

日本解剖学会

第71回九州支部学術集会

会 期：平成27年10月31日（土）

会 場：熊本大学本荘キャンパス内医学総合研究棟 3階講習室

特別

講演 1 精子形成の調節因子としての細胞接着分子の役割

若山 友彦

熊本大学大学院 生命科学研究部 生体微細構築学分野

精子形成 spermatogenesis は、造精幹細胞を含む精祖細胞の増殖と分化、精母細胞の減数分裂、さらに spermiogenesis と呼ばれる精子細胞の形態変化からなる複雑な過程である。精子形成の調節因子として、内分泌因子や精巣内局所因子がよく知られている。特に、下垂体からのゴナドトロピンや精巣の間質のライディッシュ細胞からのアンドロゲン、また、セルトリ細胞からの Steel factor と精祖細胞に発現するその受容体の cKit は、精子形成に必須の因子である。しかしながら、これらの因子が存在しても造精細胞だけでは精子形成は進行できず、造精細胞とセルトリ細胞との相互作用が必要である。この相互作用に種々の細胞接着分子の関与が遺伝子欠損マウスを用いた解析から明らかになってきた。造精細胞とセルトリ細胞間で機能する細胞接着分子の特徴は、異種分子間結合を行うことである。つまり、造精細胞に発現する細胞接着分子は、セルトリ細胞に発現する異なる細胞接着分子と結合する。具体的に、造精細胞に発現する細胞接着分子 Cell adhesion molecule-1 (CADM1)、Junctional adhesion molecule-C (JAM-C)、Nectin-3 は、それぞれセルトリ細胞に発現する Poliovirus receptor (PVR)、JAM-B、Nectin-2 と結合する。CADM1、JAM-C、Nectin-2、Nectin-3 の遺伝子欠損マウスでは、単に造精細胞が精細管上皮から脱落するだけでなく、それぞれ異なる造精細胞の分化異常が見られる。したがって、細胞接着分子が精子形成の調節因子として機能することが明らかになってきた。分化異常を引き起こす細胞接着分子の作用機序に関してはまだ不明な点も多いが、それぞれの細胞接着分子が細胞内において相互作用する分子もいくつか同定されている。本講演では、細胞接着分子の遺伝子欠損マウスの解析を中心に、精子形成の調節因子としての細胞接着分子の役割について概説する。また、内分泌因子と精巣内局所因子と細胞接着分子の関連についても最新の知見について紹介する。

特別

講演 2 骨組織の形態学解析とその応用

東 華岳

産業医科大学 医学部 第1解剖学講座

骨組織は表層の皮質骨と内部の海綿骨から構成され、骨強度を維持している。骨強度は骨量と骨質の2つの要因からなる。骨量と骨質は骨構造特性により評価することができる。骨組織が常に破骨細胞により破壊され、骨芽細胞により形成されている。この現象は骨リモデリングと呼ばれ、骨代謝の基本である。骨は破壊と形成の絶妙なバランスによってダイナミックなホメオスタシスを保っている。破骨細胞と骨芽細胞は骨表面で機能している。骨の中に埋め込まれる骨細胞は骨の構成細胞の90%以上を占めている。現在、骨代謝制御における骨細胞の役割について注目されている。

私たちは形態学的手法を用いてヒトおよび実験動物の骨構造を解析してきた。精密検査のために体幹部が撮影されたX線CT画像を利用して椎体海綿骨の骨密度を調査し、第1胸椎から腰椎にかけて低下し、加齢に伴って男女ともに骨密度が減少し、男性より女性の骨密度が低いことが確認できた。1つの椎骨におけるマイクロCTの定量解析を行い、椎体海綿骨の不均質性がわかった。大腿骨頸部における皮質骨と海綿骨の三次元構造を同時に解析し、加齢により大腿骨頸部の最も顕著な変化は皮質骨多孔性の増加である。また海綿骨の骨量と皮質骨多孔性との間には有意な逆相関を示した。椎骨、大腿骨、橈骨、脛骨、中手骨、踵骨の6箇所の海綿骨微細構造を比較検討し、加齢によるヒト海綿骨の骨量の変化に男女差と骨格部位による差が認められた。加齢による骨量低下の部位差は骨粗鬆症性骨折の発症との関連が示唆される。

骨粗鬆症モデルマウス (SAMP6) は老化促進、短寿命、骨形成と骨量の早期低下などの特徴がある。正常マウス SAMR1 と SAMP6 における骨組織の構造を比較検討した。SAMP6 マウスにおける海綿骨の骨量低下が確認され、骨細胞の形態学的変化と骨芽細胞の機能低下がこのマウスの低骨量病態に関与している可能性が考えられる。

骨粗鬆症の発症の要因には加齢と女性ホルモンの低下などがあげられる。慢性ストレスが骨粗鬆症の発症に関与する可能性がある。ストレス条件下でチューイング（咀嚼）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を解析し、慢性ストレスと骨粗鬆症との関連について検討を行った。マウスに慢性ストレスをかけると、視床下部-下垂体-副腎系と交感神経系が活性化され、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。今後は、高齢者の骨量・骨質に及ぼす慢性ストレスと咀嚼の影響を検討していく予定である。

1

マウス海馬の Parvalbumin 陽性ニューロンにおける Gap junction の分布

西村衣未 福田孝一

熊本大学大学院生命科学研究部形態構築学

【目的】 Gap junction は、脳の抑制性介在ニューロンである Parvalbumin(PV)陽性ニューロンの樹状突起間に存在する。本研究では、マウス海馬において、Gap junction が空間的にどのように分布しているかを共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。

【材料と方法】 C57BL/6J マウス 8 週齢オスを灌流固定後、大脳半球の冠状断連続切片を作成した。その後、蛍光三重染色し、油浸 60 倍の共焦点レーザー顕微鏡画像にて、樹状突起の交差部でコネキシン 36 免疫陽性の Gap junction を計数した。Gap junction の空間的密度を海馬 CA1 領域と歯状回のレイヤーごとに比較した。【結果】 Gap junction は、CA1 においては、放線層の遠位部から網状分子層にかけて、また上昇層の遠位部に多数確認できた。一方、錐体細胞層では少数しか確認できなかった。歯状回においては、分子層の遠位部に多数の Gap junction が認められた。一方、CA1 と同様に顆粒細胞層や分子層近位部には、少数しか認められなかった。Hilus にも多数の Gap junction が認められたが、その多くは顆粒細胞層との境界部に存在していた。空間的密度の検討においても、CA1 と歯状回の各層において、定性的な観察結果に一致した密度分布がみられた。

【考察と結論】 マウス海馬の PV ニューロンの樹状突起間に存在する Gap junction は、介在ニューロンの樹状突起の遠位部、および顆粒細胞層と Hilus との境界部に多く分布する傾向が見られた。Gap junction が特定の層に多く分布していることは、その層に特異的な入力同期性を高める役割があると推察される。

2

前立腺上皮における分化マーカーのレクチン組織化学的探索

作田健太郎 1, 村岸良紀 1, 吉永一也 2

1 熊本大学 大学院保健学教育部 検査技術科学分野

2 熊本大学 大学院生命科学研究部 構造機能解析学分野

前立腺は、精子の栄養と防御に関与する男性特有の器官である。

近年、前立腺がん患者はわが国においても増加傾向にあり、その発症機構の解明が急務となっている。しかし、その基盤となる正常な前立腺上皮細胞の分化メカニズムについてはほとんどわかっていない。昨年の本学会で我々は、成熟マウスにおける前立腺上皮の糖鎖発現パターンについて報告した。今回は上皮細胞の分化マーカーを探索する目的で、生後の前立腺の発達・分化過程におけるレクチン結合パターンを比較・検討した。

材料には幼若～成熟雄マウス (C57BL/6 系) の前立腺を用い、4%パラホルムアルデヒド液で灌流・浸漬固定後、パラフィン包埋切片を作成し、糖鎖構造解析で用いられる多種類のレクチンと反応させ DAB 発色後、鏡検した。なお上皮細胞の同定には、レクチン組織化学とマーカー抗体を用いた免疫組織化学とを組み合わせた蛍光多重染色を施した。その結果、数種レクチンが上皮を構成する分泌細胞や基底細胞に選択的結合を示した。また興味深いことに、前立腺の各領域や分化段階において結合パターンが変化した。こうしたレクチンが認識する糖鎖構造は、前立腺上皮の新たな分化マーカーとして細胞動態や機能分化に関する基礎研究や男性不妊症の診断に応用できる可能性が示された。

3

哺乳類の精子鞭毛分子 Tektin1 と相互作用する外腕ダイニン軽鎖分子 Tcte3 について

下條 光・○飯田弘（九州大院・農・動物学）

哺乳類の精子は頭部と鞭毛からなり、鞭毛の軸索に局在するモーター分子ダイニンによって生み出される微小管のすべり運動により鞭毛の推進力が生じる。Tektin は鞭毛を構成する繊維性分子で、哺乳類には Tektin1～5 がある。5 つの Tektin 分子はすべて精子鞭毛に存在するが、Tektin1 は他の Tektin 分子とは異なり、鞭毛の軸索 (9+2 構造) に局在する可能性がある。Tektin1 と相互作用する分子を酵母 Two-Hybrid 法によって探索した結果、Tcte3 (t-complex-associated testis expressed 3) をクローニングした。Tcte3 は鞭毛の外腕ダイニン軽鎖をコードしており、Tcte3 を欠損したマウスでは、精子の運動性が低下することが報告されている。ラットの週齢別・臓器別 RT-PCR を行ったところ、Tcte3 は生後 3 週齢以降に精巣特異的に発現した。培養細胞へ Tektin1 と Tcte3 を共発現させると局在が重複し、それらの物理的相互作用が確認された。これらの結果は、Tektin1 が鞭毛の外腕ダイニン軽鎖と分子的相互作用をしている可能性を示唆する。

2			第71回九州支部学術集会		
4	FIB/SEMを用いたCCCP投与後のミトコンドリア超微形態解析； FIB/SEMを用いたCLEM観察			7	FRET based molecular beacon fluorescent probe for <i>in situ</i> hybridization
○	宮園 佳宏 1), 太田 啓介 1), 都合 亜記暢 2), 岡山 聡子 1), 中村 桂一郎 1)				Narantsog Chojookhuu1, 徐 岩 2, 石塚 匠 2, 日野 真一郎 1, 菱川 善隆 1
1)	久留米大学医学部解剖学講座 顕微解剖・生体形成部門 2) 久留米大学 電子顕微鏡室				宮崎大学医学部 1 解剖学講座組織細胞化学分野 2 機能制御学講座 物質科学分野
	ミトコンドリアは生体エネルギーを産生する重要な細胞内小器官であり、融合および分裂を繰り返しながら品質管理をしている。ミトコンドリアの形態は様々な条件下で変化することが知られており、特に脱共役剤によりミトコンドリア膜電位を喪失させると光学顕微鏡下にその形は急激に変化し、リング状もしくはドーナツ状の形態をとる事が報告されている。近年この様な形態が機能不全ミトコンドリアの特徴の一つではないかと考えられている。しかし、その生理的な意義や機序はいまだ詳細は不明で、その形態変化の微細構造についても明確ではない。そこで今回われわれは脱共役剤である CCCP 暴露後のミトコンドリアの3次元形態変化を詳細に検討した。				<i>In situ</i> hybridization (ISH) is used to detect the localization of specific mRNA at the cellular level. In general, a specific mRNA is detected in single section due to limitation of detection system. In biomedical field, it is important to evaluate different mRNA expressions in the same section. Therefore, we have designed fluorescence resonance energy transfer (FRET) based molecular beacon fluorescent probes for ISH to detect multiple mRNAs simultaneously. In this study, C57BL/6 mouse uterus and testis paraffin embedded tissues were used. Molecular beacon fluorescent probe for ERα mRNA was labeled with Cy3 and BHQ-2 at the 3'-end and 5'-end, respectively. 28S ribosomal RNA (rRNA) probe was labeled with 6-FAM and DABCYL, respectively. Competition and neutralization assays were performed as a control experiments, by using non labeled homologous and reverse complementary oligo-DNAs for ERα mRNA and 28S rRNA. In addition, the specific staining was confirmed with or without RNase treatment. Digoxigenin labeled ERα mRNA and 28S rRNA probes were used as a positive control. ISH results revealed that fluorescent signal for ERα mRNA was clearly detected in luminal and glandular epithelium of the uterus. Moreover, strong fluorescent signal for 28S rRNA was found in cytoplasm as well as nucleolus in the same section. No staining was revealed in control experiments, such as sense probe, competition, neutralization assay and RNase treatment. The staining pattern was similar to digoxigenin labeled 28S rRNA probe in the uterus. In conclusion, FRET based molecular beacon fluorescent probe may be useful to detect the simultaneous evaluation of different mRNAs at the cellular level.
5	ラットの腹腔内常在細菌叢に及ぼす微生物学的統御の影響			8	電子顕微鏡を用いた有窓性毛細血管微小孔の解析
○	野口和浩、若山友彦（熊本大・生命科学・生体微細構築学）				千葉政一、新井智仁、立川修二、伊奈啓輔、藤倉義久 大分大学医学部 分子解剖学講座
	人医領域では帝王切開により産出された新生児の腸内細菌叢の構成は経膈分娩の新生児と比較して単純であり、そのことがその後の免疫系の発達にまで影響を及ぼすことが知られている。一方、実験動物領域では現在頻繁に用いられている specific pathogen-free (SPF；帝王切開由来) 動物の腸内細菌叢の構成は、ふつう (conventional；CV) 動物と異なることがすでに知られている。したがって、鼻腔や膈等の腸内以外のその他の粘膜で形成されている細菌叢においても腸内細菌叢と同様に異なる可能性も十分に考えられる。そこで、我々は実験動物の微生物学的統御の違いが腹腔内細菌叢の構成にまで影響を及ぼすのかについて、微生物学的統御の異なるラットを用いて比較検討した。【材料及び方法】供試動物：複数の生産業者より入手した SPF 及び CV、あるいは野外より捕獲 (野生) した雄のラットを使用した。細菌培養及び同定：検体はバスツールピペットを用いて一定量の滅菌滅菌生理食塩水で腹腔内腔を数回洗浄して採取したのち、直ちに気相部を炭酸ガスで置換後、嫌気性グローブチャンバーに移して希釈裂を作成し、14 種類の培地に塗抹後、腸内細菌叢検査法に準じて行った。【結果及び考察】CV 及び野生ラットでは、腹腔内からは通性嫌気性菌と嫌気性菌の両方の菌種群が検出され、優勢菌種は共通して通性嫌気性菌である <i>Pasteurellaceae</i> , streptococci 及び嫌気性菌である <i>Bacteroidaceae</i> であった。それに対して、SPF ラットでは嫌気性菌は全く検出されず、しかも検出されたのはそのほとんどが通性嫌気性菌である <i>Enterobacteriaceae</i> および streptococci の 2 菌種のみであった。以上より、SPF ラットの腹腔内には CV 及び野生ラットとは全く異なる異質な細菌叢が構成されていることがわかった。したがって、腹腔内細菌叢に関わる研究に SPF ラットを用いて行う場合はこれらの特性を考慮して実験する必要があると考えられた。				【背景と目的】 有窓性毛細血管は多くの組織に存在し血液組織液閉門のひとつとして機能する。我々はこれまでに、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いたラット小腸粘膜固有層の有窓性毛細血管の微小孔(pore)が交感神経系刺激で開大することを報告してきた。その方法として TEM で pore 径を網羅的に測定した後にそのサンプルの平均値を算出し、これを群間で比較した。一方で、その方法では算出された値が走査型電子顕微鏡(SEM)で観察される実際の pore 直径より比較的小さな値を示す可能性が示唆された。今回、より確実な有窓性毛細血管 pore 直径の測定方法の確立を目指し、TEM と SEM を用いて pore 解析方法を検討した。【方法】 雄性 10 週令 C57BL/6 マウスを用い、交感神経系が活性化される低濃度インスリン持続負荷モデル動物を作成し、同モデル動物の腎糸球体有窓性毛細血管の pore の形態について、TEM および SEM をもちいて解析した。有意差は p<0.05 で差有りと判定した。【結果】 Bayesian 推定を用いた画像解析方法により、TEM および SEM の双方でマウス腎糸球体有窓性毛細血管の pore 直径が同等に測定可能であり、同法を用いた画像解析により、交感神経系が活性化される低濃度インスリン持続負荷モデル動物において、腎糸球体有窓性毛細血管 pore 直径の有意な開大が認められた。【結語】 Bayesian 推定を用いた画像解析方法は TEM/SEM 双方で有用である可能性が示唆された。
6	海馬ミクログリアにおける高硫酸化ケラタン硫酸の発現とニューロン活動の関連			9	乳飲期空腸由来オルガノイドの形態学的解析
	大竜友博、神野尚三（九州大院・医・神経解剖）				馬場良子 1、國分啓司 1、森本景之 1、藤田 守 2 1 産業医科大学 医学部 第 2 解剖学、2 中村学園大学・大学院 栄養形態学

先行研究によって、活性化ミクログリアには、抗ケラタン硫酸抗体（クローン 5-D-4）で認識される高硫酸化ケラタン硫酸が発現することが知られている。しかしながら我々は最近、筋萎縮性側索硬化症モデルマウス (SOD^{G93A}) の脊髄前角では、ミクログリアが活性化する中〜末期だけでなく、明らかな活性化が認められない発症初期のミクログリアでも 5-D-4 陽性高硫酸化ケラタン硫酸が発現することを見出ししている (*PLoS One*, 2013)。現在まで、ミクログリアに高硫酸化ケラタン硫酸が発現するメカニズムは分かっていないが、ALS の発症初期には運動ニューロンの活動性が亢進することが報告されていることから、本研究で我々は、ミクログリアにおける高硫酸化ケラタン硫酸の発現とニューロン活動の関連を明らかにすることを旨とした。実験には、カイニン酸を腹腔内投与したマウスを使用し、海馬における組織化学的な変化の解析を進めている。予備的な結果であるが、成獣 ICR マウスにカイニン酸 (25 mg/kg) を腹腔内投与し、5 日後に灌流固定した場合、Iba1 で観察されるミクログリアの活性化様式と、高硫酸化ケラタン硫酸の発現様式に以下の相違が認められた。(1) アンモン角では、高度に肥大大化した多数の Iba1 陽性ミクログリアが、ニューロンの脱落が認められる錐体細胞層に浸潤していた。(2) 一方で、5-D-4 陽性ミクログリアは、錐体細胞の軸索が分布する上昇層に多く、一部は放線層にも認められた。興味深いことに、錐体細胞層に浸潤したミクログリアの大部分は 5-D-4 陰性であった。これらから、カイニン酸投与マウスの海馬ミクログリアにおける高硫酸化ケラタン硫酸の発現は、ニューロンの脱落ではなく、錐体細胞の軸索樹状突起間シナプスでのニューロン活動によって引き起こされている可能性が示唆された。学術集会では、ミクログリアにおける高硫酸化ケラタン硫酸発現の分子機序について、詳細な議論をしたい。

我々はこれまでに乳飲期齧歯類の小腸吸収上皮細胞は成熟期と異なる形態と機能を有し、また、同時期においても部位によって細胞の形態と機能が異なることを報告してきた。乳飲期の空腸吸収上皮細胞は脂質の吸収に加え、母乳中の抗体をトランスサイトシスする。しかし、細胞頂部からのトランスサイトシス機構は離乳前に消失し、それ以降は見られない。近年、単離した小腸陰窩、または単一の Lgr5 陽性幹細胞を特定の条件下で培養すると、上皮のみからなる陰窩・絨毛組織を擬似したオルガノイドを形成することが報告されている (Sato et al., 2009)。そこで、乳飲期空腸由来のオルガノイドを作製し、時期による吸収上皮細胞の変化について形態学的解析を行った。生後 7 日齢の C57BL/6J マウスから採取した空腸より陰窩を単離し、Sato らの方法を用いてオルガノイドを作製した。単離から 7 および 14 日経過したオルガノイドについて超微形態学的に観察を行い、それぞれ相当する時期のマウス空腸と比較した。乳飲期マウス空腸吸収上皮細胞の核上部にはエンドサイトーシスに関わる発達した膜系が存在し、トレーサーを投与するとトランスサイトシスが観察された。しかし、離乳期 (21 日齢) 以降では見られなかった。一方、単離から 7 日経過したオルガノイドの空腸吸収上皮細胞頂部にはエンドゾーム様構造、多胞体及びライゾームが観察された。しかし、単離から 14 日経過した吸収上皮細胞において、エンドゾームはほとんど見られなかった。以上の結果から、乳飲期特有の空腸吸収上皮細胞の構造は小腸幹細胞または陰窩に存在する上皮細胞によって決定されている可能性が示唆された。

10 腸管におけるアモキシシリン及びアンピシリンの免疫組織化学的局在研究

進 正志、白川裕太、齋田哲也、藤原邦雄
崇城大学 生物生命学部 応用生命科学科

【目的】アモキシシリン（AMPC）とアンピシリン（ABPC）はグラム陽性菌に加えて、グラム陰性桿菌にまで抗菌スペクトルを拡大した広域型ペニシリン薬である。これら2剤の構造はほとんど同じだが、AMPCの方が腸管からの吸収性が高く、内服薬としては概してAMPCが選択される。しかし、これら2剤の*in vivo*での腸管における薬物動態の詳細については不明なため、今回、小腸各部位での薬物局在を免疫組織化学的に解析した。【方法】Wistar ラットに、AMPCまたはABPC 60 mg/kgを経口投与し、30分後に1.5%グルタルアルデヒドで灌流固定を行った。十二指腸、空腸、回腸のパラフィン切片を作製し、前処理後、一次抗体として抗 AMPC モノクローナル抗体を、二次抗体としてシンプラスティン MAX-PO（ニチレイ）を反応させ、反応部位をDAB反応により可視化した。【結果・考察】AMPC：十二指腸および空腸では、吸収上皮細胞をはじめ組織全体に強陽性反応が認められた。しかし回腸での染色強度は著しく減弱していた。この結果は、本剤が十二指腸、空腸でほとんど全て吸収され、回腸まで到達しなかった可能性を示しており、本剤の腸管吸収性が高いという事実と一致していると思われる。ABPC：十二指腸では、吸収上皮細胞の微絨毛は強陽性であったが、核及び細胞質の染色は弱かった。空腸では吸収上皮細胞の染色強度が増強しており、回腸では陽性反応はさらに強くなり、組織全体が強陽性であった。このことは、ABPCは、十二指腸では微絨毛までは到達するが吸収されずにこの部位に蓄積するが、小腸の下部ではこれまで考えられていた以上に吸収されている可能性があることを示唆している。

11 第2報：Epac pathwayの慢性腎臓病における線維化抑制効果

伊奈啓輔、Yan Qiong、千葉政一、立川修二、藤倉義久
大分大学医学部 分子解剖学講座

【背景と目的】慢性腎臓病（CKD）が進展し腎線維症を来すと、腎機能は障害され腎不全に至る。腎線維症は、TGF- β 1高発現により線維芽細胞が筋線維芽細胞に分化転換することで線維過剰蓄積する病態とされている。これまで、我々はジビリダモールが、TGF- β 1誘発筋線維芽細胞化を抑制し線維蓄積を抑制することを報告してきた。前回、本学会で本薬が筋線維芽細胞化を抑制する機序について報告した。今回は、本薬が線維化そのものを抑制するメカニズムについて検討した。【方法】腎線維化モデルとして、*in vitro*で腎線維芽細胞にTGF- β 1を作用させる系を用いた。様々な物質を作用させ培地中に蓄積したI型コラーゲンをELISAで測定することにより線維化の同定を行った。【結果】TGF- β 1による線維蓄積はSmads pathwayを介することが示された。ジビリダモールにより細胞内にcAMPが増加していた。cAMPの下流に位置するPKA pathwayとEpac pathwayの関与について、各々のinhibitorとactivatorを作用させ検討したところ、 α SMAの発現（筋線維芽細胞化）抑制と同様に線維蓄積抑制にはEpac pathwayが強く働くことが示された。その抑制効果はTGF- β 1 signalingのSmadsリン酸化の抑制を介していた。【結論】ジビリダモールによるTGF- β 1誘発線維化抑制作用は、cAMPの増加からEpac pathwayが活性化されSmadsリン酸化の抑制を来す経路、を介することが示唆された。

12 ラット小腸上皮細胞の増殖分化過程におけるヒストン修飾動態の解析

三谷紗貴1、遠藤大輔2、福田智美2、穠山直太郎2、小路武彦2
1長崎大学 医学部 医学科4学年
2長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生命医学講座 組織細胞生物学分野

【目的】小腸上皮細胞は、増殖、分化、死という細胞がたどる一連の流れを一週間という短い期間で完遂するという特徴を持つ。具体的には、小腸の陰窩で低い頻度で増殖している未分化細胞の娘細胞が活発に増殖し始め、分化して4種の異なる機能を持つ細胞となる。本研究ではこの細胞動態を制御すると考えられるエピジェネティックな修飾状態の違いを解析することを目的とした。【方法】8週齢雄Wistar ラットの小腸を採取して固定後パラフィン包埋し、切片を作製した。そして、ヒストン修飾及びメチル化DNAに対する免疫組織化学を行った。細胞種の同定は連続切片を用い、吸収上皮細胞及び杯細胞はHE染色、基底顆粒細胞は鍍銀染色、パネート細胞はリゾチウムに対する免疫組織化学により行った。【結果】陰窩の未分化細胞ではH3K4me3及び5mCに対し強陽性で、増殖が高頻度の細胞及び絨毛に存在する吸収上皮細胞、杯細胞、基底顆粒細胞ではシグナルが減少した。一方、陰窩底部に存在するパネート細胞は強陽性を示した。H3K27me3は、陰窩の未分化細胞の一部とパネート細胞で強陽性を示し、その他の細胞では弱陽性を示した。また、分化の異なる細胞毎にこれらの修飾の核内局在の違いが見られた。【考察】これらのエピジェネティックな修飾状態の違いが、小腸上皮の細胞の増殖活性や4種の機能細胞へ分化する過程に於いて重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

13 重複下大静脈の一例

○門間 恵美子1、田平 陽子2、松内 和佳子3、嵯峨 堅2、岩永 譲2、渡部 功一2、山本 宏
1久留米大学 医学部 医学科第2学年
2久留米大学 医学部 解剖学講座（肉眼・臨床解剖部門）

2015年度久留米大学医学部系統解剖学実習において、多臓器不全で死亡した78歳女性に左下大静脈が著しく優位な重複下大静脈が存在する破格を経験した。右下大静脈(通常の下大静脈)は幅2.0mmであり、左下大静脈は幅23.2mmであった。非常に微細な右下大静脈は、第5腰椎上縁の高さで右総腸骨静脈から始まり、腹大動脈の右側を上行し、第2腰静脈が流入したのち、右卵巢静脈が合流した右腎静脈を第1・2腰椎間の高さで受け、その後左下大静脈と第1腰椎下縁の高さで合流した。優位な左下大静脈は、第5腰椎椎体中央の高さで左総腸骨静脈から始まり、腹大動脈の左側を上行し、左卵巢静脈が合流した左腎静脈を第2腰椎上縁の高さで受け、右斜め上方に向きを変え腹大動脈の腹側を越え、右下大静脈と合流していた。合流後の下大静脈は、第12胸椎・第1腰椎間で肝臓からの過剰な肝静脈と右副腎静脈および右下横隔静脈が流入し、第12胸椎上縁で3本の肝静脈を受け横隔膜の大静脈孔を経て胸腔内に入り、右心房に注いでいた。左右の下大静脈下端部を結ぶ吻合枝が、第5腰椎椎体前面で右下方より左上方へと斜め方向に存在していた。尿管は左右ともに外・内腸骨動静脈の腹側を通り、骨盤腔内に下降していた。発生学的には、本例の右下大静脈は、右主上静脈が完全退化をまねがれ、小静脈として残存し、左下大静脈は、左主上静脈が優位に残存したものと考える。

14 右椎骨動脈が2本存在する1破格例

本村 真由子1、佐々木 亨1、渡部 功一2、田平 陽子2、岩永 譲2、嵯峨 堅2、山本 宏一2
1. 久留米大学 医学部 医学科第2学年
2. 久留米大学 医学部 解剖学講座（肉眼・臨床解剖部門）

我々は、2015年度久留米大学医学部解剖学実習において、右椎骨動脈が2本存在する稀な1破格例を経験した。症例は91歳女性で、死因は肺癌であり、既往歴として胃癌をみとめたが頭頸部領域には著明な病変、器質的異常などは認められなかった。右椎骨動脈は2本存在した。1本は、腕頭動脈が右総頸動脈と右鎖骨下動脈となる分岐部の背側面から分枝して頸部を上行した後、第4頸椎の横突孔に侵入していた。もう1本は、通常の椎骨動脈と同様、右鎖骨下動脈より分枝して頸部を斜め上方に走行した後、第6頸椎の横突孔に侵入していた。重複する2つの右椎骨動脈の径は、右鎖骨下動脈由来の椎骨動脈が腕頭動脈由来のものより明らかに太く、重複椎骨動脈症例の一般的傾向と異なっていた。横突孔侵入後、右重複椎骨動脈は、腕頭動脈由来の右椎骨動脈が第4頸椎の横突孔に侵入した直後で合流して1本となり、そのまま横突孔を上行して左椎骨動脈と合して脳底動脈となっていた。また、左椎骨動脈には明らかな異常を認めず、通常通り左鎖骨下動脈から起始して、第6頸椎横突孔に侵入していた。その他の頭蓋内の血管系の異常としては、右後下小脳動脈が右椎骨動脈から起始せず、右前下小脳動脈との共通幹として脳底動脈から起始していた。右重複椎骨動脈の発生は以下のように考察された。椎骨動脈は、通常第1～第6節間動脈の縦吻合により形成され、鎖骨下動脈になる第7節間動脈に吻合する。本例では、これに加え通常消滅する第4節間動脈が遺残し重複椎骨動脈を形成したと考えられた。

15 神経細胞における選択的オートファジー

松本 弦、森 望
長崎大学医学部神経形態学教室

選択的オートファジーは、選択性をもたないオートファゴソームに基質となるタンパク質やオルガネラを選択的に取り込ませる過程であり、マクロオートファジーの特別な形態の一つであると言える。これまでに6種類のユビキチン結合型オートファジーアダプターが同定されている。我々は、神経細胞におけるオートファジーアダプターのmRNA量を絶対定量することにより、オートファジーアダプターの量を比較した。その結果、初代培養神経細胞及びマウスの海馬において、全アダプターの約40%をp62が占めており、タンパク質分解阻害条件下ではそれが50%近くにまで増加する。このことは、p62はオートファジーアダプターとして細胞内に最も多く存在する分子であり、オートファゴソームが基質を取り込む際の足場を形成する主要分子であることを強く示唆する。

16

加齢に伴うアグリカンコアタンパク質と Cat-315 糖鎖の発現変動とメマンチンによる制御

山田純、大笹友博、神野尚三
九州大学 医学研究院 神経解剖学

近年の研究によって、加齢に伴う認知機能の低下には神経可塑性の減少が関与している可能性が示唆されている。ペリニューロナルネットは神経可塑性を制御し、発達期における臨界期終了に関与することが知られているが、加齢変化についてはほとんどわかっていない。本研究では、ペリニューロナルネットの主な構成成分であるアグリカンコアタンパク質とそれに結合する Cat-315 糖鎖の加齢変化を解析した。実験では、若齢マウス(2 カ月齢)と加齢マウス(12 カ月齢)を用い、記憶に関与する背側海馬と情動に関与する腹側海馬を対象として、発現様式の加齢変化を免疫組織化学的に検討した。ステレオロジー法を用いた定量解析の結果、アグリカン陽性ペリニューロナルネットの空間分布密度と Cat-315 陽性ペリニューロナルネットの空間分布密度は、加齢によって変化しなかった。また、蛍光強度解析を行ったところ、アグリカン陽性ペリニューロナルネットは、アンモン角において加齢に伴う変化は認められなかった。一方で、Cat-315 陽性ペリニューロナルネットは、背側海馬アンモン角において、加齢に伴って蛍光強度が増加していた。さらに、抗認知症薬であるメマンチンを加齢マウスに投与したところ、加齢に伴う Cat-315 糖鎖の蛍光強度上昇は抑制された。現在、メマンチンの影響について、シナプスレベルでの超微形態解析や生化学的な解析を行っている。

17

下丘神経回路の神経化学的特性に関する解析

藤本 久貴、神野 尚三
九州大学 大学院医学研究院 神経解剖学

左右から入力された音声情報は、内耳にて一次元の音声波形から神経回路上の情報に変換され、上位に伝送される。下丘レベルの神経回路領域では、より下位の神経回路から様々な情報が抽出されたうえで、上位の神経回路に対して抽象化された形で出力されたと考えられている。また大脳皮質聴覚野などの上位の神経回路から下丘へのフィードバックループの存在も知られている。下丘は lateral cortex, dorsal cortex, central cortex と呼ばれる領域に分類され、投射形式などの神経解剖学的構造が異なることが知られている。また下丘神経細胞は parvalbumin(PV)や Nitric Oxide Synthase(NOS)といった神経化学マーカーで標識されることも知られている。一方で、成熟した聴覚神経回路では神経可塑性に関与するペリニューロナルネットと呼ばれる細胞外基質構造が構築され、回路成熟が機能の獲得に重要な役割を果たす可能性が考えられてきた。しかしながらこれらの分子の細胞腫における関係は、詳細不明なままである。今回我々はこれらの神経化学マーカーの分布を下丘の各領域において、免疫組織化学的に解析した。その結果、GAD67 で標識される GABA 作動性細胞は必ずしも PV 陽性細胞と一致せず、より少数であることが示された。また GABA 作動性細胞における NOS の標識率は、領域に依存することが明らかになった。さらに、ペリニューロナルネットは主に GABA 作動性細胞で観察されたが、一部の非 GABA 作動性細胞でも観察された。これらの結果は、聴覚神経回路の機能形成および発達に関する知見を与える。

18

マウス体性感覚野皮質 4 層におけるバルブアルブミン陽性細胞の特徴的な形態と視床入力との関係

重松 直樹、 福田 孝一
熊本大学大学院 生命科学研究所 形態構築学分野

バルブアルブミン陽性介在ニューロン(PV ニューロン)は大脳皮質の GABA 作動性ニューロンの中で最も多い割合を占め、投射細胞である錐体細胞の活動の調整や大脳皮質内のリズム形成などに関与していると考えられている。本研究では、明確な大脳皮質のカラム構造を呈しているマウスの 1 次体性感覚野 4 層において、PV ニューロンを形態学的手法(蛍光免疫組織化学・共焦点レーザー顕微鏡法)を用いて観察した。1 次体性感覚野 4 層の Barrel は、視床の投射細胞の神経終末に局在する VGluT2 に対する抗体を用いた免疫染色によって特定した。体性感覚野 4 層における PV ニューロンの樹状突起の立体的構造を画像解析ソフト NeuroLucida で再構築し、同内の PV ニューロンは以下の 4 種類に分類できることを見出した。

- Type1. 細胞体と樹状突起を 1 個の Barrel 内に留めているもの
Type2. 細胞体と樹状突起が Barrel 間の septa にあるもの
Type3. Barrel, septa に関係なく樹状突起を伸ばし、細胞体が Barrel 内にあるもの
Type4. Barrel, septa に関係なく樹状突起を伸展させて、細胞体が Barrel の外にあるもの
- 分類した各タイプの PV ニューロン上に分布する視床から投射される入力を定量的に比較するために、共焦点レーザー顕微鏡で取得した蛍光 2 重染色画像を用いて、PV ニューロンの細胞体と樹状突起上に分布する VGluT2 を計測した。その結果、Type1 の PV ニューロンは細胞体上には他のタイプの PV ニューロンより有意に高い密度での VGluT2 の付着が認められた。樹状突起上の VGluT2 についても Type1 は他のタイプとは異なる分布パターンを示した。

19

下行性痛覚抑制系におけるラット視床 内側下核の機能を形態学的に解析する

○倉本恵梨子 1、岩井治樹 1、山中淳之 1、千堂良造 2、大野幸 2、古田貴寛 3
日置寛之 3、金子武嗣 3、後藤哲哉 1
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 歯科機能形態学 1 歯科麻酔全身管理学 2
京都大学大学院 医学研究科 高次脳形態学教室 3
“痛み”の感じ方は精神状態により大きく変化する。例えば試合中のスポーツ選手は少々 の傷では痛みを感じない。これは「下行性の痛覚抑制系」の働きによるもので、脳幹にある痛覚抑制回路が活性化されると、最終的に脊髄後角/延髄後角において痛覚入力 が抑制される。この痛覚抑制回路は様々な脳領域から制御を受けることが知られ、その一つに視床 内側下核(Sm)がある。Sm は均一な細胞構築像を示すものの、脳幹からの痛覚情報が背側部 みにみ入し腹側部には入力しないことから、両者で機能が異なる と推測される。本研究では単一細胞レベルで Sm ニューロンの軸索投射の形態学的解析を行い、背側部と腹側部の機能の違いを明らかにすることを目的とした。遺伝子改変シンドビスウイルスベクターを順行性トレーサーとして用い、単一 Sm ニューロンにウイルスを感染させ蛍光タンパクにより標識、免疫組織化学染色を行い、樹状突起から軸索末端までニューロン全体を完全再構築した。興味深いことに軸索投射領域に違いが見られ、大脳皮質において、背側 Sm ニューロンが眼窩野腹外側部 (VLO)に局限して軸索投射したのに対し、腹側 Sm ニューロンはむしろ VLO を避けて、その周囲に軸索投射することが明らかとなった。VLO は脳幹の痛覚抑制回路に興奮性の軸索投射を送る ことから、背側 Sm は痛覚抑制機能に特化した回路を形成し、腹側 Sm は異なる機能を担っていることが示唆された。

20

味覚神経回路と摂食行動の神経回路は、視床髄板内核群尾腹側部を介して結合する

○岩井治樹、倉本恵梨子、山中淳之、後藤哲哉
鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 歯科機能形態学分野

線条体腹側部は、顎運動、摂食、飲水、あるいは脂肪摂取といった摂食行動に関わっている。線条体は一般に皮質および視床からの投射を受けており、線条体腹側部もまた味覚神経回路に含まれる島皮質からの投射を受けることが報告されている。しかし、線条体腹側部が視床から直接的に投射を受けるのか分かっていない。本研究では、ラット脳において味覚神経回路を構成する内側結合腕傍核から投射を受ける視床髄板内核群尾腹側部に着目し、この脳領域が線条体内のどの領域に投射するのか順行性トレーサー(BDA)を用いて調べた。また、内側結合腕傍核から視床への投射線維と視床から線条体へ投射する神経細胞の細胞体が実際に神経連絡を構成しているかどうか順行性トレーサーおよび逆行性トレーサー(CTb)を用いた二重標識法によって調べた。その結果、内側結合腕傍核は、視床卵形正中傍核を経由して線条体腹正中部に、視床東傍核腹外側部を経由して線条体腹外側部に、視床内側中心核、東傍核腹内側部、および後結合野を経由して線条体腹内側部にそれぞれ投射した。一方、視床後内側腹側核小細胞部経由のものは、前交連後脚間質核に投射した。これらの結果から、視床髄板内核群尾腹側部が線条体腹側部の異なる領域に投射すること、さらには、結合腕傍核-視床-線条体路が存在し、島皮質を経由しないで、視床から直接的に線条体腹側部に投射する神経路があることが明らかとなった。

21

ケロイドおよび肥厚性癬痕の三次元微細構造解析（正常皮膚と成熟癬痕との比較検討）

○カ丸 由起子 1）太田 啓介 1）金澤 知之進 1）東 龍平 2）都合 亜記暢 2）岡山 聡子 1）中村 桂一郎 1）
1）久留米大学解剖学講座 顕微解剖・生体形成部門 2）久留米大学電子顕微鏡室

【目的】ケロイドおよび肥厚性癬痕は、癬痕組織が過剰に増殖したヒト特有の傷跡の異常である。特にケロイドは自然治癒が少なく治療抵抗性であるため、自然治癒する肥厚性癬痕との区別を厳密に行う必要がある。しかし、病理組織学的に鑑別は容易ではない。今回我々は、正常皮膚、成熟癬痕と比較してケロイドおよび肥厚性癬痕をFIB/SEMを用いて観察し、組織内細胞構築を中心に、両者の三次元微細構造の違いについて検討した。【材料および方法】成人ヒト正常皮膚 (n=3)、成熟癬痕 (n=3)、肥厚性癬痕 (n=4)およびケロイド (n=4)をハーフカルノフスキー液で固定後、フェロシアンカリ、オスミウム、ウラン等による *en bloc* 染色を施し、エポキシ樹脂に包埋した。SEM(Quanta3D FEG, FEI)にてウルトラミクロトームで作製した平滑なエポキシブロック表面の組成コントラスト像を取得し、広範囲観察およびFIB/SEMによる三次元再構築により、線維芽細胞・マクロファージの細胞間接触に着目して解析を行った。【結果】正常皮膚では、線維芽細胞とマクロファージが緊密に接触しており、成熟癬痕では正常皮膚と同様の接触が見られた。肥厚性癬痕では、マクロファージと線維芽細胞の接触はあるものの、緊密ではなかった。一方、ケロイドではほとんど接触は見られなかった。【考察】FIB/SEMを用いた三次元微細構造観察により、正常皮膚とケロイドおよび肥厚性癬痕では、線維芽細胞とマクロファージとの細胞間接触の様式異なることが初めて明らかとなった。FIB/SEMは、このような解析に非常に有用であると考え

22 医学科4年生における系統解剖学実習実施の試み—胸・腹部の内臓系を中心として

○弦本敏行、岡本圭史、分部哲秋、佐伯和信、大神敬子
長崎大学医歯薬学総合研究科肉眼解剖学

【はじめに】本学医学科では昨年度まで、2年生前期に約40回の解剖学実習を実施してきた。本年度よりカリキュラムの調整を申請した上で、計8回の実習を4年生に振り分け、胸部・腹部内臓系を中心とした解剖学実習を実施した。【方法】本年度の人体解剖学実習では、2年生は4月から7月の間、3名1グループで解剖を実施した（毎週1回、計8回）。そのうち5月～6月の2か月間は両学年の学生が異なる曜日に同じご遺体で解剖を行うため、胸部および腹部の内臓に関しては、主として4年生が実際の解剖を行い、2年生はその後に内臓器の観察を主体とした内容で実習を進めて行った。4年生に対しては、AI用CTで撮影した画像情報と実際の内臓器との照合についても強調しながら実習を行った。【結果】いずれの学年においても最大の学習効果が得られるよう、5月と6月の2か月間は両学年の実習の進行具合を適宜調節しながら進めていく必要があった。4年生の実習では正常解剖の学習に加えて、病的な諸所見の観察にも重点を置くことによって、内臓疾患の理解にも役立てることができた。2年生においても、従来とほぼ同程度の学習効果を得ることができた。【考察】高学年における系統解剖学実習は、正常解剖学に関する知識の再確認のために有効である。さらに、臨床各科の学習をひととおり終えた4年生学生にとっては、さまざまな疾患に関する知識の確認および理解の上でも有意義である。2年生全員が実習後に提出した感想文では、2年後に自らが行う実習に期待する意見があった一方で、例えば心臓の切開などは今年も自らの手で行いたかった、などという感想もあった。このことは今後の検討課題と思われた。

23 踵腓靭帯の欠損ならびに同側の外側距踵靭帯の肥厚を認めた1例

吉塚久記^{1,2}、柴田健太郎¹、岩城彰³、浅見豊子²、倉岡晃夫¹（¹ 佐賀大学医学部 解剖学・人類学分野 ² 附属病院 リハビリテーション科 ³ けいめい記念病院 整形外科）

平成25～27年度の佐賀大学医学部解剖実習体78肢において、踵腓靭帯の欠損ならびに同側の外側距踵靭帯の肥厚を認めた1例に遭遇したため、若干の文献的考察を加えて報告する。本例は64歳男性、死因は急性心不全であり、足部靭帯に断裂や外科的介入の形跡は認めなかった。本例の右側踵腓靭帯は欠損しており、同側の外側距踵靭帯は、前距腓靭帯の距骨停止部とは独立した状態で距骨頰に起始し、踵骨外側面に停止していた。外側距踵靭帯の全長は39mmで、幅は距骨付着部遠位端・靭帯中央部・踵骨付着部遠位端で各々5mm・9mm・8mmであった。本例の左側踵腓靭帯は腓骨下端に起始し、全長は24mm、幅は腓骨下端・靭帯中央部・踵骨付着部遠位端で各々4mm・4mm・11mmであり、異常は認めなかった。左側外側距踵靭帯の全長は21mm、靭帯中央部の幅は4mmであった。先行研究(Burks and Morgan, 1994)では、外側距踵靭帯39例の平均の全長は26.5mm、幅は4.4mmと報告されており、本例右側は踵腓靭帯欠損に伴い代償的に外側距踵靭帯が肥厚している可能性が考えられる。ただし、この肥厚は距踵関節における内反（内反）の運動を過剰に制限し、距腿関節の背屈時に天蓋で生じる距骨の運動を妨げていた可能性が推察される。

24 ホルマリン代替液（プリザーブ液）の改良と応用

○藤倉義久、梶原良太、北村裕和、立川修二、千葉政一、伊奈啓輔
大分大学 医学部 分子解剖学講座

【背景と目的】ホルムアルデヒド(FA)は解剖学領域において①組織標本作成のための固定、②臓器の長期保存、③ご遺体の固定に汎用されている。一方、FAは関係法規の改正により厳格な管理を求められている。我々は第64回本学会においてFAの代替液としてピロリドン(NVP)を主成分とした混合液（プリザーブ液）が上記3用途に有用であることを報告した。今回は新たにエチルアルコール(EtOH)や塩化ナトリウム(NaCl)を加えることにより改良を試みた。

【方法】Ⅰ）ラットの臓器を異なるEtOH濃度に調節したプリザーブ液にて浸漬固定し、包埋、スライド作成後顕微鏡にて観察した。Ⅱ）ラットの大腿動脈からプリザーブ液中のNVP濃度が体重の5%となるように注入した。この時も種々濃度のEtOHやNaClを添加した。動物は5%NVP水溶液に3日以上浸漬した後、取り出して関節の可動域を測定した。また関節近傍の筋にマッサージを加えた後再び関節の可動域を測定した。ラットを開腹し臓器の臭気・外見・弾力等を観察し、その結果を比較検討した。

【結果】Ⅰ）従来不具合が見られた脳及び筋組織標本はEtOHの添加で改良することができた。Ⅱ）注入実験においてNaCl添加で臭気が軽減されたように感じた。また、EtOH添加で関節可動域や内臓にやや硬化が見られたようであった。

【結語】安全性も含め、もう少し改善の余地があると思われた。

25 解剖学実習室のホルムアルデヒド作業環境測定において第1管理区分の2年連続完全達成に至るまでに必要となったさまざまな方策

福田孝一、川井克司、重松直樹、熊谷芳宏、木庭義和、青木隆昌*、片山謙吾*
熊本大学大学院生命科学研究部形態構築学、*運営基盤管理部施設運営ユニット

平成19年に特定化学物質障害予防規則等の改正が行われ、解剖学実習室でもホルムアルデヒドの管理基準濃度0.1ppmの達成が法律で求められることとなった。熊本大学医学部では各実習室に局所排気装置を設置し、平成22年の実習から稼働させた。局所排気装置は以前に比べ大幅なホルムアルデヒド濃度の低下をもたらしたが、それだけでは限界があり、依然として第2管理区分にとどまった。また実習内容に応じた濃度の変化が懸念されたため、作業環境測定士資格を有する学内の施設運営職員の協力により、実習進行に沿って測定を反復するとともに、濃度低減のための方策を協議し実行に移した。その過程で以下の問題点が判明した。（1）ホルムアルデヒド濃度は、開腹・開胸、および背部の解剖の日程で高くなった。（2）特に切出した臓器をシンクに移動させ洗浄する際に濃度が最も高くなった。（3）解剖台周囲の可動性フランチを一部取り外したり、木枕の使用等によりご遺体の一部がフランチの高さを越えて、ホルムアルデヒドが有効に捕捉されていない状況が散見された。そこで実行が容易な（3）の改善を試みた結果、実測値では管理濃度0.1ppmをほぼクリアできた。ただし作業環境評価基準による計算式からなお第2管理区分にとどまり、また切出し作業時には一部区域で実測値も0.1ppmを若干越えていた。そこで上記（3）やその他の対策を学生に励行させた結果、第1区分と第2区分の境界付近となった。さらに切出した臓器は蓋つき容器内の水に入れて移動し、内容物の洗浄方法を工夫することにより、平成26年と27年に、消化管切出しの際にも第1管理区分を達成できた。以上の経験から、ハードとしての排気装置の設置に加えて、きめ細かい対策が必要ながわかった。