

01. ウシ毛様体筋から単離した細胞における小胞体 Ca^{2+} 枯渇活性化チャネルのポア構成サブユニット Orail1 蛋白質発現解析

○宮津 基, 竹谷浩介, 金子智之, 高井 章 (旭川医科大学生理自律機能)

【目的】毛様体筋の収縮持続相の Ca^{2+} 流入経路として M_3R 型ムスカリン受容体 (M_3R) 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 (35 pS) と NSCCS (100 fS)] が主要な役割を演ずる。NSCCS はその薬理学的特徴から筋小胞体 (SR) の Ca^{2+} 貯蔵の枯渇を介して活性化されるイオンチャネルである可能性が示唆されている。今回, Percoll 密度勾配により調製された単離細胞に対して flow cytometry (FCM) を用いて, M_3R および SR の Ca^{2+} 枯渇活性化チャネルのポア構成サブユニットである Orail1 蛋白質の発現について, 陽性細胞の有無とその頻度について検討した。

【方法】細胞はウシ毛様体組織試料をコラゲナーゼ酵素処理で分散させた後, Percoll 密度勾配法により得た, Fluoro-4 蛍光法による細胞内 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の測定と, 免疫蛍光顕微鏡法, FCM を使用した。

【結果と考察】カルバコールに対する $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 変化を測定すると, 約70%の細胞が一過性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇を示した。また, 免疫蛍光顕微鏡法により抗 α -アクチン抗体を用いて観察すると α -アクチン陽性細胞が大多数を占めた。浮遊した細胞を固定・膜透過性処理し, 抗 M_3R 抗体を用い免疫蛍光染色し FCM で解析したところ, M_3R 陽性・陰性の細胞群が観察され, 両者の相対平均蛍光強度比は15, 存在比は2.7であった。抗 Orail1 抗体を使用した場合には, Orail1 陽性・陰性の細胞群が観察され, 両者の相対平均蛍光強度比は9, 存在比は3.3であった。抗 M_3R 抗体, 抗 Orail1 抗体を用い2重染色を行った場合には75%の細胞が2重陽性となった。以上の結果は, M_3R 陽性の毛様体細胞において Orail1 蛋白質も強く発現し, Ca^{2+} 貯蔵の枯渇を介して活性化されるイオンチャネル構成サブユニットとして機能している可能性を示唆した。(利益相反なし)

02. 平滑筋に対する PP2A 阻害剤の二重作用

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

オカダ酸はプロテインホスファターゼ PP1 と PP2A の強力な阻害剤として多くの生理学・薬理学研究に使用されている。以前より高濃度のオカダ酸は平滑筋を Ca^{2+} 非依存的に収縮させることが知られていたが, その後の研究で低濃度のオカダ酸が平滑筋の収縮を抑制すること(弛緩作用)が報告された。オカダ酸は低濃度では PP2A に対してより

高い選択性を示すことから, オカダ酸の平滑筋弛緩作用は PP2A 阻害に由来すると考えられているが, その詳細な分子機序はまだまだ明らかでない。

オカダ酸は *in vitro* では PP1 よりも PP2A に対して数千倍高い選択性を示すが, 平滑筋の収縮—弛緩作用の選択性は十倍程度の差しか見られない。このことからオカダ酸による弛緩作用は非特異的な作用である可能性も考えられた。そこでまず我々はオカダ酸による弛緩作用が PP2A 阻害によるものであることを確認するため, 特徴の異なる他の PP2A 阻害剤 (フォストリエシン (Fos), ルブラトキシシン A (RubA)) の平滑筋収縮に対する作用を検証した。イオノマイシンで Ca^{2+} 誘導的に収縮させたウシ毛様体筋に対して, Fos, RubA とともに弛緩作用を示した。これらの PP2A 阻害剤はオカダ酸と異なり, 高濃度にしても平滑筋を収縮させなかった。この結果から低濃度オカダ酸による平滑筋弛緩作用は従来から考えられている通り PP2A 阻害によるものであることが強く支持された。

次にカルバコール (CCh) 刺激により収縮させた毛様体筋に対する PP2A 阻害剤の作用を検討したところ, オカダ酸と Fos は弛緩作用を示さなかった。一方, RubA は CCh で収縮した毛様体筋を弛緩させた。対照実験に用いたモルモット盲腸ヒモではいずれの PP2A 阻害剤も CCh 誘導性収縮を抑制したことから, このような弛緩作用に対する抵抗性はウシ毛様体筋に特有のものと考えられた。(利益相反なし)

03. 単離心筋細胞への高伸展刺激時における負荷依存性

○金子智之¹, 成瀬恵治², 入部玄太郎² (¹旭川医科大学生理学講座自律機能分野, ²岡山大学大学院医歯薬学総合研究科)

心臓は血液ポンプとして生体内で絶えず収縮・弛緩を繰り返しているため, その構成要素である心筋細胞は常に機械的負荷下にあり, そのような環境こそが心筋細胞にとって生理的であるといえる。これまでに我々は一対のカーボンファイバーを単離心筋細胞両端に装着, 保持することで細胞に伸展刺激を加え, 機械負荷環境下の細胞実験を可能にしてきたが, 生理的に十分といえる範囲まで細胞を伸展させるに足る保持力を得るには至らず, 改良の余地を残していた。そこで我々は2本のカーボンファイバーで細胞を上下両面から挟み込むことによってより強固な保持を可能にする系を作製し, その有効性を確認した。その結果, 従来方法におけるマウス単離心筋伸展時の最大サルコメア長が $1.943 \pm 0.012 \mu\text{m}$ ($n=20$) であったのに対し, 今回の方法では $2.195 \pm 0.029 \mu\text{m}$ ($n=20$) と, 大きく改善された。伸展

量が少ない過去の実験では、収縮期末長さ・張力関係は負荷非依存性に直線で近似できたが、今回の大きな伸展刺激下では顕著な後負荷依存性がみられた。筋短縮時の組織粘性抵抗のために、同様の現象が全心臓標本において観察できるが、今回その現象を単一細胞ではじめて確認することができた。さらに、時変弾性曲線を比較(各 $n=7$)すると、弾性が最大となる時相 (T_{max})は無伸展時には後負荷が増加するに従い有意に延長したのに対し、伸展時は後負荷に依存した変化は見られなかった。また、後負荷の高い収縮では伸展量の増大に応じて T_{max} は有意に増加するのに対して、後負荷が低い場合には伸展の影響は見られなかった。拡張期の弾性減衰時定数 (τ) は、伸展の有無に関わらず、後負荷が増加するに従い有意に延長した。これらのことは単細胞系において細胞内部の粘性抵抗だけでなく、収縮蛋白における収縮・弛緩速度依存のカルシウム親和性の変化が収縮期末長さ・張力関係や弾性曲線の負荷依存性に関与している可能性を示唆しているものと思われる。(利益相反なし)

04. マウス嗅神経の発火頻度符号は刺激の周波数変化に対して頑健性を示す

○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)

動物が新規匂い源の探索を行う際、平常時に比べて単位時間当たりの呼吸数が増加する。動物の探索行動で見られるこの速い呼吸は匂い嗅ぎ行動(sniffing)と呼ばれる。げっ歯類では平常時の呼吸周波数は 2Hz 以下であり、匂い嗅ぎ行動時にその周波数は 4-12Hz に上昇する。行動心理学研究より、匂いの識別は、匂い嗅ぎ行動中の一呼吸以内に完了することが知られている。一方で、平常時の遅い呼吸中でも匂いは識別される。したがって、哺乳類の嗅覚には、行動の文脈に沿って同一個体の呼吸周波数がさまざまに変化しても、一呼吸以内に匂い識別を完了する機構が存在するものと推測される。それがどのようなものかを調べるに当たって、我々はまず、末梢の嗅神経が生成する発火頻度符号(発火頻度と刺激強度の相関)に注目した。マウス剥離嗅上皮標本中の嗅神経にパッチクランプ法を適用し、周期的な正弦波電流を嗅神経の細胞体に直接注入することで、嗅神経の発火頻度と電流周波数(0.5-20Hz)の関係を調べた。その結果、周波数が高くなるにつれて一回の周期中に発生する活動電位数は減少するものの、その発火頻度符号の情報量は周波数が低いときと同様か、むしろ増える傾向にあった。別の言い方をすると、正弦波電流の周期が短いときには刺激開始から情報量は急激に上昇するが、周期が長いときには情報量の上昇は緩やかなものとなって、最終

的には一回の周期で同程度の情報量に達した。これは一回の呼吸で得られる情報量が呼吸の周波数に依存しないことを示唆する。このような嗅神経の興奮性は、匂い嗅ぎ行動中の一呼吸が匂い識別の単位となることに合致する。また、嗅神経が幅広い周波数に対して安定した符号化を行えることで、動物の行動とともに呼吸の周波数が大きく変化しても嗅覚は常に外界からの情報を取り込むことができる。(利益相反なし)

05. ピラジン化合物のマウスに対する警戒行動誘起作用について

○長田和実¹, 宮園貞治², 柏柳 誠² (¹北海道医療大歯学部口腔生物学系生理学分野, ²旭川医大医学部生理学講座神経機能分野)

以前の研究より、オオカミ尿中で見いだされた一群のアルキルピラジンはマウスに対して忌避行動、恐怖誘発行動を引き起こすことを見いだした。そこで本研究では、16種類のアシルピラジンをを用い、その化学構造とマウスに対して引き起こす各種警戒行動(不動時間、におい嗅ぎ行動時間、Animex による行動量)との構造活性相関を検討すると同時に、各種警戒行動間の相関関係についても検討した。マウスは C57BL/6j の雌(2~5ヶ月齢)を用いた。嗅覚学習の成立を避けるために各種ピラジンとの接触は1回のみとし、3種類の警戒行動を同時に測定した。16種類の化合物のうち、2,3-diethylpyrazine (DEP) は不動時間の延長、におい嗅ぎ時間の短縮、総行動量の低下に対して最も強い活性を示した。それに加え、3-ethyl-2,5-dimethylpyrazine (3EDMP), 5-ethyl-2,3-dimethylpyrazine (5EDMP) and 2,3,5-trimethyl pyrazine (TMP) にも有意な不動時間の延長が見られた。これらの結果より、官能基の総炭素数が 3-4 個程度であり、官能基の種類がメチル基およびエチル基のアシルピラジンが警戒行動を強く引き起こすことが示唆された。また3種類の警戒行動間の相関関係については不動時間と行動量の間に最も高い相関性が見られた。(利益相反なし)

06. メカノメディシン：メカノ医用工学を用いた次世代医療技術

○成瀬恵治 (岡山大学大学院医歯薬学総合研究科(医)システム生理学)

我々の体は常にストレッチ・シェアーストレス・静水圧といったメカニカル刺激を受けている。ストレッチ刺激を与えるために伸展性のあるシリコン樹脂製チャンパーで細胞をストレッチするシステム、ズリ応力を与えるためにマイクロ流体力学に基づくマイクロチャンネルシステムを開発

シメカノリセプター・細胞内情報伝達機構などの研究を行ってきた。これらのシステムを用いた再生医療・不妊治療・止血など次世代医療技術への応用に関して講演する。(利益相反なし)

07. Ras-PI3K を介したエンドサイトーシス制御に関する因子の機能解析

○堀内浩水¹、藤岡容一郎¹、南保明日香¹、佐藤 絢¹、西出真也¹、小布施力史²、大場雄介¹ (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,²北海道大学大学院先端生命科学研究所分子細胞生物学研究室)

低分子量 GTP 結合タンパク質 Ras は GTPase 活性しか持たないにもかかわらず、増殖・生存・小胞輸送など多岐にわたる生理現象を制御する。この多機能性は Ras 自身の活性・不活性化の制御に加えて、多数の標的分子を時空間的に使い分けることで実現される。実際、Ras の標的分子 phosphoinositide 3-kinase (PI3K) と Ras の複合体は、他の標的分子と異なり増殖因子刺激依存的に細胞膜からエンドゾームへ移行する。また、エンドゾームからの Ras-PI3K シグナルはエンドサイトーシスを促進する。標的分子のうち PI3K との複合体のみがエンドゾームに移行する現象に着目し、Ras 結合ドメインのアミノ酸配列を比較したところ、PI3K に特徴的なアミノ酸が存在した。この配列の欠損により、Ras-PI3K のエンドゾーム移行が抑制されたことから、この配列と相互作用する分子の存在が示唆された。そこで、質量分析法を用いて上記アミノ酸領域との結合因子を網羅的に探索し、免疫沈降法で結合が確認された細胞質タンパク質に着目した。このタンパク質は、増殖因子刺激依存的に細胞質中のびまん性局在から顆粒状局在へと変化した。この顆粒状構造は、2 分子蛍光相補法によって可視化した Ras-PI3K 複合体と共局在した。siRNA を用いたノックダウンによりエンドサイトーシス能と Ras-PI3K 複合体のエンドゾーム移行が抑制された。これらの結果から、この細胞質タンパク質は Ras-PI3K の時空間制御を介してエンドサイトーシスの制御に関与することが示唆された。(利益相反なし)

08. 蛍光イメージングを用いた時計タンパク質の細胞内局在解析

○西出真也、藤岡容一郎、南保明日香、大場雄介 (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)

全身の多くの細胞は概日リズムをもち、それらが統合されて様々な生理機能にみられるリズムを形成する。複数の時計遺伝子およびそのタンパク質が 24 時間周期で変化することにより細胞のリズムが作られ、転写因子 BMAL1-

CLOCK 二量体は転写リズムの発振に中心的な役割を果たす。近年時計関連分子の量的変化のみならず翻訳後修飾等の質的变化がリズム発振に重要であるとの報告が増えているが、時計タンパク質の細胞内局在についてはほとんど知られていない。我々は BMAL1 および CLOCK に蛍光タンパク質を結合したバイオセンサー Venus-BMAL1, SECFP-CLOCK を作製し、両者の二量体形成を FRET を用いて評価するとともに細胞内局在を観察した。BMAL1 と CLOCK の核内における二量体形成には時刻依存性があり、転写活性が抑制される時間帯にピークをもつ概日リズムを示した。BMAL1, CLOCK とともに核に多く集積していたが、CLOCK は細胞質にも存在し顆粒状の構造を示した。様々な細胞内小器官の蛍光マーカーを用いた解析により CLOCK は小胞体に局在することが明らかとなった。一方、内因性の BMAL1 および単独で発現させた Venus-BMAL1 は顆粒状構造を示さなかったが、Venus-BMAL1 と SECFP-CLOCK の共発現により Venus-BMAL1 の小胞体局在が確認された。CLOCK の顆粒形成は概日リズムを示し、そのピークは BMAL1-CLOCK 二量体形成のピークと一致した。以上の結果より時計タンパク質 CLOCK は細胞内において時刻依存的に小胞体に局在し、BMAL1 は CLOCK 依存的に小胞体に輸送されることが明らかとなった。CLOCK が細胞内局在を変化させることでリズム形成に関与している可能性、あるいは周期的に変化する未知の分子により細胞内を輸送されている可能性が考えられる。(利益相反なし)

09. 海馬苔状線維の単一軸索終末からの活動電位記録

○神谷温之、大浦峻介 (北海道大学医学研究科神経生理学分野)

中枢神経系における軸索はきわめて細く、その微小性が直接的な電気生理学的な記録による軸索興奮性の解析を阻んできた。これに対し、海馬苔状線維は、直径が 4-7 ミクロンと中枢神経系としては例外的に大型の軸索終末を有し、赤外線微分干渉顕微鏡を用いることで急性スライス標本における生きた軸索終末を形態学的に同定することが可能である。また、苔状線維は中枢軸索に特徴的な通過型軸索を構成することが知られているが、その軸索終末部における興奮伝導の制御機構の詳細については不明な点が多い。われわれは通過型軸索の終末部における興奮伝導の制御機構を検討するために、ルースパッチクランプ法を用いて海馬苔状線維の単一軸索終末からの活動電位記録を試みた。マウス海馬スライス標本において、苔状線維の起始細胞である顆粒細胞を電気刺激すると、軸索終末部から全か無かの法則に従う活動電位(軸索終末ユニット)が記録され、こ

の応答はナトリウムチャンネルブロッカーであるテトロドトキシンの投与によりほぼ消失した。低頻度の単発刺激に対しては、ほぼ確実に軸索終末部で活動電位が記録され、伝導ブロックはほとんど生じなかった。海馬苔状線維では安全率の高い高信頼性の興奮伝導が行われていることが確認された。海馬苔状線維は軸索終末部にも高密度のナトリウムチャンネルが局在し高い興奮性を有することで、興奮伝導の安全率が低いと想定される海馬苔状線維の通過型軸索においても、確実性の高い神経情報伝達を保証していると考えられた。また、ルースパッチクランプ法により記録した軸索終末ユニットは、NEURON シミュレーターを用いて推定した苔状線維軸索終末における活動電位の微分波形とはほぼ同様な時間経過を示し、細胞外記録による単一軸索終末の活動電位を正確に反映することが示された。(利益相反なし)

10. マウス脳幹部における GLP-1 分泌細胞の電気生理学的特性

○久留和成, 平井喜幸, 前澤仁志, 船橋 誠 (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)

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は、摂食・代謝調節に関与する生理活性物質であり、末梢臓器においては胃内容物排出遅延、インスリン分泌促進作用を示し、中枢神経系においては摂食抑制作用を示す事が報告されている。GLP-1 は小腸および脳幹の一部の細胞から分泌されるが、血中半減期が極めて短く (<2 分)、中枢神経系に作用する GLP-1 は GLP-1 分泌神経細胞が主な供給源になっていると考えられる。しかしながら、これまで GLP-1 分泌細胞は他の細胞とは形態学的には判別が出来ないため、生細胞の状態で同定する事ができず、電気生理学的な解析は全く行われていない。

本研究では、GLP-1 分泌細胞特異的に yellow-fluorescent protein (YFP) を発現するトランスジェニックマウスを用いて、スライスパッチクランプ法にて GLP-1 分泌神経細胞の電気生理学的特性を解析した。

GLP-1 分泌細胞は静止膜電位が安定で自発発火を示す細胞 (n=99, $V_m = -51 \pm 1$ mV)、静止膜電位が安定で自発発火を示さない細胞 (n=11, $V_m = -55 \pm 2$ mV) および静止膜電位が不安定でバースト発火を示す細胞 (n=25, $V_m = -68 \sim -38$ mV) の 3 タイプに大別された。いずれのタイプにおいても、電極内液の ATP 濃度低下に伴い静止膜電位の過分極応答が観察された。ボルテージクランプ法を用いたシナプス入力の解析では、自発性興奮性シナプス後電流 (3.0 ± 0.5 Hz) が記録された。

さらに、脳スライス標本内に残存する求心性迷走神経束

に対する電気刺激にて、誘発興奮性シナプス電位が観察された。

これらの結果から、脳幹における GLP-1 分泌機序に迷走神経を介した末梢臓器からの求心性神経伝達および ATP 感受性カリウムチャンネルが関与している事が示唆された。

(利益相反なし)

11. ラット 3 大唾液腺で生じる副交感神経性血流増加反応の相違

○佐藤寿哉, 石井久淑 (北海道医療大学歯学部生理学分野)

【目的】唾液中の水や電解質は血管内の血漿に由来するため唾液腺で生じる血流増加反応は唾液分泌に重要であると考えられる。唾液腺では三叉神経の求心性入力により副交感神経を介した反射性の血流増加反応が生じることが知られている。この反応は急峻な血流増加を示すことから唾液分泌に大きな影響を及ぼすと考えられる。大唾液腺では腺房細胞の漿液性および相対分泌比が異なるが、これらの分泌様式の相違と副交感神経を介した血流調節との関係については不明である。そこで我々は唾液腺における副交感神経性血流増加反応に差異があるのかを明らかにするためにラットの 3 大唾液腺(耳下腺、顎下腺および舌下腺)の血流動態を比較、検討した。【方法】ラットはウレタン麻酔後、ミオブロックで非動化し、人工呼吸下で管理した。大腿動脈と静脈にカテーテルを挿入し、それぞれ体幹血圧の測定と薬物投与に用いた。頸部交感神経と迷走神経は頸部で両側とも切断した。副交感神経の興奮は三叉神経(舌神経)を求心性に電気刺激(1-30V, 1-30Hz, 20s)することにより誘発させる方法を用い、血流動態はレーザースペックルイメージング血流計を用いて測定した。【結果と考察】舌神経刺激は 3 大唾液腺に刺激強度と頻度に依存した急峻な血流増加反応を誘発したが、顎下腺では他の腺よりも有意に高い血流増加反応を認めた。この血流増加反応はヘキサメソニウム(自律神経節遮断薬)の静脈内投与により有意に抑制された。アトロピンの静脈内投与により耳下腺および顎下腺の血流増加はほぼ完全に抑制されたが、舌下腺の血流増加は約 60% に抑制され、アトロピンの感受性に有意な差が認められた。したがって、3 大唾液腺で生じる副交感神経性血流増加反応は 1) 応答特性が異なる、2) コリン作動性と非コリン作動性血管拡張線維の構成比が異なることが示唆された。これらの違いが大唾液腺から分泌される唾液の性状や相対分泌比の違いと密接に関係していると考えられる。(利益相反なし)

12. 計時におけるノルアドレナリンシステムの役割

○鈴木智貴, 田中真樹 (北海道大学医学研究科神経生理学分野)

【背景】時間情報処理にドパミン, セロトニン, ノルアドレナリン (NA) などのモノアミン類が関与することが知られている。なかでも, NA は注意・覚醒・気分等に深くかかわっており, こうした内的な因子が日常的な時間体験に及ぼす影響を考えると, そのメカニズムの理解は, 計時の神経機構を明らかにするために重要である。NA 性神経核である青斑核の神経活動が瞳孔径とよく相関することに注目して, 瞳孔径と時間処理の関係を調べた。

【方法と結果】2頭のニホンザルに時間生成課題を訓練し, 赤外線式眼球運動計測システムを用いて瞳孔径を測定した。課題では, 手がかり刺激の出現から1秒以上が経過した後に刺激提示位置にサッカードを行った場合に一定の報酬を与えた。各試行のはじめにスクリーン上の固視点を見つめることで縮瞳が生じ, その後はサッカードの開始に至るまで徐々に瞳孔が散大した。手がかり刺激からサッカードまでの潜時と手がかり刺激直前の瞳孔径の間の相関係数は有意に負の値を示した ($r = -0.07 \pm 0.10$, $n = 22$, $p < 0.001$)。つぎに, NA システムの活動を变化させる目的で報酬量を10施行ごとに増減させたところ, 報酬量に応じて瞳孔径とサッカードの潜時が変化し, それらの時間経過には負の相関が認められた ($r_s = -0.59 \pm 0.25$, $n = 12$, $p < 0.001$)。また, 報酬量による瞳孔径の変化が大きいセッションほど, 大きな潜時変化がみられた ($r_s = -0.81$, $n = 12$, $p < 0.01$)。

【考察】青斑核を中心とするNAシステムの活動が高い状況では, サルの報告する時間がわずかに短縮することを見出した。NAは大脳皮質, 視床, 小脳等に投射し, 主に興奮性に作用すると考えられているため, NAが計時に関与するニューロン群の活動を増加させ, それが主観的な時間経過を促進させるのかもしれない。今後, NA関連葉の局所投与等によってその作用部位や詳細な機序を明らかにし, 時間情報処理の神経メカニズムにさらに迫ることができるものと期待される。(利益相反なし)

13. 網様体脊髄路—脊髄介在ニューロン系によるシナプス前抑制

○高草木 薫 (旭川医科大学脳機能医工学研究センター)

【目的】橋網様体から延髄網様体を介して脊髄に下行する抑制性網様体脊髄路は全身の骨格筋活動を減弱・消失させる。この抑制系はVII層に存在する脊髄介在細胞を介して運動細胞や介在細胞群にシナプス後抑制性を誘発する。本

研究では, この抑制系が感覚線維に対するシナプス前抑制を誘発するか否かを検討した。【方法】実験には14頭の除脳ネコ標本を用いた。橋・延髄網様体に連続微小電気刺激 ($10\text{-}50\mu\text{A}$, 50Hz) を加え, 延髄網様体の筋緊張抑制野 (延髄抑制野; 巨大細胞性網様核) を同定した。次に, 第6-7腰髄の前根電位, 後根電位, ならびに, 下部腰髄~上部仙髄から運動細胞と求心性線維の細胞内電位を記録した。延髄抑制野野にパルス刺激 ($1\text{-}3$ 発, $30\text{-}50\mu\text{A}$) を加え, 前根, 後根, 運動細胞, 求心性線維に誘発される電位を記録した。【結果】延髄抑制野の刺激によって運動細胞には peak 潜時が約 50ms の抑制性後シナプス電位 (IPSP) が誘発された。また, 前根にも過分極電位が誘発され, その振幅と時間経過は運動細胞で記録される IPSP と同様の変化を示した。一方, 後根にはシナプス後抑制の指標である求心性線維脱分極 (primary afferent depolarization; PAD) が誘発された。橋・延髄網様体に加えた電気刺激の効果をマッピングしたところ, 前根の過分極電位と後根の脱分極電位の振幅は延髄抑制野への刺激で最大となった。さらに, 一次求心性線維からの細胞内記録を試みた。延髄抑制野の刺激は, Ia 線維, Ib 線維, 皮膚線維に peak 潜時約 50ms の PAD を誘発した (Ia 群線維; $n = 6/12$, Ib 群線維; $n = 5/11$, II 群及び皮膚線維; $n = 7/13$)。【考察】筋緊張抑制系は Rexed VII 層の脊髄介在細胞を介して運動細胞や介在細胞にシナプス後抑制を誘発する。本研究の成績は, これらに加えて筋緊張抑制系が感覚線維に対してシナプス前抑制を誘発することを示唆する。従って, 筋緊張抑制系は, 脊髄反射の入力系 (感覚入力), 統合系 (介在細胞), 出力系 (運動細胞) の全てを抑制することにより, 筋緊張を減弱・消失させると考えられる。(利益相反なし)

14. ラット大脳皮質感覚運動野および小脳虫部損傷による姿勢調節障害の特徴

○佐々木健史¹, 長峯 隆², 松山清治³ (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)

本研究ではラットの姿勢調節の中枢メカニズムを理解するため, 運動発現や姿勢調節に重要な役割を持つ大脳皮質感覚運動野および小脳虫部に損傷を与えることで惹起される姿勢調節障害の特徴を明らかにすることを目的とした。このため, 健常ラット (健常群) および片側大脳皮質感覚運動野または小脳虫部を吸引除去したラット脳損傷モデル (皮質損傷群, 小脳損傷群) を用いて, 異なる傾斜速度で側方および前後方向へ床面を傾斜させた際のラット重心位置の変動を測定した。一部の動物では慢性埋め込み筋電極

を用いて四肢筋活動の記録も同時に行った。脳損傷群の測定は損傷前、損傷 2, 7, 14 日後に行い、重心位置の変動から重心動揺パラメーターを算出し損傷前後で比較した。

その結果、健常群はいずれの傾斜方向と速度において傾斜角度の増加に対応した安定的な姿勢調節を示した。しかし、脳損傷群では姿勢調節障害とその回復過程において脳の損傷部位の違いに応じた特徴が認められた。皮質損傷群は損傷 2 日後から側方傾斜時に重心動揺の増大を示したが、重心変動の側方に一定の傾向を示さなかった。これらの重心動揺は損傷後の時間経過に伴って回復を示した。小脳損傷群では前後方向傾斜時に姿勢動揺の増大が顕著にみられ、これらの障害は持続的で時間経過に伴う回復を示さなかった。

以上より、皮質損傷群における姿勢調節障害の回復には非損傷側皮質由来の同側皮質脊髄路や皮質網様体路の可塑的变化が関与した可能性が考えられた。一方、小脳損傷による姿勢調節障害には小脳虫部損傷による姿勢筋緊張低下および四肢協調性障害による影響が考えられた。また、小脳損傷による運動学習の障害により姿勢調節の回復が妨げられた可能性も考えられた。(利益相反なし)

15. 下肢血行不全の治療法の比較検討

○小山富康¹、笹嶋唯博² (¹元北海道大学, ²元旭川医科大学)

下肢特に足底は日常的に、立位の体重と心活動の血圧により、内外から強い圧迫を受ける。足底の小血管は一步ごとに強い圧迫を受ける。血管壁は内側から押し広げられ、体重によって押しつぶされる。このため下肢に間欠的、定常的疼痛などの病変が起きやすい。下肢血行障害の患者は米国で 2001 年に 8-12 万人であったという。一部の患者では下肢の切断に至る。笹嶋は外科的に、細い末梢静脈へのごく細い動脈枝の接続という、末梢静脈の動脈化法(DVA)を開発してきた。細静脈網に動脈血が流れることにより、酸素は安静状態ならば安定供給できることが拡散式から推定される。本人の正常部位で予め用意した皮弁により疾患部を覆えば、皮弁の小血管の健全な内皮細胞が分泌する VEGF が、患部筋肉の微小血管網の成立を促す。他方、近年は先進医療研究として骨髄から VEGF 分泌細胞の採取と下肢筋分注が有効という成果、また血中アデノシンの分解を抑制するシロザプトルの経口摂取が有効と報告され、いまや下肢血行不全は内科の範囲という研究者もいる。今回は、足関節動脈圧/腕動脈圧比 (ABI) に基づいて、これらの方法の有効性と得失について検討を試みた。DVA の施行症例では術前の ABI の平均値は 0.16-0.20 であった。一方、内科的治療者群では 0.35-0.60 という成績が見られた。

すなわち、DVA 群の患者は、はるかに厳しい状況にあったことが察知された。より厳しい状況におかれた患者が DVA 手術を受けているとみられる。(利益相反なし)

16. メタアンフェタミン慢性投与により引き起こされる脳内の概日リズムの変化～マクロ発光撮像装置を使った解析

吉川朋子^{1,2}、○本間さと²、本間研一² (¹北海道大学大学院医学研究科連携研究センター光バイオイメージング部門, ²北海道大学大学院医学研究科時間医学講座)

中枢刺激薬であるメタアンフェタミン (MAP) は、ドパミン (DA) 作動性神経のシナプス前終末において、DA トランスポーターを抑制することで DA の放出を増加させ、動物の行動量を亢進する。ラットやマウスへの慢性投与では、行動リズムを明暗サイクルから脱同調させ、急速交代双極性障害に見られる睡眠覚醒リズム障害と同様の行動リズム変化を生じる。MAP 依存性リズムは中枢時計、視交叉上核 (SCN) を破壊した動物においても誘導され、SCN 外の概日振動機構によって生じることが分かっているが、その局在は不明である。我々は、時計遺伝子 *Per2* 発現を発光レポーターにより測定することで、MAP 慢性投与により、DA 作動性神経を中心とした複数の神経核が複合振動体を形成し、MAP 依存性振動体として機能することを示唆する結果を得た。しかし、これまでは、各神経核の *Per2* 発現リズムを分離して測定していたため、各神経核がどのような関わりを持って複合振動体を形成するのかわからない。そこで、複合振動体に含まれる神経核間の神経回路を維持した状態で、概日リズム解析を行うために、大型脳スライスより発光イメージングを行う *ex vivo* 発光計測システムを立ち上げた。このシステムを用いて、PER2: LUC ノックインマウスの前額断スライスより発光イメージングを行い、SCN、線条体、頭頂皮質など複数の神経核より同時に発光リズムを測定することができた。大型脳切片の時計遺伝子発現レベルは、各部位を切り出した場合に比較しより安定し、減衰も少なく、精度よく周期や位相を解析できることが判明した。そこで、MAP を慢性投与し、行動位相が明暗サイクルから脱同調したマウスより、DA 神経を含む神経核および SCN に着目して、発光リズムを測定した。行動リズム位相と、各部位の PER2 リズムの位相の相互関係について検討する。(利益相反なし)

17. 視交叉上核ネットワークの長期膜電位イメージング

○織田善晃¹、榎木亮介^{1,2,4}、三枝理博³、本間研一¹、本間さと¹ (¹北海道大学大学院医学研究科時間医学講座、

²北海道大学大学院医学研究科連携研究センター光バイオイメージング部門, ³金沢大学大学院医薬保健学総合研究科分子神経学・統合生理学, ⁴JST さきがけ)

哺乳類の概日時計中枢は視床下部の視交叉上核に存在し、約2万個の神経細胞がネットワークを形成している。視交叉上核の神経細胞において、活動電位発生やイオンチャネルなどの電気生理学的な膜特性は、概日リズム変動を示すことが知られている。従来の電気生理学的な解析は、主に多電極アレイディッシュやパッチクランプ記録法を用いて行われてきた。両者とも高い時間解像度を有するが、多電極アレイディッシュは空間解像度が低く、神経発射頻度以外の電位変動を捉えることができず、またパッチクランプ法は、少数の細胞から短期間の記録しか得られない。本研究では、遺伝子コード型膜電位感受性蛍光プローブを用いて長期蛍光タイムラプスイメージングを行い、多数の神経細胞から膜電位変動を長期的に計測することを試みた。実験では、培養視交叉上核スライスの神経細胞に、アデノ随伴ウイルスを用いて膜電位感受性蛍光プローブ(ArcLightD)を発現させ、蛍光プローブの細胞発現パターンを詳細に観察し、さらに高感度EM-CCDカメラとディスク型共焦点システムからなる長期蛍光タイムラプスシステムにより数日間の計測を行った。その結果、視交叉上核の神経細胞ネットワークレベルで膜電位リズムを観察した。本発表では、膜電位リズムの視交叉上核ネットワーク内部位特異性について検討する。(利益相反なし)

18. 双極性障害における概日リズム異常の経時的評価

○山仲勇二郎¹、北市雄士²、北川 寛²、井上 猛^{2,3}、本間さと⁴、本間研一⁴ (¹北海道大学大学院医学研究科生理学講座, ²北海道大学大学院医学研究科精神医学分野, ³東京医科大学精神医学分野, ⁴北海道大学大学院医学研究科時間医学講座)

双極性障害は抑うつ状態と躁状態を繰り返す慢性疾患である。双極性障害では、不安定な睡眠覚醒リズム、概24時間リズム、症状の季節的な概日リズム異常が知られている。本研究の目的は、双極性障害の概日リズム異常を客観的に捉えることにより、概日リズム異常の背後に想定される生物時計の障害が存在するか否かを明らかにすることである。本研究では、北海道大学病院精神科および医療法人社団北陽会牧病院に通院中の双極性障害者10名、健常者18名を対象に、1年以上の長期間にわたり概日リズムを測定した。睡眠覚醒リズムの測定は、自記式の睡眠リズム日誌と腕時計型行動記録計(アクチウォッチ)を用いて記録した。アクチウォッチは、被験者の非利き手に装着し活動量と光照度を2分間隔で記録した。さらに、メラトニンリ

ズム位相を推定するため、覚醒時(10時、13時、16時、19時)に唾液を採取し、唾液中のメラトニン濃度をラジオイムノアッセイにより測定した。睡眠覚醒リズムデータを、カイ自乗ベリオドグラム法を用いて1か月ごとに周期解析を行った結果、健常者では24時間の有意な周期成分が認められたが、双極性障害では24時間の他にも有意な周期成分が認められた。さらに、24時間周期を示すが活動量が周期的に増減を繰り返す例、睡眠時間に異常を示す例がみられた。唾液メラトニンリズムを解析した結果、健常者では4時点とも2.0pg/ml以下の低濃度を示した。一方、双極性障害では健常者と同様に低濃度を示す例もみられたが、同一個人内でも唾液採取の時期により健常者の平均値以上の高濃度を示す例が認められ、メラトニンリズムの位相変化が疑われた。今後は、内的脱同調と気分症状との関連についても解析していく予定である。なお、本研究は北海道大学医学研究科、北大病院倫理委員会により承認されている。(利益相反なし)

19. TRPC チャンネルによる心循環恒常性の制御機構

○西田基宏(自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター(生理学研究所)心循環シグナル研究部門)

血液体肺循環の恒常性は、主に心筋、血管平滑筋、骨格筋の3つの筋肉によって支えられている。これら筋肉細胞は個体発生時から常に物理的負荷に曝されながらもこれに適応(筋肥大)しつつ循環恒常性を維持している。しかし、過度な負荷が続くと筋肉は十分に適応できなくなり、やがて機能不全に至る。我々は筋肉がストレス適応から不適応へと移行するメカニズムを解明することで、健康寿命の増加につながる新たな医療基盤技術の開発を目指している。我々はこれまで圧負荷による心臓の形態構造改変(リモデリング)を制御するカチオンチャネル(TRPC3/6)に着目してきた。TRPC3欠損マウスまたはTRPC3阻害化合物を投与したマウスでは、圧負荷による心臓リモデリングが有意に抑制され、このメカニズムとしてTRPC3とNADPH酸化酵素との機能共役が関与することを新たに見出した。その一方で、圧負荷に対する代償反応である心肥大はほとんど抑制されなかった。以上の結果から、メカノ作動性TRPC3チャンネルは心臓リモデリングの仲介分子として働く可能性が示された。一方、自由運動を行ったマウスの大動脈を結紮し、下肢虚血を施したところ、自由運動させたマウスにおいて末梢循環障害が有意に改善された。下肢虚血を行った腓腹筋ではTRPC6チャンネルの発現量が著しく増加しており、自由運動はTRPC6の発現増加を顕著に抑制した。さらに、TRPC6欠損マウスにおいても下肢虚血後の末梢循環障害が有意に改善されることが明らかとなっ

た. 以上の結果は, TRPC3/6 チャンネルが筋肉のストレス不
適応を仲介分子として働くことを強く示唆するとともに,

TRPC3/6 チャンネルの阻害が筋肉の再生・修復を促す可能
性を示している. (利益相反なし)