

第 87 回北海道医学大会生理系分科会（日本生理学会北海道地方会）

日 時：平成 19 年 9 月 8 日（土）9：00～15：15

会 場：北海道大学歯学部講堂

当番幹事：北海道大学大学院歯学研究科 口腔生理細胞情報学教室 船橋 誠

演 題 数：18 題

日本生理学会北海道地方会は、第 87 回北海道医学大会生理系分科会として上記日程で開催された。18 演題が発表され、活発な討議が行われた。その後のボーリング大会および懇親会も和気藹々とした雰囲気で行われ、盛会にて幕が引けた。本年度よりはじめて、北海道地方会のホームページ（URL <http://square.umin.ac.jp/hk-seiri/>）を設け、地方会開催情報等を掲載した。今後、情報発信の手段として活用されることが期待される。次回当番幹事は北海道医療大学歯学部口腔生物学系生理学分野の予定である。

【一般演題】

1. ラット延髄最後野における c-Fos 発現に対するプロポフォールの影響

○黒住章弘¹、船橋 誠²、平井喜幸³、黄田育宏²、福島和昭¹（¹北海道大学 大学院歯学研究科 口腔病態学講座 歯科麻酔学教室、²北海道大学 大学院歯学研究科 口腔機能学講座 口腔生理細胞情報学教室）

【目的】静脈麻酔薬プロポフォールは全身麻酔後の悪心、嘔吐が極めて少ない麻酔薬とされるが、その制吐に関する機序は不明である。延髄最後野は血液脳関門を欠き、血流を介して到達する様々な物質に反応して嘔吐を誘発する化学受容性嘔吐誘発域とされ、嘔吐しないラットにおいても、最後野の化学刺激により悪心が誘発される。本研究では、塩化リチウム投与による悪心誘発時に最後野において発現する c-Fos タンパクを定量して、最後野ニューロン活動に対するプロポフォールの影響について明らかにすることを目的とした。

【方法】実験動物には SD 系雄性ラット（6-8 週齢）を用いた。プロポフォール 100mg/kg 腹腔内投与し、全身麻酔状態にし、15 分後 0.15M 塩化リチウム 20ml/kg を腹腔内投与し悪心を誘発した。塩化リチウム投与から 45 分後、プロポフォール 100mg/kg を追加投与し麻酔を維持し、塩化リチウム投与から 120 分後、4% パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定した。その後、最後野を含む延髄切片標本（厚さ 50 μ m）を作成し、免疫染色を施し、最後野における c-Fos 発現細胞数を測定した。対照群には生食を用い、以後は同じプロトコルで行った。

【結果と考察】プロポフォール投与群は対照群と比較し

て、最後野における c-Fos 発現細胞数が著明に少ない値を示した。嘔吐の原因は多岐にわたり、嘔吐中枢への入力経路は複数存在するとされているが、本実験結果よりプロポフォールは最後野を介する嘔吐中枢への入力経路に対して作用し、制吐作用を発揮している可能性が示唆された。

2. ラット体性感覚野における BOLD-fMRI 信号と神経活動との相関

○黄田育宏¹、田村 守²、船橋 誠¹、平井喜幸¹、黒住章弘³、山本 徹¹（¹北海道大学 大学院歯学研究科 口腔生理細胞情報学教室、²北海道大学 先端生命科学研究院、³北海道大学 大学院歯学研究科 歯科麻酔学教室、⁴北海道大学 医学部 保健学科）

神経活動と血管反応性のカップリングは、脳機能画像信号を解釈する上で重要な役割を果たすと考えられ、神経活動と血流量変化との関係はよく調べられている。fMRI は、標準的脳機能画像法として広く使われているにも関わらず、神経活動とその信号との関係についての報告は少ない。今回の報告では、刺激周波数と刺激電流に対するラット体性感覚野における BOLD-fMRI 信号と神経活動との相関について検討した。対象は、雄 SD ラット（n=11）とした。ラットを人工呼吸器に繋げ、血液ガス値を正常範囲に調節した。麻酔の α -クロラロスを腹腔内に、筋弛緩剤ミオブロックを静脈より投与した。4 秒間の前足電気刺激を 40 秒間隔で繰り返し行った。刺激周波数は、1, 3, 5, 10Hz、刺激強度は、0.5, 1.0, 2.0mA で行った。MRI 撮像は、Varian 社製動物用 7T MRI 装置により 1cm 表面コイルを用いて行った。BOLD-fMRI 信号は、spin-echo EPI 法により測定した。測定条件は、TR/TE=1000/40ms、FOV=20 \times 20

mm, スライス厚=2mm, マトリックス=32×32とした。得られた BOLD-fMRI 信号(最大値と積分値)は, 刺激電流に関わらず, 刺激周波数 3-5Hz で最大を示した。神経活動については, 体性誘発電位(SEP)を測定し, 刺激中の P1-N1 差の平均値と積分値(平均値×SEP 発生数)を求めた。SEP の平均値においては, 刺激電流に関わらず, 低い刺激周波数ほど大きい値を示した。一方, SEP の積分値は刺激周波数 3-5Hz で最大を示した。BOLD-fMRI 信号と SEP の積分値は比例関係にあることが判明した($r=0.96$)。高磁場 BOLD-fMRI 信号と神経活動を反映する SEP の積分値は良い相関を示した。高磁場 BOLD-fMRI 信号は神経活動の指標となることが示唆された。

3. ノンスパイク介在ニューロンのシナプス統合における能動的膜コンダクタンスの均等/不均等分布の機能的意義

○高嶋 聡, 高畑雅一(北海道大学 大学院理学研究院 生命理学部門 生命機能科学分野)

中枢ニューロンの樹状突起膜は種々の電位/リガンド依存性膜コンダクタンスを持つが, その空間分布が樹状突起でのシナプス統合に及ぼす影響は必ずしも明確でない。節足動物のノンスパイク介在ニューロン(NSI)も活動電位は生じないものの, 種々の電位依存性膜コンダクタンスを持つが, その空間分布とシナプス統合における機能的意義の関係は不明である。ザリガニ腹部最終神経節に存在する同定 NSI である LDS 細胞は, 樹状突起の形態学的・生理学的性質が実験的に詳しく調査されており, 2 種類の一過性および 1 種の持続性電位依存性外向膜コンダクタンスを持っていることが知られている。私たちはこれらの実験データに基づき, LDS 細胞のマルチコンパートメンタルモデルを作成し, シナプス活動を計算機シミュレーションにより再構成した。3 種類の電位依存性外向膜コンダクタンスは時間および電位依存性の Hodgkin-Huxley 型活性化/不活性化ゲートカインेटクスで記述してモデルに組み込んだ。これらコンダクタンスが樹状突起膜上に均一に分布していると仮定した時のシナプス活動をシミュレーションした結果, これら能動的膜コンダクタンスは脱分極性シナプス波形を時間的に短縮することが示唆された。また, 感覚神経束を電気刺激したときに見られる特徴的なシナプス電位波形は LDS 細胞の多数の樹状突起末端に入力があった際のみ現れ, 単一のシナプス入力では生じないことが示された。さらに, 3 種類の能動的膜コンダクタンスの樹状突起上でのさまざまな空間分布パターンがシナプス電位の波形とその拡散に及ぼす効果をシミュレーションにより体系的に調べた。その結果, シナプス電流の細胞内経路に沿っ

た特定の分布様式がシナプス電位の波形とその拡散に有意な影響をもつ可能性が示唆された。

4. 電位依存性カルシウムチャネル α サブユニットとの結合における β サブユニットの GK ドメインの必要性

○小林武志, 山田陽一, 深尾充宏, 白鳥香理, 筒浦理正, 谷本勝正, 當瀬規嗣(札幌医科大学 医学部 生理学第一講座)

電位依存性カルシウムチャネルはボアを構成する α_1 サブユニットと, チャネルの発現と機能を調節する $\beta \cdot \gamma \cdot \alpha_2\delta$ サブユニットからつくられている。過去の報告ではヒト β_1 サブユニットの C 末端側のスプライズバリエーションである β_{1v1} (β_{1a}), β_{1v2} (β_{1b}), β_{1v3} (β_{1c}) が同定済みとなっている。前回, 我々は β_1 の新規のスプライズバリエーションである β_{1v4} (β_{1d}) を同定し, α_1 及び $\alpha_2\delta$ と共に BHK 細胞に共発現させ, パッチクランプ法にてカルシウム電流を測定したところ, 通常観察される β サブユニットによるカルシウム電流の増大効果が観察されなかった。今回その原因を解明すべく western blot analysis 及び binding study を行い, 新たな知見を得たので報告する。 β_{1d} は β_{1b} の GK ドメインの一部及び C 末端の一部を欠損している truncated splice variant である。その為, β_{1d} 蛋白の翻訳後修飾が適切に行われていない可能性が考えられたため, BHK 細胞を用いて蛋白の発現量を測定したところ, β_{1b} 蛋白の発現量に比して β_{1d} 蛋白では発現量の低下が確認された。また, 過去の報告において, α_1 サブユニットの I-II linker と β サブユニットの GK ドメインが結合する事が示されているので, α_1 サブユニット I-II linker 融合 GST 蛋白を作製し, GST pull down 法にて β_{1d} サブユニットに対する結合能を測定した。 β_{1d} は α_1 サブユニットの I-II linker との結合能を欠いていることが判明した。以上より, β サブユニットの GK ドメインが適正に存在することが, 電位依存性カルシウムチャネルの発現および電流修飾機構において重要であることが示された。

5. 1 型糖尿病モデルラット左室筋壁の毛細血管網について

○小山富康¹, 高明²(¹北海道大学 電子科学研究所, ²札幌青葉鍼灸専門学校)

背景] アルカリフォスファターゼ (AP) は生物界に広く分布する。その生物学的意義は未だに明らかでないものの, 血管平滑筋や内皮細胞にも発現している。本研究では左室筋壁の毛細血管網に及ぼす糖尿病の影響を検討した。方法] ストレプトゾトシン (STZ) 溶液の 7 週令雄性ラット尾静脈への注射により, 実験的な 1 型糖尿病を惹起させた。

対照群は溶媒だけを静注した。60日後麻酔下に血液と心臓を採取した。左心室の最大径部位で横断面切片を切り出し、APとDPP4の酵素二重染色法によって染色した。定法によるとSTZ投与心筋では全面が青く染まり、毛細血管の染色性を検定することは殆ど不可能であった。種々検討の結果、AP反応の時間を短縮させ、かつ水洗時間を延長することにより呈色の識別が出来た。顕微鏡下に写真撮影し、APを発現して青く呈色する毛細血管、APとDPP4とを発現して紫に呈色する血管、DPP4を発現して赤く呈色する毛細血管を計数した。血液は血漿AP、グルコース等の分析に供した。結果] AP(274 ± 72 vs $382 \pm 178/\text{mm}^2$)ならびに、APとDPP4両酵素に陽性の毛細血管(464 ± 104 vs $686 \pm 223/\text{mm}^2$)は有意に増加し、DPP4陽性血管は減少した(1173 ± 206 vs $763 \pm 193/\text{mm}^2$)。毛細血管総数は僅かに有意とならなかったが、減少傾向が見られた(1911 ± 206 vs $1831 \pm 168/\text{mm}^2$)。一本の毛細血管が酸素と栄養を供給すると想定される毛細血管ドメイン領域(CDA)は有意に増加した。血漿APは対照群の $790 \pm 58\text{U/dl}$ にたいして $3722 \pm 1387\text{U/dl}$ へと5倍近く増加した。考察と結果] 糖尿ラット心筋切片全体の強いAP反応は、血漿APの強い上昇にも依存していることが判明した。すなわち、血液と毛細血管内皮細胞ともにAPの発現が上昇するとみられるのである。先行研究によればAPは脳のBBBを完成させる、内皮細胞の増殖を抑える、血管平滑筋の増殖を促すという。すなわちAPの大発現は毛細血管構築を抑制して、酸素供給能を減じると想定される。

6. 眼球運動の随意性制御における運動性視床の役割

○國松 淳¹、田中真樹^{1,2} (¹北海道大学 大学院医学研究科 認知行動学分野、²科学技術振興機構 さきがけ研究)

我々は状況に応じて行動を選択することができる。このような運動の随意性制御を調べるための行動課題のひとつとして、antisaccade課題がある。この課題では視標に向かう反射性のサッカド(prosaccade)を抑制し、視標の反対側にサッカドを行わなければならない。被験者は視標に対してどちらの方向にサッカドを行うかをあらかじめ指示され、そのルールに従って一定の視覚刺激に対する反応を柔軟に変化させる。サルを用いたこれまでの研究によって、運動にともなう神経活動の変化は補足眼野と大脳基底核ではprosaccadeに比べてantisaccadeで大きく、上丘のニューロンでは逆にprosaccadeで大きいことが報告されている。このことは基底核の信号がそのまま上丘に送られるのでは説明がつかない。最近、機能画像研究によってantisaccade課題で視床の神経活動が増強することが示され、

また、サルの運動性視床の不活化実験によって同部の信号が自発的な眼球運動の発現に関与することが明らかにされた。これらのことから、antisaccadeの準備や実行には視床を介した皮質-皮質下のネットワークが関与する可能性が考えられる。これを検証するため、anti-, prosaccade課題をおこなっている2頭のサルの視床から、合計95個のニューロン活動を記録した。解析は基底核・小脳から強い入力を受けるVA/VL核と、基底核・上丘からの投射があるMD核を電極の位置によって区別して行った。VA/VL核から記録されたニューロンのうち1/3以上は課題間で異なった活動を示し、全体ではantisaccade課題で有意に活動が大きかった。一方、MD核と考えられる部位からはprosaccadeでより大きな活動を示すニューロンが多数記録されたが、全体では課題の種類によって神経活動の大きさに差を認めなかった。これらの結果から、antisaccadeの制御には運動性視床を介した上行性経路が関与していることが示唆され、この経路によって状況に応じた眼球運動の随意的なコントロールが可能になると考えられる。

7. Reference frames of pursuit neurons in the caudal part of frontal eye fields (FEF) during static roll-tilt

○Kurkin S¹、赤尾鉄平¹、福島順子²、福島菊郎¹ (¹北海道大学 大学院医学研究科 生理学講座 認知行動学分野、²北海道大学 医学部 保健学科 理学療法専攻)

To examine whether coordinate frames representing FEF pursuit signals are orbital or earth-vertical, we compared preferred directions of FEF pursuit neurons of head- and trunk-restrained monkeys in upright position and at 40-60° static roll-tilt. In tilted positions, preferred directions (in body centered coordinates) of all 21 tested neurons were only slightly shifted from upright: by 6° ($\pm 6^\circ$ SD) in 40° right ear down position and by 5° ($\pm 5^\circ$ SD) in 40° left ear down position. The mean difference between upright and 60° right ear down was the same (5°, $n=9$, range 3-7°). This minor shift of preferred directions of the majority of neurons could be accounted for by ocular counter-rolling. Visual motion preferred directions were also similar between upright and 40° right ear down. To examine whether FEF pursuit neurons could signal static whole-body roll-tilt, we compared discharge rates of 29 neurons during fixation of a stationary spot straight ahead of the monkeys' eyes during upright and static whole-body roll-tilt of 40°. Although some neurons exhibited a difference, no consistent effect was observed between the two conditions. Mean (\pm SD, $n=29$) discharge rates during up-

right and right ear down and left ear down conditions were 14 (± 7), 15 (± 7), and 15 (± 8) spikes/s. These results indicate that FEF pursuit neurons code pursuit signals in head/trunk-centered coordinates and do not signal static roll-tilt.

8. 若年サルにおける垂直滑動性眼球運動の非対称と垂直前庭動眼反射 (VOR) 抑制の非対称

○熊倉陽介¹, 赤尾鉄平¹, S Kurkin¹, 福島順子², 福島菊郎¹ (¹北海道大学 大学院医学研究科 生理学講座 認知行動学分野, ²北海道大学 医学部 保健学科 理学療法学専攻)

未成熟霊長類において、静止ランダムドット背景下で視標追跡滑動性眼球運動に上向き特異的な速度低下が見られる。滑動性眼球運動により視標を正確に追跡するためには、背景により誘発される視運動性眼反射の抑制が必要になるが、上向き速度低下は、視運動性眼反射の抑制不全では説明できないため、滑動性眼球運動指令自体の上下非対称が推測される。また、頭部回転中に、頭部と一緒に動く視標を追跡するためには VOR の抑制が必要となる。若年サルでは上向き頭部回転時に下向き VOR の抑制不全が観察される。今回、静止ランダムドット背景なしでも、滑動性眼球運動自体に上下の非対称があるか、また、垂直 VOR の抑制不全は、滑動性眼球運動の上下非対称とどのように関連するかを調べた。方法：3頭の若年サル(4才)を用い、頭部を固定し、水平方向のみ(静止背景なし)の正弦波状視標追跡訓練(0.2Hz)を行った後、垂直方向の視標追跡を2週間連続して訓練した。また、VOR抑制課題、視標を固定し頭部回転のみを与える VORx1課題、視標のみを動かす滑動性眼球運動課題を、正弦波とランプ状の刺激波形を用いて行い、正弦波刺激に対する周波数応答と、ランプ状の刺激に対する応答潜時と時間経過を比べた。結果：左右と下向きに比べ上向きで滑動性眼球運動速度の有意な低下が3頭のうち2頭にみられた。残りの1頭は、当初上下方向の差はなかったが、4ヶ月後には上向き特異的速度低下を示した。VOR抑制不全により起こる眼球速度応答の潜時と時間経過は、VORx1と滑動性眼球運動の和と合致した。結論：滑動性眼球運動自体の上下非対称は、脳内回路における利得の上向き特異的低下に関わることを示唆する。また、VOR抑制は、VORと滑動性眼球運動の2つの機構の和として、キャンセルしあうことによって起こるという説を支持する。

9. 前庭入力による滑動性眼球運動の適応性変化の中核機構—前頭眼野後部領域滑動性眼球運動ニューロンの応答—

○藤原圭志, 赤尾鉄平, 齊藤展士, 福島菊郎(北海道大学 大学院医学研究科 生理学講座 認知行動学分野)

滑動性眼球運動はゆっくり動く小さな視標を、約100msの潜時で中心窩に保持し続けるための追跡眼球運動で、前庭系と互いに影響しあう。静止視標の固視中に前庭回転刺激を与えると同時に視標を直交軸方向に動かし、その追跡訓練を行うことで滑動性眼球運動の潜時の短縮および初期速度の増大が報告されている。今回我々は類似の課題を用い、前頭眼野後部領域の滑動性眼球運動ニューロンがこの適応性変化にどのように関わるかを調べた。

ニホンサルを用い、水平方向に5°/sで動く視標の追跡中に、20°/sの水平前庭回転刺激を与えると同時に視標の運動に20°/sの垂直成分を加え、この追跡課題訓練を繰り返すことにより前頭眼野垂直滑動性眼球運動ニューロンが垂直滑動性眼球運動の潜時の短縮および初期速度の増大に関わるかを調べた。垂直滑動性眼球運動ニューロンの過半数が、垂直視標刺激と同時に水平前庭刺激を加えることで短潜時応答を示した。視覚刺激単独で誘発される垂直滑動性眼球運動の潜時やニューロン応答には、水平前庭刺激を加えた訓練の前後で変化は見られなかった。以上の結果は、前頭眼野後部領域が前庭入力を用いて、本課題での滑動性眼球運動の適応性変化に関与する可能性を示唆する。

10. シナプス前リアノジン受容体による海馬苔状線維シナプス可塑性の増幅機構

○神谷温之(北海道大学 大学院医学研究科 神経生物学分野)

海馬CA3野苔状線維シナプスにおける長期増強(long-term potentiation:LTP)は、NMDA受容体活性化を必要とせず、テタヌス刺激によるシナプス前部でのカルシウム上昇が持続的な伝達物質放出の増大を引き起こすと考えられている。これまでの薬理的検討から、リアノジン受容体が苔状線維シナプスでのLTPに寄与することが示唆されているが、その詳細な作用機序に関しては不明な点が多い。本研究では、軸索標識法によるシナプス前カルシウム動態測定と免疫組織学的解析を併用して、苔状線維シナプス前部のリアノジン受容体の活性化機構と分子局在を調べた。リアノジン感受性細胞内ストアからのカルシウム放出を抑制するTMB-8は、単発刺激によるシナプス前部でのカルシウム上昇にはほとんど影響を与えなかったが、50Hz10発反復刺激によるカルシウム上昇を部分的に抑制した。この際、反復刺激の1発めの応答にはほとんど変化がな

かった。LTPを誘発する100Hz 100発のテタヌス刺激によるカルシウム上昇もTMB-8により抑制された。このとき、テタヌス刺激の初期相にはほとんど変化がなく、後期相で抑制が顕著であった。苔状線維シナプス前部でのリアノジン受容体が神経活動依存的に活性化され、細胞内ストアからのカルシウム放出を引き起こしカルシウム上昇を増幅することによって、シナプス前性の長期増強の誘発に寄与するものと考えられた。さらに、このシナプス前リアノジン受容体の分子の実体と細胞内局在を調べる目的で、リアノジン受容体のサブタイプ特異的抗体を用いて免疫組織化学的解析を行った結果を合わせて紹介し、海馬苔状線維シナプス可塑性におけるシナプス前リアノジン受容体の機能的意義について議論したい。

11. Rat-1 線維芽細胞における時計遺伝子 *Cry1*, 2 強制発現の分子振動系への影響

○大坂 剛, 棚橋祐典, 本間さと, 本間研一 (北海道大学 大学院医学研究科 統合生理学講座 時間生理学分野)

【目的】細胞内サーカディアンリズムの発振は、時計遺伝子の転写とその遺伝子産物によるオートフィードバックループによると考えられている。すなわち転写促進因子 BMAL1/CLOCK 複合体の E-box への結合を介する *Per* 転写促進と、PER および CRY によるその抑制がループを回転させていると想定される。もしこの仮説が正しいとすると *Per* 転写の人為的抑制はリズム振動を停止させるはずである。そこで、*Per* とは逆位相で転写される *Bmal1* 発現を発光レポーターにより連続モニタリングする培養細胞を用い、時計遺伝子 *Cry1*, 2 の強制発現による、持続的なフィードバックループ抑制が分子振動系に与える効果を検討した。【方法】Rat-1 線維芽細胞に、*Per2* または *Bmal1* プロモータ下流に甲虫ルシフェラーゼ (PTGR) cDNA 結合したレポーターベクターと *Cry1*, および *Cry2* 強制発現ベクターをリポフェクション法にて遺伝子導入した後、dexamethasone (100nM) 処理によりリズム誘導を行い、遺伝子発現リズムを発光レポーターにて測定した。発光リズムのピーク位相、周期、振幅、発現量 (AUC) を算出し、*Cry* 強制発現を行わなかった対照群と比較した。また、遺伝子導入した Rat-1 細胞から RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法により *Bmal1*, *Per2* の mRNA 発現量を測定した。【結果と考察】*Cry1*, *Cry2* の強制発現後も、*Per2*, *Bmal1* ともに発光リズムが認められ、ピーク位相、周期に対照群と有意差は認められなかった。しかし振幅および AUC は、*Bmal1*, *Per2* ともに対照群より有意に低下していた。また、それぞれのピーク位相で測定した *Per2* mRNA 量は有意に

低下していたが、*Bmal1* に変化はみられなかった。以上の結果より、CRY の持続的上昇は、時計遺伝子発現リズムの振幅は抑制するが、振動には影響しないこと、また、転写刺激は低下しても mRNA 量の低下はわずかであることが明らかとなった。

12. マウス視交叉上核における多振動体の局在と機能：極端な長日条件を用いた検討

○中川竜也, 本間さと, 本間研一 (北海道大学 大学院医学研究科 生理学講座 時間生理学分野)

哺乳類の生物時計は視床下部視交叉上核 (SCN) に存在し、光を主な同調因子として明暗周期に同調している。現在、夜行性齧歯類の光周期同調には夕方の活動を支配する E 振動体、朝方の活動を支配する M 振動体と呼ばれる 2 振動体の関与が示唆されており、両振動体間のカップリング変化により異なる日長への同調が達成されると考えられている。当教室の先行研究では、SCN 内に E・M 振動体に相当する部位特異的な振動細胞群の存在を明らかにした。また、長日条件下でのみ第三の振動体の存在が示唆されたが、機能は未だ不明である。本実験では、更に極端な長日条件を用いて SCN 内の第三の振動体機能を検討すると共に、未だ局在の不明な光情報に直接反応する振動細胞群の探索を目的とした。【方法】動物は、生物発光により時計遺伝子 *Per1* 発現のモニター系を導入した C57BL/6J 由来トランスジェニックマウス (*Per1-luc*) 及び C57BL/6J 野生型マウスを用い、明期 12h, 暗期 12h (LD12:12) 下で 2 週間の後、LD20:4 または LD22:2 の超長日条件下で 1~6 週間飼育した。野生型マウスは、更に恒常暗下で 4 週間飼育した。行動測定は全実験期間で行った。*Per1-luc* マウスは脳を摘出し、連続 2 枚の冠状断切片 (厚さ 300 μ m) より SCN を切り出し、ルミノメーターにて *Per1* 発現リズムを測定した。【結果】行動測定結果から、LD20:4 では 1 週目以降で安定した同調が認められた。LD22:2 では、光周期への同調成分と共にフリーランする行動成分も出現し、行動成分が 2 つにスプリットした。*Per1* 発現リズムでは、LD12:12 で単相性であったが、LD20:4, 22:2 では共に吻側 SCN で二相性を示した。*Per1* 発現ピークと活動開始終了位相の相関関係を検定すると、夕方に発現する吻側 SCN の *Per1* 発現ピークは活動開始位相と、朝方に発現する尾側 SCN の *Per1* 発現ピークは活動終了位相と、朝方に発現する吻側 SCN の *Per1* 発現ピークは明期開始位相と最も強く相関していた。これらの実験結果から SCN 内における多振動体の局在および機能を検討する。

13. エゾタヌキ実験用冬眠動物の可能性検討一

○橋本真明¹, 北尾直也¹, オズボーン ピーター¹, 福井大祐², 坂東 元², 小菅正夫² (¹旭川医科大学 医学科生理学講座 自律機能分野, ²旭川市 旭山動物園)

冬眠の生理学研究には人工環境下での冬眠誘導と室内での実験操作が不可欠である。また、得られた研究成果をヒトの生命科学に還元する上で、温熱生理学的観点から、ヒトにより近い大きさは重要な因子である。冬眠する実験動物はリス、ハムスターなど小型の動物が多く、得られる研究成果のヒトへの応用範囲は限られる。北海道にはエゾタヌキが棲息し、冬眠(冬ごもり)する可能性を示唆する報告もあるが、冬眠するか否かを含め、冬期の生態・生理には不明な点が多い。冬眠行動が確認され実験動物化が可能であれば、冬眠生理学の発展に大きく貢献する事は論を待たない。旭川市旭山動物園に救護され、自然復帰困難と判断されたエゾタヌキ6頭を用い、園内半人工環境下での冬期の生理を検討した結果について報告する。11月上旬、メス2頭の腹腔内にテレメトリー送信機を留置し、心電図と体温をモニター・記録した。屋根付き金網小屋に人工の巣箱を設置し、積雪開始とともに巣箱周辺に雪を撤入、12月中旬まで飽食の後、1週間かけて減食後絶食とした。3月中旬の再給餌開始まで記録を続けた。絶食開始の前後で採血し性状を検査した。他の4頭は冬期も通常の給餌と続けた。絶食動物の血液性状は12月絶食開始前に比べ、3月再給餌開始直前には赤血球容積、血清タンパク、尿素窒素、総コレステロール、中性脂肪が低値を示した。給餌継続動物では冬期と春期の性状に顕著な変化は無かった。1~2月の間、巢内で過ごす時間は長くなった。体温、心電図とも巢内でのみ記録可能であった。通常体温は約37℃、心拍数は100前後であり、記録された最低心拍数は54、それに10~15分遅れ最低体温35.4℃を記録した。今回の観察からは冬眠を示す証拠が得られず、人工環境下での冬眠誘導は困難かもしれない。心拍数の減少から判断しエネルギー代謝は半減していた可能性があり、例数を追加しその点を確認したい。野生タヌキでの記録も検討中である。

14. ウシ毛様体筋の収縮調節に関与するムスカリン受容体作動性信号伝達経路

○高井 章, 宮津 基, 安井文智(旭川医科大学 生理学講座 自律機能分野)

【背景】視覚遠近調節を司る毛様体筋は副交感神経支配の特化した平滑筋で、伝達物質アセチルコリンによるムスカリン受容体の刺激の続く限り一定の張力を保持し続ける特性をもち、安定な焦点調節を可能にしている。さきに入れわれは、ウシ毛様体筋を用いた実験により M₃ ムスカ

リン受容体(M₃R)刺激に応じて開講する2種類の非選択性陽イオンチャネル(NSCCLとNSCCS)を同定し、それらが持続的な筋収縮に必要な細胞外からのCa²⁺流入の主要経路として機能することを示した。今回は、これらのチャネルの電気生理学的特性とともに、その活性化に関連する信号伝達経路についての最近の実験結果を報告する。さらに、この組織で同定された4種類のTRPCとNSCCL/NSCCSとの関連を示唆するいくつかの新知見を提示する。

【方法】膜電位固定法による全細胞膜電流の記録とFluo-4蛍光法による細胞内Ca²⁺([Ca²⁺]_i)の記録には、酵素処理で単離したのち、fibronectin処理したガラス小円盤表面で1-5日培養したウシ毛様体筋細胞を用いた。免疫染色には、培養細胞に低浸透圧下で超音波パルスを加え細胞体を除去したあとガラス表面に付着して残った細胞膜を用いた。

【結果と考察】単離細胞において、カルバコール(CCh; 0.5-2μM)はNSCCL/NSCCS電流の活性化と、[Ca²⁺]_iの上昇を起した。G_{q/11}阻害剤であるYM-254890(YM; 10μM)の細胞外投与により、それらの初期相、持続相とも完全に抑制された。一方、多くのTRPチャネルにも抑制効果を示すことで知られるLa³⁺、Gd³⁺およびSKF-96365は1-100μMの濃度範囲で持続相のみを濃度依存性に抑制した。TRPC6電流を増強することが報告されているfulfenamateは、10-100μMの濃度でNSCCL電流にも増強作用を示した。免疫染色による実験では、細胞膜標本のαアクチン陽性領域に集中して、M₃R、G_{q/11}、TRPC1、TRPC3、TRPC4およびTRPC6に特異的な抗体の結合を示す蛍光スポットが、いずれも1μm²以上という高密度で検出された。TRPCはNSCCL and/or NSCCSの有望な分子候補といえる。

15. 前頭眼野追跡眼球運動ニューロンに対する頸部固有受容器からの入力

○齊藤展士^{1,2}, 赤尾鉄平¹, S Kurkin¹, 福島菊郎¹ (¹北海道大学 大学院医学研究科 生理学講座 認知行動学分野, ²北海道大学 医学部 保健学科 理学療法専攻)

【目的】ゆっくり動く視標の追跡に滑動性眼球運動が働く。日常生活では多くの場合、静止した体幹に対して頭部追跡を伴って追跡眼球運動を行うので、滑動性眼球運動と頭部運動の協調が必要になる。前回、我々は前頭眼野追跡眼球運動ニューロンが頸部固有受容器から入力を受けることを報告した。今回、頸部固有受容器からの応答の性質を調べた。【方法】2頭のニホンザルの前頭眼野から滑動性眼球運動ニューロンを記録した。頭部を空間内で固定した状態で正弦波状(0.3Hz, ±10°)あるいは台形波状(20°/s, ±10°)に他動的な水平体幹回転を与えることにより、頸部固有受容器を刺激した。体幹回転中に静止視標を固視させ、

あるいは視標を追跡させた。【結果】水平方向に最適方向を持つニューロンの大多数が固視中に体幹回転刺激に应答した(82/106=77%)。正弦波状の体幹回転刺激に対し2相性に应答したニューロンを除く80個の体幹回転速度に対する应答位相は、53個がほぼ速度位相(0~45, 135~180度)、27個がほぼ位置位相(45~135度)であった。体幹回転速度に対する应答感度の平均は0.56sp/s/deg/sであった。このうち34個で台形波状の体幹回転刺激を与えた。33個は一定速度の体幹回転中に持続的に発射頻度が増加し、その大多数が正弦波状の体幹回転刺激に対しても速度位相を示した。また、16個は、頭部に対する体幹の位置がずれて静止している間に持続的に発射頻度が増加し、その多くは正弦波状の体幹回転に対して位置位相を示した。应答潜時の最頻値は75msであった。追跡課題でのニューロン应答は滑動性眼球運動課題での应答と固視課題での应答の線形加算になった。【結論】頸部固有受容器からの入力を受ける前頭眼野追跡眼球運動ニューロンの应答は頭部に対する体幹の速度情報と位置情報の両方を持つ。

16. ラット視交叉上核における時計遺伝子発現の四次元解析：光周期への反応

○徳丸信子, 福元達也, M.P. Butler, 本間さと, 本間研一(北海道大学 大学院医学研究科 生体機能学専攻 生理学講座 時間生理学分野)

【目的】哺乳類では視床下部視交叉上核(suprachiasmatic nucleus, SCN)に生物時計が存在する。生物時計は光周期の変化に反応して、その効果は行動リズムに反映される。光周期性の背後にあるとされる2振動体のSCN内局在を調べるため、ラットを対象として短日・長日下でSCNにおける時計遺伝子 *Per1*, *Per2* 発現を四次元解析した。

【方法】Wistar系雄ラットを明暗18:6(長日)と6:18(短日)の2種類の光周期に暴露して、行動リズムが各光周期条件に同調した後、1日のみ恒常暗(DD)において3時間間隔で灌流固定し、脳を採取した。厚さ30 μ mの冠状断連続切片を作成し、ジゴキシゲニンラベルプローブによるin situ hybridizationを行った。SCNを75 μ m四方の区画に分け、区画別に陽性細胞数を計測した。

【結果】長日下では、*Per1*発現細胞数のリズムは吻側では明期開始と終了後にピークを持つ2相性を示したが、尾側に移行するに従って、1つのピークに統合された。また尾側での発現ピークが吻側での発現ピークより早い時間帯に見られた。しかし*Per2*発現リズムには*Per1*ほど顕著な部位別変化はなかった。また短日下では、遺伝子発現リズムの部位差は小さくなった。

【考察】長日下の*Per1*発現からM振動体は尾側にあると考えられ、一方E振動体は吻側に存在していると考えられる。E振動体とM振動体のカップリングが光周期性により変化することによって、行動リズムに光周期性が発現すると考えられる。

17. 除脳ウサギの四肢協調歩行誘発における歩行駆動経路の部分的遮断の影響

○松山清治¹, 石黒雅敬¹, 青木 藩²(¹札幌医科大学 医学部 第二生理, ²北海道文教大学 人間科学部 理学療法学科)

【目的】除脳ウサギの片側楔状核(中脳歩行誘発野, MLR)に連続微小電気刺激を加えると四肢に歩行運動が誘発される。誘発される歩行運動は前肢の左右交互運動と後肢の左右同位相運動を特徴とする。歩行パターンの違いにも関わらず、前肢と後肢の運動は周期が一致し協調している。本研究ではMLRの歩行駆動信号が如何なる経路を介して脊髄に伝達され四肢協調歩行運動の誘発に関わるかを知るため、脳幹及び脊髄に部分的切断を加え、歩行運動発現に如何なる影響が現れるかについて検討した。【方法】ハロセン深麻酔下で上丘前縁と乳頭体後縁を結ぶ面上位脳を離断し除脳ウサギ標本を作製した。除脳ウサギの頭部を脳定位装置に固定し、胸腹部をゴムベルトで保持した。ウサギの左側MLRに連続微小電気刺激(50Hz, 持続0.2ms, 10~100 μ A)を5~15秒間加え歩行運動を誘発した。歩行動作を左側面よりビデオ撮影するとともに、四肢伸筋と屈筋から筋電図を導出記録した。一連の観察終了後、ウサギを再度ハロセン麻酔し、脊髄半切断または脳幹部分切断を加え、MLR刺激により誘発される歩行運動を観察した。【成績】右上部頸髄を半切断した除脳ウサギで左MLRを刺激したところ、左前肢—後肢のみに協調歩行運動が誘発された。さらに左下部延髄に切断を加えたところ、MLR刺激により左前肢—後肢の歩行運動も誘発されなくなった。別の例において、橋延髄正中部を矢状方向に切断し、片側(左)MLR刺激を刺激したところ、両側前肢—後肢の協調歩行運動が誘発された。さらに左下部延髄に半切断を加えたところ、左MLR刺激で右側前肢—後肢のみに歩行運動が誘発された。【結論】ウサギの片側MLRからの歩行駆動信号は中脳レベルで一部が交差し両側脳幹に伝達される。左右脳幹のそれぞれの側からの信号は同側性に頸髄と腰髄に伝達され、それぞれの側の前肢—後肢の協調歩行運動を誘発する。四肢の協調歩行運動を誘発するためには、脊髄両側に下行する歩行駆動信号の存在が必要である。

18. 姿勢筋緊張と脊髄反射弓

○高草木 薫 (旭川医科大学 生理学 神経機能分野)

姿勢筋緊張は起立するために必要な持続的な筋の張力である。筋緊張の制御に関与する基本的神経機構は脳幹と脊髄とに存在するので、大脳皮質、基底核、小脳の出力は脳幹～脊髄に存在する筋緊張制御系の活動を介して運動に伴う筋緊張の調節・維持に関与する。我々は、脚橋被蓋核から橋・延髄網様体(延髄抑制野)を経由して脊髄に至り、脊髄内の抑制性介在細胞を介して四肢筋の運動細胞の活動を抑制し、筋緊張の減弱・抑制を誘発する網様体脊髄路系を同定した。この経路が作動すると四肢の筋緊張が低下すると共に、歩行などのリズム運動も抑制される。そこで本研究では、この筋緊張抑制系がどの様に脊髄反射弓の活動を制御し、姿勢と運動の制御に関与するのか解明を試みた。除脳ネコの脊髄から、運動細胞群(n=216)、介在細胞群(n=191)、一次求心性神経線維(n=18)の細胞内・外の活動を記録した。延髄抑制野に微小電気刺激(20-40 μ A, 3連発)を加えると、運動細胞(n=212)にPeak la-

tency 約 50ms の IPSP が観察された。同様の抑制作用は脊髄中間層や前角の介在細胞群(n=67)にも誘発された。これらの介在細胞には、Ia 介在細胞、Ib 介在細胞、Renshaw 細胞、屈曲反射経路の介在細胞などが含まれていた。しかし、55 個の介在細胞には同様の time course からなる興奮作用が誘発された。それらは前角(Rexed VII 層)に分布しており、屈曲反射経路からの抑制入力と、一部は、さらに Ib 線維からの単シナプス性興奮入力を受けていた。一方、後角の介在細胞(n=69)は延髄抑制野の刺激により応答しなかった。また、大多数の感覚線維に(n=14/18)に Primary afferent depolarization (PAD) が誘発された。これらの成績は、筋緊張抑制系は脊髄反射弓を構成する神経細胞群(運動細胞・介在細胞・感覚線維)の活動を抑制することにより筋緊張と運動の抑制に関与することを示唆する。また、Rexed VII 層に存在し、延髄抑制野からの興奮を受け、屈曲反射から抑制を受ける介在細胞群が、これら脊髄反射弓の神経細胞群に対する抑制作用を誘発すると考えられる。