

第93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25年8月31日(土) 10:30~16:55
 会 場：旭川医科大学 臨床講義棟 臨床第3講義室
 当番幹事：旭川医科大学医学部脳機能医工学研究センター教授 高草木薫
 参 加 者：40名
 演 題 数：18題

日本生理学会北海道地方会は第93回北海道医学大会生理系分科会を兼ねて、旭川医科大学生理学講座の協力のもと、上記の日程で開催されました。今回は、若手とベテラン研究者を一組として各セッションの座長をお願いしました。様々な分野から18の演題が発表され、40名(うち学生10名)の参加者により、活発な質疑応答が行われ有意義な会となりました。その後、開催された懇親会は、30名を超える多数の方々に出席していただき、地方会ならではの打ち解けた雰囲気で大いに交流を深めるものとなりました。本会合にご参加いただいた皆様に厚くお礼申し上げます。なお来年度の当番幹事は、北海道大学大学院医学研究科生理学講座細胞生理学分野にご担当いただく予定です。

0-1. 基底核～脳幹投射系による歩行と筋緊張の制御＝運動細胞内記録の成績＝

○高草木 薫^{1,2} (¹旭川医大脳機能医工学研究センター, ²東京大学工学系研究科精密工学)

中脳には、歩行誘発野(Midbrain locomotor region; MLR)と脚橋被蓋核(Pedunculopontine tegmental nucleus; PPN)の筋緊張抑制野が存在し、共に、大脳基底核の出力核である黒質網様部(Substantia nigra pars reticulata; SNr)からのGABA作動性投射を受ける。本研究では、除脳ネコ(n=14)標本において後肢筋α運動細胞の活動を記録し、SNrからMLR/PPNに対するGABA作動性投射による歩行と筋緊張の制御様式を解析した。MLRに連続微小電気刺激(50Hz, 20-40μA)を加えると、伸・屈筋運動細胞にはリズムカルな発射活動と膜電位のオシレーション(歩行運動)が誘発された。同様の刺激をPPNに加えると、伸・屈筋運動細胞の発射活動は停止し、膜電位は過分極側に移行した(筋緊張抑制)。また、筋緊張促進系の一つである青斑核(Locus coeruleus; LC)に加えた電気刺激は、膜電位の脱分極と発射活動を誘発した(筋緊張促進)。一方、SNrに加えた条件刺激(100Hz, 40-60μA)は、それ単独では、運動細胞の興奮性は変化しなかったが、MLR刺激によるリズムカルな膜電位オシレーションを減弱させ(歩行の抑制)、伸・屈筋運動細胞に持続的発射活動を誘発させた。また、SNrの条件刺激は、PPN刺激による伸・屈筋運動細胞への抑制作用を低減させた(筋緊張の脱抑制)。しかし、

LC刺激の作用(膜電位の脱分極と発射活動)はむしろ促進された。次いで、MLRやPPNにBicuculline(GABA-A受容体拮抗薬)を微量注入(5-10mM, 0.25μl)すると、SNr刺激により誘発される作用はブロックされた。これらの成績は、SNrからMLR/PPNへのGABA作動性投射系の亢進は、歩行リズム生成機構の活動を抑制し、かつ、伸筋および屈筋の筋緊張レベルを亢進(共収縮)させることにより、歩行運動を抑制する(停止する)ことを示唆する。パーキンソン病では、基底核からのGABA作動性出力が亢進する。従って、MLR/PPN領域に対する過剰なGABA抑制が、この疾患における歩行障害と筋緊張亢進の一因であると考えられる。

0-2. 低酸素による癌細胞時計のシフト

○増渕 悟¹, 八木田和弘², 中村 渉³, 本間さと⁴, 本間研一⁴ (¹北海道大学大学院医学研究科連携研究センター 未来創薬・医療イノベーション拠点形成, ²京都府立医科大学大学院医学研究科統合生理学講座, ³大阪大学大学院歯学研究科口腔時間生物学研究室, ⁴北海道大学大学院医学研究科時間医学講座)

時計遺伝子によってドライブされる生物時計振動は時計中枢である視床下部視交叉上核だけではなく末梢臓器さらには癌においても存在する。そして近年、癌治療において治療効果をあげる目的で一日のうちの一定の時刻に治療を行う方法、いわゆる「時間治療」が行われている。一方、

固形癌の組織は均一ではなく、血管から離れた酸素供給が乏しい部位が存在するが、この組織内低酸素部位は治療抵抗性、転移再発の原因となると考えられている。そのため時間治療を考える上でも低酸素の癌細胞リズムへの影響を知ることが重要となる。低酸素の概日リズムへの影響としてウズグロシヨウジョウバエ羽化リズムの低酸素(窒素100%)への反応(Pittendrigh, C.S.(1974) The Neurosciences. Third Study Program. The MIT Press p437-458)が知られているが、本研究ではこれをもとに培養細胞への短時間の低酸素暴露実験を行った。血清刺激により開始された癌細胞株(大腸癌細胞株 HCT116)のリズム位相は低酸素暴露(24h 後から 6h, 酸素濃度 10% もしくは 5%)により著しくシフトしたが、非癌細胞(線維芽細胞株 NIH3T3, Rat-1 fibroblast)では低酸素暴露の影響はほとんど見られなかった。また、このときの低酸素暴露により癌細胞培地の pH は低下するが、この pH 低下を培地中に緩衝剤を添加して抑制したところ、位相シフトも減弱した。この結果は固形癌の組織低酸素環境も癌細胞リズムに影響を与えている可能性を示している。また、低酸素下での癌細胞特有の代謝異常がリズム異常の原因となる可能性を示している。これらの結果に基づき固形腫瘍での低酸素部位のリズム構築、さらにそれに配慮した時間治療について考察する。

0-3. 心拍動開始期の心臓原基に発現している収縮関連蛋白の測定～高感度ウエスタンブロッティング法を用いた検討～

○小林武志, 前田佐知子, 一瀬信敏, 宮川 健, 黄金勲矢, 山田陽一, 當瀬規嗣(札幌医科大学医学部細胞生理学講座)

Wistar rat においては、受精後 9.99~10.13 日目で心拍動が開始することを我々は明らかにしてきた。また心拍動が開始する時は、まず初めに収縮を伴わない細胞内カルシウム濃度の増加と減少(カルシウムトランジェント)が心臓原基全体で生じ、ついで収縮が心臓原基の一部から生じ、その後時間とともに全体に広がって行くことも明らかにした。これらの事象は、心筋の興奮収縮連関に関与する各種分子の発現量の変化などに起因していると想定される。発現量の変化の検討としてはウエスタンブロッティング法による蛋白発現量の測定があるが、しかし心拍動開始期のラットの心臓原基は非常に小さいため、通常ウエスタンブロッティング法では測定は困難である。そこで、今回我々は高感度ウエスタンブロッティング法を用い、心拍動開始期のラットの心臓原基に発現している収縮関連蛋白の測定を試みた。その結果、心拍動開始期においてはミオシン調

節軽鎖の発現量が成長に伴い増大していることが判明した。また、抗ミオシン調節軽鎖抗体を使用するウエスタンブロッティングでは、高感度法は通常法に比べ 100~1000 倍感度が高いことが判明した。以上より、高感度ウエスタンブロッティング法は心拍動開始の機序の解明に非常に有用であることが判明した。今後は、他の収縮関連蛋白の探索も順次行っていく予定である。

0-4. 複数の物体に対する注意の配分—サル前頭前野の神経活動による検討

○松嶋藻乃, 田中真樹(北海道大学医学研究科神経生理学分野)

私たちは、複数の物体に対して同時に注意を向けることができる。最近の心理物理実験によると、視覚刺激を左右の視野に分けて提示した場合、どちらか一方の視野にまとめて提示した場合よりも課題成績が向上する(Alvarez and Cavanagh, 2005)。こうした空間的注意の視野依存的な制御の神経機構を調べるため、訓練したサルの前頭前野より単一ニューロン活動を記録した。本研究で用いた課題では、固視中に4つの視覚刺激を提示する。そのうち2つの色を各試行のはじめに短時間だけ変化させ、ターゲットとして指示する。その後、4つの視覚刺激は同形同色となり、視野内を独立に動き回る。サルは物体が動きを止めるまで固視点を見続け、それが消えた後、2つのターゲットに向かって順にサッカードすることが要求されている。ターゲットは動き回る間、他の妨害刺激と見分けがつかないため、サルはそれらに注意を向け、内的に追跡し続けなければならない。対照試行では、4つのうち1つの視覚刺激のみをターゲットとして指示した。記録した82個のニューロン活動を解析したところ、2つを同時に追跡している際は、1つだけを追っているときよりも、ターゲットに対する反応が有意に低下していた。次に、2つを同時に追跡している際の活動を、ターゲットが左右の視野にまたがっている場合(Across)と、どちらか一方のみに提示されている場合(Within)で分けて解析した。すると、Across 条件より Within 条件のときに、ターゲットへの反応が有意に低下することが明らかとなった。一方、上下の視野についてデータを分けて解析しても、反応の違いはなかった。これらの結果は、左右の視野それぞれに対しては独立した注意資源を割り当てることができるが、同側視野内の複数箇所に注意を向ける場合には、単一の資源を配分するため競合が生じていることを示唆する。こうした視野依存的な神経活動の変化が、複数の物体の相対位置に応じた注意の向けやすさを規定すると考えられる。

0-5. 咀嚼不全のモデルマウスにおける神経新生および嗅覚機能の低下とその回復

○宇津木千鶴^{1,2}, 長田和実³, 宮園貞治², 笹島 仁², 野口智弘², 松田光悦¹, 柏柳 誠² (旭川医科大学医学部歯科口腔外科学講座,²旭川医科大学医学部生理学講座神経機能分野,³北海道医療大学歯学部口腔生物学系生理学分野)

【目的】咀嚼が、脳機能に影響を与えている可能性が考えられている。咀嚼が十分に行われない状態を再現するために、粉末飼料で飼育する系が用いられている。しかしながら、粉末飼料の摂取がどのような感覚入力の変化を生じさせるかは不明である。そこで、粉末飼料を与えた時の脳幹における神経興奮を検討した。一方、成体の脳室下層でも神経新生が継続されていて、新生細胞は嗅球まで移動して嗅覚機能に関与することが知られている。そこで、粉末飼料での飼育の脳機能に対する影響を調べるために、脳室下層における神経新生に与える影響を含めて嗅覚機能の変化を検討した。【方法】マウスの神経興奮は、その指標である Fos 蛋白の発現を免疫組織化学的に解析した。また、Y 字迷路装置を用いて嗅覚機能を行動学的に解析した。さらに、BrdU を投与し、新生細胞を免疫組織化学的に解析した。【結果】粉末飼料を与えると、三叉神経脊髄路核および三叉神経中脳路核で、固形飼料を与えたときと比べて神経興奮の低下が認められた。次に、粉末飼料による飼育の嗅覚機能に対する影響を調べた。行動実験では、嗅覚機能の低下が見られた。さらに、嗅球および梨状皮質の匂い応答が低下していた。これらの嗅覚機能の低下の原因を明らかにするために脳室下層の神経新生を調べた。粉末飼料で飼育したマウスでは、脳室下層における神経新生が低下した。次に、粉末飼料で飼育し、低下した嗅覚機能が固形飼料に戻すことにより回復するかどうかを検討した。粉末飼料から固形飼料に戻すと、神経新生、忌避能力および匂い応答性の回復が認められた。【結論】粉末飼料で飼育すると嗅覚機能が障害され、固形飼料で再度飼育することによりその障害は回復することが示唆された。

0-6. 逆行性動脈血逆流による細静脈弁開放の可能性

○小山富康 (元 北海道大学)

壞疽に侵された下肢を救済するために、笹嶋らは静脈弁を破壊したのち動脈を静脈へ縫合させる吻合手術、末梢静脈の動脈化手術 (略称 DVA) を工夫してきた。このとき弁破壊手技の及ばない細静脈の弁は残存するにもかかわらず、動脈血は逆行性に流入し、下肢患部の浮腫と潰瘍は速やかに解消する。この現象の機序を明らかにするために、弾性管の力学的解析と既報の数値の代入による検討を加え

た。その結果、細い静脈血管ほど管壁が薄く、加圧により拡張しやすいこと、逆行性の血流に対する弁の阻止力が不足して弁による閉鎖が不十分となること、その結果動脈血は逆行性に流れうることが推測されるに至った。本研究は関西大学物理関真佐子教授、旭川医科大学血管外科笹嶋唯博教授との共同研究である。

0-7. スパイク生成の独立性と神経情報コードの関係

○山野辺貴信 (北海道大学医学部神経生理学分野)

スパイク列のどの統計量により情報が伝えられているかは明らかとなっていない。デジタル回路では high と low のパターンに情報が符号化されている。high と low のパターンを自在に生成するためには、high または low の状態が過去のデバイスの状態とは独立に生成されなければならない。従って、デジタル回路では立ち上がり時間、立ち下がり時間と呼ばれる過渡応答状態を十分に短くなるように設計してある。これと同様に考えれば、神経細胞がスパイクを生成するとき、神経回路の情報処理にかかる時間よりも十分に短い過渡応答状態でスパイクを生成するのであれば、デジタル回路のようにスパイクパターンに情報が符号化される可能性がある。そうでなければ、いくつかのスパイクが神経細胞のハードとしての特性が原因で互いに相関を持った形で発生し、情報が運ばれるのではないかと考えられる。よって、神経細胞の過渡応答を調べることが重要であるが、神経細胞は非線形かつイオンチャネルなどの確率的挙動によるノイズを持つ素子であり、その過渡応答の解析方法は整備されていない。本研究では、イカ巨大軸索を用いた実験を行い、時間変化するパルス入力に対するその過渡応答特性を調べた。次に、神経細胞のようにノイズ源をもつ非線形システムの過渡応答特性を調べる方法を開発した。具体的には、確率微分方程式で表される内在性ノイズ項を含む神経細胞モデルを用い、このモデルが単一パルス入力を受けるとき、モデルの状態を表す確率密度関数がどのように時間発展するかを示す写像を構築した。この写像を元に神経細胞モデルの過渡応答の解析を行い、神経細胞の過渡応答特性がどのようにスパイク列による情報伝達と関わるのか調べた。

0-8. マウス乳腺および内分泌組織における時計遺伝子発現リズム：発光レポーターを用いた検討

○賈 書生^{1,2,3}, 吉川朋子^{2,4}, 山下啓子¹, 本間研一², 本間さと² (北海道大学病院乳腺・内分泌外科,²北海道大学大学院医学研究科時間医学講座,³中国ハルビン医科大学付属第三医院乳腺外科,⁴北海道大学大学院医学研究科連携研究センター)

【目的】哺乳類の概日時計中枢は、視床下部の視交叉上核に局在するが、末梢組織にも概日振動を示す時計機構「末梢時計」が存在する。これまでに、様々な内分泌組織に末梢時計の存在が示されているが、乳腺については自律振動する末梢時計の報告は未だない。本研究では、生物発光により概日時計の挙動をモニターし、乳腺における時計機構の存在と、関連する内分泌組織との位相関係を検討した。

【方法】時計遺伝子産物 PER2 と生物発光酵素 Luciferase の融合タンパクを合成する C57BL/6J バックグラウンドの雌性成熟 PERIOD2⁺:LUC (PER2⁺:LUC) ノックインマウスを用いた。明暗周期に同調した未交配の PER2⁺:LUC マウスより乳腺、下垂体、卵巣、甲状腺を採取し、スライスを作成して発光基質であるルシフェリンを含む DMEM 培地で培養した。培養組織からの発光を光電子増倍管により連続的に記録し、発光リズムの位相と周期を決定した。【結果・考察】培養した乳腺、下垂体、卵巣、甲状腺は、いずれもその発光に明瞭な概日リズムを示し、各臓器に自律振動する概日振動体が存在することが明らかとなった。一個体から採取した 5 対の乳腺それぞれが示す PER2⁺:LUC リズム位相と周期には有意差はなく、乳腺の位置による差はないと考えられた。現在、授乳による概日リズムへの影響を検討中であり、妊娠・授乳などで大きく形態と機能が変化する乳腺における概日振動についてさらに検討を加える。

0-9. L-ヒスチジン誘発の摂食抑制に伴う脳幹部神経活動の変化

○奥舎有加^{1,2}、平井喜幸¹、前澤仁志¹、船橋 誠¹ (北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座口腔生理学教室、²北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座高齢者歯科学教室)

【目的】ヒスタミンの前駆体である L-ヒスチジンの腹腔内投与により生じる摂食抑制において、悪心や味覚異常は随伴していないことを以前報告した。しかし、L-ヒスチジンによる摂食抑制と脳幹部神経活動の連関は不明であったため、これを明らかにするために以下の実験を行った。【方法】SD 系雄性ラット (250~350g) を用い、1 日 12 時間の食事制限を 6 日間トレーニングした。トレーニング開始 7 日目の摂食開始 30 分前に L-ヒスチジン (250, 500, 750 mg/kg) を腹腔内投与し、その後の 12 時間の摂食量を測定した。測定終了後 4% パラホルムアルデヒドにより灌流固定を行い、脳を摘出し、凍結マイクロトームを用いて厚さ 50 μm の連続切片を作成した。免疫組織化学的解析として、ABC 法を用いて c-Fos タンパクの発現を可視化し、神経活動の有無の指標とした。また迷走神経前胃枝切離ラットを

作成し、上述と同様の実験を行った。【結果】L-ヒスチジン腹腔内投与により摂食量の有意な減少を認め、L-ヒスチジン誘発の摂食抑制を確認した。孤束核における c-Fos 陽性細胞数の増加が認められた。一方、最後野においては c-Fos 陽性細胞数の増加は認められなかった。迷走神経前胃枝切離群では L-ヒスチジン腹腔内投与による摂食抑制は生じなかった。【考察】L-ヒスチジン腹腔内投与による摂食抑制は孤束核神経活動の上昇を伴うことが明らかとなった。またこれらが迷走神経求心路からの入力によることが示唆された。

0-10. Ras-PI3K シグナルが制御する外来因子取込み機構の解析

○藤岡容一朗¹、津田真寿美¹、服部ともえ²、佐々木純子³、佐々木雄彦³、宮崎忠昭^{2,4}、大場雄介¹ (北海道大学大学院医学研究科、²北海道大学人獣共通感染症研究センター、³秋田大学大学院医学系研究科、⁴北海道大学遺伝子病制御研究所)

低分子量 GTP 結合タンパク質である Ras は、複数の標的分子を使い分けることでシグナル伝達における多機能かつ中心的な役割を果たしている。Ras の標的分子の 1 つである phosphoinositide 3-kinase (PI3K) は、細胞の生存や小胞輸送など複数の機能を有するイノシトールリン酸化酵素である。しかし、これまでの研究は阻害薬あるいはノックアウトマウスを用いた解析が主であったため、その制御機構、とりわけ Ras による PI3K の活性制御については未知な点が多い。我々は 2 分子蛍光相補法を初めとする様々なイメージング手法を用いて、増殖因子刺激依存的に Ras と PI3K の複合体が細胞膜からエンドゾームへ移行すること、また、エンドゾーム上での PI3K 活性化には Ras が必要であることを見出した。さらに、Ras-PI3K のエンドゾーム移行およびエンドゾーム上での活性化が持つ生物学的意義を検索したところ、クラスリン非依存性エンドサイトーシスによる物質取り込みを制御することが明らかとなった。現在は PI3K-Ras 複合体が膜からエンドゾームに移行するメカニズムの解明に取り組んでおり、将来的には Ras-PI3K が制御するエンドサイトーシスによる物質取り込み機構の解明を目指している。

0-11. ラット姿勢調節反応の特徴：小動物用重心動揺計を用いた検討

○佐々木健史^{1,4}、長峯 隆²、松山清治^{3,4} (札幌医科大学保健医療学部理学療法第一講座、²札幌医科大学医学部神経科学講座、³札幌医科大学保健医療学部作業療法第二講座、⁴札幌医科大学大学院保健医療学研究科神経・

精神機能学分野)

動物の動的姿勢調節能力の特徴を明らかにするには、姿勢反応時の重心変動を正確に捉える必要がある。我々は小動物の動的姿勢調節能力を評価するため、床面（以下、プレート）を水平から30度まで様々な角速度で傾斜させて姿勢外乱を与えた際の動物の重心変動を測定するための重心動揺計を開発した。はじめに、本重心動揺計の機器特性を評価するため、測定対象物の重量やプレート上の測定開始位置の違いによる重心変動測定への影響について検討し、安定した重心動揺の測定を得るための適切な測定条件を確認した。この測定条件に則り、ラット（体重200~400g）を用いて、様々な角速度で前後方向または左右方向への傾斜外乱を与えた際の重心変動を測定した。一部のラットでは重心変動に加えて四肢伸筋EMGも同時記録した。その結果、姿勢外乱を与えた際のラットの重心変動には次の3つの特徴が観察された。1) 動的姿勢補正は前後方向および左右方向への傾斜の際にそれぞれ特徴的な反応が見られ、傾斜反対側に大きく重心が移動した。2) 最大30度までのプレート傾斜範囲のなかで、15度までの傾斜角度の間に強い動的姿勢反応が数回出現した。この姿勢反応に対応して四肢伸筋に相動的な筋活動がみられた。3) この姿勢調節反応の出現潜時は、プレート傾斜角速度の増加に伴い短縮したが、いずれの角速度においても反応が出現するプレート傾斜角度はほぼ同じレベルであった。以上より、一定の角速度で傾斜するプレート上におけるラットの姿勢調節には、持続的姿勢調節に加え、傾斜角度の程度に応じて相動的に出現する姿勢調節反応の存在が示唆された。

0-12. 海馬CA1野におけるアセチルコリン作動性緩徐シナプス応答のスライスパッチクランプ解析

○鈴木江津子^{1,2}、神谷温之¹（¹北海道大学大学院医学研究科神経生物学分野、²日本学術振興会）

脳の海馬領域で観察される長期増強(long-term potentiation: LTP)は、記憶の生理学的なメカニズムの1つと考えられている。グルタミン酸作動性入力である海馬CA1野シャフナー側枝に高頻度刺激を与えると、顕著なLTPが生じる。内側中間野からのアセチルコリン作動性神経が密に存在するCA1野上昇層に40Hz程度の反復刺激を与えると、シャフナー側枝シナプスでのLTPの誘導が促進することが示されている。コリン作動性入力の神経終末から放出されたアセチルコリンが、ムスカリン性アセチルコリン受容体を活性化することでCA1野錐体細胞の興奮性を増大しLTPの誘導を促進すると想定されている。本研究では、この遅い脱分極成分によるLTPの促進がどのような細胞内シグナルを介して生じるかについて検討するた

め、パッチクランプ法を用いた単一細胞レベルでの解析を試みた。生後2ないし3週齢のマウスから急性海馬スライス標本を作製しCA1錐体細胞より記録を行った。ホールセル記録では、細胞膜穿孔後、すみやかに緩徐な脱分極応答が消失し、上昇層刺激により生じる遅い脱分極が安定に記録できなかった。ホールセルクランプ法では、細胞内液と電極内液の置換により、細胞内信号伝達に必要な細胞成分が失われ、ムスカリン性アセチルコリン受容体応答が減衰したと考えられた。細胞内環境が保たれる微小電極による細胞内記録法および穿孔パッチクランプ法を用いた場合には、多くの例で遅い脱分極成分を記録することができた。ムスカリン性アセチルコリン受容体応答には、ホールセルクランプ法により消失する細胞内シグナルが必須であると考えられた。

0-13. ラット最後野ニューロンのコレシストキニン受容機構

○菅田真吾、平井喜幸、前澤仁志、船橋 誠（北海道大学歯学部口腔生理学教室）

【目的】最後野は脳室周囲器官の1つであり第4脳室底に位置している。血液脳関門を欠いており、化学受容性嘔吐誘発域としてよく知られている。最後野ニューロンが摂食抑制ペプチドホルモンであるコレシストキニン(CCK)に対して応答性を示すことは以前の研究により明らかにされているが、その受容機構については不明であった。そこで我々は、最後野ニューロンに存在するCCK受容体サブタイプとその受容機構を明らかにするために本研究を行った。【方法】SD系哺乳ラット(4~18日齢)を用いて脳スライスを作成し、ホールセルパッチクランプ法により単一ニューロン活動を記録した。CCK-8(10, 100, 1000nM)投与に対する膜電位変化およびシナプス電位を解析した。CCK受容体のサブタイプを同定するために、CCK-A受容体アンタゴニストであるロルグルミドを用いた。微小興奮性シナプス後電流(mEPSC)の記録はTTX存在下にて行った。【結果】CCK-8投与によりmEPSCの発生頻度が有意に増大したが、応答した全てのニューロンにおいて持続性の内向き電流は見られなかった。また、mEPSCの振幅の累積確率分布および平均振幅は10nM CCK-8の投与では変化がなく、100nMおよび1000nM CCK-8の投与では有意な変化が認められた。CCKに対する応答は、過分極作動性カチオン電流(H電流)を示す2ニューロンと、H電流を示さない24ニューロンから記録された。抑制性の反応を示したニューロンは見られなかった。ロルグルミド存在下では、CCK投与時におけるmEPSCの発生頻度の有意な増大は認められなかった。【考察】最後野ニューロンのCCK

に対する応答は、シナプス前膜のCCK-A受容体を介してグルタミン酸の放出を増加させることにより生じることが示唆された。また、H電流を示さない最後野ニューロンが主としてCCK受容性を有することが明らかとなった。膜特性が異なる最後野ニューロン群においてCCK応答性が異なることから、各ニューロン群の機能分化の可能性が示唆された。

0-14. 高齢者の姿勢制御時における前注意過程の脳活動：ミスマッチ陰性電位測定による解析

○井平 光^{1,4}、矢澤省吾²、長峯 隆²、古名丈人¹、松山清治^{3,4}（¹札幌医科大学保健医療学部理学療法第一講座、²札幌医科大学医学部神経科学講座、³札幌医科大学保健医療学部作業療法第二講座、⁴札幌医科大学大学院保健医療学研究科神経・精神機能学分野）

【目的】ミスマッチ陰性電位（Mismatch Negativity；MMN）は、Oddball課題に対する意識下の自動処理関連脳電位である。本研究では、姿勢制御課題の難易度を変化させた際の前注意過程における情報処理過程の加齢変化についてMMNを用いて検討することを目的とした。【方法】対象は、若年者20名（男性15名、女性5名、平均年齢21.8±1.0歳）、高齢者20名（男性15名、女性5名、平均年齢73.6±4.5歳）とした。本研究では、異なる難易度の姿勢制御条件でそれぞれOddball課題を提示した。姿勢制御条件は1)座位条件、2)安定した面での立位保持条件、3)不安定な面での立位保持条件の3条件とした。Oddball課題の標準刺激は周波数1000Hz、提示確率80%、逸脱刺激は周波数1100Hz、提示確率20%でランダムに提示された（持続時間50ms、音量50dB、刺激間時間間隔500ms）。各姿勢制御条件における腰部加速度と前脛骨筋および腓腹筋の筋活動を身体動揺の指標とし、MMN振幅とMMN潜時を前注意過程における情報処理過程の指標とした。【結果】腰部加速度と筋活動は、若年群と高齢群ともに座位条件、安定した立位保持条件、不安定な立位保持条件の順で有意に増大した。また群間と条件に有意な交互作用が認められ、高齢群では身体動揺がより増大した（ $p<0.01$ ）。さらに、MMN潜時では交互作用や主効果が認められなかったのに対して、MMN振幅では群間と条件に有意な交互作用が認められ、高齢群でのみ上記の条件順でMMN振幅が減少した（ $p<0.01$ ）。【考察】高齢群では姿勢制御の難易度が高い条件でMMN振幅が減少したが、これは意識下の脳反応が低下したことを示唆する。これより高齢者における姿勢制御時の外乱応答の特徴として、意識的に注意資源を配分する機能の低下に加えて、無意識的な注意配分機能の低下の存在が示された。

0-15. ウシ毛様体筋はオカダ酸による弛緩作用を示さない

石田美織、○竹谷浩介、赤尾鉄平、宮津 基、高井 章（旭川医科大学生理学講座自律機能分野）

【目的】毛様体筋は水晶体を調節してピントを合わせる働きを担い、副交感神経支配の平滑筋組織の一つである。ムスカリン受容体を介して素早く持続性の収縮を示し、また自動能を示さないことを特徴とする。今回、毛様体筋における収縮調節の分子機構を検討するため、プロテインホスファターゼ阻害剤であるオカダ酸の収縮・弛緩に対する作用を検討した。オカダ酸は種々の平滑筋で濃度依存的に収縮作用や弛緩作用を示すと報告されているので、本研究ではモルモット盲腸紐を対照試料としてオカダ酸の作用を比較した。

【方法】ウシ毛様体およびモルモット盲腸紐から摘出した平滑筋束を用いた。それぞれの平滑筋をムスカリン受容体作動薬であるカルバコール、またCaイオノフォアであるイオノマイシンにより収縮させて等尺性張力を記録した。収縮、および弛緩状態の筋束に対し様々な濃度のオカダ酸を加え反応を測定した。

【結果】低濃度オカダ酸（1 μ M）は収縮中のモルモット盲腸紐に対し弛緩作用を示したが、ウシ毛様体筋ではそのような弛緩作用を認めなかった。一方、高濃度オカダ酸（>5 μ M）はウシ毛様体筋およびモルモット盲腸紐で共に収縮力を増加させた。

【考察】この結果は、毛様体筋が一般的な平滑筋と比べ特異な収縮調節の分子機構を持っている可能性を示す。たとえば1)収縮調節にPP2Aが関与していない、2)PKC α がミオシンのリン酸化を抑制しない、あるいは3)リン酸化ミオシンが収縮の調節に携わっていない等の可能性が考えられる。

0-16. マウス副嗅球出力神経のPopulation dynamics解析

○野口智弘、笹島 仁、宮園貞治、柏柳 誠（旭川医科大学生理学講座神経機能分野）

哺乳類を含む四足動物の嗅覚系は、主嗅覚系と鋤鼻系のふたつの経路から構成される。前者は匂い受容、後者はフェロモン受容に関与すると考えられているが、これらの情報処理の原理的な違いについては依然不明点が多い。現在、主嗅覚系と鋤鼻系の一次中継核である主嗅球と副嗅球ではそれぞれ選別型と統合型の情報処理が行われていると考えられている。両嗅球における出力神経の形態学的観察から、主嗅球の出力神経には一種類の匂い受容体からの情報のみが入力され、副嗅球の出力神経には複数種のフェロモン受

容体からの情報が入力されるものと考えられている。しかし、このような異なる回路を構成する神経の興奮性には違いがないのだろうか？ 選別と統合という神経情報処理の基礎的な過程に個々の細胞の興奮性がどのように寄与するのかを調べるため、我々は、主嗅球および副嗅球出力神経の興奮性をスライスパッチ法を用いて解析した。パッチクランプ条件下で細胞体へ刺激電流を注入すると、主嗅球の出力神経である僧帽細胞および房飾細胞、副嗅球出力神経である吻側 MT 細胞および尾側 MT 細胞はそれぞれが固有の頻度で連続発火した。このことは、各種細胞において、刺激強度を発火頻度に変換する rate coding にそれぞれ特有の様式が存在することを示唆する。個々の細胞の発火頻度から刺激電流強度を判別できる確率はいずれの神経でも経時的に変化し、有意水準 ($\alpha=0.05$) に達する時間は刺激強度に依存した。これらの刺激強度・時間依存性の比較により、主嗅球出力神経は副嗅球のものよりも刺激強度のより小さな違いをより速く識別でき、吻側 MT 細胞は他の出力神経よりも広いダイナミックレンジで安定した刺激強度の識別を行っている可能性が浮上した。

0-17. マウス眼内平滑筋の収縮調節機構の検討

○赤尾鉄平, 宮津 基, 竹谷浩介, 高井 章 (旭川医科大学生理学講座自律機能分野)

毛様体筋や瞳孔括約筋のムスカリン受容体刺激に伴う収縮の持続相は、他の多くの平滑筋の場合と同様、細胞外からの Ca^{2+} 流入を必要とする。われわれは、ウシ毛様体筋における実験により、この Ca^{2+} 流入が単位コンダクタンスの異なる 2 種類の非選択性陽イオンチャネル (NSCCS と NSCCL) を介することを示すとともに、それらの分子候補としての TRPC1, TRPC3, TRPC4, TRPC6 や Orail などの発現を確認している。しかし、ウシ材料では、遺伝子ノックダウンなどの適用が困難で、また遺伝子改変動物の利用は事実上不可能であるため、電気生理学的に検出された NSCCL/S と免疫染色により同定された TRPC や Orail との関連を突止めるには至っていない。そこで、遺伝子改変マウスの導入を目指し、通常のマウスを使った予備実験を行った。まず、そのあまりの小ささからこの分野の生理学的研究にほとんど用いられてこなかったマウス眼球の毛様体一虹彩領域において、免疫染色法により細胞内に α アクチンを含み細胞膜に M3 型ムスカリン受容体などを発現している細胞の存在と局在を証明した。また、瞳孔括約筋の輪状摘出標本においてカルバコール (CCh) が濃度依存性 (0.1~10 μ M) に持続的収縮を発生させること、その収縮がアトロピン (1 μ M) により抑制されるが、ニフェディ

ン (2 μ M) には感受性を示さないことを観察した。さらに、単離筋細胞において fura-2 を用いて測定される細胞内 Ca^{2+} 濃度が CCh 添加により上昇を示すこと、この応答もアトロピン (1 μ M) により消失、ニフェディペン (2 μ M) には非感受性であることを確認した。これらの結果は、マウス瞳孔括約筋にもウシ毛様体筋と同様の NSCCs が存在することを示している。ウシ材料を用いて行ってきたと同様の実験はマウス材料でも実行可能であることは明かで、遺伝子改変の NSCCS/L への影響を検討するために利用できるものと考えられる。

0-18. ミトコンドリア阻害剤ロテノンの嗅覚輸送による中枢性嗅覚障害モデル

○笹島 仁, 宮園貞治, 野口智弘, 柏柳 誠 (旭川医科大学生理学講座神経機能分野)

【目的】我々の脳は、血液脳関門により様々な微生物や化学物質の侵入から守られている。しかし、近年、嗅覚輸送経路と呼ばれる嗅神経から嗅球へ至る経路は、様々な外界化学物質を頭蓋内へ送達しうることが明らかとなりつつある。本研究では、天然物由来の殺虫性農薬成分であるロテノンが、嗅覚輸送を介して中枢に与える影響について、マウス鼻腔内反復投与モデルを用いて解析することで、嗅覚輸送を介した中枢の脆弱性について考察する。【方法】マウス鼻腔内へロテノン懸濁液を投与し、嗅球に及ぼす影響を、免疫組織学的手法、ならびに分子生物学的手法によって解析した。また、嗅覚機能に与える影響について、Y 字迷路を用いて行動学解析を行った。【結果】ロテノンは、細胞内でミトコンドリア呼吸鎖複合体 I を阻害することが知られている。また、ドーパミン神経は、ミトコンドリア機能障害に感受性が高いことが知られている。マウス鼻腔内へのロテノン片側投与は、両側嗅球におけるミトコンドリアストレスマーカーを増強し、嗅球内 A16 ドーパミン神経細胞におけるチロシンヒドロキシラーゼ染色の減弱をもたらした。また、同投与マウスにおいて、嗅球の委縮ならびに酪酸臭に対する忌避スコアの減少が観察された。【考察】鼻腔内投与は、脳血管関門を経由することなく、脳内に薬物を到達させることができる有益な経路である。しかしながら、噴霧・散布使用されるロテノンのような神経毒性を有する化合物が嗅上皮に到達した場合は、脳の傷害を引き起こす経路としても機能する危険性が存在することを本実験は示した。ヒトでのパーキンソン病最初期における嗅覚異常は、嗅球 A16 ドーパミン神経の脱落によるものと推定されており、本研究における嗅覚障害マウスは同徴候を示すモデルとして期待される。