

第 89 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 21 年 9 月 12 日（土）9：30～15：10

場 所：北海道大学情報科学研究科

当番幹事：北海道大学・大学院情報科学研究科細胞情報工学研究室 河原剛一

演 題 数：19 題

日本生理学会北海道地方会は、第 89 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ました。19 演題が発表され、およそ 50 名の先生方にご参加いただき、活発な質疑応答が行われました。地方会の終了後には、毎年恒例のスポーツ大会（ボーリング大会）および懇親会（ジンギスカンパーティー）が開催され、30 名を越える多数の方々に参加していただいて懇親を深め、盛会裏に終えることが出来ました。参加者の皆様に厚くお礼申し上げます。なお次回の当番幹事は、旭川医科大学・医学部・生理学講座・神経機能分野の予定です。

1. 補足眼野と記憶依存性滑動性追跡眼球運動

○七戸夏子^{1,2}、赤尾鉄平¹、Kurkin, Sergei¹、福島順子³、福島菊郎¹（¹北海道大学大学院医学研究科認知行動学分野、²北海道大学大学院医学研究科眼科学分野、³北海道大学大学院保健科学研究院）

【目的】滑動性追跡眼球運動は、対象の網膜上の運動を主要入力とし、眼球運動が出力となるが、網膜上の入力がない場合でも予測的におこる（e.g. Becker & Fuchs 1985）。補足眼野（SEF）において滑動性追跡眼球運動関連ニューロンの予測に関連した応答が報告された（Heinen & Liu 1997, de Hemptinne et al. 2008）が、これらの研究では予測的な応答が視覚情報処理または記憶の過程と、眼球運動の準備過程のどちらを反映したものか区別していない。これらを区別する新しい眼球運動課題を用い、SEF のニューロン応答と不活性化効果を調べた。【方法】コンピュータディスプレイ上の固視点の周囲に一方方向に動くランダムドットを提示し（cue 1）、遅延期間（delay 1）の後、追視（go trial）または固視（no-go trial）を指示する cue 2 を提示した。さらに遅延期間（delay 2）の後、固視点から cue 1 と同一および反対方向に動く 2 つの視標と、静止視標を提示した。2 頭のニホンザルを訓練し、delay 2 まで固視点を注視したのち、3 視標から正解を選び、追視または固視を行わせた。課題遂行中に SEF から課題関連ニューロンを記録し、応答特性を調べた。次に、両側 SEF にムシモルを注入し、注入前の眼球運動と比較した。【結果】Go trial で方向特異性を持ち delay 1 に応答したニューロン、delay 2 に応答したニューロン、両者に応答したニューロンがみられた。No-go trial で特異的に応答したニューロンもみられた。両側 SEF にムシモル

を注入すると、正解率と眼球運動の初期速度が低下した。

【考察】以上の結果は、SEF が予測性滑動性追跡眼球運動における視覚情報処理から運動準備までの過程に関わることを示す。

2. 小脳背側虫部と記憶依存性滑動性追跡眼球運動

○田代真理¹、七戸夏子^{1,2}、赤尾鉄平¹、Kurkin, Sergei¹、福島順子³、福島菊郎¹（¹北海道大学大学院医学研究科認知行動学分野、²北海道大学大学院医学研究科眼科学分野、³北海道大学大学院保健科学研究院）

【背景と目的】滑動性追跡眼球運動は、対象の網膜上の運動を主要入力とし、中心窩に対象像を固定して、その視覚情報を正確に捉えることに用いられる。この運動は予測的にも起こる。この運動発現経路である補足眼野で予測に関連したニューロン応答が報告されたが（Heinen 1995; de Hemptinne ら 2008）、これらの研究では、予測関連応答が視覚情報処理過程に関連した応答か、運動準備に関連した応答かを区別していない。これらを区別するため、本研究室では、記憶依存性滑動性追跡眼球運動課題を開発した（Shichinohe ら 2009）。滑動性追跡眼球運動における予測には、小脳の関与が指摘されているが（Thier & Ilg 2005 総説）、詳細は不明である。本研究では、背側虫部が記憶依存性滑動性追跡眼球運動課題の実行にどのように関わるかを理解するため、Purkinje 細胞を調べた。【方法】2 頭のニホンザルにコンピューターディスプレイを使って以下の課題を訓練した。固視点の提示後、一方方向に動くランダムドットを提示し（cue 1）、2 秒の遅延時間（delay 1）の後に追視するか（go）、あるいは固視するか（no-go）の準備を指示する cue 2 を提示した。さらに 2 秒の遅延時間（delay 2）をお

いた後、固視点から cue 1 と同一方向および反対方向に動く 2 つの視標と、静止視標を提示した。サルは delay 2 まで固視点を注視し、3 視標から正解を選び、追視または固視を行った(action)。背側虫部から課題関連 Purkinje 細胞を記録し、その応答特性を調べた。【結果】go trial で、方向特異性を持って delay 2、action に応答し、運動準備の関わりが推定される Purkinje 細胞が記録された。これらとは別に、no-go trial で cue 2 以降に強い応答を示した Purkinje 細胞が多数、記録された。

3. 前頭眼野追跡眼球運動ニューロンに対する耳石器入力

○赤尾鉄平¹、Kurkin, Sergei¹、福島順子^{1,2}、福島菊郎¹
(¹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、²北海道大学大学院保健科学研究院)

【背景と目的】滑動性追跡眼球運動は、ゆっくり動く視標を網膜中心窩に保持し続けるために用いられる。頭部が動く場合、この運動は前庭眼反射と干渉を起こす。これまでに前頭眼野追跡眼球運動ニューロンが、回転刺激による半規管入力を受けることが明らかにされたが、耳石器入力については不明であった。前頭眼野追跡眼球運動ニューロンに対する耳石器入力を調べるため、今回、我々は水平面での直線加速度刺激により卵形のうを選択的に刺激し、単一ニューロン応答を調べた。【方法】頭部を固定したニホンザル 2 頭を用いた。追跡眼球運動ニューロンの最適追跡方向を決めるため、偏向シャッター付き眼鏡 (120Hz) を用い、視標を、前額面と奥行き方向を連合した 3 次元仮想空間で動かした。前額面の視標追跡のみ、奥行き方向(輻輳運動)のみ、その両方に応答するニューロンの 3 群にタイプ分けした。これらニューロンに対する耳石器入力を調べるため、完全暗室下で左右あるいは前後方向へ身体全体を正弦波状に動かし(0.33Hz, 19cm/s, 0.04g)、直線加速度刺激を与えた。比較のため、直線加速中に視標を眼前距離 65cm で静止させた。【結果】前頭眼野後部領域から 68 個の追跡眼球運動ニューロンを記録した。完全暗室下での直線加速度刺激に対し、3 群のタイプのいずれも、その大多数(68%)が応答した。完全暗室下での直線加速度刺激に対する耳石器眼反射は、左右方向では利得 0.53(水平眼球速度/頭部速度)で出現したが、前後方向では殆ど出現しなかった(利得<0.03, 輻輳眼球速度/頭部速度)。ニューロン応答と、同時に記録された耳石器眼反射とは関連しなかった。さらに、45 度方向への直線加速度刺激により、ニューロン応答と耳石器眼反射との乖離が起こったので、ニューロン応答は耳石器眼反射の結果を反映したものではなく、耳石器入力による応答であることを示す。

4. 耳石器入力による前庭眼反射と視標追跡眼球運動の干渉：前頭眼野および小脳片葉領域追跡眼球運動ニューロンの応答

金島基行、赤尾鉄平、福島菊郎(北海道大学大学院医学研究科認知行動学分野)

【背景】ゆっくり動く視標を網膜中心窩に保持し続けるためには視標運動に対する前額面の追跡眼球運動と奥行き方向の輻輳運動の協調が必要である。頭部が動く場合、この三次元性追跡眼球運動と前庭眼反射の干渉を起こす。これまでに前頭眼野が回転刺激による半規管入力だけではなく、直線加速度刺激による耳石器入力を受けることが報告された。耳石器による前庭眼反射の制御には視標の眼前距離が影響するので、今回我々は左右方向への直線加速度刺激中に、視標の眼前距離を変化させ、前頭眼野追跡眼球運動ニューロンがどのような応答を示すか調べた。また滑動性眼球運動の発現に必須である小脳片葉領域においても、同じ刺激課題を用いて応答を比較した。【方法】頭部を固定したニホンザルを用い前頭眼野と小脳片葉領域から単一ニューロン記録を行った。偏向シャッター眼鏡(120Hz)を用い視標を三次元仮想空間に示した。まず、視標を前額面と奥行き方向を連合した三次元方向へ動かし、追跡させた。この三次元性追跡眼球運動応答ニューロンに対し、左右方向へ身体全体に正弦波状(0.33Hz, 19cm/s, 0.04g)の直線加速度刺激を与えた。課題として、視標と身体全体を同振幅、同方向に動かす前庭眼反射抑制課題と、直線加速中に空間で静止した視標を固視させる前庭固視課題を用いた。また、それぞれの課題において視標の眼前距離を 65cm, 45cm, 25cm と変化させて両眼の輻輳角を変化させ、その間のニューロンの応答を記録した。【結果】前頭眼野の三次元性追跡眼球運動ニューロンでは、前庭眼反射抑制課題と前庭固視課題の両課題で応答がみられ、その両応答の間に違いがみられた。一方、小脳片葉プルキンエ細胞では前庭固視課題でのみ応答がみられた。特に前額面の水平方向の速度成分にのみ応答した片葉領域三次元性追跡眼球運動ニューロンでは、前庭固視課題中に視標の眼前距離変化に相關した応答を示した。

5. Analysis of Purkinje Cell Discharge of the Cerebellar Floccular Region During 3D-Pursuit

○Kurkin, Sergei, 赤尾鉄平, 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)

Previous studies showed that, during smooth pursuit in the frontal plane, the majority of floccular Purkinje cells (PCs) are sensitive to position and/or velocity of eye motion. To estimate discharge modulation during pursuit to

target motion in frontal and depth directions (i.e., 3D-pursuit), we used the least squares technique to fit spike density function by time-shifted linear combination of eye position and eye velocity. We analyzed responses of 109 PCs at least in two of three directions (horizontal, vertical, depth) during sinusoidal target motion at 0.1-1.0Hz. To compare discharge modulation during pursuit along different directions, for all cells we calculated unified directional sensitivities defined as vector sum of position and velocity sensitivities. Using this approach we found that a majority of PCs tested (~75%) was sensitive to both frontal and vergence motion. PC responses to combined frontal and depth motion were well predicted by linear sum of frontal and depth responses. Position versus velocity response sensitivity ratio (PVSR) showed a significant positional preference during depth pursuit (PVSR = 1.42), higher sensitivity to velocity during horizontal pursuit (PVSR = 0.73) and no position-velocity preference during vertical pursuit (PVSR = 1.02). Position and velocity preferred directions were the same in the majority of PCs tested. Our results indicate mixed vergence-version sensitivity and higher position sensitivity to vergence motion for the majority of PCs tested.

6. 欠落 oddball 課題における 2 種類の検出メカニズム

○大前彰吾¹, 植松明子^{1,2}, 田中真樹^{1,2} (北海道大学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)

我々はリズムの乱れを鋭敏に知覚できる。この様な時間情報処理の神経機構に迫るため、周期的に与えられる聴覚刺激 (1kHz, 20ミリ秒) の一拍を欠落させ、これに対するボタン押し反応を健常被験者で調べた。刺激間隔は 40-1200 ミリ秒の範囲で試行毎にランダムに選んだ。【実験 1】では 1 人の応答潜時を調べた。平均潜時は全ての条件、被験者で 400 ミリ秒未満であり、刺激間隔が 400 ミリ秒以上の場合には欠落直後の刺激に先行して反応していた。これは予測誤差による oddball の検出を意味する。また 400 ミリ秒以下では刺激間隔が短いほど潜時が直線的に短くなった。これらから、1) 刺激間隔の長短によって oddball の検出機構が異なり、2) 短い条件では周期的刺激を連続音とみなしてその休止を検出し、長い条件では一拍ごとのタイミング予測を行っている、と考え以下で検証した。【実験 2】では連続音の休止に対する応答潜時を測定した。連続音を刺激間隔ゼロの条件と同じであるとみなすと、実験 1 と同様の 400 ミリ秒以下の刺激間隔と潜時の直線関係で連

続音の休止に対する潜時がよく説明できた。これは仮説 2) を支持する。次に【実験 3】では、離散的な刺激を連続として認識するには同じ神経集団に inputs される必要があると考え、毎回の刺激 (間隔 40-400 ミリ秒) をランダムに選んだ左右の耳の一方に提示し、欠落の検出率を調べた。両耳条件 (対照) ではいずれの刺激間隔でも 95% 以上の検出率であったが、片耳条件では短い刺激間隔 (40, 80 ミリ秒) で 30% 未満にまで低下した。直線近似による推定では検出率が 50% を超える最小刺激間隔は 98-266 ミリ秒となり (n=5), 200 ミリ秒周辺での検出機序の切り替わりを示唆している。刺激間隔が短いときには聴覚野等の low-pass 特性によって刺激の欠落を連続音の休止として扱うのに対して、刺激間隔が長くなると両耳の情報を統合して一拍ごとのタイミングの予測を用いることによって刺激の欠落を検出している可能性が考えられる。

7. サル前頭前野における空間的注意のトップダウン制御

○松嶋藻乃¹, 田中真樹^{1,2} (北海道大学医学研究科・認知行動学分野,²科学技術振興機構さきがけ研究)

私たちは、目を動かさずに動き回る複数の物体のひとつを選択し、これに注意を向け続けることができる。最近の心理物理実験によると、このような状況下では選択された Target 周辺の視覚情報処理が増強され、それ以外の Distractor 周辺の視覚情報処理は積極的に抑制されている (Pylyshyn, 2006)。こうした空間的注意の文脈依存的な制御の神経機構を調べるため、Covert tracking 課題遂行中のサルの前頭前野より単一ニューロン活動を記録した。本課題では、視野内を動き回る同形同色の視覚刺激のうち 1 つを選択し、固視点を見つめたまま、それを内的に追跡することが要求される。記録した 130 個以上の前頭前野ニューロンのうち、約 6 割は主として Target の位置によって活動を変化させ (Attention type)、残りは Distractor のみ (Distractor type) か、Target と Distractor 双方に反応した。双方に反応するものには、Target と Distractor に対する受容野の位置が同じもの (Purely visual type) と、異なっているもの (Conditional type) の 2 種類があった。Distractor type および Conditional type は Distractor に対する視覚情報処理の抑制に関与すると考えられるが、Target と外見が同じで能動的に区別する必要のある Distractor に対してのみ反応するのか、Target 以外の全てのものに対して反応するのか、上記の課題では明らかでない。そこで Target と同形同色の Distractor に加え、色の異なる Distractor を同時に提示したところ、前者にのみ反応を示すニューロンが見出された。これらの結果は、Target 周辺の

視覚情報処理を促進する信号と、Distractor 周辺の視覚情報処理を抑制する信号が、前頭前野の異なった細胞群によって担われていることを示唆する。これらのトップダウン信号は、視覚刺激を能動的に区別する際に重要な役割を果たすと考えられる。

8. サル前頭葉内側部の微小電気刺激が運動タイミングに及ぼす影響

○國松 淳¹, 田中真樹^{1,2} (北海道大学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)

われわれは自ら意図したタイミングで運動を開始することができる。自発運動の発現に前頭葉内側部が関与しているとの報告がこれまでに数多くなされてきたが、どのような信号によってそのタイミングが制御されているかは未だ明確でない。最近、指示された運動のタイミングによって、前頭葉から記録される事象関連電位の時間経過が変化することが報告された (Pfeuty et al., 2005)。また、運動性視床において眼球運動の準備期間に徐々に増強する神経活動が見いだされ、これが自発性眼球運動のタイミング制御に関与することが示唆されている (Tanaka, 2006-7)。解剖学的な結合から、これら視床の信号は前頭葉内側部に送られ、自発運動のタイミングを制御している可能性がある。これを検証するため、視覚刺激に応じて即座に眼球運動を開始させる課題 (Triggered 課題) と、視覚刺激の提示後、一定の遅延期間において自発的に眼球運動を開始させる課題 (Self-timed 課題) を 2 頭のサルに訓練した。運動準備期間に前頭葉内側部の微小電気刺激 ($\leq 100\mu\text{A}$) を行った結果、29ヶ所で運動開始時間に有意な変化がみられた。それぞれの刺激部位で中央値の変化を比較すると、ほとんどの部位では Self-timed 課題のみで運動の遅延が見られた。また全体で比較しても、刺激効果は Triggered 課題よりも Self-timed 課題で有意に大きかった。一方、それぞれの刺激部位で運動開始時間の分布を調べると、11ヶ所 (38%) では中央値が延長しているにもかかわらず、一部の試行で刺激による促進効果が確認された。要求される運動の方向を変化させてもこの促進効果がみられたことから、前頭葉内側部の準備期間活動は運動のゴールではなく、そのタイミングに関与していると考えられる。これらの結果から、運動の自発的なタイミング制御に前頭葉内側部の神経活動が関与していることが明らかとなり、その制御には運動準備期間中の徐々に増強する活動が重要であることが示唆される。

9. 細静脈血管網による骨格筋の酸素供給の可能性

○小山富康, 笹嶋唯博 (北海道大学(元)電子科学研)

閉塞性動脈硬化症などでは、しばしば下肢血流が阻害さ

れ、代替の酸素補給路を作らなければ、悲惨な病態が進行する。本研究ではラット骨格筋の細静脈血管網に関する測定報告を用いて、静脈からの逆行性灌流により骨格筋への酸素供給が可能か否かを、Krogh の組織管モデルに基づいて検討した。collecting 細静脈密度と arcade 細静脈密度とはそれぞれ 2.32, 2.11mm/mm³ と報告されている。これらを全て伸展して、単一の細静脈円筒化すると、4.43mm/mm³ が得られる。この逆数から、この血管が担当する組織円筒の半径は 268 μm となる。安静骨格筋の酸素消費量 0.16 ml/100g/min, 拡散係数 $D = 1.6 \times 10^{-5} \text{cm}^2/\text{sec}$, 酸素の吸収係数 α を Krogh 式へ代入すると、流入口と流出口との酸素分圧の差は 54mmHg となった。また出口側の酸素分圧を 40mmHg とし、一次元拡散による到達距離を推定すると、328 μm という結果が得られた。これは安静状態であれば毛細血管網を経ずに酸素が供給できることを意味している。この推定は、毛細血管網は運動に伴う大きな酸素消費を賄うべく安全設計されており、多くの微小血管が安静時には閉鎖していることから理解される。人もラットも赤血球サイズと毛細血管径など殆ど変わらないことを考えると、微小血管系の同相性が成り立つと思われる。人の骨格筋でも細静脈網は良く発達しており、毛細血管網を経由しなくても安静下肢に酸素が供給できると思われる。既に笹嶋らは開存動脈枝を末梢静脈へ連結することにより重篤な下肢閉塞性動脈硬化症を救命していることの根拠が得られたと思われる。

10. 心筋細胞の虚血時における細胞外 ATP 放出制御メカニズムとその病態生理学的意義

○功刀聡彦, 松山大輔, 岩淵慎弘, 河原剛一 (北海道大学大学院情報科学研究科細胞情報工学研究室)

ATP は心筋細胞の細胞代謝や拍動維持などのエネルギーを要する反応過程において重要な物質である。最近の研究では、低酸素症や虚血ストレスに反応して細胞外に放出された ATP が細胞外情報伝達物質として機能することがわかっている。放出された ATP が隣接する細胞の ATP 感受性受容体 (プリン受容体, P2 receptors) を活性化することで、細胞外からの情報を細胞内に伝搬することが示唆されてきた。細胞外への主要な ATP 放出経路としては、connexin あるいは pannexin hemichannel と maxi-anion channel などがある。その中でも maxi-anion channel は、虚血の早期における ATP 放出機構に関与していると報告されているが、虚血時の心筋細胞における maxi-anion channel を介する ATP 放出と hemichannels を介する ATP 放出との機能連関および ATP 放出と虚血・再灌流傷害との関連については不明な点が多い。本研究結果より予想外の

ことではあったが、虚血時に maxi-anion channel の活性化を抑制すると、細胞外への ATP 放出量が増加する傾向が認められた。この ATP 放出量の増加は、hemichannels blocker によってほぼ抑制された。これは虚血の早期に maxi-anion channel を介して放出される ATP がプリン受容体を活性化させるか、もしくは他の分子が細胞内シグナルに変換され、hemichannels からの ATP 放出を抑制するという、虚血時における maxi-anion channel-hemichannels 機能連関による ATP 放出制御メカニズムが存在している可能性を示唆するものである。これまでに本研究室では、心筋細胞の虚血時に、一酸化窒素合成酵素 (NOS) の活性化によって生成される一酸化窒素 (NO) が、虚血時における心筋細胞内 ATP 量の保持に関与していることを示してきた。この報告は NO が心筋細胞の ATP 消費を抑える、あるいは虚血時における細胞外への ATP 放出量を抑制している可能性を示したものである。このことから ATP 放出制御メカニズムに NO を介した経路の存在が考えられる。

11. 胎仔ラットにおける心拍動開始時の拍動とカルシウム動態の関連

○小林武志, 前田佐知子, 一瀬信敏, 小林貴法, 岩瀬岳人, 當瀬規嗣 (札幌医科大学医学部細胞生理学講座)

心筋細胞は通常 1) 細胞膜の脱分極, 2) 細胞内カルシウム濃度の上昇 (カルシウムトランジェント), 3) カルシウムがトロポニンと結合することによって引き起こされるアクチンとミオシンの重合, の過程を経て収縮にいたる。以前我々は可視光での観察から、ラットの胎生 10.00 日目から 10.15 日目の間に心臓発生領域 (cardiac crescent) の一部分から拍動が開始し、その後時間とともに拍動範囲が cardiac crescent 全体に広がっていく現象を示した。しかし、その時点では、この拍動範囲の拡大が上記 1) ~ 3) のどの要素によるのか不明であった。そこで今回我々は、蛍光用 CCD カメラと可視光用 CCD カメラを用い、拍動開始時のカルシウムトランジェントと可視光で観察される拍動を測定した。その結果、まず初めに cardiac crescent 全体でカルシウムトランジェントが観察され、その後しばらくしてから cardiac crescent の一部分が拍動を開始し、時間とともに拍動範囲が cardiac crescent 全体に広がっていく現象を観察した。以上よりトロポニンやアクチン、ミオシンなどの収縮蛋白の収縮機能獲得が心筋細胞収縮開始の端緒であることが示唆された。

12. 海馬苔状線維興奮性の異シナプス間調節

○打田武史^{1,2}, 福田 諭¹, 神谷温之² (¹北海道大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野, ²北海道

大学大学院医学研究科神経生物学分野)

海馬苔状線維シナプス前部にはカイニン酸型グルタミン酸受容体および GABA_A 受容体が発現することが報告されているが、その生理的な活性化機構や機能的意義については不明な点が多い。今回我々は、マウスの海馬スライスを用いて、伝達物質漏出 (spill-over) によりこれらの受容体が異シナプス性に活性化され、苔状線維の興奮性を調節する可能性に関して電気生理学的解析を行った。生後 1-3 週の幼若マウスから海馬の急性スライスを作成し、室温で実験を行った。歯状回顆粒細胞層に刺激電極を刺入し、苔状線維シナプスの存在する CA3 野透明層から細胞外記録を行った。放線層に第二の刺激電極を刺入して反復刺激を加え、50ms 後の苔状線維の集合活動電位を記録した。またこの逆に CA3 野透明層を刺激し歯状回顆粒細胞層から記録した逆行性集合活動電位についても同様の実験を行った。これらの実験では、放線層の反復刺激によって抑制性ニューロンや通過軸索の終末部から神経伝達物質が放出され、離れた部位にある苔状線維の興奮性に影響を及ぼすことが予想される。そこで、受容体阻害剤を用いて関与する伝達物質および受容体の種類を同定した。苔状線維の集合活動電位は、先行する放線層の反復刺激により増大した。Ca²⁺イオンを含まない灌流液に置換して、神経伝達物質の放出を阻害するとこの効果は消失したことから、伝達物質漏出により苔状線維の興奮性を亢進させることが示唆された。AMPA/カイニン酸型グルタミン酸受容体阻害剤 CNQX はこの作用を一部抑制し、GABA_A 受容体阻害剤 picrotoxin は更に抑制を示した。これより放線層の反復刺激により GABA とグルタミン酸が漏出し、異シナプス性に苔状線維に作用することが明らかとなった。また、逆行性集合活動電位は同様に放線層の反復刺激後に増大した。この効果は CNQX により一部減弱したが、picrotoxin は抑制を示さなかったため、GABA の関与は小さいと考えた。

13. ザリガニ歩行動の自発的開始にかかわる脳機構：腹髄下行性神経活動の機能的役割

○加賀谷勝史, 高畑雅一 (北海道大学大学院理学研究科)

動物は外部感覚刺激にตอบสนองして行動するだけではなく、明確な感覚刺激が存在しない条件で自発的にも行動を開始する。脊椎動物では、脳内特定部位の中樞ニューロンが、自発性運動の企画・実行において果たす役割について多大な知見が蓄積しているが、無脊椎動物においては自発性運動の開始メカニズムについての情報はほとんど得られていない。本研究では、アメリカザリガニ *Procambarus clarkii* を用いて、自発性歩行運動開始の中樞機構を調査した。ザ

リガニの神経系には食道上神経節（脳）が存在し、これらももっとも中枢化が進んだ神経節である。脳から下行する一対の腹髄において、電気刺激を行うと歩行運動を開始する神経繊維は「司令ニューロン」としてその存在が報告された。現在では、この仮説は「司令システム」として自然状態の動物の行動制御に寄与していると考えられている。しかし、その上流の司令システム賦活機構が、歩行運動の自発的な開始に際して、どのような活動を示すかは不明である。そこで、無麻酔全体標本を用いて、球形トレッドミル上において自発的あるいは刺激誘発的に歩行運動を開始するときの下行性神経活動を環食道縦連合細胞より細胞外誘導し、各ユニットの機能的役割を解析した。その結果、自発性歩行の開始に1秒以上先行して活動が変化するユニットが、180ユニット中20ユニット見出された。また自発性歩行の開始と刺激誘発性歩行の開始では異なる先行タイプの下行性ユニットが動員されることを見出した。これは、自発性の歩行開始が刺激誘発性歩行とは異なる下行性経路によって媒介されることを示す。さらに、多くの先行型下行性ユニットは歩行の方向性を示さず、歩行中に動員される下行性ユニットは方向性を示した。また先行型ユニットの電気刺激により歩行運動が開始されることが確認された。これらの結果は、自発的に歩行が開始されるときは、まず歩行運動が決定され、その後方向が決定されるという中枢過程を示唆している。

14. β アミロイド蛋白質産生調節蛋白質 X11 あるいは X11-like を欠損したマウスのフェロモン応答

○大裕 強^{1,2}、鳴川貴司^{1,2}、神山直也¹、野口智弘¹、井関 健²、鈴木利治²、柏柳 誠¹（¹旭川医科大学生理学講座神経機能分野、²北海道大学大学院薬学研究院）

アルツハイマー病初期の特徴的な症状の一つに嗅覚障害が認められている。また、匂いを嗅ぎ分けるテストで標準以下のスコアを取った人は、アルツハイマー病に罹患する確率が高いことが報告されており、嗅覚テストは同疾患の早期診断に役立つ可能性がある。しかしながら、早期の嗅覚異常とアルツハイマー病を結びつける分子基盤は不明である。一方、アルツハイマー病患者の脳内に認められる老人斑の構成成分である β アミロイドは、X11 および X11-like 蛋白質によってその産生が調節されている。X11 蛋白質は、フェロモン情報が入力する副嗅球にも発現していることから、X11 および X11-like 蛋白質が嗅覚機能の制御にも関与している可能性が考えられる。そこで、野生型マウス、および X11 あるいは X11-like 蛋白質を欠損したマウスの副嗅球における応答性を解析した。本実験では、未成熟（6 週齢）および成熟（24 週齢）マウスの鼻孔に 10 倍希釈

した尿フェロモンを 30 分間かけて噴霧し、1 時間後に p-ホルムアルデヒドで灌流固定した。その後、フェロモンを受容する鋤鼻系の中枢である副嗅球を含む嗅球全体の矢状断切片（厚さ 50 μ m）を作成した。その後、免疫組織化学的手法を用いて切片を染色した。抗体は抗 c-Fos 抗体を用いた。一般的に、神経細胞が興奮すると神経細胞が発現する。カウントした c-Fos 陽性細胞は ANOVA で解析し、検定は Fisher の PLSD を用いた。

その結果、野生型マウスでは、成熟に伴って副嗅球の応答性が亢進した。X11 欠損マウスでは、成熟に伴って副嗅球の応答性が、野生型マウスに比べてさらに亢進した。しかしながら、X11-like 欠損マウスでは、成熟に伴って副嗅球の応答性が変化しなかった。このことから、X11 および X11-like 蛋白質は、今までに報告されていない機序で嗅覚情報の処理に関与している可能性が示唆された。

15. 思春期に現れる雄ラット尿中の雌ラット誘引フェロモンの同定

○長田和実¹、柏柳 誠²、和泉博之¹（¹北海道医療大、²旭川医科大学・医学部・生理学講座・神経機能分野）

【目的】嗅覚の発達している動物では、フェロモンなどの信号化学物質を手がかりに個体間の情報交換が行なわれている。マウスでは古くからその尿にフェロモン作用があることが知られており、2-sec-butyl-4, 5-dihydrothiazole 等数種類の雄性フェロモンが構造決定されている。一方、ラットでは意外にも雄性フェロモン物質の構造はほとんど知られていない。そこで本研究は、ラットの雄性フェロモンの存在を確認、同定するために行われた。【方法】実験動物は、におい行動実験用のラット（雌；6ヶ月齢）、におい提供動物、（5-14 週齢、雄）として Donryu を用いた。サンプルは尿を用いた。におい行動実験は、ケージの両端におい源をおき、雌マウスのにおい嗅ぎ行動量の差を比較した。次に HS-SPME を使い、38 $^{\circ}$ C で 60 分間におい物質を分離抽出した。化学分析にはガスマススペクトル検出器などを用いた。【結果及び考察】化学分析の結果、2-heptanone, 4-Methylphenol, 4-Ethylphenol などの揮発性物質が思春期以降雄ラット尿中で増加することを明らかにした。また匂い嗜好実験の結果、雌ラットは若齢雄ラット（5 週齢）の尿臭よりも、成体雄ラット（8 週齢）の尿臭に対し強い興味を示すが、上記の揮発性化合物を若齢雄ラットの尿に添加すると、成体雄ラットと同様な誘引性を示すことがわかった。本結果は、これらの揮発性物質は、思春期に伴い雄ラット尿中に増加する、雌に対する誘引フェロモンであることを示している。

16. ウシ毛様体滑筋におけるムスカリン受容体刺激による低コンダクタンス陽イオンチャネルの活性化とCa²⁺貯蔵枯渇との関連性

○宮津 基, 石居信人, 大日向 浩, 高井 章 (旭医大生理 自律機能)

【目的】毛様体筋の収縮持続相は細胞外からの持続的Ca²⁺補充を必要とするが, そのためのCa²⁺流入経路としてはM₃型ムスカリン受容体刺激に応じて開口する2種類の非選択性陽イオンチャネル[NSCCL (35pS)とNSCCS (100 fS)]が主要な役割を演ずる。しかし, M₃受容体からの信号がチャネルに至る経路については不明である。今回, 筋小胞体(SR)のCa²⁺貯蔵の枯渇の関与を検討するため, ウシ毛様体筋におけるカフェインの効果を調べた。また, SRのCa²⁺センサーとして注目されるSTIM1と, 陽イオンチャネルの分子本体として注目されるOrailの発現を検討した。

【方法】酵素処理で単離したウシ毛様体筋細胞を用いた。細胞内Ca²⁺濃度[Ca²⁺]_iはFluo-4蛍光法により測定した。全膜電流の記録は電位固定法による。RT-PCR法と免疫蛍光顕微鏡法とによりSTIM1とOrailの発現と局在を検討した。

【結果と考察】カフェイン(5-20mM)の細胞外灌流とともに, [Ca²⁺]_iはピーク状に上昇し, 30秒以内にプラトー相に移行した。細胞外液Ca²⁺除去後も前者は観察されたが, 後者は消失した。-50mVの膜電位固定下でのカフェイン灌流は持続的な内向き電流を惹起したが, ノイズ解析により, この電流がNSCCSのみの開口によるものであることがわかった。筋組織におけるRT-PCRにより, Stim1, Orailの全長mRNAを検出した。ジギトニン処理後の筋細胞にSTIM1とIP₃受容体に特異的に結合する抗体を用いて2重免疫蛍光染色を施すと, 両蛋白が細胞内に球状に共局在することがわかった。以上の結果は, ウシ毛様体筋のムスカリン刺激によるNSCCS活性化にSRのCa²⁺枯渇によって生ずる何らかの信号が関与することを示唆する。その過程におけるSTIM1とOrailの関与に興味を持たれる。

17. ウシ毛様体筋におけるエンドセリン-1刺激に対する収縮応答とその信号機構

○石居信人, 宮津 基, 荻野 大, 高井 章 (旭川医大生理自律機能)

【背景】血管収縮ペプチドの一種endothelin-1(ET-1)は, 眼房水を含め眼球内に広く存在する。眼内におけるET-1の生理的役割は未だ不明であるが, 眼圧の調節分子の一つとして機能している可能性が提唱されている。今回, 房水

流出率の主要な調節因子である毛様体筋に対するET-1の効果を検討した。

【方法】等尺性張力記録にはウシ毛様体から摘出した平滑筋束を用いた。Fluo-4蛍光法による細胞内Ca²⁺記録と電位固定法による全膜電流記録には, 酵素処理で単離した毛様体筋細胞を用いた。ET受容体の発現の検討にはRT-PCRと免疫蛍光顕微鏡法とを併用した。

【結果と考察】ET-1(1-100nM)は濃度依存性に張力を発生させた。この張力応答は, (1)ムスカリン受容体刺激への応答でみられるような一過性の早い立上がり相を欠き, 数分~10分間かかってプラトーに達する緩徐な時間経過をとる, (2)細胞外液Ca²⁺除去またはG_{q/11}阻害剤YM-254890により完全に抑制される, (3)ET_A受容体阻害剤BQ-610で濃度依存性に抑制されるがET_B受容体阻害剤BQ-788では抑制されない, などの特徴を示した。同一の単離毛様体筋においてcarbachol(CCh)とET-1はいずれもCa²⁺上昇を起した。全膜電流の測定では, ET-1投与により, CCh刺激によって開口することが知られる2種類の非選択性陽イオンチャネルのうち単位コンダクタンスが比較的大きい(35pS)のものみの開口が観察された。ET_A受容体の特異抗体を用いた免疫蛍光染色により筋細胞膜におけるその稠密な発現を確認した。これらの結果は, ET-1刺激はET_A受容体を介しG_{q/11}と共役した信号伝達経路を介して毛様体筋を収縮させるが, CCh刺激とは一部異なる経路を使用している可能性を示唆する。

18. 冬眠覚醒時の褐色脂肪組織熱産生におけるβ3アドレナリン受容体の役割

○北尾直也, 橋本眞明 (旭川医科大学生理学講座自律機能分野)

【目的】体温5℃付近で冬眠中のゴールデンハムスターは, さまざまな外部刺激により覚醒し, 4時間足らずで通常体温(38℃)になる。この急激な体温上昇の初期段階では褐色脂肪組織(BAT)による非ふるえ熱産生が重要と考えられている。BAT熱産生は主にβ3アドレナリン受容体を介したものであるが, 長期間の寒冷曝露などの慢性的な交感神経刺激が受容体の脱感作を起こすことも知られている。本研究は冬眠からの覚醒時のBAT熱産生におけるβ3アドレナリン受容体の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】室温5℃, 恒暗条件下で冬眠行動を開始したゴールデンハムスターに, 麻酔下で大腿静脈に薬物投与用カニューレを, 前腕基部に心電図記録用の銀線を慢性留置した。手術後, 冬眠行動の再開が確認できた動物を用いた。冬眠開始から約50時間後(心拍数20以下)に覚醒刺激を

加え、肩甲間のBAT腹側および直腸内に温度測定用熱電対を挿入し、カニューレより生理食塩水(PBS)、 $\beta 3$ アゴニスト(CL 316, 243)、またはアンタゴニスト(SR 59230A)を持続的に投与した。温度と心電図は覚醒するまで記録した。さらに数回冬眠行動を繰り返すのを確認した後、安楽死させ、速やかにBATを摘出、1~2mm²の小片に切り出し、 $\beta 3$ アゴニスト/アンタゴニストに対する酸素消費速度応答を低温下(10℃)および通常温度下(37℃)下で測定した。

【結果と考察】PBSと比較し、 $\beta 3$ アゴニストの投与により冬眠からの覚醒時間は有意に短縮し、単位時間あたりのBATの温度上昇も覚醒の初期から有意に高かった。一方、用いた $\beta 3$ アンタゴニストは8例中5例では覚醒時間に影響を及ぼさなかったが、残り3例では、BATの温度上昇が抑制され、一部あるいは完全に覚醒を妨げた。これらの結果は冬眠からの覚醒の初期段階において $\beta 3$ アドレナリン受容体が重要な役割を果たしていることを示唆する。使用薬物の効果と合わせ、冬眠からの覚醒時のBAT熱産生における $\beta 3$ アドレナリン受容体の役割について考察する。

19. 唾液中ストレスマーカーの動態分析

○児玉高有^{1,2}、阿部貴恵³、兼平 孝⁴、森田 学⁵、船橋 誠² (¹北海道大学大学院歯学研究科予防歯科学教室、²北海道大学大学院歯学研究科口腔生理学教室、³北海道大学大学院歯学研究科高齢者歯科学教室、⁴北海道大学病院冠橋義歯補綴学、⁵岡山大学大学院医歯薬学総合研究科予防歯科学教室)

【緒言】血中、尿中、唾液中のアミラーゼ、コルチゾール、

クロモグラニンAが生体のストレスマーカーとなることが報告されており、歯科治療の術中や予後の評価に用いることの有用性が考えられる。しかし、歯科治療によるストレスマーカーの変動については不明である。そこで、本研究は、非侵襲的に採取できる唾液中のストレスマーカーを定量し、その動態を明らかにするために行った。

【対象と方法】内科的、外科的疾患のない自衛隊所属の成人男性61名(採血時30名、歯科治療時31名)から任意の時期に唾液採取管を用いて唾液を採取した。採血および歯科治療をストレスサーとして、ストレス負荷の前後における唾液中のアミラーゼ活性、コルチゾール、クロモグラニンAの濃度を測定した。

【結果と考察】採血による各ストレスマーカーの経時変化はそれぞれ異なるパターンを示した。アミラーゼとクロモグラニンAは採血前の時点ですでに有意な増加を示し、心理的ストレスに対して反応する可能性が示唆された。被験者群は採血前の基準日において各ストレスマーカーとも高濃度であったグループと低濃度であったグループに区別された。このうち高濃度グループは低濃度グループと比べて、全てのストレスマーカーの変動が少なかった。歯科治療を行った場合、アミラーゼとコルチゾール濃度は初診時に比べ再診時には有意な低下を認め、また抜歯による有意な増加が観察された。これらの結果より、初診時の不安や恐怖が再診時には緩和される一方、抜歯は強いストレスであると考えられた。今後は、これらのストレスマーカー測定を用いて、歯科治療の質を評価する方法を確立すべくさらに検討していきたい。