日本解剖学会

第69回東北・北海道連合支部学術集会

会期：令和5年9月2日（土）、3日（日）
会場：東北医科薬科大学

特別講演

「走査電顕によるオルガネラ研究の最前線」

甲賀 大輔
旭川医科大学 解剖学講座 顕微解剖学分野

オスミウム浸軟法は、再構築することなくオルガネラをダイレクトに観察できる唯一の走査電子顕微鏡(SEM)技法である。私たちはこれまで、オスミウム浸軟法を「哺乳動物細胞ゴルジ装置の3D微細構造解析」に応用し、このオルガネラの形態的多様性を解明してきた。しかし、哺乳動物細胞ゴルジ装置は、巨大な連続体を呈しており、浸軟法による観察では、その全体形状を把握することは不可能であった。そこで私たちは、モダンな3D電顕技法である「連続切片SEM・3D再構築法」を独自に開発することで、ゴルジ装置全体像のイメージングに成功した。本講演では、私たちが得意とする「オスミウム浸軟法」と「連続切片SEM法」を中心に、これらの手法の紹介と、ゴルジ装置の形態解析の現状について発表する。さらに私たちが近年、開発を進めているオスミウム浸軟法と凍結超薄切片法(徳安法)を組み合わせた光・電子相関顕微鏡法(Correlative Light and Electron Microscopy; CLEM法)や、連続切片SEM法に免疫電顕法を組み合わせた「3D免疫電顕法」など、独創性のある先端的電顕技法についても触れ、SEMのオルガネラ研究への可能性・新展開について言及する。

1 脳発達期のFABP4機能低下が自閉症様表現型に与える影響の解析

○孫 正康¹、前川 素子¹、坂井 舞²、齋 志前³、大隅 典子⁴、富田 博秋³、大和田 祐二¹

1. 東北大・医・器官解剖学、2. 東北大・医・精神看護学、3. 東北大・医・精神神経学、4. 東北大・医・発生発達神経科学
自閉スペクトラム症(自閉症)は、社会性の障害、反復的な行動、感覚系の異常、などを特徴とする小児の発達障害である。我々は過去に、脂肪細胞型脂肪酸結合タンパク質 Fatty acid binding protein 4 (FABP4)の機能低下が自閉症病態形成に関与する可能性を報告した(Maekawa et al., 2020)。しかし、以前の研究ではFABP4機能低下が神経系に影響を与える時期が特定できなかった。そこで、本研究では、特に脳発達期に局限してFABP4機能低下を起こし、その影響を調べることにした。方法として、FABP4阻害剤として知られるBMS309403(以下BMSと略す)を、交配2週間前から、仔の離乳まで、C57BL/6J雌マウス(母獣)に投与した。母獣から生まれた仔マウスを実験に用いた。行動解析として、母仔間コミュニケーション能力を調べる母仔分離時の超音波発声試験、不安様行動を調べる基石埋め隠し試験、うづ様行動を調べる強制水泳試験などを実施した。組織学的解析として、マウスの脳を灌流固定し、大脳皮質錐体細胞樹状突起のスパイン密度の解析を行った。メカニズムの検討のため、妊娠後期(17.5日)の母体および胎児から採血し、血漿の脂肪酸組成を調べた。その結果、行動面において、BMS投与群の雄マウスでは、生後早期の超音波発声の変化、基石埋め隠し行動の亢進、強制水泳試験で無動時間の延長を認めた。組織面において、BMS投与群の雄マウスで、錐体細胞樹状突起スパイン密度の上昇を認めた。これらの結果は、脳発達期のFABP4機能低下が自閉症様表現型に影響を与えたことを示している。さらに、母体の血漿を用いた脂肪酸解析の結果、母体血におけるアラキドン酸の有意の上昇など、複数の脂肪酸組成の変化が見られた。これらの脂肪酸組成の変化が、さまざまな生理作用を介して自閉症のリスク形成につながる可能性が推測された。(COI:No)

2 妊娠中期の母体免疫活性化が仔の自閉症様表現型に与える影響の解析

○切替日奈子¹、Florian Pans¹、生田美徳¹、内堀永梨果¹、坂井舞²、齋志前³、大隅典子⁴、富田博秋³、前川素子¹、大和田祐二¹

東北大・医・器官解剖学¹、東北大・医・精神看護学²、東北大・医・精神神経学³、東北大・医・発生発達神経科学⁴

自閉スペクトラム障害(自閉症)は、社会性の障害、コミュニケーションの障害、こだわり行動を特徴とする発達障害である。母体感染が子の自閉症リスクを増加させるという疫学事象から、自閉症のリスク因子の一つとして妊娠中の母体免疫活性化(maternal immune activation, MIA)が注目されている。本研究では、自閉症と母体感染の因果関係を明らかにするために、MIAモデルマウスを作製し、表現型を調べた。MIAモデルとして、合成dsRNAであるpoly(I:C)を妊娠中期(胎生12.5日)のマウス母獣に投与し、生まれた仔(MIAマウス)を解析に用いた。行動面では、新生仔期のMIAマウスを用いて、母仔分離時の仔の超音波発声(USV)試験を実施し、新生児期の母仔間の音声コミュニケーション能力を調べた。また、9週齢以降のMIAマウスを用いて、社会的優位性チューブテスト、高架十字迷路など、複数の自閉症関連行動試験を行った。組織学的には、11-13週齢のMIAマウスの大脳皮質前頭前野を用いてGolgi染色を実施し、第II/III層の錐体細胞樹状突起スパイン密度を測定した。最後に、母体免疫活性化の程度を調べるため、Poly(I:C)投与母獣の血中のサイトカイン濃度を調べた。これらの試験を行った結果、行動面では、USV試験において、雄の新生仔MIAマウスで音声コミュニケーションの異常を認めた。また、成体のMIAマウスでは、社会的優位性チューブテストにおいて、社会優位性の変化、高架十字迷路で不安様行動の上昇を認めた。脳組織においては、Golgi染色によるスパインの解析で、MIAマウスで樹状突起スパイン密度の上昇を認めた。サイトカインの網羅的解析においては、Poly(I:C)投与3時間の母体血中で、IL-6、IL-17を含む、複数のサイトカイン濃度の上昇を認めた。一方で、投与1日後の母体血中サイトカイン濃度は低下していた。これらの結果は、妊娠中期の母体免疫活性化が、一過性の母体血中のサイトカイン濃度の上昇を介して、仔の自閉症の病態形成につながる可能性を示唆している。

3 核内受容体PPAR α に着目した統合失調症新規治療薬の開発

生田美徳¹、吉町文子¹、島田莉名¹、黒崎円花¹、坂井舞²、齋志前³、富田博秋³、前川素子¹、大和田祐二¹

東北大・医・器官解剖学¹、東北大・医・精神看護学²、東北大・医・精神神経学³

【背景】統合失調症は、幻覚や妄想、意欲や自発性の低下、認知機能障害などの症状を示す代表的な精神疾患の一つである。既存の治療薬による効果は不十分であるため、新規治療薬の開発のためにも統合失調症の発症メカニズムの理解が求められている。一方、我々はこれまでに、ヒトとマウスの解析を実施し、核内受容体Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α)の機能低下が統合失調症の病態生理に関与する可能性を見出した。そこで本研究では、統合失調症の治療標的としてPPAR α に着目し、新規治療薬の開発を行うことにした。

【方法】統合失調症のN-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体機能低下仮説に基づき、C57BL/6Jマウスに対してNMDA受容体アンタゴニストとして知られるMK-801(0.2mg/kg/day)を1日1回14日間連続腹腔内投与し、統合失調症モデルマウスを作製した。作製した統合失調症モデルマウスに対して、PPAR α アゴニストとして知られるpemafibrateを0.3mg/kg/dayを1日1回14日間経口投与し、組織学的評価、行動評価を行った。組織面では、マウスを灌流固定した後、ピラトームで脳切片を作製し、Golgi染色を行い、大脳皮質前頭前野樹状突起スパイン密度を調べた。行動面では、マウスの認知機能を調べることができる新奇物体認識試験を実施した。これらの解析を行うことで、PPAR α アゴニストによる統合失調症治療効果の有無を調べた。

【結果】統合失調症モデルマウスは、錐体細胞樹状突起スパイン密度の減少、新奇物体に対する認知能力の低下を示した。統合失調症モデルマウスに対してPPAR α アゴニストを投与した場合は、統合失調症モデルで見られた錐体細胞樹状突起スパイン密度低下と認知機能低下が改善した。また、投薬の順番を入れ替えて、先にPPAR α アゴニスト投与した後で、MK-801を投与したマウスでは、スパイン密度低下と認知機能低下が起こらなかった。

【考察】本研究により、PPAR α アゴニストが、スパイン密度低下と認知機能低下の改善または予防に役立つ可能性を示した。一方で、PPAR α アゴニストがどのような細胞においてどのような機序でこのような効果を示すのかは、未だ不明である。今後は、PPAR α アゴニストの作用機序についてのさらなる解析が必要である。(COI:No)

4 ATG9Aは非オートファジー機能によりChlamydia trachomatisの増殖に寄与する

鈴木倫毅¹、船越智子²、熊谷圭吾³、小松雅明²、和泉稜¹

福島県立医科大学・解剖組織学¹、順天堂大学・医・器官細胞生理学²、国立感染症研究所・細胞化学部³

偏性寄生性細菌であるクラミジア・トラコマティスは、宿主細胞内に侵入後、封入体を形成してこの中で増殖するが、この過程で様々な因子を宿主細胞質へ分泌し、宿主因子を利用することで自身の増殖に有利な環境を整える。本研究ではクラミジア感染における、オートファジー初期因子であるATG9Aの関与を調べる目的で、ATG9A欠損HeLa細胞(ATG9-KO)を用いた解析を行った。対照細胞に比してATG9-KO細胞では封入体におけるクラミジア増殖が抑制され、この効果は野生型あるいはスクランブラーゼ活性が低下した変異ATG9Aの再発現によりレスキューされた。一方、ATG9Aとともにオートファジーにおける隔離膜の伸長に寄与するATG2A/Bの欠損細胞ではクラミジア増殖に有意な影響が認められなかったため、オートファジーはクラミジア感染に重要ではないと結論付けた。クラミジア感染下の宿主細胞では、ゴルジ体が核近傍から封入体周囲に移動する現象が知られているが、ATG9A-KO細胞ではこの局在変化は認められなかった。ATG9Aは膜タンパク質であり、その小胞輸送にはクラスリンアダプター複合体に結合するN末端ドメインが重要である。このドメインを欠失した変異ATG9AをATG9A-KO細胞に再発現させると、クラミジア感染によるゴルジ体の局在変化は起こらず、抑制されたクラミジア増殖は回復しなかった。これらの結果は、ヒト細胞においてATG9Aが封入体におけるクラミジア増殖を支えること、その機序としてATG9Aのオートファジーにおける機能ではなく、その正常な細胞内輸送活性が重要であることが示唆された。

高浸透圧ストレス下で形成される非膜性オルガネラの性状解析

田村 直輝、和栗 聡
福島県立医科大学医学部 解剖・組織学講座

脂質膜のない非膜性オルガネラ(membraneless organelle:MLO)の多くは、液-液相分離という物理的な現象によって形成される。MLO は一般的に可逆性を示すが、凝集体などの不可逆性の構造体になると様々な神経変性疾患を引き起こす。しかし、MLO の性状に関する知見はいまだ少ない。そこで本研究では、ヒト膀胱癌由来 T24 細胞を用いて、高浸透圧ストレス下において形成される二つの MLO、p62 顆粒とストレス顆粒の比較解析を行った。

T24 細胞をシロ糖添加による高浸透圧ストレスに曝したところ、p62 顆粒とストレス顆粒が別々の構造体として形成されることが分かった。このとき、p62 顆粒の方がより低いストレスに反応して形成された。また、高浸透圧ストレスにより誘導されるオートファジーにより p62 顆粒は分解されたが、ストレス顆粒は分解されなかった。光-電子相関顕微鏡法(CLEM)を用いた微細構造解析では、両顆粒の構成要素やその集中度が異なっていた他、p62 顆粒のみオートファジー隔離膜によって包まれていた。さらに興味深いことに、p62 顆粒の近傍にはプロテアソームが局在していた。

以上から、高浸透圧ストレス下で形成される p62 顆粒とストレス顆粒は形成・分解様式および形態などの点から異なる性状を持つ MLO であることが明らかになった。また、p62 顆粒はオートファジー及びプロテアソーム両者の分解プラットフォームとして機能している可能性が示唆された。

腸管神経系の腸管内容センシング機構における表皮型脂肪酸結合タンパク質発現

○鈴木良地¹、大和田祐二²、板東良雄¹、
秋田大学大学院医学系研究科 形態解析学・器官構造学講座¹、
東北大学大学院医学系研究科 器官解剖学分野²

我々は長鎖脂肪酸との結合をもつ表皮型脂肪酸結合タンパク質(Epidermal fatty acid binding protein: EFABP)の腸管粘膜免疫組織であるマウスパイエル板における発現とその機能を検討してきた。この過程で、小腸粘膜上皮内に EFABP 発現細胞が見られることに気付いた。これらの細胞は紡錘形で腸管腔内に先端を露出させる上皮下に突起を伸ばしている。PGP9.5 と EFABP の蛍光二重染色により、EFABP 陽性細胞の上皮下の突起近傍に神経線維があることが確認できた。これらの特徴から、この細胞は enteroendocrine cell (EEC) であると予想された。EEC は腸管内の物質を感知し、粘膜下の内在性求心性神経: Intrinsic primary afferent neurons (IPANs) に対して 5-HT を放出する。IPANs により筋層間神経叢内の介在神経が興奮することで物側から肛門側への腸管蠕動が駆動される。EFABP との親和性が確認されているオレイン酸(Oleic acid: OA)とパルミチン酸(Palmitic acid: PA)を経口投与後、上記細胞の EFABP 蛍光免疫染色の蛍光強度を測定した。EFABP 蛍光強度は対照群に対し OA 群はやや強く、PA 群はやや弱い傾向にあった。このことと腸管蠕動との連動を仮定すると、蠕動による抗原の送り込みと粘膜下の免疫系への抗原提示が、EFABP 発現を介して連動する。腸管内抗原環境はパイエル板の影響を受けるので、全体で腸管内抗原環境の恒常性維持機構として機能する可能性がある。(COI:No)

ラット肺胸膜の葉状神経終末におけるグルタミン酸分泌関連タンパク質の局在

蜂矢侑可、横山拓矢、中牟田信明、山本欣郎
岩手大・農・獣医解剖学

【背景・目的】ラットの肺胸膜には、葉状の感覚神経終末があり、肺伸展刺激を受容すると考えられている。本研究では、肺胸膜の感覚神経終末におけるグルタミン酸の分泌機構を免疫組織化学により検索した。

【方法】Wistar Rat(3~8 週齢)を灌流固定後、肺を採材した。その後、肺実質を可能な限り除去し、肺胸膜のホルマウント標本を作製した。小胞膜タンパク質である Synaptophysin (Synp)、小胞性グルタミン酸トランスポーター2 (VGLUT2)、開口分分泌に関与する SNARE タンパク質 (SNAP25、Syntaxin 1、VAMP2) および小胞 Ca²⁺センサーである Synaptotagmin 1(Syt1)に対する抗体を用いた二重蛍光抗体法により免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

【結果】Synp は、肺胸膜葉状神経終末の軸索および軸索末端部で陽性反応を示した。SNARE タンパク質のうち、SNAP25 および Syntaxin 1 は、軸索および軸索末端部の広範囲で陽性反応が認められ、末端部では一様な反応を示した。VAMP2 は、葉状神経終末の軸索末端部で陽性反応が認められ、顆粒状の反応を示した。この反応は一様ではなく、一部の末端部で反応が見られた。Syt1 は、軸索末端部に局在して陽性反応が認められ、特に、辺縁部で強く、反応は一様ではなかった。また、VGLUT2 は、軸索末端部で陽性反応を示した。特に辺縁部で強く反応が見られた。

【考察】肺胸膜に分布する葉状の感覚神経終末では、Ca²⁺濃度の上昇に応じて、主に末端部から遠心性にグルタミン酸を開口分泌している可能性がある。(COI:No)

DGKε欠損マウスに認められる脂肪組織の変化

中野 知之、鈴木亜也子、後藤 薫、山形大・医・第二解剖

我々は、ε型ジアシルグリセロールキナーゼ(DGKε)-KO マウスを高脂肪食で飼育すると、40 日で精巣上体(内臓)白色脂肪組織において脂肪蓄積が亢進し、耐糖能が悪化すること、180 日では精巣上体脂肪組織の脂肪蓄積が減少し、耐糖能が大きく改善されることを報告してきた。しかし、他の脂肪組織の変化は不明のままであり、本研究では、高脂肪食給餌における DGKε欠損マウスの精巣上体白色脂肪組織、皮下脂肪および褐色脂肪組織の変化について報告する。高脂肪食給餌 40 日において、DGKε-KO マウスの皮下脂肪および褐色脂肪組織の相対重量は、精巣上体脂肪と同様、野生型マウスに比べて増加していた。褐色脂肪組織においては、褐色脂肪マーカー UCP1 免疫陽性を示す単細胞性脂肪滴を有する細胞が増加していた。180 日の高脂肪食給餌において、DGKε-KO マウスの精巣上体脂肪組織の相対重量は野生型に比べて減少するが、皮下脂肪組織では減少せず、褐色脂肪組織は増加していた。本研究の結果、DGKε-KO マウスにおける 40 日の高脂肪食給餌による脂肪蓄積は全身性に生じ、180 日給餌では、DGKε-KO マウスの精巣上体白色脂肪組織は野生型と比べて減少するが、ベージュ脂肪細胞が増加することが明らかとなった。褐色脂肪組織では、相対重量は増加するが、UCP1 陽性単細胞性脂肪滴を有する細胞の増加、すなわち白色化が進行していた。これは褐色脂肪細胞の活動性が低いことを示唆し、DGKε-KO マウスの耐糖能の改善に、褐色脂肪組織が寄与する可能性は低いと考えられ、精巣上体脂肪組織で生じたベージュ化によるものであることが示唆された。(COI:No)

ラット生後発生過程における胃 Aromatase の発現機構の解明

○小林 裕人¹、内藤 輝²
山形大・医・解剖¹
東北文化学園大・医療福祉・理学療法²

ラット胃壁細胞は Aromatase を有し、多量のエストロゲンを産生している。胃の Aromatase は生後 20 日齢頃から発現し始めるが、その制御因子や制御機構については明らかとなっていない。本研究は形質転換成長因子(Transforming growth factor α; TGFα)に着目し、ラット生後発生過程における胃 Aromatase の発現機構の解明を目的とした。哺乳中の Wistar 系雄ラットに対し TGFα を腹腔内投与した結果、胃粘膜上皮中の Aromatase mRNA 発現量、タンパク質量と共に、リン酸化 ERK が有意に増加した。また、胃粘膜上皮中の TGFα 抗体陽性細胞は Aromatase 同様、生後 20 日齢頃から胃底腺峡部に顕著に発現し始めた。ヒト胃癌由来細胞株 MKN45 の培養液に TGFα を添加したところ、濃度依存的に Aromatase mRNA 発現量が増加した。以上の結果から、ラット授乳期における胃の Aromatase 発現は胃粘膜に発現する TGFα が起因となり、MAPK シグナル伝達により制御されている可能性が示された。(COI: No)

ラット副腎髄質における細胞外 ATP 分解酵素 NTPDase2 の局在および ADP によるクロム親和性細胞の興奮調節

○横山拓矢¹、前澤五月²、山本欣郎¹、平川正人³、佐藤健一²、齋野朝幸³
¹岩手大学農学部共同獣医学科獣医解剖学研究室、岩手医科大学²歯学部口腔顎顔面再建学講座歯科麻酔学分野、³解剖学講座細胞生物学分野

副腎髄質はクロム親和性細胞とグリア様支持細胞からなる。神経系のグリア細胞は NTPDase2 により細胞外 ATP を ADP に分解することから、支持細胞も NTPDase2 を発現する可能性がある。本研究では、副腎髄質における NTPDase2 の局在と ATP 分解活性を生物発光法により解析し、クロム親和性細胞の細胞内 Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) に対する ADP の作用を解析した。

ラット副腎髄質の NTPDase2 陽性細胞は細胞質突起を伸ばし、クロム親和性細胞に接していた。NTPDase2 陽性細胞は GFAP・100B 陽性反応を示す支持細胞であった。細胞外 ATP の分解率は NTPDase 阻害によって減弱し、NTPDase2 陽性細胞による ATP 分解活性が薬理的に示唆された。クロム親和性細胞は小胞型ヌクレオチド輸送体および P2Y12 陽性反応を示し、開口放出された ATP は NTPDase2 陽性細胞によって ADP に分解され、ADP は P2Y12 を介してクロム親和性細胞に作用することが推測された。非特異的 ACh 受容体作動薬 Carbachol (CCh) と ADP の併用投与によってクロム親和性細胞の [Ca²⁺]_i 上昇が抑制された。また、CCh による [Ca²⁺]_i 上昇は P2Y12 受容体の活性化によって抑制された。以上の結果から、副腎髄質のグリア様支持細胞は NTPDase2 を発現し、クロム親和性細胞由来の ATP を分解することが示唆された。ATP の分解産物 ADP は、P2Y12 受容体を介してクロム親和性細胞の興奮を負のフィードバック調節している可能性がある。(COI:No)

11 ラット頸動脈小体におけるシナプシンの免疫組織化学的分布

○齋藤優気, 横山拓矢, 中牟田信明, 山本欣郎
岩手大・農・獣医解剖
岩手大院・獣医・動物基礎医学

頸動脈小体の感覚神経終末は、化学受容細胞から伝達を受けるだけでなく、グルタミン酸を化学受容細胞へ向けて放出することが予想されている。また、中枢神経系ではシナプス前細胞において、シナプシンが分泌小胞の予備プール形成・動員に関与する。本研究では、頸動脈小体におけるシナプシンの分布を免疫組織化学により解析した。

材料には Wistar ラットを使用し、頸動脈小体の凍結切片を作製した。シナプシンⅠ、リン酸化シナプシンⅠに対する抗体、感覚神経終末のマーカーとして P2X2 ATP 受容体と小胞グルタミン酸輸送体(VGluT2)、自律神経線維のマーカーとして小胞モノアミン輸送体(VMAT2)、小胞アセチルコリン輸送体(VAChT)に対する抗体を使用し、多重蛍光抗体法により標本を作製後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

シナプシンⅠおよびⅡの陽性反応は線維状の陽性反応として観察され、分布は類似していた。一部のシナプシン陽性反応は、P2X2 陽性感覚神経終末に局在していた。感覚神経終末内では、VGluT2 の陽性反応が強く観察される、化学受容細胞に接する部位や軸索の膨腫した部位に強く観察された。また、細胞集塊や毛細血管の周囲に分布する交感神経線維・副交感神経線維にシナプシンの強い陽性反応が観察された。化学受容細胞にも陽性反応は観察され、一部の細胞では強かった。リン酸化シナプシンⅠの点状の陽性反応は感覚神経終末やその膨腫部に一致していた。

頸動脈小体においてシナプシンは、感覚神経終末・化学受容細胞の小胞の予備のプール形成・動員調節に関与することが予想される。

12 ヒト顔面のリンパ管系の構築

千葉智博¹⁾、下田 浩¹⁾、板井菜緒²⁾、ガントゥムル エンフトール²⁾、加治屋健太郎²⁾

¹⁾ 弘前大学大学院医学研究科 生体構造医科学講座
²⁾ (株) 資生堂 みらい開発研究所

【目的】顔はヒトの外面的アイデンティティをなす領域であり、近年リンパ管系がその健康と美を制御する器官として注目されている。また、その構築を把握することは頭頸部領域の疾患の治療戦略や合併症対策を考える上で重要である。しかし、マイクロレベルまで統合されたヒト顔面のリンパ管系の構築は不明である。本研究の目的はリンパ管ニッチを含めたヒト顔面のリンパ管系の地図を確立することである。

【方法】本研究は弘前大学大学院医学研究科倫理委員会の承認(2021-039)を得て行われた。弘前大学医学部にご献体された解剖体3例において頭頸部のリンパ管の解剖を行った後、同部の皮膚と皮下組織のホルマリン固定試料と組織切片を作製し、リンパ管と血管の内皮細胞マーカーを中心に免疫染色を行い、顕微鏡下で観察を行った。

【結果】顔面のリンパ管は皮膚及び筋膜に分布する毛細血管網周囲から起始するものが多く、毛細血管網に続く静脈の周囲で毛細リンパ管と集合リンパ管から成るメッシュワークを形成しながら静脈に沿って下行し、静脈角の近傍で数条の頸リンパ本幹に収束していた。また、咀嚼筋では筋性部に迷路状の毛細リンパ管のネットワークが発達し、臍性部で集合リンパ管として静脈周囲リンパ管網に移行していた。加えて、動脈と神経に沿うリンパ管は各々動脈から静脈へ分布する vasa vasorum と神経上膜を走る静脈を介して静脈周囲リンパ管網に連絡していた。

【結論】本研究所見は顔面・頸部のリンパ管の発生と形態形成、ならびに同部の病態生理と臨床的対応を理解するための重要な構造的基盤を与えている。

13 人工三次元血管への周皮細胞の接着条件の探索と応用

○渡邊 誠¹⁾、和栗 裕貴²⁾、齊藤 絵里奈³⁾、下田 浩^{1,3)}

弘前大・院医・生体構造医科学¹⁾、弘前大・院医²⁾、弘前大・院医・神経解剖/解剖組織学³⁾

【背景・目的】細胞集積法を用いたヒト生体組織形成技術は、皮膚由来線維芽細胞(NHDF)層内に血管内皮細胞(HdVEC及びHUVVEC)による立体的な血管網を構築可能である。本研究では、ヒト脳血管由来周皮細胞(PC)が被覆する血管構造の構築を試みた。

【方法】①混合したVECとPCをNHDF層間に挟み、ECM成分のラミニン、IV型コラーゲンを添加して7日間培養し、立体血管組織を作製した。血管網をCD31、PCをデズミンに対する免疫染色により検出した蛍光像およびTEM画像により、両者の接着状態を解析した。

②組織にサイトカイン(EGF、FGF、PDGFB)を添加して同様に解析し、効果を評価した。

③事前に共培養したVECとPCをNHDFと混合して立体血管組織を作製した。

④人工血管組織が高血糖による血管障害モデルとなりうるか、異なるグルコース濃度下で血管へのPC接着を評価した。

【結果】①ラミニン添加により血管網に接着するPCが増加した。IV型コラーゲンはラミニンとの共存下でもPC接着抑制を示した。②PDGFβ添加によりPC接着が促進された。

③血管網とPCの密着度が高まり、TEM像においてVECに接着するPC周囲に豊富なECMが存在し、基底膜様構造を成すのが観察された。④高血糖条件下でPCの血管への接着が阻害されることを確認した。

【考察】人工血管組織へのPCの接着には、ECM成分、サイトカインが時間的空間的に適切に供給される必要があることが確認された。また、PC接着血管は糖尿病による血管障害モデルとして利用できる可能性が示された。(COI:No)

14 Immunohistochemical characteristics of intraepithelial mast cells in the rat larynx and trachea

○Sayed Sharif Abdali, Takuya Yokoyama, Yoshio Yamamoto, Keishi Narita, Hitomi Akutsu, Masato Hirakawa and Tomoyuki Saino.

The aim of the present study was to investigate the cellular morphology and distribution of intraepithelial mast cells (IeMCs) in the rat larynx and trachea by immunohistochemistry.

Larynx and trachea of male Wistar rats were subjected to either section or whole-mount immunohistochemistry. Immunohistochemical analysis for serotonin (5-HT) and c-kit, a mast cell marker, revealed that 5-HT- and c-kit-immunoreactive mast cells were broadly distributed within the epithelia and connective tissue in the larynx and trachea. The density of IeMCs was higher in the glottis and rostral part of the trachea compared to the epiglottis, medial and caudal parts of the trachea. IeMCs appeared variform with long cytoplasmic processes, whereas connective tissue mast cells (CTMCs) were round in shape and lacked cytoplasmic processes. Tryptase, major histocompatibility type 2 protein and histamine, the mediators of mast cells, were mainly found in CTMCs, but not in IeMCs. In conclusion, the present study showed that variform IeMCs were densely distributed in the rat larynx and trachea. These IeMCs resident in the larynx and trachea may function in triggering a rapid innate immune response against inhaled antigens.

15 大脳基底核の線条体黒質投射と並列な興奮性投射を形成する新規ニューロンの発見

平井康治, 藤山文乃
北海道大学医学研究科 解剖学分野・組織細胞学

げつ菌類の大脳基底核において、これまで知られていなかった新規のニューロンタイプを見出したので、現時点までの調査結果を報告した。

大脳基底核の線条体・淡蒼球(外節)を構成するニューロンはその殆どがGABA作動性の抑制性ニューロンであり、それ以外の少数もほぼアセチルコリン作動性ニューロンであると理解されている。しかしながら我々は、特に線条体・淡蒼球の尾側側頭部において、これらの脳領域に存在する既知のニューロンタイプのマーカーとなる物質を全く持たないニューロンが、少数分布していることを免疫染色で確認した。これらのニューロンは興奮性と考えられ、実際に興奮性ニューロンでCreを発現するトランスジェニックマウスを用いることで選択的な標識に成功した。これらのニューロンの軸索は主に黒質の外側部に投射されており、そのプトンでは興奮性シナプスマーカーへの免疫染色シグナルが実際に見られた。尾側側頭部における線条体直接路ニューロン、間接路を担う淡蒼球の投射ニューロンは共に黒質外側部に多く軸索を送っていることから、抑制性ニューロンによって構築される直接路・間接路と並行して、この新規ニューロンタイプによる興奮性の情報伝達経路が存在していることが示唆された。この結果は大脳基底核回路モデル再考の必要性を示唆する大きな所見となっている。

16 Evaluation of anterograde trans-synaptic labeling on nigrostriatal projections

Yang Yang, Fuyuki Karube, Yasuharu Hirai, Fumino Fujiyama
Laboratory of Histology and Cytology
Graduate School of Medicine, Hokkaido University

The substantia nigra pars compacta (SNc) DA neurons intensively project to the striatum with dense axon collaterals. It is well known that timing and spatial extent of DA release controls motor behavior and reinforcement learning; however, due to dense axon collaterals of SNc DA neurons and volume transmission nature of DA, it is yet uncovered relationship between DA neuron types and striatal neurons innervated by the DA neurons. It will be useful to visualize both DA neurons and their putative targets simultaneously. Here, we use the serotype 1 of adeno associated viral vector (AAV1), which is discovered as being transported anterogradely in a trans-synaptic manner. After AAV1-hSyn-Cre injection to SNc, expression of Cre was observed in the striatal neurons, including interneurons as well as medium spiny neurons (MSNs). After one week from AAV1 injection to SNc, AAV-flex-mCherry and AAV-flex-GFP were injected to SNc and striatum respectively. Using immunofluorescent staining for several transporters of neurotransmitters, we confirmed almost all of labeled axons in the striatum expressed dopamine transporter (DAT), indicating their dopaminergic nature. In the striatum, choline acetyltransferase (ChAT) or parvalbumin (PV) expressing interneurons were more frequently expressed Cre than others. Finally, according to the result mentioned above, the labeled striatal neurons were analyzed to observe subcellular localization of appositions of DAT-expressing axonal boutons. In some interneurons, including cholinergic neurons, a single DAT-expressing axons formed multiple appositions on the soma and proximal dendrites. It suggests that irrespective of diverse and dense axonal arborization of a single SNc DA neurons, a small number of DA neurons could have large effect on single striatal neurons.

17 ラット淡蒼線核における小胞型ヌクレオチドトランスポーターおよびATP受容体の分布

○芹沢里紗、横山拓矢、中牟田信明、山本欣郎
岩手大・農・獣医解剖

分時呼吸回数増加には、淡蒼線核やC1細胞群が関与することが知られている。また、淡蒼線核にATPを注入すると分時呼吸回数が増加することが報告されている。そこで、淡蒼線核およびC1細胞群におけるATPの作用基盤を検討するために、ATPの小胞輸送蛋白である小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)およびATP受容体(P2X2、P2Y1)の分布を検討した。

【材料と方法】Wistarラットを4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、延髄を採材した。凍結切片をVNUT、P2X2、P2Y1、DBH(カテコールアミン作動性神経のマーカー)、TPH2(セロトニン作動性神経のマーカー)、S100B(星状膠細胞のマーカー)に対する抗体を用い、多重間接蛍光抗体法で染色し観察した。

【結果】淡蒼線核の腹側部に、強い点状のVNUT反応が認められた。また、VNUT陽性反応はDBH陽性を示した。淡蒼線核のVNUT陽性反応はTPH2陽性細胞および樹状突起に接しており、TPH2陽性細胞には点状のP2X2陽性反応を示した。A1/C1細胞群では、DBH陽性神経細胞はVNUT陽性反応であった。また、P2Y1陽性反応が、星状膠細胞に認められた。

【考察】淡蒼線核内のセロトニン作動性神経細胞のP2X2は、C1細胞群に由来する神経終末が放出するATPによって興奮することが示唆された。また、星状膠細胞はP2Y1により三者間シナプスを形成する可能性がある。(COI:No)

18 Foxp1プロモーター内に存在するレチノイン酸受容体結合配列の機能解析

向笠勝貴、佐久間千恵、八木沼洋行
福島医大・医・神経解剖

レチノイン酸(RA)は神経系の発生を制御する重要な因子の一つである。中枢神経系の中で、特にRAシグナルが活性化している領域として、線条体と脊髄のlateral motor column neuronが挙げられる。この2つの領域に共通する特徴は転写因子Foxp1が発現することであり、このことから、RAシグナルとFoxp1の関連が予想された。脊髄においては、Foxp1ノックアウトマウスでRA合成酵素Aldh1a2の発現が消失することから、Foxp1がAldh1a2を制御しているということが明らかになっている。一方、RA受容体(RAR)のChIP-seqのデータを解析すると、Foxp1遺伝子座にRARが結合することがわかった。この配列は現在のところまだ機能が明らかではないので、本研究では、このFoxp1遺伝子座に存在するRAR結合配列(以下Foxp1-RBS)の機能解析を行うこととした。公共NGSデータを解析したところ、多くの細胞種において、RA処理によってFoxp1の発現が上昇することがわかった。また、Foxp1-RBSはマウス発生期ではオープンクロマチン状態であり、かつHistone H3K4trimethylationなどの修飾を有していることがわかり、おそらくプロモーターであると考えられた。実際、Foxp1-RBSを含む約2kbの領域についてレポーター解析を行ったところ、プロモーターとしての機能が確認できた。このプロモーター内に位置するFoxp1-RBSの機能を明らかにするために、ゲノム編集技術を用いて、Foxp1-RBSの欠損マウスを作成した。Foxp1-RBS欠損マウスの発生過程の脊髄において、Foxp1の発現を調べたところ、野生型との違いは見られなかった。また、成体の脳の線条体でFoxp1の発現を調べたところ、やはり、野生型と比べ、差が見られなかった。以上の結果から、Foxp1-RBSはFoxp1のプロモーター内に位置し、RARが結合しているものの、正常発生には必要ないことが明らかとなった。(COI:No)

19 ストレスによる海馬のミクログリアへの影響

扇谷昌宏 古部瑛莉子 田中佑典 吉田成孝
旭川医科大学医学部解剖学講座機能形態学分野

The role of microglia in stress responses has recently been highlighted, yet the underlying mechanisms of action remain unresolved. The present study examined disruption in working memory due to acute stress using the water-immersion resistant stress (WIRS) test in mice. Mice were subjected to acute WIRS, and biochemical, immunohistochemical, and behavioral assessments were conducted. Spontaneous alternations (working memory) significantly decreased after exposure to acute WIRS for 2 h. Morphological changes in hippocampal microglia were not observed after acute stress, even when assessing ramification ratios and cell somata volumes. Interestingly, hippocampal tumor necrosis factor (TNF)- α levels were significantly elevated after acute stress, and acute stress-induced TNF- α was produced by hippocampal-ramified microglia. Conversely, plasma concentrations of TNF- α were not elevated after acute stress. Etanercept (TNF- α inhibitor) recovered working memory deficits in accordance with hippocampal TNF- α reductions. Overall, results suggest that TNF- α from hippocampal microglia is a key contributor to early-stage stress-to-mental responses. In this issue, we will also present some of the effects of hippocampal microglia on chronic stress. Mice in the chronic stress group showed increased production of TNF in regions other than the hippocampus. In addition, chronic stress induced activation of Caspase3 at synapses. Normally, apoptotic signals at such synapses are phagocytosed by microglia, but there was no significant increase in microglial synaptic phagocytosis in the chronic stress group. This suggests that synapses that should be eliminated may be left behind due to microglial dysfunction. Thus, there is a close relationship between stress and microglial function.

20 マウス中大脳動脈閉塞再灌流モデルにおける KLK6 の発現変化と虚血脳損傷に及ぼす影響

○古部瑛莉子¹、扇谷昌宏¹、田中佑典¹、吉田成孝¹
旭川医科大学 解剖学講座 機能形態学分野¹

脳梗塞は、世界中で身体障害や死亡の原因となっている主要な疾患の1つである。梗塞には血流が再開しても細胞死を起こすコア領域と機能回復を期待できるペナンプラ領域が生じる。このペナンプラ領域をいかに温存するかが、血流再開後の障害の重症度を決める要素となっている。カリクレイン6(KLK6)は、オリゴデンドロサイトによって産生されるセリンプロテアーゼであり、これまでに脱髄疾患に関与することが知られている。最近我々は、KLK6がマウス中大脳動脈閉塞再灌流モデル(mCAO)のペナンプラ領域で発現が上昇することを発見した。しかし虚血再灌流障害下のKLK6の働きや虚血脳損傷に及ぼす影響についてはまだ明らかでない。そこで、本研究ではマウスmCAOモデルにおけるKLK6の経時的な発現変化と虚血脳損傷に及ぼす影響を検討した。KLK6陽性細胞はmCAO手術後24時間後から5日目にかけて大脳皮質、脳梁、線条体におけるペナンプラ領域で増加し、15日目には減少することが明らかとなった。KLK6発現細胞はAPC陽性成熟オリゴデンドロサイトであった。KLK6-WTとKLK6-KOマウス間でmCAO手術後7日目に脳梗塞体積を比較すると、KLK6-KOマウスで有意に梗塞体積が減少していることが判明した。さらに、再灌流後24時間から15日目にかけて、Clark's neurological scoreおよびローターロードにより運動機能評価を行ったところ、KLK6-KOマウスは再灌流3日目に降KLK6-WTと比較して良好な結果を示した。この研究における一連の結果は、マウスmCAOモデルでの虚血再灌流障害に対するKLK6の潜在的な関与を示している。(COI:No)

21 骨格筋の作用を示す廃物利用平面模型

安田峯生・東北医科薬科大学医学部

近年医学領域で肉眼解剖学教育時間の削減は著しく、教員には教育法の一層の工夫が求められる。今回、廃物を利用して骨格筋の作用を示す平面模型を作製した。材料の主体は段ボールで、補助材として使い捨て弁当箱の蓋などのプラスチック板、梱包などに使われたひも、ビニール袋の口の結紮に使われた細針金を用いた。開発した模型は胸鎖乳突筋、内側・外側翼突筋、内・外肋間筋、方形回内筋、内閉鎖筋である。模型の線描型紙を段ボールに貼り付け、可動部を切り抜く。可動部は以下基板と述べる。可動部と基板の関節運動の軸となる部に孔を開け、細針金を曲げて作った割ピンで可動部を基板に止める。この際、可動部は軸の周囲で回転できるようにする。筋の停止部にひもの一端を固定する。筋の起始部にはひもが通る孔を開け、ここにひもの自由端を通す。方形回内筋のように可動部の運動軸が可動部の外になる場合には、可動部にプラスチック板を貼り付け、これに回転軸となる孔を開ける。内閉鎖筋のように筋が途中で走行を変える場合には、変曲部に孔を大きくした割ピンを立て、これにひもを通す。模型の筋起始に相当するひもを引くことで、筋収縮によりどのような筋停止の運動が生じるかを理解できる。このような模型を自作することで、学生は筋の作用がその起始、停止、走行、関係する関節の形態により決まるという原則を体感することができる。

23 系統樹から見る魚の脊椎骨の組織学的解析と分類

祖父江尚哉¹、古田智絵²、吉川修司²、山田加一朗²、渡邊敬文¹、細谷実里奈¹、高橋直紀¹、○植田弘美¹
酪農学園大・獣医・解剖学¹、(地独)道立総合研究機構食品加工研究センター²

【背景と目的】道立食品加工研究センターでは“骨まで食べられる水産加工品”の開発に取り組んでおり、その一環として魚骨の脊柱を構成する脊椎骨を組織学的に検索した。本研究では得られた結果を魚種間で比較検討すると共に、系統樹と照らし合わせ魚の進化における脊椎骨の構造変化を解析した。【材料と方法】市販の魚種(17目34種類)を用い、脊柱の腹椎骨を採取した。10%ホルマリン液で固定、ギ酸・クエン酸ナトリウム液で脱炭化した後、パラフィン切片を作製し3種類の染色法(H-E染色、AB pH1.0染色、アザン染色)を施し、組織学的に検索した。【結果と考察】全ての魚種で椎体の中心部に砂時計型を呈した孔が認められ、その孔には脊索がみられた。椎体はその中心部から背側と腹側に伸び出した突起ないし骨梁により形成され、サメは太い軟骨組織の突起より構成されていた。サケやイワシなどでは背腹に伸びた突起はそれぞれ二分し、その二分した突起の間に軟骨組織を有していた。骨梁は枝を出しながら放射状に伸び格子構造を形成しているものや、隣接する細い骨梁同士が互いに結合し網目構造を形成するものも認められた。使用した魚を系統樹に当てはめると、系統学的に近い種同士は類似の構造を持ち、また、軟骨魚類であるサメや硬骨魚類でもサケやイワシなど系統学的に古い魚種では、椎体に軟骨組織が残存していることが分かった。椎体の中心部より伸び出した骨梁は、系統学的に新しい魚種ほど隣接するもの同士が結合し網目構造を形成する傾向にあり、脊椎骨内部の組織構造も魚の進化の過程で一連の変化を伴いながら進行することが推察された。(COI:No)