

## 日本解剖学会

## 第78回中部支部学術集会

会期：平成30年10月13日（土）、14日（日）  
会場：富山県民会館

## 105 汎用性および特異性の高い新規 APC 抗体の作製

山田名美、オントルマ、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

がん抑制遺伝子 APC は  $\beta$ -catenin に結合することで Wnt シグナルを抑制する。APC は 312kDa の巨大分子で、 $\beta$ -catenin 以外にも多くの分子と結合するドメインを有し、その結合を介した多彩な機能を有する。その全容を明らかにするためには、質の良い APC 抗体が必要である。しかし、市販の抗体は用途が限定されているものが多く、研究者は必要な抗体を独自に作製して使用してきた経緯がある。結果、異なる APC 抗体を使用した研究間でデータの一貫性が認められないという問題が生じている。本研究では新規 APC 抗体を作製し、その特異性と汎用性を検証した。

【方法と結果】(1) 抗体の作製: ヒト APC 蛋白質 C 末端の合成ペプチドを用いて、ウサギ由来の APC-C 抗体を作成した。(2) 抗体の検証 1) Western blotting (WB): 全長 APC を発現する細胞株 (HCT116, 253J-BV) では、市販の APC の N 末端認識抗体 (APC-N 抗体) と APC-C 抗体が APC を検出した。C 末端欠失 APC を発現する細胞株 (DLD-1) では、APC-N 抗体のみが APC を検出した。2) Immunocytochemistry: HCT116, 253J-BV 両細胞において APC は細胞質と核、および細胞伸長部の微小管遠位端に局在を認めた。3) Immunohistochemistry: マウス空腸における APC の局在を、APC-C 抗体で描出した。APC の発現は絨毛頂部が最も高く、絨毛基部及び陰窩に下るにつれて発現が低下した。C 末端欠失 APC のみ発現する APC<sup>16387/16387</sup> マウス空腸では APC は検出されなかった。

【結語】APC-C 抗体は特異性および汎用性が高いことが証明された。

## 106 新規標識法による PI4P の分布解析

○折井みなみ、辻琢磨、小笠原裕太、立松律弥子、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

イノシトールリン脂質は細胞内シグナリングや小胞輸送などにおいて重要な役割を担う膜脂質である。PI4P は最も含量が多いイノシトールリン脂質の 1 つであり、細胞膜やゴルジ体、液胞に存在し、細胞の生存に必須であることが知られている。これまでに PI4P がオートファジーやウイルスの複製などの細胞現象に関連することがわかっているが、その全容は未だつかめていない。その一因は PI4P の解析方法に限られており、細胞内分布を詳しく捉えるのが困難なことにある。

我々は急速凍結・凍結割断レプリカ標識法 (QF-FRL 法) で PI4P を特異的かつ高感度に標識する方法を新たに開発し、PI4P の分布、動態を解析することを目的として実験を行った。QF-FRL 法は急速凍結によって膜分子の運動を瞬時に停止させ、レプリカ膜で物理的に膜分子を固定したのち、プローブによる標識、電子顕微鏡観察を行う方法である。今回の方法では PI4P 結合プローブとして GST とレジオネラ・ニューモフィラ由来ペプチド SidM の融合リコンビナントタンパク質を用い、抗 GST 抗体、金コロイド結合タンパク質 A を反応させて可視化した。標識の特異性はリボソームレプリカおよび PI4P 結合能を欠く変異 SidM を用いた実験で確認した。出芽酵母を用いて PI4P の分布を解析した結果、オルガネラ膜によってその分布に差があることが分かった。

## 107

細胞多核化が眼球レンズおよび間質組織に及ぼす形態変化  
—細胞多核化と個体老化の関連—

○後藤英仁、溝口明  
三重大学大学院医学系研究科 神経再生医学・細胞情報学

【目的】哺乳類の組織では、骨髄の巨核球などの一部の細胞において、最終分化過程で細胞が多核（四倍体）化することが知られている。また、肝臓においては、加齢とともに、四倍体化細胞の割合が増加することが報告されている。しかし、多くの組織において、細胞核は二倍体の状態を維持している。本研究では、通常、核が二倍体の状態である眼球レンズおよび間質組織において、細胞の多核化を引き起こした場合の形態変化を観察した。

【材料と方法】我々の研究グループは、これまでに、眼球レンズおよび間質組織に高発現する中間径フィラメント構成タンパク質ビメンチンの分裂期リン酸化部位をリン酸化されないアミノ酸に置換すると、細胞質分裂が障害され、細胞が多核（四倍体）化することを報告してきた。今回、この変異型ビメンチンのみを発現するノックインマウス（リン酸化不全マウス）を作製し、細胞多核化を引き起こす表現型を観察した。

【結果および結論】リン酸化不全マウスを詳細に解析したところ、ビメンチンが高発現している眼球レンズおよび間質組織において、培養細胞系と同様に、細胞の多核化が誘導されていることを見出した。このような多核化は、眼球レンズにおいては白内障を、間質組織においては皮下脂肪層の早期消失を認めた。また、皮膚に損傷を加えた際においても、リン酸化不全マウスでは治癒過程の遅延が認められた。これらの表現型は早老症モデルマウスの表現型と極めて類似していることから、予定外の細胞の多核化は、組織の老化現象を促進する可能性があることが判明した。

## 108 高速度ビデオカメラを用いた凍結現象の解析

○加藤風彩、黒岡武俊、岩永進太郎、渡邊玲旺、中村真人  
富山大学大学院理工学教育部生命工学専攻生体システム医工学研究室

【目的】現在、再生医療の進歩により、細胞や幹細胞、培養した組織が研究や臨床での治療に使われる時代になった。しかし作製した培養組織の長期保存法が確立されていないという重要課題がある。そこで我々は、培養組織の凍結保存技術に着目し、凍結傷害を克服することを目的に凍結過程の可視化の研究を行ってきた。本研究では、凍結現象の新たな評価法を確立することを目的とし、動画解析を用いることによって凍結現象を定量評価する方法を検討した。【方法】高速度ビデオカメラ、温度制御可能な冷却ステージおよび倒立顕微鏡を用いた自作の凍結可視化装置を使用した。細胞の凍結保護作用のあるジメチルスルホキシド (DMSO) およびウシ胎児血清 (FBS) の濃度を 0~20% に調整した培地 (DMEM) を急速凍結 (-50°C/min) し、3000 frames/sec で凍結過程の可視化を行った。さらに、撮影した動画の解析を行うことで各溶液の凍結速度を計測し、さらに凍結界面の線形性に着目して非線形性指数を算出した。【結果】自作の凍結可視化装置を用いて凍結過程を可視化することができた。DMSO 濃度の違いにより氷晶のサイズ等、凍結過程に明らかな違いがみられた。FBS 濃度の違いによる大きな変化は確認できなかった。動画解析では凍結速度と非線形性指数ともに DMSO 濃度が高くなるほど低下した。一方、FBS 濃度の違いによる有意差は見られなかった。

【結論】本研究では自作の凍結可視化装置を用いて凍結過程を可視化し、動画解析によって凍結速度や氷晶形成の状態の定量的評価を行った。本手法で凍結保護液の性能評価や細胞や組織の凍結現象の定量評価に応用が可能であると考えられる。

## 109 成体脳神経新生における酸感受性イオンチャネル ASIC1a の役割

熊本奈都子、柴田泰宏、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

成体脳における神経新生は、脳卒中などによる脳虚血時に活性化することが知られている。我々は虚血病変での酸の蓄積 (局所的アシドーシス) に着目し、中枢神経系で水素イオンセンサーとしてはたらく陽イオンチャネル分子である ASIC1a が脳虚血時の神経新生のメディエーターとして働くことを想定した。そこで、まずマウス正常脳組織における ASIC1a の海馬神経新生への関与を調べたところ、海馬新生ニューロンの樹状突起の発達、シナプス形成に関与することを見いだした。さらに、In situ hybridization により、ASIC1a mRNA が海馬神経新生の初期から発現していることが明らかになったため、ASIC1a が神経幹細胞・神経前駆細胞の増殖に与える影響を調べた。ASIC1a ノックアウトマウスに BrdU を腹腔内投与した 2 時間後の海馬歯状回での BrdU 陽性細胞の数は野生型と比較して多かったことより、ASIC1a ノックアウトマウスでは神経幹細胞・神経前駆細胞の増殖が亢進していることが示唆された。また、赤色蛍光蛋白質 tagRFP と融合した ASIC1a を発現するノックインマウスを作成し、脳組織切片を神経新生マーカーで免疫染色して ASIC1a の発現時期を調べたところ、ASIC1a 蛋白質は DCX 陽性新生ニューロン (= 幼若新生ニューロン) の一部と Parvalbumin 陽性インターニューロンの一部に発現していた。新生ニューロンの内因性 ASIC1a が直接神経幹細胞・神経前駆細胞の増殖に関与するのか、Parvalbumin 陽性インターニューロンに発現する ASIC1a が間接的に神経幹細胞・神経前駆細胞の増殖に関与するかが今後検討が必要である。

## 110 Na/K-ATPase の神経細胞膜上発現分布の定量的局在解析

○石川達也<sup>1,2</sup>, 村田航志<sup>2</sup>, 黒田一樹<sup>2</sup>, 尾崎紀之<sup>1</sup>, 深澤有吾<sup>2</sup>  
 1. 金沢大学 医薬保健学研究域 医学系機能解剖学  
 2. 福井大学 医学部 脳形態機能学領域

近年、アルツハイマー病やジストニアの発症に Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NAK) の機能阻害や異常が関与するとの報告が相次いでおり、神経細胞での NAK の役割を理解する重要性は高まっている。しかし、NAK の基本サブユニットである  $\alpha$  サブユニット (NAK $\alpha$ ) のうち NAK $\alpha$  1 と  $\alpha$  3 のアイソフォームが中枢の神経細胞に発現しているとの報告があるものの、神経細胞種毎の NAK $\alpha$  の細胞膜上発現レベルの違いや、シナプスや樹状突起、細胞体などの神経細胞における機能ドメイン毎の発現レベルの違いについては不明である。

そこで本研究では、SDS 処理凍結割断レプリカ免疫標識法を用いて、生後 8 週齢のマウスにおける NAK $\alpha$  の発現分布を海馬内の複数の神経細胞種を対象に機能ドメイン単位で解析し、その細胞膜上の発現様式を明らかにし、神経細胞における NAK $\alpha$  の役割の一端にせまることを目的とした。

その結果、歯状回顆粒細胞、海馬錐体細胞及び苔状細胞における各機能ドメイン間では NAK $\alpha$  の標識密度に有意な差が認められなかった。その一方で、苔状細胞において細胞体を除く各機能ドメインで、歯状回顆粒細胞及び海馬錐体細胞に比べ NAK $\alpha$  の標識密度が有意に低いことが明らかとなった。

以上の結果より、NAK $\alpha$  の神経細胞膜上発現が細胞内では一定に調節されているものの、その発現密度は細胞種毎で異なることが示唆された。

## 111 鳥類の聴覚受容器における小胞性グルタミン酸トランスポーターの発現性について

岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科獣医解剖学分野  
 齋藤正一郎、阿閉泰郎

【目的】鳥類の壺嚢には、哺乳類のコルチ器に相当する基底乳頭、ならびに哺乳類には認められない第三の平衡斑である壺嚢斑が存在する。本研究では鳥類における基底乳頭並びに壺嚢斑における小胞性グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) II ならびに III mRNA の発現性について解析し、哺乳類との相同性について検討した。

【材料と方法】ハト成体ならびにニワトリ 0 日齢を用いた。ハト成体から壺嚢を採材して cDNA を作製し、VGLUT II ならびに III mRNA の発現性について RT-PCR で解析した。また in situ hybridization により、ハトおよびニワトリ壺嚢におけるこれら分子の組織局在を検討した。

【結果】RT-PCR では VGLUT II および III mRNA の両方の発現性が認められ、VGLUT II mRNA の方が VGLUT III mRNA より発現量が多かった。In situ hybridization により、VGLUT II mRNA の発現が、らせん神経細胞に認められた。VGLUT III mRNA の発現はらせん神経細胞には認められず、基底乳頭においては高有毛細胞領域に偏在していた。壺嚢斑では有毛細胞において VGLUT III mRNA の発現性が認められた。

【結論】哺乳類のらせん神経細胞はグルタミン作動性であり、VGLUT I がグルタミン酸放出を担っている。本研究では鳥類のらせん神経細胞にて VGLUT II の局在が観察され、鳥類は VGLUT I を欠くという学説が支持された。また本研究により、鳥類の高有毛細胞は哺乳類の内毛細胞に相当し、また有毛細胞における VGLUT III の発現は系統発生学的に良く保存されていることが明らかとなった。

## 112 Synapse-specific plasticity governs the identity of overlapping memory traces

Kareem Abdou

Memories are formed through long-term changes in synaptic efficacy, a process known as synaptic plasticity, and are stored in the brain in specific neuronal ensembles called engram cells, which are activated during corresponding events. When two memories are associated, cell ensembles corresponding to each memory overlap. However, each memory has its own identity. How the brain stores and defines a specific memory identity when two memories interact and are encoded in the shared ensemble have remained elusive. Here, we show that synapse-specific plasticity represents specific memory entities, and that synaptic plasticity between specific engram assemblies is both sufficient and crucial for information storage. Using auditory fear conditioning and c-fos-TetTag system, optogenetic stimulation of the activated ensemble terminals of auditory cortex (AC) and medial geniculate nucleus (MGm) in lateral amygdala (LA) after complete retrograde amnesia -accomplished by autophagy induction with protein synthesis inhibition- failed to induce memory recall at recent and remote time points, indicating that the memory engram no longer existed in that circuit. This result was correlated with the resetting of plasticity and functional connectivity between the engram assemblies. Complete retrograde amnesia of a given fear memory did not affect the linked fear memory encoded in the shared ensemble. Furthermore, potentiation or depotentiation of the plasticity at synapses specific to one memory affected the recall of only that memory without influencing the linked memory. Thus, sharing of engram cells underlies the linkage between memories, while synapse-specific plasticity guarantees the identity and storage of individual memories. Our study gives insight into therapeutic approaches to treating post-traumatic stress disorder (PTSD).

## 113 自閉症モデルラットにおける嗅覚過敏関連部位の異常について

○江藤みちる、松井勇人、下高原優樹、次山ルシラ絵美子、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】自閉症では感覚過敏をしばしば合併する。私たちは最近、胎生期にサリドマイドを投与して得られる自閉症モデルラットを用いて、脳幹の抑制性神経で構成される台形核の形態学的異常を見出し、聴覚過敏のメカニズムを明らかにした (Ida-Eto M *et al.*, *Pediatr. Int.*, 2017)。梨状皮質は嗅覚の求心性回路において嗅球から入力を受けて扁桃体など他の領域に出力する重要な部位である。そこで今回は梨状皮質と扁桃体の形態学的解析を行い、自閉症モデルラットの嗅覚異常の有無を調べた。

【材料と方法】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、生まれた仔を自閉症モデルラットとした。生後 50 日に 4%PFA で灌流固定後、脳を摘出し、50  $\mu$ m の厚さで冠状断の浮遊切片を作製した。抑制性ニューロンのマーカーとして抗パルプアルブミン抗体を用い、免疫組織化学を行った。

【結果】自閉症モデルラットにおいて、後梨状皮質と扁桃体のパルプアルブミン陽性ニューロンの形態異常が認められた。前梨状皮質での変化は見られなかった。【考察】後梨状皮質は扁桃体基底外側核から出力する入力を受ける。扁桃体は情動の中核であり、ヒト自閉症では扁桃体の体積異常が指摘されている。嗅覚過敏を引き起こす臭い物質は多岐にわたるが、その理由やメカニズムは不明である。個人の不快感と強く結びついていると考えられ、嗅覚過敏を始めとする感覚過敏と、情動を司る扁桃体との強い関連が示唆される。

## 114 視神経傷害後の網膜神経節細胞生存における小胞体ストレス応答 ATF6 経路の役割

○宝田美佳<sup>1</sup>、沖谷なほ子<sup>1</sup>、郡山恵樹<sup>2</sup>、服部剛志<sup>1</sup>、石井宏史<sup>1</sup>、堀修<sup>1</sup>  
 1. 金沢大学医薬保健研究域医学系神経解剖学  
 2. 鈴鹿医療科学大学薬学部神経薬理学

【目的】タンパク質の合成・成熟の場である小胞体内に、折り畳み不全タンパク質が蓄積すると小胞体ストレス応答 (UPR) が惹起される。UPR は、神経変性疾患を始め種々の病態に重要であることが報告されているが、神経変性とグリア細胞応答にどの UPR 経路がどのように働くかは未だ不明な点が多い。本研究では、UPR の ATF6 $\alpha$  経路の役割を明らかにするために、ATF6 $\alpha$  欠損マウスを用いて視神経挫滅モデルを作製し、網膜神経節細胞 (RGC) 変性に対する ATF6 $\alpha$  の影響を解析した。【材料と方法】マウス視神経の 10 秒間の挫滅により、緑内障様の RGC 変性を引き起こす視神経傷害モデルを作製した。視神経傷害後、 $\beta$ -tubulin 抗体を用いて網膜 flat mount の免疫染色を行い、RGC の生存率を解析した。また、視神経傷害後の網膜を用いて、ウエスタンブロット法および qPCR 法によりグリア細胞マーカー、神経栄養因子の発現について解析した。【結果】視神経傷害後の野生型マウス網膜において、顕著な小胞体シャペロンの発現誘導が認められた。ATF6 $\alpha$  欠損マウスでは、視神経傷害後 10 日目における RGC 生存率が野生型マウスと比べ有意に減少していた。また、ATF6 $\alpha$  欠損マウスでは、視神経傷害後に誘導される活性化グリア細胞マーカーの発現、および一部の神経栄養因子の発現が野生型マウスと比較して有意に減少していた。【結論】以上の結果より、小胞体ストレス応答 ATF6 $\alpha$  経路は、視神経傷害後の網膜グリア細胞の活性化に促進的に働き、RGC 生存に保護的な役割を果たす可能性が示唆された。

## 115 Auditory hypersensitivity in thalidomide exposed autistic animal model-自閉症モデルラットにおける音刺激での c-Fos 発現

三重大学大学院 医学系研究科 生命医科学専攻 (博士課程)<sup>1</sup>、  
 発生再生医学<sup>2</sup>  
 ○次山ルシラ絵美子<sup>1</sup>、江藤みちる<sup>2</sup>、大河原剛<sup>2</sup>、成田正明<sup>2</sup>

Autism is characterized by difficulties in social interaction, communication, restricted and repetitive behaviors; and sensory abnormalities, such as auditory hypersensitivity. Exposure to teratogens during early embryonic days (E) are known to be related to a higher incidence of autism. Thus, we have established a rat model of autism by prenatal exposure to Thalidomide. The superior olivary complex (SOC) is a group of auditory brainstem nuclei. Impairments in the inhibitory processing of the medial nucleus of trapezoid body (MNTB) in the auditory brainstem might be related to auditory hypersensitivity. We investigated whether abnormal auditory functional organization is present in rats prenatally exposed to Thalidomide, using c-Fos expression as a marker of neuronal activity. All animal experiments were approved by the animal research committee at Mie University. On E9 and E10, pregnant Wistar rats were exposed orally to Thalidomide 500 mg/kg dissolved in 5% arabic gum in distilled water, or vehicle only. Juvenile male rats (P49-51) were placed in a sound-attenuated box for 30 minutes without any auditory stimulation, followed by a 16-kHz (62 dB) for 1 hour or 1 hour in silence. Vehicle group showed c-Fos-positive neurons consistent to 16-kHz tonotopic band in the MNTB. However, in the Thalidomide group c-Fos-positive neurons were increased, beyond the 16-kHz-responsive area. These results suggest that Thalidomide might cause impairments in the auditory brainstem, contributing to auditory hypersensitivity.

## 116 終脳の腹側部において左右非対称に前後軸で異なった活動を示す細胞集団

富山大学大学院 医学薬学研究所 (医学) 解剖学講座  
兼本宗則, 中村友也, 川口将史, 一條裕之

終脳の腹側部 (basal forebrain) には無名質 (substantia innominata) とよばれる領域があり、情動の様々な側面に関わる領域を含む扁桃体延長部 (extended amygdala) の一部として考えられている。しかし、その機能と構造の詳細はいまだ不明な点が多い。終脳の腹側部の機能を明らかにするために、C57BL/6J マウスで最初期遺伝子 ZIF268/EGR1 陽性細胞の発現を観察した。その結果、私達は終脳の腹側部の中に ZIF268/EGR1 の発現で見分けられる細胞集団を発見した。これは ZIF268/EGR1 を発現する 30~50 個の神経細胞が、直径およそ 100 μm の領域に細胞集団をつくるもので、機能的なクラスターと考えられる。さらにこのクラスターは左右非対称に前後軸上で異なって分布しており個体差も認められた。クラスターの組成を明らかにするために、細胞マーカーを利用して細胞種の同定を行った。クラスター内の細胞の中で、NeuN は 100%、GAD67 は 45.3%、preproenkephalin は 81.1% の細胞で発現していた。したがって、このクラスターは神経細胞の集団で GABA 作動性神経を含む神経細胞であることを示唆している。また、終脳の腹側部はストレス応答に関与することが知られていることから、拘束ストレス負荷をかけてクラスターの細胞数を計測した。その結果、クラスターに含まれる細胞が安静時と比べて有意に多かった。安静時とストレス負荷時のいずれの条件でも、クラスターの前後軸上の位置は左右で異なっており、さらにクラスターの分布は個体ごとに異なっていた。これらの結果は、終脳の腹側部において機能的な神経細胞集団が左右非対称に前後軸上で異なった位置で活動しており、ストレスに反応する神経回路の一部として機能していることを示唆している。

## 117 膜骨格蛋白 Membrane protein palmitoylated-6 (MPP6) 欠損マウス末梢神経系の検討

寺田信生<sup>1</sup>、齊藤百合花<sup>1,2</sup>、上條明生<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 信州大学大学院 総合医理工学研究所 医学系専攻保健学分野 医療生命科学ユニット <sup>2</sup> 帝京科学大学 医学教育センター

我々はマウス末梢神経のシュワン細胞が髄鞘内に構築するシュミット・ランターマン切痕 (SLI) において、赤血球膜骨格蛋白 4.1G が接着分子 cell adhesion molecule (CADM) 4、シグナル蛋白 membrane protein palmitoylated (MPP) 6 と Lin7 (Veli) の蛋白複合体形成を主導し、4.1G 欠損によって末梢神経髄鞘形成不全を起こし末梢神経伝導速度や運動能力が障害を来すことを報告した。今回 MPP6 欠損マウス(KO)を新たに作製し、MPP6 によるこれら蛋白複合体への相互関係や末梢神経の髄鞘形成への役割を検討した。MPP6-KO 末梢神経線維では、免疫染色では CADM4 および 4.1G は同パターンで SLI に局在し、western blot でも蛋白量の変化はなかった。Lin7 は、MPP6-KO で SLI から消失し蛋白量が激減した。超微形態で輪間部の軸索と髄鞘の比を検討すると、MPP6-KO は野生型に比べて髄鞘が有意に肥厚していたが、4.1G-KO で認めた髄鞘の二重輪や局所突出は著明ではなかった。以上から、末梢神経においては、4.1G-CADM4 complex→MPP6→Lin7 の結合様式によって 4.1G が複合体輸送を主導することが明らかとなった。また MPP6-Lin7 複合体欠損のみでも髄鞘が過形成となるが、4.1G 欠損による CADM4 も含めた複合体の消失状態によって形態異常や実際の運動機能不全は増悪することが示唆された。

## 118 アブラコウモリ下丘を直接制御する終脳3領域

伊藤哲史<sup>1</sup>、山本亮<sup>2</sup>、古山貴文<sup>3</sup>、長谷一磨<sup>3</sup>、小林耕太<sup>3</sup>、飛龍志津子<sup>3</sup>  
(1: 金沢医科大学解剖学 II, 2: 金沢医科大学生理学 I, 3: 同志社大学生命医科学部)

コウモリはナビゲーション行動時に、こだま定位で用いるソナー音の時間・周波数成分を変化させる。さらに、こだまには飛行経路選択に影響を与える情動性を有することがある。こだまはソナー音放射後数ミリ秒後に戻ってくるので、こだま分析を行う中脳聴覚中枢である下丘は個々のソナー音へ速やかに対応する必要がある。本研究では、辺縁下皮質、扁桃体基底核大細胞部、聴覚皮質という 3 つの終脳領域が下丘に直接下行性投射を行うことを逆行性神経路追跡によって明らかにした。3 領域は両側下丘に投射するが、同側性投射が強かった。注入を受けた動物間で逆行性標識細胞の分布を比較したところ、聴覚皮質からの投射はトノトビー構築があることが示唆された一方、他の終脳領域からの投射には明確なトノトビー構築が見られなかった。過去の研究の知見と合わせて鑑みると、終脳と下丘の間には 3 つのループ構造があることが明らかになった。辺縁下皮質、扁桃体基底核大細胞部、聴覚皮質はそれぞれナビゲーション、情動性、そして空間地図に関係があることから、この 3 つのループはナビゲーション行動時に速やかに能動感覚を最適化させる働きがあると推測される。

## 119 ウガンダ・カリンズ森林に同所的に生息する霊長類 5 種とヒトの口腔細菌叢比較

矢野航<sup>1</sup>、清水大輔<sup>2</sup>、早川卓志<sup>3</sup>、橋本千絵<sup>4</sup>、上村竜也<sup>1</sup>、佐藤和彦<sup>1</sup>、齋村貴弘<sup>1</sup>、江尻真一<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> 朝日大学歯学部、<sup>2</sup> 中部学院大リハビリテーション学部、<sup>3</sup> 京都大学霊長研究所、<sup>4</sup> 日本モンキーセンター

[目的]ウガンダ・カリンズ森林には多種の霊長類が同所的に生息し、果実を中心に食性の重複が見られる。カリンズ森林に同所的に生息する宿主霊長類間の口腔細菌叢に違いがあるかどうかを見るために、食片表面に付着した唾液から野生霊長類の口腔細菌叢を間接的に再構成し比較する手法を開発し、種レベルでの同定を行いその細菌叢を比較した。[材料と方法]ウガンダ共和国カリンズ森林保護区に同所的に生息する 5 種の霊長類 (*C. ascanius* (n=3), *C. mitis* (n=8), *C. l'oeati* (n=5), *Co. guereza* (n=2), *P. troglodytes* (n=39)) 計 57 頭の食物残渣を滅菌綿棒でスワブングし Lysis buffer 液で保存後、細菌叢 DNA を抽出・精製した。16S rRNA の V1-V2 領域 PCR 増幅後、ライブラリを作成し、次世代シーケンサー (MiSeq, Illumina) を用いて細菌叢を同定した。[結果]細菌叢全体ではチンパンジーが多種と大きく異なるパターンを示し、残りの 4 種も類縁だがそれぞれ異なるパターンを示した。Streptococcus 属においては 5 種の宿主内口腔細菌叢が放射状の分布を示す一方、偏性嫌気性菌群である Bacteroides の細菌はチンパンジーにおける特異性を示した。[考察]本研究の結果から、霊長類の口腔細菌叢は好気性菌と嫌気性菌がそれぞれ別の形で宿主の口腔構造、食性、行動に応じて共進化してきた可能性が示唆された。

## 120 骨格観察における除毛処理の有効性に関する研究

狩山信生<sup>1</sup>、坂田ひろみ<sup>1</sup>、塚田剛史<sup>1</sup>、島田ひろき<sup>1,2</sup>、八田稔久<sup>1</sup>  
金沢医科大学<sup>1</sup>解剖学 I、<sup>2</sup>医科学

成獣マウスやラット等の有毛動物の骨染色では、前処置として除毛処理が重要である。しかし、除毛は組織の破壊を招くことや、手間がかかる点等が問題となる。今回、組織を破壊することなく、簡便に除毛する方法を検討し、骨染色への応用を試みた。成獣 ICR マウスを深麻酔下で 4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液 (PFA) に灌流固定した後、背部の皮膚を採取した。除毛溶液にはメルカプト酢酸カルシウム/KOH 水溶液を用いた。種々のメルカプト酢酸カルシウム濃度および KOH 濃度の除毛液を調整して皮膚片を浸漬し、除毛に有効なメルカプト酢酸カルシウム濃度、KOH 濃度、処理温度、および処理時間を検討した。その結果、皮膚片を 2%メルカプト酢酸カルシウム/0.5% または 1%KOH 溶液の場合、42℃、72 時間、メルカプト酢酸カルシウム/2%KOH 溶液であれば 42℃、48 時間の浸漬で除毛できることが明らかになった。次に、4%PFA で灌流固定した成獣 ICR マウスの手および足を 2%メルカプト酢酸カルシウム/1%KOH で 42℃、72 時間インキュベートして除毛し、迅速骨染色法 (RAP-B 法) で透明骨格標本を作製したところ、皮膚の除去をせずに骨格の観察が可能な標本を作製することができた。成獣マウスやラットの手・足の骨染色標本を製作する際、従来法では除毛や皮膚除去等の細かい作業と、軟部組織を透明化するために長時間を要した。本研究で開発した除毛液と RAP-B 法による骨染色法を組み合わせたことにより、簡便な操作、且つ短期間での骨格標本の作製が可能となった。この手法は成獣マウス・ラット以外の有毛動物の観察への応用が可能であり、多様な動物種の骨格標本作製の新しい方法として広く利用されることが期待できる。手・足の骨格異常を観察する際、従来法で作製した標本では、皮膚除去作業等によるアーチファクトが問題となっていたが、皮膚の除去が不要な本法ではその懸念がない。よって本法は、関節炎等の骨格異常の観察に有用であると考えられる。(COI: 無し)

## 121 迅速骨染色法 (RAP-B 法) の開発とその応用

坂田ひろみ<sup>1</sup>、内芝舞実<sup>2</sup>、島田ひろき<sup>1,3</sup>、塚田剛史<sup>1</sup>、狩山信生<sup>1</sup>、増田なつみ<sup>1</sup>、有川智博<sup>4</sup>、東海林博樹<sup>4</sup>、八田稔久<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 金沢医科大学 解剖学 I、<sup>2</sup> 国保日高総合病院、<sup>3</sup> 金沢医科大学 医科学、<sup>4</sup> 金沢医科大学 生物学

小型魚類および哺乳類胎児を用い、迅速骨染色法 (RAP-B 法) の開発を行った。メダカおよびゼブラフィッシュ (ZF) を麻醉し、ホルマリン、界面活性剤、及び KOH を含む透明化固定液に浸漬した。次に Alizarin red S を含む染色液に浸漬した後、界面活性剤を含む洗浄液で余剰な染色を除去し、グリセロールに浸漬して透明骨格標本作製した。成魚でも約 3 日間で全身骨格標本作製が可能であった。また、内臓、皮膚、筋肉を除去しないため、鱗や筋内骨等が原位置で観察できた。続いて、哺乳類胎児への RAP-B 法の応用を試みた。ICR マウス (E18) および Wistar ラット胎児 (E21) を透明化固定液に浸漬した後、さらにエチレングリコールを含む透明化促進液に浸漬した。透明化促進液はマウス・ラット胎児の軟部組織の透明度を高める効果が認められた。透明化後は小型魚類と同様の手順で骨格標本作製が可能であった。さらに深部観察および多重染色へ応用するための検討を行った。本法で作製した標本は、共焦点レーザー顕微鏡による深部撮影が可能であり、骨格の 3 次元画像を描出することができた。また骨染色標本に Hoechst33342 による蛍光核染色を施し、蛍光多重観察も可能であった。骨染色後標本でパラフィン切片を作製し組織構築の保持について検証したところ、組織学的解析への利用も可能であることが示された。本法は、毒性試験等で多量体をスクリーニング解析する際に有用な骨染色の自動化の開発につながることも期待される。また、深部観察や多重染色が可能であることから、骨以外の構造や物質等の局在解析にも応用できる技術であることが示された。本研究は、金沢医科大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

本研究は JSPS (科研費: JP26461634, 18K11659, ひらめきときめきサイエンス: HT24111, HT25131, HT26161, HT27181, HT28189) の助成を受け実施され、また、本研究の一部は和光純薬工業からの研究助成により実施された。(COI: 無し)

## 122 スカイフルーツが羊膜間葉系幹細胞に及ぼす効果

○吉田一晴<sup>1,2</sup>、吉田淑子<sup>3</sup>、岡部素典<sup>3</sup>、下 勝人<sup>4</sup>  
富山大学医学薬学研究所(医学)<sup>1</sup>、東京理化学テクニカルセンター株式会社<sup>2</sup>、富山大学医学薬学研究所再生医学<sup>3</sup>、医療法人社団芦屋ベングリニック院長<sup>4</sup>

スカイフルーツ(以下 SF:学名 *Swietenia macrophylla King*)は、和名オオハバマホカガニの果実であり、東南アジアでは循環器系特に高血糖や高血圧に有効な伝統生薬であり、強壮剤としても知られている。また、センダン科であることから同科の高麗人參と効能が近いといわれているものの詳細な報告はほとんどなされていない。

【目的】過酸化水素水 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で酸化ストレスを加えた細胞に対する SF の抗酸化作用を明らかにする。

【方法】SF 粉末 10g を 50%エタノール 100ml で抽出、濃縮した。SF の抽出液を培養液濃度が最終的に 0.005、0.05、0.5、5.0 mg/ml になるように調整した。ヒト線維芽細胞(HSF)およびヒト羊膜間葉系幹細胞(HAM $\alpha$ 細胞) 5.0 $\times$ 10<sup>3</sup>個を 96 well で 72 時間培養後、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 880  $\mu$ M を含む培地で 24 時間培養、その後上記濃度の SF 添加培地に交換し、24 時間後に細胞数を計測した。同条件下で培養した細胞を回収し、mRNA の発現を PCR 法にて測定した。

【結果】H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で処理した細胞に SF を添加すると濃度依存的に細胞増殖が認められた。抗酸化酵素 Mn-SOD (manganese dependent superoxide dismutase) 及び catalase の mRNA の発現が、HAM $\alpha$ 細胞では、SF の濃度依存性に増加したが、HSF では無処置群とほとんど差が認められなかった。

【結論】幹細胞に対し特異的に抗酸化酵素の発現を増強した。

## 123 横断解剖実習の実際：胸部横断 - 信州大学での試みと経験 -

佐々木克典、岳鳥鳴、友常大八郎  
信州大学学術研究院医学系組織発生学教室

30 年ほど前に人体の三次元構造を把握するための一つの手段として解剖学実習に横断解剖を組み込んだ。

遺体から、胸部内臓、腹部内臓を一塊として取り出し、胸部の場合は、大動脈弓上縁より上 1-2 cm 及び下 1-2 cm、大動脈弓下縁直下、あるいは下 1-2 cm、右心室動脈円錐、右心室中央を脳刀で横断した。次に実習と平行して学生に横断面をスケッチさせ、双方向的に CT 写真と実際の横断面を照合させる作業を行った。事前に横断面と CT 面の読み方を実習講義で触れておいた。実習試験では横断面の問題を 30%前後含むようにし、学生の知識の確実化を促した。

この実習を始めると、二つのことが起きる。一つは、通常の解剖実習ですべて同定したはずの構造が、横断面でほとんど同定できないという現実を突きつけられ、一時的に思考の麻痺をきたす。2-3 回やると、逆にクイズを解くように同定ができるようになり、突然、興味を示し始める。二つ目は、ポリクリなどで臨場の現場に立った時に、少なくとも正常構造については、指導者も驚くほど反応できるようになる。

画像診断の発達、解剖学教育に、学生が CT、MRI、超音波などの画面に親しむ機会を否応なく要求する。この要求にも今回のやり方は十分耐えると考ええる。

## 124 夫をドナーとした生体肝移植後 18 年目に発症した肝細胞癌の 1 例

高原照美<sup>1)</sup>、井村穰<sup>2)</sup> 1) 富山大学医学部第三内科 2) 同 病理診断学

B 型肝炎を背景に生体肝移植を受け 18 年目に肝細胞癌を発症した 1 例を報告する。

症例は 65 歳女性、B 型肝炎変が進行し 1999 年に夫をドナーとする生体肝移植を受けた。摘出肝には肝がんは認めなかった。術後、2 型糖尿病を発症しインスリン注射が導入されたが経過は良好であった。免疫抑制剤は、タクロリムスを、また B 型肝炎に対しては術前から核酸アナログ薬を継続し移植術前には HBV-DNA は 3.8 logIU/ml (TMA) であった。また 2000 年 11 月からは HBsAg が陰性化し、HBV-DNA も陰性を保った。2017 年 8 月に肝 S4 の肝表に 10mm 大の多血性腫瘍を認め、画像検査から肝細胞癌と診断した。2018 年 2 月に肝部分切除術を施行した。肝腫瘍は画像検査どおり肝表に見られた。病理組織は被膜形成を持つ中分化型肝細胞癌で、背景肝は広い範囲で F1 の軽度の線維化が見られた。術後経過は良好でその後の肝細胞癌の再発は認めていない。腫瘍組織の Y 染色体の検出を行ったところ、腫瘍部には Y 染色体は検出されず腫瘍細胞はレシビエント由来と判明した。

発がんの機序として、術前から抗ウイルス治療により長期に HBsAg が陰性であり HBV の関与は低いと考えられ、発がん機序ははっきりしていない。また肝がん細胞がレシビエント由来であり、同様の症例は海外を含め数例のどとまっており、きわめてまれな症例と考えられた。

## 125 バイオ 3D プリントを用いて作製した心筋組織体の薬理応答の検討

荒井 健一、村田 大紀、中山 功一  
佐賀大学 医学部 臓器再生医工学研究室

【背景及び目的】我々は、今まで細胞のみを材料として立体構造体を作製する技術を開発しており、血管、肝臓、軟骨、心臓と様々な組織様構造体の作製に成功している。本研究ではヒト iPS 由来心筋細胞を用いて心筋組織体を作製し、薬理応答を検討した。

【実験方法】iPS 由来心筋細胞、血管内皮細胞、線維芽細胞を規定の濃度で混合し、細胞が低接着性の U 字型 96well-plate 内に播種することで、心筋細胞凝集塊を作製した。作製した心筋細胞凝集塊はバイオ 3D プリントを用いて、剣山上にチューブ構造体に積層した。細胞凝集塊を融合させる為に 1 週間、剣山上で培養した。培養後、剣山上で、拍動数、収縮力を増大させる薬剤であるイソプロテレンールを添加することで、心筋組織体の拍動数、収縮を顕微鏡で観察した。

【結果及び考察】剣山上で作製した心筋組織体は、バイオリアクター内で 1 週間培養することで、細胞凝集塊同士が融合し、剣山上で同期していた。剣山上で心筋組織体が拍動する度に剣山の針が撓むことが確認された。本組織体にイソプロテレンールを添加した直後、心筋組織体の拍動数が増大し、針の撓む移動量も増大した。30 分後、薬剤を除去した後、組織体は添加前の拍動数、収縮力に戻っていた。以上ことから、バイオ 3D プリントを用いて作製した心筋組織体は、剣山上で自己組織化され、薬剤応答性があることが示唆された。本技術は、臓器移植代替法だけでなく、新薬開発に向けた動物実験代替法としても期待される。

## 201 マウス単径リンパ節郭清後に出現する迂回路は交通リンパ管の可能性はある

中谷 壽男<sup>1)</sup>、中島 由加里<sup>2)</sup>、浅野 きみ<sup>2)</sup>、向井 加奈恵<sup>1)</sup>

- 1) 金沢大学医薬保健研究域保健学系看護科学領域
- 2) 金沢大学大学院医薬保健学総合研究科保健学専攻

【目的】皮膚のリンパ管系は、真皮の毛細リンパ管、皮下組織の交通リンパ管、皮下組織にあり筋外膜に近い集合リンパ管からなる。リンパ節の郭清後に、リンパ管迂回路が形成される。この迂回路がどのようなリンパ管なのかを透過型電子顕微鏡で検討した。今回は準備実験である。【材料と方法】10 週令 Balb/c オスマウスを使用、右鼠径リンパ節を郭清、30 日後に ICG を両下肢の皮下に注入、集合リンパ管と迂回路を描出、その部位の組織を採取、樹脂切片を作製し観察した。左側はコントロールとした。この実験は金沢大学動物実験委員会の承認を得て行った (AP-153596)。【結果】単径リンパ節郭清後 30 日、ICG 注入後にリンパ管を観察すると、腹側の正中より上行する集合リンパ管に注ぐ迂回路が観察された。コントロールではこのような迂回路は観察されなかった。コントロールでは、真皮の毛細リンパ管、皮下組織の集合リンパ管はよく観察されたが、これらのリンパ管を結ぶ交通リンパ管は稀にしか観察されなかった。迂回路のある組織では、真皮の毛細リンパ管と集合リンパ管はコントロールと同じような大きさで皮下組織に観察された。一方、交通リンパ管はコントロールより太い像が観察された。コントロールの電顕像では、毛細リンパ管の内皮細胞の反管腔面には細コアゲルが無数に付着していた。交通リンパ管の壁には 1-2 層の平滑筋が見られた。集合リンパ管の壁は数層の平滑筋とコアゲル束から形成されていた。迂回路の電顕像は、交通リンパ管のように壁に 1-2 層の平滑筋がみられた。【結論】迂回路の位置が皮下組織であること、その電顕像はコントロールでの交通リンパ管と類似していたことから、迂回路は、拡張した交通リンパ管であることが示された。さらに、平滑筋が見られることから、迂回路は積極的にリンパ管を流し、リンパ浮腫に対処していると考えられた。

【参考文献】1) Komatsu E, Nakajima Y, et al., *Lymphat Res Biol.* 2017 Mar;15(1):32-38. doi: 10.1089/lrb.2016.0026. 2) Nakajima Y, et al., *Sci Rep.* 2018 May 4;8(1):7078. doi: 10.1038/s41598-018-25383-y.

## 202 肝細胞 Golgi 装置の立体構造解析

白田信光<sup>1</sup>、〇深澤元晶<sup>1</sup>、大野伸彦<sup>2</sup>、村田和義<sup>3</sup>、野田亨<sup>1,4</sup>  
1 藤田医科大学医学部解剖学 II、2 自治医科大学医学部解剖学、3 生理学研究所形態情報解析室、4 藍野大学

【目的】Osmium impregnation の一方法である ZIO 法により染色した肝細胞の Golgi 装置の分布と形態を、SBF-SEM により観察し、他の哺乳類細胞との相違を考察した。

【材料と方法】ラット肝臓組織をグルタルアルデヒド固定後、ZIO 染色液 (Zn・I・Os 混合液) で染色し、樹脂包埋したブロックを SBF-SEM により 70nm 間隔で切削・撮影した。再構築した肝細胞の三次元像における Golgi 装置の分布を可視化した。

【結果】Golgi 装置の lamella 全層が極めて高い電子密度で染色された。sacculles は 2-5 枚程度の lamellae からなり、cis 側から trans 側の lamellae と vesicles, vacuoles が反応陽性であった。立体像では、各 Golgi 装置は曲がりくねったりリボン状の構造で、cis-trans 軸の向きは複数であり、cis 面は有窓性の板状構造、trans 面は小管状構造として観察された。Golgi 装置は核近傍および毛細胆管近傍に局在し、Disse 腔側には存在しなかった。各細胞に 20 個程度存在し、細胞質に対する比体積は約 1% で、一核・二核の細胞で構造の差はなかった。

【考察】哺乳類細胞の多くで、1 個の Golgi 装置が核近傍に分布することが HVEM トモグラフィ・Volume-SEM 観察により報告されている。肝細胞では、複数の Golgi 装置が核近傍と毛細胆管に沿って局在するという例外的な分布が示された。毛細胆管に沿う分布は、光顕・電顕で古くから観察されてきたが、SBF-SEM による立体視により確認された。毛細胆管近傍に局在する Golgi 装置は、胆汁成分の輸送蛋白質の毛細胆管膜への移送に関与すると考えられる。

## 203 OPZ 食食に伴うヒト多形核白血球の分泌果粒に関する形成電顕による解析

盛口敬一、本田雅規・愛知学院大学 歯学部 口腔解剖学講座

ヒト好中球の分泌果粒はアズール顆粒; AG (MPO, ACPase)、特殊顆粒; SG (lactoferrin)、gelatinase 顆粒; GG (gelatinase)の他に secretory vesicles; SV (ALPase)が細胞分画法および免疫細胞学的に同定されている。大きさについては AG が最も大きく、SG、GG、の順に SV がもっとも小型(0.09~0.15 μm)であると報告されている。また AG を除く SG、GG、SV の膜成分に NADPH oxidase 必須の Cytochrome-b 558 (Cyt-b)の局在が報告されている。好中球が食食等により刺激されると Cyt-b と他の細胞質因子が会合し活性型 NADPH oxidase となり、 $O_2^-$  が生成される。 $O_2^-$  は急速に  $H_2O_2$  に不均化される。そこでセリウムイオン (Ce 塩法) と反応させると沈殿を形成する。我々はこの反応を利用して SV に  $H_2O_2$ -Ce を確認し AG とは異なる結果を紙上发表した。今回、同様のオゾン化ザイモザン (OPZ) を食食させた多形核白血球 (PMN) において、Ce 塩法に続いて ALPase 活性を検出した後、分析電子顕微鏡にて関連元素について解析を行うことを目的とした。健康成人の末梢血より PMN を分離し、スピッツ管に OPZ と PMN を加え 37°C、10 分間加温した。ここで 2% グルタルアルデヒドによる 7 分間の前固定を行なった。短時間固定の後 3 ml の NADPH を加えた Ce 反応液に細胞を移し 37°C、10 分間加温した。続いてくえん酸鉛 (Pb) 法による ALPase 活性検出を 37°C、10 分間行なった。反応後 1% オスミウムによる後固定、脱水を経て、Quetol 653 樹脂包埋の、超薄切片を製作し分析電子顕微鏡 (JEOL 1400 Plus) にて元素分析を行った。その結果、OPZ 食食 PMN の食胞膜に Ce、Pb 両元素が検出された顆粒と Ce のみが検出された顆粒が観察された。さらにこれらの顆粒の大きさからも、それぞれ SG、GG、SV であることが明らかとなった。以上のように通常電顕では観察できない反応関連元素の存在を証明することができ、分析電顕の有用性が確認された。

## 204 ハゼ目魚類ヨシノボリの終脳に見出された特徴的な構造

川口 将史 (富山大・解剖)、萩尾 華子、山本 直之 (名古屋大・水圏動物)、松本 浩司 (愛媛大附高)、仲山 慶 (愛媛大 CMES)、赤染 康之 (聖マリアンナ医大)、和泉 宏謙 (富山大・生命先端)、恒岡 洋右 (東邦大・解剖)、須藤 文和 (神経研)、村上 安則 (愛媛大・進化形態)、一條 裕之 (富山大・解剖)

硬骨魚類の終脳の構造は非常に多様化しており、形態学的な観察のみで各構造の相同性を理解することは難しい。神経マーカーの分布パターンの解析は、各領域の同定や他種との比較に有益だが、これまで硬骨魚類では、単一の魚種に対して複数の神経マーカーの分布解析を行った例は非常に少ない。そこで本研究では、スズキ形類の基幹に位置するハゼ目魚類ヨシノボリに注目し、その終脳の構造について、Nissl 染色による形態学的な観察と、神経マーカーおよび神経伝達関連因子の分布パターンに関する解析を行った。その結果、ヨシノボリの終脳には、他の魚種に見られない大きな特徴が二つ観察された。1) 他の魚種で視覚の中核として働く終脳側野外側部が、板状に神経細胞が並んだ構造によって区切られており、Substance-P の入力を受ける区画やグルタミン酸による興奮性出力を行う区画など、それぞれの区画が異なる入出力を担当していた。2) 終脳側野側部 (Vd) 由来の細胞が、終脳全体に広く分布していた。特に、Vd から外側に分布を広げた *gad65*, *substance-p*, *enkephalin* 陽性の細胞群が、終脳の中心部に巨大な球状構造を形成していた。以上のように、複数の神経マーカーを用いた解析は、形態学的な観察のみでは判別が困難な終脳の各領域を詳細に同定する上で、非常に有用な方法になることが示唆された。

## 205 TRPM7 を介する神経傷害

井上浩一<sup>1,2</sup>、植木孝俊<sup>1</sup>、Zhang Xiong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>名古屋市立大学医学研究科統合解剖学分野

<sup>2</sup>Department of Neurobiology, Morehouse School of Medicine

非特異的陽イオンチャネルである TRPM7 は  $Mg^{2+}$  ホメオスタシスや  $Ca^{2+}$  依存性の神経細胞傷害に関与することが知られているが、亜鉛透過性のある数少ないチャネルのひとつでもある。脳虚血などの傷害時に神経細胞への過剰な亜鉛流入が傷害性に作用することが知られており、動物モデルでの脳虚血において亜鉛除去剤を投与すると傷害が軽減する。生体内での亜鉛の局在・移行は主に亜鉛トランスポーターや亜鉛透過チャネルによって行われるが、脳内では亜鉛透過チャネルの関与がより大きいと考えられる。我々は、以前、神経細胞における亜鉛毒性に TRPM7 が関与する可能性を報告しているが、最近、糖尿病モデルの脳で TRPM7 の発現レベルが上昇することを見出した。糖尿病などの基礎疾患がある場合、脳梗塞発症時の症状が増悪することが知られており、TRPM7 の発現上昇がその一因になっている可能性がある。

参考文献

Inoue et al., J. Biol. Chem. 2010;285:7430-7439

Inoue et al. Curr. Med. Chem. 2015;22:1248-1257

Huang et al., J. Biol. Chem. 2018;293:14393-14406

## 206 乳幼児突然死症候群 (SIDS) モデルラットの作製と解析

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

乳幼児突然死症候群 (SIDS) は、何の予兆も既往歴もないまま乳幼児が死に至る病気で、日本の乳児死因の第 3 位を占めている。しかしながら、その発症機序はあまりわかっていない。疾患の発症機序を明らかにするためにモデル動物の解析は大変有用であるが、SIDS モデル動物は不整脈に関連したイオンチャネルとその下流のシグナル伝達に係る遺伝子の遺伝子改変動物だけであり、これらの遺伝子の変異が原因で発症する SIDS のケースは 1 割程度と考えられている。

我々は、SIDS を発症した児の 8 割以上に軽度の感染が見られたという疫学的な事実に着目し、SIDS モデル動物の作製を試みた。妊娠 10 日目の Wistar ラットにウイルス感染モデルとして用いられる polyriboinosinic : polyribocytidylic acid (poly I:C) を投与し、出産後、その仔ラット (生後 12 日) に細菌感染モデルとして研究に用いられる lipopolysaccharide (LPS) を投与し、24 時間後の死亡率を調べた。その結果、コントロール群の死亡率は 24.0% であったのに対し、poly I:C 群では 76.9% と死亡率の有意な増加がみられた。次に、SIDS モデルラットの血液生化学検査を行った結果、いくつかの因子に異常が見られることを明らかにした。さらに SIDS モデルラットの呼吸能を解析した結果、SIDS モデルラットは高二酸化炭素ガスにさらされた際、生後 12~14 日で総換気量が増加する傾向が見られた。これらのことから、我々の SIDS モデル動物は SIDS の病態を反映していることが考えられ、新たな SIDS モデル動物となることが期待される。

## 207 ミクログリア除去時に現れるアストロサイトの食食能

小西博之<sup>1</sup>、佐藤克明<sup>2</sup>、木山博資<sup>1</sup>

<sup>1</sup>名古屋大学 大学院医学系研究科 機能組織学

<sup>2</sup>宮崎大学 医学部医学科 感染症学講座免疫学分野

ミクログリアは脳内で食食能を担うグリア細胞である。最近我々はミクログリア特異的にジフテリア毒素受容体を発現するマウスを用い、脳内からミクログリアを除去する実験系を確立した。この実験系では、ミクログリアの食食作用は機能していないにもかかわらず、ミクログリアの残骸は速やかに脳内から消える。そのため、ミクログリア以外の細胞がミクログリア残骸を食食したと考えられた。まず、ミクログリア除去後の脳において各種細胞マーカー分子の発現をリアルタイム PCR で調べたところ、アストロサイトマーカーである GFAP が顕著に発現上昇することが分かった。そこで、免疫組織化学と走査型電子顕微鏡によりアストロサイトを観察した結果、アストロサイトは太く変化した突起を用いミクログリア残骸を食食することが明らかとなった。このアストロサイトによるミクログリア残骸の食食は、アストロサイトとアポトーシスを誘導したミクログリアの共培養でも再現された。さらに、共培養系における siRNA を用いたノックダウン実験から、アストロサイトに発現する TAM ファミリー分子がミクログリア残骸を認識する食食受容体として働くことが判明した。以上の結果から、ミクログリアの食食能が機能しない時に代償的にアストロサイトが食食を行う可能性が示唆された。

## 208 脳損傷後の神経回路再編における分子および運動介入の効果

田中 貴士<sup>1,2</sup>、宮田 信吾<sup>2</sup>

<sup>1</sup>金沢医科大学 解剖学 II、<sup>2</sup>近畿大学 東洋医学研究所

成体の中枢神経系は再生能が著しく乏しいため、脳損傷に対する根本的な治療法は未だ確立されていない。本研究では、神経再生シグナル (BDNF/TrkB) を抑制しているチロシン脱リン酸化酵素 (SHP-1) を抑制することで、脳損傷後の神経軸索の発芽を促し、自発的な運動によって神経回路の再編を強化できるのか、さらに運動機能の回復が効果的に得られるかを検証した。

成体の脳損傷モデルマウスにおいて、脳損傷の直後から脳における BDNF、TrkB の顕著な減少や SHP-1 の増加がみられたが、夜間 12 時間の自発的な運動によって BDNF、TrkB の減少が有意に緩和され、SHP-1 の増加は抑えられることが明らかになった。また、順行性・逆行性トレーサーによって脳損傷後の皮質脊髄路の発芽や神経回路の再編を免疫組織化学的に解析した結果、特に SHP-1 ノックアウトマウスの運動群において皮質脊髄路の軸索発芽の増加、麻痺筋の支配神経との神経回路の再編が示され、運動機能の回復も良好であった。

BDNF/TrkB の抑制因子である SHP-1 の抑制下において自発的な走行運動を行うことで、脳損傷後の神経軸索の発芽や神経回路の再編がさらに増大することが明らかになった。脳損傷後の効果的な神経回路の再編には、神経再生の抑制因子をターゲットとした分子的介入と、神経活動に依存的な神経回路を強化・精緻化する運動を融合させることが有効であることが示された。

## 209 アストロサイト CD38 による神経発達制御機構

○服部 剛志、堀 修  
金沢大学医薬保健研究域医学系 神経解剖学

自閉症のモデル動物であるCD38 ノックアウト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オリゴデンドロサイトやアストロサイトなどのグリア細胞の発達異常があることが知られている。本研究では、アストロサイトが脳の発達に与える影響を明らかにするため、アストロサイト特異的CD38 ノックアウトマウスを用いて神経発達異常を解析した。同マウスの前頭皮質において、前シナプスのマーカーであるVGLUT1 及び VLUGT2 のうち、特にVGLUT2 の発現量が顕著に減少していた。また、後シナプスのマーカーであるPSD95 の発現量も減少していた。両マーカーの局在が一致するシナプス部位の数もアストロサイト特異的CD38 ノックアウトマウスで減少していた。更に行動試験を行った所、3 chamber test において一歩の行動に異常がみられた。以上の結果より、アストロサイトのCD38 が非細胞自律的メカニズムにより神経発達及び社会性の形成に影響を与える可能性が示唆された。

210  $\beta$ 2-microglobulin 欠失マウスの網羅的行動解析

○深澤元晶 1、高井聡子 2、宮川剛 2、石嶺久子 1、臼田信光 1  
1 藤田保健衛生大学 医学部解剖学 II、  
2 総合医科学研究システム医科学

【目的】網羅的行動バッテリーにより  $\beta$ 2-microglobulin ( $\beta$ 2M) 欠失の脳高次機能に与える影響を調べた。 $\beta$ 2M は免疫機能を担う MHC-I 分子を構成するが、脳を含む全身の細胞に発現し、神経細胞の形態形成や認知機能への関与が近年注目される。

【材料と方法】同種個体の  $\beta$ 2M(-/-) と  $\beta$ 2M(+/+) 各 20 匹を用いて一般検査および 21 種類の行動実験を順次行った。

【結果】生理的な行動には変化はなかったが、社会的行動と記憶・学習に変化が見られた。社会的行動では、新奇探索行動 (Crawley) の軽度亢進、社会性 (Novel environment) の軽度低下が示された。記憶・学習においては、作業記憶 (T-maze) 低下が最も著明で、運動学習 (Rotarod) の低下も観察されたが、空間・参照記憶 (Barnes maze)、文脈記憶 (Fear conditioning) には変化はなかった。これらの責任部位として内側前頭前野や側坐核などのドパミン神経系の関与が考えられた。

【結論】 $\beta$ 2M 欠失が認知機能低下をもたらすことが示された。MHC-I の関連分子群の欠失においては、シナプスの異常によると推定される認知機能低下が報告されている。 $\beta$ 2M 欠失動物も同様に認知機能障害のモデル動物として病態解明への貢献が期待される。

## 211 Peripheral leukocyte accumulation in the brain is critical pathology of cerebral vasospasm/neuronal dysfunction after subdural arachnoid hemorrhage

Hiroshi Ishii\*, Yasuhiro Aida<sup>#</sup>, Yasuyuki Ohkuma\*, Roboon Jureepon\*, Tsuyoshi Hattori\*, Mika Takarada\*, Mitsutoshi Nakada<sup>#</sup>, Yasuhiko Yamamoto<sup>S</sup>, Osamu Hori\*

\*Dept. of Neuroanat., <sup>#</sup>Dept. of Neurosurg., <sup>S</sup>Dept. of Vasc. Mol. Biol., Kanazawa Univ.

**Purpose:** Subarachnoid hemorrhage (SAH) suddenly develops predominantly by ruptured cerebral aneurysm. The severity of SAH is higher than other types of stroke such as cerebral ischemia and intracranial hemorrhage. It is critical to prevent disability following cerebral vasospasm (CVS) after SAH. Our research purpose was to elucidate mechanism underlying CVS and find novel target of brain injury after SAH.

**Method:** In BL6/J background mice, Micro-filament, of which tip was cut at right angle, was inserted from left external carotid artery stump to internal carotid artery, and ruptured at the bifurcation of anterior cerebral artery and middle cerebral artery.

**Results:** In a damage-associated molecular patterns (DAMPs) receptor-deficient mice, neurological score and cerebral vasospasm was markedly improved compared with control mice. The DAMPs receptor was expressed in endothelial cells of internal carotid artery after SAH. However, vascular specific DAMPs receptor-deficient mice did not show improvement of CVS after SAH. In stead, bone marrow transplantation of wild type mice into DAMPs receptor-deficient mice did not show improvement these phenotypes compared with control one into wild mice. Therefore, DAMPs receptor in immune cells may contribute to CVS after SAH. Indeed, neutrophils accumulated around cerebral artery after SAH in DAMPs receptor-dependent manner.

**Conclusion:** We newly identified a DAMPs receptor as an inducer molecule of CVS/brain injury after SAH. The DAMPs receptor in leukocytes may be attributed to accumulation around cerebral vessels, which contributes to critical pathology of CVS after SAH.

## 212 SGLT inhibitor and Impaired Phospholipid Metabolism of Proximal Tubular Epithelium in Diet-Induced Obesity (DIO) Mouse Kidney

齊藤 成<sup>1</sup>、高木 孝士<sup>2</sup>、志茂 聡<sup>3</sup>、大野 伸彦<sup>4,5</sup>

1. 藤田医科大学 医学部 解剖 II 2. 昭和大学 電子顕微鏡室 3. 健康科学大学 健康科学部 作業療法学科 4. 自治医科大学 医学部 解剖学講座組織学部門 5. 自然科学研究機構 生理学研究所 分子神経生理研究部門

Obesity is a major cause of type 2 diabetes mellitus resulting in pathological changes in nephron system. In this study, we examined if diet-induced obesity (DIO) impairs metabolism and induces damages in the epithelium of proximal renal tubules. Adult C57BL-6J male mice were fed with a high-fat diet (HFD) or standard diet (STD) from 4 weeks of age for 16 weeks. The 20 week mice were administered with phlorhizin, an inhibitor of SGLT for Na<sup>+</sup> and glucose reabsorption into cytoplasm, or vehicle. SBF-SEM was used to identify three-dimensional architectures of the epithelial organelles in proximal convoluted tubules in kidneys. STEM-EDX and Raman microscopy were used for component-analysis of the pathological lesion of the tubular epithelium after HFD. SBF-SEM revealed mitochondrial fragmentation and accumulation of autophagosomes in proximal convoluted tubules in HFD mice, and SGLT inhibitor administration partially ameliorated the pathological changes. STEM-EDX mapping analysis evidenced accumulation of element phosphorus in the autophagosomes, and Raman microscopy detected same peak as sphingomyelin and its metabolite in the autolysosomes. These results suggest that SGLT inhibitor's administration ameliorates damage of the proximal tubules with abnormal mitochondrial dynamics and phospholipid metabolism caused by HFD.

## 213 卵丘細胞が分泌するサイトカインおよび神経ペプチドによる受精の促進

谷井一郎, 荒館忠・富山大学教養教育院

下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド (PACAP) は卵胞液中に存在し、また、精子先体にも存在する。PACAP 受容体 PAC1R は卵丘細胞で発現している。そこで本研究は、PACAP を介した卵丘細胞による受精促進について調べた。

卵丘細胞-卵複合体 (COC) に PACAP を作用させると体外受精率は上昇した。COC の PACAP 処理液には先体反応を促進し、精子の透明帯通過を促進する因子が含まれていた。この受精促進因子を同定するために、マイクロアレイ解析を行ったところ、PACAP の刺激により、卵丘細胞の多くの遺伝子発現が上昇した。これらの遺伝子産物の中で CCL2 と Neurokinin A (NKA) が精子に作用する証拠を得た。精子細胞膜分画中に CCL2 受容体 CCR2 および NKA 受容体 NK2R が存在した。間接蛍光抗体法により、CCR2 は前体部および鞭毛全体に、NK2R は精子先体を被う前体部に局在を認めた。走化性実験により、CCL2 は精子を誘引することが示された。NKA は精子の先体反応を促進させ、精子の透明帯通過率を上昇させた。NK2R アンタゴニストは体外受精を抑制した。以上の結果は、PACAP は卵丘細胞に作用して、精子を誘引する CCL2 と精子の透明帯通過率を高める NKA を分泌させて受精を促進することを強く示唆する。

## 214 Reelin 欠損による小脳低形成を Sonic hedgehog シグナルを利用し、治療できるか

○松岡未紗, 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

小脳に存在する顆粒細胞は、脳全体の三分の二を占めると言われ、最も数の多い細胞である。この顆粒細胞は生後に増加し、小脳表面積と体積を増加させる。プルキンエ細胞から分泌される Sonic hedgehog (Shh) により外顆粒細胞層 (EGL) の顆粒細胞前駆細胞 (GCP) において Smoothened (Smo) が活性化することで分裂が促進され、顆粒細胞は増加する。

*reeler* マウスではよろめくという運動失調が見られ、これは小脳低形成によるものであること、遺伝子 *reelin* の欠損により、プルキンエ細胞が整列しないことが知られている。この小脳低形成は、プルキンエ細胞が整列しなくなったことにより、EGL の GCP に Shh の供給が阻害され、顆粒細胞の生成量が減少したのではないかと考えた。そのため、今回の研究は、ステロイドホルモンの副作用による小脳低形成を Smoothened agonist (SAG) の使用により改善が見られたという報告に基づいて、同様に SAG が *reeler* マウスの治療に用いることができるのではないかと考え、調べた。

SAG を投与したことによって、Pax6 陽性細胞、BrdU 陽性細胞が有意に増加したこと、小脳における EGL の占める割合が大きくなることが分かった。この結果から、SAG による *reeler* マウスの小脳低形成の治療の可能性があること、プルキンエ細胞が整列しなくなったことにより GCP への Shh の供給が阻害され生じていることが示唆された。

## 215 EGFP-Tol2細胞標識システムとウズラ-ニワトリキメラ胚を用いた冠状血管内皮細胞の起源探索

○上村竜也<sup>1)</sup>、山岸敏之<sup>2)</sup>、江尻貞一<sup>1)</sup>、中島裕司<sup>2)</sup>

- 1) 朝日大学歯学部口腔解剖学分野解剖学  
2) 大阪市立大学大学院医学研究科器管構築形態学

冠状血管内皮細胞の起源について、鳥類では以前の研究により、心外膜の前駆体である心外膜原基が冠状血管内皮細胞の起源とされていた。一方で近年、マウスにおいて冠状血管内皮細胞の主な供給源は、静脈洞内皮または心室心内膜であるという報告がなされた。よって、本研究では細胞標識法により冠状血管内皮細胞の起源を直接的に明らかにすることを目的とした。メダカゲノムから発見されたDNA型トランスポゾンであるTol2因子を用いたシステムによりEGFP (enhanced green fluorescent protein) をそれぞれ心外膜原基、静脈洞内皮、心室心内膜の3種類の標的細胞のゲノムに組み込む細胞標識法を、ウズラ-ニワトリキメラに適用することで3種類のキメラ胚を作製した。それらのキメラ胚にウズラ内皮細胞を特異的に認識する抗QH1抗体を用いた免疫組織化学を併用することで、鳥類における冠状血管内皮細胞の起源の詳細な解析を試みた。EGFP-Tol2キメラ実験から、心外膜原基は一部が冠状血管内皮細胞に分化したが、主として血管平滑筋細胞に分化した(図A)。冠状動脈主幹部、心室自由壁、および背側心室中隔の冠状血管内皮細胞は主に静脈洞内皮に由来し(図B)、中間および腹側心室中隔の冠状血管内皮細胞の大部分は心室心内膜に由来することが分かった(図C)。よって鳥類では、静脈洞内皮および心室心内膜が冠状血管内皮細胞の主要な供給源であり、それらは異なる領域の冠状血管内皮細胞に分化する。鳥類心臓における冠状血管内皮細胞の起源は、マウスモデルで観察された結果と基本的に同じであったが、冠状動脈主幹部についての報告は初めてであり、冠状血管内皮細胞が領域特異的な起源を持つことが示された。

## 216 Leukemia inhibitory factor induces corticotropin releasing hormone in the mouse placenta

He Wang<sup>1</sup>, Tsuyoshi Tsukada<sup>1</sup>, Hiromi Sakata-Haga<sup>1</sup>, Hiroki Shimada<sup>1,2</sup>, Tomohiro Arikawa<sup>3</sup>, Hiroki Shoji<sup>3</sup>, Toshihisa Hatta<sup>1</sup>  
Departments of <sup>1</sup>Anatomy, <sup>2</sup>Medical Science, and <sup>3</sup>Biology, Kanazawa Medical University

In rodents, maternal leukemia inhibitory factor (LIF), as shown in previous studies, induces adrenocorticotropic hormone (ACTH) secretion from the placenta, which in turn stimulates fetal nucleated red blood cells to secrete LIF (maternal-fetal LIF-ACTH signal relay pathway proposed by Simamura et al., 2010). Here we examined the effects of LIF on the expression and secretion of corticotropin releasing hormone (CRH) in mouse trophoblasts in vitro. The mouse trophoblast stem cells (mTSCs) used in this study are capable of differentiating to various types of trophoblasts, including giant trophoblasts, spongiotrophoblasts, and syncytiotrophoblasts. We examined the expression of Crh in mTSCs and of CRH levels in the culture media containing LIF (10 ng/ml of recombinant mouse LIF) at several time points by quantitative RT-PCR or Sandwich ELISA, respectively. At 3 and 5 days after LIF supplementation, the expression of Crh was increased significantly in mTSCs with LIF treatment compared with those in the control. The concentration of CRH in the culture media was also increased. We then examined the effect of LIF on the induction of CRH in the placenta in vivo. We injected the pregnant mice (C57BL/6J) with LIF (5 µg/kg BW and 25 µg/kg BW) at gestational day 13.5, and collected the placenta 3 hours after the injection. The expression of Crh in the placenta was significantly increased by LIF treatment in a dose-dependent manner. These findings suggest that LIF induces CRH in trophoblasts, contributing to the induction of ACTH secretion from the placenta.

We performed all procedures involving experimental animals in accordance with the guidelines for animal experiments provided by the Ethics Committee of Kanazawa Medical University. This work was supported by KAKENHI (16H05364 and 15K15405).  
DOI: None

## 217 Role of CD38 in Cuprizone-induced Demyelination

○Roboon Jureepon、服部 剛志、堀 修  
金沢大学医薬保健研究域医学系 神経解剖学

CD38 is an ADP-ribosyl cyclase that is involved in a variety of cellular processes. We recently reported that CD38 played important roles such as myelination in the development of glial cells. However, functional role of CD38 in glial cells in pathological condition was unclear. In this study we investigated role of CD38 for demyelination. To investigate its role in demyelination, we employed cuprizone (CPZ)-induced demyelination model. We examined demyelination and glial activation of these mice by immunohistochemistry, western blotting and qRT-PCR. We found that strongly elevated expression level of CD38 in the glial cells during demyelination. CD38 KO mice exhibited significantly attenuated demyelination and glial activation. Furthermore, only astrocyte-specific conditional KO mice showed milder demyelination and glial activation. These results suggest that astrocytic CD38 play a critical role for CPZ-induced demyelination and glial activation.

## 229 Differential Response of Immortalized Human Amnion Mesenchymal and Epithelial Cells against Oxidative Stress

Lu Guang Han<sup>1</sup>, Qing-Li Zhao<sup>2</sup>, Toshiko Yoshida<sup>1</sup>, Motonori Okabe<sup>1</sup>, Chika Soko<sup>1</sup>, Mati Ur Rehman<sup>2</sup>, Takashi Kondo<sup>2</sup>, Toshihiro Nikaido<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Regenerative Medicine, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, Toyama 930-0194, Japan.

<sup>2</sup> Department of Radiology, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama, Toyama 930-0194, Japan.

<sup>3</sup> Department of CT, The fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei Province, China.

Excessive reactive oxygen species is associated with a variety of pathophysiological processes. Amniotic membranes have been extensively applied in clinical practice for burn treatment, corneal repair, and tissue regeneration. However, the antioxidative properties of amniotic cells have not yet been fully understood. Therefore, the current study aimed to observe the response of amniotic cells against Reactive oxygen species (ROS) stimuli, and to investigate the underlying molecular mechanisms. The immortalized human amniotic mesenchymal cells (iHAMs) and immortalized human amniotic epithelial cells (iHAEs) were used. Meanwhile, the human skin fibroblast (HSF) was used as a standard cell line. Intracellular ROS generation, cell viability, cellular morphology, apoptosis-related proteins and intracellular antioxidants were investigated to reveal the response of amniotic cells to oxidative stresses induced by X-rays and hydrogen peroxide. The intracellular ROS level and cell apoptosis in iHAMs was remarkably increased. iHAEs show relatively high resistance to ROS stimulation, which can be attributed to the high SOD2 expression and up-regulation of Nr2f and HO-1 after X-irradiation exposure. On the other hand, iHAMs display relatively high sensitivity to oxidative damage, which can be ascribed to the high caspase-3 expression and up-regulation of caspase-8 and BAX, whereas down-regulation of Bcl-xL, Nr2f, HO-1 and TrxR-1. In conclusion, findings have highlighted the characterization of response of amniotic derived epithelial and mesenchymal cells to oxidative stress. In physiological processes, iHAMs may play an important role to maintain the homeostasis of the pregnancy environment. Under oxidative stimulations, iHAEs play a role of defender to against oxidative damage in amnion tissue.