

第80回北海道医学大会生理系分科会

会 期：平成12年9月9日（土）

会 場：北海道大学学术交流会館

当番幹事：北海道大学大学院獣医学研究科比較形態機能学講座 葉原芳昭

参 加 者：50名

今回は、地方会の活性化を目論み、一般演題に加えてポスター発表と35歳以下の主に大学院生による若手シンポジウムを新たに企画した。総演題数は24で活発な質疑応答が行われた。次期当番幹事は北海道大学統合生理学講座時間生物学教室となった。

1. 三叉神経の電気刺激により誘発される小脳皮質内因性光シグナルの検討

村井恵良¹，根本正史²，田村 守²，赤池 忠¹（¹北大歯生理，²電子研超分子分光）

三叉神経末梢を電氣的に刺激し、小脳表面において感覚入力を契機として生じた内因性光シグナルを観察した。雄Wistar ratを用いchloralose麻酔下で両側後頭部小脳背部の骨を削り、thinned skull windowを作成した。頬部・口唇に針電極を刺入し0.1-2mA（500ms），5Hz，5～10回の刺激を行い、577及び605nm（各々oxyhemoglobin，deoxyhemoglobin優位の吸収波長）の光を照射し、反射光変化としてのシグナルをDeltaron 1700（FUJIX）にて検出した。結果は、両側の小脳において、刺激開始より1秒以内に、ほぼ同時に577nmで吸収増大、605nmで初期に吸収増大後大きく減少、ともに数秒でbaselineに戻る経過を示し、大脳皮質と同様、神経活動に伴う局所的血流増大によるhemoglobinsの濃度と酸化状態の変化に由来するものと考えられた。さらに、その後の数十秒間、両波長において強度で広域にわたる吸収変化の逆転が観察されることがあり、神経活動に対応した血流上昇後に、血流が大きく抑制される現象も生じ得ることが推測された。

2. サル前頭眼野領域電気刺激によって誘発される眼球運動の方向特性

鈴木康夫¹，新明康弘²，福島菊郎¹（北大医・¹統合生理学認知行動学，²眼科）

視標誘導サッケードの方向と大きさを運動の開始点に関連しないベクトルとしてコードしている神経細胞が頭部を固定したサルの前頭眼野領域で報告されている。今回我々は、直立時では一致している空間、頭部、眼球座標を前額面での静的頭部傾斜とその際に生じる眼球反対回旋を用いて分離し、空間内での回旋頭位と眼窩内での回旋眼位がこ

の領域が眼球運動に関して有する方向特性にどのように関与しているのかを、覚醒二ホンザル1頭を対象に検討した。右前頭皮質にて視標誘導サッケード関連細胞活動を記録し前頭眼野領域を同定し、その領域内の10個所で皮質内微小電気刺激を行った。微小電気刺激により、水平成分が刺激の反対側へ向かう眼球運動（平均振幅0.6°～6.7°）が誘発された。頭部座標における誘発眼球運動の方向は、前額面での静的頭部傾斜（±60°）によって、80%（16/20）が有意（ $P < 0.05$ ，t-test）に眼球の反対回旋方向に回転していたが、眼球の反対回旋を考慮した眼球座標においては、65%（13/20）が、有意（ $P < 0.05$ ，t-test）の回転ではなかった。これらの結果から、前頭眼野領域の微小電気刺激により誘発される眼球運動の方向の大部分は眼球座標でコードされていることが示唆された。

3. 滑動性追跡眼球運動と前庭眼反射の干渉により誘発される適応学習（cross-axis前庭眼反射）の潜時と誤差信号

福島菊郎¹，山野辺貴信¹，新明康弘¹，福島順子²，Sergei Kurkin³（¹北大大学院医学研究科統合生理学講座，²北大医療短大，³科学技術振興事業団）

運動学習の脳内機構を調べる目的で、眼球運動課題を訓練したサルを用い、前庭回転刺激とスポット刺激を直交軸で与える訓練を繰り返すと、回転刺激単独により、本来出現しない直交成分の眼球運動応答が、訓練後に、課題に対応して誘発され、その潜時は正常の前庭眼反射よりも長い（Fukushimaら1996, 2000；Satoら1999）。この適応性応答の性質をさらに調べるため今回、1）適応性応答の潜時は訓練課題に依存するか、2）誤差信号として網膜スリップが必要かどうかの2点を調べた。頭部を固定した二ホンザル3頭を用い、1）の実験のためレーザースポットによる垂直方向の連続的な視標運動を水平回転刺激（0.5Hz、

± 10度) に対して同位相, 位相遅れ90度あるいは進み90度で加えた. それぞれの課題訓練を60分間行わせ, その前後に完全な暗室下で回転刺激のみによる眼球運動応答を調べ, さらに回転刺激を台形波状に与えて応答潜時を調べた. 2) 網膜スリップを起こさせない視標刺激を与えるため, サルの眼前に8個の高輝度LEDを水平に等間隔に配置し, 各LEDを10μsecのみ点灯し, 垂直回転と同位相で運動させた. 結果として, 1) 適応性応答の潜時は訓練課題に依存し, 平均25~71msまで変化した. さらに, 2) この課題による適応性応答は網膜スリップを起こさせない条件下でも生じ, その性質は, 連続的なスポット運動により誘発される応答と同様であった.

4. 黒質網様部から中脳ドパミン細胞への抑制性投射におけるGABA_A, GABA_B受容体の関与

齋藤和也, 高草木薫(旭川医大・第二生理), 伊佐 正(生理学研究所・統合生理研究施設)

Wistar ratの脳幹in vitroスライス標本を用いて, 黒質網様部(SNr)の電気刺激に対する中脳ドパミン細胞群の抑制性応答をホールセルパッチクランプ法にて解析した. ホールセル記録時, (1) 過分極パルス通電時の異常内向き整流特性(Ih), (2) 脱分極時の一過性外向き電流(IA)などによりドパミン作動性ニューロンであると同定した. CNQX 5μM, APV 50μM存在下にて, SNrへの単発刺激は早いIPSP/IPSCを, そして20Hz以上の高頻度(10~40pulses)連続刺激は, 早いIPSP/IPSCに加えて数百ミリ秒~1秒程度持続する遅いIPSP/IPSCを誘発した. 早いIPSP/IPSCはGABA_A受容体の拮抗薬であるBicuculline(30μM)の投与で消失したが, 遅いIPSP/IPSCはBicucullineに抵抗性で, GABA_B受容体の拮抗薬であるCGP35348(100nM)の投与で消失した. 以上の結果から(1) SNrから中脳ドパミン細胞群に対して抑制性入力が存在する.(2) この抑制性入力にはGABA_AおよびGABA_B受容体の両方が関与する,(3) これら二種類の抑制作用は腹側被蓋野(A8), 黒質緻密部(A9), 赤核後領野(A10)の各々に存在するドパミン細胞に共通して認められる, ことが明らかとなった.

5. 基底核 脳幹系による歩行と筋緊張の制御様式

高草木薫, 齋藤和也, 佐藤栄一, 坂本尚志(旭川医大第二生理)

基底核は視床大脳投射系および脳幹への投射系を介して運動を調節する. 本研究では, 基底核の出力核である黒質網様部(SNr)から脳幹への投射系が歩行と筋緊張をどの様に制御するのかを検討した. 実験には除脳ネコを用いた.

中脳歩行誘発野(MLR)に加えた電気刺激(50Hz, 10~40μA)により誘発される歩行運動は, SNrへの条件刺激(100Hz, 10~60μA)によって抑制された. その際, 条件刺激を増大させると, 歩行を開始するまでの潜時が延長し, 歩行のcyclic timeも延長した. またSNrへの条件刺激は脚橋被蓋核(PPN)への電気刺激(50Hz, 10~40μA)により誘発される筋緊張の抑制作用にもブロックした. さらに, これらSNrへの刺激効果は, MLRやPPNそれぞれにGABA拮抗薬(bicuculline, picrotoxin)を微量注入(2~5mM, 0.1~0.25μl)すると完全にブロックされた. また歩行運動を抑制する領域はSNrの内側~中央部に, 筋緊張を制御する領域は外側のSNrおよびその背側部にそれぞれ局在していた. これらの成績は, SNrから脳幹へのGABA作動性投射系が歩行と筋緊張の制御に関与すること, そして, この投射系には機能的topographyが存在することを示唆する. 従って基底核疾患における運動機能の異常がSNrから脳幹へのGABA作動性投射の機能障害により誘発されると考えられる.

6. 血管内皮細胞の透過性変化における細胞内Ca²⁺とMAPキナーゼの役割

丹羽光一¹, 稲波 修², 太田利男³, 桑原幹典², 狩野猛¹(北大・¹電子研, ²獣医放射線, ³獣医薬理)

血管内皮細胞は, 血液から血管壁への物質透過性を調節する機能を持つが, 透過性変化の細胞内情報伝達機構は良く分かっていない. 本研究では, 過酸化水素負荷によるウシ肺動脈由来内皮細胞の透過性変化に細胞内Ca²⁺及びMAPキナーゼが関与しているか否か, またその際の情報伝達機構について検討を行った.

過酸化水素1mMの添加により, デキストラン(分子量4万)に対する内皮細胞の透過性が上昇した. このとき細胞内Ca²⁺濃度の増加およびMAPキナーゼ(p38及びERK)の活性化が認められた. 過酸化水素による透過性上昇は, BAPTA-AM及びp38阻害剤であるSB203580により抑制されたが, ERK阻害剤であるPD90859では抑制されなかった. また, p38の活性化は, BAPTA-AMによる影響を受けなかった. 以上の結果から, 過酸化水素による内皮細胞の透過性上昇には, 細胞内Ca²⁺濃度の上昇及びP38の活性化が関与しているが, ERKは関与していないこと, およびP38の活性化は細胞内Ca²⁺に依存しないことがわかった.

7. 抗アポトーシス因子Bcl-2のラット心筋での発現

小山富康, 鈴木淳一(北大, 札教大)

Bcl-2の過剰発現は腫瘍細胞の細胞死を抑制して腫瘍を

増大させ、自己免疫非寛容性リンパ球を放任して致命的な自己免疫疾患を招く。他方必要な細胞を死の淵から救うことも想定される。しかしその発現機序は不明である。我々はラット心筋の虚血再灌流により Bcl-2 が広範囲に出現することを観察した。エーテル麻酔下に開胸し、左冠動脈を結紮した。45分経過後結紮を解除・再灌流し、閉胸して覚醒させ4時間維持した。対照擬手術群には結紮を除き全て同じ手技を施した。ついで軽い麻酔下に断頭して心臓を摘出し抗 Bcl-2 抗体染色と、DNA 断裂を示す TUNEL 染色とにより組織学的に検討した。全断面積の 20% 弱の TUNEL 染色反応部では Bcl-2 の染色は消失したが、外側の全領域で心筋の細胞核ならびに細胞質に擬手術群よりもはるかに強い Bcl-2 免疫染色が得られた。アポトーシス発生を示す領域の外では細胞救済に向けての機作が発動すると推定された。同時に Bcl-2 が確実に発現するモデルとして、Bcl-2 発現機序を研究する手掛かりを与えられると思われる。

8. ラット心筋における T 管の発達と細胞内 Ca^{2+} 動態の変化

関 純彦, 山田陽一, 筒浦理正, 當瀬規嗣 (札幌医大・医・第一生理)

成熟心筋の収縮時には急峻な Ca^{2+} トランジェントが観察される。これは T 管の電位依存性 Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入が即座に筋小胞体の Ca^{2+} 放出を誘発するためと考えられている。一方、胎生期心筋の細胞内 Ca^{2+} 動態は全く知られておらず、この機構が、いつどのように完成するのは全く不明である。そこで、胎生期から成体までの T 管の発達と細胞内 Ca^{2+} 動態の変化を観察した。

方法：胎生 12 日目から成体までの各発達段階におけるラット心筋を単離し、 Ca^{2+} 蛍光指示薬 fluo-3、または細胞膜感受性色素 di-8-ANEPPS を負荷した。共焦点レーザー顕微鏡にて蛍光強度変化を観察した。

結果：胎児心筋の Ca^{2+} トランジェントは、立ち上がりで消退が非常に遅く、成体とは全く異なっていた。この Ca^{2+} トランジェントは、タブシガルギンやリアノジンによって抑制された。胎生期には T 管は認められず、その発達は出生数日後から観察された。

結論：筋小胞体自体は胎生期にすでに機能していることが示唆された。急峻な Ca^{2+} トランジェントの形成には、T 管の発達が重要な役割を果たしていると思われ。

9. 心拍変動の 24 時間リズム；内因性リズムと睡眠依存性

角田美保子, 遠藤拓郎, 橋本聡子, 本間さと, 本間研一

(北大統合生理学)

心拍変動のスペクトル解析によって得られる LF 値や HF 値は、自律神経系の活動を反映する指標として広く用いられている。本研究では心拍変動の 24 時間リズムの成因を明らかにする目的で 照度および呼吸数による心拍変動への影響、体位による影響、睡眠段階と心拍変動との関連、時間帯の差異による心拍変動の変化、の実験を行なった。健康成人 10 名を対象とし、居住型隔離実験室でおこなった。被験者には呼吸の影響および照度の影響の他、体位の影響を見る bedrest 実験を行った。睡眠ポリグラフィによる脳波測定のほか、携帯型自動心拍・血圧計を用いた心拍の 72 時間連続測定を行なった。その結果、呼吸回数が多くなるほど HF 値が低く、照度は高くなるほど LF/HF 値が高くなった。夜間睡眠では REM, NREM 睡眠時ともに LF 値および HF 値が高く、SWS 時に LF/HF 値が低かった。体位による影響は見られなかった。昼間睡眠では夜間睡眠に比較し、睡眠段階にかかわらず NREM 睡眠時に HF 値は低かった。心拍変動は睡眠のみならず内因性リズムにも依存している可能性がある。

10. ラット生物時計における振動細胞間リズム同調：マルチ電極ディッシュによる解析

中村 涉^{1,2}, 本間さと¹, 白川哲夫², 小口春久², 本間研一¹ (¹北大統合生理, ²北大口腔機能)

哺乳類の生物時計、視交叉上核では個々の神経細胞が固有周期のサーカディアン振動体を持つ。しかし、個々の細胞がリズム情報を伝達し同調リズムを発振するメカニズムは不明である。

本研究ではマルチ電極ディッシュ上でラット視交叉上核を器官培養し、培養 10 日～30 日の間神経核内の様々な部位から同時に自発発火頻度を連続記録することにより、視交叉上核の細胞構築と神経細胞間のサーカディアンリズム同調機構について検討した。

同一培養視交叉上核内の神経活動は異なる部位においてもほぼ同じ周期のサーカディアンリズムを示した。神経活動リズムのピークは大部分が同位相、一部が 180°異なる位相にみられた。これらの結果より器官培養では神経細胞間での電気活動にリズム同調が生じていることが示唆された。さらに、TTX を投与することにより、視交叉上核神経細胞間のリズムカップリング機構における Na 依存性活動電位の役割について検討したところ、周期の変化が観察された。

11. ピリオド遺伝子と体内時計 2 振動体仮説 CS 系マウスのリズム分割を用いて

安倍 博, 本間さと, 波平昌一, 増淵 悟, 本間研一 (北大・医・統合生理)

CS系マウスは行動のサーカディアンリズムに自発的なスプリッティング(リズム分割)を示す。リズムスプリッティングは, 体内時計2振動体間のカップリング(振動共役)関係が切れることにより起こると考えられている。そこで本研究では, CS系マウスが恒常暗条件下でスプリッティングを示しているときに, マウスの時計遺伝子である *mPeriod* の3つの相同遺伝子 *mPer1*, *mPer2*, *mPer3* の発現リズムを視交叉上核(SCN)と他の脳部位で *in situ* hybridization法により調べ, 体内時計2振動体仮説を時計遺伝子リズムから検証することを目的とした。SCNの *mPer1* 発現リズムは, リズムスプリッティングを示したCS系スプリット群でスプリッティングを示さなかった非スプリット群でピークの位相に違いはなかったが, *mPer2* 発現リズムはスプリット群で非スプリット群よりもピークが後退した。また, 大脳皮質の *mPer1* と *mPer2* リズムは, 非スプリット群では一峰性であったが, スプリット群では二峰性であった。これらの結果から, SCNにおける時計遺伝子間のスプリッティングの可能性, およびSCN外振動体におけるスプリッティングの可能性から2振動体構造について考察する。

12. Methamphetamine 持続投与ラットにおける脳波パワー値のサーカディアン変動

遠藤拓郎, 本間さと, 角田美保子, 本間研一(北大・医・統合生理)

ヒトの睡眠は概日リズムに支配されたレム睡眠と他の振動機構に支配されたノンレム睡眠の2つの部分からなると考えられる。ヒトの睡眠覚醒リズムのモデル動物であるMethamphetamine(MAP)持続投与ラットを用い2振動体の関与を明らかにした。

LD12: 12で飼育した雌ラットに, MAP(0.0025~0.01%)を飲水に溶かし経口投与し, 脳波・筋電測定を投与前と投与後2週間毎に行った。測定後, 睡眠段階の視察判定を行い, 脳波記録をFFTにて周波数解析し, 結果を15分毎にまとめた。

MAP投与により覚醒と睡眠が集約し, かつ睡眠覚醒リズム周期が延長し明暗サイクルから脱同調した。睡眠時の2Hzのパワー値は睡眠初期に急増しその後漸減, 8Hzと14Hzのパワー値は睡眠初期には低値でその後漸増した。10Hzのパワー値は覚醒時に高値を示した。逆転睡眠時には睡眠前半のレム睡眠が増加し, 暗期後半の覚醒が増加した。また覚醒期の14Hzのパワー値は逆転睡眠時に低値を示した。MAP持続投与ラットの脳波は, ヒトの睡眠覚醒

に関わる, Spindle帯域波と同様の経時変化を示し, 概日リズムの影響を受けることが示唆された。

13. ラット網膜における哺乳類時計遺伝子 *Per1* と *Per2* の発現のサーカディアン変動と光反応性

波平昌一¹, 本間さと¹, 安倍 博¹, 増淵 悟¹, 池田正明², 本間研一¹(¹北海道大・医・統合生理, ²埼玉医大・医・第一生理)

哺乳類の網膜は, 視交叉上核とは独立したサーカディアン振動体が存在することが示唆されている。そこで今回我々は, ラット網膜における時計遺伝子群の役割を検証するために, 時計遺伝子 *Per1* と *Per2* のmRNAのサーカディアン変動と光反応性について, *in situ* ハイブリダイゼーション法, 及びノーザンブロット法により検討した。その結果, *Per1* mRNAは恒常暗条件下においてサーカディアン変動を示さなかったが, *Per2* mRNAにおいては主観的暗期の前半にピークを持つ有為なサーカディアン変動を示した。また, 光照射実験において, 照射開始1時間後の各遺伝子のmRNA発現を測定したところ, *Per1* mRNAはすべての位相で増加する傾向がみられたが, *Per2* mRNAに関しては主観的明期の前半のみに有為な発現量の増加が認められた。これらの結果から, 時計遺伝子 *Per1* と *Per2* の網膜における役割は, 視交叉上核と異なっていることが示唆された。

14. Methamphetamine 慢性投与ラットの行動, 時計関連遺伝子およびホルモリズム

増淵 悟¹, 本間さと¹, 安倍 博¹, 波平昌一¹, 池田正明², 本間研一¹(¹北大統合生理, ²埼玉医大生理)

Methamphetamine慢性投与ラット(MAPラット)はその行動リズムが24時間周期の明暗サイクルから脱同調することが知られている。このリズムは生物時計の中核である視交叉上核(SCN)を破壊しても出現すること, 行動の表現型の中に複数の周期成分[SCN由来と思われるもの(約24時間)とそれより長いもの(約30時間)]があることより我々はMAPラットではSCN以外の概日振動機構が存在すると考えてきた。

近年 *Per1*, *Per2*, *BMAL1*, *Clock*などの哺乳類の時計関連遺伝子がクローニングされそれらの生物リズム発信機構についての生化学的なモデルが示されてきている。今回活動期の位相が明暗条件から脱同調しているときのMAPラットにおいてSCN内外の脳内の時計関連遺伝子およびホルモン(melatonin, corticosterone)のリズムを測定したところ, 明暗サイクルに同調する部位・成分と, 行動と相関のある部位・成分がみられた。それらの結果より

SCN内外の概日振動機構および、生物時計の階層的支配システムにつき考察する。

15. パルス結合されたペースメーカー細胞モデル結合系における Rate Coding 計算論的アプローチ

山野辺貴信¹, K. Pakdaman² (¹北大・院・医・統合生理, ²フランス国立衛生医学研究所)

神経系における情報キャリアは何かを調べるため、パルス結合された1次元直列振動子結合系の入出力特性を調べた。個々の振動子はペースメーカー細胞の動特性に必須の特徴を持っている。周期パルス列または確率的に変動するパルス列が振動子結合系の第一ユニットに加えられた。振動子結合系の出力は最終ユニットから出力されるスパイク列として定義される。我々は入力パルス列が周期的、確率的に関わらず、入力パルス列に対する振動子結合系の応答が2つの重要な現象を示すことを観察した。第1に、入力パルス1つに対し1つの出力スパイクが位相同期なして対応する入力発火頻度の範囲で、振動子結合系の出力平均発火頻度が入力平均発火頻度と等しくなる。第2に、同じ入力発火頻度の範囲で、結合される振動子が十分に多い場合、出力スパイク間隔が入力パルス間隔の平均に収束する。これらの振舞いは単一ユニットの応答が入力パルス列の発火頻度とそのパターンの両方に依存することと対照的である。我々は、振動子結合系の応答を単一パルス刺激に対する位相ずれをあらゆる位相遷移曲線で解析し、出力スパイク間隔の平均化は位相遷移曲線の幾何学的特徴が原因で起こることを示した。

16. ヨーロッパモノアラガイの咀嚼神経回路におけるNOの役割

小林 卓, 伊藤悦朗¹, 藤戸 裕, 青木 藩 (札幌医大・医・第二生理, ¹北大大学院理学研究科)

淡水産の軟体動物であるヨーロッパモノアラガイ (*Lymnaea stagnalis*) の咀嚼神経回路では一酸化窒素 (NO) が情報伝達物質として働くことが示唆されている。しかし、実際の咀嚼に伴って中枢神経系で産生されるNOを測定した例は今までにみあたらない。そこで本研究では、semi-intact 標本にNO電極法を適用して、中枢神経系でのNO濃度を測定した。

咀嚼行動を引き起こす蔗糖刺激を与えることによって中枢神経系でのNO濃度上昇が測定された。このNO濃度上昇はNO合成酵素を含有する運動ニューロンの咀嚼リズム応答と時間的に一致することが示された。これらのことから、モノアラガイの咀嚼行動に伴って運動ニューロンから実際にNOが放出されることが示唆された。

さらに、このNO産生運動ニューロンから発生するNOの咀嚼リズム調節における役割について電気生理学的に検討した。その結果、NOは過剰な咀嚼応答を抑制することによって自発的咀嚼リズムが正確に刻まれるように調節しており、反回性抑制因子として働くことが示唆された。

17. 延髄縫線核GABA及び5-HTニューロンの横隔神経核への軸索投射

青木 藩, 宋 剛¹, 松山清治 (札幌医大・医・第二生理, ¹山東医科大学・生理)

麻酔ネコの延髄大縫線核 (NRM) 又は淡蒼縫線核 (NRP) の微小電気刺激により、呼吸運動に抑制性又は興奮性効果が生じる。本研究では、NRM又はNRP内のGABAおよび5-HT作動性ニューロンから横隔神経核への軸索投射の有無を、逆行性HRP法およびGABA又は5-HT免疫組織化学法による二重標識法を用いて検討した。

方法はネコC5レベルで電気生理学的に同定した横隔神経核の5箇所を5% WGA-HRPを微量 (10nl) 圧注入し、2日後に灌流固定し、脳幹部の凍結切片 (厚さ40µm) を作製した。はじめにHRP含有細胞を可視化するために切片をTMB法により反応した。さらにこれらの切片を抗GAD抗体 (または抗GABA抗体) または抗5-HT抗体を用いて反応し、FITC結合2次抗体を用いて蛍光標識した。これらの切片を明視野および蛍光顕微鏡を用いて観察した。WGA-HRPの注入部位はDAB法で同定し、取込み部位は横隔神経核を中心とした前角内に限局していた。HRP-FITC二重標識細胞は、GABAニューロンに関しては主にNRM, KF核, Böttinger複合核などで観察され、5-HTニューロンに関しては主にNRPに限局して観察された。

これらの成績から、縫線核から横隔神経核へ直接の下行接続があり、GABAニューロンは抑制性、5-HTニューロンは興奮性効果を及ぼしていることが示唆された。

18. 左右歩行リズムの協調的発現に関わる腰髄交連細胞の発射活動様式と網様体脊髄路入力様式

松山清治^{1,2}, 森 茂美², 青木 藩¹ (¹札幌医大・医・第二生理, ²生理学研究所生体システム)

歩行運動の遂行には左右歩行リズムの協調的発現が必須であり、この発現には脊髄反対側へ軸索投射する脊髄交連細胞の関与が示唆されている。本研究では、歩行リズム生成・制御に関わる脊髄 脳幹神経機構の解明を目的として、脊髄交連細胞の発射様式とこれらに対する網様体脊髄路入力方式について解析した。実験には無動化除脳ネコ標本を用いた。除脳ネコの中脳歩行誘発野刺激による歩行リ

リズム誘発時に脊髄介在細胞の発射活動を第4～7腰髄レベルで交連線維の交叉する前索背内側領域から軸索内記録した。この際、橋・延髄網様体刺激に興奮性シナプスを応答を示す介在細胞について発射活動を解析した。また記録後にNeurobiotin (NB)を軸索内注入し、記録した介在細胞の細胞体及び軸索を標識した。この結果、NB標識細胞の多くは細胞体がVII-VIII層に存在し、その全てが軸索を反対側に投射する腰髄交連細胞であった。これら記録した交連細胞の多く(75%)は歩行リズムに対応してリズム発射を示すとともに、延髄網様体刺激により潜時3～5msで単または多シナプス性に応答した。以上の結果から、腰髄交連細胞の多くは左右後肢歩行リズムの協調的発現に関わるとともに、網様体脊髄路は左右歩行リズム形成回路の制御に関わると考えられた。

19. 前頭前皮質における視空間性選択的注意と結びついた記憶過程を再現するニューロン活動

射場美智代, 澤口俊之(北大脳科学機能分子)

目的的な情報の一時的な保持過程としてのワーキングメモリに、前頭前皮質が中心的な役割を担うことがこれまでの研究によって示されている。ワーキングメモリには容量があるため、状況に応じて必要な情報を選択する過程(選択的注意)が前頭前皮質で進行することが考えられる。本研究ではこの問題をニューロンレベルで調べるため、眼球運動を用いた遅延視覚探索課題と遅延反応課題遂行中のサルの前頭前皮質から単一ニューロン活動を記録し、遅延期活動に着目して解析を行なった。その結果、どちらの課題でも遅延期活動を示すニューロン群(Delay-neuron, n=140)に加えて、遅延視覚探索課題のみで特異的に遅延期活動を示すニューロン群(Search-delay neuron, n=40)を見つけた。これらのニューロン群で遅延期活動の時間経過(開始潜時, ピーク時間)は同様だったが、皮質内分布は異なり、Search-delay neuronの方がより尾側に存在した。これらのことは前頭前皮質に「選択的注意による情報の選択とその保持」という一連の過程に関与するニューロンシステムが、より一般的なメモリシステムと並列的に存在することを示唆する。

20. ネコ網膜血流量に対するニブラジロールの影響の解析

佐藤栄一¹, 高草木薫², 斉藤和也², 坂本尚志²(旭川医大・¹眼科, ²第二生理)

ニブラジロールは、遮断作用を持つ抗緑内障眼薬である。眼球前部において、遮断作用は房水流出を増加させ、遮断作用は房水産生を抑制する。これらの作用

により眼圧は下降し、眼灌流圧は増加し、緑内障における網膜血流改善を促すと考えられている。一方、ニブラジロールの点眼は眼球前部のみならず、後眼部の網膜にも浸潤し、直接網膜血管に作用して網膜血流量を増加させる可能性も示唆されている。そこで、本研究では、ニブラジロールを直接網膜血管に作用させた場合、網膜血流が増加するか否かを検討した。そのため、ニブラジロール溶液をネコ眼の硝子体内に注入し、レーザードップラー法を用いて、網膜血流量の変化を解析した。ネコをエンフルレン麻酔下で非動化し、人工呼吸にて管理した。そして、0.25%ニブラジロール50 μ lを硝子体内に注入し(n=6)、Canon社製のLaser Blood Flowmeter (CLBF model 100)を用いて、血管径、血流速度を計測した。対照としてリン酸緩衝液(PBS)50 μ lの硝子体注入(n=6)を行った。また、平均血圧、眼圧を各々モニターした。網膜血流量は血算径と血流速度から算出し、眼灌流圧は平均血圧、眼圧から算出した。ニブラジロール注入後40分から血流速度は増加し、それに伴い網膜血流量は増加した。PBS注入では、網膜血流量は増加しなかった。眼灌流圧はニブラジロール注入、及び、PBS注入において変化しなかった。これらの結果は、ニブラジロールが網膜血管に作用して、網膜血流量を増加させることを示唆する。

21. 神経系株化細胞における一酸化窒素毒性と活性酸素種

齋藤宗孝¹, 佐藤秀臣¹, 河原剛一¹, 戸島拓郎², 伊藤悦朗²(¹北大電子研, ²北大院・理学研究科)

一酸化窒素(NO)神経毒性は虚血性脳疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病などの病態との関連から注目されている。今回我々は、神経系株化細胞NG108-15(NG)において、細胞の分化と一酸化窒素(NO)神経毒性との関連を解析した。神経細胞様に分化誘導されたNG(DNG)では、NO供与体であるS-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SNAP)のみの負荷では細胞死が生じないが、SNAPとsuperoxide dismutase inhibitorであるdiethyldithiocarbamic acid (DDC)の同時負荷によって細胞死を起こした。この細胞死は、NO scavengerであるhemoglobin, superoxide scavengerである4,5-dihydroxy-1,3-benzene-disulfonic acid (tiron), およびperoxynitrite scavengerであるglutathioneによって抑制された。これらの観察から、SNAP・DDCを同時負荷されたDNGにおいては、NOとsuperoxideの反応によってperoxynitriteが生成され、それが細胞死の原因となった可能性が示唆された。

22. DAF-2 DA を用いた一酸化窒素産生中のクッパー細胞のイメージング

石川一志¹, 河野 透², 海老沢良昭², 川端規弘², 葛西眞一², 岩元 純¹ (旭川医大・医・¹看護学科, ²第二外科)

これまで, 一酸化窒素 (NO) の検出・測定のために, 種々の方法が試みられてきた。しかし, それらは, 放出された NO を捕捉しようとしたため, 感受性や特異性の点で不十分であり, 特に NO 産生部位の局在を直接的に知る事はできなかった。我々は, 細胞内に浸透し, NO と特異的に反応して蛍光を発する diaminofluorescein-2 diacetate (DAF-2 DA) を用いて, NO 産生クッパー細胞の画像化を試みた。0.1mg/kg lipopolysaccharide (LPS) をラットの腹腔内に投与し, 更にクッパー細胞を識別するために, サンプル開始2時間前に, ローダミン結合ラテックス粒子 (径 1 μm, 1mg/kg) を静脈内投与した。LPS 投与6時間後に, collagenase-perfusion 法で肝臓の細胞を分離し, さらに Percoll gradient 遠心法でクッパー細胞分画を分離した。Krebs 液で灌流した分画細胞のうち, 多くの細胞がローダミンの赤色蛍光を発するラテックスを取り込んでいてクッパー細胞であることが確認された。DAF-2DA (25 μM) を投与し, 波長 495 nm で励起し 515nm で観察すると, クッパー細胞は強い緑色蛍光を発した。以上の結果から, DAF-2 DA は NO を産生している細胞自体を観察するのに有効である事が示された。

23. 拘束ストレスによる褐色脂肪組織熱産生機能の調節

高 弼虎, 内海 計, 黒島辰汎 (旭川医大・第一生理) 褐色脂肪組織 (BAT) は非ふるえ熱産生 (NST) の主要発現部位であり, 脱共役蛋白質 (UCP1) がその熱産生の機能分子である。ラットにおいて, 拘束ストレスの反復負荷は NST を増大させ耐寒性を改善させるが, この現象は UCP1 を介する BAT 熱産生の増大によるものと推測される。

この点を解明するために, 本研究では UCP1 機能に及ぼ

す拘束ストレスの反復負荷の影響をラットを用いて検討した。急性 (3h) と反復 (3h/day for 4wks) の拘束群を用い, 負荷終了直後, UCP1 の活性化の指標である GDP 結合及びその発現量を比較した。

GDP 結合は, 対照群に比べ両拘束群で有意に増加していたが, その程度は反復拘束群で大であった。UCP1 発現量は, 対照群に比べ急性拘束群では変化がみられず, 反復拘束群では有意に増加していた。以上の結果から, 拘束ストレスの反復負荷は UCP1 の活性化を促進するとともにその発現量も増加させ, BAT 熱産生能を増大させることが明らかになった。

24. 部分的唾液分泌不全ラット耳下腺の食餌性状による変化

倉橋昌司 (北海道医療大・看護福祉・生命基礎科学)

顎下腺舌下腺導管結紮による部分的唾液分泌不全ラットにおける耳下腺変化の発現機序を明らかにするために, 固さと水分量の異なる三種類の食餌摂取の耳下腺に及ぼす影響について検討した。

10週齢のウイスター系雄ラットを二群に分け, 一群に両側の顎下腺および舌下腺導管結紮術を行い, 他の一群には偽手術を行った。術後, 両群ともにさらに三群に分け, 二週間, 固形食, 粉末食, 液状食 (粉末食に二倍量の水を加えたもの) それぞれを摂取させ, この期間の摂食量および摂水量を記録した。その後, 一昼夜絶食, 屠殺し, 両側の耳下腺を摘出, 湿重量およびアミラーゼ活性を測定した。

固形食群および粉末食群では, 導管結紮により摂水量の増加はなく, 固形食に比較し, 粉末食でより大きな耳下腺の肥大とアミラーゼ活性の増加が見られた。一方, 液状食群では, 導管結紮により湿重量およびアミラーゼ活性ともに変化は見られなかった。以上の結果は, 顎下腺および舌下腺唾液分泌不全による耳下腺変化の発現には, 摂食中の食餌成分による口腔粘膜への持続的な刺激の増加が重要であることを示唆する。