

日本

生理学

雑誌

JOURNAL OF THE PHYSIOLOGICAL SOCIETY OF JAPAN

56巻

10号

1994

第72回日本生理学会大会案内（第3報）

第2回日英合同生理学会（第4報）

INFORMATION 287

CALENDAR 296

RECORDS 297

PROFILE 300

TRENDS 303

生理学実験技術法講座

シリーズ「パッチクランプ実験技術法講座

八尾 寛：ホールセル記録法と穿孔パッチ法…………… 305

総 説

宮本博司・池原敏孝・山口久雄：細胞膜の $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送…………… 333



シングルチャネル・データ
解析用ソフト MAC-TAC、
遂に登場!

ドイツ・ヘカ社／パッチクランプ・システム EPC-9 Version Macintosh

あの新世代パッチクランプ・システムEPC-9が、
新しいパートナー、マックⅡとめぐり逢いました…

- ◆ドイツが世界に誇る2大オーソリティ、ヘカ社の技術と、マックス=プランク研究所のオリジナリティ。これらを見事に融合させた数々のパッチクランプ専用デザインで武装しています。
- ◆アンプ、ステミュレータ、オシロスコープを統合し、マックス=プランクのノウハウに基づいたソフトウェアと、アップル社のマッキントッシュⅡで駆動します。多彩なユーティリティと使いやすさを高次元で両立させて、すべてのパッチクランパーを強力にサポートします。

※EPC-7でも使えるソフトウェア(Pulse・PulseFit・MAC-TAC)のサンプルをご提供しています。
詳しくは下記へお問合せ下さい

ヘカ社日本総代理店
EPC-9 西日本総発売元

 ショーシンEM株式会社

〒444-02 愛知県岡崎市赤浜町蔵西1-14
ショーシンビル2F
TEL. 0564-54-1231
FAX. 0564-54-3207

EPC-9 東日本総発売元

(*Physio-Tech*)

株式会社 フィジオテック

〒101 東京都千代田区内神田3-10-3
コイイダビル4F
TEL. 03-3258-1641
FAX. 03-3258-1657

第72回日本生理学会大会案内（第3報）

第72回日本生理学会大会の特別な催しといたしまして、テニス大会およびデモンストラーション企画を計画いたしました。夫々の案内をご参照下さい。また、特別講演として日英合同生理学会シンポジウムに参加の外国人研究者によるレクチャーを計画いたしております。この詳細は予稿集に掲載いたします。

総会は3月30日(木)夕に行ないます。総会後にレセプションを計画しております。

名古屋では第24回日本医学会総会が同年4月7～9日に開催されます。日本生理学会もその分科会のひとつとなっています。この総会が開催されることにより、他学会も名古屋にて多数開催されますので、生理学会大会参加者のための宿泊所の確保など大変厳しいものがありました。宿泊のお申し込みは、遅くなりますとご希望の宿泊所をお世話できなくなる可能性がありますので、ご了承ください申し上げます。

大会参加申し込みの詳細は、日本生理学雑誌第56巻7号をご参照下さい。今回の参加申し込みは、大会翌日より開催されます日英合同生理学会名古屋シンポジウムと兼ねられていますので、多少複雑になっています。ご質問などありましたら、大会事務局までFAXにてお尋ね下さい。

予稿集郵送用「ゆうパック」ラベル(A-6)について

第2報に挟み込まれている「ゆうパック」ラベルは、事務局より予稿集を発送する際に使用するものです。教室単位でとりまとめて発送いたします。大会参加者名簿1枚に「ゆうパック」ラベル1枚を必ず添えて事務局までお送り下さい。その際、ご住所および予稿集部数(大会参加者人数に一致)をお書き込みお願いいたします。

多数のご参加を期待しております。

第72回日本生理学会大会事務局

〒464-01 名古屋市千種区不老町

名古屋大学環境医学研究所

神経性調節研究部内

TEL & FAX : 052-789-3889

「第3回日本生理学会テニス大会のお知らせ」

秋冷の候、皆様には益々ご清祥のことと存じます。

さて、来る第72回日本生理学会大会の折、下記のように懇親テニス大会を企画しております。初心者でも優勝のチャンスがあります。奮ってご参加下さい。

記

日 時：1995年3月29日(水) 16：30～19：00

試合開始：17：00（終了後、簡単なビアパーティーを行います）

場 所：名古屋大学テニスコート（名古屋大学東山キャンパス内）

夜間照明付きのハードコートを用意できます。ラケット、ウェア、ハードコート用靴の用意をお願いします。

参 加 費：1,000円（パーティー費）

試合方法：組み合わせは係りにお任せ下さい。4ゲーム先取で毎回パートナーを替え、対戦相手もできるだけ同じ人と当たらないように組みます。勝ち組みは5点、負け組みは取得ゲーム数を個人の得点とします。優勝カップが用意してあります。

申込〆切：1995年3月10日

申 込 先：第72回日本生理学会大会事務局内 只木英子

〒464-01 名古屋市千種区不老町 名古屋大学環境医学研究所

TEL & FAX：052-789-3889

世 話 人：只木英子（金城学院大学）

宮村実晴（名古屋大学総合保健体育科学センター）

（詳細については予稿集でお知らせします）

デモンストレーション企画

「生理学教育におけるパーソナルコンピューター」のご案内

パソコンは毎日の研究に欠かせない物となってきましたが、視覚に訴え、動きも出せ、かつ学生が能動的に関与することも出来る（双方向性）ことなどから、教育の上でも有用な道具になりうるし、またはすでになっていることと思います。そこで、先生方が作成され教育（講義の補助、実習の説明、実習の補助（たとえばシミュレーション）、自習用）に使われているソフトを、実際にパソコンを使ってデモをして頂くことを企画しました。ソフトを動かしてみる中で意見交換が行われ、ソフトの普及、改善、より有効な活用法が生れることが期待できると思います。この企画では program の priority よりも教材としての内容・有効性に力点をおいて展示したいと考えています。もし貴教室で生理学教育に関連したコンピュータプログラムを開発し、または市販のソフトを利用した教材を講義・実習用に開発しておいででしたら、是非展示させて頂きたいと思います。多くの先生方からの御応募、御来場を期待しております。

展示期間：生理学会期中（3月30～31日）

および／または日英合同名古屋シンポジウム会期中（4月1～2日）

見学者がいつでも動かして見る事が出来るよう、ソフトはパソコンに全会期中継続してロードしておきます。展示者の先生には説明討論して頂く時間を設ける予定です。

パソコン：NEC, IBP-PC compatible (ともに CPU は486を予定しています。IBM-PC はDOS/Vも可), Mac. 各2～4台程度を準備します。

なお同時に、幾つかの市販されている教育ソフト(Elsevier の OPAL 等)の展示も行うことを考えています。

詳細については追って、各生理学教室に連絡する予定です。

連絡先 464-01 名古屋市千種区不老町
名古屋大学環境医学研究所
神経性調節分野
第72回生理学会事務局
(担当 水村和枝)

Tel : 052-789-3862

Fax : 052-789-3889

E-mail mizu@riem.nagoya-u.ac.jp

第2回 日英合同生理学会（第4報）

本誌7号に第3報として案内致しましたように、第2回日英合同生理学会を平成7年3月27日(月)、28日(火)に岡崎の生理学研究所において、4月1日(土)、2日(日)に名古屋大学(東山キャンパス)において、それぞれ6と12のセッションに分かれてシンポジウム形式にて開催します。申し込み用紙(Registration Form)を含んだパンフレットを配布しておりますが、このパンフレットのご必要な方は下記へお申し込み下さい。

多くの方の参加を希望しています。

〒466 名古屋市昭和区鶴舞65

名古屋大学医学部生理学教室

第2回日英合同生理学会事務局

Tel : 052-741-2111(ext 2018)

Fax : 052-731-9479

目 次

第72回日本生理学会大会案内 (第3報)

第2回日英合同生理学会 (第4報)

INFORMATION

山田科学振興財団1995年度研究援助候補推薦要項	287
平成6年度(第3回)「医化器械の歴史」研究助成募集要項	288
千里ライフサイエンス技術講習会第4回『免疫学, 分子生物学および 生理学のためのペプチド合成とその検定法』	288
千里ライフサイエンスセミナー ブレインサイエンスシリーズ第7回「記憶・痴呆」	289
第8回千里シンポジウム 線溶系の新展開: 細胞性線溶の病態生理	289
第18回日本神経科学大会	290
第24回日本心脈管作動物質学会	291
日本学術会議だより 第33号 第15期最後の総会開催される	291
名古屋大学医学部生理学第一講座教授公募	293
第24回日本医学会総会 1995 名古屋総会広報 No. 3	294
事務局から (財)学会誌刊行センター分室移転のご案内	295

CALENDAR

主な学会開催日程	296
----------	-----

RECORDS

平成6年度第1回日本生理学会教育委員会議事録	297
第135回 JJP 編集委員会議事録	297
第136回 JJP 編集委員会議事録	298
会員消息	298

PROFILE

「生理学者群像」(彼末一之)	300
(河谷正仁)	301
(松田博子)	301
(山本哲朗)	302

TRENDS

小坂光男: Thermal Physiology・サテライト・シンポジウム(Aberdeen) にみる体温調節研究の動向	303
---	-----

生理学実験技術法講座

シリーズ「パッチクランプ実験技術法講座」 八尾 寛: ホールセル記録法と穿孔パッチ法	305
---	-----

総 説

宮本博司・池原敏孝・山口久雄: 細胞膜の $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送	333
---	-----

INFORMATION

山田科学振興財団 1995年度研究援助候補推薦要項

援助の趣旨及び内容

1. 本財団は、自然科学の基礎的研究に対して研究費の援助を致します。実用指向研究は援助の対象としません。
2. 援助額は1件当たり300～700万円、総額4,500万円、援助総件数は10件程度ですが、学会からの推薦及び本財団関係者からの個人推薦の中から選考致します。
3. 援助金を給与に充てることは出来ませんが、他の使途は自由です。
4. 援助金の使用期間は、贈呈した年度及びその次の年度の計2年間とします。

推薦方法

- イ. 推薦者：本財団が依頼した学(協)会の代表者
- ロ. 推薦件数：1推薦者ごとに2件以内
- ハ. 推薦手続：推薦者は、以下の書類を整え、ご送付願います。
 1. 所定の推薦書用紙又はその写しに必要事項を記入したもの 4部
 2. 添付書類(研学(95)-5/7ページ参照)

記載上の注意

- イ. 紙面不足のときには、同型同大の別紙で追加して下さい。
- ロ. 代表研究者は、所属のある場合、当該所属の長から本援助の申込をすることについての承諾を得て下さい。

推薦締切期日

本財団に推薦書が到着する締切期日は1995年3月31日です。

選考方法

選考委員会において選考の上、理事会が決定します。

選考結果の通知

1995年7月末迄に推薦者及び代表研究者等宛て文書にて通知します。

援助金の贈呈

選考結果の通知後適時銀行振込にて贈呈します。

推薦書送付先及び連絡先

財団法人 山田科学振興財団
(Yamada Science Foundation)
〒544 大阪市生野区巽西1丁目8番1号
電話 大阪(06)757局3311(代表)

研究の成果及び会計の報告

援助金の受領者には、後日当財団の連絡に基づき、研究経過、研究成果、会計について報告書の提出及び研究交歓会での発表をして頂きます。

付 記

- イ. 援助金の使途を変更する場合には、予め本財団の承諾を得て下さい。
- ロ. 研究成果を文書によって発表される際には、本財団(財団法人 山田科学振興財団, Yamada Science Foundation)の援助による旨を記載し、報文の類にあつてはその別刷1部、また著者の類にあつてはその1部をご寄贈願います。
- ハ. ご提出頂きました推薦書及び添付書類は、お返しいたしません。

研究者各位へ

推薦者の項に対応する学(協)会は次記のとおりです。学(協)会により締切期日及び募集方法等が異なりますから、代表研究者は応募の際、各学(協)会にお問い合わせ願います。

日本天文学会	日本化学会
日本生理学会	日本生物物理学会
日本物理学会	高分子学会
日本遺伝学会	日本発生物学会
応用物理学会	日本農芸化学会
日本分子生物学会	日本植物生理学会
日本金属学会	日本薬学会
日本動物学会	日本植物学会
地震学会	日本生化学会
日本細胞生物学会	日本免疫学会
地球電磁気・地球惑星圏学会	

平成6年度(第3回)「医化器械の歴史」研究助成募集要項

財団法人 日本医科器械資料保存協会

財団法人日本医科器械資料保存協会は、歴史的に重要な意義を有する医科器械を収集し、これを医科器械の開発・改良の研究に資するための資料として保存し、医科器械に関連する科学及び技術の進歩に貢献することを目的として、日本医科器械学会が昭和59年に設立した財団であります。

この研究助成は、本協会の目的を達成するための事業の一つとして、平成4年度から実施しています。

1. 研究助成の対象となる研究

医科器械の資料又は医科器械の歴史に関する研究(すでに実績のあるものに限る。今後に着手されるものは除く。)を対象といたします。

著しく歯科又は薬科の領域に偏る器械及び医科器械としても利用はされたが本来は理化学器械であったものに関する研究は対象といたしません。

2. 研究助成の候補となる研究者

前項の研究に従事している研究者であって、次のいずれかに該当する方といたします。

- 1) 日本医学会各分科会長、各大学医学部長、医学大学長及び関係機関長から推薦された者
- 2) 本協会の募集要項に従って候補者として申請した者

3. 研究助成金

本年度の研究助成金は総額100万円を計上しています。採択された研究に対する助成金の交付金額は、本協会に設置する研究助成選考委員会の審査の結果に基づいて、本協会理事会が決定いたします。

4. 推薦又は申請の方法

1) 推薦書又は申請書

本協会の所定の推薦／申請用紙を使用して、必要事項を黒色インク又はワードプロセッサを用いて記入し、本協会事務所に送付していただきます。

2) 参考資料

推薦又は申請する研究についての実績を示す参考資料として、その研究についての被推薦者又は申請者の自著の論文又は著述の別刷又はコピーを添付していただきます。参考資料の添付のないものは採択いたしません。

5. 推薦又は申請の締切

平成6年11月30日(当日消印有効)といたします。

6. 選考の方法及び受贈者の決定通知

本協会に設置する研究助成選考委員会の審査の結果に基づいて、研究助成の採否及びそれぞれの受贈者の助成金額を本協会理事会が決定し、平成6年2月上旬(予定)に推薦者又は申請者に文書をもって通知いたします。

7. 研究助成金の贈呈及び研究の公表

研究助成金は、本協会が開催する医科器械の歴史研究会において受贈者に贈呈し、これに引続き受贈対象の研究について受贈者に講演していただきます。

また研究内容を日本医科器械学会の機関誌「医科器械学」に掲載いたしますので、同誌の「原著」の投稿規定に従って作成した原稿を、当日、提出していただきます。研究会の期日は追って通知いたします。

8. 推薦者／申請書送付及び連絡先

推薦書類又は申請書類の送付先及び連絡先は下記にお願いいたします。

財団法人 日本医科器械資料保存協会

「医科器械の歴史」研究助成係 宛

〒113 東京都文京区本郷三丁目39番15号

医科器械会館4階 日本医科器械学会内

☎(03)3813-1062・3813-0247

推薦書又は申請書の用紙が必要な場合は、80円切手を同封して前記宛先に請求してください。

千里ライフサイエンス技術講習会 第4回

『免疫学、分子生物学および生理学のためのペプチド合成とその検定法』

日時：平成6年11月15日(火) 午前10時～午後5時
場所：千里ライフサイエンスセンタービル9階および10階(地下鉄御堂筋線千里中央駅北改札口すぐ)

主催：財団法人千里ライフサイエンス振興財団
後援：株式会社島津製作所
協賛：株式会社千里ライフサイエンスセンター
内容：1. 高効率ペプチド合成の基礎と実際

2. 生命科学の研究に必要なペプチドの検
定法
講 師：軒原清史 株式会社島津製作所バイオ機器
部専門部長
東京農工大学 客員教授
定 員：約30名
受 講 料：3,000円
申込締切：平成6年10月25日(財団必着)
申込方法：氏名、勤務先、所属、役職、所在地、〒、

電話・FAX番号を明記の上、郵便または
FAXで下記宛お申し込み下さい。参加費
は参加決定後にご請求致します。

申 込 先：〒565 大阪府豊中市新千里東町1-4-2
千里ライフサイエンスセンタービル8階
(財)千里ライフサイエンス振興財団
技術講習会係
TEL(06)873-2001 FAX(06)873-2002

千里ライフサイエンスセミナー ブレインサイエンスシリーズ第7回「記憶・痴呆」

日 時：平成6年11月18日(金) 午前10時～午後4時
場 所：千里ライフサイエンスセンタービル5階ラ
イフホール
(地下鉄御堂筋線千里中央駅北改札口すぐ)
(大阪府豊中市新千里東町1-4-2)
主 催：財団法人千里ライフサイエンス振興財団
協 賛：株式会社千里ライフサイエンスセンター
コーディネータ：大阪大学医学部教授 遠山正彌
奈良先端科学技術大学院大学教授
塩坂貞夫

プログラム

1. 海馬神経回路と記憶形成
福井医科大学助手 玉巻伸章
2. 海馬に存在するプロテアーゼ
奈良先端科学技術大学院大学教授 塩坂貞夫
3. 脳血管性痴呆の臨床と病理
国立循環器病センター研究所部長 緒方 絢
4. 痴呆症と遺伝的要因
大阪大学医学部講師 三木哲郎
5. アルツハイマー病
一多因子遺伝からのアプローチ

新潟大学脳研究所教授 辻 省 次
受 講 料：(講演要旨集含む)
会 員 6,000円
(但し、大学、官公庁、主催・協賛団体会員)
非 会 員 8,000円
学 生 3,000円
定 員：200名

参加申込方法：①氏名 ②所属(所在地、電話・FAX
番号)、役職名を明記の上、郵便または
FAXで下記宛お申し込み下さい。参加費
は三和銀行千里中央支店普通 No. 3656634
財団法人千里ライフサイエンス振興財団口
座宛お振込下さい。なお、振込の際振込者
名の前にB7とご記入下さい。ご送金確認
次第、領収書兼参加証を送付致します。

申 込 先：(財)千里ライフサイエンス振興財団
セミナー係
〒565 大阪府豊中市新千里東町1-4-2
千里ライフサイエンスセンタービル8階
TEL(06)873-2001 FAX(06)873-2002

第8回 千里シンポジウム 線溶系の新展開：細胞性線溶の病態生理

日 時：平成6年11月19日(土) 午後2時より
会 場：千里ライフサイエンスセンター
(大阪市豊中市新千里東町1-4-2)
Tel：06-873-2010
(地下鉄御堂筋線または大阪モノレール千里
中央駅下車すぐ)

記
Plasminogen activator とその inhibitor の反応機構の
解析
自治医科大学 止血血栓 三室 淳
坂田 洋一
遺伝子欠損動物における線溶系の意義

Leuven 大学分子血管生物学センター(ベルギー)

H. R. Lijnen

t-PAREceptorの線溶増強作用

近畿大学 生理学 深尾 偉 晴

u-PAREceptorと matrix metalloproteinase

島根医科大学 生理学 高 橋 敬

u-PAREceptorの発現調節

宮崎医科大学 生理学 吉 田 悦 男

u-PAREceptorの病態生理

Finsen研究所(デンマーク) K. Dano

(終了後に懇親会を開催します, 尚, 入場料は無料です)

世話人: 近畿大 松 尾 理

三重大 鈴木 宏 治

循環器病センター 加 藤 久 雄

問い合わせ先:

〒589 大阪狭山市大野東377-2

近畿大学医学部第2生理

松 尾 理

Tel : 0723-66-0221(内線3163)

Fax : 0723-66-2853

第 18 回 日 本 神 經 科 学 大 会

期 日: 1994年12月6日(火)~8日(木)

場 所: 池袋サンシャインシティ

参加費: (和文・英文抄録費込)

事前登録: 8,000円

当日登録: 10,000円

シンポジウム・特別講演・ワークショップ予定表

<特別講演>

12月6日(火) 午後1:30~2:30

BRAIN MECHANISMS OF PERCEPTION

Prof. V. B. Mountcastle (Mind and Brain Institute,
Johns Hopkins University)

座長: 伊 藤 正 男(理研・国際フロンティア)

12月7日(水) 午後1:30~2:30

AREAS V5 OF THE PRIMATE BRAIN-PAST, PRE-
SENT, FUTURE

Prof. S. Zeki (Department of Neurobiology, Uni-
versity College London)

座長: 酒 田 英 夫(日本大・医・第一生理)

<シンポジウム>

12月6日(火)

午前9:00~11:30

1. 神経発生における新展開

座長: 村上富士夫(大阪大・基礎工)

田 中 英 明(熊本大・医)

午後2:30~5:00

2. 知覚の脳内メカニズム

座長: 岩 村 吉 晃(東邦大・医)

12月7日(水)

午前9:00~11:30

3. Structure and function of the cortical horizontal

connections

座長: 田中啓治(理研・国際フロンティア)

午後2:30~5:00

4. ブレインイメージング

座長: 菅 野 巖(秋田県立脳血管研究センター)

岩 田 誠(東京女子医大)

12月8日(木)

午前9:00~11:30

5. K⁺ チャネルの分子構造と機能

座長: 平 岡 昌 和(東京医科歯科大・医)

久 保 義 弘(都・神経研)

6. 視覚誘導性運動の中核機構

座長: 蔵 田 潔(東北大・医)

午後1:30~4:00

7. ステロイドホルモンと受容体の神経組織に対す
る新展開

ー発生, 分化, 組織構築とシナプス伝達機構
への多様な影響ー

座長: 新 井 康 允(順天堂大・医)

河 田 光 博(京都府立医大)

8. 軸索輸送とシナプス形成・維持の分子細胞生物
学

ー長期可塑性, 遅発性ニューロン死とのかか
わりー

座長: 廣 川 信 隆(東京大・医)

黒田洋一郎(都・神経研)

<ワークショップ>

12月7日(水) 午後5:30~8:00

1. 培養脳切片標本の特徴と応用

座長: 坂 口 卓 也(塩野義・創薬第二研究所)

山 本 宣 彦(大阪大・基礎工)

2. 視覚認知の実験心理学的アプローチ

座長：山下 晶子(日本大・医)

3. シナプス小胞の膜融合メカニズム

座長：吉岡 亨(早稲田大・人間科学)

阿部 輝雄(新潟大・脳研)

ご覧のように、一般演題のほかに内容のある講演、シンポジウム、ワークショップを企画いたしました。講演をお願いしました Mountcastle 先生は体性感覚野、頭頂連合野の研究のパイオニアで、神経生理学界の重鎮でいらっしゃいます。また、Zeki 先生は視覚前野の研究で優れた業績をあげておられます。学会会

員のみならず、興味のある方にはどしどし参加していただきたいと考えております。

問い合わせ先

第18回日本神経科学大会事務局

〒173 板橋区大谷口上町30-1

日本大学医学部第一生理 泰羅 宛

TEL : 03-3972-8111 ext. 2231

FAX : 03-3972-8292

e-mail : neuro94@med.nihon-u.ac.jp

(注：一般演題の申し込みは締切ました)

第 24 回 日本心脈管作動物質学会

会 期：平成7年2月4日(土)

会 場：国立京都国際会館

会 長：中川 雅夫(京都府立医科大学第二内科)

参加費：4,000円

[問い合わせ先]

〒602 京都市上京区川原町通広小路上ル梶井町465

京都府立医科大学第二内科

第24回日本心脈管作動物質学会 総会事務局

TEL (075)251-5511(直通)

FAX (075)251-5514

事務局長 澤田 昌平

[演題申し込みについて]

演題申し込み締め切り：平成6年10月15日

演題申し込み書類請求先

〒465 名古屋市昭和区鶴舞町65

名古屋大学医学部薬理学教室内

日本心脈管作動物質学会事務局

TEL (052)741-2111 内線2035

FAX (052)733-4774

※なお、演者は本学会の会員に限ります。本学会への入会を御希望の場合は上記の演題申し込み書類請求先に御連絡下さい。必要書類をお送りします。

日本学術会議だより 第33号

第 15 期 最 後 の 総 会 開 催 さ れ る

平成6年6月 日本学術会議広報委員会

今回の日本学術会議だよりでは、5月25日から27日まで開催された第118回総会の概要と同総会で採択された「新しい方式の国際研究所の設立について勧告」、「公的機関の保有する情報の学術的利用について(要望)」、「女性科学研究者の環境改善の緊急性についての提言(声明)」についてお知らせします。

日本学術会議第118回総会報告

日本学術会議第118回総会(第15期・第6回)が、5月25日～27日の3日間にわたって開催されました。

総会の初日(25日)の午前は、会長からの前回総会以降の経過報告に続いて、各部、各委員会等の報告が行われました。次いで、今回総会に提案されている13案件について、それぞれ提案説明と質疑応答が行われました。午後からは、各部会が開催され、総会提案案件

の審議及び各部会個別案件について審議が行われました。

総会2日目(26日)の午前は、前日提案された13案件のうち、9案件の審議・採択が順次行われました。

まず、「日本学術会議会則の一部を改正する規則」、「日本学術会議の運営の細則に関する内規の一部改正」、「日本学術会議の行う国際学術交流事業の実施に関する内規の一部改正」、「副会長世話担当研究連絡委員会の運営について(申合せ)の一部改正」及び「第16

期における研究連絡委員会委員の在任期間等に関する規定の適用について(申合せ)」について一括して討論が行われ、採択の結果、いずれも可決されました。これらの会則、内規等の改正は、

1. 運営審議会の構成員等の見直し

常置委員会と運営審議会の連絡を緊密にし、運営審議会の議論をより充実させるため、常置委員会委員長が常時運営審議会に出席することとし、併せて、運営審議会の構成員の見直しを行うこと。

2. 第7常置委員会の設置及び第16期に向けての研連の見直し

国際対応委員会の改組について(申合せ)(平成5年4月22日第116回総会決定)に沿って第7常置委員会を設置し、併せて、各部等での検討結果を踏まえ、第16期へ向けての研連の見直しを行うこと。

3. 研連委員の在任期間等関係

研連委員の在任期間に関する運営内規の解釈をより一層明確化するとともに、将来に向けての研連活動の継続的発展・活性化を図るため、研連委員の在任期間等についての関係規定を整備すること。

を趣旨とするものです。

次に、「運営審議会附置会員推薦手続検討委員会の設置」についての討論・採決が行われ、可決されました。これは、会員推薦制度導入以来、今回で4度目となり、会員推薦手続きの過程において、幾つかの問題点がみられたことから、これらの諸問題について審議するため、新たな委員会を運営審議会に附置するものです。

続いて、「新しい方式の国際研究所の設立について(勧告)」、「公的機関の保有する情報の学術的利用について(要望)」、「女性科学研究者の環境改善の緊急性についての提言(声明)」についての討論・採決が行われ、可決されました。午後は、「第6常置委員会報告～国際学術交流・協力の飛躍的發展のために～」、「人口・食糧・土地利用特別委員会報告～21世紀の人口・食糧問題に対する全人類の取組に向けて」、「学術国際貢献特別委員会報告～学術国際貢献のための新たなシステムについて～」及び「死と医療特別委員会報告～尊厳死について～」の4件の対外報告について討論が行われ、それぞれ承認されました。

総会3日目(27日)は、午前は各常置委員会及び国際対応委員会が、午後は各特別委員会がそれぞれ開催されました。

新しい方式の国際研究所の設立について (勧告)(抄)

近年、学術の国際交流がますます盛んになるとともに、新しい方式の研究所が世界の国々に設立されている。それらの新しさは、固有の研究員をほとんどたず、国内外から招請した客員研究員による共同研究を企画し実行する点にある。この方式にふさわしい分野としては、自然科学のみならず、人文科学、社会科学を含め様々な領域が考えられるが、理論構築を主眼とする研究領域においては、研究テーマを学際的、機動的に選択する上で特に有効である。これは、また国を異にする若手研究者が相集い、生活と研究ないし研修を共にする場としても大きな効果を生むであろう。実際、世界的には、この意味で成果をあげている新研究所も少なくない。

さらに、いま国際貢献が基礎科学においても強く求められているが、それは、学術研究の推進と相互に強め合うべきものであって、このためにも新しい方式は最適である。

こうした観点から、新しい方式の国際研究所の設立が必要であり有用であるとの結論に達したので、ここにその設立を勧告する。

公的機関の保有する情報の学術的 利用について(要望)(抄)

研究者が学術研究のために必要とする情報には、極めて広範囲なものが含まれおり、その内容は、学問分野によっても多種多様である。学問分野によっては、公的機関の保有する情報が学術研究にとって極めて重要なしは不可欠な意味をもつことになる場合も少なくないが、多くの場合に、かかる公的機関の保有する情報を学術情報として利用することには困難が伴っている。それは、公的機関の保有する情報の少なくない部分が公開されておらず、学術情報としての利用についてもその開示を求めることができないからである。

このような公的機関の保有する情報の学術的な利用のためにも、まず基本となるのは、国民の基本的な権利に基づく公的機関の保有する情報の公開制度である。この制度の確立によって、公的機関の保有する情報の学術情報としての利用も同時に保障されることになるからである。公的機関としては、国家機関及び地方公共団体機関を挙げることができるが、国家機関の保有する情報についての公開制度が設けられていない

ことは、学術研究にとっても特に重大な障害となっている。国民の「知る権利」を中心とする基本的権利を保障するための国家機関の保有する情報の公開制度は、学術研究にとっても極めて重要な意味をもっているといえる。国民の基本的な権利を保障するために、また学術研究の推進のためにも、原則公開を基本とし的確な内容を持つ国の情報公開制度の確立が不可欠であると考えて、ここに情報公開法の制定を要望する。

なお、公的機関の保有する情報の学術的利用については、情報の保存及び研究者による非公開情報の利用についての検討が必要である。

女性科学研究者の環境改善の緊急性 についての提言(声明)(抄)

女性の社会的地位の向上を目指す取組が、国際的にも国内的にも種々行われているが、日本学術会議においても第10期及び第12期に女性科学研究者の地位の向上に関する「要望」を決議した。今期、すなわち第15期の発足に当たり、日本学術会議は「女性研究者の地

位の向上」に留意することを再確認し、今期の活動計画の一つにこの課題を取り上げ審議してきた、その結果、女性科学研究者の地位の向上の必要性は理念的には一般化したものの、科学者全体の対応の遅れもあって、その地位は実質的に余り改善されていないことが明らかになった。

このため、特に基礎科学分野における科学研究者不足の事態が目前に迫っている現在、我が国における科学の調和のある発展のために、第10期、第12期での男女平等の視点を前提としつつ、日本学術会議は、極めて女性科学研究者の環境改善の緊急性を指摘するとともに、関係方面に環境改善の促進を強く訴えるものである。

「日本学術会議だより」について御意見、お問い合わせ等がありましたら、下記までお寄せください。

〒106 東京都港区六本木 7-22-34

日本学術会議広報委員会

電話 03(3403)6291

名古屋大学医学部生理学第一講座教授公募

このたび名古屋大学医学部は、平成7年3月末日停年退官する生理学第一講座富田忠雄教授の後任教授を公募します。生理学分野において意欲的に研究される方を希望します。つきましては、平成6年12月25日までに下記の書類をお送り下さるようお願いします。

名古屋大学医学部生理学第一講座教授選考委員会

1. 履歴書
2. 業績目録(著書、原著、総説に分類。主要論文10編に○印)
3. 主要な原著(著書も含む)5編の別刷各1部

4. 科学研究費等の取得実績
5. これまでの研究概要(2,000字以内)
6. 今後の研究、教育計画(2,000字以内)

送付、問合先

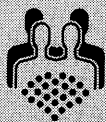
名古屋大学医学部生理学第二講座
曾我部正博

〒466 名古屋市昭和区鶴舞65

TEL: 052(741)2111 (ext. 2022)

FAX: 052(741)1459

(封筒に人事応募と朱記のこと)



第24回 日本医学会総会 1995 名古屋

名古屋総会広報

No. 3

THE 24TH GENERAL ASSEMBLY OF THE JAPAN MEDICAL CONGRESS 1995 NAGOYA

会期	開会式	閉会式	学術講演	総合医学展示
1995 April	4	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30		

学術講演プログラム 演題速報

●人間性の医学と医療

- L 人間性の医学
- L 患者と医師 (望ましい医療とは)
- L 医療における自己評価 (最適な医療を求めて)
- KL 尊厳死/安楽死

●世界に開かれた医療

- L 日本とWHO
- S 輸入感染症の実態と対策
- S 医師養成の国際比較 (アジアを中心として)

●エイズ・感染

- L エイズの現状と将来
- S エイズウイルスに対する新たな治療戦略
- S ウイルス性肝炎の基礎と臨床
- S MRSAの最近の動向

●遺伝子医学

- L 遺伝子治療 (現況と展望) (臨床) (基礎)
- L レセプター疾患とイオンチャンネル疾患
- S DNA診断の有用性と限界
- S ジーンターゲットング

●エイジングサイエンス

- L エイジングサイエンスの熟成に向けて
- S 老人性痴呆
- S 高齢者をささえる医療

●脳死と移植

- L 臓器置換術の現況と展望
- LS 臓器移植医療 (心) (肝) (腎)

●癌

- L 21世紀の癌研究
- L 消化器癌の多段階発癌
- S 癌の転移・浸潤のメカニズム
- S 現代癌医療の諸問題
- S 癌の新しい治療戦略

●シグナル伝達と分子細胞医学

- L カルシウムシグナリングの分子機構
- S Glycobiologyの新展開
- S 血管作動性ペプチド

●臨床医学の最前線

- L 臨床の視点
- LS 内視鏡治療 (呼吸器) (関節鏡) (泌尿器科)
- LS 検診発見の異常をどうする (胸部X線写真) (胃X線写真) (腹部超音波) (心電図) (血液・生化学) (検尿) (検便) (脳ドック)
- LS プライマリ・ケア (頭痛) (動悸) (呼吸困難) (めまい) (腹痛) (嘔吐) (下痢) (咳・痰) (意識障害)

●脳と神経

- L 脳の認識
- S アルツハイマー病最新の知見
- S うつ病と精神分裂病
- LS 記憶のメカニズム (分子仮説とLTP)

●免疫・血液

- L IL-8の病態論
- S アレルギー治療の最前線
- S 骨髄移植の新しい展開
- LS 花粉アレルギー (エコロギーとの関わり) (発症制御の進歩)
- LS 食物アレルギー (分子生物学を利用した食品の改良) (臨床の現状と展望)

●心臓と血管

- L 心臓肥大の分子生物学的機序
- LS 大血管外科と脳・脊髄保護
- LS 循環器とビタミンE

●発生と発育

- L 生命とカタチ
- S 先天性代謝異常症の遺伝子診断
- S 小児期における成人病予防
- LS ワクチン接種の意義

●環境と健康

- L 宇宙飛行は健康にどのような影響を与えるのか
- L 人は地球外宇宙に住めるのか (NASAの計画と展望から)
- LS 宇宙環境と健康
- LS 過労死

●社会に貢献する医療

- L 日本の医療行政
- S 東洋医学と西洋医学の融和
- S 開業医のあるべき姿
- LS 臨床医と専門医制のあり方
- LS 医療における法と人権

●チーム医療とQOL

- S 看護の専門性
- S 薬剤師の専門性
- P リハビリテーション最前線

- L レクチャー
- S シンポジウム
- LS レクチャーシリーズ
- KL キーノートレクチャー
- P パネルディスカッション

※最終段階で変更することもあります。

登録開始＝平成6年(1994年)1月

登録専用電話 052-735-4333

区分	医師または研究者	左記のうち卒業6年まで または大学院生	コ・メディカル	学生または同伴者 (登録者のご家族)	会誌
特別割引登録料 ～平成7年1月31日	30,000円	15,000円	8,000円	5,000円	12,000円
通常登録料 平成7年2月1日～当日	35,000円	20,000円	12,000円	8,000円	

名古屋観光案内



国宝源氏物語絵巻 竹河三

徳川美術館 (東区徳川町1017) TEL (052) 935-6262

口尾張徳川家伝来の重宝一万数千件を所蔵する唯一の美術館。展示は時代考証に基づいた空間復元も取入れられ、往時が偲ばれる。国宝「源氏物語絵巻」は圧巻。また企画展も多数催され春は「尾張徳川家の

雛まつり(4月9日まで)」が絶品。大名雛は見るものを雅びな世界へ導く。平成7年秋(開館60周年)には、10年に一度の「源氏物語絵巻」展(仮称)が催され(五島美術館所蔵も含め)絵巻の一斉公開あり。必見。

○栄より 市バス17番のりば「3山」・「猪高車庫」行「新出来」下車徒歩3分、名古屋駅前から市バス・名鉄バスもあり。開館10:00～17:00、休館月曜日(祝日の場合は翌日)、観覧料:一般 1,000円、高次生 700円、小中学生 500円

お問い合わせ——第24回 日本医学会総会事務局 TEL 052-732-6622 FAX 052-732-0036

〒466名古屋市中区鶴舞町65 名古屋大学医学部附属病院共済会館内

〔事務局から〕

(財)学会誌刊行センター分室移転のご案内

JJP 編集部(学会誌刊行センター内)が移転になりました。

今後のご連絡は、下記宛にさせていただきたくお願い申し上げます。

財団法人 学会誌刊行センター

〒113 東京都文京区弥生2-4-16

TEL 03-3817-5821

FAX 03-3817-5830

JJP の送付先変更、申込等は従来通り、(財)日本学会事務センター(下記参照)です。

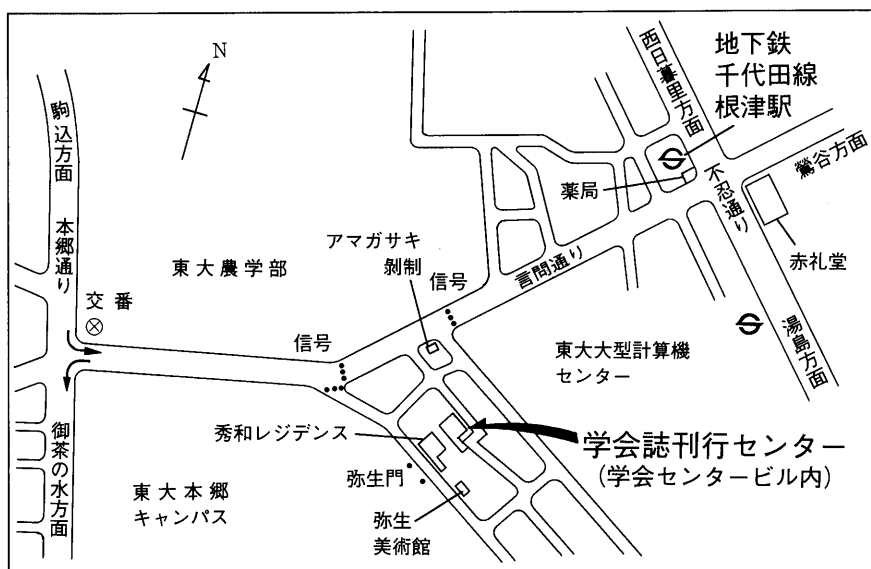
(送付先変更・申込等)

(財)日本学会事務センター

〒113 東京都文京区本駒込5-16-9

学会センター C21

TEL 03-5814-5810



CALENDAR

主 な 学 会 開 催 日 程

開 催 日 (演題締切)	名 称	会 場	連 絡 先
94.11. 7-10	第3回アジア大洋州生理科学 連合(FAOPS)大会	上海	日本生理学会事務局 ☎03-3815-1624
94.11. 8-11 (94. 7.31)	日本神経回路学会第5回全国 大会 JNNS'94 つくば	つくば：工業技術院つく ば共用講堂	日本電気(株)基礎研究所 ☎0298-50-1115
94.11.15	千里ライフサイエンス技術講習会 第4回 「ペプチド合成とその検定法」	豊中：千里ライフサイエ ンスセンタービル	(財)千里ライフサイエンス振興財団 ☎03-873-2001 技術講習会係
94.11.18	千里ライフサイエンスミナー： ブレインサイエンスシリーズ 第7回「記憶・痴呆」	豊中：千里ライフサイエ ンスセンタービル	(財)千里ライフサイエンス振興財団 ☎03-873-2001 セミナー係
94.11.19-24 (94. 5.31)	第2回国際病態生理学会総会	京都：国立京都国際会館	(株)ジェイコム内大会事務局 ☎075-341-1618
94.11.29-12. 1	第9回生体・生理工学シンポ ジウム	つくば：工業技術院共用 講堂	計測自動制御学会 ☎03-3814-4121
94.11.29-12. 1	第24回日本免疫学会学術集会	京都：国立京都国際会館	京大理学部 動物学 ☎075-751-2111 村松 繁
94.12. 3	第21回日本神経内分泌分科会	北九州：産業医大ラマツ イーニホール	産業医大 第一生理 ☎093-691-7420 山下 博
94.12. 6- 8	第18回日本神経科学大会	池袋：サンシャインシティ	日大医学部 第一生理 ☎03-3972-8111 (2231) 泰羅
94.12.16-18	第37回日本腎臓学会総会	千葉：日本コンベンションセ ンター(幕張メッセ)	筑波大 泌尿器科 ☎0298-53-3202 江藤胤尚
94.12	第17回日本分子生物学会年会	神戸：神戸ポートアイラ ンド国際会議場	学会事務センター大阪事務局 ☎06-873-2301 石濱明(国立遺伝研)
未定	慶應ニューロサイエンス研究 会	未定	慶應大 生理 ☎03-3353-1211
未定	日本医学会シンポジウム	未定	日本医学会 ☎03-3946-2121
95. 2. 4 (94.10.15)	第24回日本心脈管作動物質学会	京都：国立京都国際会館	京都府立医大 第二内科 ☎075-251-5511 澤田昌平
95. 3.27-28	第2回日英合同生理学会 岡崎シンポジウム	岡崎：生理学研究所	北大 菅野 ☎011-716-2111 生理研 山岸 ☎0564-55-7831
95. 3.30-31	第72回日本生理学会大会	名古屋：名大 東山キャ ンパス	名大 富田・曾我部・渡邊・熊澤 ☎052-782-8246
95. 4. 1- 2	第2回日英合同生理学会 名古屋シンポジウム	名古屋：名大	名大 富田・曾我部 ☎052-741-2111 名大 渡邊・熊澤 ☎052-781-5111
95. 4. 7- 9	第24回日本医学会総会	名古屋	第24回日本医学会総会事務局 ☎052-732-6622 名大 共済会館内

*INFORMATION とこの欄への記載をご希望の方は開催日の3ヶ月前までに事務局宛お送り下さい。

RECORDS

平成6年度第1回日本生理学会教育委員会議事録

日 時：平成6年6月29日(水) 午後12:00～14:00

場 所：学士会館 別館

出席者：佐藤(岩手医大), 栗原(慈恵医大), 橋本(女子医大), 本間(昭和大), 入来(山梨医大), 中野(東海大), 高田(浜松医大), 富田(名古屋大), 今井(大阪医大), 瀬山(広島大), 今永(福岡大), 有田(大分医大), 小坂(長崎大)

欠席者：加藤(北海道大), 佐久間(日本医大)

1. 生理学実験技術法講座について

- 1) 第1課題「パッチクランプ実験技術法講座」は日本生理学雑誌に順次掲載中である。
- 2) 平成6年12月には第2課題「細胞内 Ca^{++} 濃度の光学的測定法講座」の原稿が各執筆者より送られてくる予定である。

2. 生理学実験技術講習会について

- 1) 「生理学研究所生命科学実験技術トレーニング・コース」として平成6年7月21日～29日まで生理学研究所で行われる。
- 2) 109名(生理学会員30名)の応募があり定員30名の予定を53名(生理学会員22名)に変更した。
- 3) 毎年、講習会を受講した受講者が習得した技術をその後、どのように活用しているか、有用性を追跡調査する。

3. 第72回日本生理学会(名古屋)における教育シンポジ

ウムについて

- 1) 教育シンポジウムは行なわない。
- 2) 生理学を含む医学教育全般の変革に関し、教育講演会を開催する。マンチェスター大学の先生で日英合同生理学会に出席する方に特別講演を依頼し、加えて日本側から1～2名程度の方に講演をお願いする予定である。

4. 生理学問題集について

- 1) 書名は「MCQによる生理学問題集」とする。
- 2) 企画概要が了承され、7月13日付をもって各執筆者に原稿依頼を送る。
- 3) 執筆予定者は73名。平成7年3月発行予定。
5. 教室スタッフの採用に関する情報交換の場を考えたかどうかという発言があった。
6. 次回教育委員会は10月29日 午前11時30分より。

第135回 JJP編集委員会議事録

日 時：平成6年2月26日(土) 午後2:00～午後4:00

場 所：学会誌刊行センター分室6階会議室

出席者：金子委員長、高橋、佐藤、酒田、杉、福田各委員

- 1) 前回議事録を原案通り承認した。
- 2) 論文審査状況の確認と、刊行状況の報告が行なわれた。
- 3) 入澤賞の候補について討議を行なった。
- 4) 審査用紙改訂の具体案を提示し、さらに改良を加えることとなった。

- 5 第71回生理学会大会の抄録の Proceeding の確認をした。

- 6) Minireview 執筆依頼に関し、各編集委員が候補者を挙げ、依頼を始めることとなった。

次回期日：平成6年5月14日(土) 午後2:00～
学会誌刊行センター(弥生)会議室

第 136 回 JJP 編集委員会議事録

日 時：平成 6 年 5 月 14 日(土) 午後 2:00～午後 4:00

場 所：学会誌刊行センター(弥生) 5 F 会議室

出席者：金子委員長、熊田、高橋、佐藤、酒田、杉、福田、森本各委員

- | | |
|---|--|
| <p>1) 前回議事録を原案通り承認した。</p> <p>2) 論文審査状況の確認をした。</p> <p>3) 審査用紙改訂について最終的な検討をして、委員長案に若干の手直しをした様式を決定案とした。</p> <p>4) 入澤賞の発表のことに、今後の方針について話し合った。</p> | <p>5) 生理学会 Proceedings の現在の進行状況について報告をした。</p> <p>6) Minireview の執筆依頼に関する状況報告をした。</p> <p>次回期日：平成 6 年 9 月 3 日(土) 午後 2:00～
学会誌刊行センター(弥生)会議室</p> |
|---|--|

会 員 消 息

<新 入 会 員>

氏 名	勤 務 先 (電 話)	〒	自 宅 住 所	専 門 分 野
相 沢 清 香	愛知医科大学 第二生理 0561-62-3311	465,	名古屋市名東区小池町47 第2名光荘215号室	環 境
上 里 奈 名	香川医科大学 第一生理 0878-98-5111	761	香川県高松市伏石町426-1	細胞・分子
大 沼 英 晴	香川医科大学 第一生理 0878-98-5111	761-07	香川県木田郡三木町池戸1763-1 サンライズハイツ1307	細胞・分子
岡 田 薫	明治鍼灸大学 生理 0771-72-1181	622	京都府園部町上本町南2-7 シャトルミエール	感 覚
小 川 尊 明	香川医科大学 第一生理 0878-98-5111	769-23	香川県大川郡長尾町東2439-14	細胞・分子
沖 田 菜穂子	神戸学院大学 栄養学部 生理 078-974-1551	651-21	兵庫県神戸市西区大津和1-3-19 ベルフィース209	血 液
北 川 洋 史	三重大学 医学部 第二生理 0592-32-1111	515-23	三重県一志郡嬉野町平生960-61	シナプス他
喜多野 郁 夫	大阪医科大学 第二生理 0726-83-1221	630	奈良県奈良市中筋町26	膜輸送
小 浜 郁 秀	札幌医科大学 第二生理 011-611-2111	064	札幌市中央区南7条西25-7-16 医大第7アパート302	神経生理
澁 谷 浩 司	福井医科大学 第一生理 0776-61-3111	910-02	福井県坂井郡丸岡町今市4-8 第2九頭竜ハイツ1-7	
杉 浦 美 穂	財東京都老人総合研究所 運動機能 03-3964-3241	173	東京都板橋区仲町35-4 グリーンパーク中板橋B203	
鈴 木 睦 昭	静岡県立大学 054-264-5794	424	清水市折戸519-1 教職住宅103	細胞・分子
関 和 彦	国際武道大学 体育学部 0470-73-4111	299-52	千葉県勝浦市新宮946-21-203	運 動

氏 名	勤 務 先 (電 話)	〒	自 宅 住 所	専 門 分 野
田 中 潤 也	愛媛大学 医学部 第二生理 0899-64-5111	791-02	愛媛県温泉郡重信町横河原1375 愛大宿舍115	細胞・分子
坪 井 貴 司	早稲田大学 人間科学部 0429-49-8111	202	東京都保谷市東町2-16-16-101	シナプス他
道 家 洋 子	日本大学 松戸歯学部 生理 0473-68-6111	271	千葉県松戸市根本237	
富 山 華 子	香川医科大学 第一生理 0878-98-5111	760	香川県高松市今新町6-3	細胞・分子
中 隣 克 己	生理学研究所生体システム 0564-55-7772	444	愛知県岡崎市美合町字五本松61 美合住宅1-15号	運 動
長 島 雅 人	札幌医科大学 第一生理 011-611-2111	065	北海道札幌市東区北13条東1丁目 ハイグレード13-302	心臓・循環
藤 田 卓	大分医科大学 第一生理 0975-49-4411	870	大分県大分市大字賀来3766	筋
増 田 正 雄	(財)東京都老人総合研究所 臨床生理 03-3964-3241	173	東京都板橋区氷川町43-8 エステートキヨ203	
宮 本 謙一郎	環境庁国立水俣研究センター 0966-63-3111	867	熊本県水俣市古城1-9-31 環境庁水俣住宅1-11	チャネル他
宮 脇 守 男	香川医科大学 第一生理 0878-98-5111	761-03	香川県高松市下田井町647	細胞・分子
望 月 忍	山之内製薬(株) 第二分子医学研究所 0298-52-5111	305	茨城県つくば市春日2-35-2 エトワール春日102	チャネル他

＜再 入 会＞

氏 名	勤 務 先	〒	自 宅 住 所	専 門 分 野
後 藤 浩 史	愛知産業大学			
金 子 弘 毅		228	相模原市上鶴間8-16-8	心臓・循環

＜転勤・異動＞

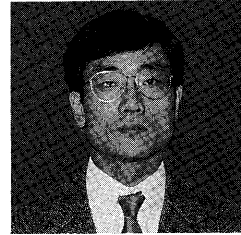
氏 名	勤 務 先 名	勤務先 T E L
伊 藤 南	理化学研究所 フロンティア思考電流	0484-62-1111
稲 永 清 敏	九州歯科大学生理	093-582-1131
亀 井 勉	(財・特)難病研究所	0853-22-9343
川原田 淳	富山大学工学部電子情報工学科	0764-41-1271 (2742)
中 村 夫左央	大阪市立大学医学部第一生理	06-645-2016
濱 川 典 章	日本たばこ産業(株)医薬総合研究所	0726-81-9700 (2629)
松 山 清 治	生理学研究所	0564-55-7772
山 下 孝	(株)ニコインステックバイオメディカル部	03-5802-0218

PROFILE

「生理学者群像」

彼 末 一 之 君

大阪大学医学部教授
(保健学科・基礎生体情報学講座)
平成 6 年 4 月 1 日就任



① 現在までの研究

もともと工学部で制御工学を専攻していたが、好きなスポーツを通して生体機能の素晴らしさに興味を持ち、結局生理学の道に入った。1979年に故中山昭雄教授の教室で体温調節の解析を始め、現在もそれを中心に研究を行なっている。体温は多くの効果器を動員して調節されるが、それぞれの効果器の調節を司る視床下部のニューロンは別々でしかも独立に働いていることをこれまでの解析から明らかにした。また田中英登(現横浜国立大)、藤原素子(大阪大学第二生理)等の協同研究者と運動時の体温調節の解析を行なってきた。そして運動時には発熱と同様に脳内でプロスタグランジンが合成され、体温が安静時よりも高いレベルで調節されることを明らかにした。

② これからの研究

個々の element が多数集まった時に elements の性質だけでは演繹出来ない新しい性質が生まれてくる。これが system である。その代表である生体、特にホメオスタシス維持の system は、見れば見るほどうまく出来ていると感心する。そのような意味で system physiology に幾ばくかの貢献が出来ればと思う。そこでこれからも生体なるべく大きな視点で捕らえ、特に個体レベルで起こる現象の解析を進めたい。しかし、system の解析には一段細かいレベルつまり elements の性質の知見は不可欠である。残念ながら体温調節について言えば、elements つまり神経回路、液性因子の動態等に関する知見が他の調節系のそれに比べて著しく不足している。そこで先ず体温調節に関係する神経回路網を明らかにすることを目標に研究を進めたい。

視床下部は種々の自律神経系、内分泌系が複雑に絡み合うホメオスタシス維持機構の中心に位置する。体

温調節に重要な視床前野に限っても循環、飲水、生殖、覚醒・睡眠等多くの機能が混在している。その中で自律性の体温調節は系統発生的には新しい機能である。ほ乳類、鳥類の恒温性がどのように進化してきたか、特にそのための神経機構が変温動物のそれとどのように異なるかを比較生理学的に検討したい。

③ 生理学教育への抱負

自明のことであるが科学の原点は注目する現象の因果関係を明らかにすることであり、科学をする喜びもそこにあると信ずる。特に生理学は“生きること”の“理(logic)”を追求する学問のはずである。しかし現在の学生は修得しなければならぬ事項があまりにも多いために、現象間の因果関係をゆっくりと理解しようとする努力を放棄しているように見える。理料系の、つまり論理的な思考に優秀な素質を持って入学する学生が、数年すると断片的な知識をひたすら覚えるメモリーマシンに変身してしまうのは残念である。何とか考える習慣を学生に身に付けさせてやりたい。しかしこれが“言うは易く”であることは日々実感している。例えば、講義も単に教えるのではなく、デモンストレーションを取り入れたり、学生を指名して質問に答えさせるといったことを行なっているが、知識の résumé だけあれば良い一部の学生には甚だ不評である。

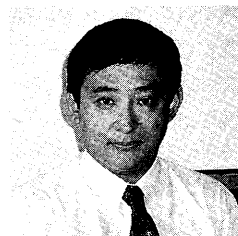
この壁を打ち破る一つ的手段としてコンピューターのシミュレーションソフトを夢見ている。例えば呼吸・循環・体液等を適切に管理しないとコンピュータ上の患者が死んでしまうといったものである。生理学の知識を総動員してこの患者をベッドから起き上がらせたら講義は聞かなくとも合格、死なせてしまったら落第、とすれば今の学生は喜んで生理学の勉強をするのでは、と目論んでいるが…。

「生理学者群像」

河 谷 正 仁 君

秋田大学医学部教授(第二生理学教室)

平成6年3月16日就任



自律神経による骨盤臓器の運動ならびに知覚伝達機構の神経伝達物質及び修飾物質と、それぞれの伝達路における興奮機構について検討しております。膀胱直腸ならびに生殖器は副交感神経性興奮と交感神経性の修飾機構を軸にコントロールされますが、交感神経は自律神経節や臓器でいくつもの受容体を介してそれぞれに興奮性にも抑制性(弛緩)にも作用しています。また、肛門及び尿道の括約筋には体性神経性の興奮性入力があり、前述の自律神経との統合機能を脊髄や脳幹の中樞が行っています。末梢自律神経ではアセチルコリン、ノルアドナリン以外の伝達物質も大切に、自律神経節には多くの神経ペプチドが存在しています。最近では陰茎勃起の伝達物質として一酸化窒素の重要性が明らかとなりつつあります。

この臓器の知覚路は臓器の拡張により活性化し、いわゆる排尿・排便の反射を誘発します。脊髄における知覚終末は後角表層に限局する特殊性があり、これから発展して痛覚との関係について検討しております。また知覚に関して臓器受容器、神経伝達物質及び、慣性的知覚入力によっておこる神経回路網の可塑性の可能性についても明らかにしました。特に一次求心性伝達物質ならびにその終末部位について、また臓器内受容器の興奮機構について今後も分子生物学的手法を含

めて検討を続けたいと考えております。

昭和大学卒業直後より、米国ピッツバーグ大学 de Groat 教授の指導でこれらの研究を開始し、継続して共同研究を行っています。現在では英国リーズ大学 Morrison 教授、豪国クイーズランド大学 Keast 講師とも国際的交流を通してそれぞれの手法で取り組んだ類似課題の結果を検討しております。研究内容の向上は当然の目的ですが、学部学生、大学院等の人材が交流を通じ国際感覚を身につけ、研究者として独立する一助となればと考えております。またこれら長期的国際共同研究により地域的差異をなくし日本の神経科学の研究が、より多く世界へ紹介する機会を持てればと期待しております。

生理学の教育は最新の知識の紹介とともに、臨床に役立つ生体の基本機構の理解を目標にしていきたいと思っています。前者は急速に発展している分子生物学を含めてのイオンチャンネルや興奮伝達機構の詳細と、また後者は医師として臨床現場で患者の訴えがどの機構異常によるものかを判断する基礎と考えています。限られたチャンスの中で学生たちに興味をもって前向きに取り組んでもらえる教育を志したいと思っています。

「生理学者群像」

松 田 博 子 君

関西医科大学教授(第一生理学教室)

平成6年2月1日就任



大学卒業後、数年間、循環器内科の臨床に携わった後、昭和56年に生理学研究所の故入澤宏先生のグループに加わりました。以来、心筋の膜電流、イオンチャ

ンネルについて研究してきました。研究の中心課題は、心筋内向き整流Kチャンネルの整流発現機序です。単一チャンネル電流記録により、電流-電圧関係は本来

直線であり、チャンネル固有の電位依存性開閉機構と、生理的に細胞内に存在する陽イオン(とくに、Mg イオン)による外向き電流のブロックにより、内向き整流特性が生じることを明らかにしました。

今までは、専ら、電気生理学的手法によりイオンチャンネルの機能を調べてきましたが、新任地では生化学者の協力が得られるので、分子生理学的手法を取り入れ、電気生理実験が示唆するチャンネルの構造を、分子レベルで裏付けてゆくことをめざしています。また、今までの研究は、生理的なチャンネルのイオン透過機構が主でしたが、出発点に戻って、疾患とイオンチャ

ネル、あるいは膜輸送との関わりについても、検討してゆくつもりです。

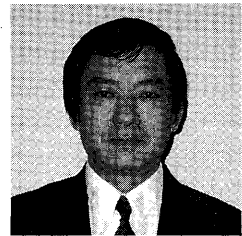
正常な生体機能の理解は、薬理学や病理学を学ぶ際にも、また臨床医学で各疾患の症候論を学ぶ際にも非常に重要であり、生理学は、解剖学や生化学とともに、基礎医学の根幹をなしていると言えます。学生に幅広い知識を与えることも必要ですが、生理学は元来理解する学問ですから、講義や実習では、鍵になる基本的な概念を理解させうえて、考えさせる過程を重視して行きたいと考えています。

「生理学者群像」

山 本 哲 朗 君

三重大学医学部教授(第二生理学教室)

平成5年10月1日就任



① 現在の研究内容

運動制御に関わる中枢神経系(視床、大脳皮質)の構成細胞の細胞内記録及び染色法による反応性と形態学的特徴の分析を行っている。とりわけ、小脳-視床-大脳皮質投射は、系統発生学的差異が大きく、齧歯類からネコ、サルにいたる系統発生学的進化により、視床-大脳皮質投射の投射様式が変化して来るようであり、この変化による皮質構成細胞の応答特性の解析を行ってきた。

また、新任地の三重大学ではこれまで、脳幹反射のニューロン回路の解析を、顔面神経核を中心とする、脳幹運動諸核で細胞内記録法により解析してきているので、こちらのテーマについても今後の研究の拡大を考えている。

② 将来の研究活動の抱負

これまで、システムとしての解析を行ってきたわけだが、反応特性や形態学的特徴を同定した皮質構成細胞のより詳細な解析を行うために、IN VITRO 系での実験手法を積極的に導入して、IN VIVO と画面から、中枢神経系の network としての情報処理機構の解析に取り組んでゆきたいと考えている。また一歩踏

み込んで、細胞内情報伝達系の解析にも今後取り組みたいと考えている。

③ 生理学教育に対する意見

生理学教育の一番重要な点は、医学部学生の多くが臨床医を目指している現状を考えると、基本的には臨床医学を学ぶ上での基本となる生命現象の仕組みを解説し、理解させることにあると考えている。ただその際に、単に知識の詰め込みではなく、生命現象の理解を通して、生命科学一般に対する好奇心を植え付けることが出来ればと考えている。このような好奇心の持続は、将来臨床医学に進んでも非常に重要であると考えている。また研究室はできるだけオープンにし、基礎医学研究の必要性を感じたときに、研究室へ出入りできるような環境を作ればとも考えている。現在基礎医学研究の後継者として医学部出身者の不足が問題となっているが、三重大学では、学部学生の研究室研修などにより研究活動に対する early exposure を行っており、このような在学中の経験に加え、大学院教育を充実させることにより、少しでも基礎医学への後継者が増えるように努力してゆきたい。

TRENDS

Thermal Physiology・サテライト・シンポジウム (Aberdeen)にみる体温調節研究の動向

長崎大学熱帯医学研究所環境医学部門

小坂 光 男

1993年8月のGlasgowの第32回国際生理学会およびAberdeenにおけるThermal Physiologyサテライト・シンポジウムの参加報告を依頼されてすでに半年以上も経っているので、今さらの感もあるが、日生誌、金子章道編集委員長と約束した事でもあるので、お詫びの意味もこめて茲に遅ればせながら投稿させていだいた。来春四月、名古屋における日本生理学会総会、同・日英合同シンポジウムの体温調節セッションに英国側代表者の一人としてA. S. Milton教授の来日が決まった事は日本の体温調節研究者にとっても大変喜ばしい。この機会にMilton教授編集になる1994年発刊のTemperature Regulation—Recent Physiological and Pharmacological Advances—を紹介し、最近の体温調節研究分野の世界の研究動向を知る上での参考に資したい。

(1) IUPSにおける体温調節関連シンポジウム：1993年8月1～6日Glasgow大学を中心として開催された体温調節関連のシンポジウムは数個あったが、シンポジスト全員が体温調節研究家で占められていたのはManchester大学のRothwell教授の企画立案による“Fever as a Neuroimmunological Endocrine Phenomenon—IUPS Symposium Glasgow 1993—”であり、大会5日目Glasgow大学のメイン・キャンパスの講堂で9⁴⁵～17¹⁵まで全日開催され盛会であった。以下3つのセッションよりなる、プログラムを再掲載する。

Thursday August 5th, 1993

I First Session

1. Professor Matt Kluger, University of Michigan, USA
“The role of cytokines, glucocorticoids and peptides in fever”
2. Professor Clark Blatteis, Dept. of Physiology & Biophysics, Memphis, USA
“Central modulation of the febrile response”
3. Professor Flavio Coceani, Division of Neurosci-

ences, The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada

“Pyrogen-prostaglandin coupling in the pathogenesis of fever”

4. Dr. John Stitt, John B Pierce Foundation Lab. Inc., New Haven, Connecticut, USA
“Is the pathogenesis of fever caused by an intracerebral or an extracerebral action of interleukins?”
5. Dr. Nancy Rothwell, Physiological Sciences, University of Manchester, UK
“Mechanisms of action of cytokines on fever and thermogenesis”

II Second Session

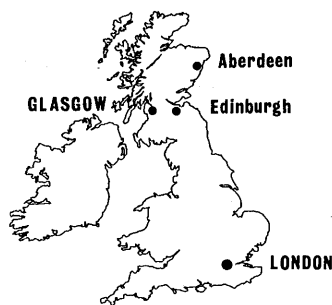
6. K. Voigt, M. C. Hirsch, H. A. Braun, Dept. of Physiology, University of Marburg, Germany
“Comparison of stationary and phasic temperature responses of hypothalamic neurons in brain slice preparation of the rat”.
7. A. C. E. Linthorst, C. Flachskamm, P. Mullerpreuss, F. Holsboer, J. M. H. M. Reul, Clinical Institute, Dept of Neuroendocrinology, Max Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany
“Peripheral administration of lipopolysaccharide enhances raphe-hippocampal serotonergic activity: an in vivo microdialysis study”.
8. A. V. Turnbull, N. J. Rothwell, Dept of Physiological Sciences, University of Manchester, UK
“The effects of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) on systemic responses to inflammation”.
9. A. Cooper, S. Brouwer, S. Hopkins, G. N. Luheshi, A. V. Turnbull, N. J. Rothwell, North Western Injury Research Centre, University of Manchester, UK
“Involvement of tumour necrosis factor α (TNF α) in fever induced by intramuscular turpentine abscess in the rat”.
10. J. Kaplanski, L. Abramovich, V. Fraifeld, D. Shemi, Dept of Clinical Pharmacology, Ben Gurion University of the Negev Beer Sheva, Israel

"Effects of lipopolysaccharides on body temperature and hypothalamic prostaglandins in mice".

III Third Session

11. M. Kosaka, J. M. Lee, T. Matsumoto, K. Tsuchiya, N. Ohwatari, Dept of Environmental Physiology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University, Japan
"The role of heat shock proteins (HSPs) and interleukin-1 interaction in lowering of fever".
12. M. Szekely, Z. Szelenyi, Dept of Pathophysiology, University Medical School Pecs Szigeti, Hungary
"The role of Type-A and Type-B cholecystokinin receptors in the thermoregulatory responses of rats to CCK 8".
13. A. A. Romanovsky, E. K. Karman, V. N. Gourine, Institute of Physiology, Minsk, Belarus
"Does peripheral arginine vasopressin (AVP) play a role in fever?"
14. I. Komaromi, T. Malkinson, W. L. Veale, Q. J. Pittman, G. Rosenbaum, K. E. Cooper, Dept of Pathophysiology, University Medical School Pecs Szigeti, Hungary
"The effect of cortical spreading depression on fever in rats".

- (2) AberdeenにおけるThermal Physiologyサテライト・シンポジウム



はAberdeen大学の学生寮と講義棟を利用して開催され8月9日～13日まで参加者全員が寝食を共にし、夜

ト・シンポジウム：Scotlandの首都Edinburghの北に位置するAberdeenは北海油田の中心の町、海岸線には船影の動きが頻繁であった。同上シンポジウム

の更けるのも忘れて世界中の体温調節研究者が意見交換が出来、まことに有意義な一週間であった。お世話いただいたA. S. Milton教授および教室員各位に衷心より御礼を申し上げる。総勢250名の大シンポジウムであった。演題149, 内oral 70, poster 79, 日本人演題数は25, 内oral 11, poster 14で約15%を占めている。因みに日本からは、永坂、小川、森本、彼末、登倉、八幡、紫藤、古山、土屋、大渡、小坂ら、約40名の出席があった。

(3) Temperature Regulation ed. by A. S. Milton : 上記のThermal Physiologyのサテライト・シンポジウムで発表された149 papersの内、47 papersと別途、追加10 papersがA. S. Milton教授によって再編集され総数57 papers, 376ページの単行本としてスイスのBirkhäuser出版から1994年刊行されている。内容と体温調節研究分野の動向が簡潔に記載されているA. S. Milton教授の編集後記を英文のままで直接掲載したので参考に資していただきたい。

Temperature Regulation : - Recent Physiological and Pharmacological Advances Edited by A. S. Milton - (以下、A. S. Milton教授の編集後記)

Temperature regulation has witnessed many important developments in recent years. Body temperature is regulated by many internal and external influences. These include physiological and biochemical processes, climate, clothing, exercise, hibernation, diseases and pharmacological agents. This volume provides reviews of the latest research results and emerging themes in the field. Aspects discussed include fever, acute-phase immune response, cytokines, thermoregulatory peptides, neurophysiology, the neonate, mechanisms of heat production, the role of brown adipose tissue, and ecological and behavioural thermoregulation. All research workers in the field of body temperature regulation, such as pharmacologists, physiologists, biochemists and biologists, will find this volume a valuable source of up-to-date information.

シリーズ「パッチクランプ実験技術法講座」

ホールセル記録法と穿孔パッチ法

八 尾 寛

(京都大学医学部生理学教室)

ホールセル記録法

Hamill らにより1981年に報告されたパッチ電極法の改良⁴⁹⁾は、画期的な内容を含んでおり、多くの生理学研究者の注目を集めた。すなわち、パッチ電極を細胞の表面に当ててシールさせた後、陰圧を加えることにより、電極直下の膜を破り、電極内の電解質液と細胞内液を交通させる。このホールセル記録法は、パッチ電極法がチャネルの生物物理学的研究のみならず、細胞生理学的研究にも応用できることを示唆していた。この論文で示された可能性の一つは、従来のガラス管微小電極法では困難であるとされていた小細胞の膜電位・膜電流の測定である。これにより、イオンチャネルが細胞においてどのように機能しているのかが明らかにされる。前稿で述べられた単一チャネル(ミクロ)記録は、マクロの電流記録と対応させることにより、はじめてその生理的意義が明らかにされる。第二に、細胞内液を人工的な溶液で灌流することが可能になった。細胞内灌流法は、カタツムリの神経節細胞などの巨大な細胞で、すでに試みられていたが、非常に高度の技術が必要とする研究法であった^{21), 70), 77), 127)}。see review²⁰⁾。細胞内液を実験的に操作することにより、細胞内情報伝達機序を解析することが可能になった。事実、Hamill らの論文から15年間にホールセル記録法を用いて細胞生理学的研究は飛躍的に進展した。多くの種類の細胞において、細胞機能と膜電位の間に密接な連関が認められている^{56), 98)}。ホールセルパッチ法の第三の可能性は、1982年 Neher と Marty の発表した細胞膜容量測定である⁹⁶⁾(丸山の稿参照)。これにより、エクソサイトーシス、エンドサイ

トーシスなどの重要な細胞機能を測定する道が開かれた。ホールセルパッチ法の応用は現在も拡大しつつある。ホールセル記録下にある細胞をバイオセンサーとして用いる試みは、この手法の工学的応用の可能性をはらんでいる。また、単一細胞の mRNA をホールセルパッチ法により採取する方法は、生体細胞の空間的・時間的多様性を解析し、多様性発現の機序を明らかにする道を開くものである。

(1) 基本的な実験手技

ホールセルパッチ法の実験手技に関しては、すでに他書に詳しい⁹⁰⁾。List 社や Axon 社から発行されているパッチクランプ増幅器のマニュアルには、基本的な原理から手法まで詳しく説明されている¹¹⁵⁾。本稿では、実用的な側面に限定してこれを簡潔に説明したい。

標本作成

パッチ電極法が開発された当初は、単離された細胞や培養細胞(継代培養ならびに初代培養)にその適用が限られていた。これは次の2つの理由に基づいている。(1) パッチ電極を細胞表面に当てる際に顕微鏡下に細胞および電極先端を直視する必要がある。(2) 通常の組織においては細胞間隙にコラーゲン繊維などの結合組織が存在している。このような結合組織を除去しなければ、パッチ電極と細胞膜の間に抵抗の大きなシールを形成することができない。逆にいえばこの2条件を満たしてさえいれば、いかなる標本にもパッチ電極法が適用できる。このため、組織のスライス標本³⁴⁾(高橋・真鍋の稿参照)や自律神経節細胞¹³⁴⁾など細胞構築を維持した状態でパッチ電極法が適用されるようになった。

た。場合によっては条件(1)は不可欠ではない。脳の海馬などの様に同質の細胞がクラスターを形成している組織においては、電極抵抗をモニターしながら組織内に電極を挿入し、抵抗の高いシールを形成することができる。その際、個々の細胞を直視する必要がない(ブラインドパッチ法、高橋・真鍋の稿参照)^{13), 24), 87)}。すなわち、工夫次第でほとんどあらゆる細胞、組織に対しパッチ電極法が適用できるだろう。たとえば、自律神経節の細胞に対しては、生きた動物の *in situ* 標本に対してもパッチ電極法を適用することが不可能ではない^{104), 105)} が、必要がないので試みられていないだけである。

顕微鏡

どのような顕微鏡を用いるかは、標本による。ブラインドパッチ法の場合は解剖用実体顕微鏡が最適である。単層の細胞標本に対しては、位相差顕微鏡が使用できる。ノマルスキー微分干渉顕微鏡を用いれば細胞表面を明瞭に観察することができる。スライス標本には通常、正立型ノマルスキー微分干渉顕微鏡が用いられる。自律神経節に対しては、斜光照明や反射照明を利用すれば、普通の正立型顕微鏡下に個々の細胞を同定することができる^{104), 134)}。数層の組織からなる標本には、正立型の顕微鏡を用いるのが合理的である。これは、パッチ電極を近づける細胞が、その組織の最上層の細胞であることが多いからである。赤外線テレビカメラを装着した顕微鏡の場合には、厚い組織の内部の構造を捉え、これにパッチ電極を当てることができる¹²¹⁾。

電気生理学的手法の一般的注意として、電源に由来するハムノイズを除去しなければならない。これには、顕微鏡本体をアースするのが最も有効である。ハムがランプに由来しているときは、測定時にランプを消すのが最も簡単な方法である。ランプの電源を直流にするのも良い方法である。この際、高価な直流安定化電源は必ずしも必要ではない。直流のプラス極かマイナス極のどちらか一方をアースすることによ

り、直流に混入するハムをのぞくことができる。正立型顕微鏡で水浸対物レンズを使用するとき、これが絶縁されていないとハム発生源になることがある。著者らのラボでは、水浸対物レンズと顕微鏡本体の間に絶縁器具を装着している。

電極作成

ホールセル記録に用いる電極は、単一チャンネル測定の場合とはほぼ同様である。しかし、ホールセル記録の場合、測定電流が単一チャンネル電流に比べ、一般に大きい。また、測定対象となる膜の面積が大きくなるので、これに由来するノイズレベルが高くなる。このため、パッチ電極と溶液の間の浮遊容量(stray capacitance)由来のノイズが比較的問題にならないことが多い。このため、肉厚の薄い電極を用いても、場合により、先端までシルガードコーティングをする必要がない。ただし、ある程度浮遊容量を小さくしておかないと後述の容量補正が効かない。著者は、肉厚の薄い電極の先端約1mmを残して溶液と接する部分をシルガードコーティングしたものを用いている。しかし、測定対象になる電流が微小なときは単一チャンネル記録と同様の注意が必要になろう。要は、常に S/N 比を考慮にいれて最適の条件で実験することである。

図1 A, Bはホールセル記録の等価回路を示したものである。電位固定に際して、フィードバックが有効なのは、パッチ電極内液までである(図1 A)。電極内の電位を V_p 、細胞内電位を V_c とすると、定常状態において、

$$V_c = \frac{R_m V_p - R_s E_m}{R_m - R_s} \quad (1)$$

の関係が成り立つ。ここで E_m , R_m は、細胞の静止膜電位ならびに細胞の膜抵抗、 R_s は電極と細胞の間のアクセス抵抗である。膜の比抵抗が一定であるとする R_m は細胞の表面積に反比例する。すなわち、小細胞の膜電位は制御し易いが、大きな細胞の膜電位を制御するためには R_s が大きすぎてはならない。また、膜電

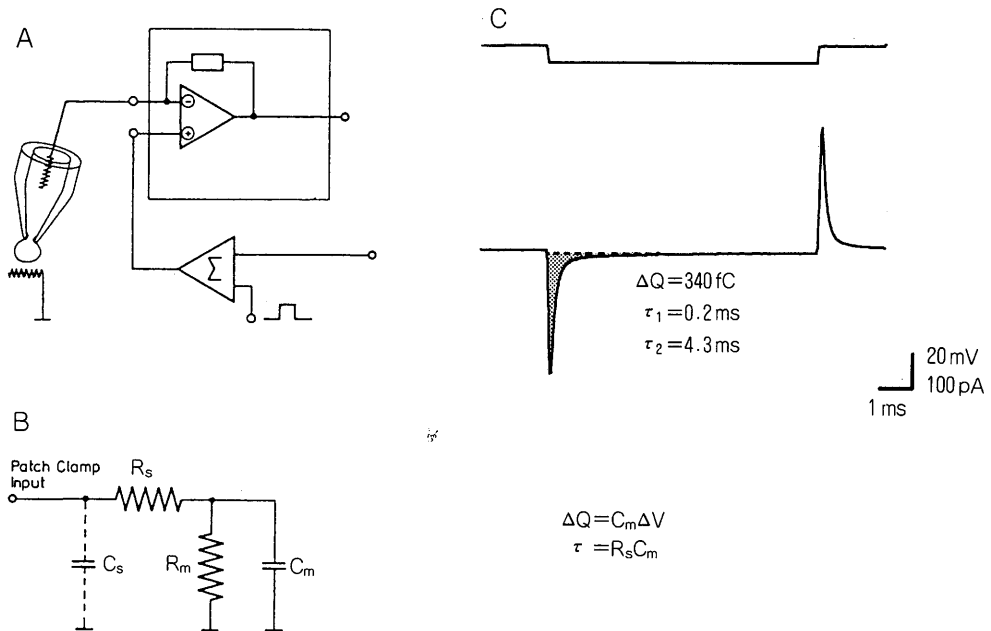


図1. ホールセルパッチ測定法

A. 測定装置の概要. B. ホールセルパッチ状態の等価回路. R_s : パッチ電極のアクセス抵抗, R_m : 細胞膜抵抗, C_m : 細胞膜容量, C_s : 浮遊容量. C. 過分極パルス通電(上段, 大きさ $\Delta V = 10 \text{ mV}$) に応答するホールセル容量性電流(下段). 保持電位 -60 mV . ハッチの面積 ΔQ より, 細胞の全膜容量 $C_m = 34 \text{ pF}$ が算出される. 本例では, 容量性電流の下降相は2つの指数関数の和で最適回帰した. 2コンパートメントモデル⁸³⁾に基づいて, それぞれの時定数 $\tau_1 = 0.2 \text{ ms}$, $\tau_2 = 4.3 \text{ ms}$ から, $C_1 = 16 \text{ pF}$, $C_2 = 14 \text{ pF}$ が得られる. R_s はアクセス抵抗で, この時 $13 \text{ M}\Omega$. (AおよびB, 文献96より加筆変更)

位を変化させると膜の比抵抗も変化する. たとえば, 膜電位が0付近から正電位になると K^+ チャネルなどのイオンチャネルが活性化され比抵抗が減少する. この時, 膜電位を制御するためには R_s が充分小さくなければならない. 電位固定実験において, 測定電流が大きいときは, 膜電位の制御が行われているかを再検討することが望ましい⁸⁾.

アクセス抵抗 R_s は, おもにパッチ電極の形状に依存している. 電極の先端部が円錐であると仮定するとパッチ電極抵抗 R_p は次の式で表される.

$$R_p = \frac{\rho l}{\pi r_s^2} + \frac{\rho \cot(\phi/2)}{\pi} \left(\frac{1}{r_t} - \frac{1}{r_s} \right) \quad (2)$$

ここで r_s , r_t は, それぞれ, ガラス管の基部(長さ l) および先端の内径を, ϕ は先端角の大き

さである. ρ は, 内液の比抵抗で, 150 mM KCl (at 25°C) の場合 $51 \Omega \text{ cm}$ である. すなわち, 先端径の大きいほど, また, 先端角の大きいほど R_p が小さくなる. 一般に R_s はパッチ電極抵抗 R_p の2~5倍になる. これは, ホールセル状態においては, 電極の先端部に細胞膜, 細胞内構造物などが進入しているためである.

電極先端のポリッシングは, 高抵抗シールを形成するのに必ずしも必要ではない. しかし, 著者の経験では, ポリッシングを少しでも行った法が, ホールセル状態を長時間維持し易い傾向がある. ポリッシングをしない電極では, ホールセル測定中に膜のリーク電流が徐々に大きくなり, ついには膜電位が制御不能になることが多い.

電極内液

電極内液は、実験の目的に応じて様々なものを用いることができる。電極内液の基本的な出発点は、等張の KCl 液である。細胞内の生理的条件下では、pH は、7 付近、 Ca^{2+} 濃度は、約 10~100 nM (pCa 7~8) である。HEPES などの pH バッファ、EGTA などの Ca^{2+} キレートによりこれを調節する(表 1)。また、細胞内の陰イオンにおいて、膜非透過性のものの占める割合は大きい。この意味において、 Cl^- を非透過性の陰イオン、 SO_4^{2-} 、methansulfonate、gluconate、glutamate、aspartate で置換した内液の方がより生理的状态に近い。これらの陰イオンを用いると、KCl 溶液に比べ liquid junctional potential が大きくなる。Liquid junctional potential の補正については他書を参照されたい^{(38), (94)}。また、有機の酸が陰イオンの時は、pH や温度に解離状態が依存しているため、浸透圧が問題になるときは、これを実際に測定して補正することが望ましい。微生物が繁殖し易いことにも留意すべきである。具体的には、小分けして -20°C に冷凍保存するのがよい。反対に、陽イオンを膜非透過性の有機塩基、tetraethylammonium、N-methyl-D-glucamine などに置換することもしばしば行われる。有機塩基を用いることにより、イオンチャネルの膜電位依存性が負電位側にシフトする可能性を考慮にいれる必要がある⁽⁸⁶⁾。これは、形質膜細胞質側の表面電位が変化することがその一因であると考えられる。

Ca^{2+} 依存性のイオンチャネル電流を測定したり、開口分泌などの細胞内 Ca^{2+} により制御される細胞機能を取り扱うとき、また、細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定を試みる場合は、 Ca^{2+} キレータの濃度を低くする必要がある。 Ca^{2+} キレータの濃度が高いと遊離 Ca^{2+} 濃度が低い値に固定されるため Ca^{2+} に依存した現象が充分認められない。表 1 に細胞内 Ca^{2+} 測定に用いられる溶液組成を一例として挙げた。反対に、 Ca^{2+} 依存性の現象、たとえば Ca^{2+} チャネルの Ca^{2+} 依存性不活性化などをできる限り除去する必要がある場合がある。このような場合は、EGTA の代わりに BAPTA などの Ca^{2+} 結合速度の速いキレータが用いられる。表 1 に Ca^{2+} 電流測定に用いられる溶液組成を挙げた。この溶液では、 K^+ を Cs^+ で置換している。これは、細胞内の Cs^+ により K^+ チャネルをブロックし、 Ca^{2+} 電流を単離して測定することを目的としている。

ホールセル記録の問題点の一つに細胞機能の rundown がある。これは、細胞内液が電極内液に置換されるため、細胞機能の維持に必要な可溶性成分が失われる (washout) ためである。既知のものは電極内液に適量補うことにより rundown を防ぐことが試みられている。たとえば、 Ca^{2+} 電流の rundown は、電極内液に ATP を補うことによりその速度を減少させることができる。これは、 Ca^{2+} チャネルにはリン酸化部位があり、リン酸化されていることが機能維持に必要であることにより説明される。

表 1. ホールセル電極内液の組成 (単位, mM)

基 本 組 成	KCl 140, MgCl_2 1, CaCl_2 1, EGTA 10, Mg-ATP 2, NaOH-HEPES 10, pH 7.3	文献34
Ca^{2+} 測 光 用	Cs-glutamate 125, TEA-glutamate 20, MgSO_4 2, $\text{K}_5\text{fura-2}$ 0.1, Na_4ATP 2, HEPES 10, pH 7.0	文献129
Ca^{2+} 電流測定用	CsCl 140, NaOH 10, MgCl_2 1, BAPTA 5, Mg-ATP 5, GTP 0.3, CsOH-HEPES 20, pH 7.4	文献136
ATP-regenerating system	creatine phosphokinase 50U/ml, Na_2 creatine-phosphate 20, Mg-ATP 5, GTP 0.04 を適当な内液に追加する。	文献40

ATP 濃度が減少すると脱リン酸化の方に平衡がシフトする。しかし、ATP を補うだけでは、チャネル近傍の ADP 濃度が結果的に上昇し、これも脱リン酸化を促進する。これを防ぐには ATP-regenerating system が用いられる⁴⁰⁾ (表 1)。受容体の情報伝達に G タンパク質が関与している系がある。このような受容体の機能を維持するためには電極内液に 0.1~0.3 mM の GTP を補う必要がある。

細胞内情報伝達系を解析する目的で、様々な内因性ならびに外因性の物質を電極内液に存在させることが試みられている。たとえば、A-キナーゼ、C-キナーゼやプロテアーゼなどの酵素、フォスファターゼインヒビターやカルモジュリンなどの細胞内因子、cAMP や IP₃ などの二次メッセンジャー、あるいは、これらを抑制する薬物、選択的毒素を細胞内に投与することができる。このような薬物の中には、それ自身は活性を持たないが強い光を当てて分解されることにより生理活性を示すケージ化合物と呼ばれる一群のものがある(野間の稿参照)。細胞機能に関与すると予想される因子に対する抗体や競合性ペプチドフラグメントを細胞内に導入することにより、機能を担っている分子を同定することが試みられている。また、Ca²⁺ 感受性色素、pH 感受性色素などを導入することにより細胞の機能を、Lucifer yellow などの蛍光色素を導入することにより細胞の形態を研究することができる。ホールセル状態を維持しながら電極内液を置き換えることができる(細胞内灌流法)。これにより、細胞内因子の定性的ならびに定量的解析が可能になる。細胞内灌流法については堀江の稿で詳述する。

ホールセル作成ならびに測定法

通常パッチ電極に陽圧を加えながら電極の先端を細胞表面に近づける。この時、0 mV に電位固定して、1 mV、10~20 ms の脱分極あるいは過分極パルスを連続的に加え、そのときの電流をモニターする。電極が細胞表面に到達するとパルスに応答する電流が減少することが認

められる。ここで、電極内圧を陽圧から弱い陰圧に切り替えることにより、さらに電流が減少する。すなわち、電極と細胞膜の間に抵抗の高いシールが形成される。固定電位を負電位側に移動させることによりシールの形成が促進される。細胞の静止膜電位近傍に固定電位を合わせたときに流れる電流がほぼ 0 になれば、パルス幅を大きく(たとえば 10 mV)し、電流測定のゲインを上げて、シール抵抗を測定する。いわゆるタイトシールが形成されるとシール抵抗の大きさは 10 G Ω 以上になる(gigaseal)。すなわち、10 mV のステップパルスに応答して、1 pA 以下の電流が流れる。この時、単一チャネル電流が認められることがあり、これが単に電極が詰まっただけなのか、きれいなタイトシールが形成されたかを判断する良い指標になる。パルスの立ち上がり立ち下がりに同期して、一過性の電流が認められる。これは、浮遊容量性電流である。これを補正して、ほぼ 0 にする。

次いで、電極内に大きな陰圧を与えてパッチ下膜を破壊する。あるいは、持続の短い大きなパルス(例えば、大きさ $\pm 0.5 \sim 5$ V、持続時間 2~20 ms)を単発与えることによりパッチ下膜を破壊する方法(Zap 法)がある。パッチ下膜が破壊されると同時に、10 mV のステップパルスの立ち上がり立ち下がりに大きな一過性の電流が生じる(図 1 C)。これは、細胞膜に由来する容量性電流である。この容量性電流を解析することにより、細胞の膜容量 C_m 、膜抵抗 R_m 、電極と細胞のアクセス抵抗 R_s などを求めることができる(図 1 C)。容量性電流を補正して、これをできる限り小さくする。等価回路が図 1 B のモデルで表されるときは、容量性電流を原理的に 0 にすることができる。また、この時の補正值からも、 C_m と R_s を求めることができる。しかし、このような場合は実際には希で、ほぼ球形の小細胞に限られる。神経細胞のように突起を有する細胞では、細胞質の抵抗が問題になり、補正が効くのは、パッチ電極の近傍に限られる。この時の補正值は、すなわち、有効な電位固定が行われる領域の膜容量を示してい

る。このような細胞の C_m , R_m , R_s などは、細胞と電氣的に等価なモデルに基づく式を当てはめることにより求められる^{(64), (65), (83), (85)}。

ホールセル記録には、電流固定モードと電位固定モードがある。前者においては、一定あるいは実験的に変化させた電流を与えて、それに応答する膜電位を測定することができる。たとえば、電流 0 に固定したときは、細胞の自然な応答(静止膜電位、自発性膜電位振動、自発性活動電位など)を測定することができる。電位固定で解析したイオン電流が膜電位の形成にどのように寄与しているかを明らかにする上で電流固定実験は重要である。

電位固定実験においては、測定しようとする電流の大きさおよび変化の速さが問題になる。膜を横切って電流が流れるときに膜電位を一定に保つためには、測定システムのフィードバックが充分速くなければならない。たとえば神経細胞においては、脱分極電位に応答して速い時間経過のナトリウム電流が流れるが、フィードバック速度が遅いと正電荷が細胞内に蓄積し、さらに膜電位が脱分極側にシフトする。この結果さらに大きなナトリウム電流が流れ、神経細胞は活動電位を発生する。測定システムのフィードバックの速さは次式で与えられる。

$$\tau = [R_s' R_m / (R_s' + R_m)] C_m \quad (3)$$

ただし、 $R_s' = R_s (1 - f)$ (f はフィードバック補正值)である。一般に $R_m \gg R_s'$ なので、 τ はほぼ $R_s' C_m$ に等しい。すなわち、アクセス抵抗が小さいほど、また、細胞の表面積が小さいほど、電位固定が成立し易い。また、電流の大きさを減少させることにより、良い電位固定が得られる。例えば、 Na^+ 電流の場合は、外液の Na^+ 濃度を下げたり、テトロドトキシン(TTX)で活動性チャネルの数を減少させることにより、膜電位の変化を補正することが可能になる。

ホールセル記録法の応用

(1) イオンチャネルのマクロの性質の解析

一般に、個々のイオンチャネルは閉状態と開状態を二者択一的にとる。この状態の移行はき

わめて速やか(μ 秒オーダー)であり、その中間状態(subconductance state)は、まれに認められるにすぎない。イオンチャネルによっては、複数の開レベルを示すものも知られている^{(16), (30), (50), (51), (66), (117), (128)}。この意味で、イオンチャネルの性質は時間的、空間的に確率的である。すなわち、ある一定時間において、一個のチャネルが開状態にある時間、およびある時刻において、ある種のイオンチャネルの集合のうち開状態にあるものの個数が、そのイオンチャネルを通るイオンの量(すなわち電流)を決定する。このうち後者は、単一チャネルの活動性から直接知ることができず、ホールセル電位固定下にマクロの電流を測定することが有力な手段となる。個々のチャネルが独立に確率的に開閉する(マルコフ過程)と仮定すると、ある一定時間中にチャネルが開状態にある時間の占める割合(開確率 p , ミクロ)と、細胞全体の機能的なチャネル N 個のうち、ある時刻のまわりの微小時間において開状態にあるチャネルの占める割合(マクロ)が等しくなる。すなわち、単一チャネル電流 i とホールセル電流 I の間に次の関係が成立する。

$$I = Npi \quad (4)$$

チャネル活動性の膜電位依存性の解析

チャネルの状態を規定する重要な因子の一つは膜電位である。イオンチャネルの多くは膜電位依存性を示すことが知られている。図 2 は、いろいろなイオンチャネルのホールセル電流の膜電位依存性を示したもので、膜電位を横軸に、電流の大きさを縦軸にとっている(電流-電位曲線、 $I-V$ プロット)。電流が 0 になるときの膜電位は、反転電位あるいは 0 電流電位と呼ばれ、チャネルのイオン選択性およびチャネルの両側のイオン濃度に依存している。たとえば、グルタミン酸 AMPA 受容体チャネルの反転電位は、図 2 A では約 0 mV だが、細胞外の Na^+ 濃度に依存しており、その関係はほぼ Nernst 式に従う。反対に細胞内の K^+ 濃度に対しても Nernst 式に従った関係を示す。しかし、陰

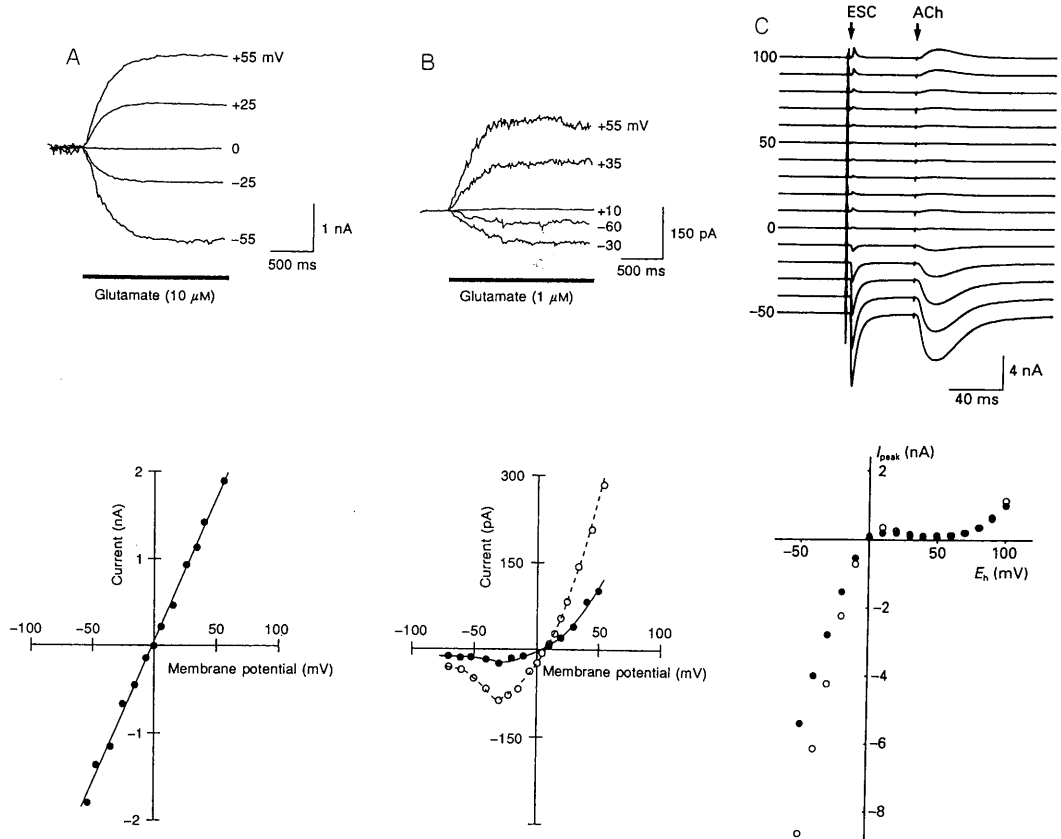


図2. 受容体チャネルホールセル電流の膜電位依存性

各図とも上段は電流のサンプル記録を、下段はピーク応答の電流-電位曲線を示している。A. ラット小脳プルキニュー細胞のグルタミン酸 AMPA 受容体応答。B. ラット小脳顆粒細胞のグルタミン酸 NMDA 受容体電流の外向き整流応答。●, ○は、それぞれ、0.5 および 1 μM のグルタミン酸に対する応答を示している。C. マウス顎下神経節ニューロンのニコチン性アセチルコリン受容体の内向き整流応答。○は節前線維刺激による興奮性シナプス電流 (EPSC) を、●はアセチルコリンのイオン泳動的投与 (ACh) に対する応答を表している。(AおよびB, 文献68; C, 文献134)

イオンの濃度を変えても反転電位に変化が認められない。このような実験から AMPA 受容体チャネルは、アルカリカチオン選択的であるが、カチオン間の選択性が緩やかなチャネル (非選択のカチオンチャネル) であることが知られた。

図2Bに示したグルタミン酸 NMDA 受容体チャネルも非選択的カチオンチャネルであるが、 Ca^{2+} に対する透過性が高いことが知られている。このチャネルの電流-電圧関係は、AMPA 受容体チャネルと異なり、直線的なオームの法則から大きくずれている。マイナス電流

(細胞からみると細胞外から細胞内へ向かう電流, すなわち内向き電流) が -50 mV よりも負の電位 (過分極電位) で著明に抑制される。このような外向き整流特性が NMDA 受容体チャネルの特徴である。これとは反対に自律神経節細胞のニコチン性アセチルコリン受容体チャネル電流は、プラス電流 (外向き電流) が抑制される内向き整流特性を示す (図2C)。

Na^+ チャネル, K^+ チャネル, Ca^{2+} チャネルなどのように膜電位そのものがチャネルの開閉を決定しているものでは、ステップ状のバル

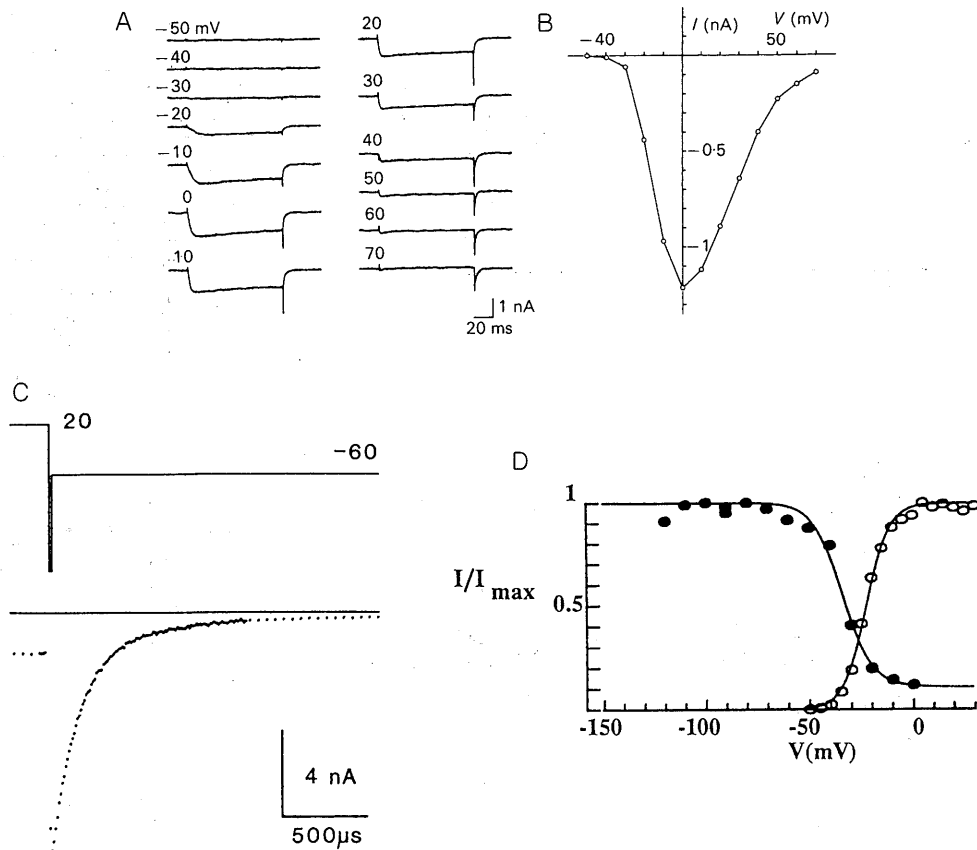


図3. Ca^{2+} チャネル活動性の膜電位依存性

A. チック毛様体神経節杯状シナプス前終末の高電位活性型 Ca^{2+} 電流のサンプル記録。保持電位 -80 mV, 100 ms 脱分極パルスに対する応答。B. 同標本の Ca^{2+} 電流のピーク値の電流-電位曲線。C. チック後根神経節ニューロンの Ca^{2+} テール電流。保持電位 -80 mV, $+20$ mV, 10 ms パルスの後 -60 mV に再分極させる (上段)。再分極に先行して -240 mV のパルスを 15 μ s 与えることにより、細胞膜の放充電を促進し、容量性電流を最小にしている (supercharging 法)¹¹⁵⁾。下段は、 Ca^{2+} 電流応答を示している。D. ラット小脳プルキニエ細胞の高電位活性型 Ca^{2+} 電流の活性化 (○) および不活性化 (●) の膜電位依存性。保持電位 -80 mV, テール電流の大きさを再分極後 0.3 ms から 0.4 ms の平均として求めた値を最大値に対する相対値としてプロットすることにより、活性化の膜電位依存性を求めた。不活性化の膜電位依存性は、保持電位 -90 mV から 2 秒間のプレパルスを与えた後、 -20 mV, 12 ms パルスに対するピーク値を測定した。プレパルスの大きさを変化させ、最大電流値に対する相対値をプロットしている。実線はともに Boltzmann 関係に最適回帰した結果を示している (本文参照)。(A および B, 文献136; C, 文献123; D, 文献109)

スを用いて膜電位依存性が調べられることが多い。図3 Aは Ca^{2+} チャネルホールセル電流の膜電位依存性を検討したものである。図3 Bはその電流-電位関係を示している。

テール電流の解析

電位依存性のチャネルにおいては、膜電位のステップ状の変化にともなって過渡的な電流 (テール電流, tail current) が見られる。図3 Cは Ca^{2+} チャネル電流のテール電流の一例を示したものである。たとえば -80 mV の保持電

位から +20 mV にステップ状に電位を変化させたとき、ホールセル電流は、ほとんど流れない。これは、 Ca^{2+} チャネルの反転電位に近いために駆動電圧が小さいことに起因している。しかし、-60 mV に膜電位を変化させると一過性に大きな電流が流れるのが認められる。これは、駆動電圧が大きくなったために個々のチャネルを大きな電流が流れたことによる。しかし、チャネルそれぞれは、時間とともに確率的に閉じていく。チャネルが n 個の閉状態と 1 つの開状態しか有しないと仮定する。すなわち、

$$C_n \frac{\beta_n}{\alpha_n} \rightleftharpoons C_2 \frac{\beta_2}{\alpha_2} C_1 \frac{\beta_1}{\alpha_1} O \quad (5)$$

ここで開速度常数 $\alpha_1 \sim \alpha_n$ 、閉速度常数 $\beta_1 \sim \beta_n$ は膜電位の関数である。時刻 $t=0$ に膜電位を -20 mV から -60 mV にステップ状に変化させたとすると、-60 mV においては Ca^{2+} チャネルは活性化されないで、一度閉じたチャネルは再び開かない。すなわち $\beta_1 \ll 1$ なので、チャネルの開確率 $p(t)$ は、次の指数関数に従って減衰する。

$$p(t) = p(0)e^{-t/\tau} \quad (6)$$

$$\tau = \frac{1}{\alpha_1} \quad (7)$$

ホールセル電流は、個々のチャネルを流れる電流の総和なので、テール電流の大きさは、指数関数に従って減衰することが予想される(図 5 参照)。 Ca^{2+} チャネルの場合、テール電流の減衰はほぼ指数関数に従い¹²²⁾、その時定数の逆数から -60 mV の時の平均の開速度常数を求めることができる。

図 3 D は、ステップ電位の大きさを変えたときのテール電流の大きさをプロットしたものである。この時、単一チャネル電流の大きさが固定されているので、この関係は、チャネル開確率の膜電位依存性を表している。あてはめた曲線は Boltzmann の関係から求めたものである。すなわち、

$$I = \frac{I_{\max}}{1 + \exp \frac{(V_h - V)}{\beta}} \quad (8)$$

ここで、 V_h は、チャネルの半分が活性化される電位を、 β は傾斜因子と呼ばれる。チャネル分子の構造の変化にともなって、膜の内外に電荷の移動が生ずる。 β と移動電荷の間には次の関係がある⁵⁵⁾。

$$Z = \frac{kT}{e\beta} \doteq \frac{24}{\beta} \quad (9)$$

(k: Boltzmann 定数, T: 絶対温度)

図 3 D に示した Ca^{2+} チャネルにおいては、 V_h は -22 mV、 β は 5.8 mV で、13 個の平均値から移動電荷の数は 3 個と推定される。

チャネルの不活性化

電位依存性チャネルには、膜電位に依存して不活性化するものが知られている。図 4 A は、N 型 Ca^{2+} チャネルの単一チャネルレベルでの不活性化を見たものである。個々のチャネル活動は確率的に振る舞うのでこれを加算平均することによりその時間依存性が明らかになる(アンサンブル平均、図 4 B)。これに対してホールセル電流はチャネル活動の空間平均を表している。アンサンブルとホールセル電流の時間依存性はほぼ一致している(図 4 B)。このことは、個々のチャネルが独立に確率的に開閉するという考えと矛盾しない。

チャネルの不活性化の速度は一般に膜電位に依存している。また、定常状態における不活性化の程度も膜電位に依存している。電流を測定しようとするパルスに先行する保持電位を変えることにより、定常状態における不活性化の膜電位依存性を Ca^{2+} チャネルについて調べたものを図 3 D に示す。不活性化を示さない電流成分を I_c とすると、この関係は次の Boltzmann 式に従う。

$$I = \frac{I_{\max}}{1 + \exp \frac{V - V_h}{\beta}} + I_c \quad (10)$$

この例では、 V_h は -34 mV、 β は 6.9 mV で、8 個の平均値から得られた移動電荷数は 2 と推定される。

チャネルの活性化・不活性化にともなう電荷

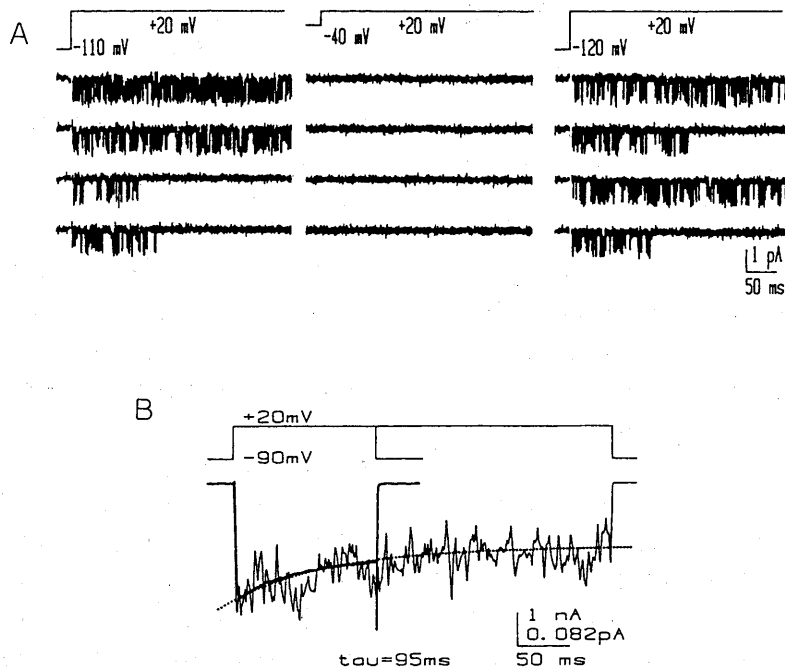


図4. Ca^{2+} チャネルの不活性化(文献103)

A. N型 Ca^{2+} チャネルの単一チャネル記録。最上段はそれぞれ電位コマンドプロトコールを示している。左上段の2つのトレースでは、脱分極中のチャネルの活動性に変化が認められないが、左下2段のトレースでは、脱分極直後にしかチャネルの開状態が認められない。このような2～3種類のモードを行き来するのがN型 Ca^{2+} チャネルの特徴である^{31), 102)}。脱分極電位に保持するとチャネルの開状態がほとんど認められない。B. N型 Ca^{2+} チャネルの単一チャネル活動35トレースのアンサンブル平均とホールセル電流。点線は、ホールセル電流を指数関数と定数項に最適回帰した結果を示している。

の移動は、ホールセル記録下で微小な電流として記録される(ゲート電流、文献6を参照)。活性化にともなうゲート電流はイオン電流に先行して認められる。ゲート電流を単独に取り出すには、イオン電流をチャネルブロッカーで抑制するか透過性のイオンを除去した状態で電位固定をする。直線性のイオン電流成分および容量電流成分を差し引くことにより、非対称的な容量電流成分として、ゲート電流が取り出される。ホールセルパッチ法によるゲート電流の解析は、心筋細胞の Ca^{2+} チャネル³⁸⁾ において報告されている。骨格筋培養細胞の興奮-収縮連関において、ゲート電流と同様の電荷の移動が観察される。この電荷の移動は、T管に存在するジヒドロピリジン受容体の構造変化に由来していることが示された¹⁾。

(2) イオンチャネルのミクロの性質の解析 シナプス電流の解析

ホールセル電流を解析することにより、イオンチャネルのミクロの性質を解析することが可能である。前述したテール電流の解析はその一例だが、アセチルコリンチャネルなどの伝達物質によりゲートされるチャネルにおいては、シナプス電流を解析することによりチャネル開閉の動特性を知ることが可能である。

図5に示すように、伝達物質が開口放出された時点におけるアセチルコリン濃度はきわめて高いので、多くのチャネルがほぼ同期して開く。しかし、アセチルコリンは速やかにチャネル近傍から消失するので、一度閉じたチャネルは再び開かない。チャネルが閉状態と1つの開状態しか有しないと仮定すると、個々のチャネ

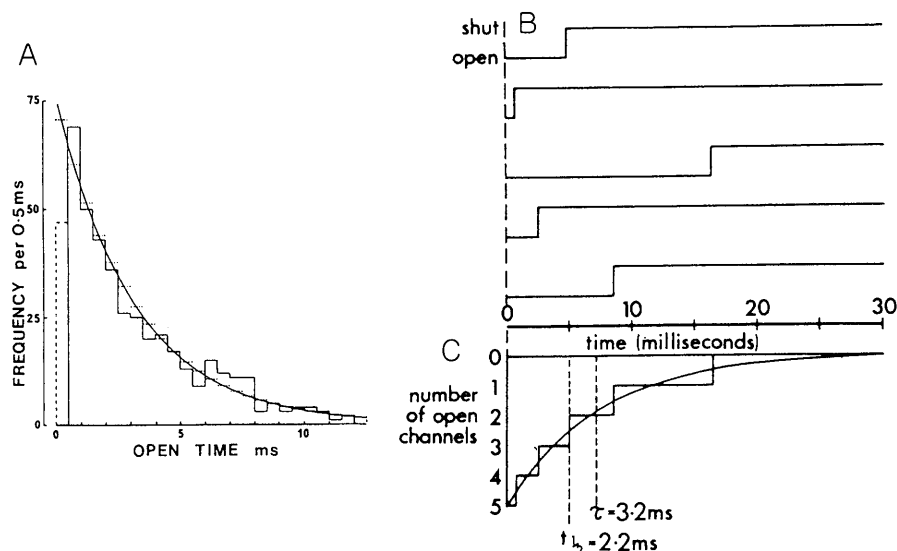


図5. シナプス電流下降相と単一チャネルの平均開時間の関係(文献27)

A. カエル骨格筋終盤のアセチルコリンチャネルの開時間ヒストグラム。実線は、最尤法から求めた指数関数分布である。B. シナプス間隙に放出されたアセチルコリンはきわめて速やかに消失するので、開口したチャネルは、一度閉じると再び開かない。それぞれのチャネルが開口している時間は、確率的に振る舞う。C. これらのアンサンブル平均がホールセル電流として測定される。すなわち、シナプス電流の下降相は指数関数に従う。

ルが開き続ける時間は、指数関数に従って分布する。ホールセル電流は、個々のチャネルを流れる電流の総和なので、電流の大きさは、指数関数に従って減衰する。骨格筋の終板やカエルの交感神経節においては、シナプス電流の下降相はほぼ指数関数に従う^{72), 82), 84)}。この時の時定数は、アセチルコリンチャネルの平均開時間に相当する。しばしば、シナプス電流の下降相は複数の指数関数によく当てはまることがある。このようなチャネルはバースト状の活動を示し、チャネルブロックなどの複雑な動特性が想定される。時定数の大きい方は平均バースト時間に、小さい方はバースト中における平均開時間にそれぞれ等しい²⁷⁾。

リガンド存在下に膜電位をステップ状に変化させると、テール電流のような過渡的な電流が認められる。骨格筋のアセチルコリンチャネルでは、この過渡性電流は指数関数に従い、その時定数は、その膜電位における平均開時間に等しい(voltage-jump analysis^{2), 3), 10), 25), 97)})。自

律神経節のアセチルコリンチャネルの場合、膜電位のステップ状の変化にともなう過渡性電流は、複数の指数関数によく当てはまる¹⁰⁶⁾。このことから、チャネルがバースト状の活動を示すことがわかる。また、時定数の内、大きい方は平均バースト時間に、小さい方はバースト中における平均開時間にそれぞれ等しい。

単一チャネル活動の測定

小細胞のホールセル記録においては、細胞の膜容量が小さいため、バックグラウンドノイズが非常に小さい。このような条件が満たされたとき、単一チャネルのステップ状の活動が拾えることがある^{38), 49), 128)}。

ホールセルノイズ解析

ある時点において開状態にあるチャネルの個数は確率的に変動するため、ホールセル電流は、ある平均値の周りで振動することが観察される。個々のチャネルの活動が開と閉の2相しか

なく、かつ、開から閉、閉から開への移行がともに瞬間的であるという仮定のもとに、ホールセル電流の振動(ノイズ)を解析することにより、単一チャンネルの性質を知ることができる^{5), 25), 26), 60)}。ノイズ解析法の詳細は、大森の稿を参照されたい。本稿では、自律神経節細胞のアセチルコリン受容体チャンネル¹³⁴⁾を例にして、その方法の概略を説明する。

図6Aは、自律神経節細胞のホールセル電流のアセチルコリンに対する応答を示したもので、保持電位を+20mVから-20mVに10mV間隔に変化させている。アセチルコリン存在下に膜電流の変動の大きさが增大していることが認められる。このノイズ記録から変動の大きさと周波数成分の2つの情報が得られる。前者からは、単一チャンネルを流れる電流の大きさが、後者からは、チャンネル開閉の動特性に関するパラメータが抽出される。ノイズを解析するためには、図6Aの様な直流記録と平行して、ローパスフィルタとハイパスフィルタを通した記録をとる。フィルタは減衰傾度の大きなバターワース関数(最大平坦)型が用いられる。各フィルタの遮断周波数は、解析しようとするチャンネルの周波数成分により試行錯誤的に決定する必要がある。後述するチャンネルの特性周波数(corner frequency)の10倍と1/10が目安になる。デジタル化するときの折り畳み現象(エイリアシング)を防ぐためにローパスフィルタの遮断周波数の約2倍がサンプリング周波数として適当である。連続記録されたデータを区切って高速フーリエ変換する。区切りの長さは、解析の上限の周波数の逆数が用いられる²⁵⁾。区切りごとのパワースペクトルを加算平均し、ベースラインノイズのパワースペクトルを差し引くことにより、アセチルコリン受容体チャンネルノイズのパワースペクトルを求める。図6Bは、アセチルコリン受容体チャンネルノイズのパワースペクトルを示したもののだが、2つのローレンツ関数の和で表された。すなわち、

$$S(f) = S_1(f) + S_2(f), \quad (11)$$

$$S_j(f) = \frac{S_j(0)}{1 + (f/f_j)^2}. \quad (12)$$

ここで、 f_j はチャンネルの特性周波数であり、 $S_j(f_j) = S_j(0)/2$ になる。パワースペクトルが単一のローレンツ関数に従うときは、チャンネルの平均開時間 τ と特性周波数 f_1 の間に、 $\tau = 1/(2\pi f_1)$ の関係が成り立つ。しかし、複数のローレンツ関数の和に従うときは、 f_1, f_2 のみから単一チャンネルの動特性を解析することは困難である²⁶⁾。しかし、アゴニストの濃度が低いときは、 $1/(2\pi f_1)$ は平均開時間と、 $1/(2\pi f_2)$ は平均バースト時間とほぼ等しいオーダーの値になる⁵⁹⁾。図6Bにみられるように自律神経節のアセチルコリン受容体チャンネルノイズの f_1, f_2 は、ともに、膜電位に依存しており、正の膜電位でより大きな値をとる。このことから、開状態から閉状態への遷移速度に膜電位依存性があることが示唆される。

単一チャンネル電流は、次の2つの方法で求められる^{5), 29), 107)}。

$$i_1 = \text{var}^*(I) / \mu_1, \quad (13)$$

$$i_2 = (\pi/2) \sum_j S_j(0) f_j / \mu_1, \quad (14)$$

ただし、 $\text{var}^*(I)$ は、アセチルコリン依存性電流の分散で、フィルタの効果を補正したものである²⁵⁾。上記の区切りごとに分散を求めて加算平均をしたものからベースラインの分散の加算平均を差し引いたものがアセチルコリン依存性電流の分散になる。 μ_1 は、アセチルコリン依存性電流の平均値で、上述の直流記録から求められる。 i_1 は、チャンネルの開閉がランダムであるという仮定のもとに導出される一般式(大森の稿、参照)から、チャンネルの開確率が小さいときの近似値として求められる。図6の例では、 i_1 と i_2 は、すべての保持電位で良い一致を示した。図6Cは、単一チャンネル電流のI-Vプロットで、負の膜電位ではほぼ直線に従いコンダクタンスは42pSであった。しかし、正の膜電位でコンダクタンスは減少し、内向き整流特性が認められた。しかし、単一チャンネル電流の整流性のみでは、ホールセル電流の内向

き整流特性(図3C)を説明し得ず, N_p にも膜電位依存性が認められた(図6D). 単一チャンネル記録においても単一チャンネル電流の内向き整流が認められること, および, 正電位側の単一

チャンネルコンダクタンスの減少が細胞内 Mg^{2+} に依存していることが後に示された^{62), 91)}.

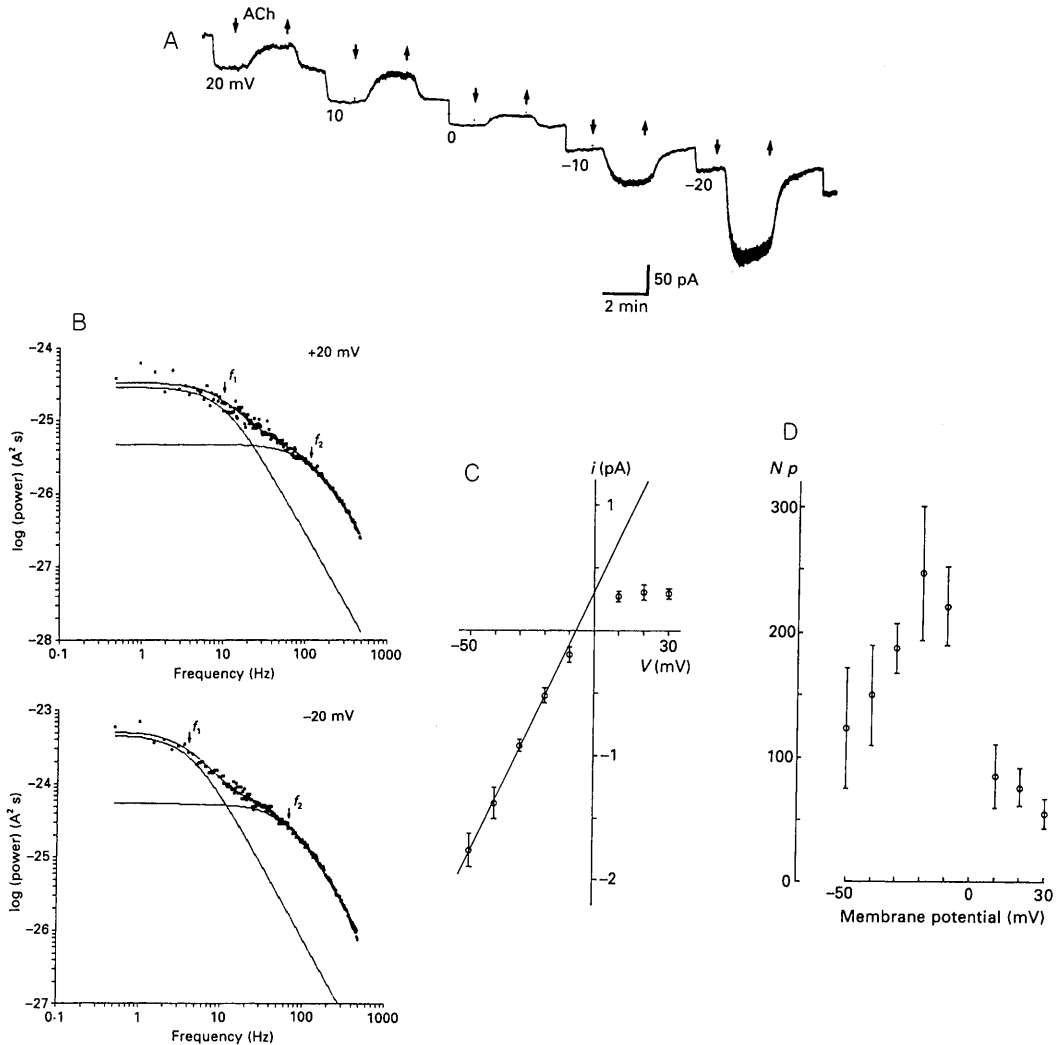


図6. マウス顎下神経節ニューロンのニコチン性アセチルコリン受容体チャンネルのホールセルノイズ解析(文献134)

A. ホールセル電流のアセチルコリン応答. 保持電位を +20 mV から -20 mV に変化させている. $\downarrow$ 間では $20 \mu\text{M}$ のアセチルコリン(ACh)と $10 \mu\text{M}$ のネオスチグミンを投与している. アセチルコリンの投与により, 0 mV近傍で反転する電流が流れるとともにノイズの増大が認められる. B. アセチルコリン誘発性ノイズのパワースペクトル. 実線は, 2つのローレンツ関数およびその和で, 最小2乗法による最適回帰である. +20 mV では, $f_1=10 \text{ Hz}$, $f_2=117 \text{ Hz}$, -20 mV では, $f_1=4 \text{ Hz}$, $f_2=65 \text{ Hz}$ となり, ニコチン性受容体チャンネルの開確率が膜電位依存性がある. C. ノイズ解析から求めた単一チャンネル電流の電流-電位関係. 直線は, 42 pS のスローコンダクタンスを表している. D. N_p 値の膜電位依存性.

(3) イオンチャネルの構造, 分布, 機能の解析

チャネル構造の解析

イカの巨大神経においては, 細胞内を蛋白分解酵素などで灌流することにより, Na^+ チャネルの不活性化がみられなくなることが知られている^{7), 101), 133)}. これは, チャネルの細胞質側に不活性化に不可欠なドメインが存在し, これが蛋白分解酵素により加水分解されることによると考えられている. 同様の酵素の限定分解を利用したチャネル構造の解析がホールセル記録法を用いることにより, 小細胞についても試みられている^{45), 54)}. これらの実験においては, パッチ電極内液に蛋白分解酵素をいれて, ホールセル状態にすることにより, これを細胞内に投与することが試みられた.

また, Na^+ チャネルの特定の部位に特異的な抗体をパッチ電極内にいれて, Na^+ ホールセル電流を測定し, 不活性化に関与しているドメインが同定された¹³²⁾. Na^+ チャネルは, 6回の膜貫通領域を持つ相似なアミノ酸配列が4つ繰り返す(リピートⅠ~Ⅳ)一次構造を有することが知られている^{56), 98)}. リピートⅢとⅣの間の細胞内セグメントの20個のアミノ酸からなるペプチドに対する抗体により, ホールセル形成からの時間とともに Na^+ 電流の不活性化が遅延することが認められる. しかし, 抗体と同時に抗原ペプチドをパッチ内液に入れると不活性化の遅延は認められなかった. このことから, 抗体が Na^+ チャネルの細胞内セグメントに結合することにより不活性化を阻害したものと解釈される. すなわち, リピートⅢとⅣの間の細胞内セグメントが Na^+ チャネルの不活性化に関与していることが, この実験から示唆された.

チャネル分布の研究

イオンチャネルが担っている細胞機能を解析する上において, チャネルの密度は重要な情報を提供する. 例えば, 副腎髄質細胞には, 促進型(図7A), P型(B), N型(C)の3種類の Ca^{2+} チャネルサブタイプが同定されており,

その各々が薬理的に分離可能である. この細胞の Ca^{2+} チャネルを流入する Ca^{2+} イオンあたりの膜容量の増加を比較すると, 促進型 Ca^{2+} チャネルはP型, N型よりも約5倍効率がよいことが示された(図7D). ホールセル記録下で細胞の膜容量の増加は開口分泌に対応することから, 促進型 Ca^{2+} チャネルが開口放出部位近傍に局在していることが示唆される⁹⁾.

一般に, イオンチャネルの分布は局在していることが知られており, これは細胞機能と密接な関係がある. 有毛細胞の Ca^{2+} 流入にともなう Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流は, パッチ電極から Ca^{2+} キレート剤の EGTA を細胞内に投与することにより抑制を受けないのに対し, BAPTA を投与することにより抑制される¹¹⁰⁾. EGTA と BAPTA の Ca^{2+} 結合能はほぼ等しいが, BAPTA のほうが EGTA よりも Ca^{2+} と結合する速度が大きい. この実験結果は, Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルが Ca^{2+} チャネルに近接して分布していることを示すものである^{44), 76), 111), 112)}.

神経細胞は, 極性を持つ細胞の代表的なものである. 樹状突起の膜電位は, 胞体に伝えられて統合され, 軸索の initial segment における膜電位が閾値以上に達したときに活動電位が発生し, 軸索を伝播する. シナプス終末に活動電位が到達することにより, 伝達物質が放出され, シナプス後膜の膜電位を変化させる. 神経細胞においては, 胞体, 樹状突起, シナプス終末それぞれからホールセル記録が試みられている. 例えば, 大脳皮質ニューロンにおいては, 胞体と樹状突起から同時にホールセル電流固定記録が試みられている¹²¹⁾. 胞体と樹状突起から活動電位が記録されるが, 樹状突起においたパッチ電極内の Na^+ チャネルブロッカーの QX 314 が拡散するにつれて, 樹状突起の活動電位のみが減弱する. すなわち, 樹状突起にも Na^+ チャネルが存在しており, 樹状突起に活動電位が伝播することが示された¹²²⁾. 神経終末は, 一般に微小であるが, 例外的に大型の終末に対して, ホールセル記録が適用できる. このようにして神経終末から, Ca^{2+} 電流(図3A, B)⁵³⁾.

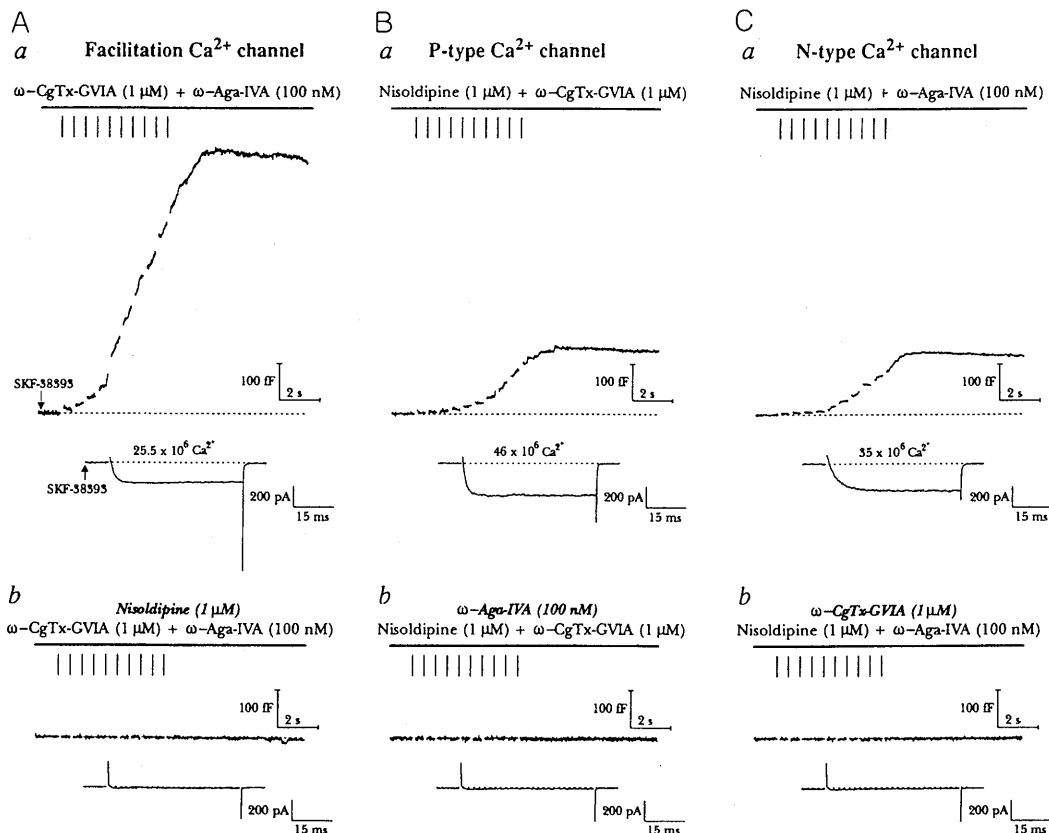


図7. 副腎随質クロム親和性細胞の3種類の Ca^{2+} チャネルサブタイプに依存する開口分泌 (文献9)

各図とも、上段は膜電位固定パルスプロトコールを、中段は膜容量を、下段は Ca^{2+} 電流を示している。A. a, N型 Ca^{2+} チャネル, P型 Ca^{2+} チャネルをそれぞれ, ω -コノトキシン ($\omega\text{-CgTx-GVIA}$), ω -アガトキシン ($\omega\text{-Aga-IVA}$) で抑制し, ジヒドロピリジンアゴニスト SKF-38393 存在下に, 促進型 Ca^{2+} チャネルが活性化される。b, ジヒドロピリジンアンタゴニスト nisoldipine により, 促進型 Ca^{2+} チャネル電流が抑制されるとともに, 開口分泌が抑制される。B. P型 Ca^{2+} チャネルは, nisoldipine と $\omega\text{-CgTx-GVIA}$ の存在下に単離される。C. N型 Ca^{2+} チャネルは, nisoldipine と $\omega\text{-Aga-IVA}$ の存在下に単離される。54例の細胞から, 促進型, P型, N型, それぞれのチャネルによって運ばれる Ca^{2+} の数は, 25.5×10^6 , 46×10^6 , 35×10^6 イオンと推定される。また, それぞれのチャネルの活性化により開口分泌される小胞数は, 356(促進型), 88(P型), 83(N型)個と算出される。

78), 79), 119), 125), 136), K^+ 電流^{78), 130)}, Na^+ 電流⁷⁸⁾が測定されている。神経細胞が分化するときに突起の先端に生長錐が形成される。このような生長錐の大きなものにホールセル記録法が試みられている^{52), 88)}。胞体からホールセル記録をしながら, 局所的に溶液を灌流する方法により, 生長錐のイオン電流が測定されている^{46), 120)}。

(5) 担体輸送の性質および機能の解析 (木村の稿参照)

担体輸送にともなって電荷の移動が起こるとき, ホールセル記録下で電流として捉えられる。たとえば, 形質膜の Na/K ポンプは, ATP 1 分子を加水分解することにより, 3 個の Na^+ イオンを細胞内から細胞外へ輸送すると同時に 2 個の K^+ イオンを細胞外から細胞内へ輸送

する³²⁾。すなわち、ポンプ反応の1サイクルにともなって、差し引き1個の電子が形質膜を横切って細胞外から細胞内に移動する(electrogenic pump)。これは、ホールセル記録下に外向きの電流として観察される^{41), 42), 92)}。

この様に非対称的なイオンの輸送にともなって電荷の移動が認められるものの代表として、Na/Ca 交換輸送が挙げられる⁷⁴⁾。Na/Ca 交換輸送はエネルギーの消費を伴わずに、Ca²⁺ 1分子を細胞内から細胞外へ輸送すると同時に、差し引き1個の正電荷を細胞外から細胞内に移動させる^{19), 35), 73)}。桿体の外節においては、4個のNa⁺ が細胞外から細胞内に輸送されるにともなって、1個のCa²⁺ と1個のK⁺ が細胞内から細胞外へ移動することが報告されている²²⁾。同様のメカニズムが神経細胞に共通であることが示唆されている⁷⁴⁾。しかし、心筋細胞においては、K⁺ の共役輸送は認められず、Na⁺ とCa²⁺ が3:1の比で交換輸送されることが報告されている^{28), 35), 108)}。いずれの場合も静止膜電位近傍では内向きの電流として測定される。エネルギー消費を伴わない担体輸送一般の特徴として、Na/Ca 交換輸送は、可逆的に機能する^{14), 74)}。Na/Ca 交換輸送電流が反転する電位は次式で与えられる。

$$E_{Na/Ca} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Ca]_i [Na]_o^4 [K]_i}{[Ca]_o [Na]_i^4 [K]_o} \\ = 4E_{Na} - E_K - 2E_{Ca} \quad (15) \\ (4Na^+ : 1Ca^{2+}, 1K^+ \text{の時})$$

または、

$$E_{Na/Ca} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Ca]_i [Na]_o^3}{[Ca]_o [Na]_i^3} \\ = 3E_{Na} - 2E_{Ca} \quad (16) \\ (3Na^+ : 1Ca^{2+} \text{の時})$$

ここで、E_{Na}、E_{Ca} は、それぞれ、Na⁺ およびCa²⁺ の平衡電位である。すなわち、E_{Na/Ca} よりも正電位側では、Ca²⁺ は細胞外から細胞内に取り込まれ、このとき外向きのNa/Ca 交換輸送電流が観察される。

中枢神経系の興奮性伝達物質のグルタミン酸は、酸性アミノ酸担体輸送により、細胞外から

細胞内に濃度勾配に逆らって取り込まれる。1分子のグルタミン酸(glutamate⁻)の輸送にともなって、3個のNa⁺ (または2個のNa⁺ と1個のH⁺) が細胞外から細胞内に、1個のK⁺ が細胞内から細胞外に共役輸送される⁹⁹⁾。しかし、グリア細胞においては、3個のNa⁺ と1分子のグルタミン酸の細胞外から細胞内への輸送と共役して、1個のNa⁺ が細胞内から細胞外に輸送されるという報告¹¹⁴⁾と、2個のNa⁺ と1分子のグルタミン酸の細胞外から細胞内への輸送と共役して、1個のK⁺ と1個のOH⁻ (HCO³⁻) が細胞内から細胞外へ輸送されるという報告がある¹⁷⁾。いずれの場合もグルタミン酸1分子の取り込みにともなって、1個の正電荷が細胞外から細胞内に移動する。すなわち、ホールセル電位固定下に、グルタミン酸の取り込みにともなって内向きの電流が観察される。反対にグルタミン酸の逆輸送にともなって外向き電流が測定される¹²⁴⁾。

担体輸送の研究において、ホールセルパッチ法は放射性同位元素によるトレース法に比べて、(1) 細胞の膜電位をコントロールすることができる、(2) ミリ秒単位の速い現象を捉えることができる¹⁰⁰⁾、(3) 細胞内外のイオン組成をコントロールすることができる、の3点において優れている。ホールセルパッチ法の導入により、担体輸送の定量的研究が飛躍的に進んだ。

(6) 細胞内情報伝達系の解析

前述のようにホールセルパッチ法により細胞内に様々な物質を投与することができる。これにより、細胞内情報伝達系の解析が数多く行われており、枚挙にいとまない。具体的には、榎本、野間、堀江の稿を参照されたい。

(7) 形質膜融合の測定

細胞質に存在する小胞と形質膜が融合する(開口分泌、エクソサイトーシス)ことにより、新しく合成された膜脂質、膜蛋白、細胞間マトリックス蛋白などが供給される。また、分泌細胞は、ホルモンや伝達物質を細胞外に放出し、

情報を他の細胞に伝える。これとは反対に、形質膜が小胞として取り込まれる(エンドサイトーシス)ことにより、細胞の表面積はほぼ一定に保たれる。生体膜は、およそ $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ の比容量をもっているの、エクソサイトーシスやエンドサイトーシスにともなう、細胞の膜容量が変動する。すなわち、ホールセル電位固定下に、細胞の膜容量を測定することにより、エクソサイトーシスおよびエンドサイトーシスを定量的に測定することができる。膜容量測定法については、丸山の稿で詳説する。

Beige マウスのマスト細胞のように大きな分泌顆粒をもった細胞では、ホールセル電位固定下に、膜融合に同期した一過性の電流が観察される¹⁸⁾。一般に形質膜を介する電位と顆粒膜を介する電位は異なっており、顆粒膜の方がより顆粒内が正になるような電位を有している。これは、分泌顆粒膜に起電性の H^+ ポンプが

存在することによって考えられている。分泌顆粒と形質膜の間に交通(fusion pore)が形成されることにより、顆粒膜から形質膜へ次式で与えられる電荷が移動する。

$$Q_V = C_V (E_C - E_V) \quad (17)$$

ここで、 C_V は、顆粒膜容量を、 E_C 、 E_V は、それぞれ、形質膜および顆粒膜を介する電位を表す。この様にして測定される fusion pore の形成がエクソサイトーシスに先行することが示されている¹¹⁸⁾。

(8) バイオセンサーとして

細胞の表面には、様々な生理活性物質に特異的な受容体が存在しており、受容体にそのリガンドが結合することにより、固有の細胞応答が観察される。この受容体の特異性と高い感受性を利用して、細胞そのものあるいは細胞膜パッチを生理活性物質のセンサーとして用いること

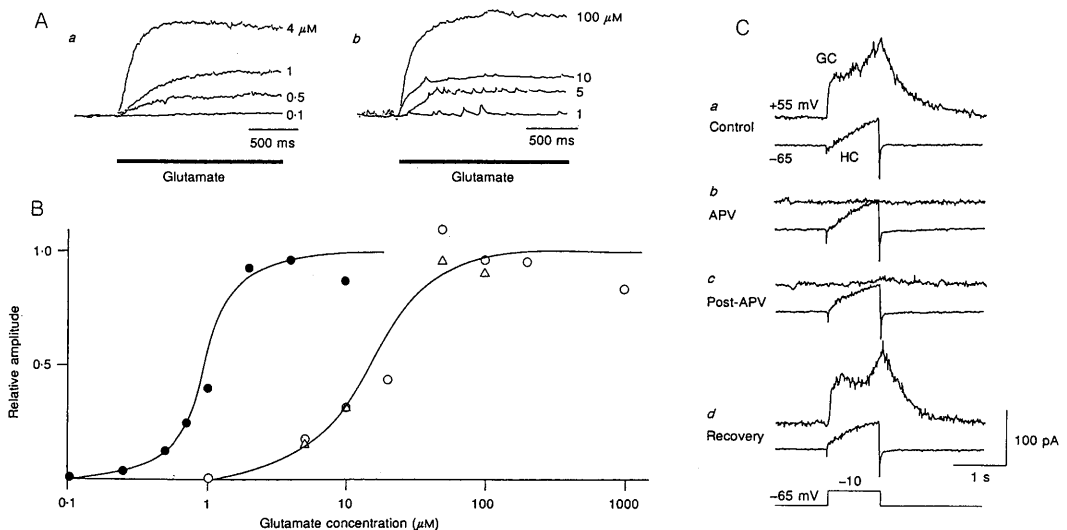


図8. チック内耳有毛細胞の伝達物質放出検知システム(文献68)

A. ラット小脳の顆粒細胞(a), プルキニエ細胞(b)のグルタミン酸応答. 保持電位はともに $+55 \text{ mV}$, 各々のトレースは、異なる濃度のグルタミン酸に対する応答で、顆粒細胞, プルキニエ細胞, それぞれ $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$ 応答に対する相対値で表されている. B. 顆粒細胞(●), プルキニエ細胞(○, △)のグルタミン酸に対する薬量-反応曲線. プルキニエ細胞に比べ顆粒細胞は、10倍以上感受性が高い. C. 有毛細胞と小脳顆粒細胞を近接させて、有毛細胞に -65 mV の保持電位から -10 mV の脱分極性パルスを 500 ms 通電したときの有毛細胞応答(下段)と顆粒細胞応答(上段). a, コントロール. b, APV ($200 \mu\text{M}$) 投与の効果. c-d, APV を除去することにより、顆粒細胞応答が徐々に回復する.

ができる。アウトサイドアウトのパッチ膜⁴⁸⁾、⁶¹⁾、¹³⁷⁾あるいは、インサイドアウトのパッチ膜⁷¹⁾をセンサーに用いたものについては、本稿では説明しない。本稿では、内耳有毛細胞の放出する伝達物質の同定⁶⁸⁾を例にして、その方法の概略を説明する。

聴覚の一次感覚細胞の内耳有毛細胞は蝸牛神経節に由来する求心性線維との間にシナプスを形成している。蝸牛神経節細胞は高いグルタミン酸感受性を有することから有毛細胞から放出される伝達物質はグルタミン酸であると推測される。これを検討する目的で小脳顆粒細胞をグルタミン酸のセンサーとして用いた。小脳顆粒細胞には、グルタミン酸 NMDA 受容体が多く発現しており、高いグルタミン酸感受性を示す。図 8 A, B は小脳顆粒細胞と小脳プルキニエ細胞のホールセル記録下におけるグルタミン酸感受性を比較したものである。小脳顆粒細胞はプルキニエ細胞に比べ 10 倍以上高い感受性を示し、 $1\mu\text{M}$ 以下のグルタミン酸に対しても十分応答する。これは、プルキニエ細胞にはおもに AMPA 受容体が発現しており、一般に NMDA 受容体よりもグルタミン酸感受性が低いことにより説明される。有毛細胞と小脳顆粒細胞を接触させた状態で、両方の細胞にニスタチン穿孔パッチ法(後述)を適用する。小脳顆粒細胞を $+55\text{ mV}$ にホールセル電位固定して、有毛細胞に -65 mV の保持電位から -10 mV のパルスを与えると、有毛細胞の電流応答に同期して、顆粒細胞から外向きの電流応答が測定される(図 8 C, a)。この時、有毛細胞には内向きの Ca^{2+} 電流に引き続いて外向きの K^{+} 電流が流れたものと考えられる。顆粒細胞応答は、NMDA 受容体阻害薬の 2-amino-5-phosphonovaleate (APV) により可逆的に阻害されることから、NMDA 受容体チャネル応答であることが確認される(図 8 C, b-d)。すなわち有毛細胞から Ca^{2+} 依存性に放出される伝達物質は、グルタミン酸あるいは類似の NMDA アゴニスト活性をもった興奮性アミノ酸であることが明らかになった。グルタミン酸であると

仮定すると小脳顆粒細胞表面における濃度は約 $0.5\mu\text{M}$ であると推測される。

同様に、様々な細胞のホールセル標本をセンサーとして、生理活性物質の計測が可能である。たとえば、ナマズ網膜水平細胞をセンサーにして、キングヨ網膜双極細胞の巨大神経終末からグルタミン酸あるいは類似の興奮性アミノ酸が Ca^{2+} 依存性に放出されることが報告されている¹²⁵⁾、¹²⁶⁾。

(9) 単一細胞における遺伝子発現の解析

ホールセルパッチ法により単一の細胞から mRNA を抽出して、その細胞の遺伝子発現を解析することが最近試みられている。脳のようにヘテロな細胞から構成される組織においては、個々の細胞で遺伝子の発現が異なっている。ホールセルパッチ法を用いた mRNA 解析法は、次のような利点がある。(1) 同定された細胞種における遺伝子発現を解析できる。すなわち、他種細胞の混入がない。(2) 形態的、電気生理学的な性質と遺伝子の発現を比較することができる。本手法を用いることにより、(1) 細胞特異的に発現する未知の遺伝子のクローニング、(2) 組織レベルでクローニングされた遺伝子の細胞特異的な発現の解析、(3) 単一細胞の cDNA ライブラリの作成、(4) 細胞特異的な遺伝子発現調節機序の解析、(5) mRNA 転写レベルとチャネルや受容体などのタンパク質発現レベルとの比較およびその調節機序の解析、などが可能になり、今後の発展が期待される。

単一細胞に存在する mRNA の量はきわめて僅か(細胞あたり約 1 pg)なので、これを増幅する必要がある。本稿では、現在試みられている 2 種類の増幅法の概要を紹介する。詳細は個々の論文を参照されたい。

逆転写酵素とオリゴ(dT)-T7プライマーを注入する方法(図 9)³³⁾、¹³¹⁾

① 細胞の mRNA と接触し得る溶液、器具等は、すべてオートクレイブにかけるか diethylpyr-carbonate で処理することにより、RNA 分解

酵素を不活性化する。特にパッチ電極の処理が重要である。またこれらの器具や溶液を取り扱う際には手袋をして、汗に含まれる RNA 分解酵素が付着しないように注意する。

② パッチ電極に dATP, dGTP, dCTP, dTTP などのデオキシヌクレオチド, 逆転写酵素, オリゴ(dT)-T7プライマーを含んだ内液を充填し, ホールセル状態にする。内液は, 細胞内に拡散し, polyA-mRNA とオリゴ(dT)-T7プライマーが結合する。

③陰圧により細胞質を電極内に吸引し, 電極先端を折ってマイクロチューブにいれ, 37℃ 1 時間インキュベーションする。この過程で単一鎖の cDNA が合成される。

④ 単一鎖の cDNA を抽出し, DNA ポリメラーゼにより二重鎖 cDNA を形成する。

⑤ 二重鎖 cDNA を抽出し, T7-RNA ポリメラーゼによりアンチセンス RNA を合成し, 抽出する(第1回増幅)。第一回増幅により2000倍

の収量が得られる。

⑥ 以上の増幅操作を繰り返すことによりさらに多くのアンチセンス RNA を得ることができる(第2回増幅)。このアンチセンス RNA をプローブとして用いることにより, 組織から得られた cDNA ライブラリをもとに cDNA クローンを得ることができる。

また, アンチセンス RNA の収量から細胞における mRNA の発現量を推定することができる。

PCR (polymerase chain reaction) 増幅法を用いる方法^{15), 75)}。

① 前記の方法はパッチ内液に酵素を含んでいるためにタイトシールを形成するのが困難なことがある。本法では逆転写酵素を含まない通常のパッチ内液を用いる。溶液, 器具の取扱いに関しては, 前記手法と同様の注意が必要である。

② ホールセル状態の後, 陰圧により細胞内成分を可能な限り吸引する。

③電極内容物をマイクロチューブにいれ, 逆転写酵素, デオキシヌクレオチドなどの存在下に 35~37℃で 1 時間インキュベーションすることにより単一鎖の cDNA を合成する。

④ (PCR 増幅) PCR 増幅法の詳細については他書^{4), 37), 63), 113)}を参照されたい。本法では, 既知の cDNA 配列をもとに, 同一あるいは類似の配列を有する cDNA を効率よく増幅することができる。ゆえに, 未知の分子の cDNA を取り出す目的には適さないが, 標的を絞って細胞における mRNA の発現を解析する場合にきわめて有効である。PCR 増幅に当たっては, 5' 側(up)のセンスプライマーと 3' 側(down)のアンチセンスプライマーを用意する必要がある。これらのプライマーの配列は, 増幅しようとする cDNA を最も効率よく認識するように決定する。通常のプライマーの長さは15~20 ベースである。

⑤ up のプライマー存在下に, 細胞から取り出した cDNA をテンプレートにして, DNA 合成酵素により, 2 重鎖の DNA を合成する。こ

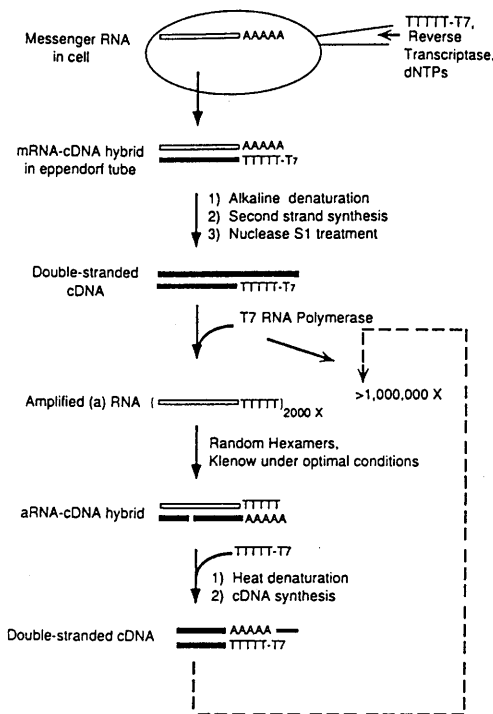


図9. 単一細胞における遺伝子発現解析法の概要(文献33)。

れを単一鎖に解離して、それぞれをテンプレートにして、up および down のプライマーを結合させ、DNA 合成酵素により、2重鎖のDNAを合成する。この操作を繰り返すことにより、DNAを増幅する。

穿孔パッチ法

(1) ホールセルパッチ法の限界・問題点

ホールセル状態になると同時に細胞内液は、パッチ電極内液により灌流される(washout)。これは、特に小細胞で顕著な影響を及ぼす。すなわち、ホールセル状態は、細胞にとっては人工的な環境である。ホールセルパッチ法は、細胞内液を実験的にコントロールすることを可能にする反面、細胞の正常な機能を損なう危険性をはらんでいる。たとえば、細胞内に存在する可溶性の機能的分子が失われる。これら機能的分子には、チャネル活動性の維持や細胞内の情報伝達機序を担っているものがある。ホールセル記録下でしばしば認められる Ca^{2+} チャネルの rundown は、この様な機序により説明される^{12), 54), 67), 116)}。また、ホールセル記録では、しばしば、受容体を介する情報伝達機序が失われる⁵⁹⁾。細胞内の Ca^{2+} バッファ能力の変化も、ホールセルパッチ法の問題点である^{11), 93), 95)}。

パッチ内液に washout されると考えられる物質をあらかじめ補うことにより、上記の問題点はある程度解消される。たとえば、パッチ内液に Mg^{2+} ATP, cAMP 依存性プロテインキナーゼの活性サブユニット, leupeptin などのプロテアーゼ阻害物質, 強い Ca^{2+} バッファなどを補うことにより、 Ca^{2+} 電流の rundown を抑えることができる。しかし、washout により失われる物質のほとんどは未知である。また、正常の細胞では、機能的分子のダイナミックな量的・質的変動が機能を担っていることが多い。パッチ内液にある場合は、機能的分子の濃度が固定されてしまうためこの様な側面が捉えられない欠点がある。

(2) 穿孔パッチ法の原理

穿孔パッチ法は、以上のようなホールセルパッチ法の欠点を解消する最も有効な手法である。穿孔パッチ法では、膜を破る代わりにパッチ膜にイオン透過性の高い小孔を形成することにより細胞内への電気的アクセスを可能にする。この様な小孔は、サイズの小さい1価イオンを通すが、大きな分子を通さないの、細胞内環境が損なわれない利点がある。この cell-attached の状態から out-side out の状態にすることにより、細胞質の可溶性成分を失わずに単一チャネル活動を記録することができる(perforated vesicle)⁸⁰⁾。また、ホールセル膜容量を測定することにより、長時間にわたり安定した開口分泌をモニターすることができる⁴³⁾。この様な測定法は、最初にマスト細胞で試みられた⁸¹⁾。マスト細胞、マクロファージ、Tリンパ球、癌由来系統細胞のあるものなどには、 ATP^{4-} に対する受容体が存在しており、 ATP^{4-} が結合することにより小分子を透過する小孔が形成される³⁶⁾。マスト細胞では、ATPを内液に含むパッチ電極で cell-attached 状態にすることにより、細胞内への電気的アクセスが可能である。しかし、アクセス抵抗が比較的高く、適用できる細胞種が限られているなどの欠点がある。

ニスタチン、アムフォテリシンBなどのポリエン抗生物質は脂質二重層内でチャネルを形成する。ニスタチンチャネルは以下のような性質をもっている^{57), 59), 89)}(文献58, 69を参照)。

① Na^+ , K^+ , Li^+ , Cs^+ , Cl^- などの1価イオンを選択的に透過するが、陽イオンの方が透過性が高い。しかし、 Ca^{2+} , Mg^{2+} , その他の多価イオンに対する透過性は非常に低い。② チャネルの透過性は、電位依存性をほとんど示さない。③ 形質膜の外から与えたニスタチンは細胞内に入らない。また、パッチ膜から外へ側方拡散しない。④ 直径0.8nm以上、あるいは、分子量200以上の分子は、ニスタチンチャネルを透過しない。すなわち、ほとんどの細胞内の機能的分子を通さない。

アムフォテリシンBは、ニスタチンの代用として用いられ、ニスタチンよりも低いアクセス抵抗が得られるという報告がある¹⁰⁶⁾。

(3) 実験手技

実験手技の概要は、他書を参照されたい^{47) 58), 69), 106)}。本稿では、著者らが開発したニスタチン-フルオレシン(N-F)法を紹介する¹³⁵⁾。従来の方法では、パッチ電極の先端をニスタチンを含まない溶液で満たす必要があった。これは、ニスタチン粒子が存在していると、形質膜とパッチ電極の間にタイトシールを形成することが困難なことに起因している。本法では、電極の先端までニスタチン溶液を充填することができる。このため、タイトシール形成後速やかに穿孔パッチが形成される利点がある。また、陽圧をかけつつパッチ電極を細胞表面に近づけることができるので、細胞表面が付着物で覆われているような標本に対してもニスタチン穿孔パッチ法が適用できる。

① 電極作成

パッチ電極は、通常のホールセル記録に用いるものと大きな違いはないが、先端径の大きいほど、また、先端角の大きいほどアクセス抵抗が小さくなる。水溶液と膜脂質の間の分配係数に従ってニスタチンチャネルの密度に上限が設定されるので、パッチ膜の面積が大きいほどアクセス抵抗が小さくなる。

② N-Fストック溶液の作成

ニスタチン(Sigma社製)5mgとフルオレシンナトリウム(Uranine, ナカライテスク社製)20mgを1mlのメタノールに溶解する。すなわち、ニスタチンとフルオレシンのモル比は、約1:10になる。N-Fストック溶液は、4℃で遮光保存すれば数日間是有効である。

③ パッチ内液の作成

N-Fストック溶液50μlをポリエチレンチューブにとり、窒素ガスでメタノールを蒸発させる。完全に乾燥させて、パッチ内液を1ml加え、よく振盪する。最終的なニスタチン、フルオレシンの濃度はそれぞれ、250μg/ml、

1mg/mlになる。ニスタチン濃度は、実験に応じて調整することが望ましい。ニスタチン濃度が高いほどアクセス抵抗が小さくなるが、200~300μg/ml付近では飽和に達するようである。フルオレシンの励起によりニスタチンの活性が失われるので、本操作ならびに以下の操作は、すべて、フルオレシンを励起する青色光をカットして行う必要がある。著者らは、黄色の単色蛍光灯(松下EL40SY-F)を室内照明に用いることにより良好な結果を得ている。

④ パッチ内液の充填

N-Fパッチ内液はセルロースアセテートフィルター(東洋濾紙, Dismic-3cp)を通して電極内に充填する。著者らは、あらかじめパッチ電極の先端を濾過したN-Fパッチ内液に10~30秒間浸した後、同じ液をバックフィルしている。先端の空気は、電極をタッピングする事により容易に除去される。ニスタチンを含んだパッチ内液は1~2時間ごとに新鮮なものに取り替える。

⑤ 穿孔パッチ膜の形成

通常のパッチ電極法と同様に、陽圧下にパッチ電極を細胞表面に接近させる。この時、顕微鏡照明もフィルターを通して青色の励起光をできる限りカットする。著者らは543nmにピークを持つ干渉フィルターを用いているが、フルオレシンの励起光スペクトルの幅が広いので、電極が細胞表面に到達した段階で照明を切っている。ここで僅かに陰圧に切り替え、保持電位を負電位側に移行させながら、タイトシールを形成する。過分極パルスを連続的に加えながら電流をモニターすると速やかに容量性電流が増大するのが認められる。すなわち、ニスタチンチャネルが形成されて、細胞内に対して電氣的にアクセスし始める。本法では、パッチ膜の穿孔がきわめて速やかに始まるので、タイトシールの形成過程で容量性電流の増大が認められることがある。アクセス抵抗は、徐々に低下し、20分以内に安定する。その大きさは、電極抵抗の5~10倍である。陽圧をかけながらパッチ電極を細胞に近づける際に、細胞がパッチ内液に

曝される。しかし、細胞機能には殆ど影響がない。また、細胞の入力抵抗もホールセルパッチ法で測定した値とほぼ等しい。これは、一過性にニスタチンが形質膜に溶け込んでも、パッチ膜の外側では、液が速やかに洗い流されるために、形質膜から細胞外液にニスタチンが移行することによると考えられる。フルオレシンは、細胞の表面に残留するが、生理機能には殆ど影響が認められない。

⑥ N-F 穿孔パッチ膜の光感受性

パッチ電極のアクセス抵抗は、光を照射しない限り安定して低い値を保ち得る。しかし、フルオレシンを励起する青色光を照射すると、アクセス抵抗が速やかに上昇する。これは、励起状態にあるフルオレシンがニスタチンチャネルの形成を阻害することによると考えられる。この性質は、穿孔パッチ膜が破壊されていないかをチェックするのに用いることができる。蛍光像を顕微鏡下で観察することによっても穿孔パッチ膜が破壊されていないかを判定することができる。

(4) N-F 法と従来の手法との比較

① 上述したように、N-F 法は、通常のパッチ電極法と殆ど同様の手技で穿孔パッチ膜を形成することができる。自律神経節などのように細胞表面に付着物が多い標本では、陽圧を加えながらパッチ電極をアプローチすることのできる N-F 法の方が従来の手法よりも成功率が高い。

② N-F 法では、パッチ電極の先端までニスタチンを含んだ溶液を満たすことができるので、速やかに穿孔パッチ膜が形成される。

③ N-F 法では、DMSO やメタノールのような有機溶媒がパッチ内液に存在しないため、これら有機溶媒の副作用がない。

④ N-F 法は、光感受性があり、フルオレシンの励起光でニスタチンが不活性化される欠点がある。しかし、室内照明、顕微鏡照明の励起光波長をカットすることにより、光感受性をほぼ完全に防ぐことができる。

⑤ 穿孔パッチ法では、パッチ膜が破壊されていないことが重要である²³⁾。N-F 法では、蛍光像を観察することにより、あるいは、アクセス抵抗の光感受性を指標にして、パッチ膜が維持されているかを判定することができる。

あらゆる測定法は、その長所とするところが同時にその測定法の欠点になる。測定するという行為そのものが人工的な影響を細胞に及ぼす(測定法の不確定性)。ホールセルパッチ法と穿孔パッチ法は、それぞれの欠点を補い合う形にある。両者をうまく組み合わせることにより、生理的な細胞機能の解析がさらに進歩するものと期待される。

追記：赤池・原田により、穿孔パッチ法についての優れた総説が発表された(Akaike & Harata, *Jpn. J. Physiol.*, 1994)ので、本法を試みる人が一読されることを薦める。

参 考 文 献

- 1) Adams, B. A., Tanabe, T., Mikami, A., Numa, S. & Beam, K. G. (1990) Intramembrane charge movement restored in dysgenic skeletal muscle by injection of dihydropyridine receptor cDNAs. *Nature* **346**, 569-572.
- 2) Adams, P. R. (1977a) Relaxation experiments using bath-applied suberyldicholine. *J. Physiol. Lond.* **268**, 271-289.
- 3) Adams, P. R. (1977b) Voltage jump analysis of procaine action at frog end-plate. *J. Physiol. Lond.* **268**, 291-318.
- 4) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1994) "Molecular Biology of The Cell. 3rd Ed." Garland Publishing Inc. New York, pp. 316-318.
- 5) Anderson, C. R. & Stevens, C. F. (1973) Voltage clamp analysis of acetylcholine produced end-plate current fluctuations at frog neuromuscular junction. *J. Physiol. Lond.* **235**, 655-691.
- 6) Armstrong, C. M. (1992) Voltage-dependent ion channels and their gating. *Physiol. Rev.* **72**, S5-S13.
- 7) Armstrong, C. M., Bezanilla, F. M. & Rojas, E. (1973) Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *J. Gen. Physiol.* **62**, 375-391.
- 8) Armstrong, C. M. & Gilly, W. F. (1992) Access

- resistance and space clamp problems associated with whole-cell patch clamping. *Methods Enzymol.* **207**, 100-122.
- 9) Artalejo, C. R., Adams, M. E. & Fox, A. P. (1994) Three types of Ca^{2+} channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature* **367**, 72-76.
 - 10) Ascher, P., Large, W. A. & Rang, H. P. (1979) Studies on the mechanism of action of acetylcholine antagonists on rat parasympathetic ganglion cells. *J. Physiol. Lond.* **295**, 139-170.
 - 11) Beech, D. J., Bernheim, L., Mathie, A. & Hille, B. (1991) Intracellular Ca^{2+} buffers disrupt muscarinic suppression of Ca^{2+} current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **88**, 652-656.
 - 12) Belles, B., Malecot, C. O., Hescheler, J. & Trautwein, W. (1988) "Run-down" of the Ca current during long whole-cell recordings in guinea pig heart cells, role of phosphorylation and intracellular calcium. *Pflügers Arch.* **411**, 353-360.
 - 13) Blanton, M. G., Lo Turco, J. J. & Kriegstein, A. R. (1989) Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *J. Neurosci. Meth.* **30**, 203-210.
 - 14) Blaustein, M. P. (1988) Calcium transport and buffering in neurons. *Trends Neurosci.* **11**, 438-443.
 - 15) Bochet, P., Audinat, E., Lambolez, B., Crépel, F., Rossier, J., Iino, M., Tsuzuki, K. & Ozawa, S. (1994) Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of glutamate-gated channel. *Neuron* **12**, 383-388.
 - 16) Bormann, J., Hamill, O. P. & Sakman, B. (1987) Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J. Physiol. Lond.* **385**, 243-286.
 - 17) Bouvier, M., Szatkowski, M., Amato, A. & Attwell, D. (1992) The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature* **360**, 471-474.
 - 18) Breckenridge, L. J. & Almers, W. (1987) Currents through the fusion pore that forms during exocytosis of a secretory vesicle. *Nature* **328**, 814-817.
 - 19) Bridge, J. H. B., Smolley, J. R. & Spitzer, K. W. (1990) The relationship between charge movements associated with I_{Ca} and $I_{\text{Na-Ca}}$ in cardiac myocytes. *Science* **248**, 376-378.
 - 20) Brown, A. M., Wilson, D. L. & Tsuda, Y. (1985) Voltage clamp and internal perfusion with suction-pipette method. in "Voltage and patch clamping with microelectrodes", eds. T. G. Smith, Jr., H. Lecar, S. J. Redman & P. W. Gage, American Physiological Society, Bethesda, Maryland, USA, pp. 151-169.
 - 21) Byerly, L. & Hagiwara, S. (1982) Calcium currents in internally perfused nerve cell bodies of *Limnea stagnalis*. *J. Physiol. Lond.* **322**, 503-528.
 - 22) Cervetto, L., Lagnado, L., Perry, R. J., Robinson, D. W. & McNaughton, P. A. (1989) Extrusion of calcium from rod outer segments is driven by both sodium and potassium gradients. *Nature* **337**, 740-743.
 - 23) Chung, I. & Schlichter, L. C. (1993) Criteria for perforated-patch recordings, ion currents versus dye permeation in human T lymphocytes. *Pflügers Arch.* **424**, 511-515.
 - 24) Coleman, P. A. & Miller, R. F. (1989) Measurement of passive membrane parameters with whole cell recording from neurons in the intact amphibian retina. *J. Neurophysiol.* **61**, 218-230.
 - 25) Colquhoun, D., Dreyer, F. & Sheridan, R. E. (1979) The actions of tubocurarine at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol. Lond.* **293**, 247-284.
 - 26) Colquhoun, D. & Hawkes, A. G. (1977) Relaxation and fluctuations of membrane currents that flow through drug-operated channels. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* **199**, 231-262.
 - 27) Colquhoun, D. & Hawkes, A. G. (1983) The principles of the stochastic interpretation of ion-channel mechanisms. in "Single-channel recording", eds. B. Sakmann & E. Neher, Plenum, New York, NY, USA, pp. 135-175.
 - 28) Crespo, L. M., Gratham, C. J. & Cannell, M. B. (1990) Kinetics, stoichiometry and role of the Na-Ca exchange mechanism in isolated cardiac myocytes. *Nature* **345**, 618-621.
 - 29) Cull-Candy, S. G., Howe, J. R. & Ogden, D. C. (1988) Noise and single channels activated by excitatory amino acids in rat cerebellar granule neurones. *J. Physiol. Lond.* **400**, 189-222.
 - 30) Cull-Candy, S. G. & Usowicz, M. M. (1987) Multiple-conductance channels activated by excitatory amino acids in cerebellar neurons. *Nature* **325**, 525-528.
 - 31) Delcour, A. H. & Tsien, R. W. (1993) Altered prevalence of gating modes in neurotransmitter inhibition of N-type calcium channels. *Science* **259**, 980-984.
 - 32) De Weer, P., Gadsby, D. C. & Rakowski, R. F. (1988) Voltage-dependence of the Na/K pump. *Annu. Rev. Physiol.* **50**, 225-241.
 - 33) Eberwine, J., Yeh, H., Miyashiro, K., Cao, Y., Nair, S., Finnel, R., Zettel, M. & Coleman, P. (1992) Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **89**, 3010-3014.
 - 34) Edwards, F. A., Konnerth, A., Sakmann, B. & Takahashi, T. (1989) A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflügers*

- Arch. **414**, 600-612.
- 35) Ehara, T., Matsuoka, S. & Noma, A. (1989) Measurement of reversal potential of Na^+ - Ca^{2+} exchange current in single guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol. Lond.* **410**, 227-249.
 - 36) El-Moatassim, C., Dornand, J. & Mani, J.-C. (1992) Extracellular ATP and cell signalling. *Biochim. Biophys. Acta* **1134**, 31-45.
 - 37) Erlich, H. A. ed., "PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification." Stockton, New York, 1989.
 - 38) Fenwick, E. M., Marty, A. & Neher, E. (1982) A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J. Physiol. Lond.* **331**, 577-597.
 - 39) Field, A. C., Hill, C. & Lamb, G. D. (1988) Asymmetric charge movement and calcium currents in ventricular myocytes of neonatal rat. *J. Physiol. Lond.* **406**, 277-297.
 - 40) Forscher, P. & Oxford, G. S. (1985) Modulation of calcium channels by norepinephrine in internally dialyzed avian sensory neurons. *J. Gen. Physiol.* **85**, 743-763.
 - 41) Gadsby, D. C., Kimura, J. & Noma, A. (1985) Voltage dependence of Na/K pump current in isolated heart cells. *Nature* **315**, 63-65.
 - 42) Gadsby, D. C. & Nakao, M. (1989) Steady-state current-voltage relationship of the Na/K pump in guinea pig ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* **94**, 511-537.
 - 43) Gillis, K. D., Pun, R. Y. K. & Misler, S. (1991) Single cell assay of exocytosis from adrenal chromaffin cells using "perforated patch recording". *Pflugers Arch.* **418**, 611-613.
 - 44) Gola, M. & Crest, M. (1993) Colocalization of active K_{Ca} channels and Ca^{2+} channels within Ca^{2+} domains in Helix neurons. *Neuron* **10**, 689-699.
 - 45) Goni, T. & Hille, B. (1987) Gating of Na channels. Inactivation modifiers discriminate among models. *J. Gen. Physiol.* **89**, 253-274.
 - 46) Gottmann, K., Rohrer, H. & Lux, H. D. (1991) Distribution of Ca^{2+} and Na^+ conductances during neuronal differentiation of chick DRG precursor cells. *J. Neurosci.* **11**, 3371-3378.
 - 47) Grantyn, R., Kraszewski, K., Riechthof, S. & Kettenmann, H. (1993) The nystatin method of whole-cell patch clamp recording. In "Practical Electrophysiological Methods" eds, H. Kettenmann & R. Grantyn, Wiley-Liss, New York, pp. 274-278.
 - 48) Grinnell, A. D., Gundersen, C. B., Meriney, S. D. & Young, S. H. (1989) Direct measurement of ACh release from exposed frog nerve terminals, constraints on interpretation of non-quantal release. *J. Physiol. Lond.* **419**, 225-251.
 - 49) Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391**, 85-100. 1981
 - 50) Hamill, O. P. & Sakmann, B. (1981) Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells. *Nature* **294**, 462-464.
 - 51) Hamill, O. P., Bormann, J. & Sakmann, B. (1983) Activation of multiple-conductance state chloride channels in spinal neurones by glycine and GABA. *Nature* **305**, 805-808.
 - 52) Haydon, P. G. & Man-Son-Hing, H. (1988) Low- and high-voltage-activated calcium currents, their relationship to the site of neurotransmitter release in an identified neuron of Helisoma. *Neuron* **1**, 919-927.
 - 53) Heidelberger, R. & Matthews, G. (1992) Calcium influx and calcium current in single synaptic terminals of goldfish retinal bipolar neurons. *J. Physiol. Lond.* **447**, 235-256.
 - 54) Hescheler, J. & Trautwein, W. (1988) Modification of L-type calcium current by intracellularly applied trypsin in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol. Lond.* **404**, 259-274.
 - 55) Hille, B. (1984) "Ionic channels of excitable membranes", Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
 - 56) Hille, B. (1992) "Ionic channels of excitable membranes, second edition", Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
 - 57) Holz, R. & Finkelstein, A. (1970) The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J. Gen. Physiol.* **56**, 125-145.
 - 58) Horn, R. & Korn, S. J. (1992) Prevention of rundown in electrophysiological recording. *Methods Enzymol.* **207**, 149-155.
 - 59) Horn, R. & Marty, A. (1988) Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J. Gen. Physiol.* **92**, 145-159.
 - 60) Howe, J. R., Colquhoun, D. & Cull-Candy, S. G. (1988) On the kinetics of large-conductance glutamate-receptor ion channels in rat cerebellar granule neurons. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* **233**, 407-422.
 - 61) Hume, R. I., Role, L. W. & Fishbach, G. D. (1983) Acetylcholine release from growth cones detected with patches of acetylcholine receptor-rich membranes. *Nature* **305**, 632-634.
 - 62) Ifune, C. K. & Steinbach, J. H. (1990) Rectification of acetylcholine-elicited currents in PC12 pheochromocytoma cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **87**, 4794-4798.
 - 63) Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. eds., "PCR Protocols, A Guide to

- Methods and Applications" Academic Press, San Diego, California, 1990.
- 64) Jackson, M. B. (1992) Cable analysis with the whole-cell patch clamp, theory and experiment. *Biophys. J.* **61**, 756-766.
 - 65) Jackson, M. B. (1993) Passive current flow and morphology in the terminal arborizations of the posterior pituitary. *J. Neurophysiol.* **69**, 692-702.
 - 66) Jahr, C. E. & Stevens, C. F. (1987) Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. *Nature* **325**, 522-525.
 - 67) Kameyama, M., Hescheler, J., Hofmann, F. & Trautwein, W. (1986) Modulation of Ca current during the phosphorylation cycle in the guinea pig heart. *Pflugers Arch.* **407**, 123-128.
 - 68) Kataoka, Y. & Ohmori, H. (1994) Activation of glutamate receptors in response to membrane depolarization of hair cells isolated from chick cochlea. *J. Physiol. Lond.* **477**, 403-414.
 - 69) Korn, S. J., Marty, A., Connor, J. A. & Horn, R. (1991) Perforated patch recording. in "Methods in Neuroscience, Vol 4" ed., P. M. Conn., Academic Press, San Diego, California, pp. 364-373.
 - 70) Kostyuk, P. G., Krishtal, O. A. & Pidoplichko, V. I. (1981) Calcium inward current and related charge movements in the membrane of snail neurons. *J. Physiol. Lond.* **310**, 403-421.
 - 71) Kramer, R. H. (1990) Patch cramming, monitoring intracellular messengers in intact cells with membrane patches containing detector ion channels. *Neuron* **4**, 335-341.
 - 72) Kuba, K. & Nishi, S. (1979) Characteristics of fast excitatory postsynaptic current in bullfrog sympathetic ganglion cell. Effects of membrane potential, temperature and Ca ions. *Pflugers Arch.* **378**, 205-212.
 - 73) Lagnado, L., Carvetto, L. & McNaughton, P. A. (1988) Ion transport by the Na-Ca exchange in isolated rod outer segment. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **85**, 4548-4552.
 - 74) Lagnado, L. & McNaughton, P. A. (1990) Electrogenic properties of the Na:Ca exchange. *J. Membrane Biol.* **113**, 177-191.
 - 75) Lambolez, B., Audinat, E., Bochet, P., Crépel, F. & Rossier, J. (1992) AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* **9**, 247-258.
 - 76) Lancaster, B. & Nicoll, R. A. (1978) Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *J. Physiol. Lond.* **389**, 187-203.
 - 77) Lee, K. S., Akaike, N. & Brown, A. M. (1978) Properties of internally perfused voltage-clamped isolated nerve cell bodies. *J. Gen. Physiol.* **71**, 489-507.
 - 78) Lemos, J. R., Nordmann, J. J., Cooke, I. M. & Stuenkel, E. L. (1986) Single channels and ionic currents in peptidergic nerve terminals. *Nature* **319**, 410-412.
 - 79) Lemos, J. R. & Nowicky, M. C. (1989) Two types of calcium channels coexist in peptide-releasing vertebrate nerve terminals. *Neuron* **2**, 1419-1426.
 - 80) Levitan, E. S. & Kramer, R. H. (1990) Neuropeptide modulation of single calcium and potassium channels detected with a new patch clamp configuration. *Nature* **348**, 545-547.
 - 81) Lindau, M. & Fernandez, J. M. (1986) IgE-mediated degranulation of mast cells does not require opening of ion channels. *Nature* **319**, 150-153.
 - 82) Lipscombe, D. & Rang, H. P. (1988) Nicotinic receptors of frog ganglia resemble pharmacologically those of skeletal muscle. *J. Neurosci.* **8**, 3258-3265.
 - 83) Llano, I., Marty, A., Armstrong, C. M. & Konnerth, A. (1991) Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of purkinje cells in rat cerebellar slices. *J. Physiol. Lond.* **434**, 183-213.
 - 84) Magleby, K. L. & Stevens, C. F. (1972) The effect of voltage on the time course of end-plate currents. *J. Physiol. Lond.* **223**, 151-171.
 - 85) Major, G., Evans, J. D. & Jack, J. B. (1993) Solutions for transients in arbitrarily branching cables. I. voltage recording with a somatic shunt. *Biophys. J.* **65**, 423-449.
 - 86) Malecot, C. O., Feindt, P. & Trautwein, W. (1988) Intracellular N-methyl-D-glucamine modifies the kinetics and voltage-dependence of the calcium current in guinea pig ventricular heart cells. *Pflugers Arch.* **411**, 235-242.
 - 87) Manabe, T., Renner, P. & Nicoll, R. A. (1992) Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents. *Nature* **355**, 50-55.
 - 88) Man-Son-Hing, H. & Haydon, P. G. (1992) Modulation of growth cone calcium current is mediated by a PTX-sensitive G protein. *Neurosci. Lett.* **137**, 133-136.
 - 89) Marty, A. & Finkelstein, A. (1975) Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin. Differences in its one-sided and two-sided action. *J. Gen. Physiol.* **65**, 515-526.
 - 90) Marty, A. & Neher, E. (1983) Tight-seal whole-cell recording. in "Single-channel recording", eds. B. Sakmann & E. Neher, Plenum, New York, NY, USA, pp. 107-122.
 - 91) Mathie, A., Colquhoun, D. & Cull-Candy, S. G. (1990) Rectification of currents activated by nicotinic acetylcholine receptors in rat sympathetic ganglion neurones. *J. Physiol. Lond.* **427**, 625-655.
 - 92) Nakao, M. & Gadsby, D. C. (1989) [Na] and [K] dependence of the Na/K pump current-voltage

- relationship in guinea pig ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* **94**, 539-565.
- 93) Neher, E. (1988) The influence of intracellular calcium concentration on degranulation of dialysed mast cells from rat peritoneum. *J. Physiol. Lond.* **395**, 193-214.
 - 94) Neher, E. (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods enzymol.* **207**, 123-131.
 - 95) Neher, E. & Augustine, G. J. (1992) Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J. Physiol. Lond.* **450**, 273-301.
 - 96) Neher, E. & Marty, A. (1982) Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **79**, 6712-6716.
 - 97) Neher, E. & Sakmann, B. (1975) Voltage-dependence of drug-induced conductance in frog neuromuscular junction. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, 2140-2144.
 - 98) Nicholls, J. G., Martin, A. R. & Wallace, B. G. (1992) "From neuron to brain, third edition", Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
 - 99) Nicholls, D. & Attwell, D. (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 462-468.
 - 100) Niggli, E. & Lederer, W. J. (1991) Molecular operations of the sodium-calcium exchanger revealed by conformation currents. *Nature* **349**, 621-624.
 - 101) Oxford, G. S., Wu, C. H. & Narahashi, T. (1978) Removal of sodium channel inactivation in squid axons by N-bromoacetamide. *J. Gen. Physiol.* **71**, 227-247.
 - 102) Plummer, M. R. & Hess, P. (1991) Reversible uncoupling of inactivation in N-type calcium channels. *Nature* **351**, 657-659.
 - 103) Plummer, M. R., Logothetis, D. E. & Hess, P. (1989) Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron* **2**, 1453-1463.
 - 104) Purves, D., Hadley, R. D. & Voyvodic, J. T. (1986) Dynamic changes in the dendritic geometry of individual neurons visualized over periods of up to three months in the superior cervical ganglion of living mice. *J. Neurosci.* **6**, 1051-1060.
 - 105) Purves, D., Voyvodic, J. T., Magrassi, L. & Yawo, H. (1987) Nerve terminal remodeling visualized in living mice by repeated examination of the same neuron. *Science* **238**, 1122-1126.
 - 106) Rae, J., Cooper, K., Gates, P. & Watsky, M. (1991) Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J. Neurosci. Meth.* **37**, 15-26.
 - 107) Rang, H. P. (1981) The characteristics of synaptic currents and responses to acetylcholine of rat submandibular ganglion cells. *J. Physiol. Lond.* **311**, 23-55.
 - 108) Reeves, J. P. & Hale, C. C. (1984) The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange. *J. Biol. Chem.* **259**, 7733-7739.
 - 109) Regan, L. J. (1991) Voltage-dependent calcium currents in Purkinje cells from rat cerebellar vermis. *J. Neurosci.* **11**, 2259-2269.
 - 110) Roberts, W. M. (1993) Spatial calcium buffering in saccular hair cells. *Nature* **363**, 74-76.
 - 111) Roberts, W. M., Jacobs, R. A. & Hudspeth, A. J. (1990) Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. *J. Neurosci.* **10**, 3664-3684.
 - 112) Robitaille, R., Garcia, M. L., Kaczorowski, G. J. & Charlton, M. P. (1993) Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* **11**, 645-655.
 - 113) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
 - 114) Schwartz, E. A. & Tachibana, M. (1990) Electrophysiology of glutamate and sodium co-transport in a glial cell of the salamander retina. *J. Physiol. Lond.* **426**, 43-80.
 - 115) Sherman-Gold, R. ed. "The Axon guide", Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA, 1993.
 - 116) Shuba, Y. M., Hesslinger, B., Trautwein, W., McDonald, T. F. & Pelzer, D. (1990) Whole-cell calcium current in guinea-pig ventricular myocytes dialysed with guanine nucleotides. *J. Physiol. Lond.* **424**, 205-228.
 - 117) Smith, S. M., Zorec, R. & McBurney, R. N. (1989) Conductance states activated by glycine and GABA in rat cultured spinal neurones. *J. Membr. Biol.* **108**, 45-52.
 - 118) Spruce, A. E., Breckenridge, L. J., Lee, A. K. & Almers, W. (1990) Properties of the fusion pore that forms during exocytosis of a mast cell secretory vesicle. *Neuron* **4**, 643-654.
 - 119) Stanley, E. F. (1989) Calcium currents in a vertebrate presynaptic nerve terminal, the chick ciliary ganglion calyx. *Brain Res.* **505**, 341-345.
 - 120) Streit, J. & Lux, H. D. (1989) Distribution of calcium currents in sprouting PC-12 cells. *J. Neurosci.* **9**, 4190-4199.
 - 121) Stuart, G. J., Dodt, H.-U. & Sakmann, B. (1993) Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared

- video microscopy. *Pflugers Arch.* **423**, 511-518.
- 122) Stuart, G. J. & Sakmann, B. (1994) Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* **367**, 69-72.
 - 123) Swandulla, D. & Armstrong, C. M. (1988) Fast-deactivationg calcium channels in chick sensory neurons. *J. Gen. Physiol.* **92**, 197-218.
 - 124) Szatkowski, M., Barbour, B. & Attwell, D. (1990) Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* **348**, 443-446.
 - 125) Tachibana, M. & Okada, T. (1991) Release of endogenous excitatory amino acids from ON-type bipolar cells isolated from the goldfish retina. *J. Neurosci.* **11**, 2199-2208.
 - 126) Tachibana, M., Okada, T., Arimura, T., Kobayashi, K. & Piccolino, M. (1993) Dihydropyridine-sensitive calcium current mediates neurotransmitter release from bipolar cells of the goldfish retina. *J. Neurosci.* **13**, 2898-2909.
 - 127) Takahashi, K. & Yoshii, M. (1978) Effects of internal free calcium upon the sodium and calcium channels in the tunicate egg analyzed by the internal perfusion technique. *J. Physiol. Lond.* **279**, 519-549.
 - 128) Takahashi, T. & Momiyama, A. (1991) Single-channel currents underlying glycinergic inhibitory postsynaptic responses in spinal neurons. *Neuron* **7**, 965-969.
 - 129) Thomas, P., Surprenant, A. & Almers, W. (1990) Cytosolic Ca^{2+} , exocytosis, and endocytosis in single melanotrophs of the rat pituitary. *Neuron* **5**, 723-733.
 - 130) Thorn, P. J., Wang, X. & Lemos, J. R. (1991) A fast, transient K^+ current in neurophysiophysial nerve terminals of the rat. *J. Physiol. Lond.* **432**, 313-326.
 - 131) VanGelder, R., VanZastrow, M., Yool, A., Dement, W., Barchas, J. & Eberwine, J. (1990) Amplified RNA (aRNA) synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **87**, 1663-1667.
 - 132) Vassilev, P. M., Scheuer, T. & Catterall, W. A. (1988) Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* **241**, 1658-1661.
 - 133) Wang, G. K., Brodwick, M. S. & Eaton, D. C. (1985) Removal of Na channel inactivation in squid axon by an oxidant chloramine-T. *J. Gen. Physiol.* **86**, 289-302.
 - 134) Yawo, H. (1989) Rectification of synaptic and acetylcholine currents in the mouse submandibular ganglion cells. *J. Physiol. Lond.* **417**, 307-322.
 - 135) Yawo, H. & Chuhma, N. (1993) An improved method for perforated patch recordings using nystatin-fluorescein mixture. *Jpn. J. Physiol.* **43**, 267-273.
 - 136) Yawo, H. & Momiyama, A. (1993) Re-evaluation of calcium currents in pre- and postsynaptic neurones of the chick ciliary ganglion. *J. Physiol. Lond.* **460**, 153-172.
 - 137) Young, S. H. & Poo, M.-M. (1983) Spontaneous release of transmitter from growth cones of embryonic neurones. *Nature* **305**, 634-637.



細胞膜の $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送

宮本博司・池原敏孝*・山口久雄*

(徳島文理大学家政学部生活環境情報学科・徳島大学医学部第一生理学教室*)

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ Cotransport in the Cell Membrane. Hiroshi MIYAMOTO, Toshitaka IKEHARA* and Hisao YAMAGUCHI* (*Faculty of Domestic Science, Tokushima Bunri University, *Department of Physiology, School Medicine, University of Tokushima*)

1. はじめに

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送は軟体動物^{3,6)}, 魚類⁶³⁾, 両生類^{16,22)}, 鳥類^{70,98)}, ヒトを含めた各種の哺乳類^{4,28,30,35,85)}等に広く分布する。哺乳類に限ってみても, 上皮・内皮細胞^{35,49,53,73,114)}を初め, 赤血球^{10,18,30,55,64)}, リンパ球²⁴⁾, 線維芽細胞^{4,85)}, 心筋細胞及び平滑筋細胞^{17,106)}や腫瘍細胞^{39,40,52,105,112)}等, 各種の組織細胞に存在する。従って, 動物界で最も広範且つ普遍的にみられる1価イオン輸送系の一つである。この共輸送は受動輸送であり, 原動力は Na^+ , K^+ と Cl^- の化学ポテンシャルの総和の細胞膜を隔てた勾配である。言うまでもなく Na^+ , K^+ 両イオンのポテンシャル勾配は Na ポンプが作り出したものであり, 正常なイオン環境ではこの共輸送系を介する K^+ (Rb^+) 取り込み(内向きフラックス)と Na^+ 流出(外向きフラックス)はそれぞれのポテンシャル勾配に逆らう2次性能動輸送であるといえる。 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送には, 1) 3種イオン間の相互依存性, 2) 電気的中性の保持と 3) ループ利尿剤感受性の3つの特性がある。この中で 1) の詳細は後に述べる。

2) については最初, Geck ら(1980)がエールリッヒ腹水腫瘍細胞を用いた研究から $1\text{Na}^+/1\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ の輸送比率を提唱し³¹⁾, その後, 同じ比率がヒト赤血球¹⁸⁾, ヒト網膜色素上皮細胞⁵¹⁾, ウサギ尿管細胞¹¹¹⁾, エールリッヒ腹水腫瘍細胞^{47,59)}, HeLa 細胞⁶⁸⁾等で確認されている。陰陽イオンの電荷が等しいので, 電気的中性が成立し, 細胞内電位が変化してもイオ

ンの輸送は影響を受けない^{31,66)}。なお電気的中性とループ利尿剤感受性を保持しつつ違った比率で共輸送するものもあり, 例えばイカ巨大軸索では $2\text{Na}^+/1\text{K}^+/3\text{Cl}^-$ であるといわれる³⁾。その他, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送とは別に電気的中性のイオン共輸送として, N-エチルマレイミド(NEM)や細胞膨潤によって活性化する K^+/Cl^- 共輸送と細胞収縮によって活性化し, ヒドロクロロチアジド(HCTZ)で阻害される Na^+/Cl^- 共輸送があるが, 今回は触れない。

3) に関し, 腎のヘンレループ上行脚における Na^+ 再吸収を阻害し, 利尿・降圧作用を有する一群の物質(ループ利尿剤)は共輸送を特異的に阻害する。これらの物質には, フロセミド, ビレタニド, プメタニド等があるが, 類似した化学構造をもつ。よく使用するフロセミドとプメタニドを比較すると, IC_{50} がアフリカツメガエル尿管細胞ではそれぞれ $6.6\text{ }\mu\text{M}$ と $1.7\text{ }\mu\text{M}$ ²²⁾, K_i がヒト赤血球では $9\text{ }\mu\text{M}$ と $0.16\text{ }\mu\text{M}$ である²⁰⁾。なお HeLa 細胞(ヒト子宮頸癌細胞)ではフロセミドの K_i が $1\text{ }\mu\text{M}$ ⁶⁸⁾, ヒト網膜色素上皮細胞ではプメタニドのそれが $0.16\text{ }\mu\text{M}$ ⁵¹⁾である。以上の結果はプメタニドに対する感受性の方が大きいことを示す。阻害の特異性からみれば, ヒト赤血球でプメタニドは $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送のみを阻害するが, フロセミドは外液 Na^+ 非依存性の K^+/K^+ 交換も阻害する^{10,18)}。また仔牛動脈内皮細胞のプメタニド非感受性 K^+/Cl^- 共輸送はフロセミドで阻害される⁸⁸⁾等, プメタニドの特異性が大きい。もっともフロセミドが K^+/Cl^- 共輸

送を阻害するといっても、有効濃度は $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送の場合より1桁以上大きい⁸⁸⁾。

本論文では $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送の機能、輸送体蛋白質の性質等に関し、我々自身の研究結果も含め、近年における研究の動向を解説する。

II. 上皮細胞膜における共輸送体の分布

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送体(以下単に共輸送)は腎尿細管のような吸収組織では主に先端膜(管腔膜)に、分泌性の組織では基底外側膜に分布するといわれる⁶³⁾。例えば、マウス腎のヘンレループ上行脚細胞では特異的な ^3H -ブメタニド結合部位の約85%が先端膜に存在する⁴⁹⁾。他方、ウサギ耳下腺とイヌやヒト気道上皮の基底外側膜は高い ^3H -ブメタニド結合能をもち^{12,35)}、またサメ直腸腺細胞では共輸送体蛋白質が基底外側膜に沿って分布し、先端膜には分布しないことが免疫顕微蛍光法と免疫電顕法で確かめられる⁶³⁾。以上、上皮細胞は吸収・分泌をとわず、正味、イオンと水を細胞内へ取り込むのに役立つであろう。一方、アフリカツメガエルの培養遠位尿細管細胞では、フロセミド感受性 Rb^+ 取り込みの50%以上が先端膜、50%以下が基底外側膜でみられ、局在性は高くない²²⁾。しかし培養の結果、局在性が失われた可能性も否定できない。尿管細胞のループ利尿剤感受性は直腸腺細胞の約10倍も高いが⁶³⁾、両細胞間における共輸送体の性質の違いは、種よりは吸収上皮と分泌上皮の差異を反映するといわれる⁶¹⁾。他の細胞をみると、カエル網膜色素上皮細胞の先端側に加えたフロセミドは Cl^- 輸送を阻害するが、基底側に加えても影響しないので、共輸送体は先端膜に局在し、網膜から脈絡膜へ向う正味の Cl^- の移動が予想できる¹⁶⁾。HCTZを加えて K^+/Cl^- 共輸送を阻害した膀胱壁細胞(家兎)では内腔側に加えたブメタニドが有効であることから、 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送体が先端膜に¹⁴⁾、また脳室脈絡膜上皮(サンショウウオ)の高浸透圧で刺激されるフロセミド感受性共輸送体が脳室側膜に存在し¹¹³⁾、いずれも細胞が管(内)腔からイオンと水を吸収す

るのに役立つ。

III. 細胞内外のイオンの影響

共輸送では細胞外液の Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- が互いに取り込みを刺激し合い、逆に1つでも欠くときは他のイオンの取り込みが抑止される。細胞からのイオンの流出についても同じことが言える。イオン欠如によって阻害される輸送成分はループ利尿剤に感受性の輸送成分に匹敵する³⁾。このような現象はヒトの赤血球^{9,11,55)}、培養細胞^{51,54,82,111)}、イカ巨大軸索^{3,94)}等の細胞で繰返し確かめられてきた。例えば、 Na^+ が枯渇した舌下線の粘液腺細胞を正常培養液に戻すと、 Na^+ 取り込みは外液の K^+ と Cl^- に依存し、ブメタニドで阻害される¹¹⁴⁾。種々の動物細胞の共輸送体に対する Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- の親和性を表すみかけの K_m を一括表示した(表)。

次に Na^+ と K^+ の効果に関する速度論的解析の一例を示す。図1AはHeLa細胞のフロセミド感受性 Rb^+ 取り込みに対する外液 Rb^+ (K^+ の代替イオン)と Na^+ の刺激効果を示すもので、両イオン共濃度依存性に取り込みを促進することがわかる⁶⁸⁾。図1Bは同様に外液 Na^+ と Cl^- の刺激効果を示すものである。AとB図上の点は共に両逆数プロットが直線に最もよく適合するので、 K^+ の結合部位が1個であることを示唆する。同様に外液 K^+ 濃度を変えて家兎腎のヘンレループ上行脚細胞の $^{22}\text{Na}^+$ 、 $^{86}\text{Rb}^+$ 及び $^{36}\text{Cl}^-$ 取り込みを測定すると、Lineweaver-Burk プロットが全て直線関係を示す¹¹¹⁾。これに対し、ヒト赤血球のフロセミド感受性 Na^+ 流出に関する細胞内 Na^+ の活性化曲線はシグモイドで Hill 係数が1.6であるから、少なくとも2個の内液 Na^+ が関与すると提唱している³⁰⁾。

Cl^- の効果については、家兎腎のヘンレループ上行脚細胞のブメタニド感受性 $^{86}\text{Rb}^+$ 及び $^{36}\text{Cl}^-$ 取り込みが外液 Cl^- 濃度の関数として、シグモイドを示し、複数の Cl^- 結合部位の存在と、両部位間の相互作用を示唆する¹¹¹⁾。外

表 哺乳動物細胞の $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送のイオン親和性

細胞	動物	細胞外液イオンのみかけの K_m (mM)			参考文献
		Na^+	K^+	Cl^-	
赤血球	ヒト	25.7	1.80		Lauf ⁵⁶⁾
HeLa	ヒト	15.3	1.49	44.1	Tivey ら ¹⁰⁵⁾
HeLa	ヒト	105*	0.83*	23.9* 103*	Miyamoto ら ⁶⁸⁾
線維芽細胞	ヒト	15	3	30	Owen ら ⁸²⁾
MDCK	イヌ	7	1		Aiton ら ¹⁾
MDCK	イヌ	30	25		Rindler ら ⁹⁰⁾
3T3	マウス	68.9	3.14		Atlan ら ⁴⁾
星状細胞	ラット	35	2.7	40	Tas ら ¹⁰³⁾
腎尿細管上行脚	マウス	7.3	1.3	68	Kaji ⁴⁹⁾
腎尿細管上行脚	家兎	2.99	3.64	46.7	Vuillemin ら ¹¹¹⁾
血管平滑筋細胞	ラット	46	4	78	Smith ら ¹⁰⁰⁾
骨芽細胞	ラット	24.4	2.9	6.7 62	Whisenant ら ¹¹²⁾
LLC-PK ₁	ブタ	0.42	11.9	5.14 55.2	Brown ら ⁸⁾

上記の数値は主にループ利尿剤感受性 Rb^+ 取り込みを指標にして得たものである。

*理想化したイオン条件への外挿値。

液 Cl^- 濃度の関数として、シグモイド状のイオン取り込みは HeLa 細胞⁵⁴⁾ やヒラメ小腸⁷⁵⁾ でも認められ、同様な相互協同作用を示す。グルコン酸塩で置換して外液の Cl^- 濃度を上げると、マウス腎のヘンレループ上行脚細胞のブメタニド感受性 K^+ 取り込みはシグモイド状に増加し、2つの Cl^- 部位が同じ親和性を有するとしている⁴⁹⁾。一方、アヒル赤血球の ^3H -ブメタニド結合に及ぼす外液 Cl^- の効果は2相性で、そのみかけの K_m が 2.5 mM とみかけの K_i が 112.9 mM の親和性の異なる2個の Cl^- 結合部位の存在が想定される³⁸⁾。しかし実際に共輸送の測定データに基づいて、2つの異なる Cl^- 部位の K_m を決定したのは、培養腎上皮細胞⁸⁾ と HeLa 細胞⁶⁸⁾ の研究だけである(表)。

共輸送体のイオン選択性は重要な研究課題である。HeLa 細胞のプロセミド感受性取り込みは Rb^+ と K^+ を区別せず⁶⁹⁾、外液の K^+ と Rb^+ のみかけの K_m の比は 1.47 とよく似た親和性を示す⁶⁸⁾。エールリッヒ腹水腫瘍細胞³¹⁾ と MDCK 細胞(培養仔イヌ腎細胞)¹⁾ のプロセミド阻害も K^+ と Rb^+ を識別しないが、前者

の RVI(後述)はブメタニド感受性で、 Na^+ をコリンで置換すると阻害される⁴⁰⁾。アヒル赤血球の研究によれば、共輸送体の Na^+ と K^+ 結合部位の間に協調的相互作用があつて、特異的 ^3H -ブメタニド結合を増強する。 Na^+ 部位の選択性は $\text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{NH}_4^+$ の順、 K^+ 部位のそれは $\text{K}^+ = \text{Rb}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Cs}^+$ の順である。従つて Na^+ と K^+ は厳密に識別され、 K^+ 部位は Rb^+ と K^+ をほとんど識別せず、 NH_4^+ も K^+ 部位に対して比較的高い親和性をもつ。 Li^+ は部分的に Na^+ の代わりをするが、他のイオンは代替できない³⁸⁾。

Cl^- を NO_3^- で置換すると共輸送を介する Na^+ 、 K^+ の取り込みは起こらない⁵⁵⁾。マウス腎のヘンレループ上行脚細胞のブメタニド感受性 K^+ 取り込みに及ぼす Cl^- 代替イオンの効果には多様性があり、 NO_3^- 置換は濃度に比例する取り込み増加、メチルスルファートと硫酸塩置換では上に凹型の増加、グルコン酸塩ではシグモイド状の飽和曲線を呈する⁴⁹⁾。エールリッヒ腹水腫瘍細胞の RVI は NO_3^- の置換で阻害される⁴⁰⁾。アヒル赤血球の研究では、 ^3H -ブメタニド結合を指標にした高親和性 Cl^- 部

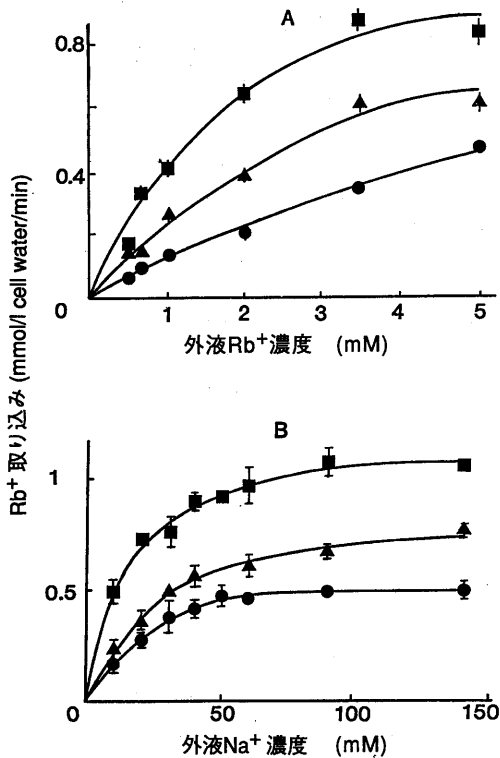


図1. ウバイン非感受性・フロセミド感受性 Rb^+ 取り込みに及ぼす外液イオンの刺激効果. A. Na^+ の効果: ●10 mM Na^+ , ▲30 mM Na^+ , ■140 mM Na^+ . B. Na^+ と Cl^- の効果: ●45 mM Cl^- , ▲60 mM Cl^- , ■140 mM Cl^- . 各点は4回の実験値の平均, バーは標準偏差を示す. (Miyamoto, H. et al.⁶⁸⁾より引用)

位の選択性は $\text{Cl}^- > \text{SCN}^- > \text{Br}^-$ の順に強く, NO_3^- , メトスルファートとグルコン酸は無縁である³⁸⁾. 一方, 低親和性 Cl^- 部位では $\text{SCN}^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$ の順で, メトスルファートとグルコン酸はやはり無縁である. しかし高親和結合部位のイオン選択性の方がはるかに強いので, 陰イオン輸送の特異性を決定する. $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送に関する Cl^- 滴定曲線の形は置換した陰イオンの種類によって違うので^{76, 82)}, 置換イオンと Cl^- 部位が相互作用すると考えられる. HeLa 細胞では, NO_3^- , SCN^- , は Cl^- とほぼ同程度, 乳酸と酢酸はこれらより低い親和性を示し, スルファミン酸とグルコン酸は無縁である⁶⁸⁾. そこでスルファミン酸

を代替イオンに用いて外液 Cl^- 濃度を調整すると, フロセミド感受性 Rb^+ 取り込みはシグモイド(図2A), NO_3^- と SCN^- を用いた場合は上に凹型を呈する(図2B). 速度論的解析から, この違いは親和性の異なる2つの Cl^- 部位に対してスルファミン酸は結合しないが, NO_3^- と SCN^- は Cl^- の結合を競争阻害するためであると説明できる.

同様に反体側のイオンの影響についてみる. 先ずヒト赤血球の内液 Na^+ 濃度の増加はフロセミド感受性 Na^+ 取り込みを刺激するが, アヒル赤血球では逆にフロセミド感受性 Rb^+ 取り込みを抑制する¹⁸⁾. また外液 K^+ 濃度が増加すると, フロセミド感受性 Na^+ 流出が低下するのに反し, 外液 Na^+ 濃度の変化はフロセミド感受性 K^+ 流出には影響しない³⁰⁾. 等張または高張海水中でイカ巨大軸索のブメタニド感受性 K^+ 取り込みは内液 Cl^- によって濃度依存性に阻害され^{6, 94)}, 培養仔牛動脈内皮細胞

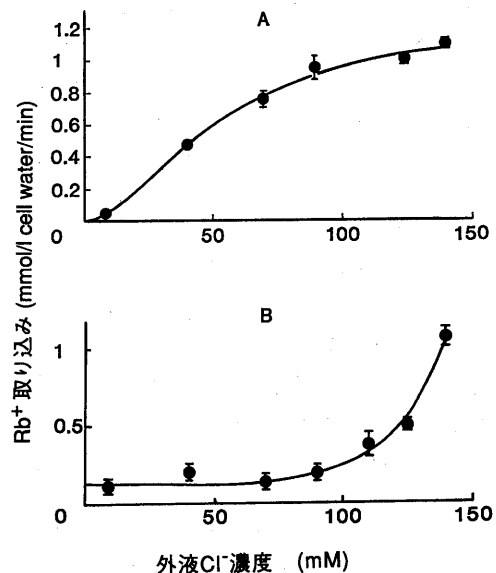


図2. 他の1価陰イオンによる外液 Cl^- の置換がウバイン非感受性・フロセミド感受性 Rb^+ 取り込みに及ぼす影響. A. スルファミン酸による置換. B. NO_3^- による置換. 各点は4回の実験値の平均, バーは標準偏差を示す. (Miyamoto, H. et al.⁶⁸⁾より引用)

でも、化学ポテンシャル勾配からは可能であるのに等張・高張条件でイオン取り込みが生じないことから、細胞内 Cl^- の阻害効果が考えられる⁷⁸⁾。予めアルカリを負荷したラット耳下腺腺胞細胞を正常培養液に帰すと、ブメタニド感受性の NH_4^+ 流出が起こって細胞内 pH が回復するが、回復は外液 Cl^- を除去すると逆に阻害される⁸⁷⁾。この様に細胞、イオンの種類等によって結果はまちまちで、まだ統一した見解を引き出すことは困難である。HeLa 細胞のフロセミド感受性 Rb^+ 取り込みは細胞内液 K^+ の増加によって刺激、細胞内 Na^+ の増加によって阻害を受ける⁴⁵⁾。速度論的解析の結果、輸送部位とは別に想定される細胞内の調節性イオン結合部位に K^+ が結合するときは Rb^+ が共輸送され、 Na^+ が結合するかイオンを結合しないときは共輸送できないと推定している。

IV. 細胞容積と浸透圧の影響

細胞は低張溶液中で直ちに膨張するが、中にはやがて収縮を始めて元の容積に復帰するものがあり、調節性容積減少 regulatory volume decrease (RVD) という。逆に高張溶液では一度浸透圧的に収縮したのち増加に転じ、元の容積に戻るものがあり、調節性容積増加 regulatory volume increase (RVI) という。細胞膜には細胞容積変化を感知する受容体の存在が認められ、浸透圧変化その他の理由で $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送以外に Na^+/H^+ 交換⁸⁰⁾、 K^+/Cl^- 共輸送^{50,77)}、 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル^{44,70)}、 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換²¹⁾ 等のイオン輸送系が刺激されて調節性容積変化が起こる。

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送活性は高浸透圧または細胞収縮で刺激され、細胞のイオンと水の取り込みが増加する。例えば、ラット赤血球は高張溶液で収縮し、ブメタニド感受性 $^{86}\text{Rb}^+$ の取り込みが約 2 倍に⁸⁰⁾、培養ヒト網膜色素細胞のそれは外液浸透圧が 30% 増すと 2.5 倍に上がる⁵¹⁾。イカ巨大軸索のブメタニド感受性 Cl^- 取り込みも高張海水で増加する⁶⁾。Hoffmann

ら(1983)はエールリッヒ腹水腫瘍細胞を低張培養液に入れて RVD を起こし、次ぎに等張溶液に戻すと収縮した後、5 分以内に容積の回復をみている⁴⁰⁾。この RVI はフロセミドとブメタニドで強力に阻害され、陰イオン交換系の阻害剤 DIDS は無効である。RVI の一次過程として、細胞収縮によるブメタニド感受性の Na^+ と Cl^- 取り込みの刺激が認められる。骨肉腫芽細胞¹¹²⁾、仔牛動脈内皮細胞⁷⁸⁾ の共輸送も細胞収縮で刺激され、特に低張溶液で細胞を膨張後、等張溶液に移して収縮させるとき効果が大きい。培養腎上皮様細胞のように低張溶液で RVD、次ぎに等張溶液で収縮、最後に低張溶液で容積が回復するという複雑な過程を経る場合にも、最終の RVI はフロセミド感受性である⁷¹⁾。ラット赤血球では高張溶液で収縮後に共輸送の活性化が生じ、しかも Na^+/H^+ 交換系の活性化よりも早く起こる⁷⁹⁾。

他方、高浸透圧による細胞収縮に伴って共輸送が刺激されても、必ずしも RVI が生じないものがある。HeLa 細胞のフロセミド感受性 $^{86}\text{Rb}^+$ 取り込みは高張溶液で刺激されるが、細胞自体は理想的な浸透圧計として働き、収縮状態を保つ¹⁰⁵⁾。蔗糖を加えた高張溶液でエールリッヒ腹水腫瘍細胞が収縮するときも共輸送は活性化するが、細胞容積は回復しない。しかしイオンを加えて高張にすると RVI が生じる⁴⁷⁾。蔗糖添加の場合、 Na^+ 、 K^+ と Cl^- の化学ポテンシャル総和の外向き勾配が大きいため正味のイオン流出が起こって収縮が持続するのに対し⁵⁸⁾、イオン添加の場合には流出が減少し、収縮後には正味のイオン流入に転じるからであろう。

ニワトリ小腸細胞の共輸送は高張溶液中で細胞収縮によって活性化し、逆に低張溶液では細胞の膨潤によって抑制される⁷⁰⁾。動脈内皮細胞でも同様な現象が観察され⁵³⁾、培養液の浸透圧を小刻みに増加して行くと共輸送活性の顕著な刺激、減少して行くと低下が起こる⁷³⁾。低張溶液だけでなく、高 K^+ 濃度の等張溶液で細胞が膨潤したときにも共輸送が阻害され

る⁷⁸⁾。この種の細胞の容積変化による輸送の調節は輸送体の磷酸化速度の変化と関係があるといわれ、容積感受性プロテインキナーゼが存在する可能性を示す⁵³⁾。

マニトールを加えて浸透圧を上げると、HeLa 細胞のプロセミド感受性 Rb^+ 取り込みは 390 mOsm まで増加し、それ以上浸透圧をあげても増加しない⁴⁵⁾ (図 3)。このとき浸透圧増加は、外液 Rb^+ のみかけの K_m には影響しないで、みかけの $V_{\max}$ が増加することが明らかになった。高張溶液で収縮した気道上皮細胞(イヌ)では特異的 ^3H -プメタニド結合が増加する⁶⁵⁾。ヘンレループ上行脚細胞(マウス)の特異的 ^3H -プメタニド結合も浸透圧の増加と

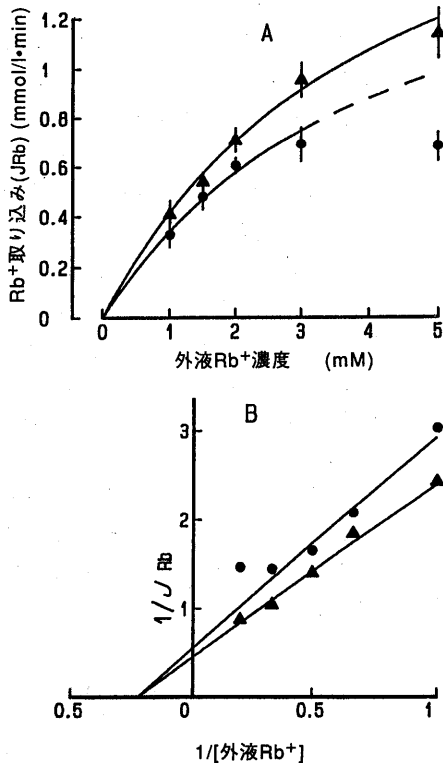


図3. マニトール添加による高浸透圧がウワバイン非感受性・プロセミド感受性 Rb^+ 取り込みに及ぼす刺激効果. A. ●対照, ▲200 mM マニトール. B. Aのデータの両逆数プロット. 各点は4回の実験値の平均, バーは標準偏差を示す. (Ikehara, T. et al.⁴⁵⁾より引用)

ともに増加し、低張溶液では低下するが、結合部位のイオン転回数は浸透圧の影響を受けない⁴⁹⁾。また動脈内皮細胞が収縮しても、プメタニド結合部位1個当りの輸送速度は変化しないことが証明されている⁷⁸⁾。従って、細胞容積の変化による共輸送の調節は主に活性化した共輸送体数の変化によると推定される。

共輸送は RVI において特に Cl^- の輸送経路として重要であるが、イオン輸送が全てこの輸送系を経由して生じるのではなく、他の輸送系と協同する場合が少なくない。例えば等張溶液にプメタニドとクロロチアジドを同時添加すると、ウサギ心筋細胞の容積が減少することから、 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送と Na^+/Cl^- 共輸送の両者が細胞容積調節に関与することがわかる¹⁷⁾。骨肉腫細胞の RVI の70%はプロセミド感受性であるが、25%はアミロリド感受性 (Na^+/H^+ 交換系)である⁵²⁾。低温の K^+ 欠乏培養液中で収縮したエールリッヒ腹水腫瘍細胞を正常培養液に戻したときに起こる RVI は、 Na^+ ポンプと共輸送の組み合わせで生じる Na^+ 流出と KCl 取り込みによって維持される⁵⁷⁾。さらに肝細胞³⁷⁾の RVI やイヌ腎細胞 (MDCK)⁹²⁾を低張から等張溶液に移したときの RVI には共輸送が関与しない。なおエールリッヒ腹水腫瘍細胞の RVI はプメタニド感受性の Na^+/Cl^- 共輸送で生じ、 K^+ は関与しないとされてきたが⁴⁰⁾、その後の研究で K^+ の必要性即ち $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送であることが明らかにされている^{46, 59)}。特殊な例として、細胞が低張溶液で膨潤した後、RVDを生じて KCl の流出が起こるときにプロセミドが阻害すると報告されているものの、結果の再現性は低い¹⁰⁴⁾。また細胞収縮がイオン交換だけを活性化し、共輸送体を介する正味のフラックスを変化させない場合もある⁹¹⁾。

細胞容積変化が共輸送に及ぼす影響の機作を解明する研究が行われている。温度を49℃に上げるとき、等張溶液ではラット赤血球の基本的な共輸送が影響されないのに、高張溶液では細胞収縮に伴う活性化が損なわれる。この高温に

おける輸送機構の性質の変化と蛋白質スペクトリンの熱変性に関するデータの比較検討から、細胞骨格が容積調節に関与する可能性があるという⁷⁹⁾。ミラノ系高血圧発症ラット(MHS)の赤血球では正常血圧ラットの赤血球よりも共輸送の速度が大きい²⁶⁾。一方、内外反転した膜小胞を作ると両赤血球の共輸送速度は同じになり、このとき細胞膜の骨格蛋白質が消失する。そこで骨格蛋白質を保有する赤血球ゴーストを作製して再び共輸送の速度を比較すると、やはり MHS の方が速いことから、細胞膜骨格蛋白質の異常が共輸送速度増加の原因であると説明される²⁶⁾。MHS 赤血球が速い共輸送を示す理由には細胞内 Na^+ に対する親和性が高いことを挙げ²⁵⁾、また調節性の骨格蛋白質の候補としては分子量 110-kDa のアッズシンを考えている^{67,96)}。エールリッヒ腹水腫瘍細胞は低張曝露してから高張処理すると、収縮後に RVI を起こす。この前処置の低張曝露中にマイクロフィラメントに著明な変化が起こり、RVD を伴う¹³⁾。そこで Ca^{2+} 存在下、低張曝露またはサイトカラシン B の処理でアクチン線維の集合を乱すと、細胞膨潤の段階で共輸送が活性化することが明らかになってきた⁴⁸⁾。しかし高張溶液ではこの様なアクチン集合体の乱れが生じないので、細胞収縮後の共輸送活性化には、正常なマイクロフィラメント系が関与する別個の調節機構が働くと推定される⁴⁸⁾。以上、研究者によって候補に挙げる蛋白質の種類は違うが、細胞膜の骨格蛋白質が共輸送の調節に何かの関係をもつという見解は一致する。なお低張溶液での共輸送活性化は、前述の低張溶液及び細胞膨潤の阻害効果と矛盾するので、今後さらに追究する必要がある。

V. 細胞内代謝とシグナル伝達系の役割

エールリッヒ腹水腫瘍細胞の共輸送活性は細胞内 ATP レベルに応じて変化し、ATP はエネルギー源よりも共輸送の調節因子として重要であると提唱されてから³¹⁾、共輸送の細胞代謝依存性に関する研究が行われてきた^{15,28,31)}。

シロイタチ赤血球の ATP レベルをブドー糖欠乏または 2-デオキシグルコース(2-DG)添加によって 100 μM 以下に低下すると、共輸送が阻害され、ATP 量を正常に戻すと共輸送も部分的に回復する²⁸⁾。イカ巨大軸索のブメタニド感受性外向き Na^+ 、 Cl^- 輸送は ATP 欠乏によって減少する³⁾。

ATP レベルが正常なシロイタチ赤血球では、細胞内遊離 Mg^{2+} 濃度が増加すると共輸送活性は著明に増加するが、ATP が枯渇すると Mg^{2+} の効果はない²⁸⁾。また 2 価イオンのイオノフォア A 23187 存在下で細胞内 Mg^{2+} が減少すると共輸送が低下する²⁷⁾。ヒト赤血球の共輸送も ATP 依存性があり¹⁵⁾、 Mg^{2+} が欠乏すると共輸送は低下、増加すると刺激される⁶⁴⁾。

これらの結果は共輸送が、輸送体蛋白質の磷酸化によって活性化、脱磷酸化によって非活性化される可能性を示す。共輸送の調節に蛋白質磷酸化が関与する証拠として、動脈内皮細胞ではプロテインホスファターゼの阻害剤オカダ酸とカリクリンが共輸送を刺激するのに対し、プロテインキナーゼの阻害剤 K 252 a がこれを阻害する事実がある^{53,87)}。ホスファターゼ 1 型阻害剤のカリクリンは作用がオカダ酸の 50 倍も強力であることから、脱磷酸化はホスファターゼ 1 型を経由して起こると推定される。この様に蛋白質の磷酸化は共輸送活性の前提条件であり、プロテインホスファターゼとキナーゼの間のバランスで左右されるため、キナーゼ活性を特に刺激しなくてもホスファターゼ阻害だけで輸送活性が変化する⁸³⁾。

我々は酸化的磷酸化の脱共役剤 CCCP の存在下で、培養液のグルコース濃度を変えて細胞内 ATP を正常値以下の各値に変化させ⁴³⁾、HeLa 細胞のプロセミド感受性 Rb^+ 取り込みと ATP レベルの関係について調べた⁴²⁾。その結果、ATP はやはりエネルギー源ではないこと、その濃度の増加によって Rb^+ 取り込みの V_{max} は影響を受けないが、 K^+ (Rb^+) に対する親和性が増加すること、即ち輸送体の活性化

は活性部位数の増加ではなく、質的变化によることを解明した。共輸送体が $1\text{Na}^+/1\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ を輸送するに当って、 Rb^+ と Cl^- の結合時(別の実験結果から Rb^+ と Cl^- は同時に結合)に ATP を要求し(図 4), ADP や AMP の効果はない。 ^3H -プメタニドの気道上皮細胞基底外側膜への結合は ATP や UTP で刺激され、ヌクレオチドによる Cl^- チャネルを介する先端側 Cl^- 流出促進の 2 次的効果であるといわれるが³⁵⁾, Cl^- 流出を生じない嚢胞線維症の鼻粘膜上皮細胞でもヌクレオチドによる ^3H -プメタニド結合の増加がみられる³⁵⁾。共輸送と ATP の化学量論的關係については、研究者間で差異がみられ、ATP 作用部位数を 1 個⁹⁵⁾ または 2 個⁴²⁾ とするもの、一定の關係が成立しない

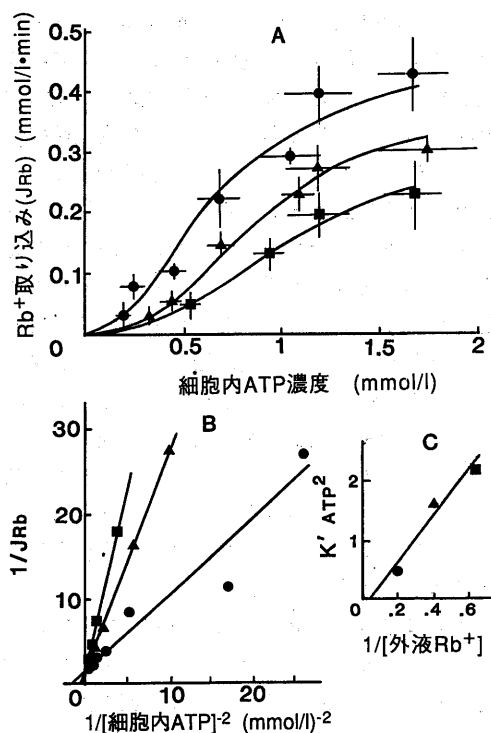


図 4. ウバイン非感受性・フロセミド感受性 Rb^+ 取り込みに及ぼす細胞内 ATP の刺激効果. A. 外液 Rb^+ の影響: $\bullet$ 5 mM, $\blacktriangle$ 2.5 mM, $\blacksquare$ 1.6 mM. 各点は 4 回の実験値の平均, バーは標準偏差を示す. B. A のデータの両逆数プロット. C. B で求めた Rb^+ の見かけの K_m と細胞内 ATP レベルの關係. (Ikehara, T. et al.⁴²⁾ より引用)

とするもの²⁸⁾に意見が分かれる. ATP の作用仮説には、1) 共輸送体に直接結合するアロステリックな調節因子、2) 輸送体蛋白質を磷酸化して輸送活性を上げるためのプロテインキナーゼの基質であるとする 2 つの考え方がある⁸³⁾. プロテインホスファターゼとキナーゼの阻害剤を用いた研究結果は 2) の意見を支持するが、早急に結論を出すことはできない。なお、2-DG によってヒト赤血球の ATP を減少させても、プメタニド感受性および Cl^- 依存性 K^+ 輸送を阻害しないという報告もあることを補足する⁷⁷⁾。

次ぎに細胞内シグナル伝達系の役割を調べた研究を紹介する。先ずヒト赤血球のプメタニド感受性 K^+ 取り込みや⁷⁷⁾, HeLa 細胞のフロセミド感受性 Rb^+ 取り込みには細胞内 cAMP の効果がない⁴²⁾。しかしイソプロテレノルや cAMP アナログは気道上皮細胞基底外側膜の ^3H -プメタニド結合を刺激し³⁵⁾, cAMP を増加させるホルスコリンは骨肉腫芽細胞のプメタニドまたはフロセミド感受性 $^{86}\text{Rb}^+$ 取り込みを刺激する¹¹²⁾。上皮小体ホルモンとプロスタグランジン E_2 はこの細胞の cAMP と遊離 Ca^{2+} 濃度を増加, PKC を刺激, 同時に共輸送の活性化を起こすのに反し, エンドセリンは遊離 Ca^{2+} 濃度を上げ, PKC を刺激するが, cAMP を増加せず, 共輸送には無効果である¹¹²⁾。RVI を指標とした場合も, ホルスコリンと IBMX の同時作用で刺激される⁵²⁾。β 受容体アゴニストのイソプロテレノル, ノルアドレナリンはラット耳下腺腺細胞の共輸送を経由する NH_4^+ 流出を刺激, アンタゴニストのアテノロールが阻害する⁸⁷⁾。8-プロモ cAMP や IBMX も刺激するが, プロテインキナーゼ阻害剤 H9, スタウロsporin や K 252 a は阻害する⁸⁷⁾。

以上の結果に対し, 培養ヒトリンパ腫瘍細胞のプメタニド感受性 $^{86}\text{Rb}^+$ 取り込みはイソプロテレノルで顕著に抑制され, 同時に cAMP 依存性プロテインキナーゼ A (PKA) とアデニレートシクラーゼの活性化が生じる。イソプロテレノルの阻害は β-アドレナリン受容体アン

タゴニストのナドロールが除去し、ジブチリル cAMP も抑制効果を示すことから、PKA の活性化はこの細胞の共輸送を阻害する²⁴⁾。同様な cAMP の阻害効果は内皮細胞⁷⁾、血管平滑筋細胞⁷⁴⁾で報告されている。

アフリカツメガエルの培養尿管細胞の特異的 ^3H -ブメタニド結合はイオノマイシン、アデノシンやホルスコリンで刺激、PKC を活性化するホルボルエステルで阻害される²²⁾。ホルボルエステルは骨肉腫芽細胞^{52,112)}、血管平滑筋細胞⁸¹⁾及びヒト大腸腺癌細胞²⁹⁾の共輸送も阻害する。逆に、この阻害剤による線維芽細胞の PKC 活性化が逆に共輸送を刺激するという報告もある^{47,84,86)}。

他方、ホルボルエステルでプロテインキナーゼ C (PKC) を刺激しても BALB/c 3 T 3 線維芽細胞の共輸送は影響されないが、 Ca^{2+} 濃度を一過性に上げる血清や各種の成長因子で活性化される。このときカルモジュリン阻害剤のトリフルオペラジンかクロロプロマジンと細胞内 Ca^{2+} 動員を阻害する TMB-8 を投与すると、血清や成長因子で刺激した共輸送をブロックする¹⁰¹⁾。舌下線の腺胞細胞では、イオノマイシンやカルバコル(ムスカリン受容体アゴニスト)による Ca^{2+} 濃度の上昇はブメタニド感受性の細胞内 Na^+ 濃度増加を引き起こし、この増加は Ca^{2+} のキレート剤で阻害される¹¹⁴⁾。エールリッヒ腹水腫瘍細胞でも、ホスフォリパーゼ C を刺激するブラジキニンが細胞内 Ca^{2+} を動員し、ブメタニド感受性 K^+ 取り込みを促進するが、カルモジュリン阻害剤ピモジドはこの取り込みを阻害する⁴⁷⁾。

以上の結果はやや錯綜しているが、 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送が各種細胞内シグナル伝達系の調節作用をうけ、その効果は細胞や阻害剤の種類によって一様でないことがわかる。cAMP の増加は PKA を活性化し、共輸送を刺激する場合が多いが、逆の例もある。PKC の刺激に関しても、共輸送を抑制するとする報告が多い反面、無関係または刺激作用を示すものがある。細胞内遊離 Ca^{2+} の増加は共輸送を促進し、 Ca^{2+} -

カルモジュリン系等の関与が考えられる。

シグナル伝達系が共輸送に及ぼす効果はどのような機作で生じるのだろうか。家兎腎のヘンレ上行脚細胞(SV40変換細胞)の cAMP 生成とブメタニド感受性 $^{86}\text{Rb}^+$ 取り込みはカルシウムその他の物質で刺激されるが、このとき Rb^+ に関するみかけの K_m は変わらないで、みかけの V_{max} が増加する¹¹¹⁾。ヒト大腸癌細胞に cAMP を数時間作用するときも共輸送の活性化が起こり⁹⁹⁾、アクチノマイシン D やシクロヘキシミドで阻害されないことから²⁹⁾、既存の輸送体の活性化または動員によって起こると考えるべきである。また血管作動性腸管ペプチド(VIP)がこの細胞のブメタニド感受性 K^+ 取り込みを刺激するが、多分 cAMP の増加の結果であろう¹⁰⁸⁾。このときも K^+ に関するみかけの K_m は変化しないでみかけの V_{max} が増加する。ラット腎糸球体のメサンギウム細胞では、ホルボルエステルまたは細胞内遊離 Ca^{2+} の増加によって共輸送が一過性に増加した後減少に転じ、8-プロモ cAMP 或はホルスコリンと IBMX の組み合わせの場合は一過性に抑制した後増加に転じる。いずれも2相性の調節であり、特に後半の調節は主に共輸送活性部位数の変化による⁴¹⁾。このようにシグナル伝達系を介する共輸送の調節は、輸送体の質的变化よりも活性型の数の変化に基づくことを支持する結果が多い。

VI. ブメタニド結合と輸送体蛋白質分子

ブメタニドは細胞膜の特定部位へ特異的に結合する性質をもっている。この結合部位についてはまだ十分に解明されていないが、アヒル赤血球ではブメタニドの共輸送阻害に対して外液 Cl^- が競争的に作用することから³⁶⁾、輸送体の Cl^- 結合部位がブメタニド結合部位であると考えられてきた。しかし近年、同種の赤血球或は膜標品を用いた研究から、 ^3H -ブメタニド結合に対して Cl^- が2相性の影響を与えることがわかってきた^{32,38,109)}。低濃度における高親和性部位への Cl^- 結合はブメタニド結合を

刺激するが、高濃度における低親和性部位への Cl^- 結合はこれを阻害するので、少なくとも低親和性部位とブメタニド結合部位は同一でないといえる^{38,109)}。

アヒル赤血球ではブメタニド結合部位数の増加と共輸送活性の促進との間に相関性が認められ^{32,33)}、家兎耳下腺細胞の基底外側膜小胞の ^3H -ブメタニド結合は Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- に強い依存性がある。他の細胞でも外液の Na^+ 、 K^+ または Cl^- を欠くと特異的 ^3H -ブメタニド結合が極端に低下する⁴⁹⁾。このような理由からブメタニド結合は共輸送活性の重要な指標として使用することができる。Sarkadi と Parker (1991) は相関性の原因として、輸送体の活性化に伴ってブメタニドが膜内へ組み込み込まれるか、或は機能している輸送体だけがブメタニドを結合するためではないかと考えている⁹⁷⁾。

ブメタニド結合の至適 pH は 7.8~8.1 であり、6.0 まで減少すると結合能が急激に低下するので、共輸送体はプロトン附加によって阻害されるらしい³⁸⁾。特異的ブメタニド結合能をアフリカツメガエルの培養遠位尿細管細胞でみた場合、8.6 pmol/mg 蛋白質で、結合親和性 K_d は $1.6 \mu\text{M}$ である²²⁾。一方、ヒト大腸癌細胞²⁹⁾ と血管内皮細胞⁷²⁾ の飽和結合の K_d はそれぞれ $0.1\sim0.2 \mu\text{M}$ と $0.13 \mu\text{M}$ である。Kaji (1993) はマウス腎のヘンレループ上行脚細胞の ^3H -ブメタニド結合のスキッチャードプロットが直線に最もよくフィットするので、結合部位は 1 個であると推定し、一方、 K_d が $0.20 \mu\text{M}$ 、最大結合能が 0.63 pmol/mg 蛋白質であり、同時に測定したブメタニド感受性 K^+ 取り込みのデータを考慮して、ブメタニド結合部位数は 1 細胞当り 53,000 個、転回数は毎分 255 と結論している⁴⁹⁾。

阻害剤等の影響をみると、ヒト大腸癌細胞の ^3H -ブメタニド結合部位数はホルボルエステルによって減少する²⁹⁾。メサングウム細胞では前述のように共輸送活性に 2 相性の変化が起こり、ホルボルエステルは後半の輸送を阻害、ホルスコリン及び IBMX は刺激して、それぞれ

最大結合能(対照値 0.33 pmol/mg 蛋白質)の有意な減少と増加を生じるが、 K_d (対照値 $0.16 \mu\text{M}$) は変化しない⁴¹⁾。以上の結果は同じ阻害剤が引き起こす共輸送の V_{max} とイオン K_m の変化に一致する。ブメタニド結合の K_d 値はアフリカツメガエルの細胞を除いていずれもよく近似し、しかもブメタニドによる共輸送阻害の K_i 値(前述)とほぼ一致する。

七面鳥赤血球の共輸送を cAMP かアドレナリンで刺激すると 230-kDa の膜蛋白質が磷酸化し²⁾、またカエル赤血球の共輸送刺激と 240-kDa の蛋白質の磷酸化がよく似た時間経過を示すことが早くから報告されている⁹³⁾。近年、特異的な ^3H -ブメタニド結合を利用してウサギ耳下腺の基底外側膜の特定部位を標識し、表面活性剤を用いて約 200-kDa の分子量をもつ高親和性ブメタニド結合蛋白質を分離、部分純化することに成功している。表面活性剤処理は一旦ブメタニド結合能を失活させるが、大豆脂質の添加によって回復する¹¹⁰⁾。回復は各種の純粋な脂質の添加によっても可能で、特に細胞膜ではマイナーな負荷電性リン脂質のホスファチジルセリンが効果的であるのに対し、哺乳類形質膜の主要成分であるホスファチジルコリン等は効果がないから、この特殊な脂質の必要性はブメタニド結合親和性が異種細胞間で異なる理由を説明する¹²⁾。上記の分子量 200-kDa はイヌ腎尿細管上皮³⁴⁾ から分離した蛋白質の約 150-160-kDa と大差がない。後二者の蛋白質は光反応性ループ利尿剤 ^3H -BSTBA を用いて $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送体であると同定されている。サメ直腸腺からも 200-kDa のブメタニド結合性膜蛋白質を分離し、ホルスコリン投与か細胞収縮による共輸送の活性化に対応する磷酸化を認めている⁶⁰⁾。この蛋白質分子構造の特定領域を認識する複数の単クローン抗体を作り、その 1 つを利用して作製した免疫親和基質を用いて、蛋白質を 195-kDa のシングルバンドの段階(電気泳動法)まで純化している⁶³⁾。一方、エールリッヒ腹水腫瘍細胞では分子量の少ない 82-kDa と 39-kDa の蛋白質が

共輸送に関与するので^{19,23)}、大きい蛋白質のサブユニットか分解産物かであろうとみなされる¹⁹⁾。しかしサメ直腸腺の膜蛋白質の単クローン抗体はいずれも 80-kDa の物質を認識せず、またトリプシン等のプロテアーゼの分解産物にもこの大きさの物質が含まれないので疑問が残る⁶³⁾。

以上の事実から共輸送体の実体は分子量 150-200-kDa のリンと脂質を含む糖蛋白質であると推定されるが、今後の研究結果を待たなければならない。

VII. 共輸送体モデルと対称性

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送体のイオン結合解離が細胞膜を挟んで対称的に生じるかどうかは問題である。Lytle と McManus(1986)はアヒル赤血球で単純な glide symmetry のモデルを提唱してきた⁶²⁾。このモデルはイオンを充分結合した輸送体が内向きと外向き構造の間を素早く振動する。外向きの空の輸送体は Na^+ , Cl^- , Rb^+ (K^+), Cl^- の順にイオンを結合すると内向きに変わって、同じ順序でイオンを内液へ完全放出し空になるか、条件によっては、例えば Na^+ と Cl^- だけを放出し、内液から Na^+ と Cl^- を結合して内向きに戻る。前者では $1\text{Na}^+/1\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ を完全輸送、後者では $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{Na}^+_{\text{o}}$ が交換される。内向き輸送体の場合は逆の順序で内液イオンを結合する。我々は実験結果に基づき、HeLa 細胞のフロセミド感受性輸送が殆ど完全輸送だけであることを確かめてから、先ず Na^+ と低親和性部位へ Cl^- が、次いで Rb^+ (K^+) と高親和部位へ Cl^- が同時に結合してから、内向きに一齐に輸送されるというモデルを提唱してきた⁶⁸⁾。我々の結果を基にして、Stein(1990)は Na^+ の次ぎに Cl^- が結合し、次いで Rb^+ と Cl^- が任意に結合する可能性を指摘している¹⁰²⁾。

MaManus のモデルは細胞膜の両側で共輸送が対称であることを前提に置いているが、それには賛否両論がある。賛成論の根拠として、ヒト赤血球の共輸送にはこのモデルで説明できる

Na^+/K^+ 共輸送と $\text{K}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{o}}$ 交換¹⁸⁾、フロセミド感受性 $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{Na}^+_{\text{o}}$ 交換⁵⁾ が認められ、エールリッヒ腹水腫瘍細胞でもループ利尿剤感受性の 1 対 1 の $\text{Na}^+_{\text{i}}/\text{Na}^+_{\text{o}}$, $\text{K}^+_{\text{i}}/\text{K}^+_{\text{o}}$ 交換がある¹⁰⁷⁾。しかし同じ赤血球でも、外液 Cl^- を NO_3^- で置換すると内向き共輸送が消失するのに反し、外向き輸送ではイオンの相互依存がみられず、また外液 Na^+ は共輸送による K^+ 取り込みを刺激するが、内液 K^+ で刺激される Na^+ 流出がない⁵⁵⁾。マウス腎ヘンレループの上行脚細胞の外向き $^{86}\text{Rb}^+$ 輸送はブメタニドで阻害されないのが共輸送体を經由する $\text{K}^+_{\text{i}}/\text{Rb}^+_{\text{o}}$ 交換はない⁴⁹⁾。HeLa 細胞のフロセミド感受性 Rb^+ 取り込みは内液 Na^+ で阻害されるが、フロセミド感受性 K^+ 流出は外液 Na^+ の阻害を受けない(池原未発表)。これ等一連の結果は非対称説を支持する。

VIII. おわりに

$\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ 共輸送による Rb^+ (K^+) 取り込みが細胞の全 K^+ 取り込みに占める割合は、HeLa 細胞で約 25%⁶⁹⁾、マウス 3T3 細胞で 20~40%⁴⁾、ヒト網膜色素上皮細胞⁵¹⁾ では約 25% である。ヒトリンパ腫細胞²⁴⁾ と遠位尿管細胞(アフリカツメガエル)²²⁾ では実にそれぞれ 74% と 63% に達して最も主要な 1 価イオン輸送系となっている。全受動輸送に占める割合でいえば、HeLa 細胞で 71~77%⁶⁸⁾、マウス 3T3 細胞で 57%⁴⁾、エールリッヒ腹水腫瘍細胞では 76%¹⁰⁷⁾ であり、重要な経路であることがわかる。特に Cl^- にとって不可欠の輸送経路である。

この様に細胞間で多少の差異はあるが、共輸送がイオン輸送系の中で大きい比率を示すことは、細胞機能の遂行に重要な役割を果たすことを意味する。細胞によっては共輸送が常に活動するものもあれば、休止状態からホルモン、成長因子の刺激で活性化するものもあり、上皮細胞では分泌と吸収等、培養細胞や赤血球等では細胞内イオン環境の恒常性維持、容積調節等に役立つことは既に詳述した。

終りに細胞の基本的機能である増殖への影響

について触れておく。細胞周期の G_0/G_1 期で休止する BALB/c 3T3 細胞の共輸送は各種のミトゲンによって活性化される¹⁰¹⁾。胎児血清と各種の成長因子は休止中のヒト皮膚線維芽細胞の共輸送を劇的に刺激し、同時に細胞は G_0/G_1 期から脱出して S 期へ進行する。フロセミドやブメタニドは細胞周期の進行と DNA 合成を阻害し、しかも阻害は可逆的、特異的であるから共輸送が分裂発現のシグナル伝達において重要な役割をもつに相違ない⁸⁵⁾。他方、ハムスター線維芽細胞の場合には血清や各種の成長因子が共輸送と DNA 合成を刺激するが、ブメタニドは DNA 合成を阻害しないので、共輸送は細胞増殖に必須ではない⁸⁶⁾。従って細胞増殖に於ける共輸送の重要性は細胞によって異なる。

文 献

- Aiton, J. F., Brown, C. D. A., Ogden, P. & Simmons, N. L. (1982) K^+ transport in 'tight' epithelial monolayers of MDCK cells. *J. Membr. Biol.*, **65**, 99-109
- Alper, S. L., Beam, K. G. & Greengard, P. (1980) Hormonal control of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ co-transport in turkey erythrocytes. Multiple site phosphorylation of goblin, a high molecular weight protein of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, **255**, 4864-4871
- Altamirano, A. A. & Russell, J. M. (1987) Coupled $\text{Na}/\text{K}/\text{Cl}$ efflux. "Reverse" unidirectional fluxes in squid giant axons. *J. Gen. Physiol.*, **89**, 669-686
- Atlan, H., Snyder, D. & Panet, R. (1984) Ouabain-resistant Na^+ , K^+ transport system in mouse NIH 3T3 cells. *J. Membr. Biol.*, **81**, 181-188
- Brand, S. C. & Whittam, R. (1985) The change from symmetry to asymmetry of a sodium transport system in red cell membranes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **223**, 449-457
- Breitwieser, G. E., Altamirano, A. A. & Russell, J. M. (1990) Osmotic stimulation of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransport in squid giant axon is $[\text{Cl}^-]_i$ dependent. *Am. J. Physiol.*, **258**, C 749-C 753
- Brock, T. A., Brugnara, C., Canessa, M. & Gimbrone, M. A., Jr. (1986) Bradykinin and vasopressin stimulate $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransport in cultured endothelial cells. *Am. J. Physiol.*, **250**, C 888-C 895
- Brown, C. D. A. & Murer, H. (1985) Characterization of a $\text{Na} : \text{K} : 2 \text{Cl}$ cotransport system in the apical membrane of a renal epithelial cell line (LLC-PK₁). *J. Membr. Biol.*, **87**, 131-139
- Brugnara, C., Canessa, M., Cusi, D. & Tosteson, D. C. (1986) Furosemide-sensitive Na and K fluxes in human red cells. Net uphill Na extrusion and equilibrium properties. *J. Gen. Physiol.*, **87**, 91-112
- Canessa, M., Brugnara, C., Cusi, D. & Tosteson, D. C. (1986) Modes of operation and variable stoichiometry of the furosemide-sensitive Na and K fluxes in human red cells. *J. Gen. Physiol.*, **87**, 113-142
- Chipperfield, A. R. (1981) Chloride dependence of furosemide- and phloretin-sensitive passive sodium and potassium fluxes in human red cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **312**, 435-444
- Corcelli, A. & Turner, R. J. (1991) Role of phospholipids in the binding of bumetanide to the rabbit parotid $\text{Na}/\text{K}/\text{Cl}$ cotransporter. *J. Membr. Biol.*, **120**, 125-130
- Cornet, M., Lambert, I. H. & Hoffmann, E. K. (1993) Relation between cytoskeleton, hypo-osmotic treatment and volume regulation in Ehrlich ascites tumor cells. *J. Membr. Biol.*, **131**, 55-66
- Cremaschi, D., Porta, C., Botta, G. & Meyer, G. (1992) Nature of the neutral $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ coupled entry at the apical membrane of rabbit gallbladder epithelium: IV. Na^+/H^+ , $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ double exchange, hydrochlorothiazide-sensitive $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$ symport and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2 \text{Cl}^-$ cotransport are all involved. *J. Membr. Biol.*, **129**, 221-235
- Dagher, G., Brugnara, C. & Canessa, M. (1985) Effects of metabolic depletion on the furosemide-sensitive Na and K fluxes in human red cells. *J. Membr. Biol.*, **86**, 145-155
- DiMattio, J., Degnan, K. J. & Zadunaisky, J. A. (1983) A model for transepithelial ion transport across the isolated retinal pigment epithelium of the frog. *Exp. Eye Res.*, **37**, 409-420
- Drewnowska, K., & Baumgarten, C. M. (1991) Regulation of cellular volume in rabbit ventricular myocytes: bumetanide, chlorothiazide, and ouabain. *Am. J. Physiol.*, **260**, C 122-C 131
- Duhm, J. (1987) Furosemide-sensitive K^+ (Rb^+) transport in human erythrocytes: modes of operation, dependence on extracellular and intracellular Na^+ , kinetics, pH dependency and the effect of cell volume and N-ethylmaleimide. *J. Membr. Biol.*, **98**, 15-32
- Dunham, P. B., Jessen, F. & Hoffmann, E. K. (1990) Inhibition of $\text{Na}-\text{K}-\text{Cl}$ cotransport in Ehrlich ascites cells by antiserum against purified proteins of the cotransporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6828-6832
- Ellory, J. C. & Stewart, G. W. (1982) The human erythrocyte Cl -dependent $\text{Na}-\text{K}$ cotransport sys-

- tem as a possible model for studying the action of loop diuretics. *Br. J. Pharmac.*, **75**, 183-188
- 21) Eveloff, J. L. & Warnock, D. G. (1987) Activation of ion transport systems during cell volume regulation. *Am. J. Physiol.*, **252**, F1-F10
 - 22) Fan, P.-Y., Haas, M. & Middleton, J. P. (1992) Identification of a regulated $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport system in a distal nephron cell line. *Biochim. Biophys. Acta*, **1111**, 75-80
 - 23) Feit, P. W., Hoffmann, E. K., Schifft, M., Kristensen, P., Jessen, F. & Dunham, P. B. (1988) Purification of proteins of the Na^+/Cl^- cotransporter from membranes of Ehrlich ascites cells using a bumetanide-sepharose affinity column. *J. Membr. Biol.*, **103**, 135-147
 - 24) Feldman, R. D. (1992) β -adrenergic inhibition of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in lymphocytes. *Am. J. Physiol.*, **263**, C1015-C1020
 - 25) Ferrari, P., Torielli, L., Cirillo, M., Salardi, S. & Bianchi, G. (1991) Sodium transport kinetics in erythrocytes and inside-out vesicles from Milan rats. *J. Hypertens.*, **9**, 703-711
 - 26) Ferrari, P., Torielli, L., Salardi, S., Rizzo, A. & Bianchi, G. (1992) $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in resealed ghosts from erythrocytes of the Milan hypertensive rats. *Biochim. Biophys. Acta*, **1111**, 111-119
 - 27) Flatman, P. W. (1988) The effects of magnesium on potassium transport in ferret red cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **397**, 471-487
 - 28) Flatman, P. W. (1991) The effects of metabolism on $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ co-transport in ferret red cells. *J. Physiol. (Lond.)*, **437**, 495-510
 - 29) Franklin, C. C., Turner, J. T. & Kim, H. D. (1989) Regulation of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport and $[\text{H}^3]$ bumetanide binding site density by phorbol esters in HT 29 cells. *J. Biol. Chem.*, **264**, 6667-6673
 - 30) Garay, R., Adragna, N., Canessa, M. & Tosteson, D. (1981) Outward sodium and potassium cotransport in human red cells. *J. Membr. Biol.*, **62**, 169-174
 - 31) Geck, P., Pietrzyk, C., Burckhardt, B.-C., Pfeiffer, B. & Heinz, E. (1980) Electrically silent cotransport of Na^+ , K^+ and Cl^- in Ehrlich cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **600**, 432-447
 - 32) Haas, M., and Forbush, B., III. (1986) $[\text{H}^3]$ bumetanide binding to duck red cells. Correlation with inhibition of $(\text{Na} + \text{K} + 2\text{Cl})$ co-transport. *J. Biol. Chem.*, **261**, 8434-8441
 - 33) Haas, M. & Forbush, B., III. (1987) Na , K , Cl -cotransport system: characterization by bumetanide binding and photolabelling. *Kidney Int.* **32**, S134-S140
 - 34) Haas, M. & Forbush, B., III. (1987) Photolabeling of a 150-kDa $(\text{Na} + \text{K} + \text{Cl})$ cotransport protein from dog kidney with a bumetanide analogue. *Am. J. Physiol.*, **253**, C243-C252
 - 35) Haas, M., McBrayer, D. G. & Yankaskas, J. R. (1993) Dual mechanisms for $\text{Na}-\text{K}-\text{Cl}$ cotransport regulation in airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, **264**, C189-C200
 - 36) Haas, M. & McManus, T. J. (1983) Bumetanide inhibits $(\text{Na} + \text{K} + 2\text{Cl})$ co-transport at a chloride site. *Am. J. Physiol.*, **245**, C235-240
 - 37) Hässinger, D. & Lang, F. (1991) Cell volume in the regulation of hepatic function: a mechanism for metabolic control. *Biochim. Biophys. Acta*, **1071**, 331-350
 - 38) Hegde, R. S. & Palfrey, H. C. (1992) Ionic effects on bumetanide binding to the activated $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransporter: selectivity and kinetic properties of ion binding sites. *J. Membr. Biol.*, **126**, 27-37
 - 39) Hoffmann, E. K., Simonsen, L. O. & Lambert, I. H. (1984) Volume-induced increase of K^+ and Cl^- permeabilities in Ehrlich ascites tumor cells. Role of internal Ca^{2+} . *J. Membr. Biol.*, **78**, 211-222
 - 40) Hoffmann, E. K., Sjöholm, C. & Simonsen, L. O. (1983) Na^+ , Cl^- cotransport in Ehrlich ascites tumor cells activated during volume regulation (regulatory volume increase). *J. Membr. Biol.*, **76**, 269-280
 - 41) Homma, T. & Harris, R. C. (1991) Time-dependent biphasic regulation of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in rat glomerular mesangial cells. *J. Biol. Chem.*, **266**, 13553-13559
 - 42) Ikehara, T., Yamaguchi, H., Hosokawa, K. & Miyamoto, H. (1990) Kinetic mechanism of ATP action in $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport of HeLa cells determined by Rb^+ influx studies. *Am. J. Physiol.*, **258**, C599-C609
 - 43) Ikehara, T., Yamaguchi, H., Hosokawa, K., Sakai, T. & Miyamoto, H. (1984) Rb^+ influx in response to changes in energy generation: effects of the regulation of the ATP content of HeLa cells. *J. Cell. Physiol.*, **119**, 273-282
 - 44) Ikehara, T., Yamaguchi, H., Hosokawa, K., Takahashi, A., Masuya, T. & Miyamoto, H. (1992) Different patterns of cell volume regulation in hyposmotic media between attached and suspended HeLa cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1111**, 151-158
 - 45) Ikehara, T., Yamaguchi, H., Hosokawa, K., Takahashi, A. & Miyamoto, H. (1993) Kinetic study on the effects of intracellular K^+ and Na^+ on Na^+ , K^+ , Cl^- cotransport of HeLa cells by Rb^+ influx determination. *J. Membr. Biol.*, **132**, 115-124
 - 46) Jensen, B. S. & Hoffmann, E. K. (1990) On the K^+ -dependence of the cation-anion cotransport system in Ehrlich ascites tumor cells. *Acta Physiol. Scand.*, **140**, 34A
 - 47) Jensen, B. S., Jessen, F. & Hoffmann, E. K. (1993) Na^+ , K^+ , Cl^- cotransport and its regulation in

- Ehrlich ascites tumor cells. Ca^{2+} /calmodulin and protein kinase C dependent pathways. *J. Membr. Biol.*, **131**, 161-178
- 48) Jessen, F. & Hoffmann, E. K. (1992) Activation of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport system by reorganization of the actin filaments in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1110**, 199-201
 - 49) Kaji, D. M. (1993) $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in medullary thick ascending limb cells: kinetics and bumetanide binding. *Biochim. Biophys. Acta*, **1152**, 289-299
 - 50) Kaji, D. M. & Tsukitani, Y. (1991) Role of protein phosphatase in activation of KCl cotransport in human erythrocytes. *Am. J. Physiol.*, **260**, C178-C182
 - 51) Kennedy, B. G. (1990) $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in cultured cells derived from human retinal pigment epithelium. *Am. J. Physiol.*, **259**, C29-C34
 - 52) Khademazad, M., Zhang, B.-X., Loessberg, P. & Muallem S. (1991) Regulation of cell volume by the osteosarcoma cell line UMR-106-01. *Am. J. Physiol.*, **261**, C441-C447
 - 53) Klein, J. D., Perry, P. B. & O'Neill, W. C. (1993) Regulation by cell volume of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in vascular endothelial cells: role of protein phosphorylation. *J. Membr. Biol.*, **132**, 243-252
 - 54) Kort, J. J. & Koch, G. (1989) The $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport system in HeLa cells and HeLa cell mutants exhibiting an altered efflux pathway. *J. Cell. Physiol.*, **141**, 181-190
 - 55) Kracke, G. R., Anatra, M. A. & Dunham, P. B. (1988) Asymmetry of Na-K-Cl cotransport in human erythrocytes. *Am. J. Physiol.*, **254**, C243-C250
 - 56) Lauf, P. K. (1983) Thiol-dependent passive K/Cl transport in sheep red cells: II. Loss of Cl^- and N-ethylmaleimide sensitivity in maturing high K^+ cells. *J. Membr. Biol.*, **73**, 247-256
 - 57) Levinson, C. (1990) Regulatory volume increase in Ehrlich ascites tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1021**, 1-8
 - 58) Levinson, C. (1991) Inability of Ehrlich ascites tumor cells to volume regulate following a hyperosmotic challenge. *J. Membr. Biol.*, **121**, 279-288
 - 59) Levinson, C. (1992) Regulatory volume increase in Ehrlich ascites tumor cells is mediated by the 1 Na:1 K:2 Cl cotransport system. *J. Membr. Biol.*, **126**, 277-284
 - 60) Lytle, C. & Forbush, B., III. (1990) The [Na-K-Cl] cotransport protein is activated and phosphorylated by cell shrinkage or cyclic AMP in a secretory epithelium. *J. Cell Biol.*, **111**, 312 a
 - 61) Lytle, C. & Forbush, B., III. (1992) Na-K-Cl cotransport in the shark rectal gland. II. Regulation in isolated tubules. *Am. J. Physiol.*, **262**, C1009-C1017
 - 62) Lytle, C. & McManus, T. J. (1986) A minimal kinetic model of [Na+K+2Cl] cotransport with ordered binding and glide symmetry. *J. Gen. Physiol.*, **88**, 36 a
 - 63) Lytle, C., Xu, J.-C., Biemesderfer, D., Haas, M. & Forbush, B., III. (1992) The Na-K-Cl cotransport protein of shark rectal gland. I. Development of monoclonal antibodies, immunoaffinity purification, and partial biochemical characterization. *J. Biol. Chem.*, **267**, 25428-25437
 - 64) Mairbäurl, H. & Hoffman, J. F. (1992) Internal magnesium, 2,3-diphosphoglycerate, and the regulation of the steady-state volume of human red blood cells by the Na/K/2Cl cotransport system. *J. Gen. Physiol.*, **99**, 721-746
 - 65) Mason, S. J., Paradiso, A. M. & Boucher, R. C. (1991) Regulation of transepithelial ion transport and intracellular calcium by extracellular ATP in human normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Br. J. Pharmacol.*, **103**, 1649-1656
 - 66) McRoberts, J. A., Erlinger, S., Rindler, M. J. & Saier, M. H., Jr. (1982) Furosemide-sensitive salt transport in the Madin-Darby canine kidney cell line. Evidence for the cotransport of Na^+ , K^+ , Cl^- . *J. Biol. Chem.*, **257**, 2260-2266
 - 67) Mische, S. M., Mooseker, M. S. & Morrow, J. S. (1987) Erythrocyte adducin: A calmodulin-regulated actin-bundling protein that stimulates spectrin-actin binding. *J. Cell Biol.*, **105**, 2837-2845
 - 68) Miyamoto, H., Ikehara, T., Yamaguchi, H., Hosokawa, K., Yonezu, T. & Masuya, T. (1986) Kinetic mechanism of Na^+ , K^+ , Cl^- -cotransport as studied by Rb^+ influx into HeLa cells: Effects of extracellular monovalent ions. *J. Membr. Biol.*, **92**, 135-150
 - 69) Miyamoto, H., Sakai, T., Ikehara, T. & Kaniike, K. (1978) Effects of Rb^+ substituted for K^+ on HeLa cells: Cellular content and membrane transport of monovalent cations, and cell growth. *Cell Str. Funct.*, **3**, 313-324
 - 70) Montero, M. C. & Ilundáin, A. (1989) Effects of anisosmotic buffers on K^+ transport in isolated chicken enterocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **979**, 269-271
 - 71) Monterose, M. H., Knoblauch, C. & Murer, H. (1988) Separate control of regulatory volume increase and Na^+/H^+ exchange by cultured renal cells. *Am. J. Physiol.*, **255**, C76-C85
 - 72) O'Donnell, M. E. (1989) [^3H] bumetanide binding in vascular endothelial cells. Quantitation of Na-K-Cl cotransporters. *J. Biol. Chem.*, **264**, 20326-20330
 - 73) O'Donnell, M. E. (1993) Role of Na-K-Cl cotransport in vascular endothelial cell volume regulation. *Am. J. Physiol.*, **264**, C1316-C1326

- 74) O'Donnell, M. E. & Owen, N. E. (1986) Atrial natriuretic factor stimulates $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in vascular smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6132-6136
- 75) O'Grady, S. M., Musch, M. W. & Field, M. (1986) Stoichiometry and ion affinities of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport system in the intestine of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *J. Membr. Biol.*, **91**, 33-41
- 76) O'Grady, S. M., Palfrey, H. C. & Field, M. (1987) Characteristics and functions of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in epithelial tissues. *Am. J. Physiol.*, **253**, C177-192
- 77) O'Neill, W. C. (1991) Swelling-activated K^+/Cl^- cotransport: metabolic dependence and inhibition by vanadate and fluoride. *Am. J. Physiol.*, **260**, C308-C315
- 78) O'Neill, W. C. & Klein, J. D. (1992) Regulation of vascular endothelial cell volume by $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport. *Am. J. Physiol.*, **262**, C436-C444
- 79) Orlov, S. N., Kolosova, I. A., Cragoe, E. J., Gurlo, T. G., Mongin, A. A., Aksentsev, S. L. & Konev, S. V. (1993) Kinetics and peculiarities of thermal inactivation of volume-induced Na^+/H^+ exchange, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport and K^+/Cl^- cotransport in rat erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **1151**, 186-192
- 80) Orlov, S. N., Pokudin, N. I., Kotelevtsev, Y. V. & Gulak, P. V. (1989) Volume-dependent regulation of ion transport and membrane phosphorylation in human and rat erythrocytes. *J. Membr. Biol.*, **107**, 105-117
- 81) Owen, N. E. (1985) Effect of TPA on ion fluxes and DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *J. Cell Biol.*, **101**, 454-459, 1985.
- 82) Owen, N. E. & Prastein, M. L. (1985) $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **260**, 1445-1451
- 83) Palfrey, H. C. & Pewitt, E. B. (1993) The ATP and Mg^{2+} dependence of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport reflects a requirement for protein phosphorylation: studies using calyculin A. *Pflügers Arch.*, **425**, 321-328
- 84) Panet, R. & Atlan, H. (1990) Bumetanide-sensitive $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ transporter is stimulated by phorbol ester and different mitogens in quiescent human skin fibroblasts. *J. Cell. Physiol.*, **145**, 30-38
- 85) Panet, R. & Atlan, H. (1991) Stimulation of bumetanide-sensitive $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport by different mitogens in synchronized human fibroblasts is essential for cell proliferation. *J. Cell Biol.*, **114**, 337-342
- 86) Paris, S. & Pouysseur, J. (1986) Growth factors activate the bumetanide-sensitive $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in hamster fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **261**, 6177-6183
- 87) Paulais, M. & Turner, R. J. (1992) β -adrenergic upregulation of the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransporter in rat parotid acinar cells. *J. Clin. Invest.*, **89**, 1142-1147
- 88) Perry, P. B. & O'Neill, W. C. (1993) Swelling activated K^+ fluxes in vascular endothelial cells: volume regulation via K^+/Cl^- cotransport and K^+ channels. *Am. J. Physiol.*, **265**, C763-C769
- 89) Pewitt, E. B., Hegde, R. S., Haas, M. & Palfrey, H. C. (1990) The regulation of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport and bumetanide binding in avian erythrocytes by protein phosphorylation and dephosphorylation. Effects of kinase inhibitors and okadaic acid. *J. Biol. Chem.*, **265**, 20747-20756
- 90) Rindler, M. J., McRoberts, J. A. & Saier, M. H., Jr. (1982) $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ -cotransport in the Madin-Darby canine kidney cell line. Kinetic characterization of the interaction between Na^+ and K^+ . *J. Biol. Chem.*, **257**, 2254-2259
- 91) Rotin, D. & Grinstein, S. (1989) Impaired cell volume regulation in Na^+/H^+ exchange-deficient mutants. *Am. J. Physiol.*, **257**, C1158-C1165
- 92) Roy, G. & Sauvé R. (1987) Effect of anisotonic media on volume, ion and amino-acid content and membrane potential of kidney cells (MDCK) in culture. *J. Membr. Biol.*, **100**, 83-96
- 93) Rudolph, S. A. & Greengard, P. (1980) Effects of catecholamines and prostaglandin E_1 on cyclic AMP, cation fluxes, and protein phosphorylation in the frog erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, **255**, 8534-8540
- 94) Russell, J. M. (1983) Cation-coupled chloride influx in squid axon. Role of potassium and stoichiometry of the transport process. *J. Gen. Physiol.*, **81**, 909-925
- 95) Russell, J. M. (1990) Role of K^+ and ATP in $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport by the squid giant axon. In: Reuss, L., Russell, J. M. & Szabo, G., Regulation of K^+ transport across biological membranes. Univ. of Texas Press, Austin, 265-282
- 96) Salardi, S., Saccardo, B., Borsani, G., Modica, R., Ferrandi, M., Tripodi, M. G., Soria, M., Ferrari, P., Baralle, F. E., Sidoli, A. & Bianchi, G. (1989) Erythrocyte adducin differential properties in the normotensive and hypertensive rats of the Milan strain. Characterization of spleen adducin m-RNA. *Am. J. Hypertens.*, **2**, 229-237
- 97) Sarkadi, B. & Parker, J. C. (1991) Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biochim. Biophys. Acta*, **1071**, 407-427
- 98) Schmidt, W. F., III, & McManus, T. J. (1977) Ouabain-insensitive salt and water movements in duck red cells. I. Kinetics of cation transport under hypertonic conditions. *J. Gen. Physiol.*, **70**, 59-79
- 99) Slotki, I. N., Breuer, W. V., Greger, R. & Cabantchik, Z. I. (1993) Long-term cAMP activa-

- tion of $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ cotransporter activity in HT-29 human adenocarcinoma cells. *Am. J. Physiol.*, **264**, C 857-C 865
- 100) Smith, J. B. & Smith, L. (1987) $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in cultured vascular smooth muscle cells: stimulation by angiotensin II and calcium ionophores, inhibition by cyclic AMP and calmodulin antagonists. *J. Membr. Biol.*, **99**, 51-63
 - 101) Snyder, D., Atlan, H., Markus, M. & Panet, R. (1991) $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport is stimulated by a Ca^{++} -calmodulin-mediated pathway in BALB/c 3T3 fibroblasts. *J. Cell. Physiol.*, **149**, 497-502
 - 102) Stein, W. D. (1990) Channels, carriers, and pumps. An introduction to membrane transport., Academic Press, San Diego, 188-219
 - 103) Tas, P. W. L., Massa, P. T., Kress, H. G. & Koschel, K. (1987) Characterization of an $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ co-transport in primary cultures of rat astrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, **903**, 411-416
 - 104) Thornhill, W. B. & Laris, P. C. (1984) KCl loss and cell shrinkage in the Ehrlich ascites tumor cell induced by hypotonic media, 2-deoxyglucose and propranolol. *Biochim. Biophys. Acta*, **773**, 207-218
 - 105) Tivey, D. R., Simmons, N. L. & Aiton, J. F. (1985) Role of passive fluxes in cell volume regulation in cultured HeLa cells. *J. Membr. Biol.*, **87**, 93-105
 - 106) Tseng, H. & Berk, B. C. (1992) The $\text{Na}/\text{K}/2\text{Cl}$ cotransporter is increased in hypertrophied vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **267**, 8161-8167
 - 107) Tupper, J. T. (1975) Cation flux in the Ehrlich ascites tumor cell. Evidence for Na^+ -for- Na^+ and K^+ -for- K^+ exchange diffusion. *Biochim. Biophys. Acta*, **394**, 586-596
 - 108) Turner, J. T., Franklin, C. C., Bollinger, D. W. & Kim, H. D. (1990) Vasoactive intestinal peptide stimulates active K^+ transport and $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$ cotransport in HT-29 cells. *Am. J. Physiol.*, **258**, C 266-C 273
 - 109) Turner, R. J. & George, J. N. (1988) Ionic dependence of bumetanide binding to the rabbit parotid $\text{Na}/\text{K}/\text{Cl}$ cotransporter. *J. Membr. Biol.*, **102**, 71-77
 - 110) Turner, R. J. & George, J. N. (1990) Solubilization and partial purification of the rabbit parotid $\text{Na}/\text{K}/\text{Cl}$ -dependent bumetanide binding site. *J. Membr. Biol.*, **113**, 203-210
 - 111) Vuillemin, T., Teulon, J., Geniteau-Legendre, M., Baudouin, B., Estrade, S., Cassingena, R., Ronco, P. & Vandewalle, A. (1992) Regulation by calcitonin of $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{Cl}^-$ cotransport in a rabbit thick ascending limb cell line. *Am. J. Physiol.*, **263**, C 563-C 572
 - 112) Whisenant, N., Zhang, B.-X., Khademazad, M., Loessberg, P. & Muallem, S. (1991) Regulation of $\text{Na}-\text{K}-2\text{Cl}$ cotransport on osteoblasts. *Am. J. Physiol.*, **261**, C 433-C 440
 - 113) Zeuthen, T. (1991) Water permeability of ventricular cell membrane in choroid plexus epithelium from *Necturus Muculosus*. *J. Physiol. (Lond.)*, **444**, 133-151
 - 114) Zhang, G. H., Cragoe, E. J., Jr. & Melvin, J. E. (1993) Na^+ influx is mediated by $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ cotransport and Na^+-H^+ exchange in sublingual mucous acini. *Am. J. Physiol.*, **264**, C 54-C 62

〔編集後記〕

国民学校の生徒として戦争を実体験し、戦後、民主主義のもとで新しい日本の教育を受け、平和に対する感受性を備えた大江健三郎氏にノーベル文学賞が授与されたことは、我々の年代の者には、初めて戦後の日本が認められたという妙な感情が浮かぶのを禁じ得ない。まことに嬉しいことである。次には、同様の医学生理学賞受賞者が生まれることを期待したい。

今回は、重厚な実験講座と立派な総説を載せることが出来た。関連分野の研究者には重要な資料として残されると思うし、異なる分野の研究者にはリーダースダイジェストとして読ませて頂ける。

私の関連する他の学会でも日本語機関誌の在り方に

ついて理事会で討論されている。国際化が目覚ましい今日、日本語機関誌の在り方が検討されることは喜ばしいことと私は受け止めている。

大江氏が賞を授与された一つの因子は広く国際的に読まれるよう翻訳されたためであろう。日本の思想が翻訳者の手で世界に理解されはじめたといっても過言ではない。

このような視点から見ると、本学会の日本語機関誌の内容移行をJJPと共に考え、実行したことは時代の変化を反映するもので、好結果を生んだように思う。自画自賛であろうか。

(野口鉄也)

— 編 集 委 員 —

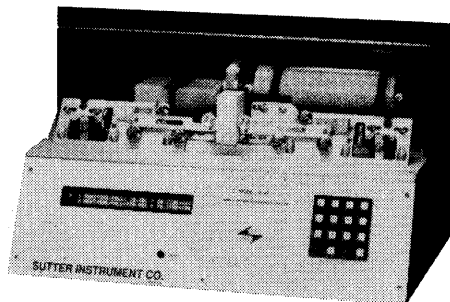
金 子 章 道(幹 事)	野 口 鉄 也	野 村 正 彦
神 田 健 郎	野 崎 修 一	中 島 祥 夫
青 木 藩(北海道)	土 居 勝 彦(東 北)	工 藤 典 雄(関 東)
松 波 謙 一(中 部)	福 田 淳(近 畿)	片 岡 喜 由(中・四国)
山 下 博(九 州)		



孤高の境地に到達するサッターのプラー (ガラス電極作製装置)

P-97 **NEW**

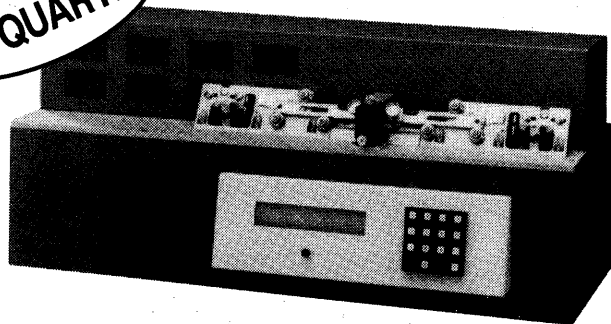
各界で圧倒的な支持を得た
銘器P-87をさらにブラッシュ・アップ。
再現性とユーティリティにいっそう
磨きをかけました。



- ◇日本で特に再現性の敵となる湿度の影響を最小限に抑えるフィラメント・ハード・カバーを装備
- ◇ヒーター電流25%強化・冷却エア能力強化により大径・肉厚ガラスにも余裕の対応
- ◇メモリ可能なプログラム数を一挙に100まで増加
- ◇P-87で立証されたすぐれたメカニカル・ハードウェアを踏襲

P-2000 **for QUARTZ**

計り知れないポテンシャルを
もつクォーツ・ガラスからの電極
作製を可能としたサッター会心
のプラー。



- ◇従来のガラスとは比較にならない強度をはじめ、数々のメリットを持つクォーツ・ガラスからあらゆる形状のガラス電極を作製します。通常のガラスにももちろん対応
- ◇レーザー光線を熱源としながら、金属フィラメントと同様の高操作性・安全性を達成

※クォーツ・ガラスの数々のアドバンテージをお知り頂くためにサンプルをお作りしています。
下記へお問合わせ下さい。

◆詳しい資料をご請求下さい



サッター社 日本総代理店

ショーシンEM株式会社

〒444-02 愛知県岡崎市赤浜町蔵西1-14 ショーシンビル2F

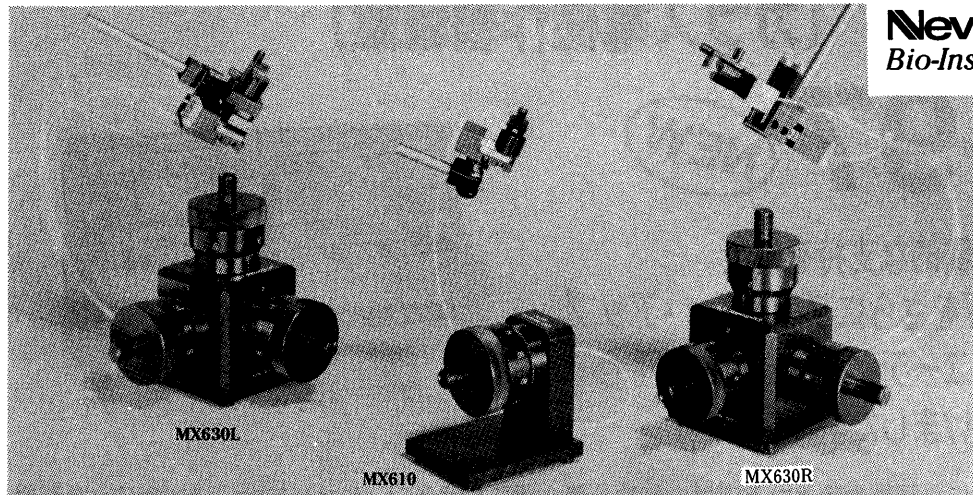
TEL. (0564) 54-1231番(代表)

FAX. (0564) 54-3207番

水圧式マイクロマニピュレータ



Newport.
Bio-Instruments



- コンパクトで遠隔操作型
- 低ドリフトで驚くべき安定性
- 高い分解能
- スムーズで応答性に優れた駆動
- 顕微鏡や粗動マニピュレータへのセッティングが簡単

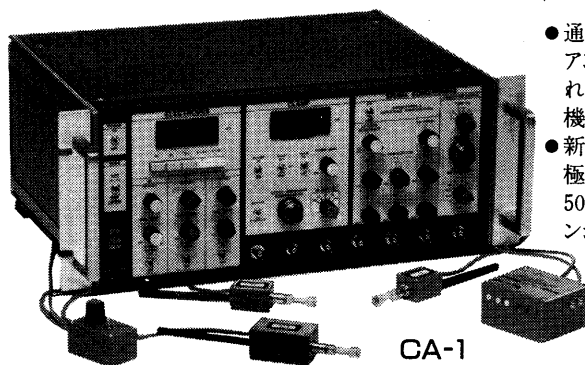
ニューポート社の高性能、低ドリフト型MX-610及びMX-630シリーズの水圧式マイクロマニピュレータは、他社で見られる多くの技術的な問題を解消しました。手動調節による駆動は円滑で応答性に優れ、Intracellularやパッチクランプの長時間記録をはじめ、マイクロインジェクションや超精密細胞刺入に理想的なマニピュレータです。同社独自の設計により定温下でのドリフトを $1\mu\text{m}/\text{時}$ 以下に抑え、精密なポジショニングが十分な駆動距離から得られます。水圧式のメリットは、油圧システムに比べ熱膨張率が2～3倍低い水の特性を利用したものです。

High Performance Oocyte Clamp 高性能Oocyteクランプ装置

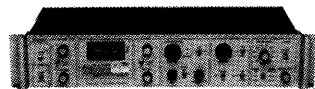
CA-1 クランプエータワン **Dagan社製**

* CA-1 は最も低ノイズで高速度のOocyteクランプシステムです。

* 従来の2電極モードと最新のCut-Open Vaseline Gap法によるクランプができます。



CA-1



姉妹品 TEV-200
2電極式ボルテージクランプ

- 通常の2電極クランプモード(TEVモード)を、コンプライアンス電圧145V、3タイムコンスタントで容量補正します。これにより従来に無いバスクランプが高精度で得られ、従来機種種の2倍以上高速でクランプします。(当社比)
- 新しい技法である“Cut Oocyte Vaseline-Gap法”は、極めて低ノイズでかつ従来のOocyteクランプ法に比べて50倍以上速くクランプが可能です。(20～100 μs で膜ポテンシャルを変化させる)。

このモードでは、Oocyteの内部還流による細胞内環境の管理が可能です。これにより、数時間に亘り安定した記録が実行できます。

この方法の利点は、速いイオンカレントやゲートチャージカレントの経過時間分解能が著しく向上します。カレントノイズは3KHzで僅か1nARMS以下です。従来の2電極法に比べ大幅に改善されます。CA-1は操作が簡単で、幅広く応用でき優れた性能が得られます。

CA-1のオリジナル設計はBaylor医科大学のDr.Enrico StefaniとUCLA医学部のDr.Francisca Benzanillaとの業績によるものです。

日本総代理店

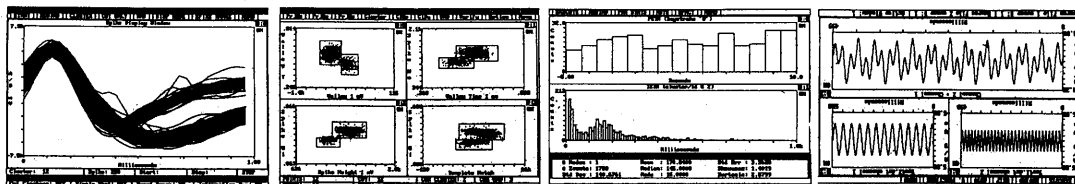


バイオリサーチセンター株式会社

本社 名古屋市東区東桜2-10-21(錦見ビル2F) ☎052(932)6421 FAX 052(932)6755
東京 東京都江戸川区東葛西6-4-10(第6類長ビル203号) ☎03(3878)6471

WorkBench & Discovery

ワークベンチ&ディスクバリーシステムは、EEG、ECG、EMG等のアナログ信号、ユニット信号を取り込み、リアルタイムで多種多様な解析が可能な優れたシステムです。豊富なコマンドファンクションを持ち、マウス操作で画面表示、データ記録、演算・解析処理、ユニット分離、印刷等が簡単に自動化できます。

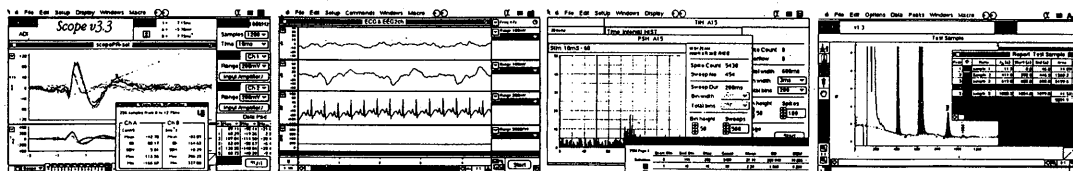


- ユニット分離 1つのユニットより12項目の値を抽出し、最大12のグループに区別します。
- ヒストグラム PETH, IEIH, XCRR, Rate Meter, JPST, Replay, Periodic PETH。
- 波形演算処理 アベレージング、スムージング、FFT、微積分、刺激誘発反応、可変面積、他多数。
- 波形数値抽出 Peak to Peak、dv/dtをはじめ、70種類にも及ぶデータ抽出が可能です。
- ディスプレイ オシロスコープ、ヒストグラム、XYプロット、デジタル表示、他多数。

動作環境	IBM PC-ATまたは100%互換機 (486DX-33MHz推奨)	
最大サンプリングレート	150KHz (1chに限定)	標準装備
	500KHz (1chに限定)	オプション
最大同時入力チャンネル数	16ch (A/Dボード1枚使用時)	標準装備
	32ch (A/Dボード2枚使用時)	オプション

マックラブシステム

MacLab/8 (8 ch)
MacLab/4 (4 ch)
MacLab/2e (2 ch)



マックラブシステムはアンプ、CPUを搭載したインテリジェントタイプのA-D、D-A インターフェイスです。

《機能例》

	マクロによる自動記録	ハードディスクレコーディング
Scope	ストレージオシロスコープ FFT、X-Yプロット 面積計算	加算平均 ピーク自動読み取り プレ・ポストトリガー
Chart	チャートレコーダー ピークホールド タイムスケジュール記録	スティムレーター dv/dt波形 シグナルジェネレーター
Peak	クロマトグラフ エリア、リテンションタイム測定	カウンタ 最高、最低トレンドグラフ オートイベント
Histogram	ベリスティムラスヒストグラム	タイムインターバルヒストグラム BINカウント

《仕様》

アナログ入力	xch Max. $\pm 10V$	サンプリング 100KHz (Max 1ch)
アナログ出力	1ch Max. $\pm 10V$	(シングルパルス、バイポーラ、ランプ、ステップ、自在波形)
デジタル入力	8ch (/4, /8), 2ch (/2e)	TTL5V (Ver. 3.3)
デジタル出力	8ch (/4, /8), 2ch (/2e)	TTL5V (Ver. 3.3)

A. D. I. 社
日本総代理店

BRC

バイオリサーチセンター株式会社

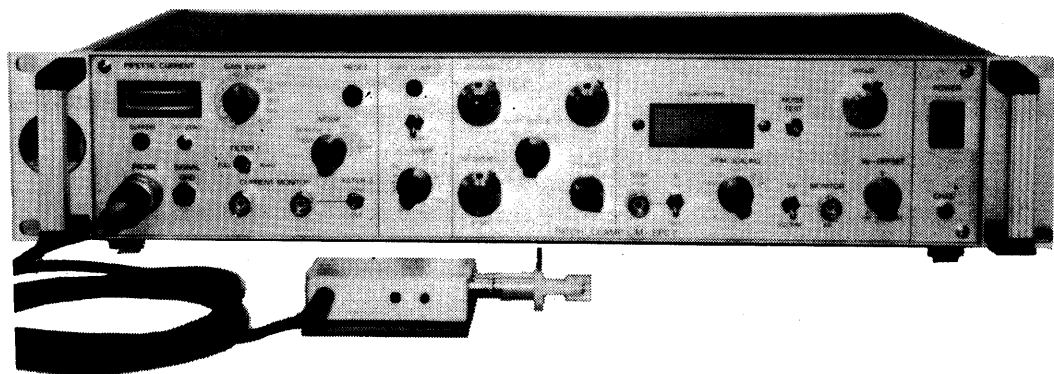
本社 名古屋市東区東桜2-10-21(錦見ビル2F) ☎ 052(932)6421 FAX 052(932)6755
東京 東京都江戸川区東葛西6-4-10(第6類長ビル203号) ☎ 03(3878)6471

実績 No.1!!

F. J. Sigworth, E. Neher のオリジナル

西独リスト社

パッチクランプシステム *EPC-7*



■ 主な性能

- ノイズレベル (rms) : 0.05pA 1KHz, 0.30pA 3KHz
- 電流レンジ : 200pA (50G Ω), 20nA (500M Ω)
- 周波数応答 : 100KHz (500M Ω)
- 電位増幅度 : X10
- 測定モード : VC, CC, CC+COMM
- Rs補償 : 1-100M Ω
- 容量補償 : 0-10pF (First)
: 0.2-10pF, 2-100pF (Slow)
- ホールド電位 : ± 200 mV
- オフセット電位 : ± 50 mV
- コマンドレベル : 0, .1, .05, .001, -.1, -.05

日本総代理店／西日本地区発売元



ショーシンEM株式会社

〒444-02 愛知県岡崎市赤浜町蔵西1番地14ショーシンビル
TEL (0564) 54-1231(代) FAX (0564) 54-3207

東日本地区発売元

(Physio-Tech)

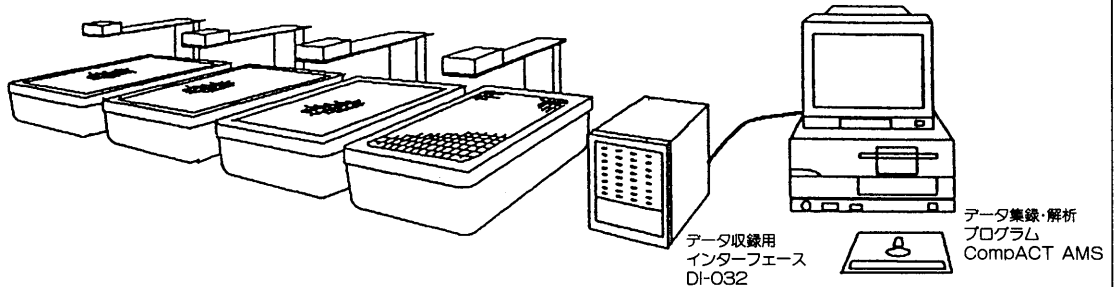
株式会社 フィジオテック

〒101 東京都千代田区内神田3丁目10番3号コイダビル4F
TEL (03) 3258-1641(代)

ローコスト型 自発運動量測定システム

スーパーメックス SUPERMEX

PAT. P.

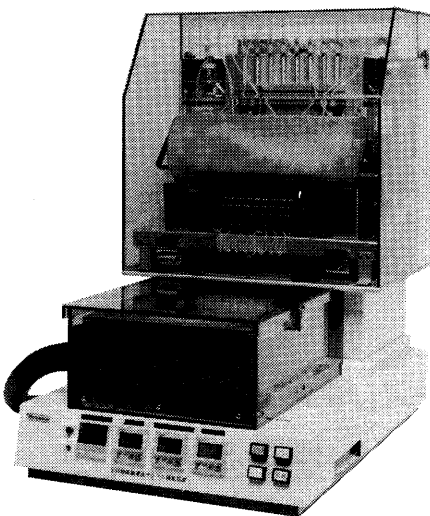


- 飼育ケージを使用することができます。
- 小動物(マウス、ラット、マーモセット等)から大動物(イヌ、サル、ブタ等)までの自発運動量を測定することができます。
- 感度調整等の煩わしい操作は不要です。
- 従来の自発運動量測定装置に比べ少ない予算で多チャンネルのシステム構成が可能です。
(例：4chのシステム価格 ¥1,500,000.- 8chで¥2,100,000.-)
- 標準で32ch、オプションで最大80chまでのデータを集録し、附属の運動量解析プログラム(CompACT AMS)及び周期解析プログラム(オプション)にてデータの集録・解析を行います。
- 増設は簡単にでき、1ch増設の費用は約15万円です。
- 測定場所から離れた所でデータ集録を行なうことができます。(パソコンとインターフェースの最大距離は約1km)
- 自発運動量に加え、飲水量及び餌の摂取量の測定システムも御見積り致します。

Muromachi

総発売元 **室町機械株式会社**

本社：〒103 東京都中央区日本橋室町4-2-1 大辻ビル
TEL 03(3241)2444 FAX 03(3241)2940
大阪営業所：〒532 大阪市淀川区木川東4-5-3 長谷興産新大阪ビル
TEL 06(302)1277 FAX 06(302)5026



全自動 細胞灌流サンプリング装置 MK-4000

脳スライス切片の各部位を灌流しながら、生体内で行なわれている化学的・電気的刺激及び、電気の刺激により灌流液中に放出される物質(サイクリックAMP、神経伝達物質、代謝産物等)を捕集することを目的とした装置です。

従来より行なわれていたセプター結合実験(RRA)と併用することで、より効果的な神経伝達物質、セカンドメッセンジャー間の相互作用の研究が行なえます。

■主な特長

- 脳切片を専用チャンバーにセットするだけで予め設定した灌流操作をし、専用ラックに灌流液を捕集します。
- 切片を入れるチャンバー数及びチャンバーは、ご指定に応じて作成いたします。
- 各チャンバーは、独立した系になっており、コンタミネーションは一切ありません。
- 本体フロントの設定スイッチにより、全ての設定ができます。

Muromachi

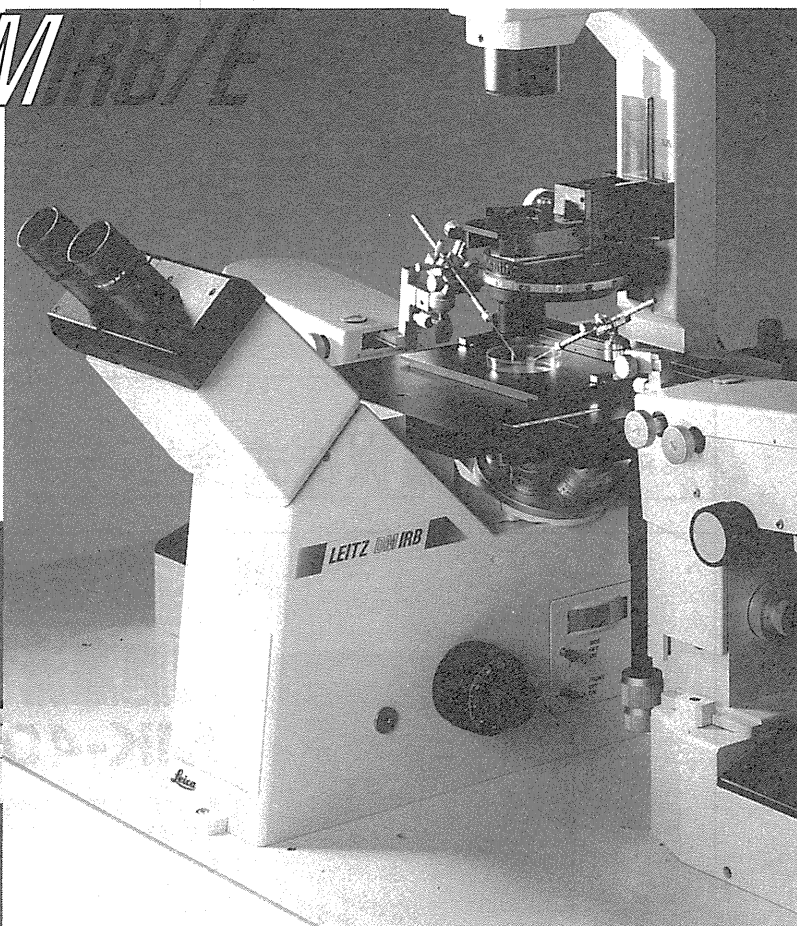
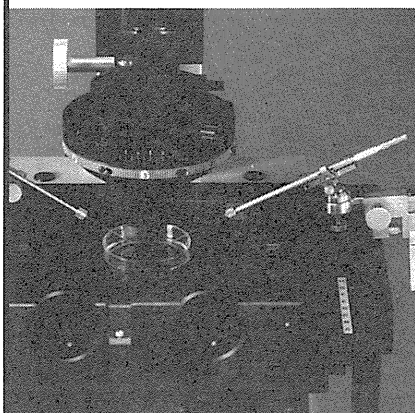
総発売元 **室町機械株式会社**

本社：〒103 東京都中央区日本橋室町4-2-1 大辻ビル
TEL 03(3241)2444 FAX 03(3241)2940
大阪営業所：〒532 大阪市淀川区木川東4-5-3 長谷興産新大阪ビル
TEL 06(302)1277 FAX 06(302)5026

さらに進化した4次元倒立顕微鏡

ライツ *DMIRB/E*

ライツDMIRB/Eはバイオテクノロジー及び医学研究のための万能倒立顕微鏡です。無限遠光学系を装備したライツDMRの新シリーズで、さらにお求めやすくなりました。



開発コンセプトはタイム & スペース(時間と空間)

作業性の飛躍的向上とゆとりの空間を実現しました。

LEITZ DMIRB/E

高い安定性と先進のエルゴノミック設計・アクセス性

- 重心の低いコンパクトなスタンド、機能性を追求したアクセス機構
- 全てのコントロール類を手元に配置、疲労の少ない観察
- 各社のマニピュレータと簡単にアクセス

抜群の光学性能・デルタオプティックス

- 対物レンズの交換不要、位相差レンズですべての観察法が瞬時に可能
- 光効率を最大限有効にする短くシンプルな光路
- 高画質を実現する色収差補正された全光学系
- 自動コントラスト機能付カバークラス補正L対物レンズ
- 落射蛍光のイメージシフト(像ズレ)ゼロ、多重露光が瞬時に可能

ゆとりの空間と高アクセス性

- 広いステージは3方向からのアクセスを実現
- 従来の2倍の倍率と空間の微分干渉観察、長作動70mmコンデンサーで対物40×まで可能
- 多機能ポーター 最大4つの画像ドキュメンテーションが可能

自動化・遠隔操作機能が標準装備(DHIRB/E)

- 新Eフォーカスシステム(インテリジェント機能オートフォーカス)
- 急速上下機能付電動対物レボルバー
- RS232C インターフェース内蔵

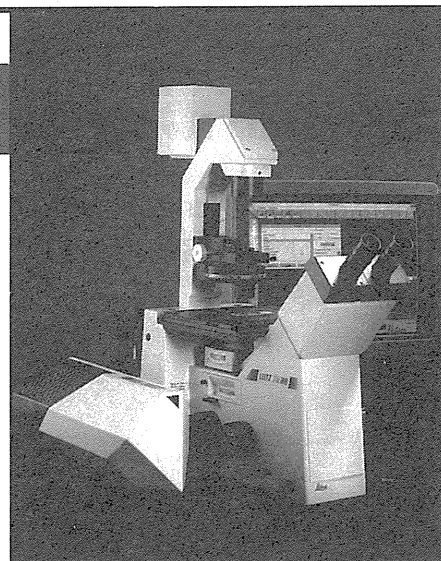
ワークステーション

- オープンな設計は高度な実験・研究の核となります

さらにお求めやすくなった価格

- 1) DMIRB(サイドポート、ベルトランレンズ付) ¥1,705,000~
- 2) DMIRB/SLR(フロント/サイドポート、1.6倍 倍率チェンジャー付) ¥2,252,000~
- 3) DMIRB/E(Eフォーカス、電動対物レボルバー、RS232Cインターフェース付) ¥2,994,000~

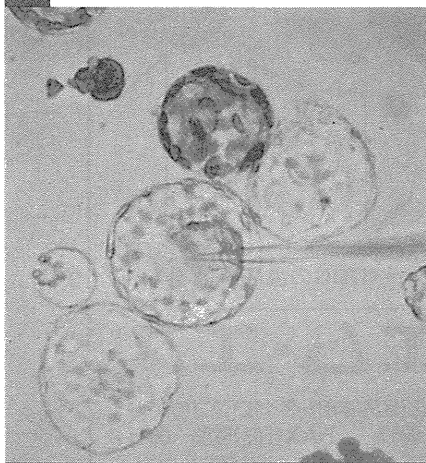
※価格には消費税は含まれておりません。



ライカTCS4D倒立型共焦点レーザー顕微鏡

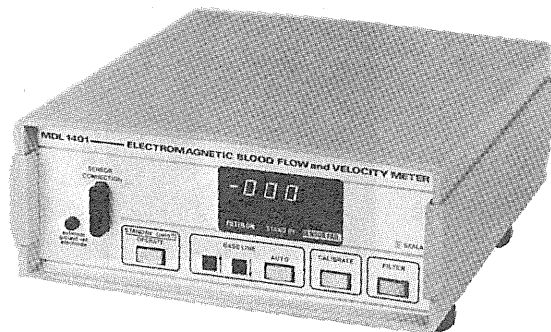
Leica ライカ株式会社
顕微鏡科学機器

本 社	〒101 東京都千代田区猿楽町2丁目8番8号 猿楽町ビル13F Tel.03-3292-9813(代表) Fax.03-3292-9777
大 阪 支 店	〒530 大阪市北区梅田1丁目11-4 駅前第4ビル15F Tel.06-345-9771 Fax.06-345-9772
名古屋営業所	〒460 名古屋市中区錦2丁目15-20 三永伏見ビル2F Tel.052-222-3939 Fax.052-222-3784
つくば出張所	〒302 茨城県取手市戸頭3-34-5-406 Tel.0297-78-7875 Fax.0297-78-7352



SKALAR サイン波 電磁血流計 MDL 1401

超小型軽量プローブにより、ラットの心拍出量から門脈、肝、腎動脈まで急性及び慢性実験用として安定した測定が可能となりました。



サイン波電磁血流計 MDL 1401

スカラー社製 サイン波電磁血流計 (MDL 1401) はサイン波励磁により、低雑音 ($0.12 \mu\text{Vrms}$) 低ドリフト (2%以内) 及び超小型軽量プローブ ($0.5\text{mm}\phi$) が可能となり、急性実験はもとより、慢性実験にも安定した測定ができる画期的な血流計です。

日本総代理店

UMS
Laboratory & Medical Supplies

株式会社 エル・エム・エス

デモのご依頼等、お気軽にご相談下さい。

〒113 東京都文京区湯島2-22-10 後藤ビル
☎ 03-3833-0910(代) FAX (03)3833-5910(代)

ラットから犬までの血圧を自動測定できます！

米国 NARCO 社製

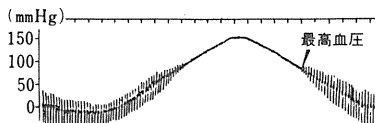
非観血式血圧測定装置

PE-300

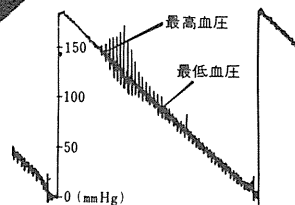
本装置は高感度トランスジューサーを用いてラット及びマウスの尾動脈よりパルスを検出し、非観血的に最高血圧を自動測定するものです。PE-300は発売以来、研究者の皆さまに好評を得ており、さらにアクセサリを交換すれば各種動物の最高および最低血圧を自動測定できます。

■特徴

- ①マウス・ラットの最高血圧を簡単に測定できます。
- ②カフの交換により、犬・猿・人間等の最高血圧及び最低血圧の測定が可能です。
- ③本体は一般のチャート・レコーダ等にも容易に接続できます。
- ④極めて再現性の高い血圧測定装置です。



〈RATの血圧データ〉

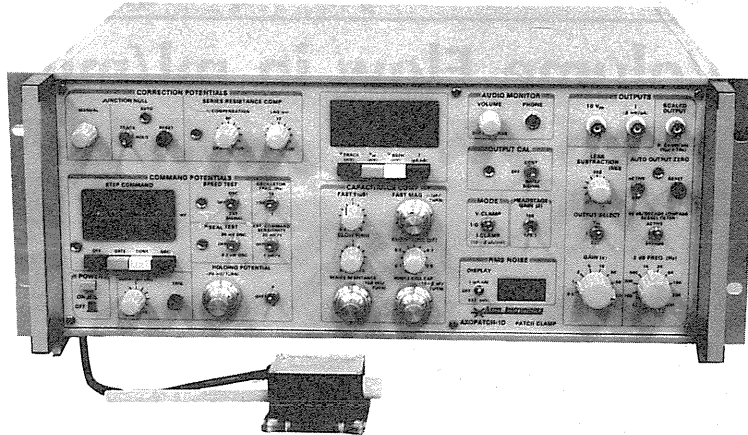


〈DOGの血圧データ〉

株式会社 エル・エム・エス

〒101 東京都千代田区外神田2-19口クゴウビル
TEL: (03)5296-0950 FAX: (03)5296-0945

AXOPATCH-1D PATCH CLAMP



低ノイズ ハイスピード 安定性と信頼性

AXOPATCH-1Dはsingle-channelパッチクランプとwhole-cellクランプするために開発された増幅器です。極めて低いノイズ・レベルと素早い応答力を特徴としています。重要な部分はハイブリッド化により完全シールドされています。

AXOPATCH-1Dはボルテージクランプと同様にカレントクランプ・モードでも作動します。フィードバック抵抗は同じセルからsingle-channel電流とwhole-cell電流を記録するため、リモート・コントロールができます。

CV4ヘッドステージは下記の3種類があります。

AXOPATCH-1Dの特徴

- 使いやすい容量補償
- ラグ・コントロールつき直列抵抗補償
- コマンド電位発生器
- 接合電位除去
- RMSノイズモニター
- ZAP (パッチ膜破壊)
- 可変出力ゲイン
- DCオフセット除去
- 可変低域通過ベッセルフィルター
- シールテスト
- オーディオモニター
- 漏れ電流除去

AXOPATCH-1Dのヘッドステージ

CV4 1/100 whole-cellクランプ (20 nAまで) とsingle-channel電流を記録するためのものです。50 GΩと500 MΩのフィードバック抵抗があります。

CV4 0.1/100 大きなセル (200 nA; >>100 pF) の whole-cellクランプとsingle-channel電流を記録するためのものです。50 GΩと50 MΩのフィードバック抵抗があります。

CV4B 0.1/100 人工膜からsingle-channel電流を記録する為の特別なヘッドステージです。大きなコマンド電圧の間、サチレーションを防ぐために外部から50 GΩと50 MΩのフィードバック抵抗でコントロールできます。(大きなセルのヘッドステージと同型です)

西日本地区発売元



INTER MEDICAL CO., LTD.

株式会社 インターメディカル

本社/〒461 名古屋市中区葵一丁目25番1号
TEL (052) 937-7060 FAX (052) 937-5423
TLX 444-3603 WDMEC J
東京支社/〒157 東京都世田谷区柏谷三丁目32番16号
製造営業部 アビタシオン千歳島山102号
TEL (03) 5384-6387 FAX (03) 5384-6487

東日本地区発売元

(Physio-Tech)

株式会社 フィジオテック

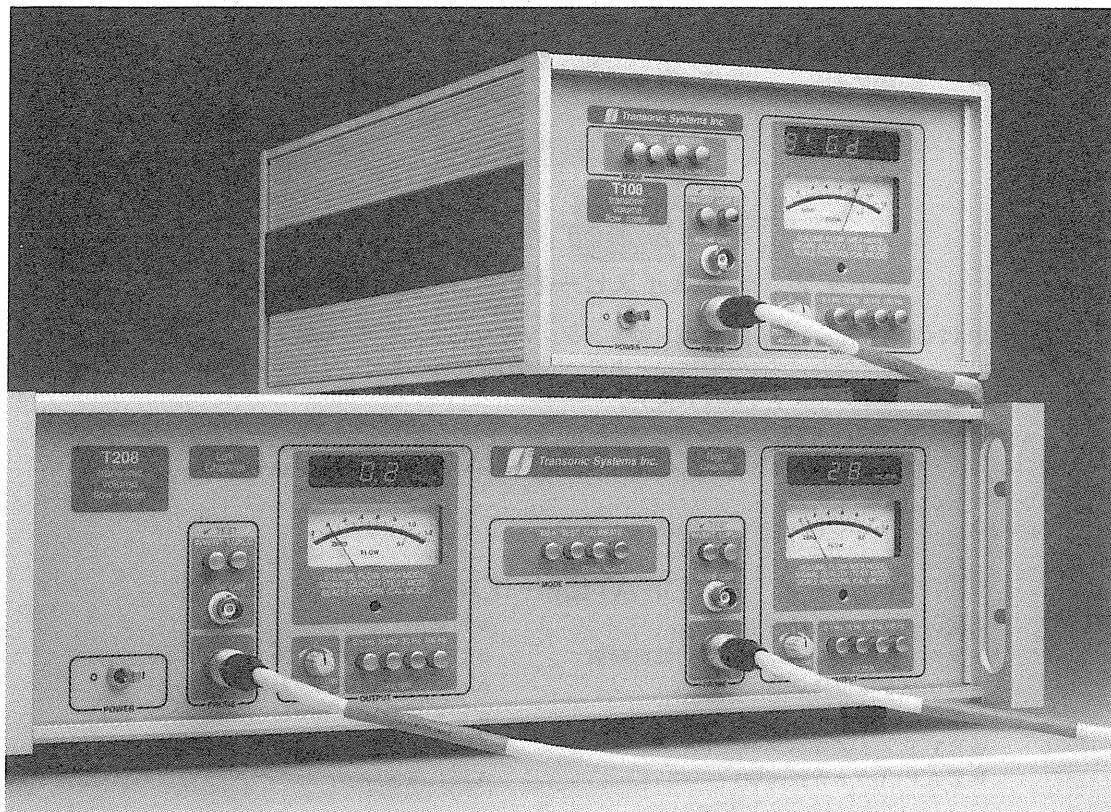
〒101 東京都千代田区内神田3丁目10番3号
コイイタビル4F

TEL (03) 3258-1641(代)

超音波トランジットタイム血流量計

Volume Flow in ml/min

T106/206 HT107/207 T108/208 HT109



実験動物の小型化に対応してトランソニック社ではコーネル大学と協力して微小血管(0.25mm ϕ)の定量測定用(ml/min)超小型プローブを開発致しました。

特 長

- 血管に対して無拘束で血流量(ml/min)を連続測定できる。
- 最小血管径0.25mm ϕ から最大48mm ϕ まで測定できる。
- ラット等小動物の微小血流のモニタリングができる。
- 急性、慢性(長期埋込み)測定ができる。
- 血管の形状に左右されないので静脈も測定できる。
- 血管に無拘束なので正確な拍動波形が測定できる。
- 体外循環などチューブの上からも測定できる。
- 2チャンネルでは同時に2ヶ所の血流量測定ができる。
- 超音波トランジット方式なので血液以外の流体でも測定できる。

(株)トランソニック システムズ ジャパン

〒350 埼玉県川越市山田1621-1 Tel. 0492-26-0557 Fax. 0492-23-0028

Transonic Systems Inc. Ithaca, NY, USA

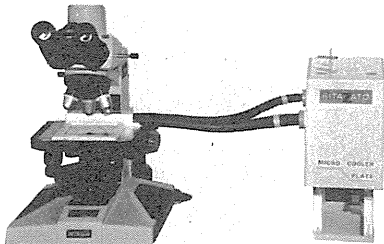
生体細胞や物性の研究に!!

KITAZATO®

新発売

冷却タイプ

マイクロクール・プレート® PAT.P (顕微鏡用透明冷却板)



マイクロクール・プレートは、室温から-25℃(MC-100)の範囲で霜(曇り)を防止した状態で設定した温度に自動制御します。電子冷却方式の為液体窒素が不要で、更に60mmシャーレーあるいはスライドガラスがセットできる広い透明冷却面となっています。

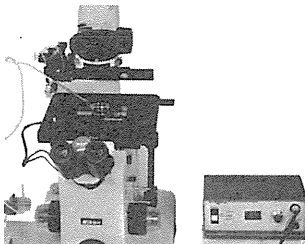
※加温・冷却兼用タイプもあります。

	冷却タイプ		加温・冷却兼用タイプ	
形 式	MC-10F	MC-10R	MD-10F	MD-10R
冷却板形状	平 型	丸 型	平 型	丸 型
冷却板厚さ	2 mm (穴開加工可能)			
設定温度範囲	室温より3℃(室温22℃)		3℃～45℃(室温22℃)	
制御温度精度	±0.5℃		±1.0℃	
冷却方 式	電子冷却			

※室温から-25℃タイプも特注製作します。

加温タイプ

マイクロウォーム・プレート® PAT.P (顕微鏡用透明加温板)



透明なガラス板の面全体が発熱体ですので、むらのない均一な表面温度を保ちます。透明プレート面は、設定した温度に自動制御されますので安定した至適温度で組織や細胞等の生体試料又、精子の活動度や卵子、授精卵等の細胞を直接観察したり、操作のできる画期的な万能型顕微鏡用透明加温板です。

MP-10DM	汎用タイプ
MP-100DM	//
MP-30DMHシリーズ	高温タイプ
DC-MPI00DMシリーズ	精密・ノイズレスタイプ
TC-MPI00DM	丸型・中座セットタイプ
MPW-10DM	マイクロプレートタイプ

ハイクテク拭き取り紙 (デイスボーザブル)

セーフティ ラボワイプ® PAT.P

セーフティラボワイプは、安全性・吸水性・機能を高めた拭き取り紙です。ポリエチレンフィルムを片面にラミネート加工する事により、水・薬品・血液や排泄物等の液体のにじみもれを防止し、手への汚染や付着を防ぎます。高吸水ポリマーを内部に挟み込むことにより、吸水・保水性能を格段に高めています。(600ml/枚)

◆使用方法・用途

- ラミネート加工した方に手を当てて拭き取って下さい。
- *こぼれた血液・検体や薬品の拭き取りに
- *危険な試薬作業時の拭き取りに
- *ビペットチップの残液や余分な水分の除去に
- *デカンテーション時の水切りに
- *血液や検査試薬等の取扱い時、作業台のベンチガードとして
- *院内での排泄のケアに
- ◎ラボワイプは、ティッシュと同様、使用後焼却処分が可能です。
- ◎γ線滅菌品も用意してあります。

●製品番号

- ラボワイプ KZ2124F
- ラボワイプ KZ2124RS(γ線滅菌品)
- シートサイズ 210×240mm
- 入数 1000枚(100枚入×10束)

お問い合わせ及びご要望は営業部をお願いします。

発売元 株式会社 北里サブライ

本社・営業部 静岡県富士宮市三豊平1429 千418
TEL0544(27)8831 FAX0544(27)6060
東京出張所 TEL03(3903)7410

パッチクランプ／ホールセルクランプの 測定に威力を発揮！



細胞膜の研究に

パッチ／ホールセルクランプ用増幅器 CEZ-2400

パッチクランプ法とホールセルクランプ法（小型細胞全体の膜電位固定法）による測定が、プローブの交換無しで可能。セルアタッチレコーディングからホールセルレコーディングまで、効率よく実験が行えます。

- 同一プローブ内で50GΩ／500MΩの電流検出抵抗が切り換え可能。
- トランジェント補正完了時に、膜容量・シリーズ抵抗が測定可能。
- 4次ベッセルフィルタを内蔵、更にノイズの低減を実現。

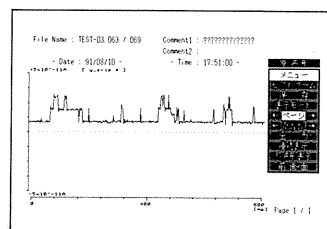
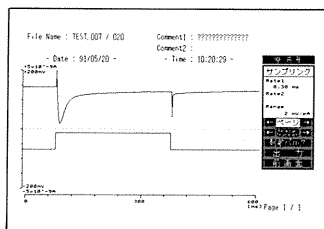
ステップパルスジェネレータ SET-1201

高精度のパルス発生回路と、ステップ電圧発生回路を組み合わせ、パッチ／ホールセルクランプに必要なコマンド信号を高い精度で発生できます。



パッチ／ホールセルクランプ用処理プログラム QP-120J

パッチクランプ法及びホールセルクランプ法により測定された微小イオン電流のデータを、パーソナルコンピュータ（PC-98シリーズ）を使用して、保存・解析するためのプログラムです。



日本光電 〒161 東京都新宿区西落合1-31-4
 ☎03(5996)8028 宣伝課

カタログをご希望の方は宣伝課宛ご請求下さい。

株式 夏目製作所
株合