

### シナプス可塑性時の AMPA 受容体動態の可視化

平野丈夫(京都大学大学院理学研究科生物物理)

シナプス可塑性は学習・記憶の細胞レベルの基盤現象である。その中でも、海馬の長期増強は最も注目されて盛んに研究されてきた可塑性である。この長期増強の発現に際しては、シナプス後膜上の AMPA 型グルタミン酸数の増加が報告されている [1]。しかしながら、複数種ある AMPA 受容体の各々が、どのようなタイミングと経路でシナプス後膜に集積するのかは不明であった。そこで、私たちは長期増強時の各 AMPA 受容体動態を可視化することをめざし、新しい実験手法を開発した [2]。

蛍光標識した AMPA 受容体を高シグナル・ノイズ比、高分解能で観察するために、カバーガラス表面直近の蛍光に限って検出できる全反射蛍光顕微鏡を利用することにした。また、全反射顕微鏡を有効に活用するために、培養神経細胞のシナプス後膜をガラス面上に直接形成させることを考えた。そして、シナプス形成誘導能を有するニューレキシンでカバーガラス面をコートし、その上に海馬神経細胞を培養したところ、シナプス後膜をガラス面上に直接形成させることができた (図)。次に、蛍光標識した各 AMPA 受容体サブユニットを神経細胞で発現させた上で、電場刺激または化学刺激により長期増強を引き起こして、各受容体の動態を調べた。AMPA 受容体は、GluA1-4 の 4 種類のサブユニットが適切な組み合わせで四量体を形成しているが、今回実験対象としている海馬の錐体神経細胞では、GluA1 と GluA2 で形成されるヘテロ四量体と GluA2 と GluA3 のヘテロ四量体が主にシナプス伝達を担うことがわかってい

た。また、GluA1 のみで形成されるホモ四量体の長期増強への関与については、研究者間で見解が分かれていた [3, 4]。今回、GluA1-3 各サブユニットが、長期増強の誘導刺激後に異なる時間経過でシナプス後膜において増加することを明らかにした。また、各サブユニットについて、受容体が細胞内から細胞膜へ移動するエキソサイトーシス、および受容体の細胞膜上でのシナプス後膜への側方移動等を観察できた。シナプス後膜内外での各サブユニットのエキソサイトーシス頻度を、各サブユニットの単独発現および 2 種類のサブユニットを共発現した状況で計測する実験も行い、長期増強発現時の各タイプの AMPA 受容体の動態を推定した。長期増強誘導刺激直後に、まず GluA1 ホモ 4 量体がシナプス後膜に直接エキソサイトーシスされることがわかった (図)。それと同時におよびその数分後に、GluA1 と GluA2 のヘテロ 4 量体がシナプス後膜外にエキソサイトーシスされ、その一部がシナプス後膜へと細胞膜上を移動すると推定した。さらに刺激後 20 分以上経過してから、GluA2 と GluA3 のヘテロ 4 量体がシナプス後膜外へエキソサイトーシスされ、その一部がシナプス後膜へ移動することも推測できた。

私たちは、長期抑圧時の各 AMPA 受容体の動態の解析と受容体の細胞内への取り込みであるエンドサイトーシスの可視化に関する実験も行った。そして、長期抑圧発現に際しては、シナプス後膜において GluA1 と GluA2 が異なる時間経過で減少することが分かった。また、緑色の蛍光タンパク質 super ecliptic pHluorin で標識したトランスフェリン受容体と赤色の蛍光タンパク質 TagRFP-T で標識したクラスリンの記録を行い、

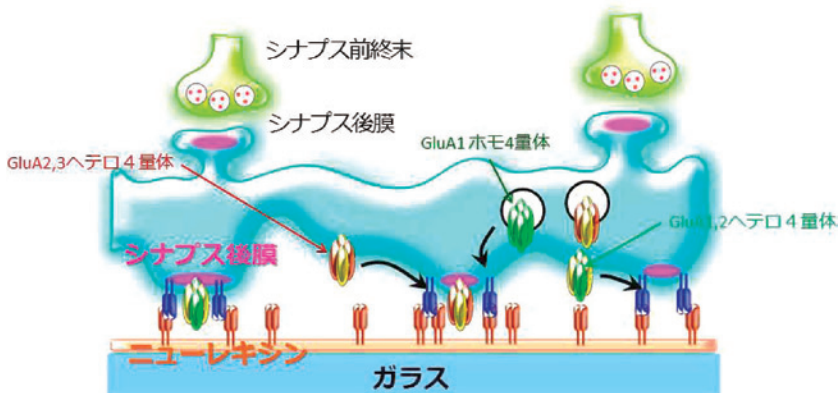


図 長期増強時の各 AMPA 受容体の動態

両者の同時消光を観察し、それをエンドサイトーシスと同定した。現在、AMPA 受容体のエンドサイトーシス記録を試みている。本研究は、京都大学理学研究科助教の田中洋光および大学院生の藤井俊平との共同研究であり、結果の一部は既に論文報告した [2]。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Shepherd JD et al: *Annu Rev Cell Dev Biol* **23**: 613-643, 2007
2. Tanaka H et al: *Cell Reports* **1**: 291-298, 2012
3. Plant K et al: *Nat Neurosci* **9**: 602-604, 2006
4. Adesnik H et al: *J Neurosci* **27**: 4598-4602, 2007

### AMPA 受容体ダイナミクスの光化学的解析

神谷温之 (北海道大学医学研究科神経生物学分野)

近年の研究において、AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA 受容体) のシナプス局在は極めて動的に制御されていることが明らかになった。海馬の長期増強では細胞内プールに存在する予備の AMPA 受容体がシナプスの細胞膜に移行することでシナプス伝達を強化することが知られている。しかしながら、「いつ」AMPA 受容体の補給が生じるかについては諸説あり、これまで一定の結論が得られていなかった。その理由の一つとして、これまでに用いられてきた GFP などの蛍光タンパクや抗体標識金粒子などの分子タグが巨大分子であり、生理的条件下での AMPA 受容体の動態を測定できていなかった可能性が考えられる。そこで、はるかに分子サイズの小さな化合物である ANQX を用いることで、より生理的な条件下での AMPA 受容体のシナプス移行の時間経過を解析することを試みた。光反応性 AMPA 受容体ブロッカーである ANQX は照射により AMPA 受容体と不可逆的に結合する。この性質を利用して ANQX 投与と短時間の照射を組み合わせて細胞外 AMPA 受容体を阻害し (光不活化)、その後の興奮性シナプス後電位 (EPSP) の回復の時間経過を測定することで、細胞内プールの AMPA 受容体がシナプスに移行する速度を評価した。静止状態では、光不活化後の EPSP の抑制は持続的で数時間にわたって回復せず、細胞内プールからの定常的なシナプス移行は、スライス標本の内在性 AMPA 受容体に関してはほとんど生じていないと考えられた。長期増強誘発の直後に光不活化を行った場合には EPSP の回復の加速がみられたことから、細胞内予備プールの AMPA 受容体は、

海馬シナプスに高頻度刺激を与えた直後にシナプスの細胞膜に補給されることがわかった。長期増強誘発の 1 時間後に光不活化を行った場合には EPSP の回復の加速は生じなかった。高頻度刺激による AMPA 受容体のシナプス移行の加速は一過性で、少なくとも高頻度刺激の 1 時間後にはシナプス移行はほとんど生じていないと考えられた。また、光学的な手法を用いるもう一つの利点である AMPA 受容体制御の空間分解能を利用して、照射の領域を局限することで、複雑な脳の神経回路網における特定の入力を選択的に遮断する手法に応用することを目指した。マウス海馬スライス標本において入力特異的な光遮断が可能かについて検討するために、主要シナプス入力細胞層ごとに分離している CA3 野の神経回路を対象として実験を行った。CA3 野の錐体細胞には苔状線維シナプスと連合線維シナプスの 2 つの性質の異なるシナプスが収束する。苔状線維シナプスと連合線維シナプスは CA3 野の異なる細胞層 (透明層 stratum lucidum と放線層 stratum radiatum) に入力するため、UV 照射の範囲を局限することで、それぞれの入力を選択的に抑制することが可能になると考えられる。CA3 野ニューロンから記録を行い、苔状線維と連合線維を交互に電気刺激することで、2 つの入力に対するシナプス応答を計測した。局所灌流システムを用いて ANQX を CA3 野領域に局所的に投与し、苔状線維の走行する透明層に局限して照射を与えると、隣接する連合線維入力に影響を与えずに苔状線維入力のみを選択的に抑制することが可能であった。脳内の多くの興奮性シナプス伝達は AMPA 受容体が担うことから、本手法は汎用性の高いグルタミン酸シナプス伝達の入力特異的遮断法となると考えられた。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Kamiya H: *J Neurosci* **32**: 6517-6524, 2012

### 環境によって制御される経験依存的 AMPA 受容体シナプス移行

高橋琢哉 (横浜市立大学)

AMPA 受容体の生体におけるシナプス移行について発表した。AMPA 受容体シナプス移行を monitor する方法を二つ紹介した。一つは電気生理学的標識法である。この方法は Malinow らによって開発された方法だが、GFP-GluA1 (AMPA 受容体の subunit の一つ) を virus で強制発現させると GFP-GluA1 はホモマーを形成する。通常の内性 AMPA 受容体は GluA2 を含むヘテロ

マーを形成していることが多く、この場合は膜電位が正の場合も負の場合も電流が流れるが、GFP-GluA1 のホモマーは膜電位が負のときのみ電流が流れる。これを内向き整流と呼ぶ。GFP-GluA1 がシナプスに挿入されると、挿入されていないシナプスに比べてより内向きの整流を示すようになる。これが組み替え受容体がシナプスへ挿入されたことの指標になる。発表者は以前この方法を用いて生後14日目のラットのバレル皮質の第4層—2/3層錐体細胞シナプスにおいてひげ経験依存的なAMPAシナプス移行が起きることを示した (Takahashi et al. Science 2003)。すなわちひげがある場合はGFP-GluA1発現細胞は非発現細胞よりも内向きの整流を示すが、ひげがない状態では発現細胞、非発現細胞間で内向き整流に差がなかった。すなわち、ひげ経験依存的にGluA1がシナプスへ移行していることが明らかになった (Takahashi et al. Science 2003)。もう一つの方法はAMPA/NMDA比を観察することである。この値が大きいということはよりAMPA受容体がシナプスに存在するというを示している。生後2週目のラットにおいて、ひげがある状態ではバレル皮質の第4層—2/3層錐体細胞シナプスにおけるAMPA/NMDA比はひげがない状態のそれよりも小さかった。この方法をもちいて様々な環境下でのAMPA受容体シナプス移行を調べた。

精神的ストレスは脳機能を含めた様々な生体現象に影響を及ぼす。そしてそのストレスレベルにより、生体機能にプラスに働く場合とマイナスに働く場合があると考えられている。例えば軽度のストレスでは精神活動を活発化し学習機能を向上させることがあるが、過度のストレスがかかると逆に精神活動を抑制しうつ状態などを引き起こす。すなわちストレスの作用はU字型の効果を持っていると考えられる。ストレスは経験依存的なAMPA受容体のシナプス移行にどのような影響を及ぼすのであろうか？われわれは生後まもなくのラットを一日のうちの一定時間(6時間)母親および他のラットから引き離すことによりその後の経験依存的なGluR1のシナプス移行を阻害することを見出した (Miyazaki et al. J. Clinical Investigation 2012)。

さらに我々は視覚剥奪ラットのバレル皮質におけるAMPA受容体シナプス移行を観察した。正常動物においては、バレル皮質第4層—2/3層シナプスにおけるGluR1のひげ経験依存的なシナプス移行は生後20日を越えると観察されなくなる (Jitsuki et al. Neuron 2011)。バレル皮質第2/3層におけるひげ—バレル間の機能的マップが生後

20日を越える時点ですでに構築されているため、新たなシナプスの再構築の必要がないためと思われる。一方この日齢において視覚を剥奪するとバレル皮質第4層—第2/3層シナプスにおいてGluR1のシナプス移行が起きようになる。さらに視覚剥奪動物のバレル皮質においてセロトニンの分泌が増え、このセロトニン分泌によりGluR1のシナプス移行が仲介されているということも明らかになった。このようなGluR1のシナプス移行促進により、バレル皮質第2/3層におけるひげ—バレル間の機能的マップがより鋭敏になるということも明らかになった (Jitsuki et al. Neuron 2011)。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

### デルタ2グルタミン酸受容体は如何にLTDを制御するか

幸田和久 (慶應義塾大学医学部生理学教室)

長期増強や長期抑圧 (LTD) などのシナプス可塑性は、記憶・学習の細胞レベルの基礎過程である。シナプス可塑性は脳の様々な部位で生じることが知られているが、運動学習に重要な役割を果たすと考えられている。小脳プルキンエ細胞と顆粒細胞間のシナプスで生じるLTDは、その誘導にデルタ2グルタミン酸受容体 (GluD2) を必要とする点で非常に特異な存在である。GluD2はイオン透過型グルタミン酸受容体に分類されているが、“孤児受容体”で、その機能は不明であった。GluD2欠損マウスでは、顆粒細胞の軸索である平行線維 (PF) とプルキンエ細胞 (PC) のシナプス形成異常があるとともに、LTDが障害されていることから、GluD2はPF-PCシナプスの形成・維持とシナプス可塑性に必須の分子であることが明らかになったものの [1]、依然としてGluD2が如何にその過程で機能しているかは明らかではなかった。そこで我々は、ウイルスベクターを用いてGluD2の変異体を導入する表現型回復実験によって、細胞外N末端部位がシナプス形成・維持に、細胞内C末端部位に存在するPDZ結合部位がLTDに必要なことを報告した [2]。

では、細胞内C末端はどのようにLTDの誘導に関与しているのだろうか。GluD2のC末端PDZ結合部位には、いくつかのタンパク質が結合することが知られている。中でも、PTPMEGはチロシン脱リン酸化酵素で、その欠損マウスではLTDが障害される。またデルフィリンにはチロシンリン酸化酵素であるSrcが結合し、その欠損マウスは、LTD誘導閾値が低下している。これらの知見

は、小脳 LTD にチロシン脱リン酸化が重要な役割を果たすことを示唆している。また既に AMPA 受容体サブユニット 2 (GluA2) C 末端のセリン 880 (S880) の PKC によるリン酸化が小脳 LTD に必須であることが知られているが、チロシンリン酸化については報告がない。海馬 CA1 領域の LTD では、GluA2 のチロシン 876 (Y876) のリン酸化状態の意義に関して議論が分かれている。そこで、GluD2 欠損マウスの小脳において GluA2 の S880, Y876 のリン酸化状態を検討したところ、同マウスでは Y876 のリン酸化が有意に亢進していることを我々は見出した [3]。さらに、高濃度 K<sup>+</sup> グルタミン酸処理による “chemical LTD” 誘導を用いて、LTD 誘導による GluA2 のリン酸化状態の変化を調べた結果、野生型においては S880 リン酸化が有意に上昇し、Y876 リン酸化が有意に低下したのに対し、GluD2 欠損マウスでは、LTD 誘導後の双方のリン酸化レベルに有意な変化が認められなかった。これらの所見は、PF-PC LTD 誘導の際、GluA2 の Y876 の脱リン酸化が生じ、この脱リン酸化によって S880 のリン酸化が可能となることを示唆しているが、実際 *in vitro* において、あらかじめ GluA2-C 末端の Y876 をリン酸化しておく、引き続き PKC による S880 のリン酸化が有意に抑制された。電気生理学的にも、Src ファミリー・キナーゼの特異的阻害剤を GluD2 欠損マウスの PC 内に投与すると、LTD が回復した。さらに、Y876 をフェニルアラニンに置換した非リン酸化変異体を作成し、GluD2 欠損マウスの

PC に導入したところ、LTD が回復した。即ち、Y876 の脱リン酸化が GluD2 欠損マウスの LTD を回復させる十分条件であることが明らかとなった。

それでは、如何に GluA2-Y876 は脱リン酸化されるのか。PTPMEG がチロシン脱リン酸化酵素であることから、同タンパク質が関与している可能性が高い。実際、野生型 PC に酵素活性のない PTPMEG を発現させると LTD が障害されたが、酵素活性と同時に GluD2 への結合能を失わせた変異体の場合は、LTD の変化は見られなかった。即ち、PTPMEG の GluD2 との結合と、脱リン酸化酵素活性が LTD 誘導に必要であることになる。さらに、我々は基質トラップ法と Mass spectrometry により、GluA2-Y876 が PTPMEG によって、直接脱リン酸化されることを示した。

GluD2 の下流のシグナルは長らく不明であったが、GluD2 は、その C 末端に結合する PTPMEG を介して GluA2 の Y876 の脱リン酸化を行い、この脱リン酸化が AMPA 受容体のエンドサイトーシスに必須である S880 のリン酸化を可能にする、いわばゲートキーパーとして機能していることが明らかとなった。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Kashiwabuchi et al: Cell **81**: 245-252, 1995
2. Yuzaki: Neuroscience **162**: 633-643, 2009
3. Kohda et al: Proc Natl Acad Sci USA **110**: E948-957, 2013

## マカクサル運動野損傷モデルを用いた把握機能回復に関わる神経の可塑的变化

村田 弓 (独) 産業技術総合研究所ヒューマンライフテクノロジー研究部門)

私達は脳損傷後に行うリハビリテーション訓練(リハビリ訓練)が脳に与える影響を明らかにすることを目的として研究を行っている。

これまで、サルの大脳皮質運動野損傷モデルを用いて、リハビリ訓練が、精密把握の回復を促進することを明らかにしてきた [1]。本実験では対象として母指と人差し指の先端で物体を把握する精密把握が可能なアカゲザルを用いた。まず、皮質内微小電極刺激法 (ICMS: 刺激頻度 333 Hz, 刺激強度 1~50 $\mu$ A) を行い、10 $\mu$ A 以下の刺激で手指の筋収縮がおこる領域を第一次運動野の手領域とした。次に、第一次運動野の手領域に神経毒であるイボテン酸を注入して、不可逆的な損傷を作成した。損傷作成の翌日には手に弛緩麻痺が認められ把握運動が困難となった。損傷作成後にサルをリハビリ訓練群と非訓練群に分け、精密把握の回復過程を比較した。精密把握課題として、直径 10~13mm 円筒状の孔から、直径約 3mm の小球状のエサを取り出す課題を用いた。訓練群では精密把握課題を 1 日 1 時間、週 5 日行った。訓練課程では精密把握課題の難易度を上げることで回復段階に応じた訓練を行った。すなわち、回復初期には難易度の低い直径の大きな孔を用い、把握機能の回復にともなって、難易度の高い直径が小さい孔からエサを取り出す訓練に移行した。

損傷後数週間経過した時期には、訓練群と非訓練群ともに握力把握は可能となった一方、精密把握は困難であった。そのため、孔からエサを取るときには母指の先端ではなく、母指の背側面を使って握りこむようにエサを把握する代償把握を使用し、成功率は損傷前よりも低い状態であった。訓練群では損傷後約 1 ヶ月半後には課題の成功率は損傷前と同程度まで回復した。さらに、精密把握の使用が増加し、損傷前と同様に精密把握を用いて課題を遂行するようになった。一方、非訓練群では代償把握が精密把握に切り替わることはなく代償把握を使い続け、損傷後 1 ヶ月半が経過しても、成功率は損傷前及び訓練群よりも有意に低かった。以上の結果から、リハビリ訓練が第一次運動野損傷後の精密把握の機能回復を促進することが示唆された。

さらに私たちは、脳損傷後の機能回復に伴う脳機能の変化を明らかにするために、陽電子放出断層撮影法 (PET) による脳活動イメージング、および薬物による神経活動抑制実験を行った。

まず、第一次運動野の損傷を作成する前に精密把握をしているときのサルの脳活動を、 $H_2^{15}O$ -PET を用いた脳血流測定により計測した。精密把握の課題には 7mm 角のプラスチック製のつまみを把握する課題を用いた。上記の行動実験と同様に、第一次運動野損傷直後は把握運動が困難であったが、損傷後 1 ヶ月間精密把握の訓練を行うと、精密把握の回復が認められた。精密把握が回復した脳損傷後 1~2 ヶ月および損傷後 3~4 ヶ月に精密把握中の脳活動を測定し、第一次運動野損傷前と損傷後の脳活動を比較した。その結果、損傷後の回復期には、損傷半球の運動前野腹側部の活動が損傷前よりも上昇する傾向が認められた。運動前野腹側部の活動は損傷後 1~2 ヶ月後に比べて損傷後 3~4 ヶ月の時期に減少する傾向が認められた。

第一次運動野損傷後に活動上昇が認められた損傷半球の運動前野腹側部の活動が精密把握の回復に関わっているかを確かめるために、損傷半球の運動前野腹側部に GABA<sub>A</sub> レセプターのアゴニストであるムシモールを投与して一時的に神経活動を抑制した。損傷前に課題遂行手と対側の運動前野腹側部の活動を抑制すると把握動作に軽度の稚拙さが認められたものの精密把握を遂行することは可能であった。一方、第一次運動野損傷後に精密把握が回復した時期に損傷半球の運動前野腹側部を抑制すると、精密把握の遂行が困難となった。

以上の結果から、第一次運動野損傷後の精密把握の機能代償に損傷半球の運動前野腹側部が関わっている可能性が示唆された。機能代償の背景として、回復過程で脳内の神経ネットワークが変化した可能性が考えられる。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Murata et al: J Neurophysiol 99: 773-786, 2008

## ロボットを用いたアシストステップングが脊髄と脊髄より上位中枢神経に与える神経生理学的影響

中澤公孝 (東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系)

はじめに

近年、片麻痺あるいは対麻痺患など歩行困難者のリハビリテーションとして、トレッドミル上で体重を免荷し療法士やロボットがステップングをアシストして行う免荷式トレッドミル歩行トレーニング (body-weight support stepping training, BWSST) の効果が報告されている。BWSST ではステップングに伴う感覚入力が中枢神経系の再組織化に重要な役割を担うと考えられている。しか

しながら、実際、BWSST時に大脳運動野や脊髄運動ニューロンの活動が変調されるのか、長期的トレーニングによって再組織化が起こるのかは検証されていない。私たちの研究グループは、この視点からこれまで、歩行トレーニング用ロボットシステム (Lokomat) を用いたトレッドミル歩行トレーニング中およびトレーニング後の各種神経経路の興奮性を調べてきた。ここでは、Lokomatによる他動歩行中の、1) 皮質脊髄路、2) 脊髄反射 (皮膚反射, H-反射) の興奮性変調についてまとめて紹介する。

#### 実験

##### 1) 皮質脊髄路

対麻痺後の自立歩行回復可能性との関係が強いとされる前脛骨筋 (TA) を対象とし、完全他動ステップ中の皮質脊髄路興奮性を経頭蓋磁気刺激 (TMS) を用いて調べた。その結果、TAの運動誘発電位 (MEP) はステップの位相に応じて大きく変調され、立位姿勢時に比べて立脚初期と後期において有意に増大した [1]。しかし、被検者を吊上げ、空中ステップにすると MEP の増大および位相依存の変調は消失した。このことは少なくとも TA の皮質脊髄路は下肢のステップに伴う感覚入力、とりわけ荷重関連の感覚入力により促通することを示している。

##### 2) 皮膚反射

TMS同様、TAを対象とし、皮膚反射 (CR) の変調を調べた。その結果、TAのCRは、これも荷重有りの完全他動ステップ中、立脚後期から遊脚初期に至る移行期においてピークを形成することが判った。このパターンは随意歩行中のCRの変調パターンと同様であり、歩行中のTA皮膚反射変調パターンは荷重関連の感覚入力に大きく影響されることが示唆された [3]。

##### 3) H-反射

ヒラメ筋 (SOL) およびTAからH-反射を誘発し、その変調パターンを調べた。その結果、SOLのH-反射はいずれの筋においても完全他動ステップ時に全体として有意に減少した [2]。この減少は荷重情報の有無にかかわらず観察された。TAのH-反射は誘発が容易ではなく、未だ記録できた健常者および対麻痺者の数は少ないが、記録できた被検者すべてにおいてSOL同様の減少が観察された。さらに、完全他動ステップ中に安静上肢の手関節屈筋からH-反射を誘発したところ、これも有意に減少することが明らかとなった。これらの結果は、上肢、下肢にかかわらずステップに伴う感覚入力は、おそらく脊髄の抑制性介在ニューロンを介して脊髄反射を抑制

することを示唆する。

#### まとめ

上記の結果をまとめると、これまでのところ、総じて、他動ステップに伴う荷重に関連する感覚入力は大脳皮質の興奮性を増大し、ステップキネマティクスに関連する感覚情報は脊髄反射を抑制する傾向にあると考えられた。これらの結果はいずれも急性の影響であるが、今後トレーニングに伴う慢性の影響なども調べることで歩行リハビリテーションによる効果の機序に迫ることができると考える。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Kamibayashi K et al: Eur J Neurosci **30**: 100–109, 2009
2. Kamibayashi K et al: Exp Brain Res **202**: 385–395, 2010
3. Nakajima T et al: Eur J Neurosci **27**: 1566–1576, 2008

#### 運動イメージに伴うヒト一次運動野の興奮性の変化およびその臨床的意義について

梁 楠 (広島大学大学院医歯薬保健学研究院基礎生命科学部門生理機能情報科学)

中枢神経系損傷患者の機能回復を図る方法として運動療法は有効であり、対象者の運動スキルを最大限に伸ばすことでパフォーマンスの向上を図る。しかし、重度の運動麻痺を呈する患者において、麻痺側に対する直接的な運動介入に限界がある。そこで、間接的な方法として運動イメージが注目されている。

運動イメージは実際の運動を行わずに脳内でその運動を想起する方法であり、運動制御に関連する中枢神経回路を賦活する。習得された運動をイメージすることでパフォーマンスが向上することは経験的に知られており、アスリート競技で利用されてきた。20世紀末から医工学技術や研究手法の進歩により、運動イメージが「目に見える」形で科学的・実験的に捉えることができるようになり、リハビリテーションの臨床においても利用され始めている。一方、運動イメージの中枢メカニズムについてまだ不明な点が多い。特に、運動指令の最終出力機構である大脳皮質運動野の興奮性の変化は明らかではない。そこで我々は、ヒト一次運動野の興奮性を非侵襲的・定量的に評価できる経頭蓋磁気刺激法 (transcranial magnetic stimulation, TMS) を用いて、運動イメージの中枢メカニズムの解明および臨床応用方法の探索を目的として一連の実験を行なった。

TMSを用いて一次運動野を刺激すると筋電図から誘発される反応は運動誘発電位 (motor evoked potential, MEP) と呼ばれ、運動イメージによって MEP の振幅値は増大する [1]. その時、脊髄  $\alpha$  運動ニューロンの興奮性の指標である H 反射は変化しないので、MEP 振幅値の変化は上位脳中枢の興奮性の変化を示唆している。一次運動野内の抑制と促進回路の興奮性が調べられる二連発 TMS を用いると、随意運動時と同様に抑制回路の脱抑制が興奮性の増大に寄与していることが分かった [2]. さらに、イメージされる運動に関わる主動筋の皮質脊髄路の興奮性が特に上昇し、拮抗筋では相反抑制を示すが、共同筋に関しては明らかではなかった。ヒトの日常生活活動で単一の筋が関わることはほとんどなく、多くの筋が協調して運動を実現していることから、運動イメージは随意運動のリハーサルであり脳内表象が同様であることが予測される。実際、前腕回内位と中間位でそれぞれ漸増的に示指の外転運動を行ない、主動筋である第一背側骨間筋 (first dorsal interosseous muscle, FDI) と前腕共同筋の橈側手根伸筋 (extensor carpi radialis muscle, ECR) から筋電図を記録すると、前腕中間位に比較して回内位では FDI の筋放電量が多い一方、ECR では逆に少ない結果が得られた [3]. 同様の肢位で示指の最大運動イメージを行なうと、MEP の振幅値は随意運動時の筋放電量と類似した結果が得られ、前腕中間位に比較して回内位では FDI の MEP の増大量が多い一方、ECR では逆に少なかった。安静状態で前腕肢位を変え、TMS 刺激強度を運動閾値の 1.0-1.4 倍に調整して MEP を記録すると、全ての筋において両肢位で有意な差がみられなかった。すなわち、運動イメージ時に主動筋および共同筋でみられた MEP 促進量の差は、肢位変化による固有受容性求心性入力の変化によるものではなく、異なる運動戦略が脳中枢にプログラムされており、中枢運動指令によって表象されたと考えられる。

最近、我々は脳卒中片麻痺患者を想定して対側肢の随意運動が運動イメージに与える影響について調べた。健常者を対象として、左手の随意運動を異なる運動方向と筋力レベルで行いながら右手で運動イメージを行ない、その時の左運動野の興奮性を調べた [4]. 一側の随意運動に伴い、対側だけではなく同側運動野の興奮性も上昇し、皮質内抑制回路が関わっていることが明らかになった [5]. 運動方向の違いによる影響について [図 1A], 右手イメージする運動と同位相の運動を左手で行なうと、運動イメージによる MEP の促進量は変

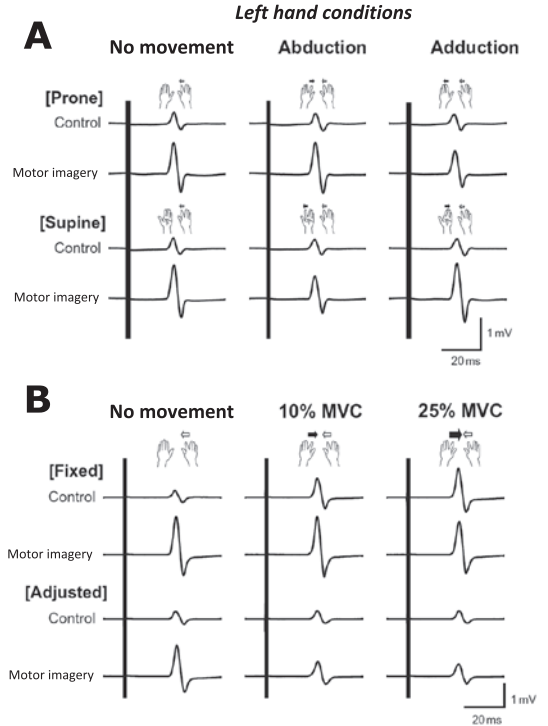


図 1. 左示指の様々な条件下で右示指の運動イメージを行なう時、左一次運動野を刺激し右第一背側骨間筋から導出される運動誘発電位の典型例。文献 4 より一部変更。

化しなかったが、逆位相の場合は MEP の促進量は有意に減少した。筋力の違いによる影響について [図 1B], 左手の運動は同位相で最大随意収縮時の 10% と 25% を維持すると、安静時に比べ MEP の振幅値は筋力に依存して増加するが、それぞれの条件で右手運動イメージを行なうと MEP の振幅値に有意な差がみられなかった。TMS の強度を調整して左手各条件下での MEP 振幅値が一定の状態で行なうと、右手運動イメージ時では MEP の促進量が有意に減少した。以上の結果から、一側肢の随意運動は同側運動野の興奮性を上昇させるが、運動の位相 (逆位相) あるいは筋力の違い (筋力の増加) によって対側肢運動イメージによる促進効果は減少することが示された。したがって、臨床で運動イメージを利用する時に、対側肢の随意運動を考慮する必要があることが示唆された。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Kasai T et al: Brain Res **744**: 147-150, 1997
2. Liang N et al: Adv Exerc Sports Physiol **12**: 45-50, 2006
3. Liang N et al: Neuroreport **18**: 1241-1245, 2007
4. Liang N et al: Clin Neurophysiol **122**: 550-557, 2011
5. Liang N et al: Neurosci Lett **433**: 135-140, 2008

### 脳の可塑性と運動療法

道免和久 (兵庫医科大学リハビリテーション医学)

使用依存性脳可塑性 (use-dependent plasticity) に代表される神経科学的知見は、様々なニューロリハビリテーションとして臨床応用されるようになった。中でも、Evidence が確立した代表的な治療法が CI 療法 (Constraint-induced movement therapy) [1] である。CI 療法は、脳卒中などによる片麻痺の非麻痺側を拘束し、段階的な難易度で調整された訓練課題 (Shaping 課題) を集中的に行うことにより、麻痺側の随意運動を誘発し、改善に導く治療法である。我々は CI 療法を日本に導入し [2-5]、これまで 150 例以上の脳卒中片麻痺患者の上肢麻痺の治療に効果をあげてきた。麻痺の改善だけでなく、痙縮の軽減も電気生理学的に証明した [6]。さらに、拡散テンソル画像から内包後脚の錐体路線維の残存率を計算したところ (図) [7]、CI 療法前は麻痺のスコアと相関がなかったが、治療後は高い相関が得られたことから、拡散テンソル画像から CI 療法後の到達レベルを予測することができる。

CI 療法は単純動作のスパルタ式訓練ではなく、きめ細かな訓練課題の調整を行いながら、運動学習を進める極めて丁寧な治療法である。その臨床で重要な点は、1) 非麻痺側の拘束、2) 課題指向的アプローチ、3) 難易度調整と達成感、4) 多様性と繰り返し、5) Transfer package [8] などである。

CI 療法は運動学習理論から直接発展した治療法ではないが、運動学習とニューロリハビリテーションの関わりを考察する中で、CI 療法が「運動学習療法」とも呼べる治療法であることがわかってきた。運動学習には 3 つの学習則 [9]、すなわち「内部モデルによる教師あり学習」「強化学習」「教師なし学習」が知られている。CI 療法の課題指向的アプローチや、難易度調整により常に達成感が得られるように配慮することは、報酬による強化という「強化学習」から説明できる。多様な

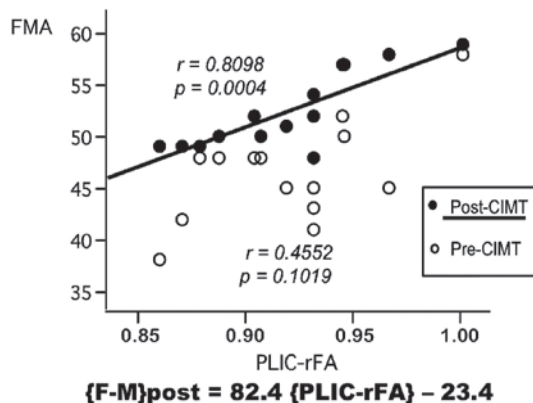


図 CI療法前後のFMA (Fugl-Meyer Assessment 上肢スコア) と PLIC-rFA (内包後脚の Fractional anisotropy の患健比) との関係。CI療法前は有意な相関を認めないが、CI療法後は高い相関を示し、図下の回帰式でCI療法後のスコアを予測できる。(Marumoto K et al. Restor Neurol Neurosci. 2013)

課題を繰り返すことは「教師あり学習」による内部モデルの再構築に役立つであろう。また、より多く実行した運動がより学習されていく過程は、use-dependent plasticity と関連付けられる。「教師なし学習」は自己組織化マップのアルゴリズムで説明されるが、Nudo [10] の運動療法による大脳皮質の再構成という有名な研究が、自己組織化マップを使ったシミュレーションで再現できることがわかった [11]。さらに、我々は Transfer package (日常生活において麻痺側上肢の使用を促進する行動戦略) により CI 療法終了後も長期的改善を認めることを明らかにした [12] が、これは各学習則をどのように利用すれば効果的な学習ができるか、すなわち、学習方法そのものを学習する「メタ学習」の役割があると予想している。

今後は適応範囲の拡大、失語症など他の機能障害の治療への応用などニューロリハビリテーションの発展が期待される。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Wolf SL et al: Neurologist **8**: 325-338, 2002
2. 道免和久: CI療法～脳卒中リハビリテーションの新たなアプローチ, 中山書店, 2008
3. Koyama T et al: NeuroRehabilitation **22**: 287-293, 2007
4. Hosomi M et al: J Stroke Cerebrovasc Dis **21**: 767-775, 2012

5. 細見雅史ら: Japanese J Rehab Med **49**: 23-30, 2012
  6. Kagawa S et al: J Stroke Cerebrovasc Dis **22**: 364-370, 2013
  7. Marumoto K et al: Restor Neurol Neurosci E-pub May 6, 2013
  8. Taub E et al: Stroke **44**: 1383-1388, 2013
  9. Doya K et al: Curr Opin Neurobiol **10**: 732-739, 2000
  10. Nudo RJ et al: Science **272**: 1791-1794, 1996
  11. Alfalo et al: J Neuroscience **26**: 6288-6297, 2006
  12. Takebayashi T et al: Clin Rehabil **27**: 418-426, 2013
-

### 成体大脳皮質の神経新生とその機能

大平耕司<sup>1,2</sup>, 竹内理香<sup>1,2</sup>, 宮川 剛<sup>1,2,3</sup> (1藤田保健衛生大・総合医科学研究所・システム医科学研究所部門, 2JST CREST, 3生理学研究所・行動様式解析室)

成熟した哺乳類の脳は、いったん損傷を受けるとほとんど再生せず、機能的に障害が残ったままになってしまうことが知られている。現在、脳を再生し機能的な回復へと導く手法の一つとして、もともと脳内にある神経幹細胞や神経前駆細胞を活性化させ、損傷された神経細胞に分化させる方法が考えられている。この治療法では、対象となる脳の領域に対する神経幹細胞や神経前駆細胞が存在すること、それらの増殖や分化を制御できることが必須となってくる。我々は、これまでに成体ラットの脳皮質で神経前駆細胞 (L1-INK細胞) が存在することを世界に先駆けて発見し、脳虚血により L1-INK細胞から新たに抑制性神経細胞が産出されることを報告している [1]。従って、薬物などの人為的な方法により、L1-INK細胞の増殖や分化を制御できれば、1) 脳卒中時の神経活動が過度に興奮することによる神経細胞死の抑制、2) 大脳皮質の抑制性神経細胞が関与する精神・神経疾患の予防・治療法の開発に応用できる可能性がある。しかし、大脳皮質が正常な状態で、L1-INK細胞の神経新生を制御できる方法は全く明らかにされていなかった。本研究では抗うつ薬の1つであるフルオキセチン (FLX) の投与による L1-INK細胞の神経新生とその機能について解析を行った。

FLXによる L1-INK細胞の増殖について検討したところ、大脳皮質の解析した全ての領域 (前頭皮質、運動皮質、体性感覚皮質、視覚皮質) で L1-INK細胞の増加が観察された。さらに、L1-INK細胞により産生された新しい神経細胞の80%以上が抑制性神経細胞であることを見出した。従って、FLXの投与によって、成体の大脳皮質では L1-INK細胞が増殖するだけでなく、L1-INK細胞から新しい抑制性神経細胞が産生されることが明らかとなった [2]。

次に、新しく産生された神経細胞の機能について解析した。新しい神経細胞が抑制性であることから、脳虚血に伴って引き起こされる神経細胞死が新しい神経細胞によって抑制されることが予想された。そこで、FLXを投与する期間中、大脳皮質の片側の半球には、細胞分裂を抑える薬物 Ara-Cを投与することにより L1-INK細胞が細胞分裂を起こさないようにし、もう片側の半球には、対照として生理的食塩水を投与した。その後、マウスに脳虚血を起こすと、L1-INK細胞の細胞分裂

を抑えた半球と比較して、L1-INK細胞から新しい神経細胞が増加した半球では、神経細胞死が有意に抑制されることを発見した。さらに、個々の神経細胞に注目すると、新しく産生された抑制性神経細胞の細胞体から20~110μm以内に存在する神経細胞の細胞死が、対象となる元々ある神経細胞と比較して、有意に抑制されていることがわかった [2]。

本研究によって、健常な成体マウスの大脳皮質において薬剤で神経細胞を増やすことが可能であることが明らかとなった。さらに新しい神経細胞によって脳虚血時の神経細胞死が抑制されることが発見されたことから、成体大脳皮質において新しい神経細胞が何らかの機能を有していることが示唆される。現在、L1-INK細胞による神経新生と FLXによる抗うつ作用との因果関係について研究を進めている。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Ohira K et al: Nature Neurosci **13**: 173-179, 2010
2. Ohira K et al: Neuropsychopharmacol **38**: 909-920, 2013

### 抗うつ作用の細胞基盤としての海馬神経脱成熟

小林克典<sup>1,2</sup>, 井本有基<sup>3</sup>, 鈴木秀典<sup>1,2</sup>, 瀬木-西田 恵里<sup>4</sup> (1日本医大・薬理, 2JST, CREST, 3京都大院・薬・生体情報制御, 4京都大院・薬・システム創薬)

抗うつ薬は気分障害や不安障害の治療に広く用いられているが、その作用機序の詳細は明らかではない。多くの動物実験によって、海馬の歯状回が抗うつ作用の神経基盤に関与することが示唆されている [1]。歯状回では成体でも神経新生が継続しており、抗うつ薬の慢性投与はこの神経新生を促進する。X線照射によって海馬における細胞増殖を障害すると、行動に対する抗うつ薬の効果が抑制されることが示され、歯状回の成体神経新生が抗うつ薬の効果の一部に必要であることが示唆された。幼若細胞は成熟細胞とは機能特性が異なっており、抗うつ薬は神経新生促進によって幼若細胞の数を増やすことによって治療効果を発揮すると推測される。この神経新生仮説は抗うつ薬の作用機序に関するこれまでの最有力仮説の一つであるが、新生細胞の数が歯状回の全神経細胞数に比して非常に少ないことがこの仮説の問題であり、さらに最近の報告によって神経新生の促進のみでは抗うつ効果様の行動変化が生じないことが示された [2]。従って、抗うつ作用に神経新生の促進が必要であったとしても、それのみでは不十

分であると考えられる。

我々は抗うつ薬・抗不安薬として用いられる選択的セロトニン再取込阻害薬のフルオキセチンが海馬神経細胞機能に及ぼす影響を詳細に解析し、グルタミン酸作動性シナプス伝達、神経細胞の興奮性、モノアミンによるシナプス修飾等に用量依存性に多様な影響を及ぼすことを報告してきた。その最も重要な成果として、フルオキセチンによる海馬歯状回の神経成熟の逆転現象の発見が挙げられる。成体マウス（9週齢）に高用量のフルオキセチンを慢性投与すると、歯状回顆粒細胞の興奮性が幼若細胞様に上昇した。成体マウスでは、顆粒細胞の軸索である苔状線維が形成するシナプスにおいて巨大なシナプス促進（シナプス前性の短期可塑性）が見られるが、フルオキセチンはこのシナプス促進を幼若レベルまで低下させた。これらの生理学的な変化と同時に、成熟顆粒細胞のマーカーである calbindin の発現が低下し、生体内における刺激反応性の成熟度の指標である c-fos 発現が強く抑制された。S 期マーカーである BrdU を用いた神経成熟度の追跡実験により、これらの変化が細胞成熟の逆転を反映することを明らかにし、この現象を脱成熟 “dematuration” と

名付けて報告した [3]。フルオキセチンの断薬から4週間後でもシナプス促進は低下したままであり、脱成熟は長期的に持続する可塑的な現象であると言える [4]。また、最近の研究によって、うつ病治療の電気けいれん療法を模した電気けいれん刺激でも同様の可塑的变化が誘導されることを示唆する結果を得ている。これらの結果は海馬における神経成熟度の可塑的变化が抗うつ作用の神経基盤に関与することを示唆している。脱成熟は神経新生とは異なり歯状回の神経細胞全体に誘導され、さらに細胞機能の顕著な変化を伴うため、海馬機能及び脳機能に強い影響を持つと推測される。このように脱成熟仮説は単に新しいのみならず、これまでの仮説の問題点を解決できるため、抗うつ薬の作用機序の仮説の一つとして現在広く認められつつある。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Kobayashi K: *Mol Neurobiol* **39**: 24–36, 2009
2. Sahay A et al: *Nature* **472**: 466–470, 2011
3. Kobayashi K et al: *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 8434–8439, 2010
4. Kobayashi K et al: *Mol Brain* **4**: 12, 2011

心筋ギャップ結合と興奮伝播：ギャップ結合リモデリングと催不整脈性について

大草知子<sup>1</sup>, 本荘晴朗<sup>2</sup>, 李 鍾国<sup>3</sup>, 児玉逸雄<sup>4</sup> (1山口大・医・器官病態内科学, 2名古屋大環境医学研究所, 3大阪大・医・心血管再生医学寄附講座, 4名古屋大学)

1. はじめに

日常臨床では、心不全患者の心機能が保持されているにもかかわらず致死性不整脈による心臓突然死に遭遇する。致死性不整脈の発生には、種々の発生基質が関与する。心臓には、遺伝的背景に様々な環境因子が加わり、構造的・機能変化が生じるが、その修飾因子として、カテコラミンやレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系などの神経体液性因子、フリーラジカル、サイトカイン、NO等が知られている。これらの修飾因子は、心臓に急性・慢性的に作用し、心臓の構造的および機能的リモデリングをきたす。リモデリングのターゲットとしては様々なイオンチャンネル、Ca<sup>2+</sup>ホメオスタシス、ギャップ結合を含む介在板、心筋線維化や細胞外マトリックス、等がある。構造的・機能的リモデリングは不整脈発生の基盤となり、心筋細胞の電気生理学的特性の異常、心筋細胞間の刺激興奮伝播異常や不均一性をきたし、不整脈の発生・維持につながる。本シンポジウムでは、介在板構成蛋白の gap junction, adhesion junction (adherens junction および desmosome)

の異常と致死性不整脈につき述べる。

2. 心筋細胞の介在板について (図1)

心筋細胞は隣接する細胞間は介在板により結合され、介在板は gap junction (GJ) と adhesion junction (AJ) で構成される。細胞間の電氣的結合はGJで、機械的結合はAJで維持され、心筋細胞の同期的な収縮・弛緩が保持される。GJは細胞間を直接連結するチャンネルにより構成され、connexin (Cx) 蛋白よりなる。

GJは細胞間を直接連結するチャンネルにより構成され、興奮伝播や電氣的結合を調節する。GJは細胞膜脂質二重層に組み込まれた connexon の集合体から成り、約2nmで近接する細胞膜の connexon どうしが融合し、中心部直径1-2nmの細胞間チャンネルが形成される。心臓には主にCx37, Cx40, Cx43, Cx45の4種類が発現し、ヒト心筋では、Cx43は心房・心室筋に均等分布している。心筋細胞間の興奮伝播はGJを介して行われ、隣接する細胞間を種々のイオンやイノシトール3リン酸, cAMPなどの情報伝達物質が交通し、心筋細胞の正常な興奮伝導はGJに依存している。GJのイオン透過性は細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度, pH, Cxのリン酸化, 細胞内ATPや種々のprotein kinaseなどの影響をうける。以上より、虚血心筋細胞, 肥大心筋細胞, 不全心筋細胞, さらにはリモデリングをきたした心筋細胞ではギャップ結合に質的・量的変化が生じ、回帰性不整脈の一因となること

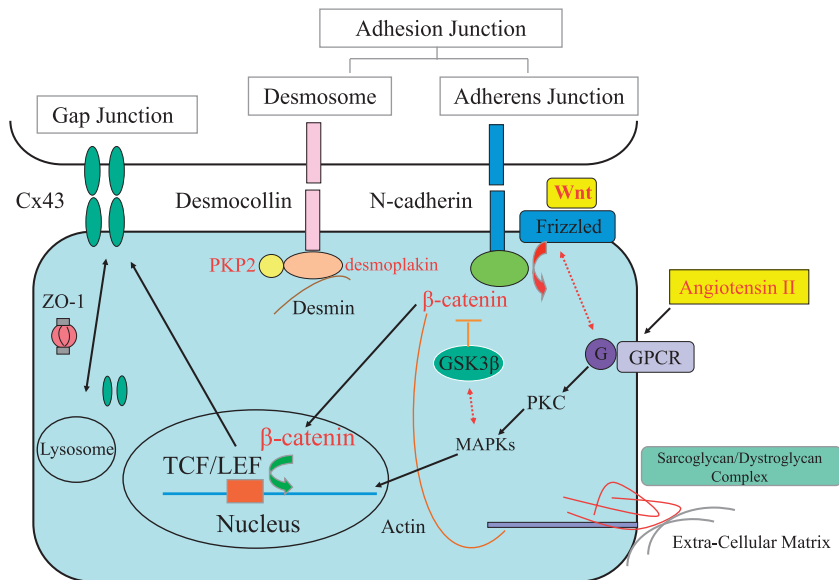


図1. 心筋細胞介在板の構成とシグナル伝達系

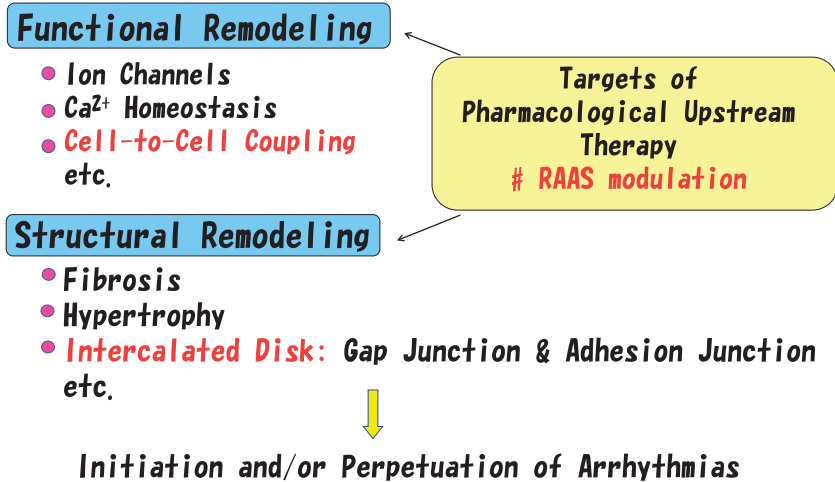


図2. 不整脈発生基盤とアップストリーム治療

が考えられている [1-3]. Cx の特徴として、半減期が約 1.5 時間と非常に短い蛋白質であるということである. Cx は proteasome や lysosome によって分解されるが、半減期が短いことから短時間のストレスにより容易に変化が生じる可能性がある. GJ リモデリングは重要な不整脈発生基盤であることは良く知られている [1].

一方, AJ は adherens junction と desmosome で構成され, 細胞間の機械的結合を保持する役割を担っており, GJ と機能的・構造的に密接な関係を有している. その構造は, 細胞膜貫通蛋白質が linker protein を介して cytoskeletal protein と結合し, 細胞の収縮・弛緩の同期性を維持している. Naxos 病や Carvajal 症候群はそれぞれ desmoplakin と plakoglobin の異常により, 皮膚や眼をはじめとする全身の結合組織の異常をきたす遺伝性疾患で, 古くよりこれらの疾患は不整脈を合併して突然死することが知られている. また, 不整脈原性右室心筋症 (ARVC) は, desmosome を構成する plakophilin2 (PKP2) をはじめとする構成蛋白質の遺伝子異常が報告されている [4-6].

### 3. 不全心筋の介在板異常と不整脈

近年, GJ の異常が細胞間の興奮伝播異常に反映され, 心筋細胞の電気生理学特性を修飾して AF の発生・維持に関与すると考えられている [7].

一方, 虚血性心疾患のみでなく, 心肥大や心不全においても Cx の発現異常が報告され, 心室性不整脈発生基盤の一つとされているが, Cx の発現を調節している情報伝達系は多様である [8-11]. 近年, 心肥大の情報伝達に関与する angiotensin II

(AG II) や cAMP が心筋細胞の Cx43 発現を調節して細胞間の興奮伝導を増加させることが報告された [11, 12]. また, 培養心室筋細胞に周期性伸展刺激を加えることにより, 刺激後約 60 分より Cx43 の発現量が増加し, 興奮伝播速度が増すこと [12], さらに持続的な伸展刺激では心筋細胞により分泌された vascular endothelial growth factor により Cx43 発現が調節されることが報告された [13]. われわれは, ラット培養心室筋細胞に高頻度電気刺激を加えて, Cx43 の発現量の変化とそれを調節する情報伝達系の検討をおこない, 同時に刺激伝導特性の変化を解析した. その結果, 刺激約 15 分後より, 心筋細胞内の AG II 発現が増加し, extracellular signal related protein kinase (ERK), c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) が活性化され, 約 60 分後には Cx43 発現が著明に増加することを報告した. Cx43 発現の増加により細胞間の興奮伝播時間は短縮した. これらの変化は, アンジオテンシン II 受容体阻害薬により有意に抑制された. 以上より, 心室筋細胞への高頻度電気刺激は, 非常に早期より, 電気刺激による収縮・弛緩頻度の増加という機械的負荷に加えて, AG II を介して MAPK 系を活性化して Cx43 発現量を増加させ, 心筋細胞の電気生理学的特性に変化をきたして回帰性不整脈の一因となる可能性が示された [14].

近年, adhesion junction がギャップ結合を直接的に制御することが分子生物学的実験によりわかった. われわれは, 心筋症ハムスターの心不全

発現過程では、介在板のβカテニンの核内発現が減少、その結果、心室筋Cx43の質的・量的変化が生じ、電気生理学的特性に変化をきたし、致死性不整脈の発生・維持につながることを報告した[15, 16].

以上より、介在板を構成するギャップ結合とadhesion junctionは直接的な制御連関を持ち、不整脈発生基質として重要な因子であることが解明されつつある。

#### 4. おわりに (図2)

心不全での不整脈発生基盤となる心筋細胞の介在板異常を中心に、最近の報告に基づき概説した。今後、心不全発現過程での致死性不整脈の発生・維持に重要な役割を担うこれらの因子に焦点をあてた、アップストリーム治療が開発されることが期待される。

\*本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Jongsma HJ et al: *Circ Res* **86**: 1193-1197, 2000
2. Danik SB et al: *Circ Res* **95**: 1035-1041, 2004
3. Dhein S: *Cardiovasc Res* **62**: 287-298, 2004
4. Oxford EM et al: *Circ Res* **101**: 703-711, 2007
5. Garcia-Gras E et al: *J Clin Invest* **116**: 2012-2021, 2006.
6. van Tintele JP et al: *Circulation* **113**: 1650-1658, 2006
7. Nao T et al: *Am J Cardiol* **91**: 678-683, 2003
8. Peters NS et al: *Circulation* **95**: 988-996, 1997
9. Uzzaman M et al: *Circ Res* **86**: 871-878, 2000
10. Shyu KG et al: *J Mol Cell Cardiol* **33**: 691-698, 2001
11. Darrow BJ et al: *Circ Res* **79**: 174-183, 1996
12. Zhuang J et al: *Circ Res* **87**: 316-322, 2000
13. Pimental RC et al: *Circ Res* **90**: 671-677, 2002
14. Inoue N et al: *J Am Coll Cardiol* **44**: 914-922, 2004
15. Sato T et al: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**: H1174-H1182, 2008
16. Yoshida M et al: *Cardiovasc Res* **92**: 95-105, 2011

### 心臓における興奮伝播ダイナミクスと持続性頻脈性不整脈の電気生理学的機序

本荘晴朗, 児玉逸雄, 神谷香一郎 (名古屋大環境医学研究所心血管分野)

心筋細胞どうしはギャップ結合により電氣的に結合しており、活動電位の発生に伴ってギャップ結合を通して局所電流が隣接した心筋細胞に流れ

る。その結果、下流の心筋細胞の膜電位が脱分極し、それが閾値を超えると活動電位が発生する。したがって、心筋興奮伝導を規定する最も重要な因子は、心筋細胞の活動電位立ち上り相を形成する細胞膜内向き電流(生理的条件下ではNa電流)と、ギャップ結合を介する心筋細胞間電気結合である。更に、2次元および3次元の組織・臓器レベルにおける興奮伝導では、興奮波の空間的形状も興奮伝導特性に大きな影響を及ぼす。例えば、下流に向かって凸の形状の興奮波では、興奮電面における既興奮部(興奮の上流)と比べて、未興奮部(興奮の下流)の割合が相対的に大きいため、局所電流の電流密度が減少し、興奮の伝導速度や安全率が低下する。このような興奮波の湾曲に伴う局所電流のsource/sink mismatchは、細動や頻拍など頻脈性不整脈が持続する機序である渦巻き型興奮波(spiral wave, scroll wave)の形成に本質的な役割を果たすと考えられている。近年の電位感受性色素を用いる活動電位光学マッピング技術の進歩により、心臓における興奮伝播ダイナミクスを詳細に解析することが可能となった[1, 2].

#### 1. 興奮波の湾曲が伝導速度に及ぼす作用

数学モデルを用いた理論的研究では、湾曲した興奮波(興奮前面の曲率,  $\kappa$ )の伝導速度( $CV_\kappa$ )は次の式で近似されることが示されている: $CV_\kappa = CV_0 - D\kappa$ (式1)。ここで、 $D$ は電氣的拡散係数、 $CV_0$ は平面波[ $\kappa=0$ ]の伝導速度を示す(図1A)。

ウサギ摘出灌流心の心室筋の一点に陰極刺激を加え、遠心性に広がる楕円形の興奮波の長軸端における興奮前面の曲率と局所伝導速度を光学計測した。両者の関係は、上記の理論式でよく近似できることが確認された(図1B)。

#### 2. 細胞間電気結合の促進および抑制が心筋興奮伝導に及ぼす作用

薬物によるギャップ結合の促進および抑制が、心筋興奮伝播ダイナミクスに及ぼす影響を、ウサギ摘出心の心室筋2次元標本で検討した。Rotigaptide (RG)は組織の空間定数(space constant,  $\lambda$ )と平面波の伝導速度( $CV_0$ )を増加し、carbenoxolone (CBX)は $\lambda$ と $CV_0$ を低下させた。これらより、RGは心筋細胞間結合を促進し、CBXはそれを抑制することが確認された。RGは、興奮前面の曲率( $\kappa$ )と局所伝導速度(CV)との関係(式1)から求めた電氣的拡散係数( $D$ )を増加し、CBXはそれを低下させた(図1B)。また、RG添加前後における $\kappa$ とCVとの近似直線は $\kappa=50-60\text{ cm}^{-1}$ で交差した。したがって、RGによる心筋細胞

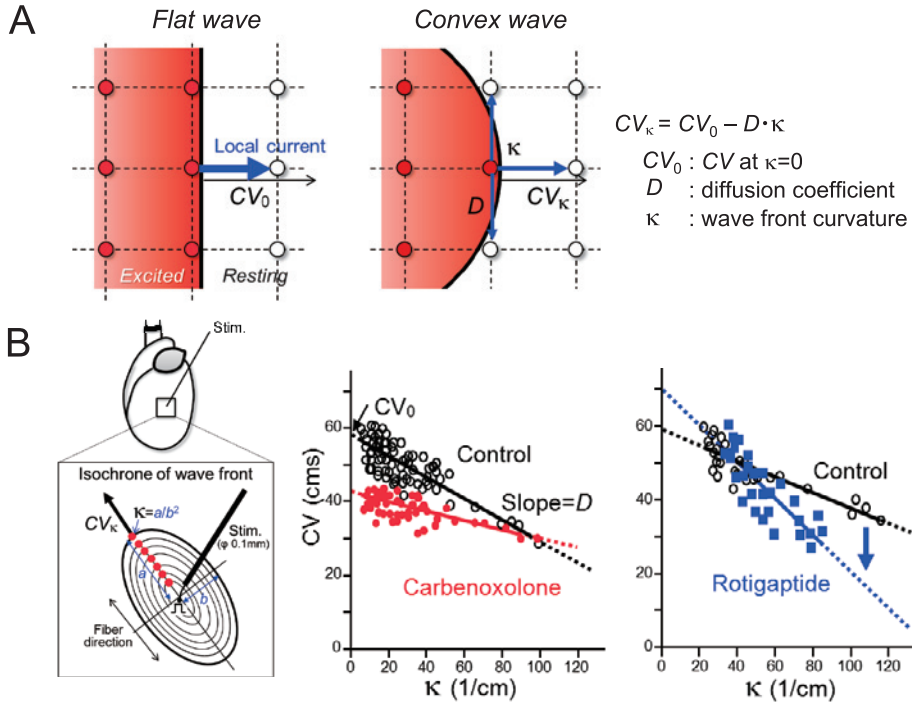


図 1

胞間電気結合の促進は、強く凸に湾曲した興奮波 ( $\kappa > 50-60 \text{ cm}^{-1}$ ) の伝導をかえて抑制することが判明した。

3. 細胞間電気結合の促進および抑制が spiral wave のダイナミクスに及ぼす作用

ウサギ心室筋 2 次元標本に直交電場刺激を加えて誘発した spiral wave リエントリーは、短い直線状の機能的ブロック (ブロックライン) の周囲を規則的に巡回しており、位相解析により求めた位相特異点 (phase singularity, PS: spiral wave リエントリーの巡回中心) は、この機能的ブロックラインに沿って移動した。CBX 作用下の spiral wave リエントリーでは、機能的ブロックラインの長さ (PS 移動の軌跡) が短縮し、安定した興奮巡回が長時間持続した。一方、RG 作用下の spiral wave リエントリーでは、機能的ブロックラインが延長するとともに、巡回中心 (PS) 近傍で局所的な減衰伝導が生じた。このため、spiral wave の巡回動態が不安定となり、PS が房室間溝の興奮障壁 (結合組織による非興奮領域) と衝突して、spiral wave リエントリーが早期に停止した。Spiral wave の PS 近傍では興奮前面が強く凸に湾

曲している。このため、RG による細胞間電気結合の促進は、PS 近傍で局所的な伝導抑制をもたらし、減衰伝導が生じたものと考えられる。

以上より、ギャップ結合による細胞間電気結合は心筋組織における興奮伝導を規定する重要な因子であること、細胞間電気結合の促進は spiral wave リエントリーの巡回ダイナミクスを不安定化し、その早期停止を促すことが明らかになった。心筋ギャップ結合の機能促進は、細動や頻拍など持続性の頻脈性不整脈に対する新たな治療戦略となる可能性が期待される。

\*本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Takanari H et al: J Pharmacol Sci **115**: 15-26, 2011
2. Takemoto Y et al: Am J Physiol **303**: H578-H586, 2012

Messenger RNA データを基に構築したヒト房室結節活動電位モデルの構築とコンピュータシミュレーションによる興奮伝導解析

稲田 慎<sup>1</sup>, 岩田倫明<sup>1</sup>, 原口 亮<sup>1</sup>, 中沢一雄<sup>1</sup>,

小野多佳子<sup>2</sup>, 三井和幸<sup>2</sup>, 鈴木 亨<sup>3</sup>, 柴田仁太郎<sup>4</sup>, Mark R Boyett<sup>5</sup>, Halina Dobrzynski<sup>5</sup> (1国立循環器病研究センター研究所, 2東京電機大学, 3金沢工業大学, 4新宿三井ビルクリニック, 5University of Manchester)

ヒト心筋細胞の電気生理学データを得ることは困難であることから、心筋細胞の活動電位モデルの開発は動物を対象としたものが多く、ヒト心筋細胞の活動電位モデルは少ない。特に、正常な心臓における電氣的興奮の発生源である洞結節や、心房と心室とを電氣的につなぐ房室結節等の刺激伝導系を構成する細胞を対象としたモデルの開発はほとんど行われていない。近年我々は、既存のヒト心筋細胞の活動電位モデルに対して、イオンチャネルの messenger RNA の発現量に対応したモデルの補正を行うことで、ヒト刺激伝導系を構成する心筋細胞の活動電位モデルを開発した [1, 2]。本研究では開発した活動電位モデルを応用し、房室結節における興奮伝導についてコンピュータシミュレーションを用いて検討した。右心房から房室結節を經由してヒス側までをシミュレーション対象とし、単純化したケーブルモデルを構築した。房室結節においては興奮伝導の速い経路と遅い経路の二つの経路を有するモデルとした。構築したケーブルモデルを用い、興奮伝導のシミュレーションを実行した。洞結節から発生し伝導する規則的な間隔の興奮に対しては、房室結節における興奮伝導の速い経路が心房と心室との間の興奮伝導に寄与した。臨床においてよく見られる不整脈である心房細動のような不規則で頻度の速い興奮に対しては、房室結節の遅い興奮伝導経路も、心房と心室との間の興奮伝導経路として機能した。さらに、心電図の PR 時間が徐々に延長し、最後に伝導が途絶する現象であるウェンケバッハ現象、心房細動時におけるイオンチャネル遮断またはベータ遮断による心室拍動制御（レートコントロール）についても同様にシミュレーションにより再現することが可能であった。本研究で開発したモデルは、房室結節の特性解析や抗不整脈薬等の薬物作用を検討する上で有用であると言える。

\*本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Chandler N et al: *Circulation* **119**: 1562–1575, 2009
2. Greener ID et al: *J Mol Cell Cardiol* **50**: 642–651, 2011

## 構造的リモデリング下の心房筋における興奮伝播のシミュレーション

芦原貴司 (滋賀医大・医・循環器内科)

【背景】発作性心房細動を繰り返すと、持続性の高い慢性心房細動に移行することが知られている [1]。従来、心房細動の慢性化には、心房筋における構造的リモデリングが基本メカニズムであると広く支持されてきた。また、構造的リモデリングは、コラーゲン沈着による線維化が主体と考えられてきた [2]。しかし、それは慢性心房細動下の心房筋では線維化が認められるという状況証拠による推論の域を出ておらず、直接証拠とは言えない。最近、心房細動下の心房筋には炎症性細胞浸潤を認め、それがマクロファージの遊走と線維芽細胞の増生を促し、その線維芽細胞からコラーゲンが分泌されること、さらにはギャップ結合のリモデリングも認めることなど、構造的リモデリングは複雑な多段階プロセスであることが判明しており、心房筋細胞のコラーゲンによる単純な置き換えではないことが分かってきた。実際、慢性心房細動患者を対象とした臨床心臓電気生理検査では、細動下の心房内局所で記録された電位波形は複雑に分裂しているものの、電位波高は必ずしも低電位ではないことが報告されている [3]。また、構造的リモデリングでは、増生した線維芽細胞が Cx40, 43, 45 等のギャップ結合を介して、心房筋細胞に何らかの電氣的影響を与えていることも示唆されるようになった [4, 5]。そこで、我々は心房細動の慢性化における構造的リモデリングの正確な役割を把握するため、コンピュータシミュレーション (in silico) で構造的リモデリングによる興奮伝播様式の変化を検証した。

【方法】ヒト心房筋細胞の数学モデル [6] を基に、ギャップ結合の再分布、線維芽細胞の増生 [7]、コラーゲン沈着などを組み入れたヒト心房筋モデル [8] を作製し (図)、その上で興奮伝播シミュレーションを行った。

【結果】(1) ヒト心房筋モデルにギャップ結合のリモデリングを組み入れたところ、興奮伝播速度 (CV) の異方性 (長軸-短軸比) が 3.5 から 2.2 に低下した。これは動物実験データ [9] と矛盾しないものであったが、この変化だけで心房細動の慢性化に繋がる興奮伝播遅延や興奮伝播ブロック等の異常は生じなかった。(2) 静止膜電位が -50 mV 付近と浅い線維芽細胞 (6.5 pF) を心房筋細胞 (100 pF) と電氣的に結合させたところ、線維芽細胞の数が増えるに連れて電気緊張性電位の影響が強くなることから、心房筋細胞の静止膜電位が浅くなり、活動電位持続時間 (APD) も短縮した。(3)

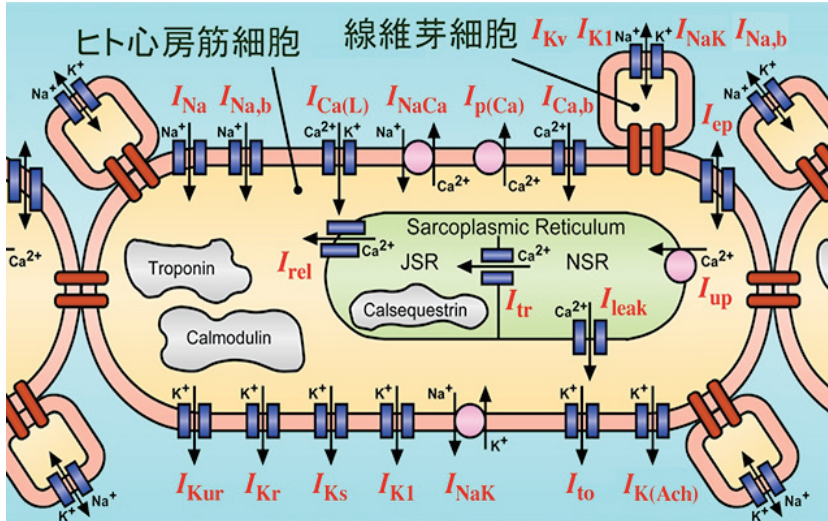


図 構造的リモデリング下のヒト心房筋モデル

心筋線維モデルにおいて線維芽細胞を増生したところ、心房筋細胞1個に対して線維芽細胞が4個以上結合するとCVが低下し始め、それが10個以上では組織興奮性が低下し、興奮伝播ブロックが生じた。(4) 線維芽細胞の増生による心房筋のAPD短縮とCV低下は、心房細動のように興奮間隔が短い状況でより顕著に現れた。(5) 心房筋におけるAPD短縮や組織興奮性の低下は、コラーゲン沈着だけではもたらされなかった。(6) 心房筋シートにおいて、心房細動の基本メカニズムであるスパイラルリエントリーを誘発したところ、線維芽細胞の増生領域では、興奮波の分裂を繰り返すようになり、持続性の心房細動へと移行した。(7) 線維芽細胞の増生領域で心房細動下に記録された局所電位波形は複雑に分裂しており、電位波高も保たれていた。これは前述の臨床データ [3] と矛盾しない。

**【結語】**心房細動の慢性化をもたらす構造的リモデリングの本質は、心房筋における線維芽細胞の増生であることが示唆された。本シミュレーション結果は、慢性心房細動患者の治療戦略を考える上で重要と思われる。

\*本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Wijffels MC et al: Atrial fibrillation begets atrial fibrillation: A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* **92**: 1954-1968, 1995
2. Allesie M et al: Electrical, contractile and

structural remodeling during atrial fibrillation. *Cardiovasc Res* **54**: 230-246, 2002

3. Jadidi AS et al: Functional nature of electrogram fractionation demonstrated by left atrial high density mapping. *Circ Arrhythm Electrophysiol* **5**: 32-42, 2012
4. Camelliti P et al: Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* **65**: 40-51, 2005
5. Kohl P et al: Fibroblast-myocyte connections in the heart. *Heart Rhythm* **9**: 461-464, 2012
6. Courtemanche M et al: Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties: Insights from a mathematical model. *Am J Physiol* **275**: H301-H321, 1998
7. MacCannell KA et al: A mathematical model of electrotonic interactions between ventricular myocytes and fibroblasts. *Biophys J* **92**: 4121-4132, 2007
8. Ashihara T et al: The role of fibroblasts in complex fractionated electrograms during persistent/permanent atrial fibrillation: Implications for electrogram-based catheter ablation. *Circ Res* **110**: 275-284, 2012
9. Polontchouk L et al: Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria. *J Am Coll Cardiol* **38**: 883-891, 2001

脳神経倫理の10年：脳神経科学コミュニティへの影響とアジアへの展開

福士珠美 (科学技術振興機構研究開発戦略センター)

2002年に脳神経倫理の成立を宣言する会議が米国で開催されてから10年余りになる。主にヒトを対象とした脳神経科学研究の倫理的諸課題について、脳神経科学研究者のみならず、生命倫理、科学史・科学哲学、科学コミュニケーション、科学技術社会論など様々な境界領域の研究者も交えた議論が続いている。日本では、2005年から日本神経科学学会において脳神経倫理に関連する学会セッションが始まり、生命倫理学会、宗教倫理学会、生物学的精神医学学会など、多様な学術コミュニティがこれまでに脳神経倫理を学会合の場で取り上げてきた。今回、日本生理学会が脳神経倫理をトピックとして取り上げてくださったことに感謝したい。

ヒトの精神活動、認知機能の解明にもとづく精神・神経疾患治療技術の開発、あるいは社会不適応などの問題の克服をゴールとする研究領域において、その手法の高度化、複雑化が進んでいる。例えば、ヒトに特有な認知機能（損得勘定、情状酌量など）に関わる脳の働きを分子レベルで可視化、計測する技術 [1, 2] や、機能MRIで計測さ

れる脳活動から被験者が体験した視覚情報を再構成したり [3]、夢に出てきた対象を特定する手法の開発 [4] が行われている。こうした研究手法が被験者の心身の健康に悪影響を与えるのを防ぐ他、実験成果とともに得られる個人情報悪用の悪用を防ぐための、より一層の配慮が求められる。一方、研究成果の公表、社会への説明責任という観点からは、コンピューターソフトの性能向上により、データの可視化、描画段階等において、意図的なオリジナルデータの改変が容易になっているという指摘がある [5]。また、科学的根拠に乏しい私見を、査読手続きを経ない媒体（インターネット、新聞、娯楽雑誌、娯楽番組、書籍など）によって公表する機会が増えたことで、脳機能に関する誤った解釈が広まり、社会的通念が形成される懸念も高まっている [6]。

上記背景を踏まえ、研究対象の生物学的階層と研究者の社会的階層、研究対象への侵襲性の3軸を用いて、脳神経倫理の構成要素をプロットし、各シンポジストの報告がカバーする要素領域について整頓を試みた (図1)。各発表は、個々の研究者の研究実施と成果公表のプロセスにおいてどのような責任ある対応をすべきか、それを如何にコミュニティが把握できるかに焦点をあてたものが多く、すなわちこれが、我が国の脳神経科学コミュニ

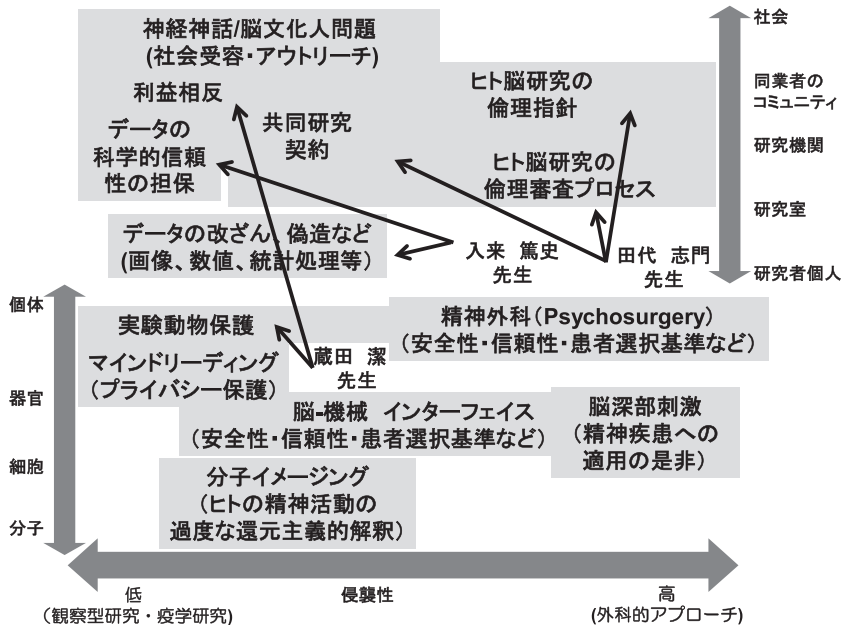


図1. 脳神経倫理の構成要素

ニティが取り組むべき倫理的課題と思われる。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. Takahashi H et al: *Mol Psychiatry* **18**: 3-4, 2013
2. Yamada M et al: *Nat Commun* **3**: DOI: 10.1038/ncomms1757, 2012
3. Nishimoto S et al: *Curr Biol* **21**: 1641-1646, 2011
4. Horikawa T et al: *Science* **340**: 639-642, 2013
5. Fanelli D: How many scientists fabricate and falsify research? A systematic review and meta-analysis of survey data. *PLoS ONE* **4**: e5738, 2009
6. 日本神経科学学会「ヒト脳機能の非侵襲的研究」の倫理問題等に関する指針 改訂にあたっての声明 (2013年5月15日アクセス確認) [http://www.jnss.org/human\\_kaitei\\_seimei/](http://www.jnss.org/human_kaitei_seimei/)

#### 動物実験倫理と利益相反における情報公開の重要性

蔵田 潔 (弘前大学大学院医学研究科統合機能生理学講座)

動物の愛護に関する法律 (以下、動愛法) の改正に関する法案が2012年8月29日に可決成立した。今回の改正にあたっては、動物実験を行う研究機関の届出制と、実験動物を取り扱う業者の届出制が論議された。これらはいずれも動物実験に関する規制強化につながるものであり、日本生理学会をはじめ、日本医学会など、さまざまな学術団体がこれに対して反対の意見を表明してきた。結局、可決成立した改正法案では、これらの規制強化は盛り込まれなかった。そもそも動愛法は主にペットを対象とするものであり、当初は内閣府が担当していたが、その後の省庁再編で環境省が担当している。学術研究を目的とする実験動物をこの動愛法で取り扱うかについてはいまだに論議があるが、2008年の動愛法改正で実験動物を対象にすることが決定され、3R (Replacement, Reduction, Refinement) の原則が法律に盛り込まれた。その結果、全国の研究機関でこの法律のもとにさまざまな対応がされてきたことは周知のとおりである。動愛法の改正は再度5年後にも行われる予定であり、今回の議論が再燃する可能性は大いにある。一方、今回の改正の論議においても、実験動物は動愛法とは別の法律によって管理されるべきとの意見が出されたが、実現していない。いずれにしても、法律による規制が強化されることにより、必要な動物実験が行いづらくなる事態も想

定される。ひとつのあり方は、現在全国で進行しつつある各研究機関相互の査察や第三者機関による評価により、各研究機関での動物実験が適正に行われているかを審査する機関規制を深化させていくことであろう。また、各研究機関のみならず、日本生理学会を含む学術団体が、情報公開や実験動物の必要性や成果に関する社会への積極的なアピールなど、一般市民への動物実験への一層の理解を深めるような活動を継続していく必要がある。

研究倫理に求められるもうひとつの重要なポイントは利益相反の問題である。我が国では、科学技術創造立国を目指して1995年に科学技術基本法を制定、1996年に「科学技術基本計画」が策定され、国家戦略として産学の連携活動が強化されてきた。20世紀後半から21世紀にかけての医学、医療の進歩はめざましく、医学における研究対象も、個体から臓器、細胞、分子へと移り、さらに遺伝子異常と疾病との関連、再生医学への展開などと、それらを基に未知の病態の解明とともに、創薬への応用、そしてまったく新しい概念に基づく治療法、予防法の開発にも応用されている。医学研究における成果を社会、患者に適切に還元していくことは、我が国の国民が安心・安全・快適な生活を享受するうえで極めて重要であると同時に、教育・研究の活性化や経済の活性化を図るうえでも大きな意義を持つことは言うまでもない。日本生理学会が主催する学会大会や刊行物などで発表される研究成果は基礎的研究が主たるものではあるが、臨床応用へのトランスレーショナル・リサーチをはじめ、さまざまな臨床研究に関わる事例があり、それら研究の推進には製薬企業、ベンチャー企業などとの産学連携活動 (共同研究、受託研究、技術移転・指導、奨学寄付金、寄付講座など) が大きな基盤となっている。このような産学連携による医学研究が盛んになればなるほど、公的な存在である大学や研究機関、学術団体などが特定の企業の活動に深く関与することになり、その結果、教育、研究という学術機関、学術団体としての責任と、産学連携活動に伴い生じる個人が得る利益と衝突・相反する状態が必然的・不可避的に発生する。こうした状態が「利益相反 (conflict of interest : COI)」と呼ばれるものである。産学連携による医学研究に携わる者にとって、資金および利益提供者となる企業組織、団体などとの利益相反状態が深刻になればなるほど、本来は研究者としての良心に委ねられている研究の方法、データの解析、結果の解釈の中立性および客観性が歪められていないこと、すなわち、利益相

反状態であっても研究が適切に行われていることを公的に表明する必要がある。そのためには、学術機関のみならず学術団体が、組織として適切に利益相反状態を管理（マネージメント）していくことにより、産学連携活動を適切に推進していく必要がある。医学研究の公正・公平さの維持、学会発表での透明性、かつ社会的信頼性を保持しつつ産学連携による医学研究の適正な推進を図るために、日本生理学会においても、研究にかかる利益相反指針を策定したところである。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

### 責任ある研究行為と学術情報発信の倫理 —雑誌編集の立場から—

入来篤史（理化学研究所脳科学総合研究センター）

現在、世界の学術情報出版は、発信する論文の質と品位の確保に大きな危機感を抱く状況に直面しつつある。出版される学術論文にしばしば研究不正が指摘されるようになってきたからである。筆者が日本の学会誌の編集主幹を務める神経科学のコミュニティーであっても、これを国際的に危機的な大問題ととらえ、世界の神経科学関係学協会誌（Neuroscience誌、IBRO；Neuroscience Research誌、JNS・日；Journal of Neuroscience誌、SfN・米；European Journal of Neuroscience誌・欧、FENS；Neuroscience Research, JNS）の編集長が協働し、国際会議等でシンポジウムを開催するなどして、世界各地で研究倫理の啓発活動を行っている。このような背景を踏まえつつ、学術出版における研究倫理の現状と問題点について概観し、その克服策について考える。

学術出版における研究不正には、「捏造（Fabrication）」「歪曲（Falsification）」「剽窃（Plagiarism）」のいわゆるFFPと呼ばれる許されざるものと、健全な「責任ある研究行為（Responsible Conduct of Research, RCR）」の中間に、グレーゾーンである「問題ある研究行為（Questionable Research Practices, QRP）」が大きな部分を占めて存在しているとされている。現在様々な調査統計が試みられているが、概ねFFPは世界の出版論文の2～14%、QRPは40%にも達するのではないかと推定されており、大きな問題として広く認識されるようになってきた。このような研究不正の事例は、意図的・作為的なものから不作為や怠慢・無知によるものなど多種多様にわたり、その完全な検出や廃絶にはきわめて多大な時間と労力を要する。これまでは、不正が疑われる論文の検出は、その

分野の研究に精通した査読者や一般読者からの指摘に委ねられていたが、現在は剽窃検出ソフトウェア等の発達により、多くの学術雑誌では投稿時点でのチェック体制を構築しつつある。

学術出版の研究不正は、単にその論文の著者の信用を損なうばかりではない。当該研究分野や、ひいては科学研究全体に対する社会の疑念を招来し、信用が失墜することによって科学研究への公的資金の配分などが困難となり、科学の発展そのものが大きく阻害される危険をはらんでいるとさえいえる。このような科学研究への直接的な悪影響ばかりではない。今日の多くの生命科学・医学研究の成果は、国民の医療や福祉政策やリスク管理制度の判断基準の根拠となっており、それらの策定が誤ったあるいは疑わしい研究成果の上になされるとすれば、国民の健康や福祉にも文字通り致命的な影響がおよぶことになる。また、これらの研究に投じられた資金や社会資源が無駄に費やされることによる、財政的・人的損失は計り知れない。

このような様々なレベルでの研究不正の原因については、いろいろな議論がある。昇進や研究費獲得のための過剰な偏った業績主義や、世界の学術雑誌数や総論文数の急激な増大による論文出版周期の短縮などが指摘されているが、その因果関係を明確にすることは困難であり、またこの状況がただちに変化することもまた望めないであろう。このような現状にあって研究不正を防止するためには、研究者各人の人間としての倫理観の寛容、科学者としての能力資質の向上、各研究機関における倫理指針や研究運用規約の策定と遵守、などの基本的な対策を徹底するとともに、これらの状況や意義についての啓発活動を普及させてゆくなどの、地道な努力を継続してゆくことが肝要である。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

### 研究倫理の新たな展開：NIH8原則と研究倫理コンサルテーション

田代志門（昭和大学研究推進室）

研究倫理（research ethics）とは、主に研究対象者の人権や福祉が守られつつ科学研究が進む仕組みを考えるための学際的な研究分野である。生命倫理学の一分野として1970年代以降に発展した。動物実験や不正行為の問題を含む場合もあるが、その中心は人を対象とする研究の倫理的問題にある [1]。以下ではこの分野の近年の発展として、実務面と学術面について、それぞれ概観して

おきたい。

研究倫理に関する実務といえば、従来は倫理審査委員会に関するものがその多くを占めていた。とりわけアメリカにおいては、倫理審査委員会事務局担当者の養成過程が確立しており、一種専門職化している。しかしここで注目したいのは、2000年代後半から出てきた新しい流れである。それが、研究倫理コンサルテーション（研究倫理支援）と呼ばれる活動である [2]。アメリカにおいては、2006年から開始されたNIHによるトランスレーショナル・リサーチ推進のためのインフラ整備事業の中で、広く注目されるようになった。これらのコンサルテーション活動には現在のところ共通の定義はなく、もっとも広義には「研究の開始から終了までを通じて対応可能な助言行為」となる。日本でも2000年代後半からいくつかの研究機関において「研究倫理支援室」等の名称でこの役割を担う部署の設置が進むとともに、国の大型研究プロジェクトにもこうした倫理的な助言機能が付加されるようになってきた。これらの支援活動の1つの狙いは、倫理審査委員会とは別に、審査の前段階から個々の研究者を倫理面で支援することにより、早い段階からの倫理的問題の解決を実現することにある。

次に、研究倫理の学術面での近年の展開について述べたい。1970年代にアメリカで確立した研究倫理の2つの大きなルールは、(1) 研究対象者から同意を得ること、および(2) 研究開始前に第三者による研究計画の審査を受けること、である。とりわけ、後者によって開始された倫理審査は、それまでの研究者コミュニティの慣行を大きく変えた。従来は研究者個人の「自治」に委ねられていた研究計画の立案が、医学研究の素人である法律の専門家や生命倫理学者、一般市民等によって事前に審査されるようになったからである。それもあって、従来の研究倫理の議論は、倫理審査と同意という、いわば研究開始「前」の問題に焦点をあててきた。しかしこれに対して、近年の研究倫理の議論においては、むしろ研究開始「後」に生じる倫理的問題への注目が高まっている。

これらの問題は様々な形をとっているが、その中心は「研究成果の還元」をめぐる問題である。これは、そもそも研究の「成果」とは何なのか、またその「成果」は誰のものか、という問いといっても良い。例えばこれを代表する問題の1つとして、個別結果の返却の問題を挙げることができる。伝統的には研究者には個々の研究対象者のデータを各人に返却する義務はないと考えられてきた。しかし近年のイメージングやゲノム研究の進展に伴い、研究の過程で個人の健康や生殖に関する知見が得られるようになってきた。脳機能イメージングであれば、予想外の腫瘍や動脈瘤が、遺伝家系調査や全ゲノム解析であれば、父子関係の不一致や予想外の遺伝子変異・染色体変異などがこれにあたる。その結果、現在ではこうした偶発的所見を含む個別の結果について、研究者が研究対象者に返却することを支持する立場が推進されつつある [3]。言ってみれば、ここでは従来「成果」とは見なされず、「還元」の対象とはされてこなかったデータが「還元」の対象となりつつある。

以上、ここでは近年の研究倫理の発展を実務面と学術面から整理した。実務面では倫理審査から倫理支援という動きが見られ、学術面では研究開始「後」の倫理的問題への注目が確認できる。研究倫理の分野は研究の進捗に伴い、常に新たな問題が生じる領域である。この意味で、今後とも本学会において、新たな課題に対応した議論が深められていくことを期待したい。

本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

1. 田代志門：研究倫理とは何か，勁草書房，東京，2010
2. 神里彩子ら：「研究倫理コンサルテーション」の現状と今後の課題，生命倫理 21: 189-193, 2010
3. Wolf SM et al: Managing incidental findings and research results in genomic research involving biobanks and archived data sets. Genet Med 14: 361-384, 2012

**内在性 Nogo 受容体拮抗物質 LOTUS による神経回路形成機構**

竹居光太郎 (横浜市立大学医学部生命医科学部門)

我々は、発生期の嗅覚2次投射路(嗅索)形成を担う新規の生体機能分子 Lateral Olfactory Tract Usher Substance (LOTUS) を発見し、更にその結合分子として Nogo 受容体 (NgR1) を同定した。NgR1 は4種の神経再生阻害因子の共通の受容体として働き神経突起伸長を強く阻害するため、中枢神経系の再生を困難にする主要因と考えられている。ところが、LOTUS は NgR1 と結合し、NgR1 のリガンド分子がもたらす神経再生阻害作用を完全に抑制した。LOTUS の遺伝子欠損マウス (LOTUS-KO マウス) では嗅索の神経束がバラバラになる脱束化を示し、NgR1-KO マウスでは正常な神経束が形成されたが、LOTUS と NgR1 の双方を欠損するダブル KO マウスでは LOTUS-KO マウスで見られた脱束化がレスキューされた。これらのことから、LOTUS の NgR1 に対する拮抗作用が嗅索形成に寄与すると考えられた。次に、LOTUS の各種ドメイン欠損変異体を作製して NgR1 との結合能を解析した結果、C 末端側約 150 アミノ酸残基 (以下、UA/EC ドメイン) を LOTUS の NgR1 に対する拮抗作用を担う機能ドメインと同定した。更に LOTUS の拮抗作用について更に詳細な解析を行ったところ、驚くべきことに、LOTUS は NgR1 の4種の

リガンド (神経再生阻害因子: Omgp, MAG, Nogo, BlyS) 全てに対して完全な拮抗作用を示し、非常に強力な NgR1 拮抗物質として作用すると考えられた (図1)。そこで、LOTUS の生体での神経再生における役割を検討するため、LOTUS-KO マウスを用いて脊髄損傷モデル動物を作製して野性型マウスと比較検討した。齧歯類は脊髄損傷後に部分的な機能回復を示すことが知られているが、LOTUS-KO マウスではそのような機能回復が殆ど見られなかった。このことは、齧歯類が有する内発的な自発的神経再生能に LOTUS が深く関わることを示す。以上より、LOTUS の NgR1 に対する拮抗作用は、発生期の嗅索形成に深く関与する一方、神経再生能においても深く関与することが判明した。

\*本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

**神経活動依存的な軸索分岐のリモデリング**

山本亘彦 (大阪大学大学院生命機能研究科)

脳内の神経回路が生後発達期の感覚入力や自発発火により修飾されることは古くから知られているが、その分子機構については不明な点が多い。視床から大脳皮質への投射系は、その特性がよく知られ、この問題を解明するのに適した系であると言えよう。これまでに私たちは、視床皮質軸索の分岐形成が神経活動により促進されること、その促進作用は視床軸索の標的層で強いことを見出している。すなわち、分岐形成を促進する因子が標的である皮質細胞によって神経活動依存的に産生され、その量に応じて視床軸索の分岐形成が増加するとの仮説を掲げた。以前に探索した皮質標的層に分布する分子の中から、神経活動に依存して発現する遺伝子を調べたところ、候補としてネトリン4が浮かび上がった。ネトリン4は視床軸索の分岐形成開始よりやや遅れて生後数日から生後1ヶ月(ラット)までの間、視覚野や体性感覚

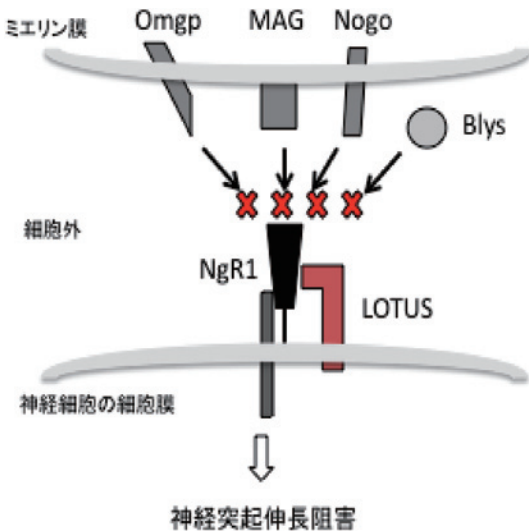
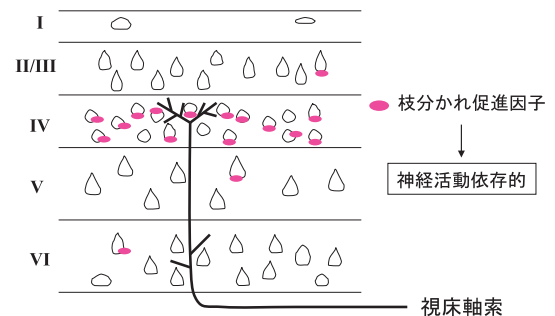


図1. LOTUS の神経再生阻害因子に対する拮抗作用



野の第4層を中心に発現した。その発現の活動依存性を解析するため、生後3週間暗闇で飼育した動物(D)と暗環境直後の24時間明環境で飼育した動物(D+L)とで比較すると、Dの視覚野では発現は激減し、逆にD+Lでは増大した。皮質切片培養下でも、TTXにより自発発火を抑えると発現は減少し、塩化カリウム処理による神経活動上昇によって増加した。次に、ネトリン4の視床軸索に対する分岐作用を視床皮質共培養系で調べたところ、ネトリン4添加によって分岐数は顕著しく増大し、ネトリン4 KOの皮質切片と野生型の視床切片の共培養では著しく減少した。加えて、*in vivo*での軸索投射についても、外側膝状体ニューロンの軸索分岐が欠損動物の感覚野で有為に減少することが明らかになった。一方、視床細胞では、この時期ネトリン4に対する受容体が発現し、そのノックダウンにより培養下での視床軸索の分岐が減少することが判ってきた。以上の結果から、ネトリン4は神経活動依存的に発達期の脳皮質感覚野に発現し、特定の受容体を介して視床軸索の分岐形成に促進的に作用することが示された。

\*本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

### 神経活動依存的な海馬樹状突起スパインの構造・機能的可塑性に対する、CaMKIIのゲート作用

林 康紀 (理化学研究所脳科学総合研究センター)

我々はLTPに伴うスパインの構造可塑性に至る分子機構を明らかにするために、シナプス後部に多量に存在するシグナル分子であるCaMKIIに

注目した。

まずCaMKIIがアクチンを東化する事で細胞骨格の一員として機能する事を示した。CaMKIIを自己リン酸化させるとアクチンとの相互作用が低下することを見だし、それがアクチン結合領域に存在する多くのセリンとスレオニンの自己リン酸化によることを見いだした。それぞれをアスパラギン酸に置換してCaMKII変異体のアクチンとの相互作用を観察した結果、アクチンとの相互作用に影響を及ぼすリン酸化部位を絞る込む事が出来た。それらの部位のアラニン変異体を作成したところ、リン酸化反応を起こしてもアクチンと遊離しない事から、この部位がアクチンとの相互作用を調節するのに必要かつ十分である事が判った。また、アラニン変異体、アスパラギン酸変異体を神経細胞に発現させ、シナプスへの分布を確認した所、アラニン変異体は野生型同様、シナプスへ結合していたが、アクチンに結合出来ないアスパラギン酸変異体はシナプスへ分布しなかった。

また、FRETによりシナプスにおいてアクチンとの結合を観察し、グルタミン酸のアンケージングにより、一過性にアクチンとの結合が減弱すること、またアラニン変異体はその減弱がみられないことを明らかにした。

さらに、CaMKIIによるアクチン東化の生理的意義を探るため、CaMKII、アクチン、種々のアクチン結合ならびに制御タンパク質との相互作用を検討した。その結果、CaMKIIがアクチンに結合した状態下では、コフィリン、Arp2/3、ゲルズリンがアクチンと相互作用出来ず、重合・脱重合反応に対する影響が抑えられることがわかった。

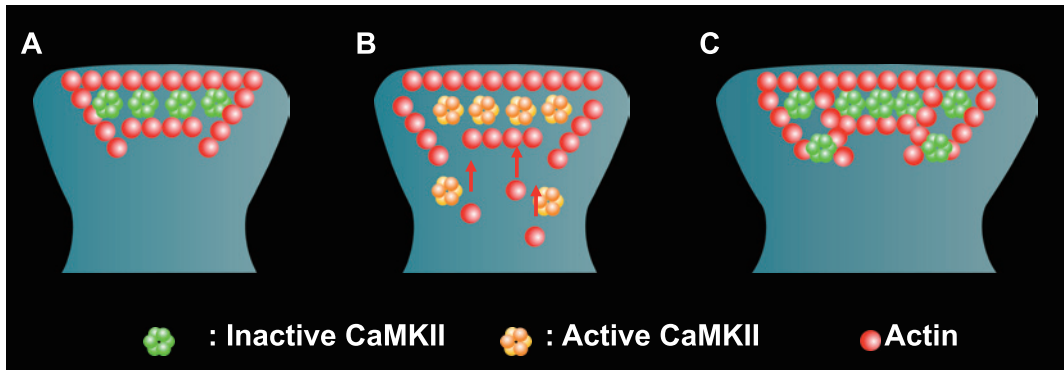


図 A 基底状態のシナプスではCaMKIIはアクチンを東化している。B 活性化されるとCaMKIIは自己リン酸化によりアクチンから遊離する。それにより、アクチンの再構成がおり、スパイン形態が大きくなる。C CaMKII活性が基底状態になると再びアクチンを東化し、安定化させる。

即ち、CaMKII がアクチンを安定化している事が示唆された。

次に構造可塑性と CaMKII による F-actin 束化の機能解析を行い、構造可塑性には CaMKII のアクチンからの遊離が必要であるということを見いだした。この機構がシナプスの構造可塑性に必要な充分であるかを検討するため、光分子不活性化 (CALI) を用いた解析を行った。GFP ファミリー蛋白の一つである KillerRed を用い、光照射により CaMKII を活性化させる事なく F-アクチンから遊離させた。その上でスパインの形態がどう変化するかを検討した。その結果、CALI を用いて、CaMKII を活性化させる事なく F-アクチンから遊離させるのにグルタミン酸のアンケーシングを加えると、それだけで構造可塑性が誘導できることが分かった。

以上より、CaMKII は神経活動が基底状態下でアクチンを束化しているが、活性化により F-アクチンから遊離し、それによりアクチンが修飾され、構造可塑性が引き起こされると考えられた。これらの事実は CaMKII が構造可塑性のゲートとして機能していることを示唆する。

\*本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

**海馬学習は興奮性と抑制性のシナプス伝達を強化する**

美津島大<sup>12</sup>, 高橋琢哉<sup>2</sup> (1山口大・医・第二生

理,<sup>2</sup>横浜市大・医・生理)

ラットを用いて海馬依存性の文脈学習 (Inhibitory avoidance task) を行い、学習群と非学習群から急性脳スライスを作製した。TTX 存在下で miniature EPSC (mEPSC) と miniature IPSC (mIPSC) を同一の CA1 ニューロンから記録し、興奮性シナプスと抑制性シナプスの可塑性を網羅的に評価した。mEPSC は CNQX で、mIPSC は bicucilline methiodide で block された。このことから mEPSC は AMPA 受容体を介する興奮性シナプス、mIPSC は GABA<sub>A</sub> 受容体を介する抑制性シナプスの反応であることを確認した。さらに、非学習群では mEPSC と mIPSC の振幅が共に小さく、多様性が限定的である一方、学習群では、mEPSC と mIPSC の振幅が増大し、シナプス入力が多様性が高まった。Paired pulse facilitation と Paired pulse inhibition により、これらの変化は主にシナプス後細胞側の現象であることも判明した。以上より、AMPA 受容体を介する興奮性シナプスの強化と、GABA<sub>A</sub> 受容体を介する抑制性シナプスの強化の結果、学習依存的に多様なシナプス入力特性を持つ CA1 ニューロンが生じることが明らかとなった。

次に、興奮性シナプスと抑制性シナプスの可塑性を高める機序を探った。学習タスク前に、アセチルコリン (ACh) の muscarinic M<sub>1</sub> 受容体阻害薬を海馬 CA1 に局所投与しておくとも mEPSC の振幅増加が抑えられ、学習が阻止された。一方、ACh

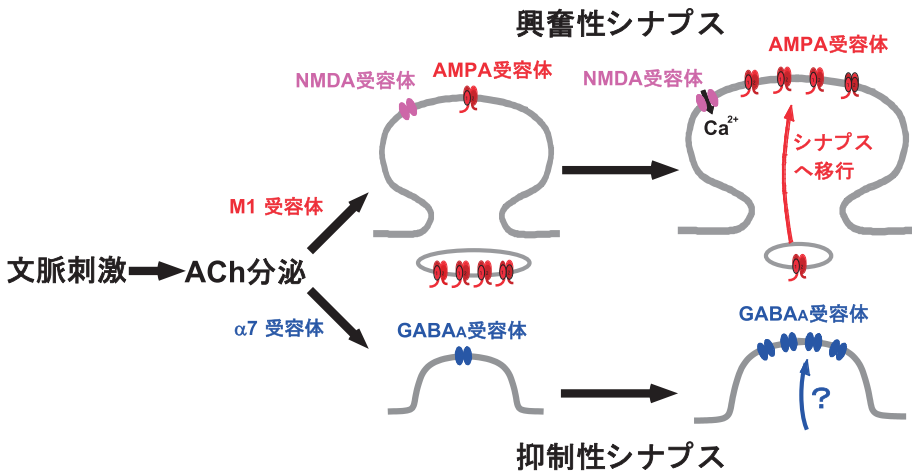


図 文脈刺激により海馬 CA1 で学習依存的に ACh 分泌が高まる。ACh は muscarinic M<sub>1</sub> 受容体を介して興奮性シナプスの可塑性を高める一方、nicotinic α7 受容体を介して抑制性シナプスの可塑性も高め、文脈学習が成立することが判明した。

の nicotinic  $\alpha_7$  受容体阻害薬の海馬 CA1 に局所投与しておくとも IPSC の振幅増加が抑えられ、学習が阻止された。さらに、*in vivo* microdialysis 法により、海馬 CA1 における ACh 分泌動態を確認したところ、文脈学習中に ACh 分泌量が増加し、学習後も約 1 時間増加が維持された。以上より、海馬 CA1 で学習依存的に ACh 分泌が高まること、異なる ACh 受容体を介して興奮と抑制の両方のシナプス可塑性が高まり、文脈学習が成立することが判明した。

\*本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

### 大脳皮質回路の異種感覚間可塑性

実木 亨, 高橋琢哉 (横浜市立大学大学院医学研究科生理学)

我々の脳は外界からの刺激に応じて脳内の神経回路を変化させることにより発達する。こうした脳の変化が起こるとき、神経細胞と神経細胞の間において形成されるシナプスを介した情報の伝達効率が変化する。シナプス伝達において中心的役割を担っている神経伝達物質の 1 つとしてグルタミン酸があり、その受け手である受容体の一つとして AMPA 受容体が挙げられる。動物が新しいことを経験するときに AMPA 受容体がシナプス後膜に移動し、シナプスにおけるその数を増やす

ことによりシナプス伝達が増強するということがすでに明らかになっており、AMPA 受容体のシナプス移行が脳の可塑性の分子基盤の一つであるというコンセプトが世界的に認められてきた。

盲目の人間において触覚や聴覚等の機能が常人をはるかに超えることがある。このようにある一つの感覚器が事故や病気などにより障害を受けた時、残存している感覚器系において可塑的な変化が起こり、その能力の向上などがみられると考えられている。しかしながらこの分子細胞基盤は未だ不明のままだった。今回我々は AMPA 受容体シナプス移行がこの現象の背景にあるという仮説のもと、視覚障害動物の体性感覚野 (パレル皮質) の神経細胞における AMPA 受容体のシナプス移行を検討した。体性感覚野の神経回路がほとんど成熟した時期において、正常動物では AMPA 受容体のシナプス移行が見られなかったが、視覚障害動物において AMPA 受容体がシナプスに移行し、神経回路が強化されるということが示された。さらに、このような現象は神経伝達物質であるセロトニン分泌の増加が仲介しており、最終的に体性感覚機能 (ひげなどによる触覚機能) が向上するということが明らかになった。

\*本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

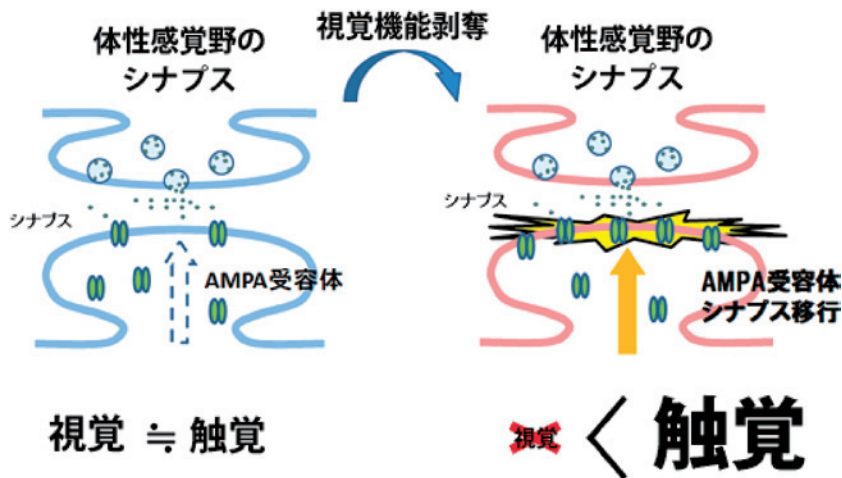


図 視覚機能の剥奪により体性感覚野の一つであるパレル皮質において、AMPA 受容体のシナプスへの移行が促進し、触覚機能が向上する。(Neuron 69 : 780-792, 2011).

### 橋結合腕傍核における発声—呼吸モードスイッチングの神経機構

荒田晶子 (兵庫医科大学生理学生体機能部門)

橋は、高次脳と脳幹部を結ぶ位置に存在する。したがって高次脳機能と脳幹部の求心性入力、遠心性出力として連絡している。その橋には、自律神経系や原始的な感覚の統合機能があると最近考えられるようになった。

橋は呼吸の調節機構としても重要な場所である。特に、橋結合腕傍核 (Nucleus Parabrachialis; NPB) は、橋の背側部に位置しており、上小脳脚の周辺部に存在する。生理学的機能としては、呼吸関連の化学および機械受容情報や循環の調節機能といった呼吸循環の統合部位の一つであり、味覚、痛覚、内臓感覚、あるいは、体温調節などの機能に参与している。また、発声は、呼吸を随意的にコントロールすることで実現される。NPBには、呼吸と連動している肺伸展受容器からの情報と、発声中枢からの信号が入力している場所である。呼吸モードから発声モードへ切り替える仕組みをNPBのレベルで明らかにするために、より単純系である摘出橋-延髄-脊髓標本を用いて実験を行った。

実験には、新生ラット (生後0日齢~4日齢) を用い、新生ラットから橋、延髄、脊髓のブロックを取り出し、橋の部分は半切し、灌流液に出来るだけ触れる面を多くした。この標本を用いて、NPBが刺激されると、どのような呼吸パターンになるかを検討した。NPBの内外側野にタングステン電極を挿入し刺激することにより図1に見られるように、刺激が入ったタイミングで吸息相が抑制され、刺激が強ければ吸息相から呼息相へとスイッチした。この場所には、能動的吸息-呼息切り替えスイッチがあると考えられた。また、呼吸相の切り替えを起こす原因に、どのような神経伝達物質が関わるのか検討した。このNPB刺激による抑制は、NMDA-receptor antagonist (MK801, APV) により、ある程度ブロックされ、GABA-antagonist bicuculline で完全に遮断された。このスイッチング現象には、NMDA-receptor と GABA システムの関与があることが判明した。GABA antagonist bicuculline で吸息-呼息の切り替えが起こらなくなったことから、吸息抑制の本体は、GABA であることが判明した。

延髄の吻側腹外側野にある呼吸性ニューロンをホールセルパッチクランプ法で記録し、NPBを刺激すると、呼吸リズムジェネレータである吸息先行型ニューロンはIPSPs, EPSPsが記録されるものがあり、パターンジェネレータである吸息性

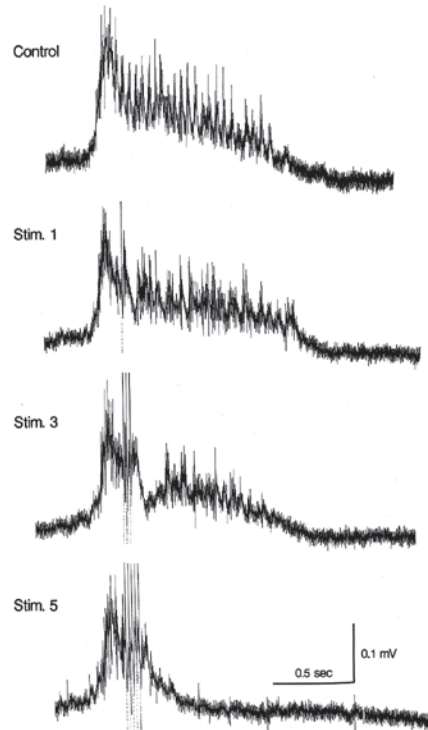


図1. C4 吸息性活動における NPB 刺激の効果 C4 吸息相は、NPB1 回及び3回連続刺激で抑制を受け、NPB 5回連続刺激により吸息相は明らかに短縮され、吸息相から呼息相に切り替わった。

ニューロンでは IPSPs が記録され、呼息性ニューロンは、EPSPs を記録した。NPB 刺激では、吸息性ニューロンを抑制し、呼息性ニューロンを興奮させることにより、吸息相から呼息相へ切り替えていると考えられた。さらに吸息-呼息切り替えに関わる NPB のニューロンの発火パターンを調べた。NPB には、吸息相から呼息相に掛けて発火するニューロン (I-E ニューロン) が多く存在し、迷走神経 (肺伸展受容器からの求心性入力) 刺激により、そのニューロンの発火頻度が上昇することが分かった。

以上の結果より、橋結合腕傍核には、能動的吸息-呼息切り替えスイッチが新生時期にも存在し、そのスイッチは I-E ニューロンの関与により、吸息性ニューロンを抑制し、呼息性ニューロンを興奮させることにより、吸息相から呼息相へ切り替えていると考えられた。

なお、本シンポジウム発表について、開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

情動と呼吸

本間生夫, 政岡ゆり (昭和大学医学部生理学生体調節機能学分野)

普段我々の無意識の呼吸は身体の酸・塩基平衡を調節し, ホメオスタシスを保つために体の中のCO<sub>2</sub>量を調節している. その調節系は化学受容器と脳幹の呼吸性ニューロン群により構成されている. しかし, 呼吸のパターンを観察すると, 同一のヒトであっても同じCO<sub>2</sub>の刺激でも同一の呼吸パターンをとるとは限らない. 睡眠中の呼吸は別として, 覚醒中は常に様々な外的・内的刺激を受け, 呼吸パターンは変化している. 外的刺激に寄ることが多いが, 内的刺激としては情動の変化が呼吸パターンを大きく変化させている [1]. 情動を伴う生理変化では恐れや不安が心拍数を高め, 血圧を上昇させることが知られ, また, 覚醒度の上昇が呼吸数を早めることも示されている [1]. これまでに不快感を与えることにより呼吸数が早まることを示してきた [2, 3]. その呼吸数の変化はそれぞれのヒトの特性に関連し, 呼吸数上昇と特性不安度に正の相関を示すことが明らかにされている (図1) [3, 4]. 脳機能イメージング法により, 恐れや不安など負の情動が扁桃体に関係していることが示され, 双極子追跡法により, 呼吸関連不安電位 (Respiratory-related anxiety potential) が扁桃体に出現することも明らかになった [5]. 内側側頭葉てんかんの患者さんで, その発作焦点を探るために埋め込まれた深部電極を介して, 扁桃体を刺激すると呼吸数が増大すること, 発作焦点切除術として片側扁桃体切除後, 予期不安に対する呼吸反応が減弱することも示されている [6]. 扁桃体に呼吸リズムがあることは新生ラットから取り出した辺縁系—脳幹—脊髓標本でも明らかになっている. 扁桃体の呼吸リズムは梨状葉の自発性バーストを起源としており, 脊髓根から記録される呼吸性活動と同期している (図2) [7]. 同標本で脳幹部分で切り離すと, 扁桃体のリズムは脊髓根のリズムと同期しなくなる. さらに扁桃体での呼吸リズムはストレス関連ホルモンである副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (corticotrophin-releasing factor : CRF) を投与すると増大することも明らかになり, 扁桃体での呼吸リズムが様々な内定環境の変化に応じて変動していることが動物実験からも示唆された [8].

本シンポジウム発表について, 開示すべき利益相反関係にある企業等はない.

1. Homma I et al: Breathing rhythms and emotions. *Exp Physiol* **93**: 1011-1021, 2008
2. Masaoka Y et al: Anxiety and respiratory

(breaths/min)



図1. 予期不安時の呼吸数上昇と特性不安感との関係. 正の相関が認められた. (文献4を改変)

- pattern: their relationship during mental stress and physical load. *Int J Psychol* **27**: 153-159, 1997
3. Masaoka Y et al: Expiratory time determined by individual anxiety levels in humans. *J Appl Physiol* **86**: 1329-1336, 1999
  4. Masaoka Y et al: The effect of anticipatory anxiety on breathing and metabolism in humans. *Respir Physiol* **128**: 171-177, 2001
  5. Masaoka Y et al: The source generator of respiratory-related anxiety potential in the human brain. *Neurosci Lett* **283**: 21-24, 2000
  6. Masaoka Y et al: Effects of left amygdala lesions on respiration, skin conductance, heart rate, anxiety and activity of the right amygdala during anticipation of negative stimulus. *Behav Modif* **27**: 607-619, 2003
  7. Onimaru H et al: Spontaneous oscillatory burst activity in the piriform-amygdala region and its relation to in vitro respiratory activity in newborn rats. *Neurosci* **144**: 387-394, 2007
  8. Fujii T et al: Effects of corticotropin releasing factor on spontaneous burst activity in the piriform-amigdala complex of in vitro brain preparations from newborn rats. *Neurosci Res* **71**: 134-139, 2011

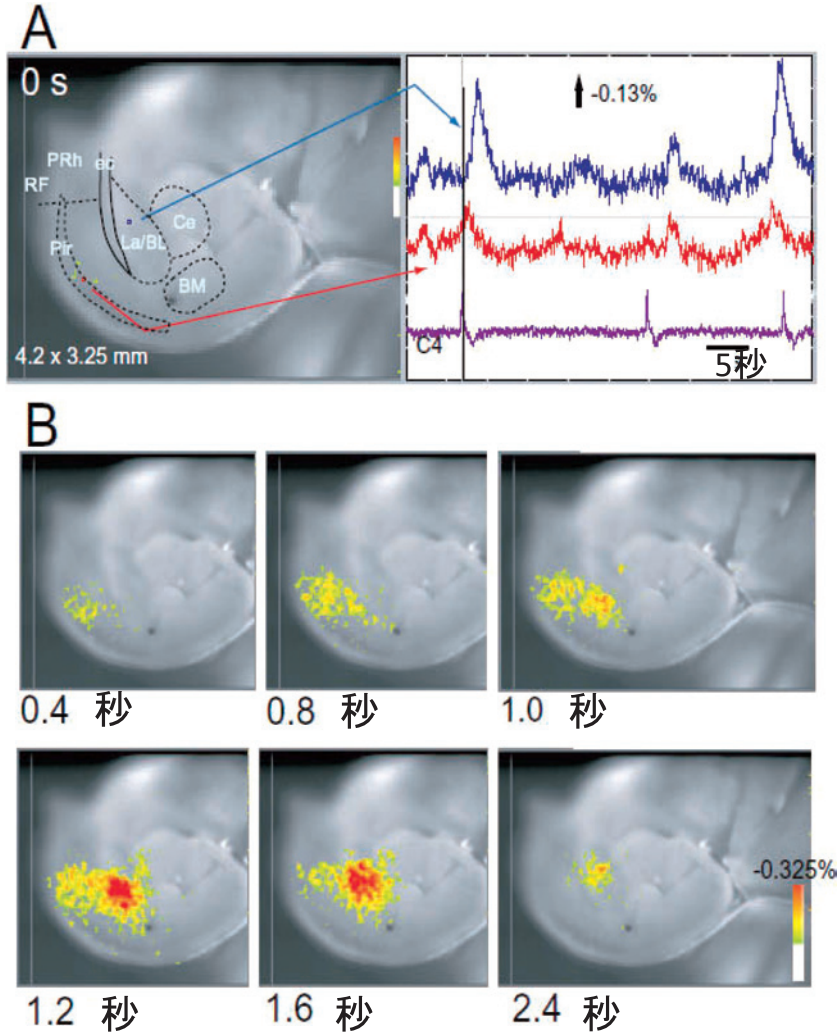


図2. 辺縁系における自発性神経群の活動部位（発光部位）.

A 左：BM, 扁桃体内側基底核；Ce, 扁桃体中心核；ec, 最外包；La/BL, 扁桃体外側基底核；Pir, 梨状葉；PRh, 梨状皮質；RF, 鼻腔裂 右：外側扁桃体の背側部（上）、梨状葉（中）と第4頸椎前根（C4）（下）の活動の同時記録.

B 梨状葉から扁桃体への発光部位の移動が時間を追って観察される. Aの状態から0.4秒～2.4秒. (文献7を改変)

### 瞑想と呼吸

有田秀穂（東邦大学医学部統合生理学（現在、東邦大学名誉教授））

呼吸には機能的に二つの異なる形がある. 生きるための呼吸と行動としての呼吸である. 生きるための呼吸は、一生涯休むことなく継続されるもので、意識しないでも自律的に調節される. それ

は延髄の呼吸中枢が営み、呼吸運動の中心は横隔膜による吸気運動である. 呼吸過程は安静時には能動的な筋活動を伴わない. その役割は、動脈血の酸素分圧、二酸化炭素分圧のホメオスタシス維持および酸塩基平衡である.

他方、行動性の呼吸は、発語や笑い・泣きの情動性発声であり、大脳皮質や大脳辺縁系などの上

位脳からの下行性司令によって調節され、生きる呼吸では通常使わない呼吸筋（主に腹筋群）を意識的に収縮させる運動が発現される。今回、話題にする、瞑想法の一つである坐禅の丹田呼吸法は、そのような行動性呼吸に分類される。坐禅瞑想の効能は、覚醒や情動などの状態を変容させることである。

私たちは坐禅未経験者を対象に、丹田呼吸法を実施させて、脳波測定、POMS心理テスト、前頭前野の血流計測を実施した [1]。丹田呼吸法を坐禅未経験者に教示するために、被験者から腹筋筋電図を導出し、眼前に置かれたオシロスコープで自己の腹筋収縮を確認させ、なるべく長く深く呼吸を行うように指導した。これが、丹田に意識を集中した呼吸法（丹田呼吸法）の生理学的定義である。その結果、覚醒脳波であるβ波の中に、α波が混入する現象が観察された。α波（8-13Hz）の中でも高周波のα2成分（10-13Hz）が有意に増加し、θ波はむしろ減少、β波のパワーには有意な変動が認められなかった。脳波学では、閉眼すると誰でも直ちにα波優位の脳波に変わることが知られているので、上記の丹田呼吸法は開眼状態を確認しつつ、実行された。

脳内機構を検証するために、閉眼状態においても丹田呼吸法による脳波への影響を検討した。得られた脳波を1分毎のパワースペクトラム解析で詳細に検討すると、閉眼状態によるα波の高いピークが最初から認められていたが、そのα波（低周波のα1成分に相当）は呼吸法7分位で消失し、代わって丹田呼吸法45分で、α2成分が新たに出現するようになり、次第に増強した。すなわち、丹田呼吸法は、閉眼によるのとは違う脳内経路を介して、脳波を変えることが判明した。

この結果は次のように説明される。覚醒システムとしては、Magounらによって明らかにされた脳幹網様体賦活系がよく知られている。脳幹網様体→視床非特殊核→大脳皮質の経路である。外部から入力されたさまざまな感覚信号が、この経路を介して大脳皮質全体を賦活化し、覚醒状態を形成させ、脳波を速波化する。閉眼状態というものは、最大の感覚信号である視覚入力が遮断されることであり、この感覚遮断が脳波を徐波化し、α波を出現させると考えられる。閉眼状態が遷延すると、やがてθ波、δ波と徐波化が進行し、睡眠に移行する。なお、この経路を仲介する脳幹網様体の構造としては、現在、青斑核ノルアドレナリン神経が明らかになっている。

もう一つの賦活系がJonesらによって10年ぐらい前に同定された [1]。脳幹網様体→前脳基底部

→大脳皮質の経路である。前者を背側経路、後者を腹側経路と区別する。この腹側経路の中継核である前脳基底部はAlzheimer病に関与するコリン作動性神経が分布する領域である。ここにセロトニンを局所投与すると、脳波が徐波化することが動物実験で示されている。すなわち、背側縫線核セロトニン神経が活性化されて、前脳基底部でセロトニン分泌が増加すると、そこから大脳皮質へ投射する神経系が抑制され、脳波が徐波化する（α2成分の増加）と考えられる。

それでは、丹田呼吸法でセロトニン神経は本当に活性化されるか。これまでの種々の動物実験データが、その可能性を示唆してきている。

背側縫線核セロトニン神経は、上記の青斑核ノルアドレナリン神経と同様に、覚醒時に規則的な自発発射を繰り返し、睡眠時に抑制されるので、覚醒系としての必要条件を備えている。ただし、セロトニン神経が活性化される因子は、強いストレス性感覚刺激ではなく、呼吸・歩行・咀嚼のリズム運動であることが、動物実験で示されている。丹田呼吸法は、呼吸の意識的なるリズム運動であることを考慮すると、セロトニン神経を活性化させる可能性があるかと仮説された。私達はそれを全血中のセロトニン濃度の増加によって検証した。

その根拠として、ラットで脳内セロトニン濃度が増加した状況で、血液中にセロトニンが放出される実験が行われた [2]。血液脳関門にセロトニン・トランスポーターが発見されているので、その阻害剤による効果も判定された。詳細は文献2に詳述されているが、脳内のセロトニンが増えると、血液脳関門を通過して血液中にセロトニンがトランスポーターを介して放出されることが証明された。この結果を踏まえて、丹田呼吸法の前後で全血中のセロトニン濃度を比較すると、有意に増加することが確認された。したがって、上記のα2波の出現はセロトニン神経の活性化によるものと私達は結論した。

以上の結果より、丹田呼吸法はセロトニン神経を活性化させて、大脳皮質の活動を鎮静化させることが明らかとなった。なお、心理テストと前頭前野の血流変動については、ここでは触れなかったため、関心のある方は文献1をご参照下さい。

本研究は「利益相反状態」にはない。

1. Yu X et al: Activation of the anterior prefrontal cortex and serotonergic system is associated with improvements in mood and EEG changes induced by Zen meditation practice in novices. *International J Psychophysiol* **80**: 103-111, 2011

2. Nakatani Y et al: Augmented brain 5-HT crosses the blood-brain barrier through the 5-HT transporter in rat. *Eur J Neurosci* **27**: 2466-2472, 2008

### 行動と呼吸：TRPA1の役割

桑木共之, 米満 亨, 上村裕一 (鹿大院・医歯学・統合分子生理, 侵襲制御)

Transient receptor potential super familyの一員であるTRPA1は三叉神経節, 節状神経節, 後根神経節の感覚ニューロンの一部に発現している。気管の迷走神経感覚枝のTRPA1は刺激物受容体として機能し, 呼吸減少反射を引き起こして刺激物の更なる吸引を防ぐ。今回我々は, TRPA1が有害な環境ガスが気管に入ってしまう前にこれを検出し, そしてその吸引防御にも働いている可能性について検討した。TRPA1ノックアウトマウスと対照野生型マウスを用いて忌避行動を観察

した。2つの部屋とそれらを繋ぐ通路から成る手製の行動観察装置を作成した。2部屋とも空の場合にはいずれのマウスも2部屋を均等(入室回数, 滞在時間とも)に探索した。一方の部屋をTRPA1アゴニストとして知られているホルマリンのガスで充満させると, 野生型マウスは決してその部屋には入らなかったのに対し, TRPA1ノックアウトマウスは平気で入室し, (通常大気の場合と比べると時間は短いものの)滞在さえした。TRPA1ブロッカーのAP18を野生型マウスの鼻腔内に投与するとノックアウトマウスと類似の行動を示したが, 腹腔内投与ではそのような効果はなかった。これらの結果から, 鼻腔(上気道)内のTRPA1は忌避行動として能動的な生体防御に働き, 気管(下気道)のTRPA1は呼吸抑制として受動的な生体防御に働いていると推測された。

本研究は「利益相反状態」にはない。