

第81回日本生理学会北海道地方会

日 時：平成13年9月8日

会 場：札幌市 北海道大学医学部臨床大講堂

当番幹事：北海道大学大学院医学研究科統合生理時間生物学 本間研一

日本生理学会北海道地方会は、例年北海道医学大会の一環として開催されるため第81回大会となっているが、本年は北海道地方会が結成されてからちょうど50周年にあたる。そこで、通常の演題発表に加え、今回は特に生理学会北海道地方会50周年記念大会として、特別講演とランチョンセミナーをあわせて開催した。記念講演会では、廣重 力北大医学部名誉教授に「地方会の歩みと系譜」と題して、また、加藤正道北大医学部名誉教授に「北海道地方会の思い出話」と題して、それぞれ、生理学会北海道地方会の成り立ちや、参加各教室の系譜を話していただき、出席者各自のルーツを知るチャンスをあたえられた。さらに、ランチョンセミナーでは久田光彦北大理学部名誉教授に「北海道地方会今昔物語—過去は明日のプロローグ」と題して、戦後まもなくの各教室の様子やメンバーの写真を交えて、過去の生理学者から何を学ぶかを話して頂いた。記念講演会に引き続き、昨年から開催されている若手シンポジウムが行われ、生理学の明日を担う3名の若手および中堅の研究者に、研究成果をまとめて発表してもらった。一般演題は18題であり、神経生理学、細胞生理学、形態学、環境、運動、行動生理学など、幅広い領域での発表がなされた。各自の持ち時間を15分と比較的長く設定し、例年、鋭い本質的な質問や討議がなされるが、本年も、終了が1時間ずれこむほど討議が白熱した。

1. Li_2CO_3 投与に伴う Bcl-2, Bax の挙動

小山富康 (元北海道大学電子科学研究所)

ラットの冠動脈を結紮・解除すると抗細胞死因子 Bcl-2 が心筋壁の虚血部からは消失し、その周囲の筋層に強く発現した。一方細胞死誘導因子 Bax は虚血部にも周辺部にも強く発現した。今回は細胞死関連因子に変化をもたらすと言われるリチウム摂取の作用を検討した。 Li_2CO_3 0.24% 添加飼料を5頭のウイスターラットに自由摂取させ、飲料水には0.1% NaCl を添加した。4週間後に心臓、脳、膵臓を採取した。血漿 Li 濃度は対照群の $0.002 \pm 0.004 \text{mEq/l}$ にたいし、Li 群 $2.781 \pm 1.162 \text{mEq/l}$ であった。パラフィン包埋薄切片を bcl-2, bax 抗体を反応させ DAB 法で呈色させ、光学顕微鏡観察した。脳切片は大脳後縁より5mmの位置で横断面とした。対照ラット脳で僅かの bcl-2 陽性細胞が散在していた。Li ラットの脳でもほぼ同様であり、bcl-1 が有意に増強するようには見えなかった。Bax は Li 群で広範に発現した。膵臓では選択的にランゲンハルス氏島に bcl-2 の染色が見られ、Li ラットではむしろ染色が弱いようであった。Bax は両群ともにラ氏島が同程度に呈色した。左室心筋については前壁の中層と内膜下層において bcl-2, Bax とも広範に染色され、Li ラットにおいてやや強い染色が得られた。現段階では定性的観察に過ぎないが、3~5mM の Li が初代培養 SD ラット脳細胞

の Bax 発現を半減させたとする Chan ら (JBC 1999) の結果とは異なる。また Li 摂取による体重の減少や血漿濃度に個体差が大きめという印象をもった。本研究は北大医学研究科神経病態学講座藤井幸子氏との共同研究である。

2. ラット新生仔の時計遺伝子発現リズムに対する母ラット保育行動の影響

太田英伸, 本間さと, 安倍 博, 波平昌一, 増淵 悟, 本間研一 (北海道大学大学院医学研究科統合生理講座)

母ラット保育行動がラット新生仔生物時計に対して影響するか否かを、新生仔視交叉上核で発現している時計遺伝子 *rat Period 1/Period 2* mRNA のリズムを指標として評価した。

6~18時が明期, 18~6時が暗期の LD 条件下の母ラットより出生した新生仔を対象とし、生後0日より以下の3つの保育環境にて飼育を開始した: 1) 眼球摘出を行わず明暗条件が LD の母ラット (LD 母ラット) にて保育 (LD 非盲目新生仔), 2) 眼球摘出を行い DL 母ラットにて保育 (LD 盲目新生仔), 3) 眼球摘出を行い DL 母ラット (6~18時が暗期, 18~6時が明期) にて保育 (DL 盲目新生仔)。3グループの新生仔視交叉上核における *rat Period 1/Period 2* のサーカディアンリズムを生後1・2・3週目に *in situ hybridization* 法にて評価した。

生後1週目において、同一の光条件で、母ラットの保育行動のみが違うLD非盲目新生仔とDL盲目新生仔間にrat *Period 1/Period 2*のリズム位相の違いを認め、母ラットの保育活動がラット新生仔生物時計に対して影響することが明らかになった。また、P13以降、LD盲目新生仔・DL盲目新生仔の時計遺伝子リズムにフリーラン現象を認め、LD非盲目新生仔に同じ現象を認めないことから、新生仔生物時計に対し光が母ラットの保育活動より強い影響力をもつことが示唆された。

3. 周期的な身体運動がヒト体内時計に及ぼす影響

宮崎俊彦, 橋本聡子, 本間さと, 本間研一 (北海道大学大学院医学研究科統合生理)

身体運動にヒト体内時計の位相前進作用があるか否かを確かめるために、住居型隔離実験室において50lux以下の照度で23時間40分周期の強制睡眠スケジュールを健康被験者に15日間課した。睡眠時間帯は15日間で4h前進させた。運動群は覚醒後3時間、7時間後にそれぞれ2時間の運動を12サイクル与えた。2時間の運動は自転車エルゴメーター、ローイングエルゴメーターを用い、心拍数140拍/分の強度で15分間行い、15分間休息の間欠運動を4回繰り返した。留置カテーテル法による1時間毎の24時間連続採血を実験1日目、8日目、14日目にを行い、血中メラトニンリズムの位相を比較検討した。両群の位相差はすでに実験8日目で認められ、運動負荷群は0.88時間位相前進、対照群は0.67時間位相後退した。14日目では運動群では1.6時間位相前進したのに対して、非運動群では0.8時間の位相後退を示した。また、1回の運動による位相変位の時刻依存性を確かめる実験では、午前9時、午後3時、午前0時の3点で対照群と比較した場合、有意な位相変化は認められなかった。一方、深部体温の上昇は身体運動の時刻によって変化し、運動後の体温低下の時間帯も身体運動の時刻により変化した。以上の結果は身体運動にはヒト体内時計の位相前進を促進する作用があると考えられるが、身体運動の直接効果ではなく、覚醒レベルを上げることによる間接的なものと思われる。

4. 分離槍型神経終末シュワン細胞のATPに対する反応

岩永ひろみ¹, 阿部和厚¹, 葉原芳昭² (¹北大医解剖, ²北大獣生理)

知覚神経の軸索終末とそれに随伴する終末シュワン細胞の相互作用を検討するため、知覚線維から放出されるといわれるATPに対するこの細胞の反応を、細胞内Ca²⁺濃度の変化を指標として調べた。コラゲナーゼ消化で分離したラット頬部洞毛周囲槍型神経終末を標本として用い、これ

に蛍光性Ca指示薬Fura-2を負荷して、細胞内Ca²⁺動態をArgus 100で画像解析した。分離槍型終末は、ATP 50 μM-1mMの灌流刺激に反応し、蛍光比で基礎値の1.5~3倍の急峻な細胞内Ca²⁺の上昇をみせた。反応の大きさは用量に依存する傾向を示し、比較的低濃度のATP刺激で、しばしば、毎分1~2回周期のCa振動が出現した。反応部位は、槍型終末を包むシュワン鞘と、そこから細長い首をもって突出する終末シュワン細胞の丸い細胞体に限られ、終末近位側の有髄神経線維や周囲結合組織の線維芽細胞は、無反応だった。また、シュワン鞘とそれに続くシュワン細胞体では、前者が後者よりやや早く刺激への応答を始めた。以上の結果は、軸索終末から放出されるATPを、終末シュワン細胞が鞘状突起の部分で受容し、それによって惹き起こされる細胞体のCa信号が終末の形態の維持や変化に関わるシュワン細胞の活動を調節する可能性を示唆する。

5. Preconditioningによる大脳皮質虚血後のc-Junならびにリン酸化CREB発現動態の変化について

岩淵禎弘, 中島崇行, 河原剛一 (北大電子研), 宮崎浩之, 大熊康修, 野村靖幸 (北大薬学), 稲波 修, 桑原幹典 (北大獣医)

脳が梗塞を生じる程度の長時間の虚血に陥る前に、短時間の虚血処理 (preconditioning) を加えておくと、梗塞巣が減少する。この現象は虚血耐性と呼ばれているが、その詳しいメカニズムに関しては不明である。一方、脳虚血により各種の転写調節因子が活性化し、虚血ストレスに対する応答機構を作動させていると考えられている。本研究では局所脳虚血モデルラットを用い、preconditioning処置の有無による大脳皮質虚血後のc-Junならびにリン酸化CREBの発現動態の変化について検討した。

虚血処置として、微小クリップによる総頸動脈および左側中大脳動脈の閉塞を行った。preconditioning処置群では10分間閉塞し、再灌流10分後、再び10分間の閉塞を行い、sham operation群では血管を露出させるのみとした。それぞれの処置から72時間後、1時間の虚血を施し、経時的に大脳皮質を採取後、c-Junならびにリン酸化CREBの発現をwestern blot法、免疫染色法で解析した。

その結果、両群間で、それぞれの転写調節因子の発現動態に変化が認められたことから、preconditioning処置により、これらの転写調節因子の虚血ストレス応答に変化が生じ、虚血耐性効果が発揮されるのではないかと考えた。

6. 腸間膜微小動脈におけるα受容体刺激による律動性収縮と内皮機能の関わり

関 純彦^{1,2}, 岡崎加代子², 服部淳一², 並木昭義², 當瀬規嗣¹ (¹札幌医科大学医学部生理学第一講座, ²札幌医科大学医学部麻酔学講座)

α 受容体刺激による血管収縮時に, 内皮がどのように機能しているかは解明されていない. そこで, フェニレフリン (以下PE) による腸間膜細動脈収縮反応に及ぼす内皮の有無の影響を調べた.

〔方法〕SD ratの上腸間膜動脈最終分岐部を摘出した. 両端に微小ガラス管を挿入し, 内圧を50mmHgに維持した. 一部標本では内皮細胞を除去した. Krebs液を灌流したオルガンバス内にPEを累積投与し, 顕微鏡下で内皮の変化を観察した.

〔結果〕内皮温存標本では, PE 1 μ M以上の投与で律動的な収縮が見られた. この律動は内皮除去標本では観察されなかった. 律動は, プロプラノロール, ヨヒンビン, L-NAME, インドメタシンのいずれの前処置でも消失しなかった. しかし, L-NAME, インドメタシンに加え, K_{Ca} 阻害薬 (カリブドトキシン+アバミン) を投与すると消失した.

〔結語〕PEによる最大収縮は内皮の有無に影響されなかったことから, 内皮依存性拡張と収縮の繰り返しが, 律動を形成していると考えられた. 薬理的検討から, この律動には, NO, PGI_2 よりも, 内皮由来過分極因子 (EDHF) の関与が大きいと考えられた.

7. ラット心室筋L型Caチャンネル β サブユニットに関する検討

山田陽一, 長島雅人, 筒浦理正, 小林武志, 関 純彦, 當瀬規嗣 (札幌医科大学医学部細胞生理学講座)

心筋L型Caチャンネルは a_{1C} , β , $a_2\delta$ の三つのサブユニットから構成され, ラット心筋では β_{2a} とよばれる β サブユニットが特異的に発現していると報告されている. しかし, このサブユニットを用いた再構成系での実験ではCa電流の不活性化過程はnativeの心筋のそれと較べて遅い. また, β_{2a} サブユニットは元来ラットの脳からクローニングされ, northern blot解析により, 心臓にも存在するとされたものであるが, この遺伝子配列を用いたPCR解析では心筋そのものにはシグナルが得られないとの報告も見られる. 今回, 我々はラット心室筋より5'RACE法を用いて, β_{2a} サブユニットのsplice variantと思われる β サブユニット (β_{2b}) をクローニングした. β_{2b} サブユニットを a_{1C} , $a_2\sigma$ サブユニットとともにBHK細胞に発現させ, これらで構成されるCaチャンネルを通るBa電流を観察したところ, β_{2a} サブユニットを発現させた時と異なり, nativeのそれに非常に近い, 不活性化過程の速い電流が観察

された. 心筋では β_{2b} サブユニットが機能的に発現している可能性が示唆された.

8. 上部頸髄呼吸性ニューロンへの延髄縫線核GABA及び5-HTニューロンの投射

青木 藩¹, 宋 剛², 松山清治¹ (¹札幌医大・医・第二生理, ²山東大学医学院)

ネコの延髄大縫線核 (NRM) 又は淡蒼縫線核 (NRP) などの微小電気刺激により, それぞれ呼吸運動の抑制又は興奮性変化が生じる. 我々はこれまでにNRM及びNRP内ニューロンの横隔神経核への軸索投射を報告してきた. 今回は, さらに上部頸髄灰白質中間帯外側部に存在する吸気性ニューロン (UCIN) についても, 逆行性HRP法及びGAD又は5-HT免疫組織化学による二重標識法を用いて軸索投射の有無を検討した.

方法はネコ C_1 - C_2 レベルでUCIN発射が細胞外記録される部位を同定し, 3箇所 (2mm間隔) に5% WGA-HRPをナノリッターポンプを用いて微量 (各10nl) 圧注入した. 3日後に灌流固定し, 脳幹部の凍結切片 (厚さ50 μ m) を作製した. はじめに切片をTMB/DAB法により反応し, さらに抗GAD抗体又は抗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. HRP-FITC二重標識細胞は, GABAニューロンに関しては主にNRMおよびNRO (不確縫線核) などで観察され, 5-HTニューロンに関しては主としてNRPおよびNROに局限して観察された.

9. 順行性および逆行性標識法によるラット赤核への入力様式の解析

藤戸 裕, 青木 藩 (札幌医大・医・第二生理)

ラット赤核細胞への入力様式を組織学的に明らかにするため, 入力系起始部位に標識薬を注入して赤核への入力線維を順行性に標識するとともに赤核脊髄路細胞を逆行性に標識した. 体重220~420gの雄Wistarラットを用いて, 対側頸髄膨大部にBDAもしくはBHRP溶液を1箇所あたり20~50nlで数箇所注入すると, 赤核大細胞は細胞体と樹状突起ともに逆行性に標識された. BDAもしくはPHA-Lを対側小脳中位核, 対側後索核もしくは同定された同側大脳運動野に1箇所あたり10~30nlを数箇所注入すると, 赤核への入力線維がそれぞれ順行性に標識された. PHA-Lに順行標識された神経線維の数はBDAに比べて明らかに少なかった. 標識薬の頸髄注入による赤核大細胞の逆行性標識と対側小脳中位核, 後索核もしくは同側運動野前肢領域への標識薬の微量注入による入力線維逆行性標識

の二重染色法により、赤核への各入力系起始部位からの線維投射様式と赤核細胞への接続を観察した。対側小脳中位核と対側後索核由来と考えられる赤核への標識された神経線維は逆行標識された赤核大細胞の細胞体もしくは細胞体近傍にシナプス接続すると考えられた。それに対し、同側大脳運動野由来と考えられる標識線維は赤核内に少数認められたものの赤核細胞との接続は認められなかった。赤核細胞樹状突起末端部への大脳由来神経線維の接続の検討が今後の課題である。

10. ラット海馬の抑制性シナプス伝達におけるミダゾラムの効果の領域差

小林 卓, 藤戸 裕, 松山清治, 青木 藩 (札幌医大・医・第2生理)

我々は以前にベンゾジアゼピン系薬物の一種であるミダゾラムを用いた実験において、海馬スライス標本での細胞内記録により、抑制性シナプス後電位増強作用にラット海馬内で領域差が存在する事を報告した。本研究では、ミダゾラムの作用の領域差から強く存在が推測される海馬CA1, DG両領域間における抑制性シナプス伝達の生理学的性質の相違性に注目し、電気生理学的・薬理的解析を行った。約1~4週齢のWistarラットより作製した海馬スライス標本にパッチクランプ法を適用し、CA1-錐体細胞(CA1-PC)、歯状回-顆粒細胞(DG-GC)における抑制性シナプス後電流(IPSC)を測定した。IPSC記録は興奮性シナプス伝達を薬理的に除去した上で、記録する細胞の近傍の介入ニューロンを双極電極で電気刺激(0.1~0.5mA, 100~150 μ s)することにより行われた。その成績として、CA1-PCでは、ミダゾラム(0.3, 1, 10, 75 μ M)の投与により濃度依存的にIPSCの振幅が増大した。一方、DG-GCでは、IPSCはミダゾラム投与によりほとんど変化しないか、わずかに減少した。これらの成績は、海馬、CA1, DG両領域の抑制性シナプス伝達様式の相違性を明確に示し、両領域間の抑制性シナプスにおいてGABA_A受容体の異なるサブタイプが存在することを示唆する。

11. サル前頭眼野後部領域に再現される3次元視線運動信号

福島菊郎, 山野辺貴信, 新明康弘, 福島順子, Sergei Kurkin (北海道大学大学院医学研究科統合生理学講座認知行動学分野)

滑動性眼球運動と輻輳運動はいずれもゆっくり動く視覚対象の追跡に必須であるが、両者はそれぞれ異なるシステムとして、前者は網膜像の速度情報を、後者は両眼視差

(位置)情報を使い、脳内経路も異なることが報告されている。しかし両運動系は共通点が多いため私どもは、日本サル弓状溝底部および背部部の滑動性眼球運動ニューロンが輻輳運動にも応答するかどうかを、スポット視標をサルに追跡させることにより調べた。どちらかの眼球運動に応答し、両眼球運動に対する応答を調べた125個中、大多数のニューロン(71%)は両者に応答した。輻輳運動に応答したニューロンには、視標が近づくときに応答するニューロンと、遠ざかるときに応答するニューロン群がほぼ同数、記録された。滑動性眼球運動のみに応答したのは19%で、残り10%は輻輳運動のみに応答した。これらニューロンの最適応答方向は前額面ではあらゆる方向を向いており、視標運動速度に応答するものが含まれた。以上の結果は、前頭眼野後部領域が滑動性眼球運動と輻輳運動の両者に共通の神経機構を備えることを示し、それにより3次元空間のあらゆる方向の視標運動の追跡のための視線運動信号が形成される可能性を示唆する。

12. 仮想指標を用いて誘発される滑動性眼球運動と輻輳運動

武市紀人, Sergei Kurkin, 赤尾鉄平, 佐藤史江, 福島順子, 福島菊郎 (北海道大学大学院医学研究科統合生理学講座)

滑動性眼球運動と輻輳運動は用いる視覚情報も脳内経路も異なることが報告されている。左右眼の非対称性の運動は左右眼を同方向に動かす運動系と逆方向に動かす輻輳運動が、ともに同じ大きさの指令を出し(equal innervation)それらの干渉によると説明されている。最近私どもは前頭眼野後部領域滑動性眼球運動ニューロンの大多数は輻輳運動にも応答することから、従来の説明に反して両者が共通機構により制御される可能性を示唆した。前頭眼野領域がequal innervation指令に関わるかどうかを理解する第一段階として今回、左右眼が独立して滑動性眼球運動と輻輳運動を行えるかどうかを健康人で調べた。コンピューター画面上の仮想空間で正弦波状に奥行き方向に動く指標を、LCDシャッターを通して左右眼に個別に与え、左右眼に提示するスポットを異なる周波数(例、0.2と0.5Hz)で与えると被験者は単一指標が奥行きと前額面方向に複雑に動くように知覚した。このような刺激に対し左右眼は、それぞれの網膜に与えられた指標運動と一致して同方向或いは逆方向に動いた。以上の結果は、ヒトの両眼球は左右独立して滑動性眼球運動と輻輳運動を行うことが出来る可能性を示唆する。

13. ザリガニ神経系における一酸化窒素の神経修飾作用

青沼仁志(北海道大学電子科学研究所神経情報研究分野)
動物は外部の信号を特定の受容器で受容し、その感覚情報を中枢で処理・統合し適切に行動する。この際、必要な感覚情報を描出する神経機構が重要で神経修飾作用はその一端を担っている。近年、無脊椎動物の神経系における一酸化窒素(NO)の修飾効果が示唆され始めた。本研究では、個々の神経細胞が同定可能で、それらが形成する神経回路網が詳細に解析できるザリガニ腹部最終神経節を材料にNOの修飾効果を解析した。

ザリガニ最終神経節におけるNOの産生細胞の分布をNADPH-d染色法で、標的細胞の分布をNO誘導性cGMPに対する抗体染色法で確かめたところ、それぞれ約10対、35対の細胞体が陽性で、ニューロパイル部位で染色の重複が見られた。更に、感覚神経を電気刺激し介在神経で応答を記録し、NO合成剤、除去剤、及びNOS阻害剤、グアニル酸シクラーゼ阻害剤などを灌流することでNOの修飾効果を解析したところ、(1)スパイク発射型局所介在神経に対してNOは抑制効果を持ち、(2)上行性介在神経に対しては(a)特定の同定細胞に対しては応答を増強するように、(b)別の同定細胞に対しては抑制するように修飾効果を持つことが判明した。これらの結果から、感覚神経と介在神経の化学シナプスに於いて、NOはcGMPを介してシナプス伝達を修飾する効果をもち、感覚情報が中枢に伝わる初期の段階で修飾を受けることを示した。

14. 歩行運動の基礎的発現・制御に関わる脳幹—脊髄神経機構の構築及び作動様式

松山清治, 青木 藩(札幌医大・医・第二生理)
歩行運動は四肢・体幹の広範囲に同期して発現する協調運動であることから、脊髄全長に軸索投射する脳幹下行系とその標的部位に分布する脊髄介在細胞群は、歩行運動の発現・制御機構の主要な構成要素であると考えられる。本研究では脳幹—脊髄系の中でも網様体脊髄路とその標的部位の脊髄前角VII~VIII層に分布する介在細胞群の関係に着目し、これらの構築と歩行リズム発現群の作動様式についてネコを用いて解析し、次の4項目を明らかにしてきた。1) 網様体脊髄路細胞の多くは歩行運動時に歩行周期に対してリズム発射を示し、その発射頻度は運動負荷の程度に応じて変化した。2) 網様体脊髄路軸索は脊髄全長を通じて高頻度に軸索側枝を分枝し、前角VIII~VII層の介在細胞層に強く投射した。3) 網様体脊髄路から興奮性入力を受ける腰髄介在細胞の殆どは後肢歩行リズム周期に対応してリズム発射を示した。4) 標識細胞の多くはVIII層交連

細胞であり、その交差性軸索は軸索側枝を高頻度に分枝し、反対側の運動ニューロン層や介在細胞層に強く投射した。以上より、交連細胞が構成する神経回路は各節レベルでの局所的な左右歩行リズムの形成に関係し、さらに脊髄全長にわたり多数分布する交連細胞回路群を網様体脊髄路が統合・制御すると考えられた。このため網様体脊髄路—交連細胞神経機構は肢—肢間または肢—体幹間における左右歩行リズムの協調的発現に重要な機能的役割を持つと推定された。

15. 前頭前皮質における選択的注意について

射場美智代, 澤口俊之(北大院・医・機能分子)

これまでの研究により前頭前皮質は意味のある情報を一時的に保持し、出力する「ワーキングメモリ過程」に関与することが示されてきた。しかし、ワーキングメモリに入力される前段階の「意味のある情報の選択」に関する研究はほとんどされてこなかった。記憶には容量があるため、雑多な情報から意味のある情報を選択する過程が存在すると考えられる。そこで、我々は前頭前皮質がターゲット選択のような選択的注意にいかに関与するかを明らかにするため、サルを用いてこの問題に取り組んだ。認知心理学的に注意を計測するのに適しているとされている視覚探索課題をサル用に開発した眼球運動視覚探索(Oculomotor visual search: OVS)課題とそのコントロール課題をサルに訓練し、ムシモールによる局所機能脱落法で、前頭前皮質が、選択的注意に実際に関与するかどうかを調べた。その結果、注意を必要とするOVS課題のみが特異的に障害される事がわかった。また、OVS課題に遅延期を導入した課題で単一ニューロン活動を記録したところ、前頭前皮質にはターゲット選択の結果を特異的に保持するニューロン群と、単に空間情報を保持するニューロン群が存在することがわかった。これらの事実は前頭前皮質が意味のある情報の選択に関与すること、さらに、この領野には空間情報を保持するような従来報告されてきた記憶システムに加え、選択的注意と結びついた記憶過程が存在することを示唆する。

16. 無麻酔除脳ネコ咽頭期嚥下に対する延髄小細胞性網様体へのピククリン注入の効果

原田広文, 坂本尚志(旭川医科大学第二生理学講座)

咽頭期嚥下は咽頭頭粘膜からの知覚入力により咽頭頭・呼吸筋活動を統合し、誘発される反射運動である。咽頭頭・呼吸筋活動の統合された反射運動パターンの形成にGABAを介する抑制系が関与しているか解析した。

ネコ(n=5)はGOF麻酔下に、中脳前縁レベルで除脳

した。嚥下運動は咽喉頭粘膜を支配する上喉頭神経 (SLN) に電気刺激 (0.2msec, 0.3V ~ 0.4V, 10 ~ 20Hz, 持続 10 ~ 20s) を加えて誘発した。SLN 刺激の刺激強度もしくは刺激頻度が低い際には嚥下運動が、高い際には咳運動が誘発された。実験には咳運動の閾値下の刺激強度と刺激頻度を用いた。嚥下運動は SLN 刺激により咽喉頭筋、呼吸筋から記録された筋電図と、咽頭注水により誘発した嚥下時の筋電図を比較し、同定した。GABA 受容体拮抗薬ピククリン (5mM) は微小ガラス管 ($\phi = 100 \mu\text{m}$) を用い微量注入 (0.15 ~ 0.5 μl) した。

SLN 刺激と同側の延髄小細胞性網様体へのピククリン注入は、注入直後から、刺激持続中に誘発される嚥下運動の回数を増加させるのみならず、咳運動を誘発し、その効果は注入後 20 分以上持続した ($n = 5$)。SLN 刺激と対側への注入は、刺激持続中に誘発される嚥下運動の回数を増加させた ($n = 1$)。

咽喉頭・呼吸筋活動の統合された多様な反射運動パターンの形成に GABA を介する抑制系が関与している可能性が示唆された。

17. 一酸化窒素 (NO) 合成酵素阻害剤 NG-nitro-L-arginine-methylester (L-NAME) の硝子体注入による網膜血流変化

佐藤栄一¹, 吉田晃敏¹, 坂本尚志² (¹旭川医科大学眼科学講座, ²旭川医科大学第二生理学講座)

虚血時の低 O_2 による網膜血流量増加反応は、毛細血管、終末細動脈における血管拡張と、大口径細動脈における血管拡張によってもたらされ、両者に NO が関与している。本研究では、虚血時の高 CO_2 による網膜血流量増加反応への NO の関与を検討した。

実験には成ネコ (20 頭) を用いた。エンフルレン麻酔下で非動化し、人工呼吸下にて管理した。CO₂ 負荷は混合ガス (CO₂ 5% : O₂ 21% : N₂ 74%) 吸入を 10 分間行った ($n = 20$)。L-NAME (100mM, 50 μl) 硝子体注入後 120 分から CO₂ 負荷を行った (L-NAME 群, $n = 8$)。レーザードップラー眼底血流計 (CLBF model 100, キヤノン社製) を用い、網膜大口径細動脈における血管径、血流速度を同時計測し、網膜血流量 (RBF) 算出した。

CO₂ 負荷により、RBF は有意に増加し、血管径増大 (ΔD) と血流速度増大 (ΔV) は負の相関を示した。L-NAME 群の RBF は有意に増加せず、 ΔV が減少し、 ΔD と ΔV は相関を示さなかった。末梢組織における血流増大は、大口径細動脈での ΔV を引き起こすことから、 ΔV の減少は、毛細血管、終末細動脈における血管拡張の減少による末梢組織の血流増大の低下を示唆する。

5% CO₂ 負荷による RBF 増加反応は、大口径細動脈における血管拡張よりも、毛細血管、終末細動脈における NO を介する血管拡張によることが示唆された。

18. 自発呼吸下でのヒゲ領域刺激による脳局所循環変化

野田坂佳伸, 赤池 忠 (北海道大・歯・口腔機能)

ヒゲ領域を自然刺激または電氣的に刺激し、大脳皮質において感覚入力为契机として生じた内因性光シグナルを計測し、脳局所循環変化を観察した。雄 Wistar rat を用い *a*-chloralose 麻酔下で右側頭蓋骨を削り window を作成した。左ヒゲ 1 本 (D1) を機械的に曲げる (50 ~ 500ms, 1 ~ 2Hz, 1 ~ 20 回) 或いはヒゲ領域に同心針電極を刺入し 1mA (100 ~ 500us, 1 ~ 100Hz) 1 ~ 50 回の刺激を行い、577nm と 605nm (各々オキシヘモグロビン、デオキシヘモグロビン優位の吸収波長) 及び 585nm (吸収率同じ) 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。刺激開始より直ちに 605nm で吸収が増加し 1 ~ 2 秒に後大きく減少し 5 ~ 6 秒で回復する。577nm と 585nm 波長では 0.5 秒以内にほぼ同時に、吸収増大、ともに 5 ~ 7 秒で基線に戻る経過を示した。酸素化状態の変化は血流の局所変化に由来すると考えられる。自発呼吸下では脳血流は周期的に変動しやすく、局所の変化は其中に隠れて見えにくいこと、痛覚刺激によると考えられる反射運動が起こっても大脳局所血流変化は必ずしも観察されないことから、痛覚入力は脳に至る前で主に処理されていることが推測された。

19. Single-cell RT-PCR 法を用いた三叉神経中脳路核ニューロンにおける GABA (A) 受容体のサブユニット解析

石井久淑, 赤坂 徹, 永瀬佳孝, 姜 英男 (北海道医療大学歯学部口腔生理学講座)

三叉神経中脳路核ニューロン (Vmes) は閉口筋の筋紡錘や歯根膜の圧受容器を支配する一次感覚ニューロンであり、中脳に存在する細胞体は GABA (A) 受容体 (GABAAR) を豊富に発現している。本研究では、Vmes のムシモールに対する応答特性に関連する GABAAR サブユニットを主として single-cell RT-PCR 法を用いて明らかにした。Vmes は、脳幹スライス標本を用いたパッチクランプ法においてムシモールの反復投与により漸減する脱分極応答を示し、主として $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ サブユニットを発現していた。 $\alpha 5$ ならびに $\beta 1$ においては extracellular domain 内に deletion をともなう新たな splicing variant が認められた。一方、 $\alpha 2$ サブユニットに対するポ

リクローナル抗体で前処理したVmesでは、FITCとローダミンを用いた2重蛍光染色法により、ムシモールの反復投与は細胞内の蛍光標識されたGABAARの蛍光強度を著明に増加させることが明らかになった。

以上より、VmesのGABAARは、 $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\gamma 1$, $\gamma 2$ サブユニットによって機能的に構成されており、 $\alpha 5$ ならびに $\beta 1$ におけるdeletionをともなうsplicing variantがアゴニストの反復刺激によって引き起こされる受容体の内在化現象に関与する可能性が示唆される。

20. パッチクランプ法を用いた前脳基底部AChに対するNOの影響の検討

傳法佳恵¹, 姜 英男², 平井敏博¹, 永瀬佳孝², 池田和博¹, 寺澤秀朗¹ (¹北海道医療大第一補綴科, ²口腔生理学)

歯の喪失による求心性情報筋の弛緩は、対角帯核・中隔核(NDB/MS)のACh作動性ニューロンの減少を惹起することが報告された。その機構は未だ不明の点が多いが、NDB/MSのACh作動性ニューロンは、NOに非常に障害されやすいことが生化学的に証明された。そこでNOに着目し、NDB/MSのACh作動性ニューロンへの影響を電気生理学的に検討した。

NDB/MSを含むラット脳切片標本を作成し、同ニューロンからパッチクランプ・ホールセル記録を行った。同時に、NOの蛍光指示薬を用いて、NO供与体投与前後の経時的なNO濃度変化を記録した。

NDB/MS細胞は、視覚的に2種の細胞 (type I < 10 μ m, type II > 20 μ m) に分別できた。type Iには低閾値型Ca spikeが、type IIにはA電流が高い割合で観察され、後者はACh作動性ニューロンであると推測された。type IはNO投与による膜電位の変化が顕著ではなく、一方、type IIはNO濃度に比例して膜電位は変化し、NOの反復

投与で細胞の障害が蓄積していった。従って、NDB/MSのACh作動性ニューロンはNOにより容易に傷害をうける可能性が高いことが示唆された。

21. 三叉神経中脳路核ニューロンにおけるh-チャネルとNa⁺/K⁺ポンプの機能協関

永瀬佳孝¹, 重永凱男², 姜 英男¹ (¹北海道医療大学歯学部口腔生理学講座, ²大阪大学大学院・歯学研究科・高次脳口腔機能学講座)

三叉神経中脳路核ニューロンの電気生理学的特性を明らかにするために、ラット脳幹スライス標本を用いてホールセルクランプ法により記録を行った。-80mVのholding potentialから脱分極パルス通電を与えると、パルスオフセット時にK⁺の平衡電位を越える大きく急峻な後過分極電位 (pulse-AHP) が発生する。このpulse-AHPがh-チャネルとNa⁺/K⁺ポンプの相互作用により生じる可能性を検討した。電流固定法では、pulse-AHPがNa⁺/K⁺ポンプの働きによりもたらされ、h電流によるNa⁺の流入がNa⁺/K⁺ポンプの働きを活性化することが示唆された。h-チャネルとNa⁺/K⁺ポンプの機能協関を電圧固定法によりさらに検討した。その結果、(1) 過分極コマンドパルスのonset時に、Na⁺/K⁺トランスポーターのNa結合部にNaが捕捉され、膜に発現しているトランスポーターが同じタイミングで準備状態となり、h-チャネルよりNaの流入が始まるやいなや、Na⁺/K⁺ポンプが一斉に働き、その結果さらなる過分極が進行すること；(2) このNa⁺/K⁺ポンプの働きによりh-チャネルには当初の過分極より大きな過分極がもたらされ、h-チャネルがさらに活性化させることが示唆された。こうしたh-チャネルとNa⁺/K⁺ポンプの機能協関は三叉神経中脳路核ニューロンに極めて特徴的なものである。