

日本解剖学会

第75回中部支部学術集会

会期：平成27年10月3日（土）、4日（日）
会場：福井大学松岡キャンパス

101 全内臓逆位を認めた1例と、胃噴門部の耳垂様構造に関する考察

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】 本年度の肉眼解剖学実習では、腹腔鏡下手術におけるランドマークとして役立つ解剖学的構造として、胃噴門部の耳垂様構造に注目し、30体の解剖実習体による調査を行った。また、全内臓逆位の1例にも遭遇した。

【胃噴門部の耳垂様構造】 胃噴門部付近には重要な動脈や神経が存在し、腹腔鏡下でこの部位に侵襲を加える場合、噴門部周囲構造の位置関係を十分に把握する必要がある。今回我々は、『胃噴門部の耳垂様構造』に注目し、構造の大きさと附着部位を観察した。30例の解剖体のうち胃癌に対する胃全摘術既往症例と、腫瘍の腹膜播種による観察困難症例を除いた28例について検討を行ったところ、22例（78.6%）において明瞭な構造として観察できた。厚さ1mm程度の薄膜状の構造がほとんどであり、22例中18例（81.8%）は、耳垂様構造が横隔膜と小網の双方に附着がみられた。この他、2枚の耳垂様構造を認める1症例や、厚さが4mmにも及ぶ3症例がみられた。

【全内臓逆位】 胃噴門部の耳垂様構造を観察していた際に、全内臓逆位の1例（93歳男性、死因：肺炎）を経験した。内臓逆位症は胸・腹腔内臓器の一部または全部が左右逆転した先天性異常で、3,000～10,000人に1人の割合で発見される比較的多発な疾患で、繊毛不動症候群（カルタゲナー症候群）が主な原因と考えられる。本症例は、胸腹部内臓が正常に対して完全な鏡像を呈していた。ただし奇静脈・半奇静脈は正常の位置関係であった。なお、胃噴門部の耳垂様構造は横隔膜と小網の双方に附着していたが、胃噴門部の付近の他の構造と同様に完全逆位を呈していた。

102 気管分岐部の軟骨の構成に関する解剖学的研究

齒村貴弘、木南利栄子、安高悟、本間智

金沢医科大学医学部解剖学Ⅱ

【目的】 ヒトの気管分岐部における軟骨の外観は、多くの成書を見ると気管分岐部から左右の気管支の始部にかけてV字またはY字の一つの軟骨として描かれているが、一方でPaturet(1958)は気管分岐部に軟骨を欠く膜型が半数を占めると記し、加えて、気管分岐部の軟骨は気管あるいは気管支に由来しており、その由来を基に5型に分類するなど、その記載の内容が成書とは異なっている。本研究では、解剖学実習体から気管分岐部の軟骨の肉眼的な形態パターンを明らかにし、これが気管軟骨の構成にどのように関与するのか検討することにより、従来の記載の相違に対して、妥当性を検討することを目的とした。**【材料と方法】** 金沢医科大学に献体された解剖学実習体17体の気管支を用いた。外膜を除去して気管軟骨と気管支軟骨の表面を削出し、軟骨の形状を写真および描画で記録した。一部は軟骨染色および透明化処理を行った。分類はPaturet(1958)による。**【結果】** 気管分岐部の軟骨が1)最後の気管軟骨から続くY字型2例、2)左右の最初の気管支軟骨が合わさって気管分岐部に続くV字型0例、3)最初の右気管支軟骨から続く右気管支型6例、4)最初の左気管支軟骨からの左気管支型4例であった。さらに5)Paturetの分類にあてはまらないものが3例あり、6)Paturetが約50%を占めると記載した線維膜型は、17体中わずかに2例であった。**【結論】** 多くの気管分岐部は、右もしくは左の最初の気管支軟骨が気管軟骨を形成していた。従来の成書に類案に見られるV字型の一つの軟骨というような例はなく、またPaturetがその半数を占めると記載した線維膜型も1割程度であった。

103

両側性重複膝蓋骨の1例

愛知医科大学 医学部 解剖学講座
○小澤由紀, 内藤宗和, 矢倉富子, 中野隆

重複膝蓋骨は、一側に2個の膝蓋骨が存在するきわめて稀な形態変異である。今回、重複膝蓋骨が両側性に存在する症例（97歳女性）を見出したので報告する。

【結果】 両側において、上下方向（近位・遠位方向）に2個の膝蓋骨が存在していた。上位の膝蓋骨は、下位の膝蓋骨よりやや内側で、中間広筋の深層に位置していた。上位および下位の膝蓋骨は、単一の関節腔を共有し、ともに内面（関節面）の辺縁は滑膜ヒダに被われていた。大腿四頭筋腱は、上位の膝蓋骨の表層を乗り越え、下位の膝蓋骨底に附着していた。大腿四頭筋腱と上位の膝蓋骨の間には、関節包内面から連続する滑膜および脂肪組織が介在していた。

【考察】 重複膝蓋骨の位置関係は、症例によって異なり、上下、左右の例が報告されている。2個の膝蓋骨が上下に並ぶ症例は、Joachimsthal(1902)を嚆矢として、10例程度の報告がある。その大部分は単純X線写真において偶然に発見された症例であり、詳細な解剖学的観察は演者らが渉猟した限りにおいて存在しない。本例において、大腿四頭筋腱は下位の膝蓋骨だけに附着していた。したがって、下位のものが本来の膝蓋骨であり、上位のものは過剰な膝蓋骨であると考えられる。

重複膝蓋骨の本態は明らかではないが、分裂膝蓋骨と同様に、2つの分離した骨化核から生じる可能性が考えられる。

104 愛知医科大学における骨学実習の改善への試み
—‘自己啓発型’骨学実習手びきの提案—

1. 愛知医科大学 医学部 医学科 2学年次 2. 愛知医科大学 医学部 解剖学講座
○山田崇義¹, 伊藤由希子¹, 今枝陽¹, 横井宏幸¹, 石井宏和¹, 久納しおり¹, 竹村友字輝¹, 中里尚貴¹, 南川大輔¹, 小澤由紀², 内藤宗和², 中野隆²

【目的】 現在、本邦の医学部は医学教育の国際基準‘グローバルスタンダード’を満たすため、基礎医学の授業時間が削減される傾向が強まり、骨学実習を行うことが困難になりつつある。また、骨格系は基礎医学最初の難関でもあり、学生は解剖学用語の単純暗記に陥り、解剖学に対する苦手意識を持ちやすい。今回、全国の医学部における骨学実習の現状を調査し、愛知医科大学における骨学実習の改善を試みた。

【方法】 インターネット上に公開されている情報を基に、全国の医学部における骨学実習の時間および参考書を調査した。また、2015年度の本学1学年次生（113名）の骨学実習に2学年次生（9名）がチューターとして参加した。そして、骨学実習が終わった段階で『骨学実習の手びき』に関するアンケート調査を行い、チューター制度のなかった昨年度の結果と比較した。

【結果と考察】 全国20大学の調査の結果、骨学実習の時間は8.4±4.0時間、『骨学実習の手びき』を用いている大学は7大学であった。本学の骨学実習では、学生チューター制度の導入によって学生の理解度や満足度に大きな変化は見られなかった。そこで、新たな実習書『‘自己啓発型’骨学実習手びき』を提案する。

105 ネズミ科齧歯類の咬筋内部構造にみられる種間変異

佐藤和彦、矢野航、渡邊竜太、小萱康徳、江尻貞一
朝日大・歯・口腔構造機能発育・口腔解剖学

【目的】 哺乳類の咬筋はいくつかの筋層に分化し、内部を腱膜で仕切られた複雑な構造をもつ。咬筋内部構造にみられる適応的な特徴を知るためには、系統関係を考慮した近縁な分類群間の比較をおこなう必要がある。

【材料と方法】 ネズミ科齧歯類の咬筋内部構造にみられる種間変異を明らかにするため、5亜科15種の咬筋表層・深層（前部および後部）・内側層を肉眼解剖学的に観察して比較をおこなった。

【結果】 咬筋表層・深層後部・内側層では、内部構造に大きな種間変異が認められなかった。一方、深層前部の内部構造は、亜科間・亜科内で著しく異なっていた。起始部については、ハタネズミ亜科、アメリカネズミ亜科のメキシコウッドラットでは2枚、ネズミ亜科、アレチネズミ亜科、アメリカネズミ亜科のアラゲコトラット、シカマウスでは1枚の腱膜が認められた。キヌゲネズミ亜科およびアメリカネズミ亜科のキタバタマウスでは起始部における腱膜が欠如していた。また停止部については、キヌゲネズミ亜科、ネズミ亜科、アレチネズミ亜科では1枚、アメリカネズミ亜科、ハタネズミ亜科では2枚の腱膜が認められた。

【結論】 ネズミ科の咬筋においては、深層前部が系統進化に伴う構造の変化が最も起きやすい部位であることが示唆された。また、起始部における腱膜の数は食性への適応、停止部における腱膜の数は系統的な関係を反映する特徴と考えられた。

106 脳原基における側方抑制を四次元的 (三次元+時間) に理解する

川上巧¹、深沢有吾²、宮田卓樹¹

1. 名古屋大学大学院 医学系研究科 細胞生物学教室
2. 福井大学医学部 組織細胞形態学・神経科学

発生中の脳原基には脳室帯と呼ばれる構造があり、そこは細胞生産と細胞運命選択が行われる場である。誕生したばかりの細胞はやがて未分化状態、あるいは、ニューロンとなる手前の分化途上状態のどちらかへと進む。生まれたての細胞がその運命を「未分化」へと傾けるには、近隣細胞から Delta が提示され、それを受容することが重要であると以前から知られており、「分化途上細胞」が Delta の主な提示主であろうと示唆されてきた。しかし、その運命選択のために、分化途上細胞と「いつ、どこで、どの程度 (時間・面積)」接触する必要があるのか、その具体的なルールは分かっていない。この問題に取り組むためにまず、生まれたての細胞と分化途上細胞との細胞間接触の観察システム構築を試みた。これには分化途上細胞が緑色蛍光標識されるよう設計された Gadd45g-d4Venus マウスの大脳組織を、脂溶性赤色蛍光色素 (FM4-64) で染色する方法を用いた。細胞膜を標識する FM4-64 による細胞輪郭の可視化と、Venus シグナルによる分化途上細胞か否かの識別、を同時に行えるシステムである。これにより接触「相手・部位・時間・面積」を特定することが可能となった。この手法を用いた観察で注視すべきは、生まれたての細胞と Delta 局在部位との接触であるが、Delta の膜局在部位は特定されていない。そこで、Delta-Venus ノックインマウスを用いた免疫電顕を行った。Delta (Delta-Venus) は apical 突起の膜表面に局在しており、その中でも特に apical 面近傍域に存在する葉状仮足様構造体にその局在が多く見られた。現在、この領域における細胞間接触と運命選択との関係性を調査中である。

107 自閉症モデルラットにおける中枢性聴覚伝導路の形態学的考察 -聴覚過敏のメカニズムの解明-

三重大学大学院 医学系研究科 医科学専攻 (修士課程)¹、発生再生医学²
○原奈央¹、江藤みちる²、大河原剛²、成田正明²

【目的】自閉症は先天性的脳機能障害であり、社会性行動の異常やコミュニケーションの異常、活動と興味の偏りの特徴を持つ発達障害である。感覚過敏、特に聴覚過敏は自閉症においてよく現れる特徴であるが、そのメカニズムは詳しく分かっていない。私たちはこれまでサリドマイドやバルプロ酸を用いた自閉症モデルラットを報告してきた。本研究では、ヒト自閉症聴覚過敏のメカニズム解明につながると思われる、自閉症モデルラットにおける中枢性聴覚伝導路の形態異常について報告する。

【材料と方法】自閉症モデルラットは従来どおりの方法で作製した。即ち Wistar ラットの妊娠 9、10 日目にサリドマイド 500 mg/kg を経口投与した。生まれた仔ラットの生後 21 日と 50 日に 4%PFA で灌流固定を行い、脳を摘出し、50 μm の厚さで浮遊切片を作製した。それらを Calbindin 抗体を用いて免疫染色を行い、中枢性聴覚伝導路である脳幹の上オリブ複合体を観察した。

【結果】自閉症モデル動物群ではコントロール群と比較して、抑制性神経である台形核の Calbindin の発現が低下していた (第 38 回日本神経科学大会で報告済、右図)。自閉症発症には性差が存在しているため、今回我々は雌雄差について検討し、雄の自閉症モデル動物群のみに Calbindin の発現低下がみられた。

【結論】ヒト自閉症は、男児優位といわれている。一方、感覚過敏発症の性差は、男児優位とはわかっておらず、興味深い。

108 自閉症関連因子 CD38 のグリア細胞発達に与える影響

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 がグリア細胞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は、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。CD38 KO マウスにおいては、生後 7 日齢~14 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。アストロサイトマーカー (GFAP, s100b) についても、生後 1 日齢~7 日齢において顕著な発現減少が認められた。これらの結果より、CD38 はオリゴデンドロサイト、アストロサイトの発達に関与している可能性が示唆された。

109 PTSD モデルラットの脳内における CRH の発現変化

○橋本 隆¹、松田 賢一²、吉井 崇喜³、河田 光博⁴、飯野 哲¹

1. 福井大 医 人体解剖学 2. 京都府立医 生体構造科学
3. 京都府医 精神科 4. 佛科大学 保健医療技術学部 理学療法学科

心的外傷後ストレス障害 (PTSD) は、日常では経験し得ないような心的外傷体験 (トラウマ) に後発する精神疾患で、フラッシュバック等の不安症状が長期に持続する。PTSD ではネガティブフィードバックが充進する等、内分泌環境との関連が報告されており、ストレス応答や情動に関連する脳領域においてストレス負荷後に脳機能障害が引き起こる可能性が示唆される。本研究では動物モデルを使用し、CRH に着目して視床下部のストレス中枢である室傍核 (PVH) や、不安様行動に関連する境界条床核 (BNST) および扁桃体中心核 (CeA) での発現変化を検索した。拘束・強制水泳・エーテル深麻酔の連続暴露よりなる Single prolonged stress (SPS) 負荷を行った成熟オスラットを用い、7 日の無接触期において各種アッセイを行った。SPS 負荷後 7 日目にマイクロレイ解析を行ったところ、CeA における CRH の遺伝子発現量は 2 倍以上の増大をみとめたが、BNST では変化を示さなかった。PVH と BNST における CRH-mRNA とペプチドの発現レベルをリアルタイム PCR 法および免疫組織化学により検討した結果、明らかな変化は認められなかった。一方 CeA における CRH の発現レベルは SPS 負荷によって有意に増大した。また、CRH 免疫陽性の細胞数は対象領域の全てにおいて SPS-コントロール群間で有意差を示さなかった。情動中枢である扁桃体において観察された不安惹起作用のある CRH の発現レベルの上昇が、PTSD における不安症状に深く関与する可能性が考えられた。

110 慢性疼痛発症時における大脳皮質一次体性感覚野の役割

○石川達也^{1,2}、江藤圭²、石橋仁³、鍋倉淳一^{2,4}

- 1 福井大学 医学部 組織細胞形態学 脳形態機能学, 2 生理学研究所 生体恒常機能発達機構研究部門, 3 北里大学 医療衛生学部 生理学教室, 4 総合研究大学院大学 生理科学専攻

これまで我々は、患肢と対側の大脳皮質一次体性感覚野 (S1) の可塑的変化が慢性疼痛発症の一因である事を報告した。一方で fMRI を用いた研究では患肢と同側の S1 (ipsi-S1) においても脳機能活動充進を反映した報告がある。しかし、この ipsi-S1 における脳機能活動充進は 1) どの細胞に起因するか、2) どのような役割を担っているか不明である。したがって、本研究では坐骨神経を結紮したモデルマウスを用い、ipsi-S1 における興奮・抑制性神経細胞およびアストロサイトの活動を *in vivo* 2 光子 Ca²⁺ imaging 法により観察した。

その結果、ipsi-S1 における抑制性神経細胞とアストロサイトの活動は充進したが、興奮性神経細胞の活動は減弱した。これは、慢性疼痛時 ipsi-S1 では興奮性神経細胞が抑制性神経細胞による過剰抑制を受けている事を示唆した。この抑制活動充進が担う機能を検証するため、GABA_A 受容体のアンタゴニストを ipsi-S1 に投与したところ、5 層錐体細胞の樹状突起スパインの形成・消失 (神経回路再編充進を示唆する現象) が増加し、健常肢 (患肢と対側の後肢) で痛覚閾値の低下が認められた。また、この閾値低下はアストロサイトの活性化を薬理的に抑制すると生じなかった。

慢性疼痛時、fMRI で観察された ipsi-S1 における脳機能活動の充進は、1) 抑制性神経細胞およびアストロサイトの活動充進を反映し、2) 健常肢の痛覚閾値を正常に保つ機能を担っている事が示唆された。さらに、S1 において興奮性神経細胞およびアストロサイトの活動充進が神経回路再編を誘発し疼痛を惹起する事を示唆した。

111 海馬神経細胞における FILIP 関連分子の機能解析

○黒田一樹¹、謝敏カク¹、深澤有吾¹、猪口徳一²、岡雄一郎²、八木秀司³、佐藤真²
¹福井大学医学部形態機能医科学講座脳形態機能学、²大阪大学大学院医学系研究科解剖学講座神経機能形態学、³兵庫医科大学医学部解剖学 (細胞生物部門)

【目的】マウスの大脳皮質の発生過程における興奮性神経細胞の細胞移動に関わる分子の解析を行い、FILIP が神経細胞の移動開始時のアクチン線維の動態を制御に関与することを見出してきた。更に、FILIP は成体の脳において梨状皮質の神経細胞で発現し、アクチン線維の動態を制御することにより樹状突起上のスパインの形態や機能を制御していることを見出してきた (Yagi H. *et al.* 2014)。FILIP の関連分子である FRM1 (FILIP-related molecule 1) は大脳皮質や海馬の神経細胞で発現しており、海馬神経細胞における FRM1 の機能を明らかにするために解析を行った。【材料と方法】1) マウスの胎児 (E17) の海馬から海馬神経細胞を培養し、FRM1 の発現を抑制する shRNA 等を導入して FRM1 の機能解析を行った。2) 大脳皮質や海馬神経細胞で FRM1 を欠損したマウスを作成するために、FRM1 の flox マウスと大脳皮質や海馬の神経細胞で Cre 組換え酵素を発現する Emx1-Cre マウスと交配し、FRM1 コンディショナルノックアウトマウス (cKO) を作成して生体における FRM1 の機能解析を行った。【結果】1) 海馬培養神経細胞において FRM1 の発現を抑制すると、スパインの全長が変化し、また細胞膜上の NMDA レセプター-2A の発現が増加することを見出した。生化学的解析により、FRM1 は NMDA レセプターの細胞内領域に結合することも見出している。2) 大脳皮質や海馬の神経細胞で FRM1 を欠損した cKO マウスでは、オープンフィールドを用いた行動解析によって FRM1-cKO マウスが不安様行動を示すことを見出した。

112 新規軸索ガイダンス分子 Netrin-5 の神経新生領域における発現

○山岸覚、佐藤康二
浜松医科大学解剖学講座神経機能学分野

神経細胞の移動や軸索投射は個々の細胞で異なり、厳密に制御されているにも拘らず、まだまだその全容は明らかになっていない。私は新規軸索ガイダンス因子を見出すため、Netrin-1 に注目し、C345C ドメインに対するホモログ検索を行った。その結果、新規ファミリー分子として Netrin-5 を見出した。哺乳類における Netrin ファミリーは Netrin-1, 3, 4 が知られているので、4 番目の Netrin ファミリー分子となる。Netrin-5 の成体ラット脳における発現は非常に特徴的で、側脳室下帯(SVZ)、海馬歯状回の subgranular zone (SGZ) 等、神経新生が活発な領域において見られた。Netrin-5 は transient amplifying cells マーカーである Mash1、ニューロblast マーカーである DCX、両細胞を染色する Stathmin-1 との共局在が観察され、幹細胞・グリア細胞のマーカーである GFAP とは重ならなかった。すなわち、SVZ では C 細胞と A 細胞が Netrin-5 を発現しており、SGZ では Type2a-Type3 細胞に発現していることが明らかとなった。以上の結果から、Netrin-5 が新規ガイダンス分子として神経新生におけるニューロblastの未分化状態の維持や細胞移動に関わっている可能性が考えられる。

113 出芽酵母リポファジーの膜動態

辻塚磨、藤本萌、高鳥翔、藤本豊士
名古屋大学大学院 医学系研究科 分子細胞学

過剰なエネルギーはトリアシルグリセロールやコレステロールエステルなどの脂質エステルとして、細胞内の脂肪滴に貯蔵されることが知られている。脂肪滴は脂肪細胞だけでなくほとんどの細胞に存在し、貯蔵された脂質はエネルギー源としてだけでなく、膜生成などにも利用され、生理的に重要な役割を持つことが明らかになってきた。脂肪滴に貯蔵された脂質の分解は、おもに細胞質中の酵素(リパーゼ)の働きによるものと理解されてきたが、近年、オートファジーによる分解(リポファジー)が関与することが明らかにされ、大きな注目を集めている。ラット肝細胞や出芽酵母などにおいてリポファジーが報告されているが、それらが共通のメカニズムによって起こるのか、また他のオートファジーと同じ分子機構によるものかなど、不明な点が多く残されている。

本研究では、リポファジーがどのようなメカニズムで進行するかを明らかにするために、急速凍結・凍結切断レプリカ標識法(QF-FRL)やディープエッチ電子顕微鏡法など様々な電子顕微鏡技術を駆使し、出芽酵母のリポファジーにおける膜動態を解析した。その結果、脂肪滴はマイクロオートファジーによって、すなわち、オートファゴソームを介さずに、液胞膜の陥入により直接液胞内部に運ばれることが明らかになった。また液胞内部においては、リポファジー(もしくはマイクロオートファジー)により形成された小胞は、マクロオートファジックボディとは真逆のホスファチジルイノシトール3-リン酸(PtdIns3P)の非対称性を有することが明らかになった。

114 培養筋芽細胞を用いた細胞膜融合メカニズムの解明

磯部茉莉、亀高論
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

【目的】発生中の筋の成長においては、筋衛星細胞が活性化、分化し筋芽細胞となった後、筋芽細胞同士或は筋芽細胞と筋管細胞との細胞融合を経て多核の筋細胞が形成される。これらの過程における細胞間の認識機構等、その基本的な分子機構は未だ不明な点が多い。本研究では、筋芽細胞の膜融合の基本的な分子機構、及びその調節機構を明らかにする事を目的とし、まず筋芽細胞の膜融合現象を生きた状態で簡便にモニターする為の細胞系を開発し、それらの細胞を用いて新たな膜融合関連因子を探索する事を目指した。

【材料と方法】マウス由来培養筋芽細胞(C2C12細胞)集団の中から高分化能を有する細胞のクローンを単離した(クローン#4)。その後、GFPとH2B-mCherryの発現ベクターを遺伝子導入し、安定発現株を作製した。これらを混合培養、筋分化誘導し、その後1週間蛍光顕微鏡により経時的に観察を行った。

【結果】今回単離したC2C12細胞クローン#4は分化誘導後4日目において約53%の細胞融合率がみられた。蛍光蛋白質発現細胞の共培養においては分化誘導開始後2日目から3日目にかけてGFP、H2B-mCherryの両方を有する筋管の形成が見られ始めた。【結論】C2C12細胞の高分化能クローン由来の蛍光蛋白質の安定発現株を用いることで、細胞融合を高効率で観察する事が出来るようになり、生細胞における細胞融合現象を容易にモニターする事が可能となった。この系を用いることで新たな細胞膜融合関連因子の探索をより簡便に行うことが可能となると考えられる。

115 新規微小管状態デルタ3化の局在解析

池上浩司¹、Vu Thi Hang¹、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αチューブリンは、遺伝子にコードされたカルボキシル末端(-GEEY)のチロシン残基が切除される脱チロシン化(-GEE)、その次のグルタミン酸残基が除去されるデルタ2化(-GE)を受ける。われわれは最近、デルタ2化を担う酵素の生化学実験において、さらに次のグルタミン酸残基が除去されるデルタ3化(-G)が起こることを発見した。本研究では、デルタ3化状態のαチューブリンC末端領域合成ペプチドを抗原にしてポリクローナル抗体を新たに作成し、マウス組織内におけるデルタ3化αチューブリンの存在比と局在を解析した。組換えαチューブリンC末端領域を用いた定量解析により、デルタ3化αチューブリンが最も多く検出された組織では、デルタ3化αチューブリン量は全αチューブリンの2~3%であった。当該組織内におけるデルタ3化αチューブリンの局在について蛍光免疫染色法により解析を行った結果、組織内においてデルタ3化αチューブリンが不均一に分布していることが明らかとなった。また、存在比の少ない組織由来の細胞を蛍光免疫染色法により解析した結果、特殊な構造を持つ微小管にデルタ3化αチューブリンが豊富に集積していることが明らかとなった。

116 マウス精細管の三次元構造

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

【目的】マウス精細管の数、分岐、盲端、長さ、走行、相互関係などの三次元構造を明らかにする。【方法】マウス精巣の連続切片を作製し、HE染色を行い、すべてのスライドをパーチャルスライドスキャナでデジタル化した。三次元再構築ソフトAmiraを用いて、デジタル化した画像の位置合わせを行い、精細管を精巣網から連続的にマークし、三次元再構築を行って解析した。【結果】一匹のマウスのひとつの精巣において、精細管の数は11本で平均長は140mm、各精細管は上下にヘアピンカーブを描きながら円周状の走行を示し、頭部に近いカーブは精巣の表面、尾部に近いカーブは内側に位置して全体として漏斗型を示し、尾部側の精細管が頭部側の精細管を外側下部からコップを重ねるように取り巻いていた。精細管全体で分岐点が9、盲端が1、精巣網との結合点が28あった。【結論】精細管の走行は全体として胎生期の精巣索の構造を保っていることが判明したが、個体により細部に多様性があることも示唆された。

117 2型糖尿病 SGLT 阻害剤投与モデルマウスにおける腎近位尿管の3次元超微細構造解析

○齋藤成¹、吳空¹、志茂聡^{1,4}、齋藤百合花¹、Truc Quynh Thai¹、Nguyen Huy Bang¹、藤井靖久^{1,3}、大野伸一^{1,3}、大野伸彦^{1,2}
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)自然科学研究機構 生理学研究所 3)帝京科学大学 医療科学部 4)健康科学大学 作業療法学科

Serial Block Face-Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM) は組み込み式マイクロームによる表層切削とSEMによる試料の断面観察を交互に反復し、様々な生体組織の3次元超微細構造解析を行う方法である。本研究では2型糖尿病 SGLT 阻害剤投与マウスモデルの腎組織を用いて SBF-SEM による解析を行い、SGLT 阻害剤が早期腎障害に及ぼす薬理作用を検討した。4 週齢雄マウスに 20 週齢まで通常食もしくは高脂肪食を与え、体重と血糖値を測定した。一部のマウスでは、固定 1 日前より Na⁺・グルコース共輸送体(SGLT)阻害剤の一種であるフロリジン、もしくは DMSO(コントロール)を投与した。灌流固定後、OTO 法とウラン・鉛のブロック染色を行い、樹脂包埋した。SBF-SEM により近位尿管の連続断面画像を取得し、形態学的特徴とミトコンドリアの体積を解析した。20 週齢では、通常食群と比較して高脂肪食群で平均体重増加と平均血糖値上昇がみられ、フロリジン投与後は高脂肪食群でのみ有意な血糖値低下を認めた。SBF-SEM 観察では、近位尿管の異なる部位(S1~S3)のうち、SGLT を介した糖の再吸収の盛んな S1 と S2 の解析を行った。その結果、通常食の DMSO 群では基底陥入構造に沿って複雑に分枝する大きなミトコンドリア(Mit)と細胞頂部に散在する小さなライゾソーム(Ly)が認められたが、高脂肪食の DMSO 群 S1 後半から S2 の領域にかけて、小型で円筒状の Mit と巨大なオートファゴソーム(At)と脂肪滴が認められた。高脂肪食のフロリジン群では巨大 At は減少し、比較的大きな Mit と小型~中型の Ly と脂肪滴が多数認められた。S1, S2 領域のミトコンドリア体積を定量解析した結果、高脂肪食の DMSO と比べフロリジン群では各領域(S1, S2)に対応して有意に大きかった。SGLT 阻害剤が早期糖尿病性腎近位尿管障害に対して保護的に作用する可能性が示唆された。

118 伸張性臓器における壁内微小血管の自発活動

三井烈・橋谷光

名古屋市立大学大学院医学研究科 細胞生理学分野

【目的】膀胱や胃・遠位結腸など、内容物により持続的な伸張を受ける臓器では、微小血管が血流を維持する固有のしくみをもつと考えられる。これらの臓器において直径30~130 μmの細静脈に静脈血排出に関わる自動能があることを報告したが、本研究では、直径20 μm以下の毛細血管後細静脈(PCV; postcapillary venule)の機能および構造について検討した。【方法】ラット胃粘膜下層標本を用い、1)免疫染色による微小血管網およびmural cells(血管平滑筋やペリサイト)の形態学的検討、2)Ca²⁺イメージングによるmural cellsの細胞内Ca²⁺変動の記録、3)ビデオイメージングによる血管径変化の経時記録を行った。【結果】胃では、内皮特異的一酸化窒素合成酵素(eNOS)に対する免疫染色により微小血管網が描出され、粘膜の毛細血管網から続く粘膜下層のPCVが確認された。このPCVでは、毎分2~6回の周期的な自発収縮がみられ、星型でα平滑筋アクチン陽性のPCV mural cellsでは細胞間で同期した自発的Ca²⁺上昇が収縮にともなって認められた。ギャップ結合阻害剤(3 μM carbenoxolone)は、自発的Ca²⁺上昇の同期性を阻害し、PCVの自発収縮を抑制した。cGMP特異的ホスホジエステラーゼ5(PDE5)阻害剤(1 μM tadalafil)も、自発的Ca²⁺上昇の同期性を阻害し、自発収縮を減弱させた。【結論】胃のPCVでは、星型のmural cellsがギャップ結合を介して機能的合胞体を形成し、自発収縮を発生させた。内皮由来NO-cGMP系はPCVの自発収縮を抑制し、持続的なPDE5によるcGMP分解により、自発収縮が保たれていると考えられた。

119 マウス消化管筋層のカハール介在細胞と線維芽細胞におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の発現解析

福井大学医学部人体解剖学・神経科学領域

○堀口里美 堀口和秀 飯野哲

消化管筋層に分布するカハール介在細胞 ICC と線維芽細胞 FLC は、非神経性の運動調節細胞として知られている。生理学的研究から、消化管筋層の抑制性神経伝達に関しては、ICC は NO 作動性神経伝達、FLC はプリン作動性神経伝達をそれぞれ仲介することが示されている。本研究では、ICC および FLC におけるムスカリン性アセチルコリン受容体発現を検討するため、マウス消化管平滑筋層由来の単離細胞を用いた発現解析と消化管筋層の形態学的解析を行った。FACS を用いて KIT-GFP および PDGFR α-GFP マウスそれぞれの小腸筋層より細胞を単離し、ムスカリン受容体サブタイプ M1-M5 について定量 PCR により発現解析を行った。また、BALB/c マウスの胃・小腸および遠位結腸を用いて、M2 発現細胞の同定のため、形態学的解析を行った。小腸筋層全細胞に対する ICC の割合は約 1-2%、FLC は約 4-5%であった。定量 PCR から ICC、FLC とともに M2 および M3 の発現が認められ、M1、M4、M5 は認められなかった。免疫組織化学により M2 の両細胞での発現及びアセチルコリン神経終末が近接することが観察された。免疫電子顕微鏡的解析では、筋層の平滑筋細胞と、深部筋神経叢部の ICC の細胞膜上に強い M2 様免疫陽性反応が認められた。それに加えて筋層内に分布する線維芽細胞様細胞の特徴を持つ細胞の細胞膜上にも M2 様免疫陽性反応が観察された。結論として、消化管筋層においてカハール介在細胞に加えて線維芽細胞もムスカリン受容体を発現し、同受容体を介したコリン作動性興奮性神経伝達に関与する可能性が示唆された。

201 Th1 リンパ球移行による脊髄損傷後の機能回復促進

¹金沢大学医薬保健研究域医学系神経分子標的学²大阪大学大学院医学系研究科分子神経科学石井宏史¹、山下俊英²、堀修¹

(目的) 脊髄損傷や脳挫傷と言った中枢神経の外傷後の、神経再生・顕著な機能回復は極めて困難である。外傷後に起こる免疫反応は機能回復の妨げになると考えられてきた。しかし近年、自己反応性 T 細胞の投与や活性化により、神経損傷後の機能回復が改善すると報告されている。しかし、T 細胞がどのような条件有益、あるいは有害であるか詳細は未解明であった。そこで我々は、中枢神経損傷後に治療効果のある T リンパ球のサブタイプの同定とその作用機序を解明することを試みた。(材料と方法) 控減型脊髄損傷モデルマウスにヘルパー T リンパ球のサブセットである Th1/Th2/Th17 細胞を別々に腹腔内投与して、機能回復を観察する。そして、改善が観察された際に、運動機能を司る皮質脊髄路および縫線核脊髄路を観察する。損傷脊髄内に集積する免疫細胞をフローサイトメトリーや免疫組織学染色により観察、解析する。治療効果の認められた Th1 細胞移行による分子機構を、Th1 の発現する IL-10 を中和抗体および i10 欠損マウスを用い解明する。また Th1 細胞が特徴的に分泌する IFN-γ の遺伝子欠損マウス由来 Th1 細胞を用いた比較実験を行う。(結果) Th1 細胞移行群で有意に脊髄損傷後の機能回復が促進された。Th1 群の損傷脊髄では、皮質脊髄路と縫線核脊髄路の再構成が促進していた。また損傷脊髄に集積する単球系細胞は保護作用のある M2 型の細胞が多いことが分かった。そして Th1 細胞の産生する IL-10 および IFN-γ および Th1 細胞により誘導される単球系細胞からの IL-10 分泌が機能回復の促進に必要であることが分かった。

202 リン酸化酵素 SGK 阻害剤の脳虚血に対する影響

井上浩一^{1,2}、Tao Yang²、Zhiqiang Xiong²、植木孝俊¹¹名古屋市立大学医学研究科統合解剖学分野²Neuroscience Institute, Morehouse School of Medicine

【目的】 Serum- and glucocorticoid-inducible kinase (SGK) はストレスや栄養因子などにより誘導されるリン酸化酵素で癌、糖尿病、高血圧に関与する。今回我々は SGK 阻害剤の虚血性脳疾患に対する効果を検討した。

【材料と方法】 成体雄マウスを用い、麻酔下にて中大脳動脈を結紮し1時間血流を遮断する一過性脳虚血モデルマウスを作製した。24 時間後に 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) 染色を用いて脳傷害領域の大きさを比較した。また、そのメカニズムを調査するために、培養神経細胞を用いて細胞毒性試験、パッチクランプ法、蛍光カルシウムイメージング法を行った。

【結果】 モデルマウスに SGK 阻害剤 gsk650394 と EMD638683 を投与したところ、いずれの場合も TTC 染色で対照と比べて染色されない領域が減少し、脳梗塞による脳傷害が軽減されることが示唆された。培養神経細胞を用いて脳梗塞時の神経障害の主な原因であるグルタミン酸受容体を刺激したところ細胞傷害が認められたが、その細胞障害は SGK 阻害剤により抑制された。また、カルシウムイメージング法とパッチクランプ法によりグルタミン酸受容体の活性が SGK 阻害剤により抑制されることが観察された。さらに、SGK 阻害剤により電位依存性ナトリウムチャネルの活性の低下も観察された。

【結論】 SGK 阻害剤の投与はグルタミン酸受容体および電位依存性ナトリウムチャネルの活性を減弱し、脳虚血モデルマウスの脳障害を軽減する可能性が示唆された。

203 アルツハイマー抵抗遺伝子としての BRI2

松田修二、千田隆夫

岐阜大学大学院医学系研究科病態制御学講座解剖学分野

アルツハイマー病は、βアミロイドの沈着である老人斑、タウの高度リン酸化である神経原繊維変化、それと神経細胞の消失を特徴とする痴呆性疾患である。βアミロイドは、その前駆体である APP から順次蛋白質分解酵素によって代謝され、生産されてくる。APP を代謝する機序になんらかの病因があることは間違いない。

私どもは、2型の一回国産通構造をもつ BRI2 が、APP に結合し、APP が代謝されるのを抑制することを見出した。実際、BRI2 は APP の代謝される 3 つ経路、α、β、γ 経路をすべて阻害する。この BRI2 のトランスジェニックマウスをアルツハイマー病のモデルマウスと掛け合わせると、BRI2 は個体レベルでβアミロイドの沈着を抑制する。一方、BRI2 をノックダウンすると、α、β、γ 経路は亢進し、BRI2 のノックアウトマウスは記憶障害を示す。

今回の発表では、BRI2 に由来したペプチドを用いて、APP の代謝を制御できること、さらにそれがどのような意義があるのかを考察する。

204 磁性流体を用いたマウス坐骨神経へのアデノウイルス遺伝子の導入法および磁界可視化法

寺田信生¹、齊藤百合花²、大野伸彦²¹信州大学大学院医学系研究科保健学専攻医療生命科学分野、²山梨大学大学院医学工学総合研究部解剖分子組織学教室

磁性流体 (Magnetic fluid) は、磁場を零にすると磁化状態が残らない性質をもつナノ磁性体である。赤血球膜骨格蛋白 4.1R のファミリー蛋白である 4.1B の cDNA を組み込んだアデノウイルス (4.1B-Ad) を作製し磁性流体に結合させ、麻酔したマウスの坐骨神経下に磁石を置きながら注射した。7 日後にその坐骨神経を摘出し浸漬固定後、ほぐし標本を作製した。4.1B の免疫染色により、神経線維のシュワン細胞に 4.1B 蛋白の強制発現を認めた。マウス末梢神経シュワン細胞には、元々 4.1G が Schmidt-Lanterman 切痕 (SLI) に局在しているが、強制発現された 4.1B も SLI に局在することを、SLI にある縫線アクチンに対するファロイジン染色によって確認した。以上のように、磁性流体を媒体として 4.1B-Ad を安定して坐骨神経の標的部位に遺伝子導入でき、4.1 ファミリー同士が末梢神経で類似部位に局在化することが明らかとなった。一方、アルブミンを含有した生理食塩水に磁性流体を混合した液滴を、磁力をかけながらイソペンタン-プロパン混合寒剤 (-193°C) により急速凍結し、グルタルアルデヒド含有アセトン中で凍結置換固定後、Inverted capsule 法によりエポキシ樹脂に包埋し、集束イオンビーム走査型電子顕微鏡 (FIB-SEM) で観察した。種々の磁力下で急速凍結された磁性流体は、磁力方向に対応して約 10 nm 直径 1 粒子毎の解像力で配列が判別でき、FIB-SEM 連続像の再構築によって 3 次元的に磁区 (Magnetic domain) をナノレベルで可視化できた。

205 不活動に伴う筋機械痛覚過敏には骨格筋で増加する NGF が関与する

○平賀慎一郎¹、肥田朋子²、堀紀代美¹、仲田浩規²、中川達貴¹、Tewarat kumchantuek¹、井関尚一³、尾崎紀之¹

¹金沢大・院医薬保健・機能解剖学、²名古屋学院大・リハビリテーション

³金沢大・院医薬保健・組織発達構築学

【目的】不活動によって発生する痛みは機能回復や治療介入に悪影響を及ぼすため、その発症機序を解明することは重要である。しかし、これまで不活動に伴う筋痛の発症機序は明らかにされていない。一方、我々は持続性筋痛モデルの痛みに神経成長因子(NGF)が関与することを報告してきた。そこで今回、不活動モデルラットで発生する筋痛に伴い NGF がどのような変化を示すか調べた。

【材料と方法】実験には Wistar 系雄性ラットを用い、通常飼育をする Control 群と両側後肢を 4 週間ギブス固定させた不活動状態で飼育する Inactivity 群に振り分けた。筋機械痛覚閾値はギブス固定前から固定 4 週後まで週 1 回測定し、固定 4 週後には腓腹筋を採取して筋内の NGF protein と mRNA を定量した。また筋痛に及ぼす NGF の作用を調べるため NGF の中和抗体を筋注し、筋機械痛覚閾値の変化を調べた。さらに筋ならびに後根神経節(DRG)で NGF の免疫染色を行った。筋一次知覚神経の標識には逆行性トレーサーである Fluoro-Gold(FG)を用いた。

【結果】Inactivity 群の筋機械痛覚閾値は不活動 2 週目から 4 週目で有意に低値を示し、不活動 4 週目における筋内の NGF protein, mRNA は有意に増加していた。そして、不活動 4 週目に低値を示した筋機械痛覚閾値は NGF の中和抗体を筋内に注入することで改善した。また、Inactivity 群の筋組織では NGF 陽性細胞数が増加しており、DRG では FG 陽性細胞数中の NGF 陽性細胞数が増加していた。

【結論】不活動モデルラットでは NGF が筋組織で増加し、筋の一次知覚神経に取り込まれ、知覚神経の感作を介して筋機械痛覚過敏に関わると考えられた。

206 マウスメラノーマ肺転移巣における I 型肺胞上皮細胞による微小封鎖環境の形成と血行動態の免疫組織化学的解析

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 医療生命科学分野

○齊藤百合花¹、寺田信生²、齊藤成¹、大野伸彦¹

【目的】本研究では、マウスメラノーマ肺転移モデルの肺転移巣において、癌細胞と既存の肺胞中隔壁構造を可視化し、肺胞中隔壁構造が癌微小環境と血行動態に及ぼす影響を生体内凍結組織切片標本上で解析した。【材料と方法】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 13 日後、麻酔・人工呼吸下で、horseradish peroxidase (HRP; 2.5 mg/100 μl) を右心室内に注入した。その 5 分後に肺を生体内凍結して採取して凍結置換固定後、パラフィン包埋した。【結果】毛細血管網を含む肺転移巣では、既存の肺胞中隔壁構造を維持しており、I 型肺胞上皮細胞に囲まれ、毛細血管を外側に持つ癌細胞塊(タイプ1)と、毛細血管を内側に含む癌細胞塊(タイプ2)の2種類の構造が見られた。タイプ1の癌細胞塊の多くは、HIF-1α陽性であったが、タイプ2の癌細胞塊の多くは、HIF-1α陰性もしくは弱陽性であった。ただし、タイプ2の癌細胞塊であっても、血流不全の部位では HIF-1α陽性であることが多かった。また、タイプ2の癌細胞塊では癌細胞間の間質において血管から漏出した HRP が検出されたが、タイプ1の癌細胞塊では HRP の検出ができなかった。【結論】以上のことから、癌細胞は既存の肺胞中隔壁を足場として転移巣を形成するが、一部の腫瘍細胞では I 型肺胞上皮細胞によって、肺胞毛細血管からの酸素の供給が障害されるため、酸欠シグナルを発現すると考えられた。また、I 型肺胞上皮細胞によって血中可溶性蛋白の拡散も障害されていたことから、こうした「微小封鎖環境」が、抗体医療や化学療法に使用される製剤の分布を阻害している可能性も示唆された。

207 膜骨格蛋白 Membrane Protein Palmitoylated 6 (MPP6) のマウス小腸における免疫組織化学的検討

上條明生¹、齊藤百合花²、大野伸彦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医療生命科学分野専攻、

²山梨大学大学院医学工学総合研究部解剖分子組織学教室

膜骨格蛋白 Membrane Protein Palmitoylated (MPP)6 は、赤血球で 4.1 ファミリーの 4.1R と結合して赤血球膜を保持する MPP1 のファミリー蛋白である。今回、パラホルムアルデヒド灌流固定したマウス小腸クライオスタット切片を作製し、MPP6 の局在を adherence junction に局在する E-cadherin, tight junction に局在する Zonula occludens (ZO)-1 と免疫組織化学的に比較検討した。一部の試料は前包埋免疫電子顕微鏡法を行った。さらに既にマウス小腸上皮に見出している 4.1 ファミリーの 1 つである 4.1B との関係について、MPP6 と 4.1B の局在を正常および 4.1B 欠損マウス小腸において比較、また他の 4.1 ファミリーである 4.1G と 4.1N の redundancy の可能性についても検討した。MPP6 は、腸陰窩から腸絨毛にかけての上皮細胞側底面の細胞膜直下に局在していた。この細胞内の免疫染色パターンは E-cadherin とは類似するが、ZO-1 とは異なっていた。小腸上皮における免疫染色パターンについて 4.1B は腸絨毛に限局して染色される点が MPP6 と異なり、4.1G や 4.1N は腸絨毛での染色はみられなかった。さらに 4.1B 欠損マウス小腸の MPP6 の免疫染色性や局在部位は野生型マウスの小腸と変化は認めず、4.1B は MPP6 の細胞内局在に必須ではないことがわかり、4.1G や 4.1N の発現と局在にも変化はなかった。一方、これまでマウス小腸上皮で明らかになっていた Calcium/calmodulin dependent serine kinase (CASK) が免疫沈降法によって MPP6 と結合していることが明らかとなった。以上より、MPP6 が、CASK と蛋白複合体を形成しながら膜骨格蛋白として機能していることが示唆された。

208 マウス顎下腺におけるカルパイン 3 の発現と局在

Tewarat Kumchantuek、仲田浩規、山本美由紀、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

カルパイン (calpain) ファミリーは Ca²⁺依存性のシステインプロテアーゼであり、標的蛋白質を限定的に分解、修飾する。このうちカルパイン 1 と 2 は全身に発現するが、カルパイン 3 は主に骨格筋に発現し、その遺伝子変異で肢帯型筋ジストロフィーが起こる。我々は雌雄マウスの 3 大唾液腺でカルパインファミリーの mRNA と蛋白質の発現と局在を調べたところ、カルパイン 1 と 2 (それぞれ長鎖と短鎖からなる) は 3 大唾液腺のすべてに発現し、雌雄で発現の差はなかったが、カルパイン 3 (長鎖 CAPN3 からなる) は顎下腺のみに発現し、また雄で雌よりはるかに高い発現が見られた。顎下腺の生後発達および雌へのアンドロゲン投与において、顆粒性導管 (GCT) の発達に一致して CAPN3 の発現も増加した。顎下腺の Western ブロットでも雄で雌より高い CAPN3 の産生が見られた。免疫組織化学では、CAPN3 は耳下腺と舌下腺には存在せず、雄の顎下腺の GCT 細胞の細胞質に局在し、雄の導管系の他の部分や、雌の顎下腺には存在しなかった。マウス雄の顎下腺で特異的に発達する GCT 細胞は、NGF、EGF を始めとする種々の生理活性物質を産生し、唾液中に分泌している。カルパインは主にサイトゾルに存在し、膜蛋白質や輸送蛋白質に働いて分泌過程を制御したり、細胞内シグナル伝達系を制御する可能性が示唆されている。今回 GCT 細胞での特異的発現が見いだされたカルパイン 3 についても、細胞の分化や分泌作用への関与が示唆される。

209 FIB/SEM を用いた DrplcKO マウス損傷運動ニューロンにおけるミトコンドリアの三次元構造解析

○玉田宏美¹、桐生寿美子¹、太田啓介²、石原直忠³、中村桂一郎²、木山博資¹
¹名古屋大学大学院医学系研究科機能組織学、²久留米大学医学部解剖学講座顕微鏡部・生体形成部門、³久留米大学分子生命科学研究所高分子化学研究部門

ミトコンドリアは、fission と fusion のバランスによって形態が変化し、機能が維持される。我々の研究室では、fission を制御する分子である Drp1(Dynamin-related protein 1)が、損傷神経細胞特異的にノックアウトされる遺伝子改変マウス(Drp1 cKO)を使用し、損傷運動ニューロンが fission の欠損により細胞死に至ること、その過程でミトコンドリアの肥大化やクリステの密集(cristae-rich)などが見られることを透過型電子顕微鏡(TEM)で観察してきた。近年、新しい電子顕微鏡技術として、3 次元立体再構築像を用いることができる SEM 連続断面観察が注目されている。本研究では、FIB/SEM を得て、野生型マウスおよび DrplcKO マウスにおける、損傷運動ニューロンのミトコンドリアの挙動を 3 次元解析した。

野生型マウスでは、正常、損傷運動ニューロンいずれにおいても、ミトコンドリアの立体構造は、bipolar、3-4 方向に分岐した multipolar、あるいは小型の球体であった。DrplcKO マウスの損傷 1 週間後の運動ニューロンでは、bipolar のミトコンドリアはさらに長軸方向に伸び、また、長い突起を伸ばした肥大ミトコンドリアの存在、複数の肥大ミトコンドリアの突起による連結などが、3 次元立体再構築で明らかになった。さらに DrplcKO マウスの損傷後 2 週間では、突起を持たず、より肥大化することが示された。一部のミトコンドリアではクリステ構造が急激に疎になりミトコンドリアの機能低下が示唆され、細胞死の原因の一端である可能性が考えられる。

210 マウス脳における ASIC4 の分布と機能解析

○柴田泰宏、星川真理子、熊本奈都子、植田高史、鶴川真也

名古屋市立大学大学院 医学研究科 機能組織学分野

【目的】酸感受性イオンチャネル (acid-sensing ion channels: ASICs) のサブタイプである ASIC4 は神経細胞に発現するが、その詳細な分布や機能は不明であった。そこで ASIC4 のチャネル特性を解析するとともに、脳における分布の詳細を検討した。【材料と方法】C57BL/6J マウス全脳から ASIC4 と ASIC1a をクローニングした。アフリカツメガエル卵母細胞に ASIC4 単独、あるいは ASIC1a と共に強制発現させ、膜電位固定法を用いて電気生理学的特性を調べた。ASIC4 の分布の解析には、ASIC4 β ガラクトシダーゼレポーターマウス (UC DAVIS KOMP Repository) を使用した。

【結果】ASIC4 を強制発現させた卵母細胞には、水素イオン非存在下で、持続的な内向き電流が生じていた。この電流は、アミロライド非感受性であり、Zn²⁺により可逆的に阻害された (IC₅₀ ≈ 90 μM)。ASIC1a と ASIC4 とを共発現させた卵母細胞では、一過性電流と持続性電流の二相性電流が観察された。一過性電流の水素イオン感受性閾値を ASIC1a 単独の場合と比較したところ、その閾値の低下が認められた。

8 週齢 ASIC4 レポーターマウス (♂) において、ASIC4 陽性細胞は、脳全体に広く分布し、なかでも、嗅球、梨状葉皮質、線条体、上丘および下丘に強く発現していた。また、内側中隔核、対角帯垂直核、対角帯水平部、内側手綱核、脚間核、二丘体傍核、橋脚被蓋核などの Ach ニューロンが存在する領域にほぼ例外なく発現していた。

【結論】ASIC4 は脳の広い領域において、他の ASIC サブタイプと複合体を形成し、神経伝達に関与していると予想された。

211 嗅覚による意欲・情動行動誘起への嗅結節の関与

村田航志^{1,2}, 菅野未知子², 家城直², 森憲作², 山口正洋²

1. 福井大学医学部 脳形態機能学領域
2. 東京大学大学院医学系研究科 細胞分子生理学教室

[目的] 嗅覚は食欲や危険への警戒など多様な意欲、情動を誘起する感覚系であるが、嗅覚中枢領野において、匂いの情報がどのように処理されて意欲・情動行動を誘起するかはよくわかっていなかった。今回我々は、嗅覚中枢領野の中でも腹側線条体の一部である嗅結節に着目し、嗅覚によって餌探索行動、忌避行動が誘起されたときの神経活動を比較した。

[材料と方法] マウスに匂い物質（酢酸アミルまたはオイゲノール）を提示する際に砂糖あるいは電気ショックを提示し、匂い-餌、匂い-忌避刺激の関連学習をさせた。学習後に匂い物質を提示し、マウスが餌探索行動もしくは警戒行動を示した後に固定し、嗅結節全域において最初期遺伝子 c-Fos の発現を評価、比較した。

[結果] 関連学習した匂いによって餌探索行動が誘起されたマウスでは嗅結節の前内側部領域で c-Fos 発現が亢進した。一方、警戒行動が誘起されたマウスでは嗅結節の外側部領域で c-Fos 発現が亢進した。

[結論] 嗅結節の前内側部領域には、嗅覚によって餌探索・摂食行動を引き起こす神経回路が備わり、外側領域には、嗅覚によって警戒行動を引き起こす神経回路が備わる可能性が示唆された。

212 光遺伝学を用いた同定されたマウス下丘 GABA ニューロンの音応答特性

小野 宗範¹, Deborah C. Bishop², Douglas L. Oliver²

- 1: 金沢医科大学・医学部・生理学 I
- 2: University of Connecticut Health Center

[目的] 下丘は中枢聴覚情報の総合処理の起点といえる。下丘の神経回路を理解する鍵として興奮性および抑制性ニューロンの活動の究明があるが、その重要性にもかかわらず下丘では両者が混在して分布し従来両者の特性の違いを知ることができなかった。そこで本研究では従来の実験上の困難を克服する手段として、抑制性ニューロンに特異的に ChR2 が発現する遺伝子改変動物（VGAT-ChR2 マウス）を用い下丘興奮性、抑制性ニューロンを生体内で識別しそれぞれの音反応特性を比較した。

[結果] 免疫染色の結果、VAT-ChR2 マウス下丘では ChR2 は GABA 作動性ニューロンに特異的に発現していた。また ChR2 は、抑制性神経終末にも発現が観察された。下丘から単細胞外記録を行い、脳表から光刺激を与えたところ、光刺激により活動電位が①引き起こされる細胞と②抑制される細胞が観察された。ChR2 の特異的発現から①の細胞は GABA 作動性ニューロンであり、②は ChR2 を持たない興奮性細胞で光刺激により賦活された抑制性入力を受け抑制されることが考えられた。juxtacellular staining により②の細胞は GAD 陰性であり (n=5) 興奮性細胞であると確かめられた。

このように識別された細胞に対し、純音、ノイズ、振幅変調音を与え、音刺激に対する反応を抑制性および興奮性ニューロン間で比較した。その結果抑制性、興奮性ニューロンはどちらも様々な音反応を持つ神経細胞集団であることが明らかとなった。集団としての両者を比較した場合、音反応特性に大きな違いは見られなかった。また局所において両者は良く似た周波数応答野をもつことから、下丘内局所神経回路で抑制性、興奮性細胞ニューロンは、入力を共有していることが示唆された。

213 鳥下丘相同構造抑制性ニューロンの神経回路

伊藤哲史¹, 阿閉泰郎²

- 1: 福井大学医学部人体解剖学・神経科学領域
- 2: 岐阜大学応用生物科学部獣医解剖学

我々はラットの下丘のどの微小領域をとってみても、そこに3種類のニューロンが識別されることを明らかにした。細胞体に密な VGLUT2 陽性興奮性入力を受け、視床聴覚核である内側膝状体にフィードフォワード抑制投射をする大型の GABA 作動性抑制性細胞、そのような入力を欠き、内側膝状体にもあまり投射しない小型抑制性細胞、そして興奮性細胞である。このような細胞群からなる局所回路が様々な動物分類群に保存されているのかは不明であった。そこで本研究では有羊膜類の中で哺乳類から離れた分類群である鳥類のニワトリとハトの下丘の相同構造 torus semicircularis (TS) について、大型抑制性細胞が存在するか、するならばその形態の異同について検討を行った。両種の TS のサブ領域すべてで GABA 陽性細胞が観察された。大型のものは VGLUT2 陽性終末に密に取り囲まれていた。GABA 陽性細胞と陰性細胞を電子顕微鏡で観察したところ、確かに大型 GABA 陽性細胞の細胞体は小型円形細胞を含有した多数の神経終末と非対称性シナプスを形成しており、小型のものや GABA 陰性細胞はこのようなシナプスが少なかったことがわかった。聴覚視床核に逆行性トレーサー注入を行ったところ、逆行性標識された細胞は両側の TS に見られた。逆行性標識された細胞の9割以上は GABA 陰性であったが、残りの視床投射 GABA 細胞はほとんど VGLUT2 陽性終末に取り囲まれていた。このことから、鳥類においても多数の興奮性入力を細胞体を受け、視床を抑制する大型抑制性細胞は存在することが判明した。