有意に増加し、疼痛が発生していることが示唆された。そして、ホットパックにより不動化に伴う疼痛発生を予防し、CGRP含有細胞の中型細胞への偏移とNGFの増加を抑制することができたことから、ホットパックは不動化による疼痛発生を抑制することが示唆された。

102 ギプス固定後慢性痛モデルラットの広範囲機械痛覚過敏は明らかな神経損傷に起因しない

大道 裕介^{1,2,4}、大道 美香^{1,2}、牛田 享宏²、佐藤 純^{2,3,4}、中野 隆¹
1. 愛知医科大学 医学部 解剖学講座、2. 愛知医科大学 医学部 学際的痛みセンター、3. 名古屋大学 環境医学研究所、4. 名古屋大学 動物実験支援センター

【目的】我々は、ギプス固定後慢性痛(chronic post-cast pain: CPCP)モデルラットに生じる広範囲機械痛覚過敏のメカニズムについて、脊髄の多分節におけるミクログリアの活性化、およびそれに続くアストロサイトの活性化が関与することを明らかにしてきた。しかし、「片側後肢のギプス固定による機械的圧迫が広範囲に神経を障害した結果、多分節においてグリア細胞が活性化し、痛覚過敏が発生したのではないか」という疑問に対して、明確な解答は得られていない。そこで今回、片側の後肢ギプス固定中およびギプス除去後の神経損傷の程度と一次感覚神経の興奮性について検討した。【材料と方法】

実験にはSD雄ラットを用いた。ギプス固定前、固定終了時(2週間目)、除去後1日目に、固定部の支配神経節に対応する第3～5腰神経後根神経節(DRG)を、神経損傷マーカーであるATF3で免疫染色した。これを未処置群および坐骨神経切断群(術後3日目)と比較し、神経損傷の程度について検討した。また、第4腰神経DRGにおいて、神経興奮マーカーであるpERKとsubstance Pの免疫二重染色を行い、一次感覚神経の興奮性について検討した。

【結果】ギプス固定中にATF3陽性細胞数の増大は認められなかった。一方、pERK免疫応答は、ギプス除去後の固定側においてのみ増大し、その一部はsubstance Pと共染された。

【結論】CPCPモデルラットに生じる広範囲機械痛覚過敏は、ギプス固定による神経損傷ではなく、ギプス除去後に生じた固定側の一次感覚神経の異常興奮に起因することが示唆された。

103 慢性複合ストレスによる脊髄ミクログリアの活性化と病的疼痛

名古屋大学大学院医学系研究科機能組織学分野
○安井正佐也、時實恭平、校條由紀、木山博貴

【目的】慢性複合ストレス動物モデルにおいて、視床下部-下垂体系の器質的变化を伴う異常や免疫系の異常が示されホメオスタシスの崩壊が示唆されている。本モデルを用いて、慢性複合ストレスが病的疼痛を惹起するメカニズムについて解析したので報告する。

【材料と方法】雄性SDラットを1.5cmの水を張ったケージで5日間飼育した。疼痛解析はRandall-Selitto test, von-Frey testの評価を行った。また、筋・皮膚組織・血液および神経組織の組織学的・生化学的解析を行った。

【結果】5日間の複合ストレス負荷により4日間の筋性痛覚過敏を認め、2日間のアロディニアが認められた。皮膚・筋・血液において組織学的・生化学的に炎症は認められなかった。しかし、脊髄後角の一部の領域においてミクログリアの増殖と活性化を認めた。アストロサイトの活性化は認められなかった。このミクログリア活性化はミノサイクリン髄腔内投与により抑制され、同時に病的疼痛も抑制した。また、ストレス負荷後1週間の安静によってミクログリアの活性化は消失し通常の静止型へ戻った。

【結論】慢性ストレスにより生じる病的疼痛発症の原因には、中枢のミクログリア活性化が関与している。

104 妊娠中のウイルス感染が引き起こす神経伝達物質異常の解剖学的検討

氏名・所属をご記入ください
○大河原剛、江藤みちる、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】妊娠中のウイルス感染は、生まれてきた児に様々な先天異常を引き起こすことはよく知られている。近年、妊娠中のウイルス感染が統合失調症や自閉症のリスクファクターであることが報告されているが、妊娠中のウイルス感染が胎児脳の発達に及ぼす影響に関してはあまりわかっていない。本研究では、妊娠中のウイルス感染が、胎児脳の特にセロトニン神経に与える影響を明らかにすることを目的とする。

【材料と方法】ウイルス感染状態を再現するために、我々は合成二本鎖RNAであるpolyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly I:C)を妊娠ラットに投与した。胎児脳のセロトニン神経を評価するために、胎生15日の胎仔から後脳部分の神経管を取り出し、抗セロトニン抗体で染色を行うことでセロトニン神経の評価を行った。次に、生まれた仔のセロトニン神経を評価するために、生後50日目の仔ラットの海馬を取り出し、HPLCによりセロトニン含量の測定を行った。

【結果】胎仔脳の評価を行った結果、poly I:C投与群においてセロトニン神経細胞数の有意な増加が見られた。さらに、生後の仔ラット脳中のセロトニン含量を測定した結果、poly I:C投与群においてセロトニン含量の有意な減少が見られた。

【結論】自閉症には、セロトニン神経の異常が関与していると考えられている。妊娠中のウイルス感染が、胎仔及び生まれてきた仔のセロトニン神経系に異常を引き起こすことから、妊娠中は生まれてきた児の情動認知行動に異常が起きないためにもウイルス感染に注意する必要がある。

105 ラットの生後発達に伴うノルアドレナリンの解剖学的検討

○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】我々は胎生期の化学物質ばく露がセロトニン神経の初期発達に異常を引き起こすこと、即ち、妊娠ラットにサリドマイドやバルプロ酸を投与して得られた仔はセロトニン神経系の異常を示す自閉症モデル動物となること、有機水銀チメロサールを妊娠ラットに投与すると仔のセロトニン神経およびドーパミン神経の発達異常を引き起こすことを報告してきた。発達障害におけるモノアミン神経系の研究発展のため、今回ノルアドレナリン神経に注目して生後の発達に伴う変化を解析した。

【材料と方法】生後7日～50日の雄Wistarラットから脳を8領域(小脳、橋、延髄、中脳、視床、海馬、線条体、大脳皮質前頭葉、大脳皮質頂側頭-後頭葉)に分けて採取し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いてモノアミン定量解析を行った。組織学的解析は、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し厚さ50μmの脳浮遊切片を

作製し、抗ドーパミンβ-ヒドロキシラーゼ抗体を用いて免疫組織化学を行った。【結果】ノルアドレナリンは生後の神経発達に伴って量が増加し、脳の領域によってその増加パターンは異なっていた。ノルアドレナリン量は青斑核など神経核が局在する延髄や太い神経束が通過する中脳は生後3週までにプラトーに達する一方、神経終末が到達する大脳皮質や海馬では生後50日まで経時的に増加を続けていた。

【結論】ノルアドレナリン神経は生後3週齢までに神経核や主な神経束が完成し、神経終末への投射はその後も時間をかけて徐々に成熟すると考えられる。

106 自閉症関連因子 CD38 のオリゴデンドロサイト発達に与える影響

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

自閉症のモデル動物である CD38 ノックアウト (KO) マウスではオキシトシンの分泌量が低下するため、子育て行動の異常、社会性の低下がおきる。一方、自閉症患者脳において白質の形成異常やオリゴデンドロサイトの発達異常があることが知られている。本研究では、CD38 がオリゴデンドロサイトの発達に与える影響を明らかにするため、CD38KO マウスを用いてオリゴデンドロサイト発達異常を解析した。まず、野生型マウスの大脳皮質において CD38 は生後 7 日齢から 21 日齢において発現が強く、オリゴデンドロサイトのマーカー遺伝子の発現も同時期において発現が強かった。培養オリゴデンドロサイトにおいても、CD38 mRNA は未分化なオリゴデンドロサイトに発現が強かった。CD38 KO マウスにおいては、生後 7 日齢～21 日齢において、オリゴデンドロサイトのマーカー遺伝子 (MBP, CNP) の発現が減少していたため、CD38 の欠損はオリゴデンドロサイトの発達に抑制的に働くことが示唆された。

107 橈骨神経浅枝が皮下へ出現する位置及び橈骨神経浅枝と橈側皮静脈の交叉の位置と傾度に関する解剖学的調査

向井加奈恵¹、小松恵美¹、浦井珠恵¹、中島由加里¹、尾崎紀之²、中谷壽男³

1 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科保健学専攻臨床実践看護学講座

2 金沢大学医薬保健研究域医学系機能解剖学分野

3 金沢大学医薬保健研究域保健学系看護科学領域

【目的】橈骨神経浅枝が皮下に出現する位置及び橈側皮静脈と交叉する位置と傾度を明らかにすること。【材料と方法】本学において解剖実習に供されたご遺体 28 体 28 右肢(平均年齢 84.9±9.2 歳、男性 15 体、女性 13 体)を用い、金沢大学倫理審査委員会の承認を得て実施した(承認番号 501)。データは平均値±SD(最小値-最大値)で示した。【結果】外側上顆から橈骨茎状突起までの距離は 22.3±1.7cm (19-25) であった。橈骨茎状突起より近位 6.7±0.8cm (5.0-8.5) の地点で橈骨神経浅枝が腕橈骨筋の深部より皮下に出現し、この神経より背側に位置する橈側皮静脈と伴行・下行した。この橈骨神経浅枝の出現部位は、外側上顆から橈骨茎状突起までの距離の遠位約 1/3 に位置していた。また、皮下に出現した橈骨神経浅枝は橈骨茎状突起より近位 6.5cm から遠位 3.0cm の位置で橈側皮静脈と交叉した。その傾度は橈骨茎状突起より近位 22 例、遠位 6 例、橈骨茎状突起の位置 5 例であった。橈骨神経浅枝は常に橈側皮静脈より深層に位置していた。また、橈側皮静脈の太さに対する橈骨神経浅枝の太さの比は 0.88±0.31 (0.53-1.91) であった。【結論】外側上顆から橈骨茎状突起までの距離の遠位約 1/3 の位置で橈骨神経浅枝が皮下に出現し、その後橈側皮静脈と交叉していることが明らかとなった。それゆえ、手首付近の橈側皮静脈穿刺を実施する場合には、橈骨神経浅枝との位置関係を考慮して行う必要がある。

108 大腿二頭筋(長頭)肉離れの背景について -形態と筋機能からの検討-

大阪体育大学体育学部機能解剖学研究室¹⁾、順天堂大学大学院医学研究科解剖学・生体構造科学講座²⁾、愛知医科大学医学部解剖学講座³⁾

○熊崎敏真^{1) 2)}、坂井建雄²⁾

本研究では、ハムストリングス 4 筋の肉離れが特定の部位と肢位で好発する理由を明らかにするために、解剖体で形態解析、生体での機能解析を行った。解剖体での形態解析では、ハムストリングス 4 筋の筋長 (TML) と筋線維長 (FL) を計測し、更に膝関節の角度を変えて各筋の筋長を計測した。ハムストリングス各筋の筋長に対する筋線維長の比率 (FL/TML) と、膝関節屈曲位 4 条件における TML の変化も算出した。膝関節屈曲位 4 条件における筋長の変化は、膝関節屈曲位 0° における FL を基準に正規化した数値 (Δ TML/FL) で比較検討した。生体での機能解析では、等尺性収縮時の膝関節屈曲トルクとハムストリングス各筋の筋活動量を計測した。大腿二頭筋長頭 (BF-L) と半腱様筋 (SM) は半羽状筋の形態を有し、大腿二頭筋短頭 (BF-S) や半腱様筋 (ST) と比較し FL/TML は小さかった。更に Δ TML/FL は、BF-L と SM では他の 2 筋に比べて顕著に大きかった。ハムストリングス 4 筋のうち半羽状筋である BF-L と SM は、膝関節伸展位により筋線維が過度に伸長され肉離れのリスクが高かった。膝関節伸展位での筋活動量は BF-L と SM でほぼ同等だが、Ward らの報告した生理学的筋断面積 (PCSA) を参考に PCSA あたりの筋活動度を算出すると、BF-L の方が SM より 1.6 倍ほど大きく肉離れのリスクが大きい事が示された。これらは、BF-L がハムストリングの肉離れ好発部位であり、膝関節伸展位が好発肢位である事を裏付けた。

109 母指矢状索に関する機能解剖学および臨床解剖学的考察 -中指矢状索と比較して-

高橋 亮¹⁾²⁾、木全健太郎¹⁾²⁾、國田佳子²⁾、吉野圭祐³⁾⁴⁾、中野 隆²⁾

¹⁾ 中和医療専門学校柔道整復科、²⁾ 愛知医科大学医学部解剖学講座、

³⁾ 医療法人めぐみ めぐみ整形外科、⁴⁾ 神奈川柔整鍼灸専門学校柔道整復学科

【目的】矢状索は、MP 関節を円筒状に取り囲み、掌側板と指伸筋腱を連結する腱膜状の構造である。母指と示指～小指において矢状索の構造を詳細に比較した報告は見当たらない。今回、母指と中指の矢状索を比較し、興味深い知見を得たので報告する。

【対象と方法】愛知医科大学解剖セミナーに供された解剖体の母指 20 指と中指 2 指を用いた。母指・中指矢状索を剖出し、肉眼的に観察した。各 1 指については、伸筋腱の長軸に垂直な薄切切片を作成し、HE 染色を施して組織学的に観察した。

【結果】母指矢状索と中指矢状索は、伸筋腱付着部において構造の相違を認めた。母指矢状索は明瞭な層構造を呈し、大部分が長母指伸筋腱 (以下、EPL 腱) をフールド状に覆っていた。一方、中指矢状索は、大部分が指伸筋腱に直接付着していた。

【考察】母指矢状索と EPL 腱の結合は脆弱であり、EPL 腱の滑走に有利な構造であることが示唆された。一方、中指矢状索と指伸筋腱の結合は強固であり、指伸筋腱の安定性に有利な構造であることが示唆された。矢状索損傷に起因する「伸筋腱脱臼」は、中指に好発し、母指での発生は稀である。母指矢状索は、EPL 腱との結合が脆弱なため、損傷を免れやすく、「伸筋腱脱臼」をきたしにくいと考えられた。一方、「母指 MP 関節脱臼」においては、母指矢状索が掌側板を関節内に陥入させることで、特有な 'Z 字状変形' を引き起こすと考えられた。すなわち、矢状索の構造が、「伸筋腱脱臼」の発生頻度と 'Z 字状変形' の発生に関係することが示唆された。

110 信州大学医学部における横断解剖実習とその際認められた動脈硬化による大動脈蛇行の一例

信州大学医学部組織発生学講座

○平島 寛司、岳 鳳鳴、友常 大八郎、佐々木 克典

【緒言・目的】本学では、人体を異なる視点から見ることによって構造の認識を深めること、画像解析読影の基礎を身に付けることを目的として、通常の系統解剖学実習に加え、胸腹部臓器における横断解剖実習を行っている。今回はその方法を概説するとともに、本年度みられた動脈硬化による大動脈蛇行の一例について示す。

【実習・講義】実習では解剖体より胸腹部を一塊として取り出し、これを 8 か所で切断して横断体を作成する。スケッチと剖出項目の同定後、横断体と CT 画像を用いた試問を行う。また、講義では通常の実習講義に加え、次の 3 項目にポイントを置いて横断面の説明を行う。(1) 横断面は CT や MRI 同様、必ず下方から上方を眺めさせる。(2) 個々の横断面で適切な指標を決め、それを中心に構造の位置関係を理解させる。(3) 横断面を説明後、それに対応する CT、MRI および超音波画像と比較させ、画像診断への応用を意識させる。【症例と所見】2014 年度の実習において、右側大動脈弓と動脈硬化による大動脈蛇行の鑑別を要した解剖体 (98 歳女性、死因：肺炎) を経験した。下行大動脈が食道の右側後方を走行していたため、まずは発生学的異常による右側大動脈弓を疑った。しかし大動脈弓より分岐する血管および右反回神経は通常の走行と判断された。そのため、大動脈内壁の石灰化および腹部大動脈の蛇行の所見より、動脈硬化による大動脈蛇行が起こったものと判断した。【考察】実際の横断面の導入は画像のみでは得にくい構造の位置関係、三次元像を理解するうえで重要である。さらに本例のような破格を疑う解剖体を横断解剖に供することで、正確な構造の理解と臨床への応用に有益である。

111 右外腸骨動脈を取り囲む静脈輪の 1 例

1. 愛知医科大学 医学部 解剖学講座

2. 東京医科大学 医学部 人体構造学分野

3. 大阪体育大学 体育学部 機能解剖学研究室

○矢倉富子¹、林省吾²、内藤宗和¹、熊崎敏真³、伊藤正裕²、中野隆¹

【目的】通常、腸骨静脈系は腸骨動脈系の背側を走行し、下大静脈に流入する今回、解剖実習室 (84 歳女性) において見出された『右外腸骨動脈を取り囲む静脈輪』の一例について報告する。

【所見】本例では、右外腸骨静脈から分枝した細い静脈が、右外腸骨動脈の「腹側」を走行して下大静脈に流入していた。この静脈は、右外腸骨静脈とともに静脈輪を形成し、右外腸骨動脈を取り囲んでいた。また、右内腸骨静脈は左総腸骨静脈に流入し、右総腸骨静脈が存在しなかった。さらに、右閉鎖静脈が右外腸骨静脈に流入していた。

【考察】本例で見られた静脈輪は、「発生過程において、腹大動脈あるいは右総腸骨動脈の「腹側」に出現する静脈の遺残によって、形成された」と推測される。腸骨静脈系が総腸骨動脈の「腹側」を走行する変異は Preatortic iliac confluence (Edwards 1951, Ruemenaph et al. 1998) として知られるが、本例のように静脈輪を形成する例はきわめて稀である。しかし、右大腿静脈からの中心静脈カテーテル挿入や骨盤内手術においては、このような変異例の存在について留意することが重要である。

112 上肢においてみられた浅上腕動脈～浅尺骨動脈の破格例

山口豪¹⁾, 中谷壽男²⁾, 堀紀代美¹⁾, 白石昌武¹⁾, 中村恒夫¹⁾, 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) 金沢大学医薬保健研究域保健学系 看護科学領域

【所見】95歳男性。右上肢にて浅上腕動脈(SBA)は正中神経ワナの外側根と内側根の吻合部より近位で、腋窩動脈より分岐しており、正中神経の前部を通って肘窩に至っていた。肘窩部ではSBAは上腕二頭筋腱膜の直前で橈骨動脈と尺骨動脈に分岐し、尺骨動脈は上腕二頭筋腱膜より浅層を走行し、浅指屈筋、円回内筋の表面を下行していた(浅尺骨動脈)。浅尺骨動脈(SUA)は屈筋支帯の浅層を尺骨神経と共に走行していた。橈骨動脈は通常の走行をしており、SUAは橈骨動脈浅掌枝と浅掌動脈弓を形成していた。一方、SBAが分岐した腋窩動脈は、SBA分岐後に上腕回旋動脈を分岐し、上腕動脈に相当する動脈となった。上腕動脈に相当する動脈は上腕深動脈を分岐し、その後上腕二頭筋内側に沿って下行し、上腕筋の深部の方に枝を出しながら上腕筋内側に沿って下行していた。

【考察】本例では正中神経ワナの外側根と内側根の吻合部より近位でSBAが分岐している点と、上腕二頭筋腱膜より浅層を走るSUAがみられた点の2点が破格として挙げられる。SUAは0.7-9.3%の頻度でおこるとされ、上腕動脈から分岐する例や、腋窩動脈から分岐したSBAがそのままSUAとなる例が報告されているが、上記の2例において橈骨動脈はいずれも上腕動脈から分岐している。本例のようにSBAから橈骨動脈とSUAの両方が分岐する例は、報告はきわめて少なく、まれな例であると考えられる。

113 メタボリックシンドロームラットモデル MSC 由来 iPS 細胞の樹立

○竹中(蛭川)菜々^{1,2)}, 川端佑果¹⁾, 渡辺彰吾³⁾, 永田浩三³⁾, 鳥橋茂子¹⁾
 1,名古屋大学大学院医学系研究科リハビリテーション療法学専攻
 2,日本学術振興会特別研究員PD(京都大学iPS細胞研究所)
 3,名古屋大学大学院医学系研究科医療技術学専攻

【目的】近年、共同研究者の永田らはヒトの病態をよく表すメタボリックシンドローム(MetS)の新規ラットモデルを確立した(Nutr Diabetes. 2011)。本研究ではMetSラットの体細胞から人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells; iPS細胞)を樹立し、その性質を解析することを目的とした。【材料と方法】実験には、MetSのラットモデル(DahIS.Z-Lepr^{fl/Lepr})と、対照ラット(DahIS)を用いた。また、間葉系幹細胞(MSC)に初期化遺伝子を導入すると、より安定した高い確率でiPS細胞が樹立できるという報告がある。そこで我々は、各々のラットのMSCを分離収集し、初期化遺伝子とGFP遺伝子を導入した。その後、GFP陽性の細胞コロニーのみをクローニング培養し、初期化遺伝子の発現と多分化能力を評価した。さらに、樹立されたMetSラット由来iPS細胞と対照ラット由来iPS細胞の細胞生理学的特徴を比較した。【結果】ラットMSCから、GFPタンパク陽性のクローン細胞コロニーが多数形成された。それらはほぼすべて、iPS細胞であることが証明された。さらに、MetSラット由来iPS細胞と対照ラット由来iPS細胞とでは、その性質に差が見られた。【結論】ラットのMSCから高効率でiPS細胞が作製でき、それらはほぼ全てのクローンで高い分化能力と増殖能力が証明された。また、MetSラット由来iPS細胞と対照ラット由来iPS細胞とではその性質に差が見られた。本研究で樹立されたMetSラット由来iPS細胞は病態解明に向けた細胞モデルとして非常に有用な研究ツールとなると考えられる。

114 ヒト卵巣癌由来 CD24(+)/SSEA4(+)細胞の特性

吉田淑子¹⁾, Fang Wang¹⁾, Kaixuan Zhou¹⁾, 古市恵津子¹⁾, 岡部素典¹⁾, 吉田佳奈美¹⁾, 齋藤 滋²⁾, 二階堂敏雄¹⁾
 1 富山大学大学院医学薬学薬学部再生医学講座, 2 同産婦人科講座

【目的】癌組織に存在する幹細胞を標的とした治療法の開発のために、ヒト卵巣癌の癌幹細胞の表面マーカーを同定した。【材料と方法】富山大学の倫理委員会に基づき、付属病院で外科的な治療を施した試料を研究対象とした。癌原性の強い細胞を、細胞表面マーカーにより同定するため、幹細胞関連転写因子や細胞表面マーカーの発現をPCR法やFACSにより解析した。自己複製能、Sphere形成能、薬物抵抗性およびscid mouseへの異種移植を行った。組織は、病理組織学および免疫組織学的に検討した。【結果】単離した卵巣癌細胞における表面マーカーの発現と幹細胞関連遺伝子の発現の相関を検討したところ、CD24およびSSEA4陽性細胞が陰性細胞より幹細胞関連遺伝子を強く発現することが確認された。CD24(+)/SSEA4(+), CD24(+)/SSEA4(-), CD24(-)/SSEA4(+), CD24(-)/SSEA4(-)の4群において、その特性を検討したところ、CD24(+)/SSEA4(+)細胞群のみに自己複製能が見られた。Sphere形成能やsoft agarにおけるcolony形成能も他の群と比較し、有意に高かった。Scid mouseの皮下組織に100個の細胞を移植したところ、CD24(+)/SSEA4(+)細胞群のみ、4例中4例に腫瘍の形成が認められた。【結論】CD24およびSSEA4の二重陽性は、卵巣癌幹細胞のマーカーとして有効である。

115 マウス坐骨神経における膜骨格蛋白4.1Gとの抗angiominin抗体の免疫交差反応性の検討

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

Angiomininと4.1Gの末梢神経系における関連性を検討する際に種々抗体特異性の評価時に、human angiominin C-末端(AC; アミノ酸1,034-1,084ペプチド)に対して作製された抗体(AC-Ab)が、マウス4.1Gに免疫交差反応性をもつ現象を認めたので報告する。【方法】1) Western blot: C57BL/6(WT)および4.1G遺伝子欠損(KO)マウス坐骨神経(SN)のtissue lysateをSDS-PAGE後、AC-Ab, 抗4.1G抗体(4.1G-Ab)でblotした。2) 免疫組織化学的染色(IHCS): paraformaldehyde固定したSNの単離標本をAC-Ab, 4.1G-Abで免疫染色した。3) 免疫沈降(IP): SN lysateを4.1G-AbでIP後、4.1G-Ab, AC-Abでblotした。4) 4.1G-knock down(KD)細胞の検討: マウスメラノーマ由来細胞株B16-BL6に4.1G-shRNA発現遺伝子導入レンチウイルスを感染させ4.1G-KD細胞株を樹立、そのlysateをAC-Ab, 4.1G-Abでblotした。5) 抗体吸収試験(Ab-t): AC-Abの作製ペプチドACによりAC-Abを吸収後、blotおよびIHCSを行った。【結果】1) WTマウスSNのblotにより、130kDおよび80kDに同一パターンのラインが得られ、4.1G-KOマウス試料では消失した。2) WTマウスではAC-Abと4.1G-AbのどちらでもSchmidt-Lanterman切痕に認め、4.1G-KOマウスでは消失した。3) 4.1G-AbでIP後、4.1G-Ab, AC-Abでのblotパターンは同一であった。4) 4.1G-KD細胞の4.1G-Ab, AC-Abによるblotで、消失したラインは同一パターンであった。5) Ab-tではAC-AbによるblotラインおよびIHCSでは消失したが4.1G-Abでは消失しなかった。【結論】本結果からAC-Abがマウス4.1Gに免疫交差反応性をもつ抗体であることが示唆された。

116 ユニークなモノクローナル抗体を用いたチューブリン翻訳後修飾の解析

Vu Thi Hang¹⁾, 池上浩司¹⁾, 瀬藤光利¹⁾
¹浜松医科大学 解剖学講座・細胞生物学分野

微小管を構成するチューブリンは様々な翻訳後修飾を受ける。特に神経細胞では、複数の翻訳後修飾がチューブリンのカルボキシ末端(C末端)で同時に起こり、微小管表面に大きな多様性を生み出している。これまで使われてきた抗体は単一の翻訳後修飾を認識するのみで、複数の修飾状態を一度に認識する抗体はなかった。我々は、チューブリンC末端の二つの翻訳後修飾を同時に認識するユニークな抗体を作成し、神経組織における修飾状態を解析した。作成した抗体は、チューブリンのΔ2修飾を選択的に検出した。抗体はCOS7細胞にΔ2化酵素とグルタミン酸化酵素を共発現させた場合のみ、微小管を非常に強く認識した。それぞれの酵素を単独で発現した場合は、微小管をほとんど認識しなかった。作成抗体は神経組織のチューブリンを非常に強く認識した。免疫組織化学染色では、主に細胞体と樹状突起を強く認識した。神経細胞死を誘発するストレス刺激を脳に与えると、作成抗体により認識されるチューブリンが増加した。それぞれの修飾に対する抗体では顕著な変化はあまり観察されなかった。二種類の翻訳後修飾を一度に認識するユニークな抗体の作成に成功し、個々の修飾を認識する抗体では検出できなかった神経組織における特徴的分布や刺激による変化を観察することに成功した。

117 神経系前駆細胞偽重層化構造の維持機構

篠田友靖¹⁾, 長坂新¹⁾, 樋口亮²⁾, 深澤有吾³⁾, 三浦岳⁴⁾, 岡本麻友美¹⁾, 長山雅晴²⁾, 宮田卓樹¹⁾

1. 名古屋大・院・医学系研究科, 2. 北大・電子科学研究所, 3. 福井大・医, 4. 九大・院・医学系研究院

大脳皮質原基において、神経系前駆細胞(以下、前駆細胞)は脳室に面した一定の領域(脳室帯)に存在している。前駆細胞たちは上皮構造をとり、脳室面であdhrens junctionを形成する。一方前駆細胞は脳室側・脳膜側に細長い筒状構造(apical process, basal process)を持つので、脳室帯では前駆細胞の細胞体が見「積み重なった」状態、すなわち偽重層化構造をなしている。また前駆細胞の細胞体は細胞周期と相関した核運動(Interkinetic Nuclear migration, 以下 INM)を行うことが知られており、その分子機構に関する知見も集積しつつある。しかしながら個々の前駆細胞のINMがどのように「調和」して、前駆細胞集団からなる脳室帯の偽重層化構造を「計時的に維持」出来ているかは不明であった。前駆細胞の集団動態数理シミュレーションを行った結果、従来の説に反して、誕生直後G1細胞が脳室面隣接域から脳膜方向に自立的に立ち去ることが重要であることが示唆された。この「自立的」核運動の由来を調べるために脳室面近傍域の前駆細胞動態を高時間・空間分解能で観察した結果、間期前駆細胞のapical process先端領域に極めて動的な膜構造が存在することを見出した。さらに脳室帯の電顕観察を行った結果、脳室面近傍域が前述の膜構造で充満しており、分裂期およびその直前直後の前駆細胞の細胞体が膜構造に包まれるように存在することが明らかになった。この膜構造の動態が誕生直後G1細胞のINMに関与する可能性を現在検証している。

118 反発因子 FLRT 2 による血管形成機構

山岸寛、佐藤康二

浜松医科大学解剖学講座神経機能学分野

私は近年、神経系における新規ガイド因子 FLRT2 を見出し、神経発生異常を報告した (Yamagishi et al., EMBO J., 2011)。FLRT2 はネトリン受容体である Unc5D に強く結合し、脳室下帯から皮質へ移動する細胞を反発的に制御していた。FLRT2 ノックアウトマウスは神経系の異常に加え、体表出血が観察され、半数以上が胎生致死となる。興味深いことに胎生 9.5 日齢 FLRT2 ノックアウトマウスの血管内皮細胞では接着因子である PECAM1 の発現が顕著に低下していた。すなわち、PECAM の発現が抑制されたことにより血管が脆弱になっている可能性が考えられる。また、LacZ ノックインマウスを用いた解析により、FLRT2 は胎生 10.5 日齢頭部外側部において強い発現が観察された。ノックアウトマウスにおいては、当該部位における静脈の分岐が少なく、FLRT2 が分岐に関わっている可能性が考えられた。実際、静脈系血管内皮細胞である HUVEC は FLRT2 に対して回避反応を示した。

以上の結果から、FLRT2 は血管内皮細胞に対しても反発性ガイド因子として機能し、血管形成に関わっていることが明らかとなった。

119 TRPV4 による血液脳脊髄液関門の機能調節

成田啓之¹、笹本祥平¹、小泉修一²、竹田扇¹¹山梨大学大学院 総合研究部 解剖学講座細胞生物学教室²山梨大学大学院 総合研究部 薬理学講座

【目的】血液から中枢神経系への物質移動は血液脳関門 (BBB) および血液脳脊髄液関門 (BCSFB) により制限されている。脈絡叢上皮細胞 (CPECs) によって構成される BCSFB の調節機構には不明な点が多い。今回我々は CPECs における役割がまだよく知られていない非選択的カチオンチャネル TRPV4 に注目し、その生理機能を検討した。【材料と方法】CPECs はブタ組織を得て初代培養した。TRPV4 の細胞内局在は免疫染色により検討した。TRPV4 の活性は Fura2-AM を用いて解析した。また TRPV4 の活性が CPECs の形態および経上皮物質輸送にどのような影響を及ぼすかを、免疫染色およびトランスウェル培養系などを用いてそれぞれ検討した。【結果】CPECs における TRPV4 は頂端側の細胞膜に局在していた。TRPV4 選択的アゴニスト GSK1016790A で初代培養 CPECs を刺激すると、直ちに $[Ca^{2+}]_i$ が上昇するとともにタンパク質のリン酸化を誘導した。その後、細胞内のアクチン線維が減少し、10-20 分後には細胞接着結合が崩壊した。一方、TRPV4 特異的アンタゴニスト HC067047 で CPECs を処理してその基礎活性を阻害すると、基底側から頂端側への $\alpha 2$ マクログロブリン (A2M) の輸送量が減少した。【結論】以上の知見から、CPECs における TRPV4 はバリア機能の調節および経上皮細胞輸送の制御を担っていることが示された。TRPV4 は炎症関連のメディエーターにより活性化するため、中枢神経系に生じた炎症に反応して BCSFB の機能を調節していると考えられた。

201 マウス脳梗塞モデルにおける Ndr2 の機能解析

金沢大学 医薬保健研究域医学系 神経分子標的学¹、脳神経外科学²○宝田 美佳¹、吉川 陽文²、服部 剛志¹、北尾 康子¹、堀 修¹

【目的】Ndr2 (N-myc downstream regulated gene2) は中枢神経系においてアストロサイト特異的に発現する分化関連遺伝子である。本研究では、マウス脳虚血モデルを用いて Ndr2 の発現を解析すると共に、Ndr2 欠損マウスを用いて Ndr2 が脳虚血後の病態に与える影響を解析した。【材料と方法】脳梗塞モデルは、左側頭骨底部を開頭し、中大脳動脈を直視下で電気凝固により閉塞する方法を用いて作製した。脳虚血後 1,3,7,14 日目にマウスを灌流固定した後に凍結切片を作製し、Ndr2 および GFAP 抗体を用いた免疫染色、および HE 染色を行った。また、脳虚血後 1,3,7 日目に虚血側および対側の大脳皮質から RNA を抽出し、qPCR 法により解析した。【結果】免疫染色の結果、脳虚血後 3,7,14 日目の野生型マウスにおいて、梗塞巣周辺部位で顕著な GFAP 染色性の増加が観察された。Ndr2 の発現は、脳虚血後 1 日目から梗塞巣周囲において染色性の増加が認められた。脳虚血後 14 日目において、野生型マウスでは glial scar が形成され、HE 染色では萎縮を伴う梗塞巣の形成が認められた。一方、Ndr2 欠損マウスでは、梗塞巣サイズが野生型と比較して有意に増加していた。また、qPCR 解析の結果、野生型マウスで脳虚血後 7 日目に虚血側で顕著に増加する GFAP 発現は、Ndr2 欠損マウスにおいて有意に減少していた。【結論】以上の結果より、Ndr2 は、脳虚血条件下においても活性化アストロサイトによる glial scar 形成に促進的に働き、梗塞巣を局限させる働きを持つ可能性が示唆された。

202 ATF6 α 欠損マウスにおけるカニニン酸誘導性神経細胞死の増強毛塚 大、宝田 美佳、服部 剛志、北尾 康子、堀 修
金沢大学 医薬保健研究域医学系 神経分子標的学

海馬 CA3 領域では、グルタミン酸受容体アゴニストであるカニニン酸 (KA) により、過剰興奮由来の神経細胞死が誘導される。我々はこれまでに、小胞体内の分子シャペロン ORP150 が小胞体内の Ca^{2+} 恒常性を維持することで KA 由来の神経細胞死を抑制することを報告した。ORP150 の上流にはマスター転写因子 ATF6 α が存在し、本研究では、KA 投与マウスにおける ATF6 α 経路の活性化、及びその重要性についての検討を行った。WT マウスに KA を注入した所、8 時間後から CA3 神経細胞において ATF6 α の下流遺伝子 GRP78 の発現上昇が認められた。次に、WT 及び ATF6 α -/- マウスに KA を注入し、その後誘導される神経変性及び神経細胞死を、組織化学及び免疫組織化学により評価したところ、いずれも前者に比べ後者で高頻度で起こることが明らかになった。更に、KA 投与後の c-fos の発現が前者に比べ後者でより上昇し、KA 投与後の神経活動が亢進していることが示唆された。また、WT 及び ATF6 α -/- マウスに、細胞内カルシウム恒常性を障害するタプシガルギン (Tg) を注入したところ、KA 投与時と同様、後者で神経細胞死が高頻度で起こることが確認された。以上より、ATF6 α が海馬における細胞内 Ca^{2+} 恒常性の維持や神経の活動性制御を通じて、神経細胞の生存を促進している可能性が示唆された。

203 下丘皮質第 1 層の音刺激応答性

伊藤哲史^{1,2}、廣瀬潤一³、村瀬一之^{2,3}、池田弘^{2,3}¹福井大学医学部人体解剖学・神経科学領域²福井大学生命科学複合研究教育センター³福井大学大学院工学研究科知能システム工学専攻

【目的】下丘はすべての脳幹聴覚神経核からの上行線維が収束する場所であり、各神経核で抽出された音情報が統合される最初の場であると考えられている。下丘皮質には大脳皮質聴覚野からの下降投射が密に存在し、特定の音への注意などの機能が示唆されている。下丘皮質は 3 層構造をしているが、もっとも薄い第 1 層は電極記録が困難であるため、音刺激に対して応答するのか不明であった。in vivo カルシウムイメージングの下丘皮質第 1 層のニューロンの音刺激応答性について検討を行った。【結果】計 162 個の細胞が音刺激に対して蛍光強度変化を示した。このうち 150 個の細胞が広帯域ノイズに対して強い応答性を示した。このうち約半数はノイズの音圧増大に対する応答が非線形性を示した。一方、142 個の細胞が 4.5 から 55 kHz の間の周波数の純音に対して応答性を示した。ほとんどの純音応答細胞 (106 個) が 5.9-10.3 kHz という、マウスの可聴域からみて極めて低い周波数の音に対して最大の応答を示した。周波数-音圧受容野には様々な形状のものが見られた。同一視野内の細胞について、2 つの細胞の距離と、蛍光強度変化曲線の類似性の間に弱い相関が見られた。また、より内側の領域にはトノピー構築が存在することが示唆された。

【結論】下丘皮質第 1 層には音に反応する細胞が多数存在する。ほとんどの細胞が広帯域雑音と低い周波数の純音への嗜好性を有した。下丘皮質第 1 層は Te2 領域から強い下行性投射を受け、視床 PIL 核に投射する。これらの領域は multimodal であることが知られており、多感覚統合における低い周波数の音の重要性を示唆している。

204 マウス蝸牛有毛細胞の感覚毛に発現する陽イオンチャネル ASIC1b の機能解析

名古屋市立大学大学院 医学研究科 機能組織学分野
鶴川 真也

【目的と方法】蝸牛有毛細胞の感覚毛には聴覚受容体すなわち機械刺激電気変換チャネル (MET チャネル) が存在し、鼓膜の振動に由来する機械刺激を電気信号に変換しているが、その分子実体は不明である。われわれは、線虫における機械刺激受容チャネル degenerin の哺乳類ホモログである酸感受性イオンチャネル ASIC1b が MET チャネルの本体であるという仮説を立て、ASIC1b 遺伝子欠損 (KO) マウスを作出し、聴覚受容における ASIC1b の役割について、以下の方法を用いて検討を加えた。
(1) 走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡による KO マウスの有毛細胞の観察
(2) 免疫組織化学法を用いた感覚毛における ASIC1b の詳細な分布の検討
(3) 聴性脳幹反応 (ABR)、歪み成分耳音響放射 (DPOAE) の測定による聴力検査
(4) パッチクランプ法を用いた有毛細胞の電気生理学的特性の解析

【結果と結論】電子顕微鏡学的解析の結果、KO マウス有毛細胞の形態は、野生型のものと同じであった。免疫組織化学法を用いて検討したところ、ASIC1b は、感覚毛の基部前部かつ蝸牛軸と反対側に位置していた。ABR 検査にて、KO マウスに、軽度から中程度の非進行性難聴を認めた。また、DPOAE 測定にて軽度異常を認めたことから、有毛細胞の障害に起因する難聴であると考えられた。パッチクランプ法を用いて、野生型マウスにおける機械刺激電流を測定したところ、この応答は、ASIC1b の阻害剤であるナファモスタットで完全に抑制された。KO マウスの機械刺激電流は、野生型のものに比べ、減弱している可能性が示唆された。

205 CO と O₂ の混合ガスを用いた高圧気相保存法

内藤 宗和¹、畑山 直之²、平井 宗一²、伊藤 正裕²、中野 隆¹ 1. 愛知医科大学 医学部 医学科 解剖学講座 2. 東京医科大学 医学部 医学科 人体構造学分野

本研究の目的は、CO と O₂ 混合ガスを用いた高圧気相保存法の有用性を明らかにすることである。深麻酔下にてラットの心臓を摘出し、様々な条件で耐圧チャンパー内に保存した。A 群:CO と O₂ の混合ガスを用いた高圧気相保存法で保存した群、B 群: University of Wisconsin (UW) 液中に浸漬保存し、耐圧チャンパー内を CO と O₂ の混合ガスで充満した群、C 群: CO と O₂ の混合ガスを溶解させた UW 液中に浸漬保存した群に分けた。各群のラット心臓を 24~48 時間保存した後、ランゲンドルフ灌流法による in vitro での評価、および頸部異所性心移植後の PET による in vivo での評価を行った。48 時間の保存において、B 群および C 群のラット心臓は、蘇生を確認することができなかった。一方、A 群のラット心臓だけは蘇生し、頸部異所性心移植による生着を確認できた。また、ランゲンドルフ灌流法、頸部移植後の PET による機能的な評価では、24 時間保存の A 群と摘出直後に移植した Control 群においては、同等の機能を示した。CO と O₂ の混合ガスを用いた高圧気相保存法によって、ガスの細胞保護効果を最大限に引き出すことができる。細胞保護効果のある様々なガスを高圧気相保存法に用いることで、保存した臓器の質の向上と保存時間の延長が見込まれる。

206 生体内凍結技法によるマウスメラノーマ肺転移巣における血行動態と酸欠シグナル分子の免疫組織化学的解析

齊藤百合花¹、劉一超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信州大学大学院 医学系研究科 保健学専攻

【目的】我々は生体内凍結-凍結置換固定法 (IVCT-FS) により、血行動態を維持した機能的肺組織像を報告してきた。本研究では、癌肺転移組織部位における血行動態および酸欠シグナル分子発現を肺組織切片標本上で解析した。【材料と方法】実験的癌肺転移モデルとしてマウスメラノーマ細胞株 (B16-BL6) を C57BL/6J マウスの尾静脈内に注入移植した。14 日後、麻酔下マウスを人工呼吸器で維持し、horseradish peroxidase (HRP; 25 mg/ml) を 10 μL/秒で右心室内に持続注入した。その 10 秒後に液性イソペンタン-プロパノール混合寒剤 (約 -193°C) を直接肺にかけて IVCT した。さらに肺組織試料を 2%パラホルムアルデヒド含有アゼン中で FS してパラフィン包埋し、光顕標本を作製した。比較対照群としては、同細胞株を背部皮下移植して癌原発巣を作製し、同様に検討した。【結果】原発巣では、細動脈レベルの血管と壊死組織が多く、肺転移巣では毛細血管網を含む癌細胞塊と毛細血管の少ない癌細胞塊を認めた。特に毛細血管の少ない癌細胞塊は、胸膜側への突出組織部位と太い血管周囲で多く見られた。酸欠シグナル分子 HIF-1α は、原発巣と肺転移巣の胸膜突出部位では、血管周囲癌細胞の核内に一様に認められたが、肺転移巣では塊状に癌細胞核内に見られた。また注入 HRP 局在により、肺転移巣の毛細血管網の一部で血行不全が認められた。これらの毛細血管網は、I 型肺胞上皮細胞に並走する部位と、癌細胞が介在している部位とであった。しかし、いずれも肺胞中隔壁様の弾性線維配列を認めた。また癌細胞が多量のリンパ管内に局在していた。【結論】以上のように IVCT による血行動態を反映した光顕用切片標本により、肺転移巣には、原発巣とは異なり肺胞中隔壁内毛細血管網を取り込むことで、血行動態を維持しながら生存していると考えられた。

207 生体内凍結-凍結置換固定による生体マウス筋疲労モデルの機能形態学的解析

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】昨年の本学会で報告した生体内凍結技法 (IVCT) によるマウス筋疲労モデルの組織化学的解析について追加実験を行い、神経電気刺激による筋組織の経時的形態変化と種々蛋白質の免疫組織化学的分布について再検討した。【材料と方法】麻酔下マウスの腓腹筋と坐骨神経を露出し、坐骨神経を電気刺激して腓腹筋を収縮させ、刺激開始直後 (i)、3 分後 (ii)、10 分後 (iii) に IVCT を行い、凍結置換固定しパラフィン包埋した。対照群 (iv) では、非収縮状態で IVCT を行った。一部のマウスでは、腓腹筋収縮力の変化を測定した。さらに HE 染色による筋組織の形態学的変化、PAS 染色によるグリコーゲン局在変化、免疫染色 (IgG1、IgM、albumin、fast-myosin) により、血清蛋白とミオシン分子の局在について解析した。【結果】筋収縮力の測定では刺激開始直後より一過性に最大張力が得られたが、約 1 分で急速に張力が減少した。HE 染色では、(iv) と比較して、(i) で筋線維のたわみと赤血球うっ滞像が確認された。この変化は、刺激時間の延長に伴って減少するが、(ii) でもなおみられた。fast-myosin 染色にて計測した I/A 帯長の比は、(iv) で最も大きく、(i) で低下するが、(ii)、さらに (iii) では増大した。PAS 染色は (iv) に比較して (ii) では、一部の筋線維で染色性は低下し、(iii) では多くの筋線維で減弱していた。血清蛋白では、IgG1 と IgM は毛細血管内や間質に局限しているが、albumin は刺激群の筋線維内で免疫反応像が筋質周辺部に認められた。【結論】電気刺激に伴う筋収縮により、筋線維や筋節の機能形態学的変化および筋線維内グリコーゲン量の経時的変化とともに、血清アルブミンが筋線維 T 細管内へ流入することが示された。

208 リンパ節切除後のリンパ動態の変化
—リアルタイムイメージング法を用いた解析—

竹野 ゆかり、藤本 悦子
名古屋大学大学院医学系研究科看護学専攻

【目的】in vivo でリンパを追跡できる赤外観察カメラシステム装置 (PDE) を用い、リンパ節切除後のラット起こるリンパ流の変化を解析した。【方法】Wistar 系ラットを用い、吸入麻酔下にて、インドシアニンググリーン (ICG) を右足背に皮下注射した。皮膚切開後、右鼠径リンパ節と膝窩リンパ節を摘出した。リンパ管は結紮した。術後 3 日目から 10 週目までは、1 週間ごとに、その後、半年、1 年に、再度 ICG を注入し、PDE で ICG の蛍光を追跡した。【結果】リンパ節摘出ラットでは、術後 3 日目から、右後肢全体に浮腫を表すびまん性の蛍光像が現れ始めた。術後 2~3 週間目までに、大腿から下腹部にかけて、網目状の蛍光像が観察された。網目状の蛍光像は創部を通過し、右下腹部にて集合したあと線状になり、障害側の腋窩リンパ節に達した。また別の経路として、恥骨上を通過して反対側の鼠径リンパ節へ達するのが観察された。これらの経路が形成されたあと、時間の経過とともに右後肢のびまん性の蛍光像は減少し、8 週目にはすべてのラットにおいて消滅した。創部周囲の網目状の蛍光像と障害側腋窩、反対側鼠径部へ向かう経路は、1 年の観察期間終了まで残存していた。【考察】以下のことが明らかになった。1) 鼠径部でリンパ流を遮断することにより、下肢に浮腫が生じたが、やがて intact なリンパ節へ向かう新しいリンパ流が出現すると、浮腫は軽減した。2) リンパの流れは網目状を呈しながら創部を乗り越え、新しい経路に流入した。以上から、浮腫の改善には、この新しい経路の出現が重要であることが示唆される。

209 トランスフェリン修飾粒子を用いたドラッグデリバリーシステム

辻塚磨 (現所属: 名大院医・分子細胞学)、吉富浩史、白倉治郎
名大院工・材料工学

悪性腫瘍の化学治療は様々な問題を抱えている。現行の抗がん剤はがん細胞のみを選択的に攻撃することができず、正常な細胞にまで影響を及ぼしてしまうため、副作用が大きな問題となっている。この問題を克服するためには、標的細胞内のみ薬物を届ける必要がある (ドラッグデリバリーシステム)。そのため、受容体が多種のがん細胞に高発現しているトランスフェリン (Tf) を、薬物を内包した粒子表面に修飾するという戦略が目ざされている。Tf はクラスリン依存的に細胞内に取り込まれるため、これまで Tf 修飾粒子は、クラスリン被覆小胞 (100 nm) 以下が適していると考えられてきた。しかし、粒子径が制限されると、一度に細胞内に運ぶことができる薬物の量が制限されてしまう。一方、大きな粒子は多くの薬物を内包できるが、Tf 受容体を介さずに非特異的に細胞に取り込まれるかもしれない。そこで、本研究では 100 nm 以上の Tf 修飾サブミクロン粒子が薬物キャリアとして適しているかどうかを検討した。蛍光顕微鏡、TEM 観察から、500 nm の Tf 修飾粒子が、Tf 受容体を介して、非常に大きなクラスリン被膜に包まれ細胞内に取り込まれることがわかった。次に、薬物送達効率の粒子サイズ依存性を検討するために、径の異なる抗がん剤内包生分解性粒子 (ドキソルビシン内包 PLGA 粒子) を作製して (216 nm、56 nm)、それぞれの薬物送達効率を比較した。結果、Tf 修飾サブミクロン粒子はナノ粒子よりも高いがん細胞選択性を有することがわかった。

210 B-mode 超音波画像診断装置を用いた踵腓靭帯描出方法の解剖学的検討

名古屋大学大学院医学系研究科機能組織学分野
○近藤英隆、安井正佐也、時實恭平、木山博貴

【目的】足関節内反捻挫では前距腓靭帯 (ATFL) と踵腓靭帯 (CFL) が損傷される事が多いが、これまで B-mode 超音波画像診断装置を用いた内反捻挫の評価方法は ATFL が中心であり、CFL の描出方法については十分に確立されていない。我々は解剖実習体を用いて CFL の描出方法について検討を行った。【材料と方法】解剖実習体には、軟部組織が生体に近く関節可動性や超音波画像における観察所見が生体に近いとされる Thiel 法にて固定を行った遺体 2 体 4 足と、ホルマリン固定遺体 8 体 8 足を使用した。【結果】足関節底屈位・足部回内位・外旋位は fibrillar pattern を伴った CFL 全体を描出することが可能であった。さらに、伸張ストレスを加える際でも、足関節底屈位・足部回内位・外旋位の方が CFL の fibrillar pattern 全体像を描出する事に優れていた。CFL は個体によって形態のバリエーションが豊富であった。【考察】CFL 全体像を描出するには、足関節底屈位のほうが良好であった。背屈位では CFL の下に距骨下関節が位置するため、エコービームが関節裂隙に抜けてしまい正確な画像を得られることが困難となる。一方、底屈位では CFL の前方に距骨下関節は移動するため、エコービームを踵骨に垂直に反射させることが可能であったと考えられる。CFL は個体によって形態のバリエーションが豊富なため、今後さらに個体数を増やした検討が必要である。

211 Localization of nerve fibers in mucosa and taste bud of the soft palate of rat

Ahmed Rashwan, Hiroyuki Konishi, Kyohei Tokizane, Ashraf ElSharaby, Hiroshi Kiyama

Dept. of Functional Anatomy & Neuroscience, Nagoya University, Grd Sch of Med

The precise localization of nerve fibers in relation to taste buds in the soft palate of rat was examined using the taste bud, nerve and presynaptic markers such as gustducin, PGP9.5, choline acetyltransferase (ChAT), and synaptophysin. PGP9.5 immunostaining, which is a nerve marker in peripheral tissue, demonstrated that the innervation of soft palate was classified into three types of plexuses in relation to taste buds; the basal, intragemmal and perigemmal plexuses. The basal plexus consists of dense nerve terminals at the basal part of taste buds as well as the basal layer of mucosa. The intragemmal plexus is the nerve fibers forming a plexus within taste buds and some branches could be traced up to the apical portion of the taste buds (the taste pore region). The punctate synaptophysin immunoreactivity was observed along the intragemmal fibers. The perigemmal plexus consists of nerve fibers, which was in paragemmal layer of epithelium, surrounding a taste bud and making a cup-like structure. The cup of perigemmal plexus sometimes contains dual or triple taste buds. An intense synaptophysin staining was mainly observed at the apical part of perigemmal layer. Apart from taste buds several fibers branching from the basal plexus vertically traced up to the surface of epithelial layers. ChAT immuno-staining was heavily observed in the basal layer and moderately in intragemmal and perigemmal plexus, however fibers vertically crossing epithelial layers did not have ChAT immunoreactivity. The present data indicated the localization of nerve fibers in palate was different from those seen in tongue, and the soft palate taste buds were highly innervated than those in tongue. This innervation difference may be associated with the regulation of the palatal taste buds recycle, which has not validated fully. Further Characteristics of innervation of soft palate will be discussed.

212 アンドロゲン受容体欠損マウスにおける顎下腺導管系の分化

Tewarat Kumchantuek, 仲田浩規, 山本美由紀, 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

マウスの顎下腺において顆粒性導管 (GCT) は雄で雌よりもはるかに著しく発達し、雌にアンドロゲンを投与すると線条部導管 (SD) の細胞が GCT 細胞に転換して、神経成長因子 (NGF) や上皮増殖因子 (EGF) など種々の生理活性物質を産生する。同様な GCT 細胞の分化は甲状腺ホルモンの投与によっても起こる。アンドロゲン依存性の GCT 分化が古典的な細胞内アンドロゲン受容体 (AR) を介しているか否かを明らかにするため、AR を欠損するノックアウトマウス (ARKO) における顎下腺の形態と遺伝子発現を調べ、また ARKO に対するアンドロゲン (テストステロン) および甲状腺ホルモン (T4) 投与の影響を調べた。ARKO 雄の顎下腺では GCT が発達しない正常雌と似た導管系を示し、NGF 免疫反応陽性の顆粒を持つ細胞数や NGF の mRNA 発現量は正常雌よりさらに低かった。ARKO 雄にテストステロンを5日間にわたり連続投与しても GCT の分化は見られなかったが、T4 を連続投与すると GCT の分化が見られ、NGF 免疫反応陽性の顆粒や NGF の mRNA 発現の著しい増加が見られた。このことから、マウス顎下腺導管系におけるアンドロゲン依存性の GCT 分化は古典的な AR を介すること、また甲状腺ホルモンは AR と無関係に GCT 分化を起こすことがわかった。マウス顎下腺で GCT 分化を起こす未知のシグナル伝達経路において、甲状腺ホルモンはアンドロゲンより下流に作用点を持つことが示唆された。

213 精子形成の定量的評価方法の検討

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ことが多い。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。ステージの決定と構成細胞の同定を行い、精細管に存在する各細胞数により精子形成を定量的に評価することができるのではないかと考えた。本研究では正常マウスにおけるステージごとの各細胞数のスタンダードを作り、不妊マウスである Nectin-3 ノックアウトマウスにおいてどの段階の細胞数に変化があるのか定量的に評価した。

正常マウスにおいてステージごとに精細管内の細胞数を定量した。セトリ細胞、中間型精祖細胞、B 型精祖細胞、精母細胞、step1-12 の精子細胞はそれぞれ平均 18.1 ± 3.4 個、11.8 ± 4.1 個、26.1 ± 6.3 個、51.4 ± 8.7 個、144.6 ± 29.8 個であった。さらに、精子形成障害を示す Nectin-3 ノックアウトマウスにおいて同様の定量を行い、正常マウスと比較し、step12 以降の精子細胞数の有為な減少、さらには step16 がほとんど存在しないことを明らかにした。