

日本

# 生理学

雑誌

JOURNAL OF THE PHYSIOLOGICAL SOCIETY OF JAPAN

60巻 1号 1998

会員名簿用届	
生理学論文表題集の原稿記載についてのお願い	
生理学論文表題集記載要項	
平成9年度(1997)論文表題集申込み案内	
〔巻頭言〕 中島祥夫：21世紀の大学改革諮問	1
<b>NEWS</b>	3
<b>INFORMATION</b>	4
<b>CALENDAR</b>	9
<b>RECORDS</b>	10
<b>PROFILE</b>	15
<b>TRENDS</b>	17
<b>BOOK REVIEWS</b>	20
<b>IN JJP</b>	21
<b>実験技術法講座</b>	
シリーズ「生理学者のための分子生物学技術講座」	
小嶋哲人：血友病の遺伝子異常と遺伝子診断	31
坂野喜子・野澤義則：細胞膜脂質シグナリングの分子機構	43
シリーズ「データ処理法技術講座」	
連尾 博・鶴崎政志：パソコンを使ったデータ処理	
—データ取り込みから論文用原図作成まで—(pClamp・AxoData 編)	59
<b>学会抄録</b>	
第76回北海道医学大会生理系分科会	79
第30回東北生理学談話会	85
第233回生理学東京談話会	93
第44回中部日本生理学会	97
第90回近畿生理学談話会	112
第49回日本生理学会中国四国地方会	120
日本生理学会会則	i
日本生理学雑誌投稿規定	iii
生理学領域における動物実験に関する基本的指針	vi

日本生理誌  
J. Physiol. Soc. Japan

日本生理学会

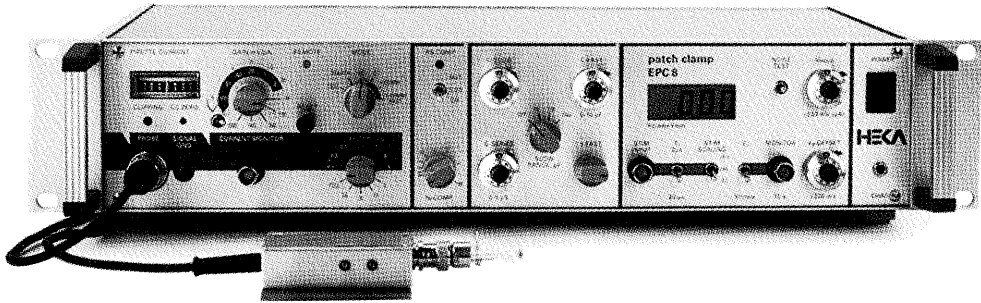
# HEKA

# EPC-8

Windows 95. NT対応

New!!

## パッチクランプ・システム



EPCシリーズの最新作・EPC-8は、名器EPC-7の  
正統な後継器として、数々の進歩を刻みました。

- 従来からご要望の多かったホールド電圧のレンジを $\pm 500\text{mV}$ まで、オフセット補正電圧を $\pm 200\text{mV}$ まで、それぞれ大幅に拡大しました。
- ヘッドステージを、EPC-7の2抵抗型からEPC-9と同等の3抵抗型へグレード・アップ。測定レンジを拡大し、大容量の細胞( $1000\text{pF}$ )にも対応します。
- 7ポール/12ステップの高性能フィルタを新設。
- ファースト・カレント・クランプやダブル/トリプル・パッチにも対応。
- 専用のインターフェイス+ソフトの追加により、パルス・ジェネレーションに始まる一連のデータ収集・解析をコンピュータ上で実行可能。

さらにゲイン、モード、フィルタのスイッチなどをソフト上から遠隔操作できます。

ソフトは、新たにWindows対応版もリリース。

☆フル・コンピュータ・コントロールのEPC-9もいっそう完成度を高め、ますます円熟。



~~~~ 詳しい資料をご請求ください ~~~~

HEKA社 日本総代理店  
EPCシリーズ 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シリーズ 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2-6-11  
若松ビル2F

TEL. 03-3258-1641  
FAX. 03-3258-1657

会員名簿用届

このフォームはインターネット上の生理学会ホームページ (<http://wwwsoc.nacsis.ac.jp/psj/>) にありますのでなるべくそちらを利用し、インターネット経由でお送り下さい。インターネットの利用できない方はこの用紙に記入して生理学会事務所 (〒113-0033 文京区本郷3-30-10 布施ビル) へ郵送して下さい。

1. 会員番号 (雑誌のラベルにある7桁の数字)   
2. 氏名 (漢字)  ふりがな (ひらがな)

3. 勤務先  
郵便番号 (7桁) -  
所在地

名 称 (講座あるいは研究室名まで)

職 名   
TEL -内線   
FAX   
E-mail

4. 自宅  
郵便番号 (7桁) -  
住 所

TEL   
FAX   
E-mail

5. 事務局から雑誌、郵便物の送付先を指定して下さい。 ○勤務先 ○自宅  
6. 自宅住所の名簿への掲載 ○掲載しても良い ○掲載しないで欲しい  
7. 専門分野 (下記の中から3つまで選んで、主なものから番号でご記入下さい。)

- 1. 細胞・分子    2. 膜輸送    3. 心臓・循環    4. 呼吸
- 5. 血液    6. 腎・体液    7. 消化・吸収    8. 筋
- 9. チャネル他    10. シナプス他    11. 感覚    12. 運動
- 13. 高次中枢    14. 自律神経    15. 行動・リズム    16. 神経科学
- 17. 内分泌    18. 生殖    19. 発生・成長・老化    20. 栄養・代謝・体温
- 21. 体力    22. 環境    23. 病態生理    24. その他 (モデリング・研究法・歴史など)

,  ,

8. 他所属学会 (5つまで)

ここから下は IUPS の名簿用です。下記の分類を参考にして英文、あるいはコード番号を記入して下さい。

Each I.U.P.S. affiliate was asked to provide information on its members in a standard format.

Information provided for each member listed is:

• Name, family name first

• Mailing Address

Coded biological Information:

• D-(Earned doctorate degree codes)

| CODE | DESCRIPTION        | CODE | DESCRIPTION              |
|------|--------------------|------|--------------------------|
| 01   | PH.D. or Dr. Phil. | 07   | D.D.S. D. Odont or D. O. |
| 03   | M.D. or Dr. Med.   | 10   | ED.D. or Dr. Ed.         |
| 05   | D.V.M. or Dr. Vet. | 25   | Cand. Med.               |

• T-(Position title codes)

|                           |                        |                              |
|---------------------------|------------------------|------------------------------|
| A. Director               | F. Associate Professor | K. Executive Secretary       |
| B. Chairman               | G. Assistant Professor | L. Academician               |
| C. Professor              | H. Laboratory Director | M. Corresponding Academician |
| D. Research Associate     | I. Institute Director  | Z. Other                     |
| E. Sr. Research Associate | J. Dean                |                              |

• S-(Special interest codes)

(生理学会の分類とは必ずしも一致しません)

|                                    |                         |                                        |
|------------------------------------|-------------------------|----------------------------------------|
| 01. Anesthesia                     | 12. Endocrine           | 3. Minerals, Bone and Teeth            |
| 02. Anatomy and Embryology         | 13. Energy Metabolism   | 24. Muscle and Exercise                |
| 03. Anthropology                   | 14. Environmental       | 25. Neuroscience                       |
| 04. Biochemistry                   | 15. Enzymes             | 26. Nutrition and Food                 |
| 05. Biophysics                     | 16. Gastrointestinal    | 27. Pathology                          |
| 06. Biomedical Engineering         | 17. General Physiology  | 28. Pharmacology                       |
| 07. Blood                          | 18. Gerontology         | 29. Radiation & Temperature Regulation |
| 08. Cardiovascular                 | 19. Immunology          | 30. Renal                              |
| 09. Cellular and Tissue            | 20. Liver and Bile      | 31. Reproduction                       |
| 10. Comparative Physiology         | 21. Lipids and Steroids | 32. Respiration                        |
| 11. Electrolytes and Water Balance | 22. Microbiology        |                                        |

• J-(Year member Joined the Society) 19

－ 第75回日本生理学会大会のプログラムの追加とお詫び －

第75回日本生理学会大会の予稿集（プログラム）に別紙のごとく記載もれがございましたのでご追加をお願いします。訂正されたものを大会当日予稿集とともにご持参いただきますよう、お詫びとお願いを申し上げます。

2 頁目 動物実験シンポジウム（本館 6 階 講601）  
3 月28日（土） 14:10～16:40

6 頁目 第二日目午後 3 月28日（土）14時10分～16時40分

| 会場     | シンポジウム名                       | 司会者    |
|--------|-------------------------------|--------|
| A      | 教育シンポジウム「医学教育の新しい動向」          | 高田・佐久間 |
| 6F-601 | 動物実験シンポジウム「生理学教育で動物実験をどう教えるか」 | 久保田 競  |

160頁目 動物実験シンポジウム

163頁目 教育シンポジウム（A会場；14:10～16:40）

医学教育の新しい動向

司会：高田 明和（浜松医大・第二生理）

佐久間 康夫（日本医大・第一生理）

- 1) 総論－メディカルスクール、学士入学、修士制度、研修医制度の改革  
高久 史麿（自治医科大・学長）
- 2) 学士入学－東京大学における決定まで  
脊山 洋右（東京大・医・生化・分子生物）
- 3) 修士制度－慶応大学医学部における経験  
金子 章道（慶応大・医・生理）
- 4) 第33回国際生理学会の教育ワークショップを聞いて  
佐久間 康夫（日本医大・第一生理）

動物実験シンポジウム（本館 6 階 講601；14:10～16:40）

生理学教育で動物実験をどう教えるか

司会：久保田 競（日本福祉大）

教室  
主任殿  
研究室

## 生理学論文表題集の原稿記載についてのお願い

日本生理学雑誌編集委員会

生理学論文表題集を編集しますので、原稿をお送り下さい。貴教室（研究室）の1997年1月～12月内に印刷されました生理学に関連する論文、抄録の表題を下記の記載要領に従い記入して下さい。封筒の表には、論文表題と明記して1998年4月末日（厳守）までにお送り願います。

尚、該当するものがない場合もその旨を必ずお知らせ下さい。

### 生理学論文表題集記載要項

1. 論文の分類は次のA、Bの分類のみとします。
  - A. 論文（著書、総説を含む、欧文、和文の順で記入して下さい）
  - B. 学会抄録（予稿集は含みません。欧文、和文の順で記入して下さい）
2. 用紙はA4の白紙を用い、横160mm、縦230mmの範囲（厳守）に、横50字、縦46行で記入して下さい。英文はこれに準じます。使用されるワープロソフトによって字数、行数は多少変わるでしょうが、上記の基準は目安とお考え下さい。原稿をB5に縮小コピーしてみて、記載例と、ほぼ同じになることをご確認下さい。
3. プリンターは必ずレーザープリンター等のハイクォリティープリンターをご使用下さい。
4. 原稿用紙上段右の所属名欄にはご自分の所属を必ず記入して下さい。
5. A（論文）、B（学会抄録）を通じ、著者名の前に通し番号を附して下さい（記載例参照）。
6. 著者氏名、論文表題名の順にお書き下さい。句読法についてはOpen systemを採用します。JJJの論文リストをご参照下さい。雑誌名の省略法はIndex Medicusに従って下さい。

A. 論 文

1. Nagashima T, Ohinata H & Kuroshima A (1994) Involvement of nitric oxide in noradrenaline-induced increase in blood flow through brown adipose tissue. *Life Sci* 54: 17-25
2. Saha SK, Moriya M, Ohinata H & Kuroshima A (1994) Lipid interference with fluorometric assay of DNA in adipose tissues under various conditions. *Jpn J Physiol* 44: 421-431
3. Ohno T, Ohinata H, Ogawa K & Kuroshima A (1994) Fasting-induced modifications of fatty acids composition in brown adipose tissue. *J Therm Biol* 19: 135-140
4. Yahata T & Kuroshima A (1994) Inhibitory role of prolactin in brown adipose tissue thermogenic activity. *Jpn J Biometeor* 31: 63-67
5. Moriya M, Kikuchi K, Nozu T & Kuroshima A (1994)  $\beta$ -endorphin does not directly stimulate BAT thermogenesis. *Jpn J Biometeor* 31: 85-88
6. Yahata T & Kuroshima A (1994) Role of prolactin in brown adipose tissue thermogenic activity. *Temperature Regulation, Recent Physiological and Pharmacological Advances*, Ed. AS Milton (*Advances in Pharmacological Sciences*) Birkhauser Verlag Basel, 327-331
7. Iwamoto J, Morin III FC, Inaba M, Gorfien SF & Battista PJ (1994) Direct measurement of nitric oxide from ovine endothelium cultured in endothelial-SFM. *Focus* 16: 31-33
8. Iwamoto J, Krasney JA & Morin III FC (1994) Methemoglobin production by nitric oxide in fresh sheep blood. *Respir Physiol* 96: 273-283
9. Iwamoto J, Pendergast DR, Suzuki H & Krasney JA (1994) Effect of graded exercise on nitric oxide in expired air in humans. *Respir Physiol* 97: 333-345.
10. 黒島辰汎 (1994) 熱産生器官・褐色脂肪組織の適応生理 *臨床体温* 14: 1-13
11. 黒島辰汎 (1994) (分担訳) 第17章 内分泌 In *スタンダード 人体生理学* (RFシュミット/Gテウス編) 佐藤昭夫監訳 シュプリンガー・フェアラーク東京 374-402
12. 黒島辰汎(1994) 寒冷適応と褐色脂肪組織. *臨床環境医学* 32: 81-84

B. 学会抄録

13. Iwamoto J, Pendergast DR & Krasney JA (1994) Effect of graded exercise on nitric oxide in expired air in humans. *FASEB J* 8:A687
14. Ohno T, Ogawa K, Moriya M, Ohinata H & Kuroshima A (1994) Nutritional conditions and brown adipose tissue (BAT) fatty acids (FA) -with special reference to overfeeding and iron deficiency-. *Jpn J Physiol* 44(Suppl) S281
15. Saha SK, Moriya M, Ohinata H & Kuroshima A (1994) Fluorometric assay with hoechst 33258 of DNA in adipose tissues under various conditions. *Jpn J Physiol* 44(Suppl) S281
16. Moriya M, Ohinata H, Yahata T, Ohno T, Ogawa K & Kuroshima A (1994) Nutritional conditions and brown adipose tissue (BAT) thermogenesis -with special reference to overfeeding and iron deficiency-. *Jpn J Physiol* 44(Suppl) S285
17. Nagashima Y, Kikuchi K, Nagashima T & Kuroshima A (1994) Effect of fasting on rat brown adipose tissue with special reference to in vitro thermogenesis and lipolysis-. *Jpn J Physiol* 44(Suppl) S286
18. Nagashima T, Ohinata H & Kuroshima A (1994) Effect of nitric oxide on blood flow through brown adipose tissue in the rat. *Jpn J Physiol* 44(Suppl) S286
19. Ohinata H, Saha SK & Kuroshima A (1994) Effect of cold plus immobilization stress on in vitro thermogenesis and GM3 level of rat brown adipose tissue. *Jpn J Physiol* 44(Suppl) S287

# 平成9年度(1997)論文表題集申込み案内

日本生理学雑誌編集委員会

1998年4月末日を以ってご提出願います論文表題集は、1998年8月に出来上がりますのでお申込み下さい。本表題集は、限定版のため追加印刷が許されませんので、至急に購入申込みを完了願います。教室、研究室におかれては最低2部(図書館を含めて)のご購入をぜひお願いいたします。申込みには、郵送用宛名ラベルに必要事項を記入の上、論文表題集用原稿と一緒に送ります。

尚、ご送金は論文表題集送付の際振込用紙と、国立大学及びこれに準ずる機関には事務処理上必要な見積、納品、請求書を一括したものを同封いたしますから、折り返しご送金下さいますようお願い申し上げます。その際各教室名を明記して下さい。

また、個人でも申込みが出来ます。その際は、下の郵送用宛名ラベルをコピーして必要事項を明記の上お送り下さい。

宛先 日本生理学会(〒113 東京都文京区本郷 3-30-10 布施ビル内)

平成9年度(1997)論文表題集

定価 1部 金7,000円也

(郵送料込み)

郵送用宛名ラベル

|      |       |
|------|-------|
| 郵便番号 | _____ |
| 住 所  |       |
| 氏 名  | 殿     |

平成9年度(1997)論文表題集 ( ) 部

## 目 次

## 会員名簿用届

生理学論文表題集の原稿記載についてのお願い

生理学論文表題集記載要項

平成9年度(1997)論文表題集申込み案内

〔巻頭言〕 21世紀の大学改革諮問 (中島祥夫) ..... 1

## NEWS

平成9年度第2回常任幹事会速報..... 3

日加合同生理学会について..... 3

## INFORMATION

アサヒ・フェローシップ (朝日国際奨励金) の募集案内..... 4

平成10年度科学技術振興調整費による目標達成型脳科学研究推進制度募集要綱..... 5

事務局から 日本生理学会会員払込みのお願い..... 7

設立30周年記念事業 内藤コンファレンスのテーマ募集..... 8

## CALENDAR

主な学会開催日程..... 9

## RECORDS

会員消息.....10

日本生理学会研究費委員会報告.....10

第149回 JJP 編集委員会議事録 .....12

第150回 JJP 編集委員会議事録 .....12

第151回 JJP 編集委員会議事録 .....12

日本医学会だより.....13

## PROFILE

「生理学者群像」(伊佐 正).....15

## TRENDS

IUPS サテライト会議 “Physiome Project” に参加して .....17

**BOOK REVIEWS**

- 『生物のスーパーセンサー（共立出版，編集委員：津田基之）』……………20

**IN JJP**

- JJP 和文要旨……………21

**実験技術法講座**

シリーズ「生理学者のための分子生物学技術講座」

- 小嶋哲人：血友病の遺伝子異常と遺伝子診断……………31

- 坂野喜子・野澤義則：細胞膜脂質シグナリングの分子機構……………43

シリーズ「データ処理法技術講座」

蓮尾 博・鶴崎政志：パソコンを使ったデータ処理

- データ取り込みから論文用原図作成まで—(pClamp・AxoData 編)……………59

**学会抄録**

- 第76回北海道医学大会生理系分科会……………79

- 第30回東北生理談話会……………85

- 第233回生理学東京談話会……………93

- 第44回中部日本生理学会……………97

- 第90回近畿生理学談話会……………112

- 第49回日本生理学会中国四国地方会……………120

- 日本生理学会会則…………… i

- 日本生理学雑誌投稿規定…………… iii

- 生理学領域における動物実験に関する基本的指針…………… vi

## 巻頭言

## 21世紀の大学改革諮問

千葉大学医学部生理学第一講座

中島祥夫

平成6年度から医学部6年一貫教育が始まり、各医学部でカリキュラムの検討がされ、従来からの伝授型ではない様々な新しい教育形態が模索され、それらの試みは生理学会大会において教育シンポジウムとして取り上げられ、本誌に寄稿されている。平成9年度に学士入学枠の提言が突如出現し、再びカリキュラムの再検討を迫られている大学もあるのではないだろうか。明治、戦後、平成とほぼ50年間隔での第三回目の教育改革とうたわれた大学設置基準の大綱化によって制度の弾力化が計られたが、ハード、ソフトの評価もできない内に新たなOSが出現し、見直したばかりのハードの変更を迫られていると感ずる次第である。

既に承知かも知れないが、平成9年10月31日に文部大臣から大学審議会に「21世紀の大学像と今後の改革方策について」が諮問された。諮問理由のキーワードに、少子高齢化の拡大、国際化、情報化、科学技術の発展、産業構造の改革、厳しい財政状況、狭い国土、少資源、「不透明な時代とされる21世紀」が挙げられ、創造性と活力ある国家、国際社会で主要な役割を果たす国家のため、大学の教育研究の質の飛躍的向上が必要であるとしている。諮問検討事項例として

1. 21世紀の大学像では、(1) 21世紀の大学像の提示、(2) 高等教育(学部レベル)の妥当な規模、(3) 大学院の量的な拡充、(4) 国公立大学の役割分担等が諮問されている。ここでは、高等教育の大衆化と学生の多様化の結果から生じた教育水準の質を問い、国立大学の大学院の量的拡大(先端科学技術分野、情報関連・国際関連分野、新規産業創出分野の需要に考慮し、2010年に在学者30万人)を図り、学部規模の縮減を考えてほしいとしている。また大学教育の8割を担い、人文・社会科学分野で大きな役割を果たした私立大学の役割について、国公立大学の授業料のあり方について検討してほしいとしている。

2. 大学院制度の改革では、(1) 卓越した教育研究拠点としての大学院を整備するための具体的システムの構築、(2) 大学院大学や大学院を中心とした大学の設置促進、(3) 高度専門職業人の養成に応じた修業年限の弾力化、(4) 社会に開かれた大学院や、国際的に開かれた大学院となるための条件整備が諮問されている。ここでは、教育の大衆化以前に大学の学部が果たしてきた質の高い教育を大学院が担い、レベルの高い大学院を重点的に整備し、既存の大学の改組転換や新設による整備の促進策などの検討を依頼している。

3. 学部レベルの改革では、(1) 教育機能の充実強化、(2) 高等学校教育と大学教育の連携、(3) 大学院教育と連携した学部教育が諮問されている。ここでは、少人数教育の推進、厳格な成績評価の実施と安易な進級・卒業の抑制、教養教育や人格形成のための教育重視などの検討を依頼している。

4. 大学の組織運営システムの改革では、(1) 大学の組織運営の改善、(2) 大学の教育研究の機動的な対応を可能とする措置、(3) 評価システムの確立、(4) 透明性の高い開かれた大学になるための情報公開の推進を挙げ、学外の有識者を加えた大学運営協議会の設置、国立大学の経営的視点の導入、人事・会計等の制度の見直し、私立大学認可手続きの弾力化・簡素化などの検討を依頼している。上記は諮問文、文部大臣諮問理由説明、検討事項例から一部を紹介したもので、詳しくは文部省のホームページ(<http://www.monbu.go.jp>)にアクセスすれば入手できる。

これらの内容は、大学の設置形態などにより様々な受けとめ方があると思うが、実現できれば評価できる諮問もあるが、「部局ごとの意志決定が最も尊重されるという現在の仕組みの改善、例えば教授会の審議事項の明確化」など何故学部の意志決定が尊重されてはいけないのかなど、首を傾げたくなる諮問もある。現在の大学生数、大学院学生数がどのくらいなのか調べる時間的余裕がなく、諮問にある30万人の大学院生がどのくらいの規模なのか想像つかないが、学部を持たない大学院大学、大学院を中心とした大学、学部のみで出現するのだろうか。国立大学民営化論も取りざたされている現在、教育研究のシステムはまさに不透明な21世紀を迎えている。医学部は、医学部の持つ高度な専門性、国際性、先端科学性等を生かし、21世紀に向かって全国一斉に、国公立を問わず学士入学枠を100%にし、4年制の大学院化の道を選択すべきと思われる。戦中・戦後の医専と医学部のような区別が復活することは避けたい。しかし、この場合教養担当教員の削減の問題、学部の予備校化が懸念されるが、これらはソフトでカバーできると思える。大学改革についての意見は文部省高等教育局企画課大学審議会室までと書いてあるので、大いに意見を述べましょう。地球温暖化、ゴミ処理問題、地球資源の減少などは我々に無縁な問題ではなく、やはり21世紀は不透明な時代なのでしょうか。変えるべきもの、べからざるものを考えて行きたいと思う。

## NEWS

### 平成9年度第2回常任幹事会速報

平成9年度第2回常任幹事会が11月1日日本郷の学士会館で開かれた。主な報告、審議事項は次の通り。

- 現在の会員数は3,674名である(庶務幹事)。
- 日本生理学雑誌の発行形態の変更, 第4種郵便物認可等により会誌製作発送費が大幅に節約できた(会計幹事)。
- 賛助会員数は現在31件(会計幹事)。
- 10月30日現在, 過去一年間のJJPへの投稿論文数は76編, 掲載論文数は57編である(JJP編集委員長)。
- 若手研究奨励賞(仮称)の設立が基本的に合意され, 具体的な選考方法について議論が繰り広げられた。
- 生理学の将来問題を検討するため専門委員会を設置することになり松尾幹事(近畿医大)が世話人に選出された。
- 生理学用語集の改訂作業が進み来年の学会までに完成の見込み(用語委員会委員長)。
- ロシア・サンクトペテルブルグで開催された第33

回 IUPS 大会において2005年の開催地にアメリカ・ワシントン市が決定した。

- IUPS 理事に金子編集幹事が選出された。
- カナダ生理学会から申し入れのあった日加合同生理学会の開催に協力することになった(下記参照)。
- 来年9月末にオーストラリア・ブリスベンでアジア・オセアニア生理学連合(FAOPS)の会合がオーストラリア生理学会, FAONS(アジア・オセアニア神経科学連合)との共催で開催される。日本生理学会からも多くの演者が予定されており, 多数の会員が望まれている。
- 来年金沢で開催される第75回日本生理学会大会の日程は次の通り。
  - 3月26日午前11時より各委員会, 午後常任幹事会
  - 3月27日夕刻グループディナー
  - 3月28日午後評議委員会・総会
  - 3月29日は午前中で終了

### 日加合同生理学会について

このたびカナダ生理学会から2000年1月にカナダ・カルガリー州バンフで開催されるカナダ生理学会大会を日本生理学会と合同で行いたい旨申し入れがあった。期日は平成12年(2000年)1月20日(木)から23日(日), 開催地は Lake Louise である。ここはカナダのスキースキーリゾートとして知られた場所で, 日本人にも人気の高い場所である。日本生理学会はこれまでも英国の生理学会と合同で2回の学会(1991年

にケンブリッジ, 1995年に名古屋・岡崎)を開催し, ケンブリッジ大会には約80名の会員が参加した。Lake Louise はカナダ国内でも人気の高いところでホテルの確保が困難であるが, カナダ生理学会では日本からの参加者のためすでに75名分を確保したと連絡があった。プログラムの内容など詳細については今後両学会で検討を進めることとしている。

# INFORMATION

## アサヒ・フェローシップ（朝日国際奨励金）の募集案内

### 1. 目的

外国の将来性ある学者、芸術家、ジャーナリストらに日本国内での研究活動の機会を与えることで日本理解を深めてもらい、併せて人と人との交流により国際間の協調に寄与する。

### 2. 応募資格

- (1) 外国国籍の個人（日本永住権を持つ外国人は除く）。
- (2) 応募時において満40歳未満であること。
- (3) 大卒、またはそれにふさわしい経験を持つもの。学術研究分野は、Ph. D. 取得者もしくはそれに相当する学識を持つものが望ましい。
- (4) 学者、芸術家、ジャーナリストなどで日本に関心を持って研究、学習などの活動を行おうとし、日本滞在の必要性がある者。自国でも同程度の活動が可能なのは受け付けない。
- (5) 日本に現在長期滞在中の者、および今後長期にわたり居住する見込みのある者は受け付けない。留学、研修などで、来日がすでに決定している者も受け付けない。
- (6) 日常生活に事欠かない程度の日本語を話せることが望ましい。
- (7) 日本に滞在して活動を行う上で支障のない健康状態であること。
- (8) 滞日活動終了後、自国においてその経験を生かし発展的活動が出来る者。将来性を持つ者が望ましい。

### 3. 採用者数

若干名

### 4. 滞日期間

原則として当年9月から1年間とし、滞日期間の延長は認めない。

### 5. 支給内容

- (1) 奨励金は研究内容に応じて選考委員会が適切な額を決定、支給する。
- (2) 来日、離日時の旅費は航空券（居住地～東京間のエコノミークラス）を支給する。

家族、同伴者などには支給されない。

- (3) 滞日中の海外旅行傷害保険料は(財)朝日新聞文化財団が負担する。

- (4) 採用者は奨励金で研究費、生活費をまかなう。

### 6. 応募方法

- (1) 募集は毎年1回行う。1998年分の応募締め切りは2月27日（必着）とする。

- (2) 申請用紙一式（①申請書3枚、②推薦書、③指導承諾書）、応募要項は本事務局に郵送で請求するか、朝日新聞社の海外総局、支局で直接受け取ること。

- (3) 推薦書は、応募者の日本語能力、研究テーマに関する能力、テーマについての評価ができる人物（指導教官、上司など）に作成を依頼すること。

- (4) 日本での受入機関・指導協力者へは、申請者本人が直接申し入れ、所定の指導承諾書への記入を依頼すること。

- (5) 希望者は所定の申請書に記入の上、締め切りまでにアサヒ・フェローシップ事務局へ郵送すること。推薦書、指導承諾書は、記入者が直接同事務局へ郵送してもよい。

申請書、推薦書、指導承諾書がそろわないものは、審査の対象とならない。

- (6) 応募書類はいずれも日本語（黒インク）または英語（タイプに限る）で記すこと。

- (7) 応募書類は一切返却しない。

- (8) 電話による問い合わせには応じない。

### 7. 選考と通知

- (1) 選考は朝日新聞社内での審査を経て、(財)朝日新聞文化財団の選考委員会が行う。

- (2) 選考結果は6月末までに朝日新聞紙上で発表するほか、本人に郵便で通知する。

- (3) 選考の中間状況に関する問い合わせには応じない。

- (4) 選考経過および決定の理由は公表しない。

### 8. 規則

- (1) 以下の事実が確認された場合、採用を取り消す。
- (a) 本募集要項の条件に反する事実。
- (b) 応募書類における虚偽、または一方的な変更。
- (c) 支給金を滞日中の生活費、研究費以外に使うこと。
- (2) 本奨励金は他の奨励金、研究助成金など同時に需給することはできない。
- (3) 研究協力者については申請者本人が直接申し入れ、許可を得ること。
- (4) 本事務局は住居の斡旋は行わない。
- (5) 滞日期間中は申請書に記入した研究計画に基づいて行動すること。
- (6) 採用者は滞日終了時に、報告書を本事務局に提出しなければならない。また、研究成果の公表などで朝日新聞社が協力を求めた場合、これに協力すること。

#### 申請書記入要領

申請書は必ず申請者自身が記入してください。記入は日本語（黒インク）か英語（タイプに限る）またはその両方でしてください。記入の必要がない項目も、空欄にせず、「なし」と記入してください。

#### 氏名

ローマ字表記で記入してください。漢字で表記できる人は、漢字とローマ字の両方で記入してください。

#### 写真

最近6か月以内の胸から上の写真を貼ってください。

#### 国籍、永住権

申請者の持つすべての国籍および永住権を記入してください。

#### 出生地

申請者が出生した国、市を記入してください。

#### 住所

勤務先、自宅双方の住所を記入し、そのいずれかを結果通知などの郵便物送付先に指定してください（どちらかの□に印を付ける）。利用可能なファクスがあれば、番号を記入してください。申請書提出後に変更があった場合には、本事務局まで通知してください。

#### 現職

所属団体名は日本語または英語のいずれか、できれば双方と、原語名を必ず記入してください。役職／職業欄および専門分野欄は日本語または英語で記入してください。

## 平成10年度科学技術振興調整費による目標達成型 脳科学研究推進制度募集要綱

### 1. 目的

脳科学は、多くの画期的な発見が行われる可能性を秘めている研究領域であり、21世紀に残された数少ないフロンティアと言われています。脳の仕組みや働き の 解明は、人間の 高次機能を明らかにし 社会生活の質の向上に役立つとともに、その成果は、脳の老化の防止やアルツハイマー病など脳・神経系の回復困難な病気の克服のほか、脳の原理を生かしたコンピュータやロボットなどの新産業・新技術の開発につながるものと期待されています。

また、脳科学研究の分野での長期間にわたる基礎研究の成果の積み上げを踏まえ、産学官の研究ポテンシャルを結集して集中的に資源を投入することに

より多くの成果を生み出すことが可能となっています。

本制度は、脳科学研究を戦略目標タイムテーブル（参考1；平成9年5月28日科学技術会議ライフサイエンス部会脳科学委員会（以下、「脳科学委員会」）で決定）上の達成目標に沿って、各省庁の試験研究機関、大学、民間研究機関等の研究ポテンシャルを結集しながら総合的に推進するものです。これにより、我が国の経済、社会の繁栄と国民生活の質の向上に資することを目的としています。

### 2. 対象

本制度では、「脳を知る」、「脳を守る」、「脳を創る」の3領域において、戦略目標タイムテーブルに記さ

れた目標を達成するための研究開発（その為に必要な先端的機器・技術の開発を含む）が対象となります。ただし、戦略目標タイムテーブルに示された目標のうち10年後以降に達成が見込まれるものを目標とした場合は、目標達成に至るまでの過程を明らかにした上で研究期間の終了時（5年後）の研究開発の目標を設定することが必要です。

なお、本制度では基礎研究の成果を積み上げ、新技術開発、新産業の創出を目指すため、産学官における各研究期間の連携により進めることとし、原則として産（民間の研究機関等）・学（国公立私立大学等）・官（各省庁の試験研究機関等）の各々から少なくとも1機関ずつ参加して行われる研究開発を対象とします。

### 3. 研究期間及び予算規模

研究期間は原則として5年間とします。ただし、研究開始後3年目に中間評価を行い、評価の結果によっては研究を打ち切る場合があります。

研究予算規模は、1課題当たり約2億円を予定しています。（参考2）。

### 4. 研究目標の設定

当該研究により、5年後に達成される具体的な研究目標を「詳細目標（研究課題名）」とし、課題提案の際には「詳細目標（研究課題名）」が戦略目標タイムテーブル（参考1）に示された目標のいずれに対応するのか明記してください。

### 5. 研究実施のスキーム

#### (1) 研究実施体制

提案課題毎に1名の研究管理統括及び数名のリエゾン置きます。リエゾンは提案課題のサブテーマごとに参加研究機関の研究担当者の中から選任され

る者で、原則として各研究機関1名以上、全体で10名以内とします。ただし、参加研究機関が多く全体で10名をこえる場合は代表的な機関から選んで10名以内に調整して下さい。

#### (2) 研究管理統括

研究管理統括は、プロジェクト全体の目標達成に責任を負います。自らは研究を行わず、目標達成のために客観的・中立的立場から研究担当者への指導、助言、脳科学委員会への報告、リエゾン会議の開催、研究成果報告会の開催、研究実施計画の調整、研究費の配分案の調整等課題全体の研究管理を行います。研究課題が採択された場合、平成10年度の実施計画書及び積算資料の取りまとめを平成9年度中にお願ひすることとなります。

なお、研究管理統括の研究管理に係る事務経費及び研究管理統括補佐の雇用のための経費については、予算要求の際に計上することができます。

#### (3) リエゾン

リエゾンは、研究管理統括及び他の参加研究機関との連絡・意見交換等を行います。

#### (4) 参加研究機関

産学官からなる参加研究機関は、研究管理統括の責任において、リエゾン会議等による連絡調整により、有機的連携をとりつつ研究を実施します。

### 6. 課題の選定

脳科学委員会による書類審査（平成10年1月頃予定）を行い、必要に応じて研究管理統括候補者からのヒアリング審査（平成10年2月頃予定）を行い、選定します。なお、課題の採択に当たり、研究管理統括候補者との調整の上で、他の提案課題との統合、研究内容の変更等を行うことがあります。

### 7. 提出書類

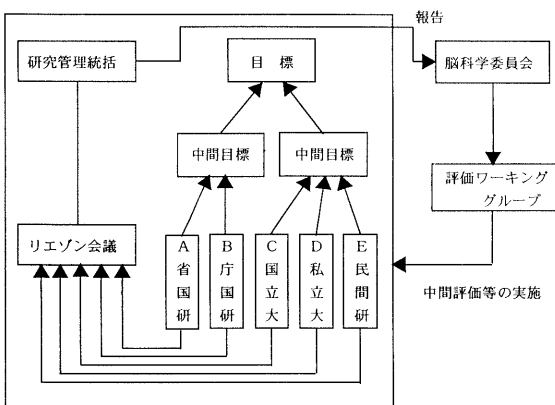
- ① 平成10年度目標達成型脳科学研究推進制度新規課題提案書（別紙1）
- ② 研究年次計画（別紙2）
- ③ 研究管理統括候補者及び研究担当予定者の研究実績等（別紙3）
- ④ 研究の概要を示す資料（図表、ポンチ絵等；A4で1枚程度）

### 8. 提出期限

郵送あるいは宅配便にて

平成10年1月12日(月)17:00までに必着のこと

### 9. 提出先



〒100 東京都千代田区霞が関2-2-1  
 科学技術庁 研究開発局  
 ライフサイエンス課

#### 10. 応募に当たっての注意

- ① 課題提案書は研究管理統括候補者が取りまとめた上で提出してください。
- ② 研究計画は、当該研究を推進する上で最適な規模としてください。
- ③ 課題選定に当たっては、科学技術振興調整費の他制度あるいは他予算により実施することが適当と判断される提案課題は採択しないこととしています。
- ④ 民間の研究機関及び公立私立大学等での研究実施に伴い発生した特許権等の知的所有権の扱

いについては参考3を参照してください。

- ⑤ なお、本件は平成10年度予算の成立を前提としており、今後変更があり得ることをお含みおきください。

#### 11. その他

提出書類は返却致しません。その他、不明な点はお問い合わせ下さい。

#### 問い合わせ先

科学技術庁 研究開発局 ライフサイエンス課  
 担当 森下, 祖川, 金子  
 Tel. 03-3581-5250  
 Fex. 03-3506-1960  
 e-mail: ymorishi@sta.go.jp

## 事務局から

### 日本生理学会会費払込みのお願い

平成10年度会費8,000円をお払込み頂きたくお願いいたします。本号に振替用紙を添付してあります。9年度会費8,000円未納の方々にはお知らせしてありますのでまとめて納入して下さい。各教室等研究機関でまとめてお振込みいただくと幸甚です。所属の変更、入会希望の方がおられましたら、ご連絡下さい。本会の年度は1月～12月となっております。退会等の場合は前年度中に文書でご連絡下さい。図書館、研究所等団体の10年度講読料は9,500円です。なお JJP の講読料の払込先は日本学会事務センター（振替口座 00130-9-55247）です。生理学会会費とは別扱いになります。ご注意下さい。

### 日本生理学会

〒113-0033 東京都文京区本郷3-30-10 布施ビル  
 電話 (03) 3815-1624  
 振替口座 00130-0-86430



## 設立30周年記念事業

内藤コンファレンスは、米国のゴードン・リサーチ・コンファレンスを手本にして、

- ① 離れた場所で
- ② 質の高い小グループで
- ③ 個人的な交流に重きをおいて全員が合宿

というルールで発足し、1991年に第1回を「細胞における蛋白質移行」(水島昭二組織委員長)のテーマで開き、現在までに9回を開催してきました。

### 領域

生命科学の  
基礎的研究

**規模** 講演者25人(うち外国人10人~12人)、ポスターセッション30人×2日で60人、参加者総数約100人

**言語** 発表・討論とも英語で通訳なし

**会場** 神奈川県三浦郡葉山町・湘南国際村センター

**開催時期** 1999年10月~11月上旬

| 会期  | 3泊4日   | 午前     | 午後        | 夜      |
|-----|--------|--------|-----------|--------|
| 1日目 |        |        | レジストレーション | レセプション |
| 2日目 | セッション1 | セッション2 |           | ポスター1  |
| 3日目 | セッション3 | セッション4 |           | ポスター2  |
| 4日目 | セッション5 | 昼食後に解散 |           |        |

**費用** 開催費の全額(約1,700万円)を内藤財団で負担します。海外演者には往復の渡航費(ビジネスクラス)と日本国内の旅費を、国内演者に対しては新幹線・航空運賃等の旅費を支給します。他の参加者は、交通費は自費となります。なお、3泊4日の宿泊費と食事代は内藤財団で負担します。

**応募期間** 1998年3月31日まで

**選定** 理事・評議員からなるテーマ選定委員会において1件を選び、評議員会の同意を得た上で理事会で決定します。

申請用紙・内藤記念科学振興財団事務局までFAXでご請求ください。

# 内藤コンファレンス の テーマ募集

# CALENDAR

## 主 な 学 会 開 催 日 程

| 開 催 日<br>(演題縮切)             | 名 称                                            | 会 場                                 | 連 絡 先                                                                                   |
|-----------------------------|------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| 98. 1. 21                   | 「Vascular Biology<br>—シグナル伝達の分子医学—」            | 豊中：千里ライフサイエ<br>ンスセンタービル5階<br>ライフホール | 財千里ライフサイエンス振興財団<br>セミナー係<br>☎06-873-2001 FAX：06-873-2002 松本                             |
| 98. 1. 31                   | 文部省重点領域研究「神経回路の<br>機能伝達」公開シンポジウム<br>「神経回路の多様性」 | 東京：銀座ガスホール                          | 大阪大学大学院基礎工学研究科 村上<br>☎06-850-6500 FAX：06-875-6340                                       |
| 98. 2. 17                   | 「蛋白質の3次元構造解析の<br>現状と未来」                        | 豊中：千里ライフサイエ<br>ンスセンタービル5階<br>ライフホール | 財千里ライフサイエンス振興財団<br>セミナー係<br>☎06-873-2001 FAX：06-873-2002 井関                             |
| 98. 3. 21-25                | 第6回国際誘発電位シンポジウム                                | 岡崎：岡崎コンファレン<br>スセンター                | 生理学研究所 統合生理研究施設 柿木<br>☎0564-55-7769 FAX：0564-52-7913<br>E-mail：kakigi@nips.ac.jp        |
| 98. 3. 27-29                | 第75回日本生理学大会                                    | 金沢：金沢経済大学                           | 金沢大学 医学部 第一生理<br>☎076-265-2168 FAX：076-234-4223<br>E-mail：phys75@med.kanazawa-u.ac.jp   |
| 98. 5. 23-24<br>(98. 3. 16) | 第13回日本生体磁気学会大会                                 | 東京：東京電機大学神田<br>校舎                   | NTT 基礎研究所 今田<br>☎0462-40-3575 FAX：0462-40-4716<br>E-mail：imada@brain.brl.ntt.co.jp      |
| 98. 6. 5- 6                 | 第5回肝細胞研究会                                      | つくば：工業技術院筑波<br>研究センター               | 工業技術院生命工学工業技術研 田中<br>☎0298-54-6503 FAX：0298-54-6503<br>E-mail：tmanami@nibh.go.jp        |
| 98. 6. 6                    | 第13回神経組織の成長・再生・<br>移植研究会 学術集会                  | 東京：東京大学山上会館                         | 東京大学 医 脳神経外科<br>☎03-3815-5411(3340)<br>FAX：03-3811-8647                                 |
| 99. 8. 22-25                | 第4回頭・頸部運動制御<br>国際シンポジウム                        | 東京：東京医大<br>臨床講堂                     | JCS：日本コンベンションサービス(株)<br>☎03-3508-1214 FAX：03-3508-0820<br>E-mail：ishns@convension.co.jp |

\* 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

## 会 員 消 息

## &lt; 転 勤 ・ 異 動 &gt;

| 氏 名   | 勤務先名・部署名                          | 勤 務 先(TEL・FAX)            | E-MAIL ADDRESS |
|-------|-----------------------------------|---------------------------|----------------|
| 香川 広司 | 静岡県立こども病院 形成外科                    | 054-247-6251・054-247-6259 |                |
| 倉持 元  | 厚生連 刈羽郡総合病院 内科                    | 0257-23-2165・0257-22-0834 |                |
| 島田 忠人 | 獨協医科大学 第二内科                       |                           |                |
| 福田 光洋 | 理化学研究所 フロンティア研究システム<br>脳統合機能研究チーム | 048-462-1111(6419)        |                |
| 古家喜四夫 | 京都工芸繊維大学 繊維学部 応用生物                | 075-724-7772              |                |

## 日本生理学会研究費委員会報告

1. 平成9年度の文部省科学研究費補助金、生理学関係の配分の結果

学術情報センターのデータベースに基づいて、生理学関係の配分結果を表1にまとめました。セクションによって違いますが、平成8年度の配分結果(本誌, Vol. 59, No. 6 掲載)に比して、5ないし27%の増加です。来年度の申請のための参考にして頂ければと存じます。

2. 各省庁の基礎研究推進制度について

各省庁実施の基礎研究推進制度の名称, 予算規模, 連絡先等のデータを表2にまとめましたので, ご参考にして下さい。

3. 生理学会へ送られて来る各種の研究助成応募要項は, 日本生理学雑誌の INFORMATION 欄, お

よび日本生理学会のホームページに掲載されていますので, 是非これらを参照下さい。

4. 研究費委員会では, 研究費に関連する種々の情報を生理学会員へ提供したいと考えています。また会員のご意見や質問を寄せていただき, 調査等を行いたいと考えていますので, よろしくご協力のほどをお願いします。

〒602 京都市上京区河原町通広小路  
京都府立医科大学第一生理学教室  
森本 武利

TEL: 075-251-5310

FAX: 075-251-0295

E-mail: morimoto@phys.kpu-m.ac.jp

表1 平成9年度科学研究費補助金(生理学関係)

[単位: 千円, ( )内は件数]

|         | 生理学一般<br>602 | 環境生理学<br>603 | 神経科学一般<br>833 | 神経筋肉生理学<br>834 |            |
|---------|--------------|--------------|---------------|----------------|------------|
| 基盤研究(A) | 継 続          | 17,000(5)    | 60,900(13)    | 19,500(5)      | 29,100(9)  |
|         | 新 規          | 7,900(1)     | 0(0)          | 29,000(2)      | 14,700(1)  |
|         | 小 計          | 25,000(6)    | 60,900(13)    | 48,500(7)      | 43,800(10) |
| 基盤研究(B) | 継 続          | 24,400(13)   | 11,100(5)     | 17,500(11)     | 16,800(10) |
|         | 新 規          | 63,800(9)    | 53,600(8)     | 72,000(10)     | 68,900(9)  |
|         | 小 計          | 88,200(22)   | 64,700(13)    | 89,500(21)     | 85,700(19) |

|         |     |             |             |             |             |
|---------|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 基盤研究(C) | 継 続 | 9,300(12)   | 8,900(15)   | 9,000(10)   | 12,400(15)  |
|         | 新 規 | 50,900(28)  | 40,600(18)  | 36,300(19)  | 43,800(19)  |
|         | 小 計 | 60,200(40)  | 49,500(33)  | 45,300(29)  | 56,200(34)  |
| 萌芽の研究   | 継 続 | 3,100(5)    | 1,400(3)    | 3,600(5)    | 1,200(2)    |
|         | 新 規 | 8,900(8)    | 4,800(4)    | 12,500(9)   | 6,300(4)    |
|         | 小 計 | 12,000(13)  | 6,200(7)    | 16,100(14)  | 7,500(6)    |
| 奨励研究(A) |     | 19,700(16)  | 20,300(15)  | 28,800(23)  | 18,700(14)  |
| 合 計     |     | 205,100(97) | 201,600(81) | 228,200(94) | 211,900(83) |

表2 各省庁による基礎研究推進制度について

| 省 庁 名<br>事 業 名                     | 予算額<br>(億円)                | 研 究<br>課題数      | 目 的・内 容                    | テーマ選定方法:<br>募集予定  | 実施機関連絡先とホームページアドレス                                                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------|----------------------------|-----------------|----------------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 文 部 省<br>未来開拓学術研究推進事業              | H8:110<br>H9:220           | 117<br>87       | 知的資産形成を図る大学<br>主導型学術研究     | JSPS 事業<br>委員会による | 日本学術振興会(JSPS)<br>〒102 東京都千代田区麴町5-3-1<br>ヤマトビル Tel:03-3263-1722<br><a href="http://www.jsps.go.jp/">http://www.jsps.go.jp/</a>                                                                                               |
| 科学技術庁<br>戦略的基礎研究推進事業               | H7:50<br>H8:150<br>H9:240  | 54<br>45<br>60  | 重要研究領域に関する<br>シース探索型基礎研究   | 公募:2月~4月          | 科学技術振興事業団(JST)<br>〒332 埼玉県川口市本町4-1-8<br>Tel:048-226-5601/Fax:048-226-5651<br><a href="http://www.jst.go.jp/">http://www.jst.go.jp/</a><br><a href="http://www.jst-c.go.jp/index.html">http://www.jst-c.go.jp/index.html</a> |
| 厚 生 省<br>保健医療分野における基礎<br>研究推進事業    | H8:10.2<br>H9:41           | 17<br>17        | 医薬品・医療用具等の基<br>礎的研究開発      | 公募:5月~6月          | 医薬品副作用被害救済・研究振興調査機構<br>〒100 東京都千代田区霞ヶ関3-3-2<br>新霞ヶ関ビル9階 Tel:03-3506-9549<br><a href="http://www.ijinet.or.jp/iyakuhin-kiko/">http://www.ijinet.or.jp/iyakuhin-kiko/</a>                                                     |
| 農林水産省<br>新技術・新分野創出のため<br>の基礎研究推進制度 | H8:19.8<br>H9:37           | 21<br>20        | 生物機能高度利用促進の<br>ための基礎的研究    | 公募:4月             | 生物系特定産業技術研究推進機構新技術開発部<br>〒105 東京都港区虎ノ門3-18-19<br>虎ノ門マリンビル10階 Tel:03-3459-6569<br><a href="http://www.tokyo.brain.go.jp/">http://www.tokyo.brain.go.jp/</a>                                                                  |
| 通商産業省<br>新規産業創造型研究開発促<br>進事業       | H7:150<br>H8:26.5<br>H9:35 | 216<br>39<br>45 | 新規産業創出に資する研<br>究開発         | 公募:4月~5月          | 新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)<br>〒170 東京都豊島区東池袋3-1-1<br>Tel:03-3987-9311<br><a href="http://www.nedo.go.jp/">http://www.nedo.go.jp/</a>                                                                                           |
| 郵 政 省<br>創造的情報通信技術研究開<br>発推進制度     | H8:4.8<br>H9:8             | 10<br>15        | 通信・放送技術を対象と<br>した未来開拓型研究開発 | 公募:4月             | 通信・放送機構研究推進部<br>〒105 東京都港区芝2丁目31-19<br>バンザイビル6,7階 Tel:03-3769-6810<br><a href="http://www.shiba.tao.or.jp/">http://www.shiba.tao.or.jp/</a>                                                                                 |
| 運 輸 省<br>運輸分野における基礎研究<br>推進制度      | H9:3<br>H9:8               | 10<br>15        | 交通サービス高質化・多<br>様化に資する基礎研究  | 公 募               | 運輸施設整備公団(仮称)<br><a href="http://www.motnet.go.jp/mthome_.htm">http://www.motnet.go.jp/mthome_.htm</a>                                                                                                                       |

### 第149回 JJP 編集委員会議事録

日 時：平成9年3月1日(土) 午後2:00～4:00

場 所：学会誌刊行センター

出席者：金子, 岡田, 葛西, 熊田, 黒島, 杉, 高橋,  
森本各委員

本郷理学会庶務幹事

(刊行センター 渡辺)

欠席者：酒田, 佐藤, 菅, 山下, 福田委員

1. 前回の議事録を原案通り承認した。

2. 原稿の審査・編集状況の報告が行われた。

3. 投稿の増加に向けて委員の協力を要請した。

4. 入澤賞候補推薦論文1編を決定した(Sakai et al. [JJP 46:465-472])

5. 次期編集委員に推薦する候補者を決めた。

6. Supplement を発行する際の内容についてのガイドラインを確認した。

7. インパクトファクターを上げる方策を検討した。

### 第150回 JJP 編集委員会議事録

日 時：平成9年5月17日(土) 午後3:00～4:40

場 所：学会誌刊行センター

出席者：葛西, 金子, 栗原, 黒島, 佐藤, 高橋, 丹  
治, 福田, 森本, 菅委員

(刊行センター 渡辺)

欠席者：岡田, 熊田, 山下委員

1. 菅新委員長及び栗原, 丹治新委員の紹介があった。

2. 前回(第149回, 平成9年3月1日)の議事録を原案通り承認した。

3. 原稿の審査状況の報告があった。

4. 取り下げ原稿の審査結果を委員長も閲覧するこ

ととした。

5. レビュー原稿減少の対策を協議した。

6. サプリメントの発行がインパクトファクター減少の要因になることを避けるため, その発行形態に留意することとした。

7. JJP 掲載論文の引用を原稿審査の各場面で著者に積極的に働きかけることとした。

8. JJP の掲載論文, 特に入沢賞受賞論文の引用頻度の調査の提案があった。

9. 次回予定日は8月9日(土)午後3時～5時で, その後新旧委員の懇親慰労会を行うこととした。

### 第151回 JJP 編集委員会議事録

日 時：平成9年8月9日(土) 午後3:00～5:00

場 所：学士会館分館

出席者：岡田, 葛西, 金子, 黒島, 高橋, 丹治, 福  
田, 森本, 菅委員 (計9名)

(刊行センター 渡辺)

欠席者：熊田, 栗原, 佐藤, 山下委員 (計4名)

1. 前回の議事録を原案通り承認した。

2. 投稿・審査状況について報告があった。

3. Review 原稿の執筆・依頼の促進をはかることとした。

4. 編集事務フローとそこで使うフォームを再確認した。

5. 返却する却下論文には, 担当エディターか委員長の手紙を必ず添付することとした。

6. レフェリーへの査読お礼のハガキは廃止。E-mail/Fax で代用することとした。

7. 和文要旨の執筆は審査過程で著者に依頼することに変更した。

8. 投稿論文のチェックリストを作成し各号に掲載することとした。

9. サプリメントの発行が日生誌でも可能であると報告があった。

10. 次回の編集委員会は11月8日(土)午後2:00からとした。

## 日本医学会だより

1997年10月 No. 18

### 第2回日本医学会特別シンポジウム

1997年9月27日～28日、「医と教育」をテーマに、岡山ロイヤルホテル（岡山市）において開催された。

特別シンポジウムは、4年毎開催の日本医学会総会の中間年に、他分野の学問とも関連、対比させながら医学の本質について考えるという趣旨のもとに行われることになったものである。前回は仙台において「医と法」を開催した。

今回は、小坂淳夫元岡山大学長にシンポジウム組織委員会代表者をお引き受けいただき、岡山大学医学部を中心に企画、運営がなされた。

シンポジウムは、「医学教育史の立場から」、「医学教育の立場から」、「医の倫理と教育」の3セッションから構成され、医学教育の過去、現在、未来について、講演ならびに討議が展開された。ハイライトとしての特別講演は、日野原重明聖路加看護大学長による「日米の医学部教育スタックの比較と日米の医師の臨床研修のレベルの差について」であった。

全国各地から、650名という多くの参加者を見たが、このようにシンポジウムが有益、かつ盛会裡に終了したことは誠に喜ばしい。企画、構成、準備、そして実行にあられた小坂組織委員会代表者はじめ6名の組織委員、ならびに関連の方々すべてにあらためて御礼申し上げる次第である。

なお、シンポジウム記録集は、平成10年2月頃に刊行の予定。希望者は日本医学会あて、郵便はがきで申し込まれる（無料）。

### 第109回日本医学会シンポジウム

「内視鏡およびカテーテル治療の最前線」が、1997年11月25日（火）、10：00～17：00、日本医師会館大講堂で開催される予定である。

本シンポジウムの組織委員は、幕内雅敏、板井悠二、鈴木博昭、の3氏で、目下諸準備が進行中、参加希望者は、日本医学会に郵便はがきで申し込まれる。参加費は無料。

プログラムならびに演者の概要は、下記のとおり。

### I. カテーテル治療

1. 腹部動脈性出血に対する救急動脈塞栓術—いつでも、どこでも—岡崎正敏（福岡大・放射線医学）。
2. 肝細胞癌塞栓療法—亜区域塞栓術—松井修（金沢大・放射線医学）。
3. 腸骨動脈狭窄のステント治療—血管内超音波による観察を含めて—栗林幸夫（国立循環器病センター・放射線診療部）。
4. 胆道ドレナージとステントの応用—澤田敏（琉球大・放射線医学）

### II. 内視鏡治療

5. 食道・胃静脈瘤の内視鏡治療—幕内博康（東海大・外科学）。
6. 上部消化管癌の根治的および緩和的内視鏡治療—鈴木博昭（慈恵医大・内視鏡科）。
7. 大腸のポリペクトミーとEMR—酒井義浩（東邦大大橋病院・消化器診断部）

### III. 内視鏡下手術

8. 胆石症の内視鏡下手術（ESTを含む）—山川達郎（帝京大溝口病院・外科学）。
9. 鼠径ヘルニアの内視鏡下手術。金田悟良（国立相模原病院・外科学）。
10. 腸疾患に対する腹腔鏡下手術の現状と展望—渡邊昌彦（慶應大・外科学）。
11. 胸腔鏡下手術—中島淳（東大・胸部外科）

### 医学賞・医学研究助成費の決定

医学賞ならびに医学研究助成費についての選考は、日本医師会から本会に委託されており、本年度は9月8日にそのための委員会が開催された。受賞・授与式は、日本医師会設立50周年記念式典並びに医学大会（11月1日）の場において行われる。

日本医師会医学賞は、候補24件の中から下記の3氏が選ばれた（敬称略）。

- ・デュシェンヌ型及びデュシェンヌ様筋ジストロフィーの分子論的研究—小沢鉄二郎（国立精神・神経センター・生化学）
- ・心血管系の発生・分化と負荷に対する適応に関する研究とその臨床応用—矢崎義雄（東大・内科学）
- ・高カロリー輸液のわが国への導入・確立、臨床栄養研究の展開—岡田正（阪大・小児外科学）

また日本医師会医学研究助成費は、応募97件中、次の15氏を選考した。

- ・ 遺伝子ノックアウトマウスを用いた痛覚情報処理機構の解析／緒方宣邦（広島大・生理学）
- ・ 骨形成異常の発症機構に関する分子遺伝学的研究／村垣泰光（和歌山医大・病理学）
- ・ 糖尿病治療薬スルホニール尿素剤の作用機構の解明／稲垣暢也（秋田大・生理学）
- ・ 低濃度フッ化物暴露作業者の健康管理に関する研究－腎毒性と加齢に伴う腎機能低下との相互影響について／河野公一（阪医大・衛生学）
- ・ 白血病発症の分子機構の解析／平井久丸（東大・内科学）
- ・ 血管老化と平滑筋細胞増殖の分子機構／永井良三（群大・内科学）
- ・ バセドウ病の発症並びに甲状腺中毒症の維持・増悪機構に関する研究／西川光重（関西医大・内科学）
- ・ 脾液中癌関連遺伝子分析による脾癌診断法の開発／澤武紀雄（金沢大がん研・内科学）
- ・ IgA 腎症の発症の病因解明に関する研究－IgA 腎症患者における *Haemophilus para-influenzae* 抗原に対する扁桃リンパ球の免疫応答について／鈴木亨（福井医大・内科学）
- ・ Ca チャンネル異常による小脳失調症の発症機序の解明／水澤英洋（医歯大・神経内科学）
- ・ 重症型遺伝性皮膚疾患の遺伝子診断ならびに培養表皮シートを用いた遺伝子治療法の基礎研究／清水宏（慶應大・皮膚科学）
- ・ 癌遺伝子治療の新たな分子ターゲット－癌化シグナル抑制分子開発による癌治療への応用／田中真二（九大生体防医研・外科学）
- ・ 遺伝子導入法による虚血耐性獲得を応用した心筋保護法の確立に関する研究／澤芳樹（阪大・外科学）
- ・ 網膜神経細胞再生過程に於ける選択的遺伝子発現と神経細胞移植へ向けての基礎的研究／梶原一人（慶應大・眼科学）
- ・ ヒト精子形成遺伝子の同定および精子形成機構の解明／並木幹夫（金沢大・泌尿器科学）

#### 医学用語管理事業

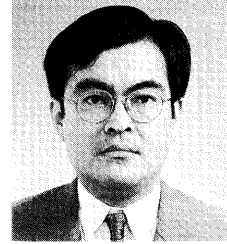
医学用語管理委員会では、日本医学会医学用語辞典（英和）の改訂作業に取りかかるべく、各分科会の用語委員に、辞典に追加・訂正・削除したい用語の指摘、提出を依頼した。その結果を収集整理し、今後の医学用語標準化進展のための更なる基盤として、辞典の改訂に反映させるよう努力中である。

## PROFILE

「生理学者群像」

## 伊 佐 正 君

生理学研究所 統合生理研究施設  
高次脳機能研究プロジェクト教授  
平成8年4月就任



今から16年ほど前、大学入学とともに学問に関する種の虚脱状態になっていた私に転機が訪れたのは医学部2年のフリークォーターで東京都老人研の佐藤昭夫先生の研究室でお世話になり、麻酔ラットの副腎髓質を支配する交感神経節前線維の活動を見た時のことでした。皮膚に痛み刺激を加えた時と、なでるような刺激を加えた時で反応の様式は変化し、刺激部位によっても、また上部頸髓の切断前後でも反応は異なります。このとき私の頭の中では末梢求心線維ごとに異なった信号が中枢内の異なった神経回路を駆け巡り、副腎交感神経に流れ込んでいく様子が非常にリアルな感じでイメージされました。「これはおもしろい!」、これが契機になって、真面目な学生ではなかった私の、せっせと老人研の研究室に通う日々が始まりました。その結果、卒業前になって「学生時代に何が面白かったか」を考えたとき、その後の進路として生理学の道を選ぶのにあまり迷いを感じなくなっていました。卒業後は中枢神経系の中身を勉強したくなり、東大脳研の島津浩教授の研究室の門をたたきました。教授は後に本郷利憲先生に変わりましたが、その間助教授の佐々木成人先生(現東京都神経研)のもとで麻酔ネコを用いた電気生理学実験とHRPなどのトレーサーを用い、視覚刺激に対する頸の指向運動を制御する神経回路の解析に従事しました。そこで初めて見た、HRPを頸髓に注入して逆行性に染色された脳幹、大脳皮質の細胞群の美しさは今でも忘れられません。そして大学院4年目から、スウェーデンのイエテボリ大学のLundberg教授の研究室に留学する機会を得て、2年間ネコの上肢到達運動を制御する脊髄神経回路の解析と腕の運動のkinematicsを解析することを学びました。研究内容もさることながら

Lundberg先生の御人柄とサイエンスに対する姿勢に触れたことが私に絶大な影響を与えました。その頃Flash & Hoganの、腕の運動のkinematicsの解析をもとにトップダウン的に脳の情報処理過程に関する仮説を立てる論文を読みました。ただその時点では神経回路の情報処理過程における最適化による制約条件という考えに興味を引かれはしましたが、実際にどのような神経活動を記録すれば彼らのような制約的条件を証明したことになるのかは理解できませんでした。2年の留学の後、東大脳研生理の研究室に戻り、大学院の時に行ってきた研究テーマで、頸の運動の制御回路が水平、垂直系に分かれているということこそ、冗長性の高い骨格筋運動系を制御する視覚運動変換過程の重要な制約条件のひとつではないかと考え、無麻酔、無拘束ネコにおいて脳幹網様体の水平、垂直性の頸運動を制御する領域の単一細胞活動を記録・解析しました。この研究がひとまとまりした頃に、今度は群馬大学の小澤澗司教授の研究室にポジションをいただきました。当時の私にとってはそれまでの生理学的研究から分類されていたグルタミン酸受容体が、分子クローニングと発現実験によってももの見事に整理し直されていった過程は驚異でした。小澤先生の研究室では、大きく方向転換してスライスパッチクランプ法と単一細胞RT-PCR法を組み合わせ、中枢ニューロンのAMPA型受容体のカルシウム透過性と整流特性と受容体分子の構造との関係を明らかにする研究に参加しました。このようにして分子生物学によって何ができるかということについての私なりのイメージを得ることができました。そして平成8年の1月より生理学研究所に自分の研究室を立ち上げる機会を与えられました。新しい研究室ではこれま

でのテーマを一新し、新しい研究を開始することになりました。私の現在の研究は、ラットの脳スライスでのパッチクランプ法を用いた局所神経回路の動作原理の解析とサルを用いた電気生理学的、心理物理学的研究が主体です。このような研究は分子生物学的脳研究とイメージングによる人間の高次脳機能研究という現在かなり二極化している脳研究の間を埋めるような部分に属すると思います。今の私の願いは、少々大胆ではありますが、私達が“高次機能”と呼んでいる注意、意識といった統合機能を脳の様々な領域を結ぶ神経回路、それぞれの局所神経回路の動作原理、さらにはその構成素子の働きへと徹底的に還元していくことでどこまでいけるか見てみたいということです。もちろん労力を要する作業ですが、以前に比べて有効な実験道具が増えたせいで、実験系をうまく選択すれば、分子、細胞レベルから

統合機能へのロジカルな理解をつなぐことがそれほど無理ではなくなっていると楽観的に考えることにしています。幸いにも研究室に集まってくれた若くてバイタリテイあふれる共合研究者達とともに今後奮闘努力していきたいと考えていますので、ご指導ご鞭撻のほどを宜しくお願い致します。

**【略歴】**

- 1985年 東京大学医学部医学科卒業
- 1989年 東京大学大学院医学系研究科修了
- 1988~1990年 スウェーデン王国イエテボリ大学生理学教室に留学
- 1989年 東京大学医学部脳研究施設助手
- 1993年 群馬大学医学部第二生理学教室講師
- 1997年 同 助教授
- 1996年 生理学研究所 統合生理研究施設 教授

## TRENDS

### IUPS サテライト会議 “Physiome Project” に参加して

川崎医科大学医用工学 梶谷文彦

第33回国際生理学会連合 (IUPS) の国際会議が1997年6月30日から7月5日にサントペテルブルグで開かれたが、そのサテライト会議として “Physiome Project” が近郊 Petrodoret の “Znamenska” で開催された。この会合は NIH の援助を受けてワシントン大学バイオエンジニアリングセンタ J. Bassingthwaight 教授 (米国シアトル) の主唱のもと、世界各国から34名が参加して行われた。NIHからは J. I. Vaitukaitis 女史らが参加し、私は国際医用生体工学連合の会長として招待された。Petrodoret “ピョートルの宮殿” という町名は皇帝が夏の宮殿を建てた時に名付けられた。「芸術の真珠」といわれている下公園は滝と噴水の公園として有名であるが、その数と仕掛けの雄大さにはしばしば目を奪われ、圧倒された。

さて、physiome であるが physio=life, -ome=as a whole entity からの造語で、生体の機能を構成的に解析し、理解することを目指すものであり、“a description of the integrated functions of a living organism” と定義されている。因みに genome は “the whole of the assemblage of genes in the chromosome” とされているので、genome の “gene” に対して、physiome は “function” が基本的事項といえよう。physiome 会議の具体的な内容は、近日中に Bassingthwaight 教授より報告書が出版されることになっているので、ここでは2日間に行われた討論内容を以下に示すことにする。このプログラムから大略の主旨をご理解いただけるものと思う。

Sunday, 6 July : Morning session :

Some definitions and descriptions for the Physiome.

What can the Physiome Project do ?

Chairs : Weibel, Bassingthwaight

Speakers :

James Bassingthwaight, USA : A View of the

Physiome

Ewald Weibel, Bern : Understanding via Comparative Studies

Denis Noble, Oxford : The Cardiome, from Excitation to Function

Allen Cowley and Peter Tonellato, Milwaukee : Hypertension : A Study in Functional Genomics. Part I : The Challenge (Cowley);

Part H : Technical Solutions (Tonellato)

Sunday, 6 July : Afternoon :

How can such a massive project be developed and supported ?

Experiences with the Genome Project and large databases :

Chairs : Michel, Hood

Speakers :

Evgeni Selkov and Gene Selkov, Cambridge UK, Argonne Nat Lab, USA and St. Petersburg, RU : The enzyme database,

Hans van Beek, VU, Amsterdam : Transcytosolic energy transport

Karl Hofbauer, Novartis, Basel : Target identification, concept validation and patient selection

Leroy Hood, U. Washington : Deciphering the Book of Life : New

Opportunities for Systems Analysis of Biological Information

William Raub, HHS : Potential role in improving health care

Monday, 7 July : Morning :

Hierarchical Structures in quantitative physiological modeling

Chairs : Cowley, Spaan

Speakers :

Alexander D'yachenko, Moscow : Modeling Respiratory Physiology : from Micro to Macrostructures

Karlfried Groebe, Mainz : Vascular Dynamical Systems

Aleksander Popel, Baltimore : Oxygenation of Tissues

Fumihiko Kajiya, Okayama : Regulation of Coronary Vascular Networks

James Schafer, Birmingham, USA : Kidneys, electrolytes and blood pressure

Monday, 7 July : Afternoon :

Dissemination and Communication, on-line and off-line

Networks of Physiome Centers. How shall they be defined ?

How do networked investigators actually communicate ?

Chairs : Michael, Scott

Speakers :

Peter Macklem, McGill : Experience with the Canadian Centres of Excellence Program

Peter Hunter, Auckland : Mechanisms for International Collaboration in the Cardiome Project

Jerry Collins, Vanderbilt : Strategies for Implementing the Physiome

Richard King, Seattle : Delivering Models and Modeling Tools to Investigators and Teachers

Jeremy Levin, Cadus Pharm. NY : Going public with models

Summary and Discussion and Reiteration of the "Mission Statement" :

Discussion leaders : Bassingthwaighte, Noble, Weibel

会の始めに, Bassingthwaighte 教授が physiome の全体像について説明した. 彼は genotype を知ることが生体の全てを知ることにつながるのかとの設問から講演を始め, Boyd と Noble の生理学の定

義(the logic of life)を引用して, genome で冗長性と多重性に富んだ生体の logic の全てを知ることが出来ないこと, 生体システム解析に knock-out や knock-in などの限界があること, gene が phenotype の出現を決定するのに十分な情報でないことなどを挙げ, genome とともに function を主眼とした physiome が重要であることを主張した. そこで, 彼は physiome の project として (i) 分子情報, 生化学情報, 細胞レベル, 組織レベル, 器官レベルの機能情報に関する形態を含んだデータベースの作成, (ii) 世界中から容易にアクセス可能なデータベース・ネットワークの構成, (iii) 生体機能及びそれぞれの相互作用の定量的なスキーマの作成, (iv) 可能なものについては可及的にコンピュータモデルでの表現, などの提案を行った. また, physiome データベースとして表 1 に示す項目を挙げ, これらをインターネットで利用できるようにするための "networks of centers" 設立の必要性を述べた.

#### The Physiome Project : Databasing for Physiology

- Elemental level : proteins and isoforms from sequence and properties to function ; chemical concentrations and kinetic "constants" under specific conditions, cells, species.
- Same for substrates, hormones, messengers, pharmaceutical agents.
- Relationships : force/length, shear/NO, etc.
- Responses to interventions !!
- Time series, response functions, summaries.
- Data in health and disease.

次に個々の発表が行われ, 初日の午前はず, E. Weibel 教授 (IUPS 会長) が comparative study におけるシステム, サブシステム, コンポーネントの形態と機能データを蓄積することが重要であることを述べた. D. Noble 教授は physiome の中の一つの例として "cardiome" を挙げ, イオンチャンネルから, 心電気現象, 不整脈を定量的かつ構成的に解析する立場から physiome の意義を説明した. この発表に関連して Hunter 教授は Noble 及び米国のグループを含む Caridome Project の国際協力の具体例を挙げ, "network of centers" 設立の有効性を示した. また, ミルウォーキーグループは高血圧に関して "genome から function, function から genome" という integrative な研究の進行例について説明した.

初日の午後以降、先に述べたプログラムに従って会が進行したが、数種類の臓器ないし生体システム、サブシステム、コンポーネントについての実例が、それぞれの演者の *physiome* に対する意見と共に提示された。中でも遺伝子工学手段を用いて何十種類のG蛋白の変異体を作り、薬品を開発しているベンチャービジネスの研究者が“function”のデータベースの重要性を指摘して“*physiome*”に期待しているとの発言が印象的であった。これらの個々の内容については後日配布されることになっている Bassingthwaight 教授のレポートを参照されたい。

わずか3日間の会議ではあったが、参加者はフィンランド湾を見晴らすホテルで食住をともにして、*physiome* について熱心な討論が行われた。なお、

IUPS 前会長の伊藤正男先生もこのサテライト会議にご出席の予定であったが、急用で帰国された。先生のご意見を聞くことが出来なかったのは参加者にとって残念であったが、今後、伊藤、Weibel, Bassingthwaight, Noble 各先生による steering の下に project が進行していくものと思う。

稿を終えるにあたり、本サテライト会議についてレポートする機会を与えていただいた生理学会誌編集委員長の金子章道教授および執筆を薦めていただいた菅弘之教授に深謝いたします。この会に同行いただいた川崎医科大学生理学辻岡克彦教授にも謝意を表したい。なお、謬見に関しましては、大いに御叱正頂きたいと思ひます。

## BOOK REVIEWS

### 『生物のスーパーセンサー（共立出版，編集委員：津田基之）』

広島修道大学・生物科学 高橋 恭一

外界並びに生体内部の諸変化を検出するため、生物には高感度で且つ特異的なセンサーが備わっている。本書では、これをスーパーセンサーと呼び、各分野で先端的研究を行っている研究者が分担執筆している。『生物のスーパーセンサー』という表題から、感覚器の入門書を連想するが、感覚器のみならず免疫や植物の光受容に至るまで、本書は実に広い範囲をカバーしている。いずれの執筆者も、生物物理学という分野を意識してか、スーパーセンサーに拘わる機能分子と関連する情報伝達系の説明を実に丁寧に説明している。初心者でもどんどん読み進むことができるよう、難解な専門用語を Key Word として、また重要な部分および最新知見を COLUMN として随所に折り込むという配慮もなされている。おかげで、各項目を読み終える頃には、ちょっとした専門家になってしまう。つまり、本書を読解すれば、生物にどのようなセンサーが存在し、それらがどのように生命活動に拘わっているかを具に知ることができるのである。

各執筆者による記述は10ページ前後であるが、その中にはスーパーセンサーのエッセンスが凝集されている。執筆者は自身の研究成果を上手く取り入れ、基礎から最新知見へとその内容を見事に展開しており、初心者のみならず専門家にも満足がゆく。ただ、研究成果を得るまでのプロセス、即ち実験に関する記載が少ないのが少し残念である。本書では、「感覚のセンサー」、「体の中のセンサー」、「生物の多様なセンサー」、「生物に学ぶ人口センサー」という順に、解説が進んで行く。「感覚のセンサー」では、感覚受容のメカニズムを取り上げ、外界の変化がどのようにして生体信号に変換されるのかを、最新知見を交えて紹介している。「体の中のセンサー」では、今流行のテーマ（免疫や体内時計など）を取り上げ、

研究の現状と将来の展望を分り易く解説している。「生物の多様なセンサー」では、動物以外の生物（植物と微生物）が見せる外界情報の獲得戦略を説明している。最後の「生物に学ぶ人口センサー」では、生物センサーを見本にした人口センサー作製の原理とその将来性を紹介している。テーマ毎に内容が完結しているため、最初から読み進む必要はなく、どの項目或いはどのテーマからでも、読み始めることができる。適所に挿入された図や表は、本文の理解を助けてくれる。文献は充分とは言えないが、これらを頼りにさらに理解を深めることも可能である。

本書には、センサー研究を通じて明らかになったもう一つの別な生物物理学のテーマが潜んでいる。それは、Gタンパク質である。本書では、近年急速に発展したGタンパク質研究の成果が余すことなく紹介されている。執筆者間に開設の重複が若干みられるが、これは反って、Gタンパク質の理解を助けてくれる。物質（生体の高分子やそれらが構成する構造体）に着目して生物機能を解明しようとする生物物理学にとって、Gタンパク質は好個の研究対象であり、執筆者たちも水を得た魚のようにその機能について生き生きと解説している。読み進むうちに、全く異なる機能の根底に、Gタンパク質という共通項が存在することに気づき、生物研究の面白さを改めて実感する。

シリーズニューバイオフィジックス（全11巻）の第6号として刊行された本書は、若い世代に生物物理学の重要性と面白さを伝えるための入門書の形態をとってはいるが、専門家にも充分満足できる内容になっている。これから生物物理学の研究を始めようと考えている方に限らず、いろんな分野の研究者にも読んで頂きたい一冊である。

## IN JJP

## JJP 和 文 要 旨

## &lt;Vol. 47, No. 1, 1997&gt;

## 腎尿細管のカリウム輸送とカリウムチャンネル

Potassium transport and potassium channels in the kidney tubules

河原克雅, 安西尚彦 (北里大医学部生理)

腎尿細管における  $K^+$  チャンネルの生理学的役割を解説し, ついで, クローニングされた  $K^+$  チャンネルの分子構造を元にして機能別に分類した. 体液の  $K^+$  バランスのしくみと腎の  $K^+$  チャンネルの役割を学ぶのに適している. [Review pp. 1-10]

## 内向き整流カリウムチャンネル: その分子多機能性と機能

Inwardly rectifying potassium channels: their molecular heterogeneity and function

磯本正二郎, 近藤千香子, 倉智嘉久 (大阪大医学部第二薬理)

[Review pp. 11-39]

ラット耳下腺細胞における細胞内 pH 変化による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の変化

Changes in intracellular  $Ca^{2+}$  concentration produced by the alteration on intracellular pH in rat parotid acinar cells

西口浩明, 林 常敏, 重富俊雄, 上田 実, 富田忠雄\* (名古屋大医学部口腔外科, \*藤田保健衛生大総医研)

ラット耳下腺分離細胞を用いて, 細胞内 pH 変動の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度に及ぼす影響について検討した. 菌結果, 細胞内  $H^+$  イオンの絶対値ではなく, 細胞内  $H^+$  イオンの低下が細胞内からの  $Ca^{2+}$  の放出を促すことが明となった. [Regular paper pp. 41-49]

## 低圧暴露が骨格筋の酵素活性に及ぼす影響

Effects of exposure to hypobaric-hypoxia on body weight, muscular and hematological characteristics,

and work performance in rats

田中美智子, 水田公子, 木場富喜, 大平充宣\*, 小林敏生\*\*, 本田良行\*\*\* (鹿児島純心女子大看護学部, \*鹿屋体育大体力科学, \*\*東京商船大保健管理センター, \*\*\*千葉大医学部)

ラットで低圧-低酸素暴露(550メートル, 8時間/日, 2週間)を昼間と夜間に行うと, ともに血液, 骨格筋代謝活性が低酸素馴化を示したが, 昼間時暴露群でのみ脂肪代謝の亢進によると考えられる運動耐性(遊泳耐性)の改善が認められた. [Regular paper pp. 51-57]

## 運動からの受動的及び能動的回復過程における呼吸応答

Respiratory responses to passive and active recovery from exercise

高橋龍尚, 新関久一, 宮本嘉巳 (山形大工学部電子情報工学)

ヒトにおける自転車エルゴメーター運動からの回復時の換気量変化は, 筋からの求心性情報変化や中枢性コマンドの変化よりも, もっぱら炭酸ガス排出量(運搬量)変化に依存することを指摘した. [Regular paper pp. 59-65]

 $G\alpha$  蛋白質  $GL2\alpha$  はアフリカツメガエル卵母細胞に極微量発現された PLC 共役型受容体の検出感度を増強する

The  $G\alpha$  protein  $GL2\alpha$  improves the ability to detect the subthreshold expressions of receptors linked to phospholipase C in *Xenopus* oocytes

山下聡子, 水上令子\*, 杉山博之 (九州大理学部生物, \*九州大医療短期大学部)

フォスホリパーゼC(PLC)共役型リセプターの研究には, ツメガエル卵母細胞発現系がよく使われる. しかし, 何らかの理由でその発現が充分には得られないことも多い. 山下らはこの論文で, そのような場合でも PLC を活性化させる G 蛋白質の  $\alpha$  サブユ

ニット (GL2 $\alpha$ ) を共発現させると確実にその反応を見ることが可能となることを示した。これは実用性の高い優れた方法として期待される。 [Regular paper pp. 67-72]

#### モルモット心室筋細胞における内向き整流 K<sup>+</sup> チャネル開閉反応の温度依存性

Temperature dependence of the inward rectifier K<sup>+</sup> channel gating in guinea-pig ventricular cells

光家 保, 品川泰子, 野間昭典 (京都大医学部生理) [Regular paper pp. 73-79]

#### 慢性胸髄横断犬における寒冷震えの筋電図学的研究 Electromyographic (EMG) study of cold shivering in the chronic spinal dog

内藤 輝, 孫 英傑, 柳平坦徳\* (信州大医学部第二解剖, \*同加齢適応研究センタースポーツ医学)

慢性脊髄切断 (T4-T10) イヌで急性寒冷暴露 (3℃) による体温低下に対照群と差がなく, 前肢, 後肢ともふるえが発現したが, その平均頻度は前肢で低く, ふるえの興奮性が脊髄上位の影響下にあることが示唆された。 [Regular paper pp. 81-86]

#### 高投与量のベントバルビタールナトリウムで麻酔したラットの心臓から単離したミトコンドリアの呼吸機能の非抑制

No suppression of respiratory function on mitochondria isolated from the hearts of anesthetized rats with high-dose pentobarbital sodium

高木 都, 中原裕子\*, 河合由紀, 内海耕造\*, 菅弘之 (岡山大学医学部第二生理, \*倉敷成人病センター医科学研)

動物実験に用いる投与量のベントバルビタールが心筋の呼吸機能を抑制するかどうかをラットの心筋より抽出したミトコンドリアで調べた。呼吸機能の種々の指標を測定した結果, 100 mg/kg (ip) 程度の投与量では, 呼吸機能は抑制されないことが確認された。 [Regular paper pp. 87-92]

#### 活性化されたマクロファージによる内因性プロスタグランジンと一酸化窒素を介するリンパ管平滑筋の弛緩反応

Activated macrophage-mediated endogenous prostag-

landin and nitric oxide-dependent relaxation of lymphatic smooth muscles

Wang, H. (信大医学部第一生理)

ラット腹腔に浸出した MP は, リポ多糖体で刺激されて, 誘導 NO 合成酵素とシクロオキシゲナーゼを誘導し, NO と血管拡張性 PG を同時に分泌すること及びそれらがイヌ胸管平滑筋に対し顕著な弛緩反応を惹起することを発見した。 [Regular paper pp. 93-100]

#### 庄一間隔関係が心房細動時の左心室の不規則な一心拍毎の収縮性とその平均レベルを特徴づける

Pressure-interval relationship characterizes left ventricular irregular beat contractilities and their mean level during atrial fibrillation

山口裕己\*, 高木 都\*\*, 伊藤治男\*\*\*, 立花英夫\*, 李 進雄\*, 菅 弘之\* (\*岡山大学医学部第二生理, \*\*奈良県立医大第二生理)

左心室の収縮性と規則的または不規則な RR 間隔とがどのような関係にあるかを交叉循環下の犬心臓において等容量収縮の E<sub>max</sub> を収縮性の指標として調べ, 特定の心拍の E<sub>max</sub> は, 1つおよび2つ先行する RR 間隔により決まることを見出した。

[Regular paper pp. 101-110]

#### オポッサム腎細胞における内向き整流性 ATP 依存性 K<sup>+</sup> チャネルの蛋白質リン酸化による調節

Modulation of inwardly rectifying ATP-regulated K<sup>+</sup> channel by phosphorylation process in opossum kidney cells

久保川学, 森 禎章, 窪田隆裕 (大阪医大第二生理)

オポッサム腎近位尿細管細胞に存在する ATP 依存性 K<sup>+</sup> チャネルが cAMP をセカンドメッセンジャーとする A キナーゼによって活性化されることを示し, 尿細管のイオン輸送調節に関する重要な知見を提供した。 [Regular paper pp. 111-119]

#### 麻酔ラット内臓体性反射に対する鍼刺激と視床内側下核の局所通電刺激の抑制効果

Inhibitory effects on acupuncture manipulation and focal electrical stimulation of the nucleus submedius on a viscerosomatic reflex in anesthetized rats

角谷英治, 川喜田健司 (明治鍼灸大生理)

鎮痛系における視床内側下核(Sm)の関与について明らかにするために、麻酔ラットを用いて、大腸・直腸伸展刺激により外腹斜筋の筋電図に誘発される反射性反応(内臓一体性反射)に対する、鍼刺激とSm電気刺激の効果を調べた。この内臓一体性反射は、頬への鍼刺激によって抑制された。この抑制効果は、Smへ局所麻酔薬を投与すると消失した。またSmの電気刺激で、この内臓一体性反射は抑制された。以上の結果から、Smは痛覚の経路であるとともに、鎮痛系にも関与すると考えられる。[Regular paper pp. 121-130]

#### 腎上皮細胞(A6)におけるアミロライド感受性ナトリウム輸送の抗利尿ホルモンによる促進作用と低浸透圧による増強効果

Hyposmolality-induced enhancement of ADH action on amiloride-sensitive ISC in renal epithelial A6 cells

新里直美, 丸中良典 (Div. of Respir. Res., Hosp. for Sick Child., Toronto)

アルドステロン非処理腎遠位尿細管において、アミロライド感受性ナトリウムチャネルの細胞内貯蔵部位から管腔側膜への移動が細胞外液低浸透圧により促進され、本条件下においてのみ抗利尿ホルモンのナトリウム再吸収促進作用が発現することを初めて見出した。[Short communication pp. 131-137]

#### 幼若期 Fischer 344 系雌ラットの最大酸素摂取量におよぼす自発的運動の影響

Effect of voluntary exercise on maximal oxygen uptake in young female Fischer 344 rats

矢野博己, 矢野里佐, 木下幸文, 辻悦子 (川崎医療福祉大健康体育)

動物実験においては通常強制的な運動訓練の効果が検討されている。著者らはラットの自発運動訓練においても最大酸素摂取量、運動スピード到達度、筋酵素活性などを指標として有酸素運動能の向上を認めた。[Short communication pp. 139-141]

#### エストロゲン処理ラット子宮縦走筋における Mn による収縮抑制と cAMP 含有量との関係

Relationship between Mn-induced contractile inhibition and cyclic-AMP content in the longitudinal

muscle of estrogen-treated rat uterus

最上紀美子, 轟奈津子 (山口大医学部第一生理)

エストロゲン処理したラット子宮縦走筋の反復電気刺激による収縮は nifedipine (0.03  $\mu$ M) により徐々に抑制され20分以内に定常値に達する。これに対し Mn (0.5 mM) は急速に収縮を抑制するが、この抑制は一過性で Mn 投与後4分以内に最大に達し、以後収縮回復し20分以内に対照値よりやや低い定常値に落ちつく。このさいMnは筋細胞内の cAMP 含量をも一過性に低下させ、この効果は phosphodiesterase 活性を抑制する IBMX (1 mM) により増強される。以上の結果は Mn が単に Ca antagonist として働くほか、adenylate cyclase にも作用することを示唆する。[Short communication pp. 143-146]

#### <Vol. 47, No. 2, 1997>

#### コルチコトロピン放出因子の多様性

Heterogeneity of corticotropin-releasing factor (CRF)

安田直毅, 中村一芳 (岩手医大第二生理)

視床下部から同定された CRH 以外の沢山の CRH 関連ペプチドの末梢・血液等での多様な生理作用・分布とストレス反応に対する意義を詳細に述べたレビューである。CRF 様物質がフラクシオンに分けられ生理活性が調べられていく過程が描かれている。[Review pp. 147-159]

#### 血管新生における細胞性線溶系の役割

The role of pericellular fibrinolytic system in angiogenesis

深尾偉晴, 上嶋 繁, 岡田清孝, 松尾 理 (近畿大医学部第二生理)

血管新生には血管内皮細胞表面での局所的、集約的な線溶系因子の発現によって制御される一連の蛋白分解活性が関与する。ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ (u-PA) とその細胞性受容体である u-PAR を中心とした機構が注目されている。[Review pp. 161-171]

#### F 344 ラットの足三里相当部位 (S 36) への針刺激による脾臓 IL-2, IFN- $\gamma$ および NK 活性の増大

Enhancement of splenic interferon- $\gamma$ , interleukin-2, and NK cytotoxicity by S 36 acupoint acupuncture in

F344 rats

Yu, Y., 笠原多嘉子, 佐藤孝雄, Guo, S., Liu, Y., 浅野和仁\*, 久光 正 (昭和大医学部第一生理, \*同医動物学)

ラットで電気ハリ刺激(S36点, 1-5 ボルト, 1 ミリ秒, 1 ヘルツ; 1時間/日, 3日間)が脾NK細胞活性を促進した。同時に脾IL-2; IFN- $\gamma$  レベルの上昇がみられたことから, これらの因子が一部NK細胞の活性化に寄与していることが示唆された。[Regular paper pp. 173-178]

光学的マッピングによるラット心房内興奮伝播の解析: 正常および頻拍状パターン

Optical mapping of conduction patterns of normal and tachycardia-like excitations in the rat atrium

酒井哲郎, 廣田秋彦\*, 佐藤容子, 佐藤勝重, 神野耕太郎 (東京医歯大医学部第二生理, \*島根医大第二生理)

膜電位感受性色素を用いた活動電位の光学的多部位同時測定法をラット心房標本に適用して興奮波伝播のマッピングをおこない, 生理的自発興奮および電気刺激で誘発された旋回性興奮について, その伝播パターンを解析した。[Regular paper pp. 179-188]

有機陽イオンとアンモニウムのショウジョウバエ幼虫筋のグルタミン酸受容体チャネルにおける透過性 Permeation of organic cations and ammonium through the glutamate receptor channel in *Drosophila* larval muscle

Ciani, S., 西川光一\*, 城所良明\* (カリフォルニア大 LA 医学部生理, \*群馬大医学部行動医学研究施設) [Regular paper pp. 189-198]

注射針穿刺によるラットのLPS発熱の遅延

Lipopolysaccharide-induced fever in rats prolonged by a needle prick

杉本直俊, 紫藤 治, 桜田惣太郎, 永坂鉄夫 (金沢大医学部第一生理)

ラットLPS皮下投与による二相性発熱による遅延性発熱現象が腹腔内留置カテーテルからの投与ではみられないことから, 皮下注射時の穿刺刺激によるストレス性因子(カテコラミン, IL-2, IL-6, TNFなど)がPGEsとともにこの現象に関与している

ことを示唆した。[Regular paper pp. 199-204]

2, 3-ブタンジオンモノキシムはイヌ血液灌流左心室の興奮収縮連関を抑制する

2, 3-Butanedione monoxime suppresses excitation-contraction coupling in the canine blood-perfused left ventricle

高砂利行, 後藤葉一\*, 川口 鎮, 畑 勝也, 佐伯彰夫, Taylor, T.W., 西岡武彦, 菅 弘之\*\* (国立循環器病センター研究所, \*同病院, \*\*岡山大医学部第二生理)

BDM ( $5 < q < \text{mM}$ )の心筋に対する負の変化効果は細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 調節系を著しく抑制することなくクロスブリッジの張力発生を抑制するためと考えられている。著者らは交叉灌流したイヌ心臓左心室における $\text{O}_2$ 消費と心拍出時の圧力・容積関係(機械的エネルギー発生量の指標)などにおよぼすBDMと $\text{CaCl}_2$ の影響を比較解析した結果, BDMの負の変化効果は主として心筋の興奮収縮連関の抑制によることを明らかにした。[Regular paper pp. 205-215]

赤血球細胞における膜電位-容積変化の関連

Photometric assessment of volume changes coupled with membrane potential in valinomycin-incorporated red blood cells

楊 雪松, 神野耕太郎 (東京医歯大医学部第二生理)

最近, 細胞容積調節の研究が注目を浴び始めている。この論文では, バリノマイシン処理をした赤血球をモデルにして, 細胞容積と膜電位を光学的に測定し, 細胞容積は脱分極に伴って増大すること, 両者の関係は定量的に表現できることをはじめて明らかにした。細胞容積を規定するのは水の移動であり, これは正味の溶質移動(この場合はKCl移動)に依存していることが示された。[Regular paper pp. 217-230]

塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)の中樞投与によるエタノール胃潰瘍の形成低下

Intracisternal injection of basic fibroblast growth factor reduces the severity of gastric mucosal lesions evoked by ethanol in rat

渡辺泰男, 奥村利勝, 小野寺秀, 高橋伸彦, 小路悦

朗, 高後 裕 (旭川医大第三内科)

胃酸に依存しない機序で胃潰瘍を防ぐ作用を持つという仮説を検討した. エタノールを胃内に投与すると胃潰瘍が発生する. このエタノールによる胃潰瘍は, bFGF の大槽内投与により抑えられたが, bFGF の腹腔内投与では抑えられなかった. エタノールで誘発される胃潰瘍は, 胃酸に無関係であるとされているので, 今回の実験から, bFGF は中枢に作用して胃酸には関係しない機序で, 抗胃潰瘍作用を示すと推測される. [Short communication pp. 231-233]

ラット肝細胞において ATP, thapsigargin, cAMP は 3 種の異なる  $Ca^{2+}$  流入経路を活性化して, 細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇を引き起こす

ATP, thapsigargin and cAMP increase  $Ca^{2+}$  in rat hepatocytes by activating three different  $Ca^{2+}$  influx pathways

五十里彰, 酒井秀紀, 竹口紀晃 (富山医薬大薬学部薬物生理)

最近, Ca ストア枯渇によって開く  $Ca^{2+}$  チャネルの存在が話題を呼んだが, 細胞はこの他にも多種の  $Ca^{2+}$  流入経路を持っているようだ. この論文では, 非興奮性細胞である肝細胞の  $Ca^{2+}$  流入通路には,  $La^{3+}$  感受性のもの, verapamil 感受性のもの, そして両者に対して感受性を示すものの三種があることを示している. 今後の分子論的道程同定に期待がかかる. [Short communication pp. 235-239]

#### <Vol. 47, No. 3, 1997>

アプリシアニューロンでみられる PKC の活性化による受容体と G 蛋白の間の機能的アンカップリング  
Functional uncoupling between the receptor and G-protein as the result of PKC activation, observed in Aplysia neurons

佐々木和彦, 川崎 敏, 木村真吾, 藤田玲子, 高島浩一郎, 松本光比古, 佐藤 誠 (岩手医大医学部第一生理)

[Regular paper pp. 241-249]

フェレット心室筋におけるカフェインおよび急速冷却により放出された  $Ca^{2+}$  除去に対するミトコン

ドリアの関与

Contribution of mitochondria to the removal of intracellular  $Ca^{2+}$  induced by caffeine and rapid cooling at low temperatures in ferret ventricular muscles

田中悦子, 栗原 敏 (東京慈医大第二生理)

白イタチの心室筋内のカルシウム濃度変化を発光タンパクエウオリンで測る系を用いて, 急速冷却, カフェイン刺激, 電気刺激で駆動したときの細胞内遊離カルシウムの除去機構を調べた. その結果, 急速冷却とカフェイン刺激ではミトコンドリアの寄与が大きいことを示した. [Regular paper pp. 251-262]

フェレット心室筋における急速冷却とカフェインによる  $Ca^{2+}$  放出機構

$Ca^{2+}$  release induced by rapid cooling and caffeine in ferret ventricular muscles

田中悦子 (東京慈医大第二生理)

前の論文と同じ系を用いて, 急速冷却とカフェイン刺激によるカルシウム動員機構を調べた. その結果, 前者のカルシウム動員機構には細胞内ナトリウムを必要とし, 後者とは異なる機構であると結論した. [Regular paper pp. 263-272]

ルテニウムレッド処理フェレット心室筋の細胞機能と電顕像

Effects of ruthenium red on the cellular functions and ultrastructure in intact ferret ventricular muscles

田中悦子, 川井 真, 栗原 敏, 堀田康明\*, Soji, T.\* (東京慈医大第二生理, \*名古屋市大医学部第一解剖)

前の論文と同じ標本を用いて, ルテニウムレッドの作用を調べた. その結果, ルテニウムレッドは筋小胞体からのカルシウム放出の抑制, ミトコンドリアのカルシウム取り込みの阻害, 収縮蛋白質系のカルシウム感受性の低下をきたすこと, 更に細胞内に入ることを形態学的にも示した. [Regular paper pp. 273-281]

イヌ血液灌流右室乳頭筋の等尺性単収縮のハイブリッドロジスティック性

Hybrid logistic characterization of isometric twitch

force-time curve of intact blood-perfused canine right ventricular papillary muscle

坂本泰祐, 高木 都\*, 幡 芳樹, 松原広己, 荒木 惇一, 菅 弘之 (岡山大医学部第二生理, \* 奈良県医大第二生理)

心室の等容量収縮・弛緩時の内圧は, 圧上昇相および下降相に対応する2つのS字状曲線の差として表されるが, 同じ事情は, 右心室の乳頭筋の等長性収縮および弛緩に関しても成り立つことを交叉循環した犬の心臓で見出した. [Regular paper pp. 283-289]

#### 交差緩和時間測定による軟骨内の水状性の研究

Cross-relaxation times of normal and biochemically induced osteoarthritic rabbit knee cartilages

桑田一夫, 佐藤真司\*, 恵良聖一, 曾我美勝, 木田公洋\*, 岩間 亨\*\*, 加藤一夫\*\*\*, 松永隆信\*, 亘 弘\*\*\*\* (岐阜大医学部第二生理, \* 同整形外科, \*\* 同神経外科, \*\*\* 同第一病理, \*\*\*\* 生理学研究所)

桑田らは, NMR を用いて家兎膝関節軟骨からのプロトンのスピン格子緩和時間と交差緩和時間を測定し, ヨード酢酸によって得た変形性関節症モデルでは前者は正常だが後者が有意に短縮することをはじめて明らかにした. これはおそらく本変性疾患における軟骨内蛋白 (おそらくコラーゲン) の組成変化によるものと著者らは推定している. いずれにせよ, NMR 法はこの方面でも優れた非侵襲的検査法となりそうだ. [Regular paper pp. 291-297]

#### マウス膵B細胞における $\text{Na}^+$ 流入の抑制による細胞内 ATP 濃度の上昇

Suppressing  $\text{Na}^+$  influx induces an increase in intracellular ATP concentration in mouse pancreatic  $\beta$ -cells

丁 維光, 北里 宏 (滋賀医大第二生理)

マウス・ラ氏島  $\beta$ -細胞において  $\text{Na}^+$  流入を抑制すると ATP 感受性  $\text{K}^+$  チャネルが閉じて脱分極がおこる. この現象が細胞内の  $\text{Na}^+$  濃度が減少し膜  $\text{Na}^+$  ポンプの ATP の消費が減少して ATP 濃度が上昇した結果であることを示した. [Regular paper pp. 299-306]

#### 磁気によるヒト白血球細胞のアポトーシス誘導

Induction of apoptosis in human leukemic cells by magnetic fields

久光 正, 成田和広, 笠原多嘉子, 瀬戸 明, Yu, Y., 浅野和仁\* (昭和大医学部第一生理, \* 同医動物学)

50 Hz の低周波電磁波をヒト骨髄性白血病のセルラインである HL-60 と ML-1 に照射するとアポトーシスが起るが, 正常白血球では起こらないことを発見し, 低周波電磁波の医学への応用の可能性を示唆した短報である. [Short communication pp. 307-310]

#### ラット灌流顎下腺の浸透圧負荷後の間質浸透圧の経時変化の推定

A method to estimate the transient interstitial osmolarity change upon application of osmotic stress in perfused rat submandibular gland

吉田秀世, 中張隆司, 今井雄介 (大阪医大第一生理) 細胞間液の浸透圧をリアルタイムで測定することは困難である. 著者らは臓器灌流実験における細胞外空間での灌流液交換についてのモデル化を行い, その検証のため灌流液の  $\text{Cl}^-$  のステップ交換と  $\text{Ag}-\text{AgCl}$  電極を用いて細胞間隙の  $\text{Cl}^-$  濃度変化を測定した. [Technical note pp. 311-316]

#### <Vol. 47, No. 4, 1997>

体プレチスモグラフィによるマウスの換気量測定  
Determination of ventilatory volume in mice by whole body plethysmography

小野寺誠, 桑木共之\*\*\*, 熊田 衛\*\*, 増田善昭 (千葉大医学部内科, \* 同生理, \*\* 東京大医学部生理)

全身プレチスモグラフィによる意識下と麻酔下のマウスの一換気量測定の信頼性を, 直接プレチスモグラフィ, ニューモタコグラフィ法に対して比較検討したところ, 前者の誤差は, 後二者に比べ7%以下であり, 前者の有用性が示された. [Regular paper pp. 317-326]

#### ラットにおける低圧下の酸素状態と甘味物質

Hypobaric hypoxia and hedonic matrix in rats

Singh, S. B., Sharma, A., Panjwani, U., Yadav, D. K., Chandra, K., Sharma, K. N., Selvamurthy, W. (Defense Inst. of Physiol. and Allied Sci., India)

ラットを用いて、7620メートルの高地の気圧環境に相当する低圧、低酸素状態を、1日に21時間、連続18日間続けた時に見られる摂食行動と、異なる味をもつ物質摂取反応を調べた。低酸素に曝露している18日間に、毎日の食事摂取量、水分摂取量と体重は低下し、軽度の低血糖が認められた。ラットはその間甘いものをとる傾向があり、グルコースとサッカリンを与えると、エネルギー源となるグルコースをとる傾向が認められた。高地におけるストレスは食事摂取量に影響を与えるが、その場合味覚反応、たとえば甘いあるいはエネルギー源となる甘みに対する反応も重要な意味を持つことを示唆する。

[Regular paper pp. 327-333]

#### 人一回呼出法による一酸化窒素

Nitric oxide in single-breath exhalation in humans

鈴木英雄, Krasney, J. A. (池上総合病院内科)

NOを含むガスをヒトに吸引させ、呼気のはじめの部分と終末部分のガスのNO濃度を測定した。呼気終末部分のNO濃度が低いことから、気道において産生されたNOの一部が肺胞からも除去される可能性を指摘した。[Regular paper pp. 335-339]

#### 皮膚冷却刺激が運動単位の活動様式に及ぼす影響

Effects of cold stimulation of human skin on motor unit activity

与那正栄 (東京薬大体育)

温度の運動単位活動への効果を、筋温度を変化させない-10℃の空気中での皮膚冷却による上腕二頭筋の随意的等尺性収縮で検討し、皮膚温度の低下が、特に末梢の皮膚温度受容器とシナプス連絡をもつ高閾値運動単位数を漸増させる力を選択的に低下させることを示唆した。[Regular paper pp. 341-348]

#### 妊娠中におけるラット子宮筋ミオシン重鎖発現の変化

Changes in myosin heavy chain (MHC) expression during pregnancy in rat uterus

Kumar, R., Malhotra, R. K., Katoch, S. S. (Dept. of

Biosci., Himachal Pradesh Univ., India)

ラット子宮筋のミオシン重鎖(MHC)は204 kDa (MHCI)と200 kDa (MHCII)の2種類からなり、妊娠によりMHCIは増加し、MHCIIは減少する。妊娠によりMHCの分解が亢進する。[Regular paper pp. 349-354]

#### ウサギ房室結節細胞における低閾値持続性内向き電流の存在

Existence of a low-threshold and sustained inward current in rabbit atrio-ventricular node cells

過集慶, 野間昭典 (京都大医学研究科細胞機能制御)

家兔房室結節単離心筋細胞の中の紡錘状細胞で、すでに洞結節歩調取り細胞で見られている持続内向き電流Istと同様なものと考えられる、ニカルジピンで抑制される低閾値持続内向き電流の存在を見いだした。[Regular paper pp. 355-359]

#### 高酸素親和性赤血球の低流量灌流下での最大収縮時骨格筋酸素摂取

Oxygen uptake in maximally contracting muscle perfused at low flow with high O<sub>2</sub> affinity erythrocytes

上月久治, 高木 都, 石立つ裕美, 坂田 進, 清水悟, 大賀好美, 岸 隆司, 榎 泰義 (奈良県医大第二生理)

イヌ腓腹筋血管灌流標本(圧・量一定)にて最大筋収縮時のV<sub>O<sub>2</sub></sub>とP<sub>vO<sub>2</sub></sub>の関係を正常赤血球と高酸素親和性赤血球溶液で比較した。P<sub>vO<sub>2</sub></sub>は前者で高いがV<sub>O<sub>2</sub></sub>とO<sub>2</sub>抽出率は同じであった。血球の毛細血管通過時間が長くシャントが一定のため、P<sub>vO<sub>2</sub></sub>とは無関係にO<sub>2</sub>摂取が生じると推測した。[Regular paper pp. 361-366]

#### イモリ嗅細胞の活動電位発生に及ぼすNa<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>電流の効果の定量的解析

Quantitative analysis of Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> current contributions on spike initiation in the newt olfactory receptor cell

河合房夫, 倉橋 隆, 金子章道 (生理学研究所生体情報)

イモリ嗅覚受容器細胞(ORC)をもちい、実際の活動電位の発生時におけるT型Caチャンネル電流の寄与

分を膜電位固定下での電流測定をもとにしてイオン電流モデルから予測した。[Regular paper pp. 367-376]

**鶏胚心筋の興奮収縮連関調整における PKC の関与**  
Participation of PKC in modulation of the excitation-contraction process of chick embryo cardiac muscle  
波多江純真 (福岡大医学部第二生理)

Chick embryo の心筋条片における単収縮と細胞内 Ca 濃度変化に対して phorbol ester (TPA) が抑制的に作用し、かつ、高濃度 K 溶液による Ca 流入を抑制することから、protein kinase C (PKC) が心筋細胞内 Ca 調節と収縮に影響している可能性がある。[Regular paper pp. 377-383]

#### <Vol. 47, No. 5, 1997>

**呼吸リズム形成の神経機序：摘出脳幹・脊髄標本によるアプローチ**

Neuronal mechanisms of respiratory rhythm generation: An approach using in vitro preparation  
鬼丸 洋, 荒田晶子, 本間生夫 (昭和大医学部第二生理)

本邦において世界に先駆けて開発された摘出新生ラット下部脳幹・脊髄標本を用いて、呼吸リズム形成機序を詳細に解析した著者らの成績が主に記載されている。他研究者の成績も十分考慮してあり、呼吸中枢機序を解明する際の指標となる重要な総説である。[Review pp. 385-403]

**ケージド ATP パルス光分解による骨格筋クロスブリッジ研究**

The cross-bridge mechanism studied by flash photolysis of caged ATP in skeletal muscle fibers  
堀内桂輔 (大分医大生理)

ケージド物質パルス光分解法の最初の実用は、骨格筋クロスブリッジ研究として1982年に報告された。これまで報告されてきた骨格筋ケージド ATP 実験の結果を見渡し、クロスブリッジ化学力学構造関連の研究に残されている問題点を整理する。[Review pp. 405-415]

**GABAA 受容体の脱感作が網膜水平細胞の光応答振幅を変化させる**

Desensitization of the GABAA receptor shifts the dynamic range of retinal horizontal cells due to light and dark adaptation

河合房夫, 神山斉己, 白井支朗 (豊橋技術科学大情報工学)

背景光照射によって魚類網膜水平細胞の光応答振幅がゆっくりと変化することは以前から知られており、どのようなメカニズムでこのような現象が発生するのかは網膜研究者の間で謎とされていた。今回の報告はこの現象が錐体視細胞の GABAA 受容体によるものであることを明確に示したものである。[Regular paper pp. 417-429]

**ラットの脳の腸間膜微小血管を用いた実験的急性血栓形成におけるフォンウィルブランド因子、フィブリノーゲン、フィブロネクチン関与の相違**

The difference involvement of von Willebrand factor, fibrinogen and fibronectin in acute experimental thrombosis in rat cerebral and mesenteric microvessels

山本順一郎<sup>1</sup>, 石井いずみ<sup>1</sup>, 沖田奈穂子<sup>1</sup>, 佐々木康人<sup>1</sup>, 山下 勉<sup>1,2</sup>, 松岡 瑛<sup>2</sup>, 木村敏明<sup>1,3</sup>, John C. Giddings<sup>4</sup>, 渡辺定博<sup>5</sup>, 関 淳二<sup>6</sup> (<sup>1</sup>神戸学院大栄養学部生理, <sup>2</sup>兵庫医大臨床病理, <sup>3</sup>神戸大医学部保健, <sup>4</sup>Dept. of Haematol., Univ. of Wales Coll. of Med. UK, <sup>5</sup>神戸市看護大基礎医学系, <sup>6</sup>国立循環器病センター研究所生体工学)

血小板はずり力の影響下で、種々の接着分子を介して血液細胞やその他の表面に結合する。本件本研究はラット微小血管にレーザー照射により血小板血栓を形成させる方法を用いて、血栓形成におけるずり力と接着分子の関与を明らかにした。[Regular paper pp. 431-441]

**新生児ラットの下部脳幹・右迷走神経・心臓摘出標本**

An in vitro brainstem-heart preparation of the neonatal rat with intact right vagus nerve  
粟生田輝, 林 文明\*, 福田康一郎\*, 増田善昭 (千葉大医学部第二生理・\*第三内科)

新生ラットを用いて摘出脳幹—迷走神経—心臓標本

を作成した。舌咽神経・迷走神経求心路を刺激すると、下部延髄を介して反射的に徐脈反応がおこることを明らかにした。また迷走神経支配の偏側性は生後発達することが示唆された。[Regular paper pp. 443-448]

#### ラット副腎スライス標本における副腎髄質細胞の機能的構造とシナプス伝達

Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla  
梶原利一<sup>1,2</sup>, Olav Sand<sup>3</sup>, 城所良明<sup>4</sup>, Michael E. Barish<sup>5</sup>, 飯島敏夫<sup>1</sup> ( <sup>1</sup>電子技術総合研究所超分子部, <sup>2</sup>東北大情報科学研究科, <sup>3</sup>Dept. of Biol., Univ. of Oslo, Norway, <sup>4</sup>群馬大医学部行動生理, <sup>5</sup>Div. of Neurosci. Beckman Res. Inst. of the City of Hope, USA)

副腎髄質細胞に投射するコリン作働性神経からのニコチン型アセチルコリン受容体を介したシナプス入力 の性質をラット副腎髄質のスライス標本を用いて形態学的, 光学的, 電気生理学的に詳細に解析した研究である。[Regular paper pp. 449-464]

#### 最大下作業時における鼻および口呼吸時の呼気一酸化窒素の比較

Comparison of exhaled nitric oxide and cardiorespiratory indices between nasal and oral breathings during submaximal exercise in humans

安田好文, 伊藤智式, 宮村実晴\*, 西野仁雄\*\* (豊橋技術科学大体育保健センター, \*名古屋大総合保健体育科学センター, \*\*名古屋市大医学部生理)

気道から排出される NO の運動時の呼吸機能への影響についてヒトの口呼吸と鼻呼吸で比較した。鼻呼吸で NO 排出量が多いが, その他の呼吸パラメータや心拍数に差は認められないことから, 主に鼻腔から排出される NO の呼吸への影響は少ないと推定した。[Regular paper pp. 465-470]

#### 微小重力環境がラット後肢の速筋の酵素活性ならびに微細構造に与える影響

Effects of spaceflight on enzyme activities and ultrastructure of fast-type skeletal muscles of rats

吉岡利忠, 山下勝正, 田中 修, 内田宙司, 木村みどり, 藤田和彦, 関口千春\*, 長岡俊治\* (聖マリアンナ医大第二生理, \*宇宙開発事業団)

ラット骨格筋の酸化的および解糖系酵素活性と微細構造が, 宇宙飛行の微小重力の影響によりどのように変化するのか調べた。[Short communication pp. 471-476]

#### 一酸化窒素合成酵素阻害剤が褐色脂肪細胞のリン脂質組成に及ぼす効果

Effects of nitric oxide synthase inhibition on phospholipid fatty acid composition of brown adipose tissue

シャハ・シャマル・クマル, 大野都美恵\*, 大日向浩, 黒島晨汎旭川医大第一生理, \*北海道教育大旭川校家庭科)

ラット褐色脂肪細胞(BAT)の機能調節に関する NO の役割を明らかにすべく, BAT のリン脂質脂肪酸に及ぼす NO 合成酵素(NOS)阻害剤の影響を調べた研究であり, NOS 阻害剤である L-NAME が特定のリン脂質成分を変化させることを明らかにした。

[Short communication pp. 477-480]

#### 耐久運動選手の最大乳酸定常状態

The maximal lactate steady state in elite endurance athletes

A. R. Hoogveen, J. Hoogsteen, G. Schep (St. Joseph Hosp. Veldhoven, The Netherlands)

運動選手(トライアスリートとサイクリスト)でフィールドで 40 km 自転車走を行い定常状態での乳酸レベル(最大乳酸定常状態)を測定した。その結果, 従来実験室で得られた値より高く, 乳酸の意義の再検討が示唆された。[Short communication pp. 481-485]





## 血友病の遺伝子異常と遺伝子診断

小嶋 哲人  
(名古屋大学医学部第一内科)

### はじめに

血液凝固機序に関与する因子には、現在のところ少なくとも13種の蛋白とリン脂質およびカルシウムイオンが知られている。これらの凝固蛋白の先天性異常による出血性素因の代表的なものに血友病(Hemophilia)がある。血友病には血友病Aと血友病Bがありそれぞれ血友病Aは血液凝固第VIII因子、血友病Bは第IX因子の量的あるいは質的な欠乏が原因で出血症状を呈する疾患である。血友病はX染色体連鎖性遺伝形式をとり男児に出現するが、これは第VIII因子、第IX因子がともにX染色体上にそれぞれ責任遺伝子が存在するためである。

日本人での血友病の発生率は欧米諸国と同様に男児出生人口10万人当り10人、血友病AとBとの比率はおおよそ5:1とされ、先天性出血性素因の中では最も頻度の高い疾患である[1]。血友病の診断は従来より凝血的ならびに生化学的な手法により行われてきたが、以下に述べるようにそれぞれの責任遺伝子およびcDNAが単離され、遺伝子のレベルでの診断が可能となっている。1980年代に入ってから遺伝子工学的解析技術のめざましい進歩により、同一症状を呈する血友病が遺伝子レベルでは様々な異常により引き起こされていることが明かにされている。とくに血友病Aでは、蛋白解析からは困難であった第VIII因子の構造・機能解析による病態解明に、これらの遺伝子解析から得られた知見が大いに貢献している。

血友病についての研究は、このように分子遺伝学的手法の発展に伴い画期的とも言える進歩を遂げ、遺伝子レベルの臨床診断、遺伝子工学を用いた組み換え型第VIII因子、第IX因子の

臨床応用、さらには新しい治療法としての遺伝子治療を目指した包括的な臨床的研究が進められている。本稿では、これらの最近の知見も踏まえ血友病の遺伝子解析、遺伝子診断について概説する。

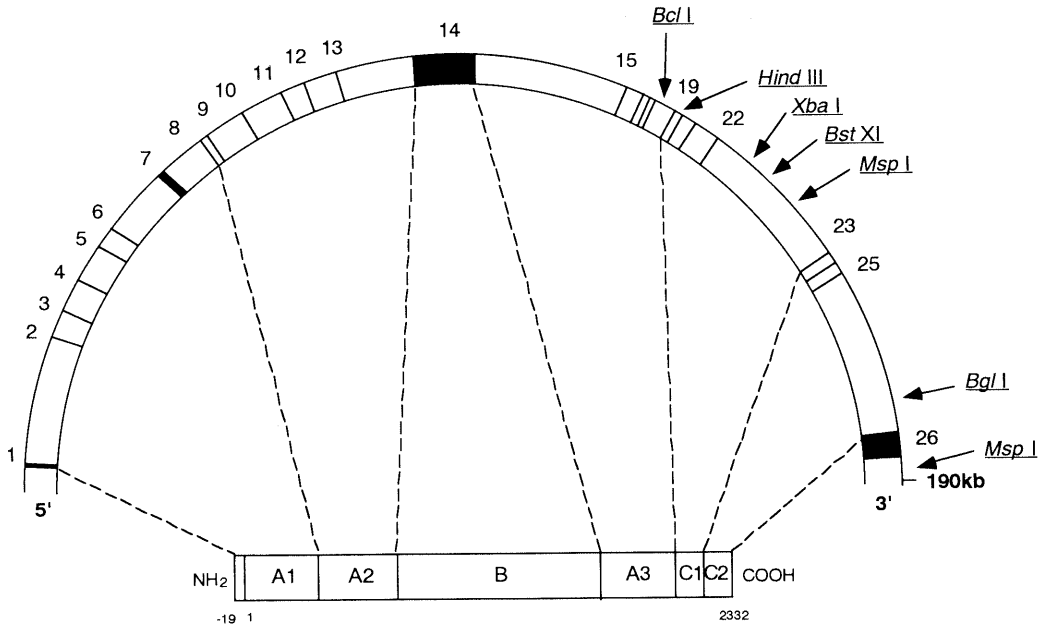
### 遺伝子構成と蛋白構造

#### 1: 第VIII因子

X性染色体上のXq28の位置にマッピングされたヒト血液凝固第VIII因子遺伝子は、1984年に分離されて図1に示すように26個のエクソンと25個のイントロンをもつ全長186kb(X染色体の約0.1%)にも及ぶ巨大な遺伝子であることが判明し、転写されたmRNAの大きさも9kbと巨大である[2]。第VIII因子が肝臓で産生されることは従来よりよく知られていたが、第VIII因子mRNAの産生部位の検索により腎臓、脾臓、リンパ節などでも発現していることが判明している[3]。第VIII因子遺伝子内およびそのごく近傍には、血友病Aの遺伝子診断に使用可能な制限酵素断片多型(Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP)部位が少なくとも7ヶ所(*BclI*, *HindIII*, *XbaI*, *BstXI*, *MspI*, *BglI*, *MspI*)、第VIII因子遺伝子外では2ヶ所(*TaqI*/St14, *gPII*/DX13)に存在しており、これらを用いて血友病AのDNAレベルでの保因者診断、出生前診断が可能となっている[4]。

第VIII因子の血中濃度は100ng/mlときわめて微量の上に、精製過程でのプロテアーゼ分解のために純化が非常に難しく、蛋白レベルからの研究ではその詳細な解析は困難であった。しかし、第VIII因子遺伝子に加えそのcDNAも分離され[5]、これらの解析結果より推定される第VIII因子は19個のアミノ酸残基よりな

## 第VIII因子遺伝子



## 第VIII因子蛋白

図1. 第VIII因子の遺伝子と蛋白の構造(模式図)

*BclI*, *HindIII*, *XbaI*, *BstXI*, *MspI*, *BglI* は RFLP を検出する制限酵素とその部位を示す。

るシグナルペプチドをもち、その成熟蛋白は2332アミノ酸残基からなる一本鎖ポリペプチドとして合成されることが判明した。そして、この成熟第VIII因子は第V因子と非常によく似たドメイン構造をもち、N末からA1, A2, B, A3, C1, C2各ドメインから構成されることが明らかとなった。この各Aドメインはセルロプラスミンに見られるA1, A2, A3ドメインと相同性が認められており、一方Cドメインは discoidin あるいは mouse milk fat globule binding protein に相同性が認められている。さらに、リコンビナント第VIII因子の発現系を用いた詳細な第VIII因子合成分泌の研究により、リボゾームで合成された第VIII因子の前駆体は小胞体に移行する際にシグナルペプチドがはずされ、小胞体および次のゴルジ体において様々な糖付加などの修飾を受け、さらにゴルジ体を通過する際に Arg 1648-Glu 1649 および Arg 1313-Ala 1314 で切断を受け2本鎖型成熟第

VIII因子としての分子形態を完成させて行くことが明らかにされた[6](図2)。

血中へ分泌された成熟第VIII因子はフォンヴィルブランド因子と複合体を形成しており、様々なプロテアーゼから保護されている。このフォンヴィルブランド因子との結合には、第VIII因子の2ヶ所ある酸性配列 a1 部位(331-372)、a2 部位(1649-1689)が重要で、とくに後者はフォンヴィルブランド因子との結合に必須とされ、その硫酸化 Tyr 1680 が重要な役割を果たしていることがリコンビナント第VIII因子の発現実験系において示されている[7]。

## 2: 第IX因子

第IX因子は分子量約54,000の一本鎖糖蛋白(糖鎖重量はおよそ17%)で、血中濃度はおよそ5 Mg/ml、主たる産生場所は肝臓と考えられている。1982年、Kurachi & Davie ら[8]により全長1463 bp のヒト第IX因子 cDNA が単離さ

第VIII因子蛋白

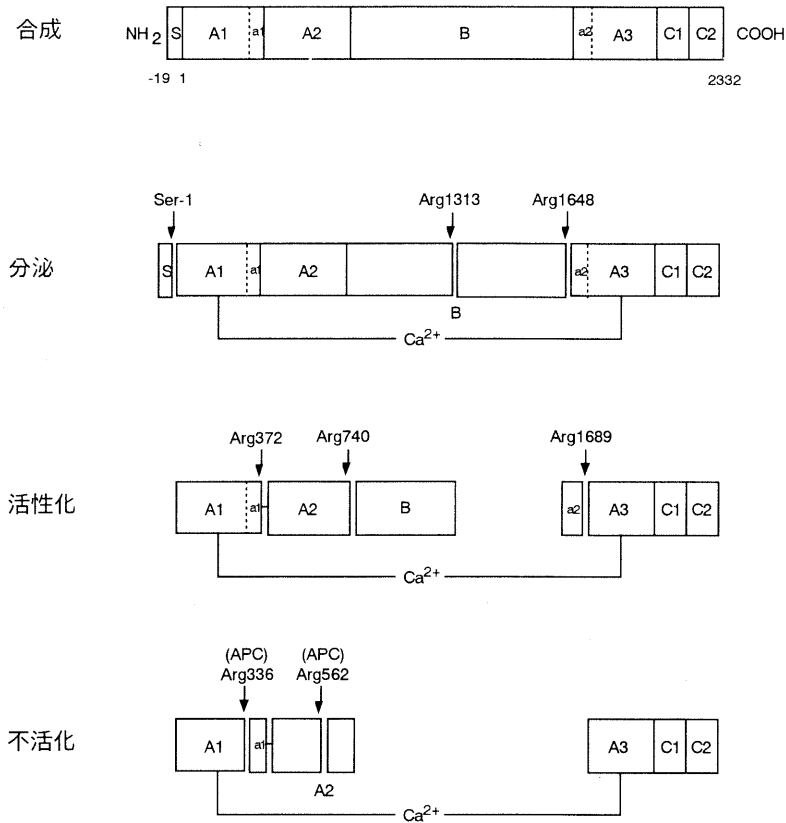
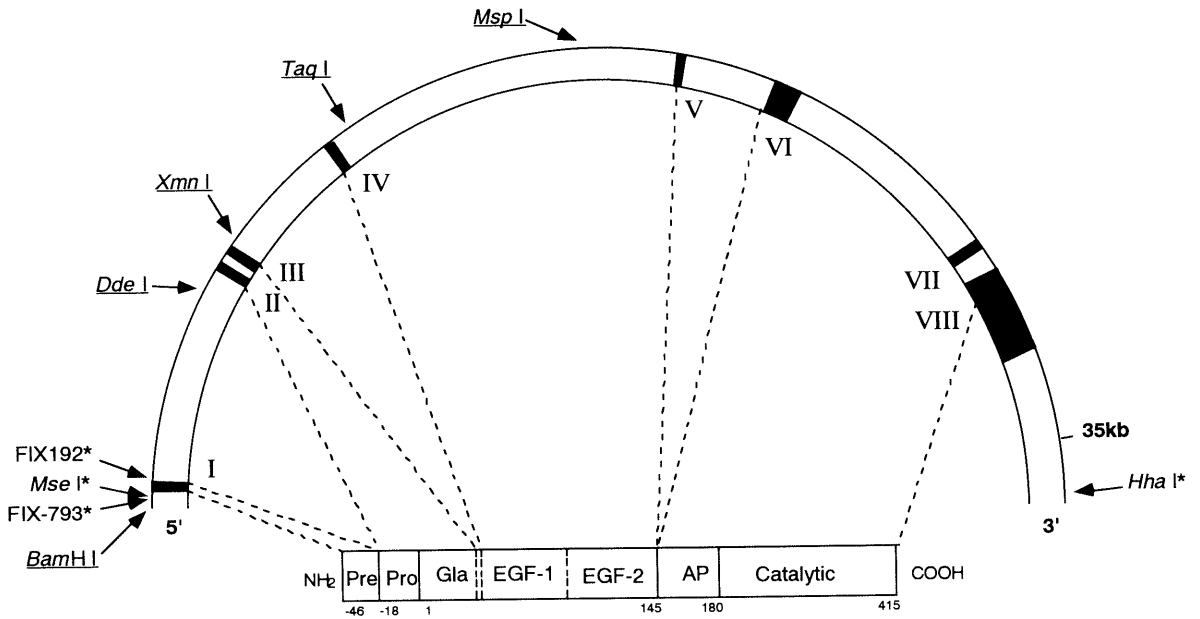


図2. 第VIII因子ドメイン構造とその合成分泌  
 活性化不活化における蛋白解裂部位アミノ酸とその番号はC末側を示す。

れたが、これとは独立した数グループからもクローニングが報告されている。そして、ヒト第IX因子 cDNA は約 2.8 kb の大きさを持ち46個のアミノ酸残基からなるプレプロリーダー領域と415アミノ酸残基の成熟第IX因子をコードする領域、さらに 1.4 kb の長いノンコーディング領域が存在することが判明した。ここで興味あることは Kurachi らの cDNA では148番目のアミノ酸が GCT でコードされる Ala であるのに対し、Jaye ら [9] のクローンは ACT でコードされる Thr であったことで、染色体遺伝子の塩基配列あるいは精製蛋白のアミノ酸配列でも Ala と Thr とが確認されているので、この相違は正常人における二型性(dimorphism)とされている。また、性染色体 q27.1 にマッ

ピングされているヒト第IX因子遺伝子は Yoshitake ら [10] により単離され、約 33 kb に及ぶその全塩基配列が決定された。そして、ヒト第IX因子遺伝子は 8つのエクソンから約 2.8 kb の mRNA を産み出し、他のビタミンK依存性因子遺伝子との構造的な相同性を示すことが観察されている(図3)。第IX因子は蛋白構造上6つのドメインから成り、そのうち肝細胞からの分泌過程で必須の疎水性シグナルペプチドはエクソン a、プロペプチドおよび正常な蛋白折り畳みと Ca<sup>2+</sup> 結合に必要な12個の  $\gamma$ -carboxyglutamic acid 残基を含む gla ドメインはエクソン b と c、Ca<sup>2+</sup> の高親和性結合に重要な第1EGF ドメインはエクソン d、第2EGF ドメインはエクソン e、XIa 因子あるいは VIIa

### 第IX因子遺伝子



### 第IX因子蛋白

図3. 第IX因子の遺伝子と蛋白の構造(模式図)

*Bam*HI, *Dde*I, *Xmn*I, *Taq*I, *Msp*I, *Hha*I, *Mse*I は RFLP 部位, F 9-192 は DGGE 法で検出される polymorphysm 部位を示す。

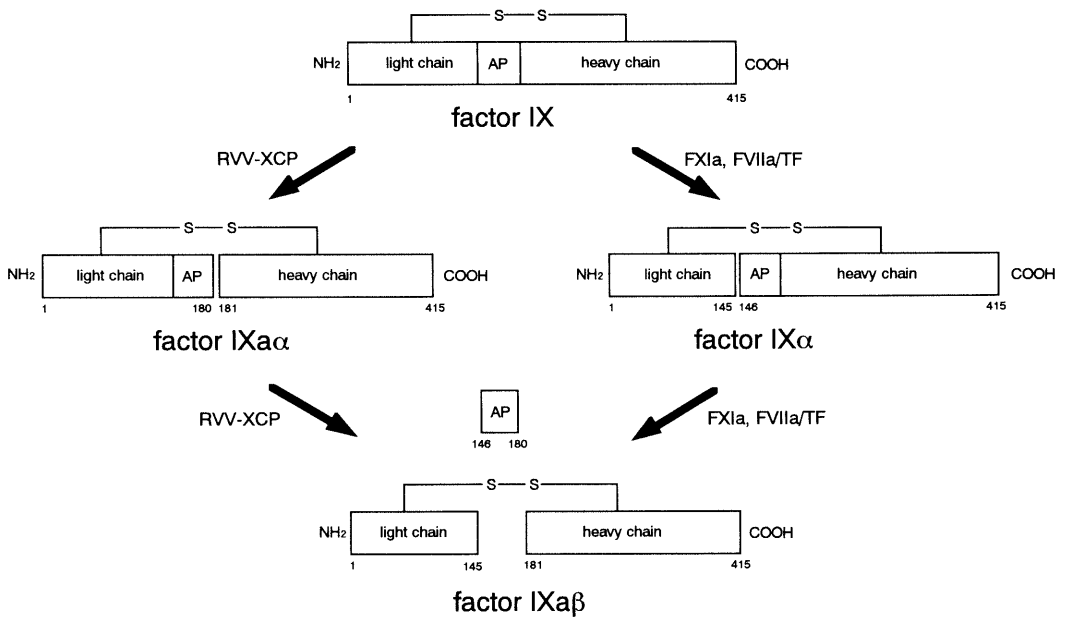


図4. 第IX因子の活性化機構

RVV-XCP: クサリヘビ毒アクチベーター

因子／組織因子により2カ所切断される活性化ドメインはエクソン f, His 221, Asp 269 と Ser 365 で構成される活性基を含むセリンプロテアーゼ・ドメインはエクソン g と h によってコードされている。

第IX因子は肝臓細胞で産生されるビタミンK依存性の糖蛋白で、図4に示したようにCa<sup>2+</sup>存在下にVIIa因子-組織因子、あるいはXIa因子によって活性化されIXa因子となる。また、第IX因子はクサリヘビ毒Xアクチベータ(RVV-XCP)によっても活性化され、この活性化系は補助因子が不要なので異常因子の解析やIX因子のアクチベータとして有用である。

### 血友病の遺伝子解析

#### 1：第VIII因子遺伝子解析

第VIII因子遺伝子は第IX因子遺伝子に比べて上述のごとく186 kb と非常に大きくかつやや遅れてクローニングされたため、血友病Aの遺伝子解析は血友病Bほど進んでいないのが現状である。当初、血友病Aの遺伝子解析はホットスポットであるCpGジヌクレオチドにおける変異を検索する方法で検討されていたが、最近のより迅速なスクリーニング法により血友病Aの遺伝子異常が多岐にわたることが判明している。そして、1991年のTuddenhamらによる255症例の集計では、182例の点変異、59例の大欠失、8例の小欠失、6例の挿入変異が報告されている[11]。

182例の点突然変異の中には、少なくとも80種以上の異なる点突然変異の型が認められており、血友病Aが遺伝子のレベルではかなり不均一な疾患であることが容易に理解できる。これらの点突然変異74例のうち、重症型の血友病Aは27例(36.5%)、中等症は29例(39%)、軽症型は18例(24%)であったが、ナンセンス変異の症例は全例重症型の表現型を持っていた。そして、中等症あるいは軽症型はすべてミスセンス変異型であった。

興味あることに、同一の点突然変異が必ずし

も同じ表現型を示さないという事実がある。例えば、Pattinsonらはコドン1689のCT変異をもつ患者に、あるものには重症型、あるものには中等症型血友病Aをもたらすことを報告している[12]。また、Schwaabら[13]はコドン2307のGT変異(Arg→Leu)重症型血友病Aを示すことを報告したが、同じ変異でInabaら[14]は中等症を示す症例の報告を行っている。これらの事象がなぜ起こるのかはその詳細は明かではないが、これはミスセンスに限った事象でナンセンス変異では必ず重症型の血友病を起こしている。

血友病Aの病型の多様性をもたらすものにも一つ、インヒビターの発生がある。血友病Bでは大きな遺伝子欠損がインヒビター発生に関与していると言われている[15]が、血友病Aではそれほどの相関は見られない。実際、Tuddenhamらの集計でも12例の点突然変異例においてインヒビターの発生が見られることが報告されており、逆に比較的大きな遺伝子欠損をもつ血友病A患者でもインヒビターをもたない症例が数多く報告されている。血友病Aの点突然変異12例のうち10例はナンセンス変異であり、残りの2例は2209 Arg→Gln と 2229 Try→Cys アミノ酸置換例の軽症～中等症患者であった。しかし、そのインヒビター陽性ナンセンス変異8例は1914 Arg と 2147 Arg に集中しており、これらのアミノ酸が免疫寛容をもたらす構造形成に重要な働きを持つことが想像される。

血友病Aには第VIII因子の抗原量を正常にもつが活性の低い変異型がある。これらはCross Reacting Material Positive (CRM+)あるいは血友病A+と呼ばれ、その頻度は全血友病Aの約5%である。これらの機能異常をもつ第VIII因子の解析は機能上重要な情報が得られる可能性があるが、第VIII因子の血中濃度が微量でかつ精製過程でのプロテアーゼ分解のために純化が非常に難しく、蛋白レベルからの研究ではその詳細な解析は困難であった。しかし、近年のモノクローナル抗体による純化法やイム

ノブロット解析法の進歩によりようやく解析できるようになってきている。例えば、アミノ酸372と1689の Arg は第 VIII 因子活性化時のトロンビン解裂部位で、これらの部位のアミノ酸置換による CRM+異常第 VIII 因子例の報告がある [16~19]。

一方、これらの点突然変異の38%はホットスポットと言われている CpG ジヌクレオチドにおける CT あるいは GA 置換である。実際、ヒト遺伝子病の原因となる点突然変異の約半はこの CG→TG あるいは CG→CA 置換の結果とも言われている [20,21]が、Tuddenham らの集計での高い CpG ジヌクレオチドにおける変異の占める割合は、当初、制限酵素あるいはオリゴヌクレオチドによるこの CpG 変異スクリーニング法を用いていたためである。しかし、最近のより迅速なスクリーニング法により血友病 A の遺伝子異常が多種多岐にわたることが判明している。例えば Higuchi らは45組のプライマーによる PCR および DGGE によるスクリー

ニングにより、軽症~中等症血友病 A 29例の蛋白コード領域およびスプライス結合領域を検索することにより25例の遺伝子異常を検出している [22]。しかしながら、血友病 A 患者の過半数を占める重症型では上記領域を網羅しても50%は遺伝子異常が検出不能であることが報告されている [23]。

Naylor らは28例の血友病 A 患者の第 VIII 因子 mRNA からの RT-PCR 産物から Chemical mismatch 解析を行い、軽症あるいは中等症の5例全例にミスセンス点突然変異を、重症血友病 A 23例中13例に原因と思われる遺伝子異常を認めたと報告している [24]。しかし、残り10例においてはエクソン 1-22 およびエクソン 23-26 では予想されるサイズの正常なフラグメントが得られるものの、エクソン22からエクソン23に連なる mRNA からの RT-PCR 産物は全く得ることができなかったと報告している。そして、最近2つのグループから [25,26] 独立して、第 VIII 因子遺伝子のエクソンおよびその近傍に異

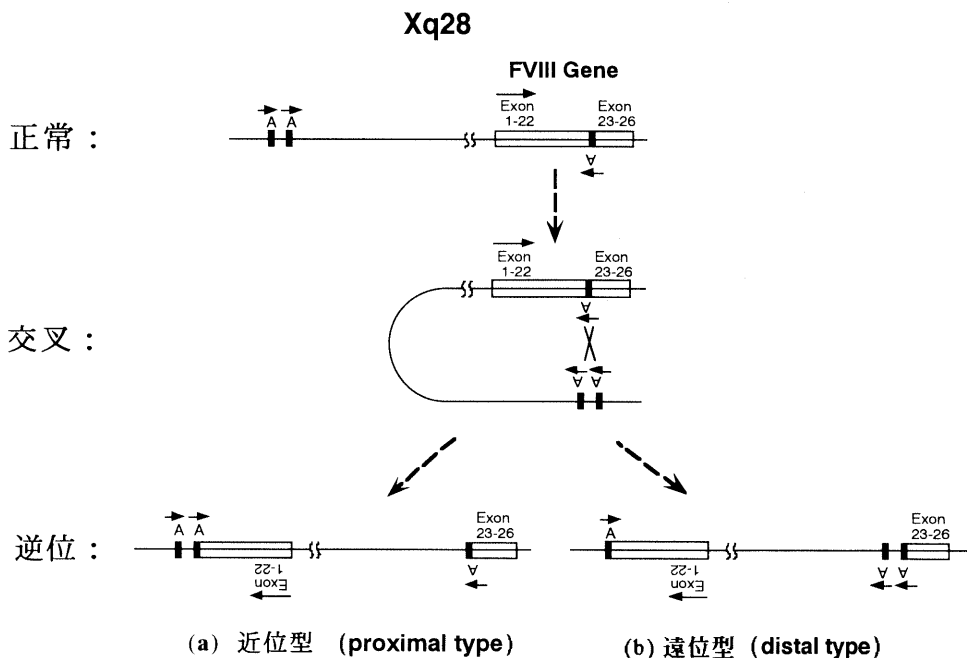


図5. 重症血友病A患者における第 VIII 因子遺伝子逆位のモデル(文献22より改変)  
Exon 1-22, 23-26 は第 VIII 因子遺伝子, A は第 VIII 因子遺伝内およびその上流に3コピー存在する別の遺伝子を示す。矢印は転写方向を示す。逆位には近位型と遠位型とが存在する。

常を検出できない血友病A重症例におけるイントロン22と上流位との逆位(Inversion)の可能性が報告され、注目されている。

逆位の生じる正確な機構については明らかではないが、約 500 kb 上流の 2 つの gene A とイントロン22内の逆向き gene A とで相同組換えが生じることにより引き起こされるものと考えられている。そして、イントロン22内の gene A と上流の gene A の 2 コピーのうちより近位に存在するものとの組換えが起こる近位型 (Proximal type: 図 5 (a)), より遠位に存在するものとの遠位型 (Distal type: 図 5 (b)) の 2 種類のパターンを生じる。その結果、第 VIII 因子遺伝子がおのおの逆向きに分断されることになり、第 VIII 因子遺伝子は正常に転写できず重症の血友病Aを発症する。この場合、それぞれ蛋白コード領域、スプライス結合領域、プロモーター領域等での塩基配列には全く変異を起していないため、Higuchi らの用いた PCR および Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) によるスクリーニングでは遺伝子異常が検出できなかったのである。我々が non-RI サザンブロッティング法を用いてこの第 VIII 因子遺伝子逆位解析を行なった結果、欧米人と同様に日本人においても第 VIII 因子遺伝子逆位異常が重症型血友病Aの原因の一つであること判明した[27]。

## 2: 第 IX 因子遺伝子解析

第 IX 因子遺伝子は第 VIII 因子遺伝子に比べて比較的早期にクローニングされ、かつ約 33 kb と小さいため、血友病Aに比べ血友病Bの遺伝子解析が早くから進められてきた。1997年にまとめられた database [28] によると合計 1535名の血友病B患者における遺伝子異常が登録されている。そのうちあるものは重複しており、血友病Bの原因と思われる独立した遺伝子異常は597種類と報告されている。これらの多くは、いわゆるホットスポットである CpG ジヌクレオチドにおける変異 (CG→TG あるいは CA 変換) によるものであることが知られてい

表 1. 血友病B患者に見られた第 IX 因子遺伝子異常 [28]

|                                         |     |
|-----------------------------------------|-----|
| unique events                           | 597 |
| pont mutations                          | 456 |
| short additions<br>or deletions or both | 119 |
| deletions                               | 91  |
| additions                               | 22  |
| additions and deletions                 | 6   |
| double mutations                        | 21  |
| triple mutation                         | 1   |

る。しかしながら、少なくともその一部は CG doublets の高度繰り返しの founder effect によるものであることが明らかにされている。CG doublets 以外の突然変異の founder effect もよく知られており、そのほか多種の重複異常が認められている。おそらく全部ではないにしろ、これらの多くは共通起源のものと思われる。(表 1)

この集計には遺伝子の部分欠損あるいは完全欠損が含まれていないが、我々の報告を含めて現在までに29例の第 IX 因子遺伝子欠損例が報告されている。そして、この大きな遺伝子欠損と第 IX 因子インヒビター発生との因果関係が指摘されている [15]。

## 遺 伝 子 診 断

血友病のように X 染色体連鎖性遺伝をする疾患の遺伝相談には保因者診断が非常に重要であり、従来、これは詳細な家族歴の調査と血液凝固学的な検査法とを組み合わせで行なわれてきたが、精度の点でやや不確実である問題があった。最近、これに加え第 VIII 因子および第 IX 因子遺伝子ならびに cDNA がクローニングされ、より正確な DNA レベルでの診断が可能となりその威力を発揮している。

一般に遺伝子診断には、血友病の異常遺伝子と連鎖する遺伝子マーカーを指標にした間接診断法と、血友病の原因と思われる遺伝子の異常自体を検索する直接診断法とがある。血友病は

臨床検査上からも多様性の大きな疾患であることが知られているが、DNA レベルでの異常はさらに多種多岐にわたり一様でなく、しかも容易には同定できない。このため直接遺伝子診断法はごく限られた家系にのみに適用可能である。一方、間接診断法は、DNA の制限断片長多型 (RFLP) あるいはその他のポリモルフィズム (多型性) により解析するため、母親がヘテロ接合体でかつ異常 allele が判明している遺伝子

マーカーが必要であるものの、より実用的で保因者診断のみならず出生前診断にも応用可能となっている。これらは、以下に述べるようにサザンブロッティング法、PCR 法、DGGE 法など、様々な遺伝子工学的手法の開発とその臨床への応用により格段の進歩を遂げてきた。

1) 異常遺伝子の直接診断法

血友病 A、B ともに比較的大きな遺伝子異常

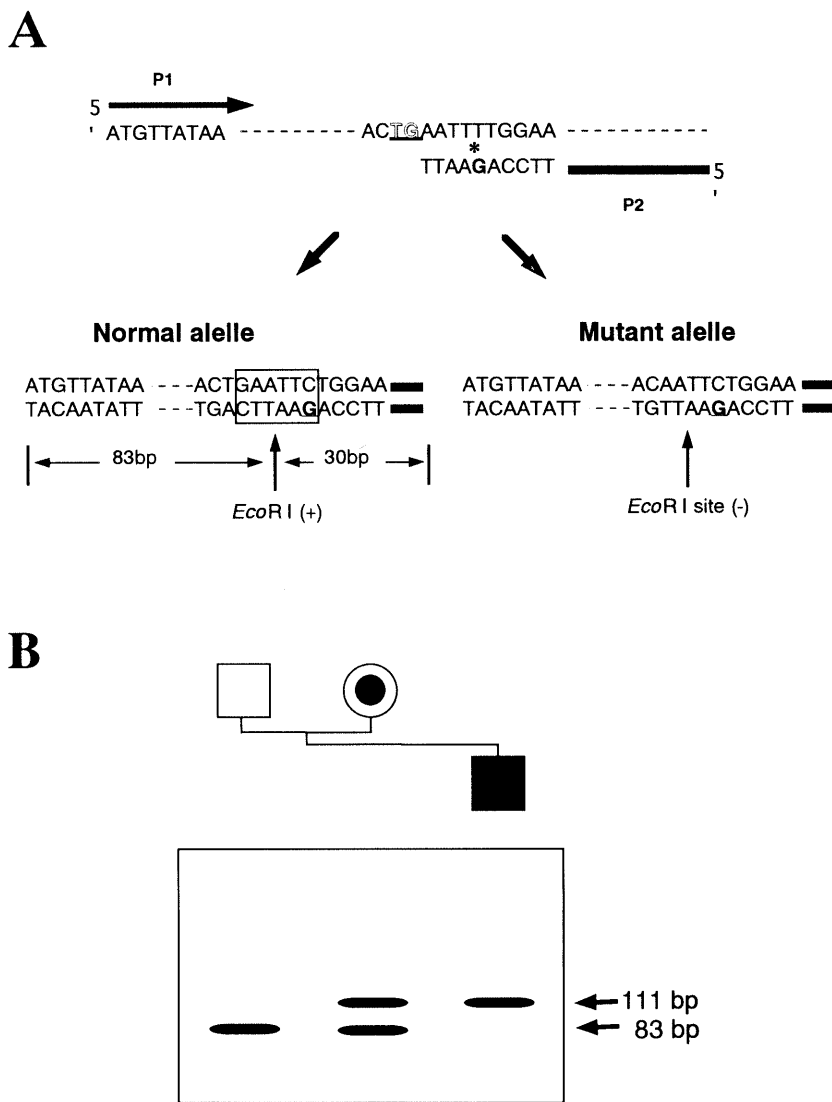


図6. Mutagenic primer を用いた血友病Bの直接的遺伝子診断 (PCR 法) その原理 (A) と実際 (B) : ■ = 血友病B患者, ● = 保因者

例(そのほとんどは欠損例)がサザンブロッティング法を用いた遺伝子解析により報告されている。また、点突然変異例の同定も数多く報告されているが、血友病Aでは第VIII因子遺伝子が巨大であるため当初は *TaqI* サイト(TCGA)の消失あるいは新たな出現により発見されたものが多い。これに対し、第IX因子遺伝子は第VIII因子遺伝子に比べ小さく比較的早期に単離されたため血友病Bではすでに1,000例を超えており、血友病が極めて多様性に富む遺伝子異常による疾患であることが判明している。

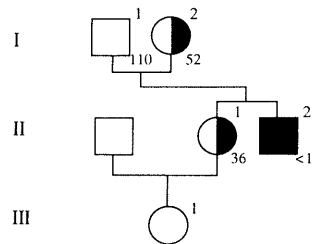
このように血友病遺伝子異常が判明している家系では、この遺伝子異常をマーカーにして直接家系内診断が可能である。しかし、上述のごとく血友病は極めて多様性に富む遺伝子異常による疾患であり、直接診断法が応用できる場合はむしろ稀である。血友病の遺伝子異常が判明しておりこの異常部位を認識する制限酵素がある場合は、これによる fragment のサイズを比較し家系内診断が可能である。有用な制限酵素部位のない場合でも、強制的に制限酵素部位を導入するように一部塩基配列を変えた primer (mutagenic primer) を用いて PCR を行ない、同様に家系内診断が可能である。

図6に、当教室の松下らが報告した血友病Bの遺伝子異常(2塩基(TG)欠損)での実用例を紹介する[29]。2塩基欠損部を含む113bpを増幅するPCR primer (P1, P2)のうち3'側の antisense primer (P2)の\*印の塩基をAからGに置換しておけば、正常遺伝子由来のPCR産物に *EcoRI* を導入することができる。したがって、*EcoRI* 処理された正常遺伝子由来PCR産物は83bp、一方 *EcoRI* 処理されても異常遺伝子由来PCR産物は切断されないため2塩基短い111bpのバンドとして認識される。本家系では、父親は正常遺伝子(83bpバンド)を、母親は正常遺伝子と異常遺伝子(111bpバンド)を持ち、患者の異常遺伝子が母親由来であることが診断できた。

前述の如く、重症血友病A患者の約40%にお

いてX染色体長腕中の第VIII因子遺伝子の一部を含んだ領域で約500kbにおよぶ逆位が起こっていることが報告されている。我々が non-RI サザンブロッティング法を用いた第VIII因子遺伝子の逆位解析を行なった結果、日本人重症血友病A患者33名のうち12名(36.4%)に逆位を検出した[27]。そして、第VIII因子遺伝子内に存在する *BclI*, *HindIII*, *XbaI* RFLP による遺伝子保因者診断が不能であった家系において、この逆位解析を用いることにより保因者診断および出生前診断を行なうことができた一家系を経験した(図7)。II-1は血友病Aである弟(II-2)と同様、一方のX染色体に逆位(遠位型)を持つことが判明し、その母親(I-2)も正常と逆位を生じた異常X染色体のヘテロ接合体であった。したがって、両者はともに血友病Aの保因者であることが遺伝子レベルで確認できた。さらに、informed consent のもとに保因者であるII-1の妊娠11週時胎盤絨毛から調整し

## A



## B

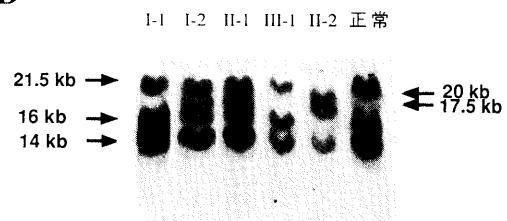


図7. 血友病Aにおける逆位解析による直接遺伝子診断(サザン法)

その家系図(A)とアガロースゲル電気泳動検査結果(B): ■=血友病A患者, □=保因者, 右下数字は第VIII因子活性値

たゲノム DNA 試料での Y 染色体検索の結果は陰性，すなわち逆位解析では正常パターンのみを示し胎児(III-1)は女兒で逆位異常 X 染色体を受け継いでいないことが判明した。

## 2) 血友病の間接遺伝子診断法

血友病 A の遺伝子診断に有用な RFLP は，少なくとも第 VIII 因子遺伝子内およびその極近傍に 7 ケ所 (*BclI*, *HindIII*, *XbaI*, *BstXI*, *MspI*, *BglII*, *MspI*)，遺伝子外で 2 ケ所 (*TaqI*/St 14, *BgIII*/DX 13) のものがよく知られている (図 1)．当教室での血友病 A 24 家系における検討では，これらの RFLP は欧米人と同様に日本人にも使用でき，*BclI* + *XbaI* で 79%，*BclI* + *XbaI* + *TaqI*/St 14 の組み合わせでは 100% に保因者の診断をすることができた [30]．さらに，PCR 法の導入により迅速かつラジオアイソトープを用いず診断することもできるようになっている．図 8 に，*HindIII* による診断例を示すが，*HindIII* RFLP は *BclI* RFLP と強い連鎖性を示すものである．保因者診断を希望してきた女性 (II-1) は 239 bp バンドと 159 bp + 80 bp バンドを示す X 染色体のヘテロ接合体であることが明らかとなったが，父親から 239 bp

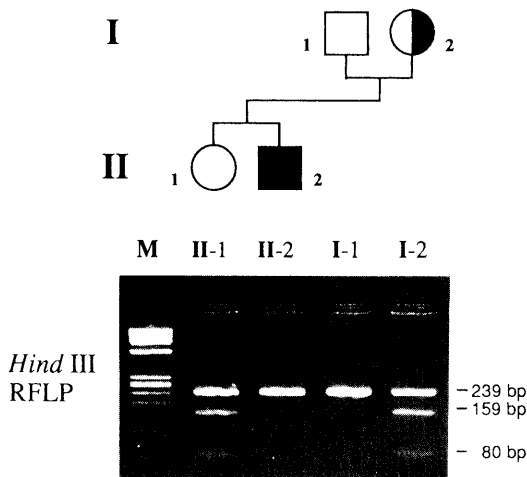


図 8. *HindIII* RFLP を用いた血友病 A の間接的遺伝子診断 (PCR 法)

その家系図とアガロースゲル電気泳動検査結果: ■ = 血友病 A 患者, □ = 保因者

バンドを示す X 染色体を，母親から 159 bp + 80 bp バンドを示す X 染色体をそれぞれ受け継いでいることが分かる．一方，患者である弟 (II-2) が 239 bp バンドを示す X 染色体を持つことから，母親由来の 159 bp + 80 bp バンドは正常 X 染色体遺伝子由来であることが明らかで，この女性が保因者でないことが診断できた [31]．

第 IX 因子遺伝子内にも 4 ケ所の RFLP 部位 (*DdeI*, *XmnI*, *TaqI*, *MspI*) がよく知られており，これらを用いての欧米白人における保因者診断有効率は 60~80% と報告されている (図 3)．しかし，これらの RFLP は日本人にほとんど存在せず [32]，日本人家系の保因者診断に有用なポリモルフィズム部位の発見が必要であった．第 IX 因子遺伝子外の DXS 99 RFLP が第 IX 因子遺伝子と強い遺伝的リンケージを示すことが報告されたが，当教室において日本人を対象に

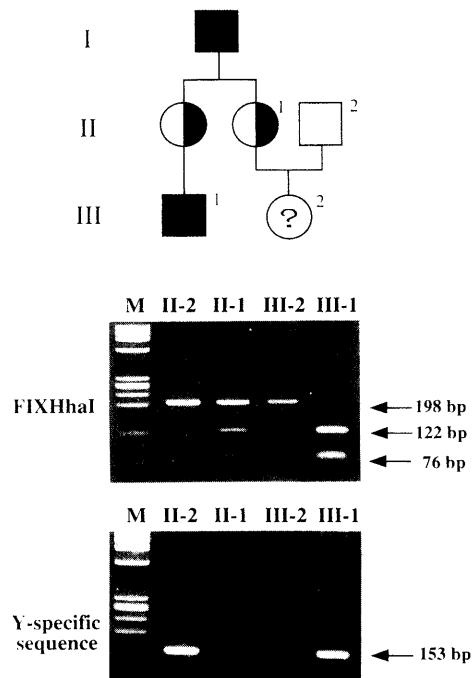


図 9. *HhaI* RFLP 解析による血友病 B の間接的遺伝子診断 (PCR 法)

その家系図とアガロースゲル電気泳動検査結果: ■ = 血友病 A 患者, □ = 保因者

検討したところ欧米人と同様(48%)に RFLP が検出され、実際の診断可能率は63%と高率であった[33]。また、我々は新たに3カ所の第IX因子遺伝子内もしくはごく近傍に存在するDNA ポリモルフィズム (FIX-793, FIX 192, FIXHhaI) が日本人に比較的高頻度に認められることを発見した[34]。図9に FIXHhaI ポリモルフィズム解析を用いた血友病Bの出生前診断例を示す。胎児(III-2)は、Y染色体検出PCRでは陰性で女兒と判明した。また、FIXHhaI ポリモルフィズム解析においては患者である母方従兄弟(III-1)のもつ血友病B責任遺伝子 allele の 122+76 bp のバンドをもっておらず、胎児は血友病Bの保因者でないと診断された。なお、本児は出生後測定した第IX因子活性および抗原量は共に70%であり正常女兒と診断されている。また、FIX-793, FIX 192に関しては母親(II-1)がホモ接合体であり診断不能であった[35]。

### おわりに

先天性の血液凝固異常疾患のなかでも、血友病は出血症状が重篤でかつ頻度も高いことから臨床の場において血友病保因者診断が重要な課題となっている。血友病では、従来より凝血学的な因子活性量や抗原量測定が診断の手段に使われていたが、その精度にはやや問題があった。そして、最近のめざましい分子生物学的手法の進歩とその応用により、これらの診断も、より正確な遺伝子レベルで行われるようになってきている。こうした遺伝子診断技術の進歩は、従来の診断法の欠点を補う意味で重要で、より正確な診断が可能となることが大いに期待される。

### 文 献

- 藤巻道男, 池松正次郎: 16凝固・線溶系, 一VI出血性素因, 一6凝固因子異常, 血液学(日比野進・監修), 丸善, 東京, 1985, p. 1583.
- Gitscier, J., Wood, W. I., Goralka, T. M., et al.: Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*. **312**: 326, 1984.
- Wion, K. L., Kelly, D., Summerfield, J. A., et al.: Distribution of factor VIII mRNA and antigens in human liver and other tissues. *Nature*, **317**: 726, 1985.
- 小嶋哲人: 先天性凝固因子異常症の遺伝子診断, 臨床医のための実験医学シリーズ13遺伝子診断(平井久丸・編), 羊土社, 東京, 1993, p. 24.
- Toole, J. J., Knopf, J. L., Wozney, J. M., et al.: Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* **312**: 342, 1984.
- Kaufman, R. J., Wasley, L. C., Dorner, A. J.: Synthesis processing and secretion of recombinant human factor VIII expressed in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **263**: 6352, 1988.
- Lyete, A., van Schijndel, H. B., Njehrs, C., et al.: Sulfation of Try 1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor. *J. Biol. Chem.* **266**: 740, 1991.
- Kurachi, K., Davie, E. W.: Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **79**: 6461, 1982.
- Jaye, M., de la Sale, H., Schamber, F., et al.: Isolation of a human anti-hemophilic factor IX cDNA clone using a unique 52-base synthetic oligonucleotide probe deduced from the amino acid sequence of bovine factor IX. *Nucl. Acids Res.* **11**: 2325, 1983.
- Yoshitake, S., Schach, B. G., Foster, D. C., et al.: Nucleotide sequence of the gene for human factor IX. *Biochemistry*, **24**: 3736, 1985.
- Tuddenham, E. G. D., Cooper, D. N., Gitschier, J., et al.: Haemophilia A: database of nucleotide substitutions, deletions, insertions and rearrangements of the factor VIII gene. *Nucl. Acids Res.* **19**: 4621, 1991.
- Pattinson, J., Millar, D. S., McVey, J. H., et al.: The molecular genetic analysis of hemophilia A: directed search strategy for the detection of point mutations in the human factor VIII gene. *Blood* **76**: 2242, 1990.
- Schwaab, R., Oldenburg, J., Tuddenham, E. G. D., et al.: Mutations in haemophilia A. *Brit. J. Haematol.* **83**: 450, 1993.
- Inaba, H., Fujimaki, M., Kazazian, H. H., et al.: Mild hemophilia A resulting from arg-to-leu substitution in exon 26 of the factor VIII gene. *Hum. Genet.* **81**: 335, 1989.
- Tanimoto, M., Kojima, T., Kamiya, T., et al.: DNA analysis of seven patients with hemophilia B who have anti-factor IX antibodies: relationship to clinical manifestations and evidence that the abnormal gene was inherited. *J. Lab. Clin. Med.* **112**: 307, 1988.
- O'Brien, D. P., Tuddenham E. G. D.: Purification and characterization of factor VIII 1,689-Cys: a

- non functional cofactor occurring in a patient with severe hemophilia A. *Blood* **73**: 2117, 1989.
- 17) Arai, M., Inaba, H., Higuchi, M., et al.: Direct characterization of factor VIII in plasma: Detection of a mutation altering a thrombin cleavage site (arginine-372->histidine). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 4277, 1989.
  - 18) O'Brien, D. P., Pattinson, J. K., Tuddenham E. G. D.: Purification and characterization of factor VIII 372-Cys: A hypofunctional cofactor from a patient with moderately severe hemophilia A. *Blood* **75**: 1664, 1990.
  - 19) Arai, M., Higuchi, M., Antonarakis, S. E., et al.: Characterization of a thrombin cleavage site mutation (Arg1, 689 to Cys) in the factor VIII gene of two unrelated patients with cross-reacting material-positive hemophilia A. *Blood* **75**: 2117, 1990.
  - 20) Cooper, D. N. and Youssoufian, H.: The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum. Gnet.* **78**: 151, 1988.
  - 21) Cooper, D. N. and Krawczak, M.: Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomics. *Hum. Gnet.* **83**: 181, 1989.
  - 22) Higuchi, M., Antonarakis, S. E., Kasch, L., et al.: Molecular characterization of mild-to moderate hemophilia A: Detection of the mutation in 25 of 29 patients by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8307, 1991.
  - 23) Higuchi, M., Kazazian, H. H., Kasch, L., et al.: Molecular characterization of severe hemophilia A suggests that about half the mutations are not within the coding regions and splice junctions of the factor VIII gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7405, 1991.
  - 24) Naylor, J. A., Green, P. M., Rizza, C. R., et al.: Analysis of factor VIII mRNA reveals defects in everyone of 28 haemophilia A patients. *Hum. Mol. Genet.* **2**: 11, 1993.
  - 25) Lakich, D., Kazazian, H. H., Antonarakis, S. E., et al.: Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A. *Nature genet.* **5**: 236, 1993.
  - 26) Naylor, J. A., Brink, A., Hassock, S., et al.: Characteristic mRNA abnormality found in half the patients with severe haemophilia A is due to large DNA inversions. *Hum. Mol. Genet.* **2**: 1773, 1993.
  - 27) 岡本能弘, 小嶋哲人, 勝見 章, ほか: 第VIII因子遺伝子逆位解析の重症血友病Aにおける保因者診断, 出生前診断への応用 *臨床血液* **36**(11): 1252-1256, 1995.
  - 28) Giannelli, F., Green, P. M., Sommer, S. S., et al.: Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions, 7th edition. *Nucl. Acid Res.* **25**: 133, 1997.
  - 29) 松下 正, 齋藤英彦: 血友病のDNA診断, *血液・腫瘍科* **22**: 129, 1991.
  - 30) Suehiro, K., Tanimoto, M., Hamaguchi, M., et al.: Carrier detection in Japanese hemophilia A by use of three intragenic and two extragenic factor VIII DNA probes: a study of 24 kindreds. *J. Lab. Clin. Med.* **112**: 314, 1988.
  - 31) 小嶋哲人: 血友病「遺伝子診断実践ガイド」中井利昭ほか編 p.267, 中外医学社, 1995.
  - 32) Kojima, T., Tanimoto, M., Kamiya, T., et al.: Possible absence of common polymorphisms in coagulation factor IX gene in Japanese subjects. *Blood*, **69**: 349, 1987.
  - 33) Tanimoto, M., Kojima, T., Kamiya, T., et al.: DNA analysis of seven patients with hemophilia B who have anti-factor IX antibodies: relationship to clinical manifestations and evidence that the abnormal gene was inherited. *J. Lab. Clin. Med.*, **112**: 307, 1988.
  - 34) Toyozumi, H., Kojima, T., Matsushita, T., et al.: Diagnosis of Hemophilia B Carriers Using Two Novel Dinucleotide Polymorphisms and Hha I RFLP of the Factor IX Gene in Japanese Subjects. *Thromb. Haemost.* **74**(4): 1009, 1995.
  - 35) 小嶋哲人, 勝見 章, 山崎鶴夫, ほか: 日本人血友病BのDNAポリモルフィズムを用いた保因者ならびに出生前遺伝子診断 *日本血栓止血学会誌* **7**(1): 29, 1996.

## 細胞膜脂質シグナリングの分子機構

坂野 喜子・野澤 義則

(岐阜大学医学部生化学教室)

### I. はじめに

膜リン脂質は蛋白質とともに生体膜を構成する二大成分と位置づけられ、もっぱら疎水性環境を提供する構築要素としてその意義づけがなされていた。この構造脂質の概念は典型的な膜構造モデルとして Robertson が提唱した単位膜説であった。脂質二重層の中に蛋白質が対称的に分布するという膜構造であった<sup>1)</sup>。ところが、1972年に至り、この膜モデルの概念が一変し、膜機能との関連性から機能脂質という新しい考えが導入された膜流動モザイクモデル説が Singer-Nicolson により提唱された。その基本理念は、膜流動性と蛋白質・脂質の非対称分布にあり、膜は静的ではなく動的であり、そのことが機能の発現にかなり密接に関連しているという重要な提言であった。

さらに、膜脂質が複雑な膜機能の一つである

情報伝達システムにも関与していることが明らかにされ、膜脂質がにわかに脚光を浴びることになった。40年余前の Hokin 夫婦によるハト腺切片の実験に端を発して、その後の諸細胞を用いた活発な研究によって、生体膜脂質の情報変換素子としての重要性が明らかにされた<sup>2)</sup>。

### II. 細胞内情報伝達における膜脂質の意義

(表1)

最初の細胞内情報伝達系としてアデニル酸シクラーゼ(AC)により産生されるサイクリックAMP(cAMP)を介するシグナル伝達系が初めて明らかにされ、セカンドメッセンジャーを介する蛋白質リン酸化・脱リン酸化によるシグナルカスケードが示されていた。その後、膜脂質が細胞内情報伝達に関わりをもつことが最初に Hokin 夫婦により示され注目されるようになった<sup>3)</sup>。彼らはハト腺切片のカルバコール刺激

表1. 細胞情報伝達における脂質の役割

|                                                                                              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| [A] セカンドメッセンジャー……細胞内情報伝達因子                                                                   |
| 1. 加水分解……情報変換ホスホリパーゼ<br>PI-PLC, PC-PLC, cPLA <sub>2</sub> , PLD, SM アーゼ                      |
| 2. リン酸・脱リン酸化……脂質キナーゼ・脂質ホスファターゼ<br>DG キナーゼ, PIP5 キナーゼ, PI3 キナーゼ<br>スフィンゴシン-1-キナーゼ, PA ホスファターゼ |
| [B] セカンドアゴニスト……細胞間情報伝達因子<br>リゾPA(LPA), 血小板活性化因子(PAF), エイコサノイド(PG, LT, TX)                    |
| [C] 情報伝達関連タンパク質の脂質修飾……細胞膜との相互作用                                                              |
| 1. アシル化(ミリストイル化, パルミトイル化)                                                                    |
| 2. プレニル化(ファルネシル化, ゲラニルゲラニル化)                                                                 |
| 3. グルコシルPI化(GPIアンカータンパク質)                                                                    |

PI-PLC; ホスホイノシチド特異性ホスホリパーゼ C, PC-PLC; ホスファチジルコリン特異性 PLC, cPLA<sub>2</sub>; 細胞質型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>, PLD; ホスホリパーゼ D, SM アーゼ; スフィンゴミエリナーゼ, PG; プロスタグランジン, LT; ロイコトリエン, TX; トロンボキサン

によるアミラーゼ分泌と RNA との関係調べているなかで、 $[^{32}\text{P}]$ リン脂質の比活性上昇という現象に遭遇し、分泌にリン脂質代謝が関与することを初めて示唆し、リン脂質効果とよんだ。さらに、このリン脂質がホスファチジルイノシトール(PI)とホスファチジン酸(PA)と同一とされ、細胞刺激にみられる応答をPIレスポンス、またその代謝をPIサイクルとして広く知られるようになった。このPIサイクルが $\text{Ca}^{2+}$ 流入と連係しているという $\text{Ca}^{2+}$ ゲート説が提唱され、分泌などの細胞応答におけるPI分解の意義が説明づけられた。ところが、ポリホスホイノシチドのPI-4,5二リン酸( $\text{PIP}_2$ )の減少がPI減少に先行することが虹彩平滑筋や肝細胞で示され、細胞刺激の初発反応はPIの $\text{PIP}_2$ への変換を反映するものと解釈された。 $\text{PIP}_2$ はホスホリパーゼC(PLC)により分解され、ジアシルグリセロール(DG)とイノシトール三リン酸( $\text{IP}_3$ )を産生し、前者はC-キナーゼ(PKC)の活性化因子として、後者は細胞内貯蔵部位の受容体に作用する $\text{Ca}^{2+}$ 動員因子として働く<sup>4,5)</sup>。

ついで、膜リン脂質の主要構成成分であるホスファチジルコリン(PC)も情報変換素子として重要な位置を占めるようになった<sup>6)</sup>。PCからはホスホリパーゼ $\text{A}_2$ ( $\text{PLA}_2$ )によりリゾPC(LPC)と不飽和脂肪酸が、またホスホリパーゼD(PLD)によりホスファチジン酸(PA)ができる。PC特異的に作用するPLCの存在も推測されている。PAから $\text{PLA}_2$ によってリゾPA(LPA)が生じる。スフィンゴミエリン(SM)からはSMアーゼによりセラミド(Cer)が、さらに代謝されスフィンゴシン(Sph)を経てスフィンゴシン-1-リン酸(Sph-1-P)も産生される。このように、様々なセカンドメッセンジャーあるいはセカンドアゴニストが産生される。イノシトールリン脂質にもPI3キナーゼ(PI3K)による $\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3$ という新規セカンドメッセンジャーが出現した。

これらの細胞膜リン脂質代謝に由来するセカンドメッセンジャーやセカンドアゴニストを介

する情報伝達への関与に加えて、最近では情報伝達タンパク質因子の脂質修飾によって、情報伝達系をモデレートする例が数多く示されている。その主要なものに、アシル化、プレニル化およびグリコシルPI化がある。

以上のように、細胞膜に由来する脂質メディエーターは直接的なシグナル因子として、あるいは間接的なモジュレーターとして情報伝達に関わっている。以下に、それらの主なものについて述べる。

### Ⅲ. 膜脂質由来セカンドメッセンジャーの多様性

膜リン脂質シグナリングを司る多様なセカンドメッセンジャーは、様々な情報変換ホスホリパーゼによる分解系、あるいは脂質キナーゼ・ホスファターゼによる脂質リン酸化・脱リン酸化系によって産生される。生体膜を構成する主要成分のPCをはじめ、量的に少ないイノシトールリン脂質などさまざまな膜リン脂質は、受容体刺激に伴って活性化される情報変換ホスホリパーゼにより多くの種類のセカンドメッセンジャーに変換される。以下これらの情報変換酵素の活性調節およびその作用で産生される膜脂質由来のセカンドメッセンジャーの働きについて述べる(図1)。

#### 1. 情報変換ホスホリパーゼによる分解系 (図2)

##### a) サイトゾル型ホスホリパーゼ $\text{A}_2$

$\text{PLA}_2$ は、グリセロリン脂質のC-2位から不飽和脂肪酸を遊離し、残りはリゾリン脂質となる。その構造、性質から分泌型 $\text{PLA}_2$ (s $\text{PLA}_2$ )、細胞質型 $\text{PLA}_2$ (c $\text{PLA}_2$ )、 $\text{Ca}^{2+}$ 非依存型(i $\text{PLA}_2$ )に大別されるが、血小板活性化因子(PAF)に特異的なアセチルヒドロラーゼ(PAF-AH)も最近では1つのタイプとして加えられている(表2)<sup>7)</sup>。細胞外に分泌されるs $\text{PLA}_2$ は分子量14kDaのI型(臍臓型)とII型(非臍臓型)がクローニングされている。他に17kDaのIII型(蜂毒)があり、高濃度(mM)の $\text{Ca}^{2+}$ を必要とする。

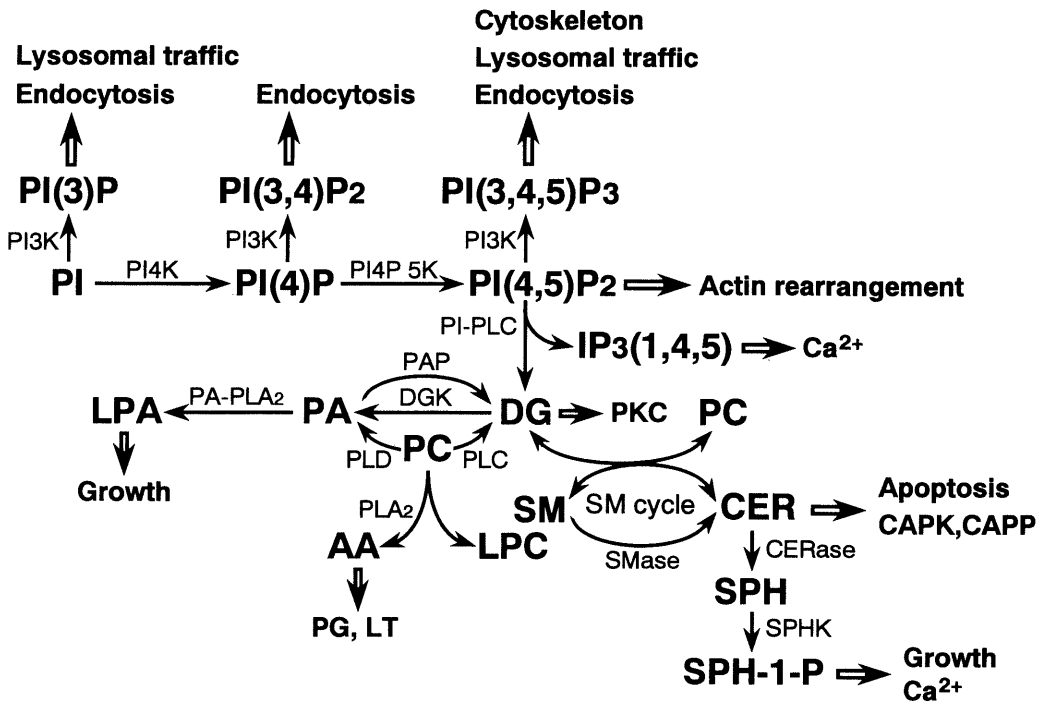


図1. 膜脂質シグナリングの相互関係

PI, ホスファチジルイノシトール; PI3K, PI3 キナーゼ; PI4K, PI4 キナーゼ; PI4P 5K, PI4 リン酸 5 キナーゼ; PAP, ホスファチジン酸ホスホヒドラーゼ; DGK, DG キナーゼ; CERase セラミダーゼ; CER, セラミド; SHP, スフィンゴシン; SPH-1-P, スフィンゴシン-1-リン酸; SPHK, スフィンゴシンキナーゼ; CAPK, セラミド活性化蛋白質キナーゼ; CAPP, セラミド活性化蛋白質ホスファターゼ; PG, プロスタグランジン; LT, ロイコトリエン; SMase, スフィンゴミエリナーゼ.

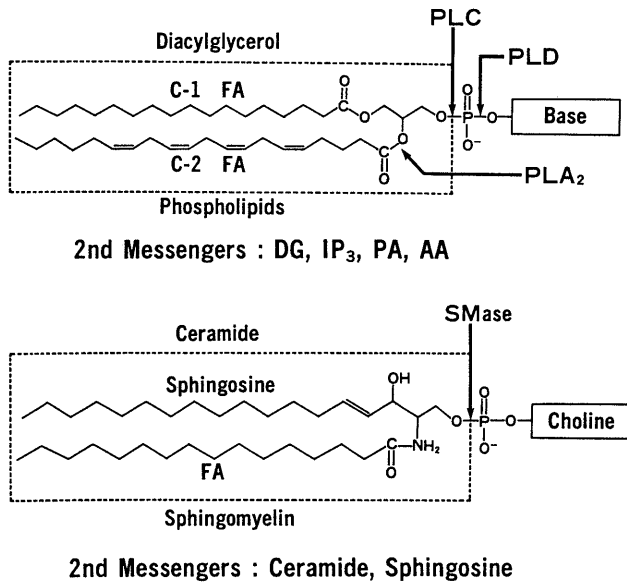


図2. 各種情報変換ホスホリパーゼの作用様式とセカンドメッセンジャー

表2. ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>(PLA<sub>2</sub>)のタイプと性質

| タイプ               | 分子量          | Ca <sup>2+</sup> 依存性 | 局在       | 生物活性           |
|-------------------|--------------|----------------------|----------|----------------|
| sPLA <sub>2</sub> |              |                      |          |                |
| I                 | 14 kDa       | mM                   | 細胞外(分泌)  | 食物消化, 蛇毒(コブラ)  |
| II                | 14 kDa       | mM                   | 〃        | 炎症, 蛇毒(マムシ)    |
| III               | 17 kDa       | mM                   | 〃        | 蜂毒             |
| cPLA <sub>2</sub> | 85 kDa       | μM                   | 細胞内(非分泌) | アラキドン酸遊離       |
| iPLA <sub>2</sub> | 29~85 kDa    | —                    | 細胞内(非分泌) | 脂質の remodeling |
| PAF-HA            | 29/30/45 kDa | —                    | 細胞内, 血清  | PAF の分解        |

cPLA<sub>2</sub> (85 kDa)は低濃度(μMオーダー)のCa<sup>2+</sup>で活性化される. Ca<sup>2+</sup>非依存型の29~85 kDaのPLA<sub>2</sub>(iPLA<sub>2</sub>)は種々の細胞や組織から精製されており, 膜脂質間の変換に関与する. また, Ca<sup>2+</sup>非依存性のPAF-AHは血清リポ蛋白質に結合して血清中に存在するタイプと細胞質タイプの両方がクローニングされている. 脳PAF-AHは三量体G蛋白質に似た触媒サブユニット(βγ: 30 kDa, 29 kDa)とMiller-Diekerの原因遺伝子LIS-1をコードする調節サブユニット(α: 45 kDa)から構成されている<sup>8)</sup>.

cPLA<sub>2</sub>は主にPCからアラキドン酸(AA)を遊離する. 血小板, マクロファージ, 脳, 腎臓などの多くの細胞や組織に存在し, 大部分は細胞質に局在するが, 受容体活性化により細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度が上昇すると, 膜へ移行し活性化される. N末端の特定部分(アミノ酸45残基, CaLBドメイン)はCa<sup>2+</sup>依存性の膜移行に必要である. cPLA<sub>2</sub>の活性調節に関しては諸説がある. 細胞刺激に先だってホルボールエステル(PMA)を加えておくと, AA遊離が増大することからPKCの関与が指摘されている. しかし, 試験管内でのcPLA<sub>2</sub>の酵素活性はPKCの影響を受けない. PLC活性化→DG産生→PKC活性化→PLA<sub>2</sub>活性化の過程がよく知られているが, 精製cPLA<sub>2</sub>がMAPキナーゼでリン酸化されると活性化が起こることから, PKCとcPLA<sub>2</sub>の間にMAPキナーゼが介在することが考えられる. cPLA<sub>2</sub>の活性化に重要な505番目のセリンが, MAPキナーゼによってリン酸化される<sup>9)</sup>. ヒト血小板では, p38MAPキナーゼによるcPLA<sub>2</sub>のリン酸化が起こる<sup>10)</sup>.

cPLA<sub>2</sub>を過剰発現させた細胞ではCa<sup>2+</sup>イオノホアやG蛋白共役型受容体刺激による即時型アラキドン酸(AA)遊離が増強し, 特異的阻害剤AACOCF<sub>3</sub>で完全に阻害される. 遊離したAAはCox-1やロキシゲナーゼによりプロスタグランジン(PG)やロイコトリエンの産生に利用される. また, サイトカイン刺激に伴うCox-2依存的な遅延型PG産生にもcPLA<sub>2</sub>が関与している.

#### b) イノシトールリン脂質特異的ホスホリパーゼC (PI-PLC)

PI-PLCはPIP<sub>2</sub>を分解して, 2つのセカンドメッセンジャーであるIP<sub>3</sub>とDGを産生する. PI-PLCには分子多様性がみられ, 遺伝子クローニングからβ(β1, β2, β3, β4), γ(γ1, γ1), δ(δ1, δ2, δ3, δ4)など10種類のアイソフォームが存在し, 組織分布や活性調節もさまざまである<sup>11-13)</sup>. 相同性の高い共通領域としてX, Y領域があり, この両者が酵素活性に必要である(図3). また, 膜表面でPIP<sub>2</sub>と結合する領域としてpleckstrinホモロジー(PH)領域がN末端近傍に存在している. さらに, PHドメインに近接してEFハンドドメインが, Y領域に近接してC2ドメインが存在し, 後者はCa<sup>2+</sup>依存的な触媒活性に必要である<sup>14,15)</sup>. PLCγファミリーはがん遺伝子srcと相同性の高い領域(src homology domain; SH)のSH2およびSH3を有する. SH2はチロシンリン酸化に, またSH3は細胞骨格のアクチンとの結合に関係するドメインである. また, PLCδファミリーはN末端側に塩基性アミノ酸に富んだ領域があり, IP<sub>3</sub>のような陰性荷電の強い化合物

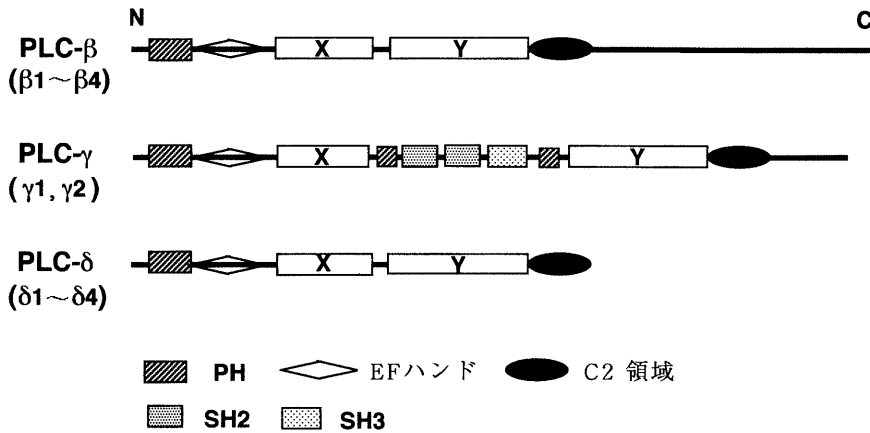


図3. ホスホリパーゼC(PLC)の分子多様性と構造特異性  
 文献16)より改変

PH: Pleckstrin homology 領域 SH: Src homology 領域

と結合する。

PLCの活性調節機構は各アイソフォームにより異なる<sup>16)</sup>。細胞膜7回貫通型受容体を介するPLC $\beta$ の活性化には、百日咳毒素(PT)感受性と非感受性の2種類のG蛋白質が介在する。非感受性G蛋白質としてのGqファミリーはC末端から4番目のシステインを欠くために、PTによるADPリボシル化を受けない。三量体G蛋白質は、 $\alpha$ と $\beta\gamma$ の2つのサブユニットからなり、哺乳類から約20種類(Gs, Gi/Go, Gq, G12のそれぞれのサブファミリー)が同定されているが、PLC $\beta$ の活性化に関与する $\alpha$ サブユニットはGqファミリー(Gq, G11, G14, G15/16)のみである。 $\alpha_q/11$ は、PLC $\beta_1 \geq \text{PLC}\beta_3 > \text{PLC}\beta_4 > \text{PLC}\beta_2$ の順に活性化し、PLCの最大活性( $V_{\max}$ )を高めるが、 $\text{Ca}^{2+}$ 要求性には影響しない。また、PLC $\beta_2$ は $\alpha_{16}$ に対して、PLC $\beta_4$ は $\alpha_q$ に特異性が高い。

一方、G蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニットもPLC $\beta$ を直接活性化することが再構成系で明らかにされている。 $\beta\gamma$ はPLC $\beta_3 > \beta_2 > \beta_1$ の順に活性化するが、PLC $\beta_4$ には作用しない。 $\alpha_q$ と $\beta\gamma$ の結合部位は異なり、 $\alpha_q$ はC末端側に、 $\beta\gamma$ の結合部位はPLC $\beta_2$ のGlu<sup>435</sup>とVal<sup>641</sup>の間に存在する。

増殖因子(PDGF, EGF)の受容体刺激に伴う

PLCの活性化には、受容体結合型のチロシンキナーゼ(RPTK)によるPLC $\gamma_1$ のチロシンリン酸化が重要である。PDGF刺激により、RPTKが自己リン酸化されると、その部位にPLC $\gamma_1$ のSH2ドメインが結合し、自身の771, 783, 1254番目のチロシンがリン酸化される。PLC $\gamma_1$ のチロシンリン酸化は、基質PIP<sub>2</sub>の結合を阻害する因子(プロフィリン, ゲルゾリンなど)との相互作用を変化させることによって活性化するといわれている。また、非受容体型PTK(Src, Lyn, Fyn, Sykなど)によるPLC $\gamma$ のチロシンリン酸化が知られている。たとえば、血小板をコラーゲン刺激すると、SykによるPLC $\gamma_2$ のチロシンリン酸化が起こる。その他に、PLC $\gamma$ はtau蛋白質の存在下でcPLA<sub>2</sub>により生じたAA, PI3-キナーゼによるPIP<sub>3</sub>やPLDによるPAによっても活性化されることが知られている。

一方、PLC $\delta$ の活性化機構は十分明らかにされていない。PLC $\delta_1$ はIP<sub>3</sub>による活性阻害や、またスフィンゴシンによる活性化が示唆されている。また、ある種のG蛋白質が関与する可能性があり、 $\alpha_1$ -アドレナジック受容体活性化の際に3量体G蛋白質のG $\alpha$ がPLC $\delta_1$ を活性化することや低分子量G蛋白質のRhoAのGTPアーゼ様蛋白質が精製PLC $\delta_1$ を活性化

することが知られている。PLC $\delta$ 4 は核に特異的に存在しており、その調節機構が注目されている。

プロテインキナーゼA (PKA) や PKC は PLC 活性を制御する。PKC は PLC $\beta$ 1 をリン酸化するが、Gq $\alpha$  による PLC $\beta$ 1 の活性化に影響しない。Jurkat T 細胞では PKA, PKC の活性化は PLC $\gamma$ 1 のチロシンリン酸化を阻害し、その程度は PLC 活性の減少と相関する。また、PKA の触媒部位を過剰発現させた COS 細胞では  $\beta\gamma$  により PLC $\beta$ 2 の活性化が抑制される。

PLC アイソザイムの生理的役割はノックアウトマウスで調べられており、PLC $\beta$ 1 と  $\beta$ 4 のノックアウトマウスでは、正常に生まれるが発育や運動機能障害がみられる<sup>17)</sup>。一方 PLC $\gamma$ 1 の欠損マウスは、妊娠初期で死亡し、生育には必須であることが示された。また、凝集や分泌異常の血小板では PLC $\beta$ 2 が正常血小板の 1/4 に減少しており、このタイプの PLC アイソザイムが血小板活性化に関与していることが推測されている。

#### c) ホスファチジルコリン特異性 PLC (PC-PLC)

PC-PLC はホスファチジルコリン (PC) を分解して DG とホスホリルコリンを産生する酵素である。PC-PLC の哺乳動物での実体が定かでない上に特異的な活性測定がないために、必ずしも特異的ではないが D609 が阻害剤としてよく用いられる。この酵素によって主要膜成分の PC から量的に多い DG がつくられ、PKC が持続的に活性化され細胞増殖・分化のような長期応答に重要な働きをする。PC-PLC 活性は Ras を過剰発現させた線維芽細胞で強い活性が見られ、MAP キナーゼカスケードと関連している<sup>18)</sup>。

#### d) ホスホリパーゼ D (PLD)

PLD は主として PC を加水分解し、PA とコリンを産生する酵素である。PE や PI を分解する PLD もある。また、一級アルコールの存在下においてはホスファチジル基転移という特異反応を触媒し、代謝されにくい特異リン脂質

であるホスファチジルアルコールを産生するために PLD 活性の特異的測定法として用いられる。PLD は、Hanahan と Chaikoff (1947) によって、ニンジンで見つけられ、当初は植物酵素と考えられていた。その後、PLD は植物のみならず藻類、粘菌、細菌まで広く分布していることが分かった。さらに、Kanfer のグループがラット脳膜画分から部分精製し、哺乳動物における PLD の存在が確認され、今日では各種動物細胞において種々のアゴニスト刺激によって活性化される情報変換酵素として広く認められている<sup>19,20)</sup>。

PLD の精製は多くの培養細胞系や組織において試みられたが、単一にまで精製するのが困難であった。従来よりラット肝マイクロゾームに不飽和脂肪酸によって活性化される PLD が存在することが知られていたが、その性状は不明であった<sup>21)</sup>。最近、山下ら (1994) によりブタ肺からこのタイプの PLD が単一に精製された<sup>22)</sup>。この酵素は 190 kDa の単一サブユニットからなり不飽和脂肪酸で活性化される。さらに、酵母、バクテリア、植物などから相次いで PLD の遺伝子がクローニングされている。動物細胞からは、酵母の減数分裂に必須である *SPO14* 遺伝子が、実は PLD をコードしていることがホモロジー検索から分かり、ついで、それをもとに HeLa 細胞の cDNA ライブラリーを用いてヒト *PLD1* (*hPLD1*) が初めてクローニングされた (図 4)。すべてに 4 つの相同性アミノ酸配列領域があり、ここに触媒活性が存在すると思われる。*hPLD1a* は 1072 のアミノ酸からなり、分子量 124 kDa の蛋白質である。筆者らは *hPLD1a* と似た性状を有するスプライシングバリエーションの *hPLD1b* (1034 個のアミノ酸) を見出した<sup>23)</sup>。さらに、マウスやラットのライブラリーを用いて、*PLD2* がクローニングされた<sup>24)</sup>。*PLD2* は 932 個のアミノ酸からなり、*PLD1* と 51% の相同性を有する。さらに、ブタ脳膜画分から 95 kDa の PLD が部分精製されている。これらはいずれも膜画分に多く存在するが、可溶性画分から PLD 活性化が見

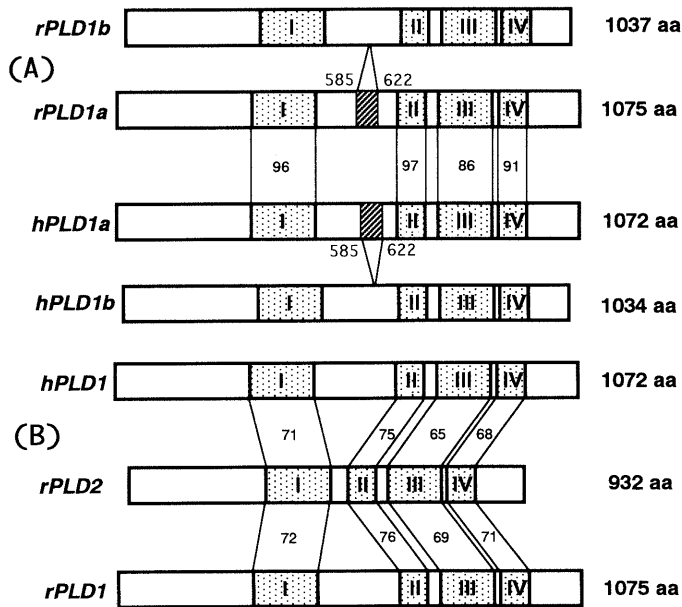


図4. ホスホリパーゼ D (PLD) 遺伝子のアイソフォーム  
*hPLD*, ヒト PLD 遺伝子; *rPLD*, ラット PLD 遺伝子

出されており、PLD にもいくつかのアイソフォームが存在する。

PLD の活性調節にはさまざまな因子が関与する。無細胞系で非水解性 GTP アナログの  $GTP\gamma S$  を添加すると PLD が活性化されることから、G 蛋白質が関与することが示唆されていた。Brown ら (1993) および Cockcroft ら (1994) は、HL 60 細胞膜画分や透過性 HL 60 細胞では  $GTP\gamma S$  による PLD の活性化は非常に弱い、サイトゾル画分の添加によってより活性化が増強されることから、サイトゾル画分中の PLD 活性化因子として ADP-リポシル化因子 (Arf) を同定した<sup>25)</sup>。さらに肝細胞膜の  $GTP\gamma S$  による PLD 活性化が RhoGDI によって阻害され、過剰 Rho の再添加によって増強されることから Rho の関与が示された<sup>26)</sup>。また、Rho に特異的な *Clostridium botulinum* 由来の C3 毒素、あるいは Rho ファミリーすべてを不活化する *C. difficile* 由来の毒素 B で細胞を処理するとアゴニスト刺激による PLD の活性化は起こらない<sup>27)</sup>。RhoA や Rac を過剰発現させた線維芽細胞を受容体刺激すると、

PLD の活性化は対照細胞より増強される。クローニングされた *PLD1a*, *PLD1b*, *PLD2* 遺伝子を Sf9 で過剰発現させ、精製した酵素について活性化因子が調べられた。これらはいずれも  $PIP_2$  により活性化され、*PLD1a*, *1b* は Arf 依存性であるが、*PLD2* はそれ自身高い活性を有し Arf による活性上昇を示さない。さらに Arf による *PLD1* の活性化は、Rho, Cdc 42, Rac で相乗的に増強される。また、Ral も直接 *PLD1* に結合して活性化する<sup>28)</sup>。

一方、PKC が PLD 活性化に深く関わっていることは、PMA が PLD を活性化すること、あるいは PKC 阻害剤や PMA の長時間処理による PKC のダウンレギュレーションによって、アゴニスト刺激による PLD 活性化が阻害されることなどからよく知られている。膜画分に各 PKC アイソザイムを直接作用させた場合、 $\alpha$  型が最も効果的に PLD を活性化する。ただし、PKC の触媒部位を欠失した調節部位だけでも PLD の活性化は起こることや、Arf の *PLD1* 活性化は  $PKC\alpha$  と相乗効果を示すが ATP 非依存性である。これらのことより、

PKC による PLD の活性化はリン酸化というよりはむしろアロステリック効果によるものと考えられている<sup>29)</sup>。

一方、PLD 活性の阻害作用をする因子も存在する。その一つはセラミド(Cer)であり、阻害のメカニズムとしてサイトゾルの活性化因子(Arf, RhoA, PKC)の膜移行を抑制するためと考えられている<sup>30)</sup>。また、特異的な阻害因子としてフォドリン、シナプトジャニン、クラスリン結合蛋白質 3 (AP3)がある。シナプトジャニンは PIP<sub>2</sub> に対するホスファターゼ活性を有し、PIP<sub>2</sub> を減少させることにより Arf による hPLD1 活性を阻害する<sup>31)</sup>。AP3 は hPLD1 に直接結合して阻害する。

PLD の細胞機能における役割については、多くの推測がなされているが、十分に明らかにされていない。好中球やマスマト細胞などの分泌反応は、エタノール添加で PA 産生を抑制すると阻害される。Arf は細胞内小胞輸送の重要因子の1つであることはよく知られており、そのN末端ペプチドあるいは Arf 活性を阻害するプレフェルデンAを用いた実験では、PLD 活性とエキソサイトーシスとの相関が見られる<sup>32)</sup>。また、Arf 依存型 PLD はゴルジ膜に局在し、被覆小胞の形成がエタノール処理によって阻害されることが示されている。エキソサイトーシスの膜融合部位での PA の重要性から PLD の関与が推測されているが、直接証拠は得られていない。一方、LPA で血管内皮細胞を刺激するとストレス線維の形成が観察されるが、ブタノール存在下では起こらない。また、PLD の活性調節に関与するゲルズリンや前述のフォドリンはアクチン結合蛋白質であり、PLD 活性化因子の Rho はアクチン細胞骨格系を介して細胞の運動や形態に密接に関連しており、PLD が細胞骨格制御にも関与していることは十分推測される。

さらに、細胞増殖・分化との関連を示唆する実験知見がいくつかある。PLD の代謝産物である PA や LPA は *c-fos*・*c-myc* の発現や DNA 合成を誘起する。PLC や cPLA<sub>2</sub> と同じ

ように、PLD は核にも存在しており、再生肝から単離した核では Arf 依存型 PLD 活性がS期に増加する<sup>33)</sup>。最近では、HL 60 細胞や C6 グリア細胞の分化誘導に伴って、PLD の活性上昇と PLD2 mRNA の発現増大が起こることが見出されている。また、Cer で誘導したアポトーシスでは PLD 活性の低下がみられる。

#### c) スフィンゴミエリナーゼ(SM アーゼ)

細胞膜リン脂質の数%を占めるスフィンゴミエリン(SM)はスフィンゴ脂質のなかで最も単純な構造を示し、神経組織などに多く存在する。PC と同じようにコリン含有リン脂質であり、細胞膜の脂質二重層の外層に多い。SM アーゼは SM を分解し、セラミド(Cer)とホスホリルコリンをつくる。Cer はセラミダーゼの作用でスフィンゴシン(Sph)となる。Sph はさらにキナーゼによりスフィンゴシン-1-リン酸(Sph-1-P)となる(図5)。これらはともにセカンドメッセンジャーとして作用する。Cer と PC から SM 合成酵素によって SM がつくられ、SM アーゼで再び Cer となり SM サイクルを形成している。

少なくとも3種類の SM アーゼが存在し、それぞれが異なる局在性を示す。中性 SM アーゼには Mg<sup>2+</sup> 依存性と非依存性があり、それぞれ細胞膜と細胞質に存在する。酸性 SM アーゼはリソゾーム酵素であり、この酵素の欠損がニーマン・ピック病の原因である。腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )、Fas/APO-1、NGF やサイトカイン(IL-1)などの刺激によって、SM アーゼが活性化され Cer が産生される。Fas/APO-1 受容体活性化では2種類の SM アーゼ(中性と酸性)と PC-PLC が活性化されることが示された。しかし一方では、膜結合型の中性 SM アーゼが TNF- $\alpha$  と関係しているとする説もあり、議論の多いところである<sup>36)</sup>。

前述したように、Cer は PLD や DG キナーゼ(DGK)活性など増殖シグナル関連酵素活性の阻害作用を示し、ストレスや傷害の誘導因子であり、特にアポトーシス、分化、老化などに関与する。Cer によるアポトーシスでは、カス

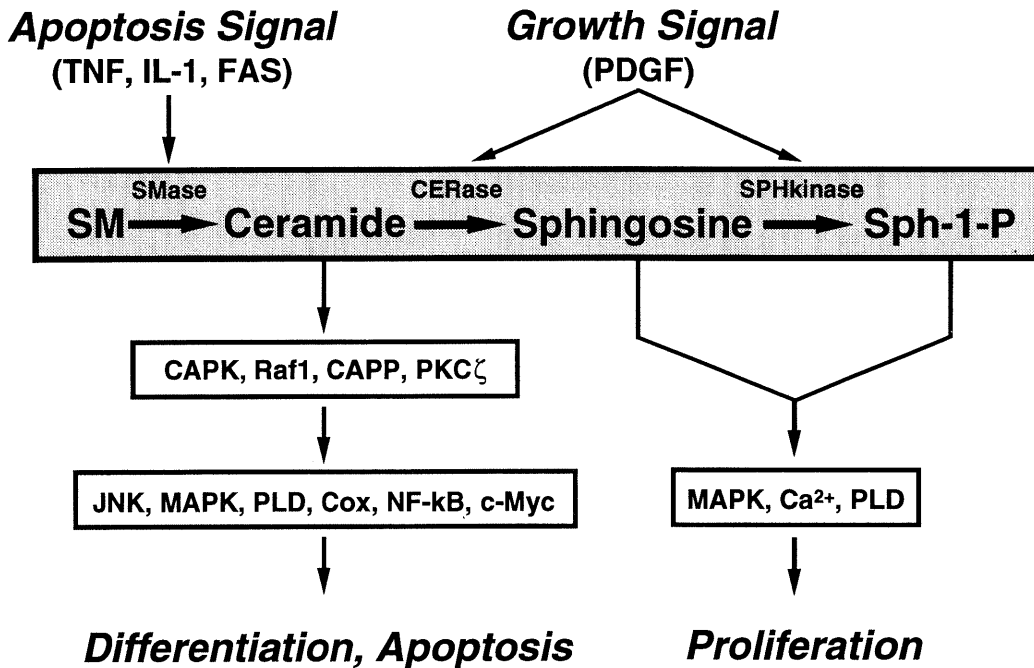


図5. スフィンゴミエリンを介するシグナリング

TNF, tumor necrosis factor; IL-1, interleukin-1; PDGF, platelet-derived growth factor; MAPK, mitogen-activated protein kinase

パーゼ (caspase) ファミリー (interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme (ICE), CPP 32 など) を活性化し、Bcl-2 は Cer によるアポトーシス誘導や CPP 32 の活性化を阻害する。Cer から長鎖脂肪酸が切断されてできる Sph も多彩な生理活性を示し、その一つは PKC の阻害作用である。また、PA ホスホヒドロラーゼ (PAP) に対しては抑制的に、DGK に対しては促進的に作用する。

## 2. 脂質キナーゼ・ホスファターゼによるリン酸化・脱リン酸化

### a) 脂質キナーゼ

脂質のキナーゼによるリン酸化、あるいはホスファターゼによる脱リン酸化によって、セカンドメッセンジャーの産生や修飾が起こる。PI キナーゼ、DG キナーゼ、Sph キナーゼなどがその例である。PI キナーゼ (PIK) 系には、イノシトール環の D-4 位をリン酸化する PI4K と D-3 位をリン酸化する PI3K に大別される。

前者は大部分が膜結合型であり、PI から PI(4)P を作り、ついで PIP5K により PI(4,5)P<sub>2</sub> となる。後者はほとんどサイトゾルに存在し、PI から PI(3)P、PI(4)P から PI(3,4)P<sub>2</sub>、PI(4,5)P<sub>2</sub> から PI(3,4,5)P<sub>3</sub> を生成する。PI(4,5)P<sub>2</sub> は PLC の基質になるが、PI(3,4)P<sub>2</sub> は既存の PLC では分解されず、リン酸化される部位が 3 位と 4 位では性質がまったく異なり、細胞応答における機能も異なる。PIP5K は RhoA により活性化され PI(4,5)P<sub>2</sub> の量的調節をする。その PI(4,5)P<sub>2</sub> は PLD やカルパインの活性化因子、あるいはゲルゾリンやプロフィリンなどのアクチン結合蛋白質に結合しアクチン重合を引き起こすなど、さまざまな作用を発揮する<sup>37)</sup>。

PI3K は 3 つのクラスに分けられ、すべてのクラスに共通した PIK ドメインとキナーゼドメインがある (図 6)<sup>38)</sup>。クラス I には A と B のサブクラスがあり、IA は 110 KDa の触媒サブユニットと p85 ( $\alpha$ ,  $\beta$ , や p55 $\gamma$ ) の調節サ

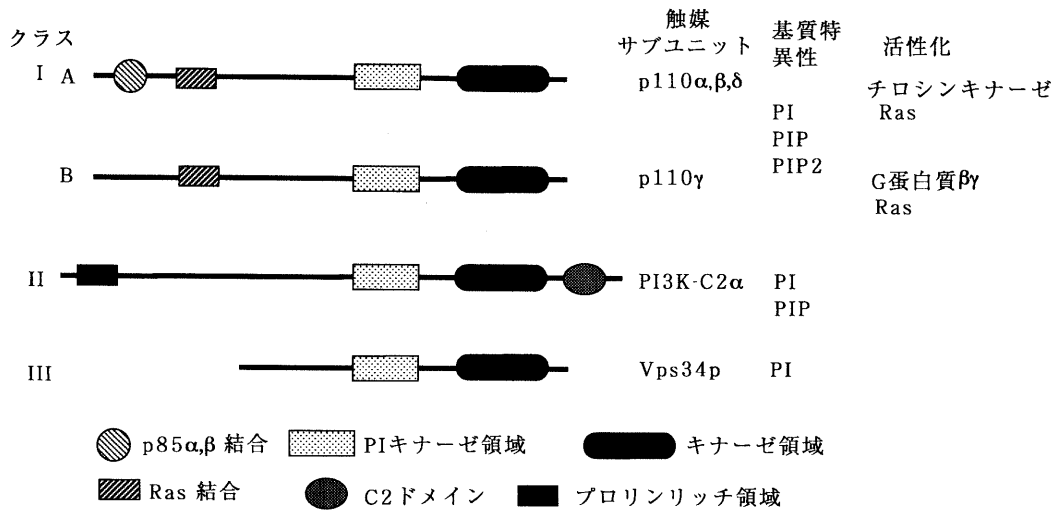


図6. ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ(PI3K)ファミリーの構造特異性(文献38)より改変

グユニットからなるヘテロダイマーである。前者には p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$  の3種類がある。p85には1つのSH3領域と2つのSH2領域が存在し、PDGFなどでの刺激によって受容体の自己リン酸化が起こり、そのリン酸化部位にPI3KがSH2領域を介して結合し、リン酸化されて活性化される。また、G蛋白質で活性化されるIBクラスはp85を欠きp110 $\gamma$ の触媒サブユニットにp101のアダプター蛋白が隣接している。IAとIBにはRas結合ドメインが存在し、Rasにより活性化される。クラスIIのPI3Kは、カルシウム特異性リン脂質結合ドメイン(C2)を有し分子量(200 kDa)も大きく、PIとPI(4)Pをリン酸化するがPSの存在下ではPI(4,5)P2もリン酸化する。クラスIIIのPI3Kは酵母のVps34pに類似性を示しPIのみをリン酸化する。PI3Kの下流シグナルにはPKC $\lambda$ の活性化が知られているが、p70S6キナーゼやAktなどの活性化もある。特異的な阻害剤であるwortmanninを用いて、PI3Kが細胞骨格形成に関与していることが示されている。また、低分子量G蛋白質のRacもPI3Kの下流で活性化され、JNKのシグナル系に連結している。

DGKは主要セカンドメッセンジャーのDG

をPAに転換する酵素である。二相性DG産性の、第一相はPAに転換されるが、第二相のDGはPAにならないという報告がある。

DGKは分子多様性を示し、哺乳動物から少なくとも5つのサブファミリーからなる8種類のアイソザイムの遺伝子がクローニングされている(図7)<sup>39)</sup>。I型DGK( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )はCa<sup>2+</sup>依存性を示し、2個のEFハンドと2個の亜鉛フィンガー構造を有し、受容体刺激によるCa<sup>2+</sup>濃度上昇で膜に移行する。II型DGK( $\delta$ )はC末端側にPHドメインを有し、亜鉛フィンガーも存在するが、EFハンドはない。その他(III: $\epsilon$ , IV型: $\zeta$ , V型: $\theta$ )のDGKは触媒領域以外にI型やII型との相同生領域がなく、それぞれ異なっている。III型DGKはアラキドノイル型DGに特異的でPI由来のDGをリン酸化する。IV型は主に核に局在する。DGKの生理機能に関しては、DG量の調節によるPKC活性を制御しさまざまな細胞機能に影響を与える。DGK $\alpha$ はIL-2刺激により核に移行し、またDGK活性を制御するとS期に移行できないなど細胞増殖に関連しており、PA産生酵素としても働いているようである。

SphキナーゼはSph-1-Pを産生する酵素で血小板で高い活性を示す<sup>40)</sup>。精製が困難なた

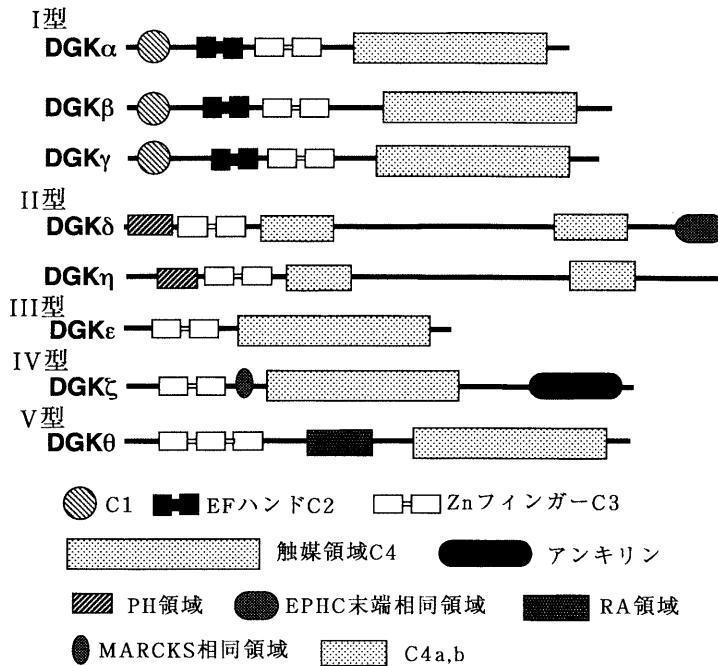


図7. ジアシグリセロールキナーゼ(DGK)ファミリーの構造的特異性  
文献39)より改変

め単一酵素は得られていないが、PS、PA やカルジオリピンなどの酸性リン脂質により活性化される。Sph-1-P は MAPK の活性化を介して DNA 合成を促進する増殖シグナルとして作用する<sup>41)</sup>。

#### b) 脂質ホスファターゼ

リン脂質のホスファターゼによる脱リン酸化によってセカンドメッセンジャーの転換が起こる。代表的なものに PA ホスホヒドロラーゼ (PAP) があり、PLD などで生じた PA を脱リン酸化して DG に転換する。この系と DGK との作用による脱リン酸化・リン酸化によって、セカンドメッセンジャーの相互転換 (PA ⇄ DG) が起こり、両者の質的・量的な調節がなされる。また、イノシトールポリリン酸もホスファターゼの作用で修飾を受ける<sup>42)</sup>。この酵素にもいくつかの種類のものがあり、IP<sub>3</sub>、IP<sub>4</sub> を基質とするタイプ I、IP<sub>3</sub>、IP<sub>4</sub>、PIP<sub>3</sub>、PIP<sub>2</sub> を基質とするタイプ II、さらに SH 領域を有し 3 位にリン酸基をもつ IP<sub>4</sub> (1,3,4,5) や PI (3,4,5) P<sub>3</sub> だけを基質とする SH2-containing inositol phos-

phatase (SHIP) などがある。PI 3K と SHIP はシグナルの on-off スイッチとして作用する。また、PIP<sub>2</sub> に対して高いホスファターゼ活性をもつシナプトジャニン は PIP<sub>2</sub> の濃度の低下をもたらし、Rho と共に PIP<sub>2</sub> の量的調節機能を有する。

#### IV. 脂質セカンドアゴニスト

細胞内代謝で生じた脂質誘導体は細胞外に出て、セカンドアゴニストとしてそれぞれ固有の受容体に作用する。したがって、これらは細胞間伝達因子であり、主なものにリゾホスファチジン酸 (LPA)、血小板活性化因子 (PAF)、エイコサノイドや Sph-1-P がある。

LPA は多機能リン脂質メッセンジャーであり、さまざまな細胞機能の発現に関連している<sup>43)</sup>。血中ではアルブミンと結合した状態で存在し、その主な起源は血小板と考えられている。つまり、血小板刺激によって PA から PLA<sub>2</sub> の作用で生じ、細胞外に遊離する。

LPA の G 蛋白質を介するシグナル伝達系に

は、1) PLC, PLD の活性化, 2) アデニル酸シクラーゼの抑制, 3) Ras とその下流シグナル系(Raf/MAPK)の活性化, 4) Rho を介する細胞骨格変化など多彩である。このなかで、2), 3) は Gi を介し, 1), 4) は Gq を介する。LPA の Ras を介する系はかなり分かっているが、Rho 系のシグナルカスケードの連係様式はかなり複雑である。

PAF の受容体がクローニングされ、Gi, Gq を介する系が明らかにされている<sup>44)</sup>。PAF は好塩基球から放出され、血小板活性化因子として見出されたが、炎症細胞のみならず、多くの正常組織、細胞などでもつくられる。PAF 刺激により受容体を介して PLC, PLD, PLA<sub>2</sub> および MAPK カスケードが活性化され、実に多彩な機能を発揮する。

リン脂質から PLA<sub>2</sub> により遊離した AA からは多種類のエイコサノイドが作られ、そのいくつかは刺激に伴って細胞外に遊離され、セカンドアゴニストとして作用する。プロスタグランジン(PG)やトロンボキサン A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)、ロイコトリエン B<sub>4</sub> などは種々の G 蛋白質を介する受容体を活性化するセカンドアゴニストとして細胞に作用し、PLC, PLD, PLA<sub>2</sub> などの活性化をもたらす。

Sph-1-P は LPA と同様に血小板でつくられ

細胞外に遊離し、血中でアルブミンと結合して存在し、オートクライン的に細胞を刺激する。Sph-1-P の受容体は PT 感受性 Gi がカップルしている<sup>45)</sup>。Sph-1-P 添加により DNA 合成が促進され、増殖アゴニストとして作用する。血小板では LPA と同じように PTK を活性化する。また、多くの細胞で PLC や PLD の活性化、細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の増加をきたす。

## V. シグナリング蛋白質の脂質修飾 (Lipidation)

情報伝達関連蛋白質のなかで、翻訳後脂質修飾を受けて細胞膜と結合するものがかなり多く知られている。脂質修飾の様式には、脂肪酸を付加するアシル化、イソプレノイド代謝産物によるプレニル化、グリコシル PI による GPI アンカリングなどがある(表3)<sup>2)</sup>。

### a) アシル化(acylation)

3量体G蛋白質の Gi, Go の  $\alpha$  サブユニットの N 末端グリシンにミリスチン酸(14:0)がミリストイルトランスフェラーゼによってアミド結合しているが、Gq, Gs の  $\alpha$  サブユニットでは、N 末端に近いシステインにパルミチン酸(16:0)が非酵素的にチオエステル結合している。Gq, Gs の  $\alpha$  サブユニットの 9, 10番目のシステインをセリンで置換すると、C 16:0 が付加されな

表3. 情報伝達関連タンパク質の脂質修飾様式

| 修飾脂質               | 修飾を受けるタンパク質                                                               | 修飾部位       | 結合様式                   |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------|------------|------------------------|
| アシル化               |                                                                           |            |                        |
| ミリスチン酸<br>(C14:0)  | $\alpha$ i, $\alpha$ o, $\alpha$ t サブユニット,<br>Src, Fyn, Lyn, Arf, GAP-43, | N末端グリシン    | アミド結合                  |
| パルミチン酸<br>(C16:0)  | Gs, Gq, G12, G13 サブユニット,<br>Fyn, Lyn, Ras                                 | N末端システイン   | チオエステル結合               |
| プレニル化              |                                                                           |            |                        |
| ファルネシル基<br>(C15)   | $\gamma$ サブユニット,<br>ラミン, Ras                                              | C末端システイン   | チオエーテル結合               |
| ゲラニルゲラニル基<br>(C20) | $\gamma$ サブユニット, Rab                                                      | C末端システイン   | チオエーテル結合               |
| グリコシル PI(GPI)      | Thy-1, N-CAM,<br>TCRb, CD55/DAF<br>CD48 など                                | C末端カルボキシル基 | アミド結合<br>(エタノールアミンによる) |

いために、細胞膜移行が起こらなくなり PLC も活性化されない。as の 3 番目を同様に変更させると膜移行も AC の活性化もおこらない。

低分子量 G 蛋白質の Arf はミリスチン酸の修飾を受ける。PLD の活性化作用はミリスチン化された方が修飾されない Arf に比べ約 1000 倍強い。PTK も脂質修飾され、Src はミリスチン酸を、Lyn, Fyn にはミリスチン酸とパルミチン酸の両脂肪酸で二重修飾されている。また、長期増強に関与する GAP-43 はパルミチン酸を介して膜と結合している。

#### b) プレニル化 (prenylation)

イソプレノイド脂質の炭素数 15 のファルネシル基あるいは炭素数 20 のゲラニルゲラニル基が、C 末端側の 4 番目のシステインに安定なチオエーテル結合をしている。3 量体 G 蛋白質の  $\gamma$  サブユニットは、コンセンサス配列の CAAX (X; 任意のアミノ酸) の C 末端アミノ酸 X の種類で修飾され方が違う。弱い酸性アミノ酸であればファルネシル基が、疎水性アミノ酸であればゲラニルゲラニル基が結合する。このプレニル化後に膜に移行し、AAX の 3 個のアミノ酸が切断され、プレニルシステインのカルボキシル基がメチル化を受ける。

低分子量 G 蛋白質の Rab ファミリーは C 末端側にある 2 つのシステイン残基がゲラニルゲラニル化されている。Ras は C 末端側のシステイン残基にファルネシル基が、N 末端側のシステイン残基にパルミチン酸が結合しており、両者が膜と相互作用する。

#### c) GPI アンカー

GPI は細胞表面において細胞外蛋白質とのアンカーの役割をしている。GPI アンカー蛋白質は 60 以上もあり、アルカリホスファターゼ、5'ヌクレオチダーゼ、コリンエステラーゼがよく知られているが、そのほかにも表面抗原 (Thy-1, CD48), 細胞接着因子 (N-CAM), 補体制御因子 (CD55/DAF, CD59) や受容体 (T cell receptor  $\beta$ ; TCR $\beta$ ) など細胞応答に関連するものがある。GPI アンカーは、PI の 6 位のグルコサミンに 3 分子のマンノースがグリコシ

ド結合し、それがエタノールアミンリン酸を介して蛋白質の C 末端と酸アミド結合している。したがって、GPI 生成不全は、機能的に重要な蛋白質を正常な状態で膜表面に発現できないことによる様々な膜機能障害をもたらす。発作性夜間血色素尿症 (proxymal nocturnal hemoglobinuria; PNH) はその代表例である。GPI を分解する酵素には細菌の PI-PLC, トリパノゾーマの GPI-PLC, ヒト・ウサギ血清中の GPI-PLD などがある。

## VI. おわりに

細胞膜脂質が情報伝達システムに密接に関与していることが明かになり、従来の膜脂質に対する概念はこの 10 年間で一変した。細胞機能において、分泌などの迅速応答のみならず増殖、分化、アポトーシスなどの中・長期応答にも数多くのセカンドメッセンジャーあるいはメディエーターを介して蛋白質リン酸化と連係し、効率的なシグナル伝達が営まれている。ノックアウトを含めた分子遺伝学的手法により、膜脂質シグナリングの分子レベルでの解析が急速に進展することになり、機能との関連がより具体的に理解されるのもそう遠い先のことではなさそうである。

執筆の機会を与えていただきました高田明和教授にお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 野澤義則 (1991) 細胞膜脂質の機能的側面—機能脂質。科学 61, 341-348
- 2) 野澤義則 (1995) 脂質からみた生体膜, 生体膜—新しい膜学への招待—(宇井理生, 香川靖雄, 春日雅人, 野澤義則編) pp 1-61, 講談社サイエンスティフィク
- 3) Hokin, M. R. & Hokin, L. E. (1953) J. Biol. Chem. 203, 967-977
- 4) Nishizuka, Y. (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science 258, 607-614
- 5) Thorn, P., Moreton, R. & Berridge, M. (1996) Multiple, coordinated  $Ca^{2+}$ -release events underlie the inositol trisphosphate-induced local  $Ca^{2+}$  spikes in mouse pancreatic acinar cells. EMBO

- J. **15**, 999-1003
- 6) Exton, J. H. (1990) Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *J. Biol. Chem.* **265**, 1-4
  - 7) 村上 誠, 井上圭三, 工藤一郎 (1996) ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>. *実験医学* **14**, 1999-2005
  - 8) Hattori, M., Adachi, H., Tsujimoto, M., Arai, H. & Inoue, K. (1994) Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature* **370**, 216-218
  - 9) Lin, L. L., Wartmann, M., Lin, A. Y., Knopf, J. L., Seth, A. & Davis, R. J. (1993) cPLA<sub>2</sub> is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* **72**, 269-278
  - 10) Kramer, R. M., Roberts, E. F., Um, S. L., Borsch-Haubold, A. G., Watson, S. P., Fisher, M. J. & Jakubowski, J. A. (1996) p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylates cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) in thrombin-stimulated platelets. Evidence that proline-directed phosphorylation is not required for mobilization of arachidonic acid by cPLA<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.* **271**, 27723-27729
  - 11) Rhee, S. G. & Choi, K. D. (1992) Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase isozymes. *J. Biol. Chem.* **267**, 12393-12396
  - 12) Noh, D.-Y., Shin, S. H. & Rhee, S. G. (1995) Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochim. Biophys. Acta* **1242**, 99-114
  - 13) 坂野喜子, 野澤義則 (1996) ホスホリパーゼ C の多様性. *実験医学* **14**, 1992-1998
  - 14) Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J. & Sigler, P. B. (1995) Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell* **83**, 1037-1046
  - 15) Essen, L.-O., Perisic, O., Cheung, R., Katan M. & Williams, R. L. (1996) Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C $\delta$ . *Nature* **380**, 595-602
  - 16) Rhee, S. G. & Bac, Y. S. (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* **272**, 15045-15048
  - 17) Ji, Q. S., Winnier, G. E., Niswender, K. D., Horstman, D., Wisdom, R., Magnuson, M. A. & Carpenter, G. (1997) Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma 1 in mammalian growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **94**, 2999-3003
  - 18) Van Dijk, M. C. M., Muriana, F. J. G., de Widt, J., Hilkmann, H. & Van Blitterswijk, W. J. (1997) Involvement of phosphatidylcholine-specific phospholipase C in platelet-derived growth factor-induced activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in Rat-1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **272**, 11011-11016
  - 19) 中島 茂, 坂野喜子, 野澤義則 (1995) 細胞活動におけるホスホリパーゼ D の役割と活性調節機構, *蛋白質核酸酸素* **40**, 877-888
  - 20) Exton, J. H. (1997) New developments in phospholipase D. **272**, 15579-15582
  - 21) Taki, T. & Kanfer, J. (1979) Partial purification and properties of a rat brain phospholipase D. *J. Biol. Chem.* **254**, 9761-9765
  - 22) Okamura, S. & Yamashita, S. (1994) Purification and characterization of phosphatidylcholine phospholipase D from pig lung. *J. Biol. Chem.* **269**, 31207-31213
  - 23) Hammond, S. M., Jenco, J. M., Nakashima, S., Cadwallader, K., Gu, Q.-M., Cook, S., Nozawa, Y., Prestwich, G. D., Frohman, M. A. & Morris, A. J. (1997) Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. *J. Biol. Chem.* **272**, 3860-3868
  - 24) Colley, W. C., Sung, T.-C., Roll, R., Jenco, J., Hammond, S. M., Altschuler, Y., Bar-Sagi, D., Morris, A. J. & Frohman, M. A. (1997) Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Current Biology*. **7**, 191-201
  - 25) Brown, A. A., Gutowski, S., Moomaw, C. R., Slaughter, C. & Sternweis, P. C. (1993) ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell* **75**, 1137-1144
  - 26) Bowman, E. P., Uhlinger, D. J. & Lambeth, J. D. (1993) Neutrophil phospholipase D is activated by a membrane-associated Rho family small molecular weight GTP-binding protein. *J. Biol. Chem.* **268**, 21509-21512
  - 27) Ojio, K., Banno, Y., Nakashima, S., Kato, N., Watanabe, K., Lyerly, D. M., Miyata, & Nozawa, Y. (1996) Effect of *Clostridium difficile* toxin B on IgE receptor-mediated signal transduction in rat basophilic leukemic cells: inhibition of phospholipase D activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 591-596
  - 28) Luo, J. Q., Liu, X., Hammond, S. M., Colley, W. C., Feig, L. A., Frohman, M. A., Morris, A. J. & Foster, D. A. (1997) RalA interacts directly with the Arf-responsive, PIP<sub>2</sub>-dependent phospholipase D1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**, 854-859
  - 29) Ohguchi, K., Banno, U., Nakashima, S. & Nozawa, Y. (1996) Regulation of membrane phospholipase D by protein kinase C in HL60 cells. Synergistic action of small GTP-binding protein RhoA. *J. Biol. Chem.* **271**, 4366-4372
  - 30) Abousalham, A., Liou, C., O'Brien, L. & Brindley, D. N. (1997) Cell-permeable ceramides prevent the activation of phospholipase D by ADP-ribosylation factor and RhoA. *J. Biol. Chem.* **272**, 1069-1075

- 31) Chung, J. K., Sekiya, F., Kang, H. S., Lee, C., Han, J. S., Kim, S. R., Bac, Y. S., Morris, A. J. & Rhee, S. G. (1997) Synaptojanin inhibition of phospholipase D activity by hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.* **272**, 15980-15985
- 32) Liscovitch, M. & Chalifa, V. (1994) Signal-activated phospholipase D. In *Signal-Activated Phospholipases* (M. Liscovitch ed.) R. G. Landes Company, pp. 31-63
- 33) Banno, Y., Tamiya-Koizumi, K., Oshima, H., Morikawa, A., Yoshida, S & Nozawa, Y. (1997) Nuclear ADP-ribosylation factor (ARF)- and oleate-dependent phospholipase D (PLD) in rat liver cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 5208-5213
- 34) 岡崎俊郎, 沢井宏文, 堂前尚親 (1996) スフィンゴリエリンサイクル. *実験医学* **14**, 23-28
- 35) Testi, R. (1996) Sphingomyelin breakdown and cell fate. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 468-471
- 36) Hannun, Y. A. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274**, 1855-1859
- 37) 伊集院壯 (1997) イノシトールリン脂質代謝の新しい仲間たち. *蛋白質核酸酵素* **42**, 385-393
- 38) Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Panayotou, G. & Waterfield, M. D. (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 267-272
- 39) 坂根郁夫 (1997) ジアシルグリセロールキナーゼ遺伝子ファミリーの多様な構造. *生化学* **69**, 176-181
- 40) 矢富 裕 (1996) 血小板におけるスフィンゴ脂質の機能と代謝. *血栓止血誌* **7**, 219-226
- 41) Olivera, A. & Spiegel, S. (1993) Sphingosin-1-phosphate as a second messenger in cell proliferation induced by PDGF and CS mitogens. **365**, 557-560
- 42) 勾坂敏朗 (1996) イノシトール情報伝達系におけるイノシトールポリリン酸 5-ホスファターゼの役割とその意義. *実験医学* **14**, 2026-2031
- 43) Moolenaar, W. H. (1995) Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J. Biol. Chem.* **270**, 12949-12959
- 44) Mori, M., Aihara, M., Kume, K., Hamanoue, M., Kohsaka, S. & Shimizu, T. (1996) Predominant expression of platelet-activating factor receptor in the rat brain microglia. *J. Neurosci.* **16**, 3590-3600
- 45) Zu Heringdorf, D. M., Van Koppen, C. J. & Jakobs, K. H. (1997) Molecular diversity of sphingolipid signalling. *FEBS Lett.* **410**, 34-38



シリーズ「データ処理技術講座」

パソコンを使ったデータ処理  
—データ取り込みから論文用原図作成まで—  
(pClamp・AxoData 編)

蓮尾 博・鶴崎 政志  
(久留米大学医学部生理学第2講座)

はじめに

インターネットを始めとして、広く一般にもコンピュータの利用が当たり前と言った時代になってきましたが、我々の研究の分野でもデジタル化の波は例外ではないようです。データの取り込みや解析については、以前からコンピュータを使われてきた先生方も多いかと思えます。このようなコンピュータの利用形態は、それぞれの研究で特異な利用方法であるといえますが、今回はこう言った個々の研究に特異なコンピュータの利用法ではなく、比較的一般的な利用方法、言い換えるとデータのデジタル化から論文用の図版を作成するまでの過程を私共の教室の例を参考に、DOS/V(担当：蓮尾)、Mac(担当：鶴崎)に分けて説明していきたいと思えます。使用するソフトウェアに関しては、一部そのソフトウェア特有の部分がありますが、同様の使い慣れたソフトウェアと読み換えて頂いてかまわないと思えます。また、今回の内容に関しては、久留米大学医学部第2生理のホームページ (<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med> より第2生理を選択)でもご覧頂けるように準備いたしましたので、ご利用下さい。

掲載項目

A) DOS/V編

- 1) システム構成の一例
- 2) データの取り込み
- 3) 取り込みデータの解析
- 4) 解析後の生データの図をつくる
  - 4 A) 計測したデータを用いる場合
  - 4 B) 波形データそのものを用いる場合

4 B-1) スキャナを使って読み込む場合

4 B-2) バイナリーデータを直接読み込む場合

5) いくつかの図表や生データの波形をレイアウトした図をつくる

6) 補遺

B) Macintosh 編

1) システム構成の一例

2) 全体の処理の流れ

3) AxoData によるデータの取り込み

- LabBench の設定
- プロトコールの設定
- 設定の確認

4) AxoGraph によるデータの解析

5) SigmaPlot を使ったグラフ作成

- AxoGraph から SigmaPlot へ

6) チャート紙に記録されたデータのデジタル化

- チャート紙からの スキャンニング

7) CANVAS でのレイアウト作業

- AxoGraph の波形データから CANVAS へ
- スキャン画像から CANVAS へ
- SigmaPlot のグラフから CANVAS へ

A) DOS/V 編

OS (Operating System: 基本ソフト)として MS-DOS (PC-DOS もほとんど同じ) および Windows 3.1 または Windows 95 を用いる (いずれも Microsoft 社) のが標準的である。これらの OS には英語版と日本語版があるが、データ取得ソフトの多くが英語版で動くように作られているため、できれば英語の OS と英語のアプリケーションの組み合わせがベストであると思われる。しかしながら、日本語版のシステム

で英語のアプリケーションを動かす場合も可能である。とくに最近のコンピュータは OS をはじめからインストールしてある場合が多く、筆者の場合も日本語のシステム (DOS/V や Windows 95) 上で英語のプログラムソフトを動かすことも少なくない。一般に Windows 版のアプリケーションは使い易いという評判であるが、それは DOS 版と比べてたどきの話であって、決してすぐに使えるものではない。いろいろ使って慣れることが大切である。アプリケーションは DOS 版のソフトと Windows 版のソフトに大別されるが、以前から使われているのは DOS 版のソフトである。DOS は歴史のある OS だけに動作は安定しているものの、ユーザーインターフェースが貧弱である点は否めない。データの解析、図表の作成はやはり、Windows 版のソフトがその使い易さという点で優れているので、現時点では、データの取得は DOS 版のソフトで行い、図表は Windows 版のソフトで行っている。アプリケーションによってはデータの取り込みから図のレイアウトまでができるというものも存在はするが、それぞれの機能の制限が多く、なかなかすべてに満足できるというものは存在しない。したがって、これらの作業を別々のアプリケーションを用いて行うことになる。最近の Axon 社の話では、近いうちにデータ取得に用いる Clampex の Windows 95 版が発売されるということで、そうするとデータの取り込みから図の作成まですべてが Windows 版のソフトで処理できるようになり便利となる。データ処理は前述の掲載項目の順序で説明を進めていく。言うまでもないことだが、ここで取り上げたアプリケーションは、ほんの一部であり、またそれぞれの機能も一部しか説明していない。詳しくはそれぞれのアプリケーションの解説書を参照のこと。

### 1) システム構成の一例

今回の解説例におけるシステムの構成は以下のようになっている。

[ハードウェア]

- CPU : Gateway 2000 P 5-120
- RAM : 16 MB     HDD : 1 GB
- OS : MS-DOS Ver. 6.2 と Windows 3.1
- 17インチカラーモニター
- データ取得システム : Digidata 1200
- スキャナ : HP ScanJet 4c
- プリンター : EPSON LP-1600

電気生理学のための機器は Macintosh の場合と同じなので省略

[ソフトウェア]

- pClamp 6 (ver. 6.02) : DOS 上で走るデータ取得、解析ソフト。Clampex, Fetchex, Clampfit, Fetchan, pStat などからなる。
- Excel (ver. 5) : 表計算ソフト
- Sigmaplot (ver. 1.02) : グラフ作成ソフト
- Origin (ver. 4.0) : データ解析からグラフィックレイアウトまで幅広い機能を持つソフト
- Photopaint (ver. 5) : ビットマップデータを編集するためのソフト
- PowerPoint (ver. 4) : プレゼンテーションソフト

### 2) データの取り込み

データの取り込みのアプリケーションとしては IBM-PC/AT 互換機用 (以下 PC と略す) の場合 Axon 社の pClamp, CED 社の Spike など数多く存在する。日本光電からは、PC-98 シリーズ (NEC 社) 用のデータ収録用インターフェイス・データ収集・処理ソフトも存在する。筆者の場合 Axon 社の pClamp システムを用いているので、これに基づいて話をすすめる。ほかのアプリケーションを用いた場合でも、基本的な作業の流れは同じであろう。

pClamp システムの場合現在のバージョンは 6.03 になっているが、以前の 5.5 までとはだいぶ変わったものになっている。バージョン 6 になってから、Clampex の場合、1 回に取り込めるサンプルデータポイント数が最大で 4096 から最大 16384 まで増えているし、データの解析ソフトも Clampan が廃止になり Clampfit も大幅に改良されているので、バージョンアップをさ

れることをお勧めする。またユーザーズマニュアルも随分分厚くなっている。その分以前より使い方が分かり易くなっているが、はじめて使う人にはまだ問題がある。できれば、なにか応用例をチュートリアルの形で示してあればいいのだが。

pClamp 6 の場合のデータの取り込みは、神経刺激で記録されるシナプス後電位のような誘発現象は Clampex を用い、自発性後電位のような比較的長時間連続して記録する必要がある場合には Fetchex を用いる。データの取り込み終了後ハードディスク等に保存(save)されたデータファイルを読み出して解析する(オフライン処理)。このときはそれぞれ、Clampfit, Fetchan というプログラムが用意されている。連続したデータの取り込みでない場合は、データ取得時の待ち時間にデータの解析を行うことも可能である(オンライン処理)。この場合、解析結果のみを保存するのであればかなりのメモリーを節約できるし、実験の進行中に変化をとらえやすいので便利であるが、この機能は Clampex では持っておらず、他のオンライン処理をサポートしたアプリケーションを使うか、又は AxoBasic (Axon 社) のようなプログラム言語を用いて自作する必要がある。AxoBasic はひとつのコマンドでかなりまとまった機能を持っているものだが、それでも自分でいろいろなコマンドを組み合わせて、ある計測を行うことになり、かなりのコンピュータの知識と忍耐を必要とする。こういった事ができる人は今回の記事の対象外であろう。

pClamp システムの使い方としては、1つの実験セットに1つのシステムをおいて、pClamp システムを電流コマンドなどの刺激発生装置として用いてデータを取り込み、あとでデータの解析を行うという方法に適したように作られている。pClamp システムを使うためには、コマンド波形の作成のしかた、データ取り込みのときの種々のパラメーターの設定、データの保存、プリンターその他への出力方法などを最低限知る必要がある。上達してくると、設

定したコマンドの自動的実行(マクロ機能)を利用することで、いろいろな作業の自動化が可能になるだろう。

### 3)取り込みデータの解析

実験終了後、Clampex 等で取得・保存されたデータファイルを Clampfit 等で再び開いて (File OpenData) して解析を行う。Clampfit を用いる場合の最初の注意点を簡単に述べておく。Clampfit をインストールしたら、メインメニューの configure を選び、plotter の選択をしておく。もちろん plotter だけでなくレーザープリンターも使用できるし、このほうがずっと速い。Clampfit は一度に1チャンネルのデータを読み込んで処理するようにできている。どのチャンネルを読み込むかは、メインメニューの File Setting で ANALOG IN channel の項目で決定されている。

Clampfit では回帰曲線 (Curve fitting), 2次元座標軸プロット (X-Y plot), 種々の解析・変換 (Analyze) など豊富な機能が用意されている。例えば、Analyze Statistics には Basic, Resistance, Spike というまとまった解析ソフトが入っている。それぞれ、種々のパラメーターを瞬時に測定してくれるものであるが、適用の条件その他を理解した上で使わないと問題である。波形データにおける任意の部位の振幅、時間を測定するにはカーサーによる測定が用意されている。測定結果は Analyze Measure Write Cursors でファイルに書き込む。これは Analyze Measure Close が押されるまで、Write Cursors を行うごとにそのデータは追加されていく。カーサーによる測定ではカーサーのある位置のデータポイント1点のデータ値だけを返すものである。ノイズを無視できないデータ波形では、測定の前に、Analyze Force や Analyze Lowpass コマンドを用いて、smoothing をしたのち測定する方法もある(図1)。

これらの一連の作業をくり返し行い、多数のデータを測定することも多いと思われるが、そのときにはマクロ機能を利用すると便利であ

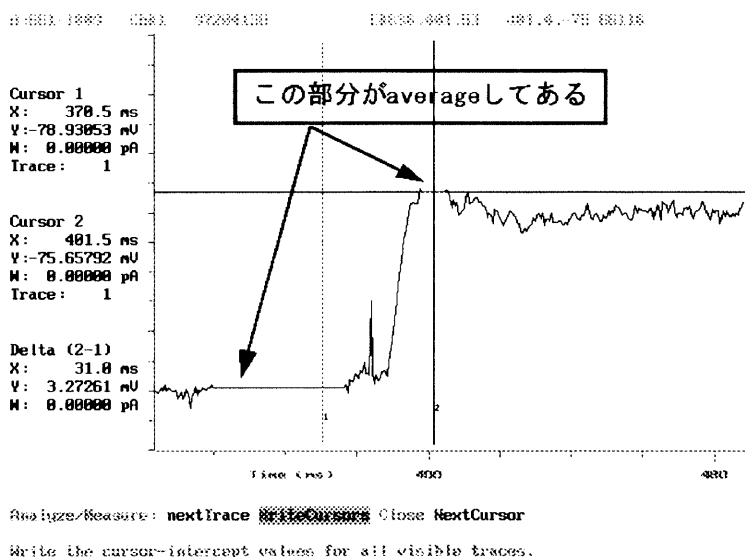


図1. Clampfit を用いて、振幅を計測しているところ。矢印で示される部分は Analyze Force コマンドを用いて average してある。

る。ここで save したファイルはテキスト形式で保存されているので、簡単に他のアプリケーション(たとえば表計算ソフトなど)で利用できる。

#### 4) 解析後の生データの図をつくる

##### 4 A) 計測したデータを用いる場合:

Clampfit では、解析データ(例えば活動電位の振幅、立ち上がり速度、持続時間など)を保存することができ、ここで保存されたファイルは表計算ソフトなどの他のアプリケーションで利用できる。また Clampex で取得したデータ間の演算(例えば、リーク電流の引き算など)が簡単にできるほか、電流-電圧関係のグラフも作ることができる。とくに Ver. 6 からは10個までのプロットを同時表示やデータの保存ができるようになっている。また種々の回帰曲線機能も用意されている。しかしながら、プリンター(またはプロッター)で出力したグラフは、論文投稿には耐えられない。そこで、他のアプリケーション(グラフ作成ソフト)に解析データを転送して、グラフを作り直す必要がある。グラフ作成ソフトには、Sigmaplot (SPSS 社)や Prism (GraphPad 社)などがある。

X-Y グラフを例にとり説明する。Clampfit で X-Y グラフを画面に表示させた状態で、Export Ascii コマンドを実行すると、自動的にファイル名と拡張子を付けて ASCII テキスト形式で保存できる。このとき、このファイルを保存するドライブ名、ディレクトリ名を間違えないように覚えていないとあとでそのファイルを探さないといけなくなる。また Export するデータの種類により拡張子が異なるので、これも注意が必要である。同時に複数のグラフ表示した(X-Y graph multi)データの場合の拡張子は XYM、計測結果表示画面(Results array)のデータの場合は RSn (n は数字)という具合である(詳細については、ユーザーズガイド15章の file formats and naming conventions を参照のこと)。

次にグラフ作成ソフト(Sigmaplot, Prism や Origin など)を立ちあげて、そのデータワークシートに先ほど保存していたファイルのデータを読み込むわけである。グラフ作成ソフトや表計算ソフト(Lotus1-2-3 や Microsoft Excel)には他のアプリケーションのデータを取り込む機能が用意してある。Sigmaplot では Import (図2)というのがそれであるし、Excel ではファ

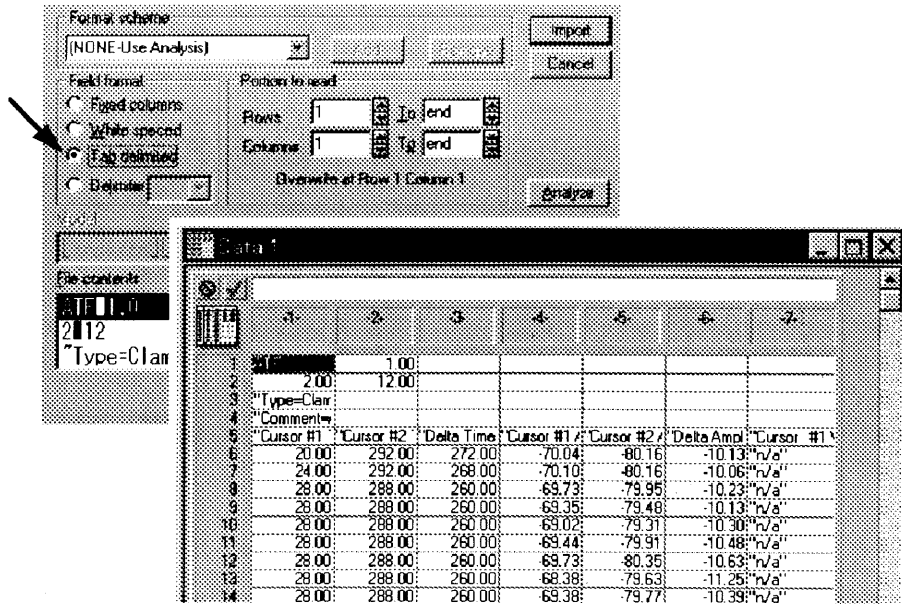


図2. Sigmaplot に Clampfit で計測したデータを読み込んでいるところ。矢印はタブ区切りを選んでいるところを示す。

イルのオープンを行う。このとき注意が必要なのは、データ解析ソフトからの出力ファイルがどのような形式で保存されているかということで、これが Import のとき影響してくる。ここではファイルの種類は plain text を選んでおく。実際にこのコマンドを実行してみるとすぐにわかることだが、Import するデータの区切りが何であるかを指定しないと正しくデータが取り込まれない。Clampfit の ASCII テキストファイルの場合は Tab 区切りを選ぶといいようである。計測データポイント数が少ないうちは手で入力しなおしても大差ないが、数が多くなるとこの方法によるデータの転送は非常に役に立つ。このあとグラフ作成ソフトを使って図をつくることになるがここでは省略する。

#### 4 B) 波形データそのものを用いる場合

いままでは計測したデータを別のアプリケーションに転送する方法を説明してきたが、今度は、波形データの転送に関する方法を述べる。データ取得ソフトで取得したデータは通常バイナリーファイルとして保存される。このファイ

ルはコンパクトであるが、他の表計算ソフトなどで直接データを読み込むことができない。

データを転送するときの1つの方法としては、Clampfit の Export Ascii コマンドを使って波形データを ASCII テキストファイル形式で保存してそれを他のアプリケーションで読み込むという方法がある。問題はそのとき ASCII テキストファイルの大きさが、大きくなるという点である(バイナリーデータの約8倍)。この点が特に問題にならないのであれば、このデータをグラフ作成ソフト(例えば Sigmaplot)で読み込み、グラフ表示機能を利用して、波形データを任意の大きさにレイアウトし、ラベルも入れて表示させることができる。一度他のソフトでデータを取り込んだあとは、データ転送に使ったファイルをとときどき削除しないと、ハードディスクの容量を圧迫することになる。

その他の方法としては、一度プリンターに波形として出力して、そのあとスキャナーを用いて画像データとして取り込む方法やバイナリーファイル形式をサポートしているソフトでこれを読み取り処理する方法である。pClamp の場

合、データファイル(拡張子は“dat”)を読み取るソフトとして、pClamp module を組み込んだ Origin 等がある。

#### 4 B-1) スキャナ使って読み込む場合:

Clampfit の Export のサブメニューにある Plot を用いて、プリンターまたはプロッターに出力できる。以前は質のよい、またカラーを用いた出力を得るためにはプロッターが必要であったが、出力に時間がかかるし、レーザープリンター等で出力するほうが現在では主流である。1 ページに含める波形の数は 1, 2, 4, 6 等選ぶことができる。また波形データ、X-Y 軸、その他のラベルなどの線の太さを変えることができるので、適当な太さを設定しておく、次回からその設定が使われる。どの程度の太さにしておけばよいかというのは最終的な図の大きさを考えて決める必要がある。

プリンターで出力した図をスキャナで取り込み、フォトレタッチソフトで不必要な部分を取り除いて保存しておく。このとき軸を消す前に直線描画ツールなどを用いて、キャリブレーションバーを入れておくことが大切。スキャナーに取り込むとき、その解像度を決める必要があるが、これに関することとして、CPU の処理速度、メモリー、プリンターの解像度などが挙げられる。一般的な設定としては、モノクロで 300 dpi、カラーで 150 dpi といったところが、現在の多くの人の妥協点であろう。細い線を忠実に表現したい時や、あとで拡大する予定がある場合は 600 dpi 程度で取り込む必要性もある。カラーの場合普通のインクジェットプリンターでは例え 360 dpi とか 720 dpi の解像度といっても取り込みはせいぜい 200 dpi で遜色はない。ただしこの解像度で文字を入れるとどうしても文字のギザギザが目立つので、他のレイアウト用ソフトにカラーの図を取り込んで、このなかで文字を入れるとよい。この場合、文字情報と図の情報を加えるだけなので、文字の印刷時の質を高くしても、ファイル全体の大きさは小さく保つことができる。レイアウト用ソ

フトを立ちあげて、いままで保存していたビットマップの図、グラフなどをページに貼り込んでいく。PC 用のレイアウト用ソフトとしては、PowerPoint (Microsoft 社) とか Harvard Graphics (SPC 社) などがある。これらのアプリケーションはプレゼンテーション用ソフトともよばれ、口演のスライドをつくったりポスターの図を作ったりするときにも利用できる。

#### 4 B-2) バイナリーデータを直接読み込む場合:

pClamp module を組み込んだ Origin (Microcal 社) などを使って pClamp のデータを読み込み図を作る場合がこれにあたる。方法としては、pClamp で取り込んだデータファイル(拡張子は“dat”)でバイナリー形式で保存してある)を Origin のワークシートに直接読み込み処理するものである。この方法で処理すると、波形データが Origin のグラフ機能ではドロー (draw) 形式で扱われるために、後から、線の太さを変えたり、色を変えたり、線の種類を変えたり、波形データの一部を取り除くことが簡単にできるという利点がある。また波形の縦横の比を変化させても印刷時の画像の劣化が無いという利点がある。Origin はそもそも同時に違った種類のウィンドウを表示するソフトで、ワークシートウィンドウとグラフウィンドウを同時に表示したりすることのできるソフトである。pClamp module とはこのワークシートウィンドウにデータを読み込むための付加機能である。Origin にはワークシート、グラフ、関数など多機能が用意されている。このソフトを購入しての印象としては、Origin そのもののマニュアルは良くできているのであるが、その欠点として pClamp のデータを使い図を作りたいというような特別な目的を持ったユーザーに対する配慮が欠如していることがあげられる。まだ Origin を使用しはじめて経験も浅いので最善の方法かどうかは分からないが、自分で考えた利用方法を少し述べてみる。例としてはコントロールの波形とテスト波形が別々の pClamp の

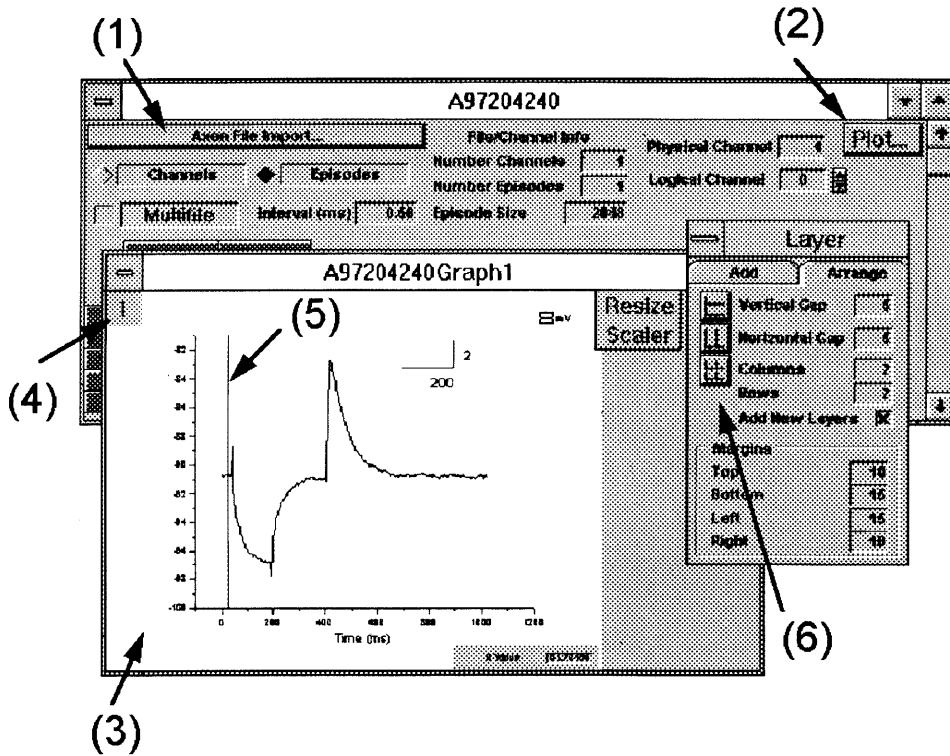


図3. Clampex で取り込んだデータを Origin に読み込んでいるところ。図中の番号については本文中参照のこと。

データファイルとして保存されていて、これを用いて、二つの波形の比較を行う図を作る場合とする。

まず pClamp モジュールの入った Origin を立ち上げ、ワークシートの中にある、axon file import のボタンをクリックしてコントロールの波形データを読み込む(図3の(1))。このとき1チャンネル分しか読み込まないので、注意が必要である。これが一つのデータセットとなり、別の波形を読み込むときには、新しくワークシートを開いてデータを読み込むことになる。それぞれのワークシートの data plot ボタンをクリックすると(図3の(2))、それぞれの波形がグラフウィンドウに示される(図3の(3))。

デフォルト(初期設定)ではグラフウィンドウに一つのデータファイルセットが表示されるが、ここに別のグラフを追加することができる。Tools: Layer: Arrange: Array をつかうとよい(図3の(6))。Origin ではこれをレイヤーの追

加といい、レイヤーの番号ボタンがそのグラフウィンドウにあらわれる(図3の(4))。追加したレイヤーのボタンをダブルクリックして、表示したいデータ名を選び、右向きの矢印ボタンをおして、表示するデータが右のボックスに表示されたのを確認してから OK のボタンを押す。これで二つの波形が一つのページに表示されたわけであるが、注意が必要なのは、それぞれのグラフのY軸がそれぞれ独立して扱われているので、この例のように波形を比較する場合には、Y軸のスケールを同じにしておく必要がある。このためにはY軸をマウスでクリックしてY軸設定用のBOXをあけ、Y軸の表示範囲をマニュアルで入力する。通常の波形図ではX-Yの座標軸を表さないのも非表示にしておく。data plot のウィンドウではX軸の計測のためのカーサーが入っているが(図3の(5))、これも図を作るときには邪魔になるので、消す必要があるが、これは単にマウスで選択し

て、delete key を押しただけでは消えない。Edit : Button Edit mode にしてから同様のことを行くと、消去できる。これで一応図はできたことになるが、このような表示の設定を毎回くりかえすのはつまらないので、これをテンプレートとして保存しておくことよ。このときのファイル名をデフォルトのまましておく、次回に data plot を行ったときに、テンプレートが自動的に使われるので便利である。

あとはできたグラフウィンドウをアクティブにして、copy page を行い、別のドロー系のアプリケーションのページ画面にこれをペーストして処理することになる。筆者はこの目的にプレゼンテーションソフトである PowerPoint (Microsoft 社) を用いている。スライドにペーストした後、Draw (図形) メニューの下にあるグループ解除 (Ungroup) を用いて PowerPoint の形式の Draw データとして比較的自由に図形の処理ができるためである。このあとの図の作り方は基本的に Mac の場合と同じであるので省略する。要は各コンポーネントのグループ化 (Group) とグループ解除 (Ungroup) をうまく使い分けてキャリブレーションが狂わないようにして作業することである。

#### 5) いくつかの図表や生データの波形をレイアウトした図をつくる

学会発表や論文投稿のときに必要になる作業である。これはレイアウトソフトやプレゼンテーションソフトを用いて行うことができる。いままでに述べてきたグラフ作成ソフトの図やフォトタッチソフトの図、Origin のようなアプリケーションで作られた図をひとつの画面に埋めこんで1つの原図をつくる。このようにしてできた複数の原図をそれぞれを組み合わせて最終的なまとまった図を作ることになる。このようにしてできた図はプレゼンテーションソフトや画像データベースソフトなどを利用して、整理しておくこと将来の利用が楽になるはずである。

#### 6) 補遺

**pClamp 6 に必要なハードウェアと OS:**  
80386 DX 以降の CPU を持つ IBM-PC/AT 互換機 (SX は数値演算コプロセッサを持たないので増設する必要あり)、TL-1/Lab Master DMA や Digidata 1200 データ取得システムおよび MS-DOS Ver. 3.3 以降が必要である。最近の Windows 用コンピュータは Pentium を CPU に持つことが多いが、もちろんこれを用いることができる。ただし Axon 社によると Clampex は Windows 内の DOS モードで走らせることは可能であるが、データの取り込みが正確に行われなくなることから薦められないとのこと。Windows 95 で用いるときはスタートメニューで “Windows を終了して DOS モードで再起動する” を選んで Windows 環境を離れた DOS モードにして Clampex を使う必要がある。現在 Windows 95 版の pClamp が開発中であるが、これを用いるためには Digidata 1200 で Windows に対応したボードを持つものが必要である。

**アプリケーション・ソフトウェア:** ワードプロセッサ、表計算ソフト、通信プログラムなど特定の目的につかうソフトウェア (略してアプリケーション) のことをいう。

**基本ソフト (Operating System : OS):** いろいろのアプリケーションソフトを動かすために必要な基本となるソフト。ハードウェアとアプリケーションソフトの仲介役をするソフトで、アプリケーションソフトと異なり、コンピュータを制御したり、ソフトウェアとデータの流れ、入出力、表示を管理するもので、アプリケーションの実行の前に必要なもの。

OS として MS-DOS (PC-DOS もほとんど同じ) および Windows 3.1 または Windows 95 を用いることが多い。簡単にこれらの OS のことを説明すると、DOS は今から約15年前から普及してきた OS で、CPU (コンピュータの演算回路) の負担が軽く優れた点があるが、ユーザーインターフェースが文字を基本にしており、いろいろのコマンドを覚えないと使いにくかった

りした。その後出てきたのが、Windows システムで、これは GUI(Graphic User Interface) を基本としており、文字だけでなく図を用いて直感的に機能を選ぶことができる。それに伴いアプリケーションソフト(以後アプリケーションと略す)の作り方もだいぶ変わり、使い易くなっている。問題は Windows システム、特に Windows 95 の場合は CPU に対する負担が重いことである。

**DOS/V**：IBM 社が開発した日本語 DOS でのままの日本語 DOS と大きく異なり、日本語表示に特別なハードウェアを必要としない、非常に英語 DOS (MS-DOS や PC-DOS) と互換性の高い OS であり、日本語処理機能を組み込まない場合はほぼ100%の互換性をもつ。DOS/V は日本語表示等をすべてソフトウェア的に行い、コンピュータそのものが日本語表示用の ROM (はじめから組み込まれている読み出し専用メモリー) を持たなくてもすむようになったし、英語版の DOS との互換性が非常に高く作られている。この機能を利用する場合少し注意が必要である。日本語を表示したり、入力するために必要なデバイス(システムメモリーに常駐する)等を入れるとアプリケーションの使用可能なシステムメモリーが足りなくなるし、いろいろのトラブルのもとになるので、英語のアプリケーションを動かすときには、これらのデバイスを入れずに、コンピュータを立ちあげるとよい。このためには config. sys ファイルを編集する必要がある。DOS の ver. 6 からは標準でメニュー形式で複数の config. sys ファイルを選んで実行することができるようになり、日本語用の config. sys と英語用の config. sys とを使い分けることが容易になった。

**ファイル名と拡張子**：コンピュータは、情報をファイル単位で管理し、コンピュータの内部では、プログラムやデータなどの個々のまとまりを「ファイル」という単位で呼ぶ。全てのファイルには「ファイル名」が付いていて、MS-DOS 系のファイルは通常次のように2つの部分から構成されている。

myfile.ext

「ファイルの名前」と「拡張子」の間は、ピリオド(.)で区切る。拡張子はアプリケーションによってファイルの種類を区別するために用いられるので、原則として変更しないほうがよい。

**ディレクトリ**(Win 95 や Mac の場合、フォルダー)：すべてのファイルを同じところに保存しておく、目的のファイルを探すのが大変になる。ファイルをグループに分けて、それぞれ違うところに保存しておくとし易くなる。ファイルをグループ分けして保存しておく場所をディレクトリという。

**ドライブ**：ハードディスク、フロッピーディスク、CD-ROM などの駆動装置と関連して用いられ、A、Bなどのドライブ名で示す。ディレクトリが複数のファイルのまとまりであるのと同様にドライブは複数のディレクトリのまとまりを指す。

**保存 (save)**：コンピュータのメモリーにあるデータは電源を切ると一瞬にして消えてしまうので、データその他はファイルとしてハードディスク等に保存しておく。つぎにこれを使用するときは open (開く) する。このような作業のときに裏で活躍するのが基本ソフト(OS)である。

**ASCII テキストファイル**：米国情報交換標準コードで表された文字ファイルで、ファイルの大きさは大きくなるが、ほとんどのアプリケーションソフトでも読み込むことができるという利点がある。例えば、数字の「123000」を表すのにそれぞれの文字1つずつにこの1文字を表すのに必要なメモリー容量を費やす。

**バイナリー(binary)ファイル**：数字として表すので、基本的に、ある有効桁数を表すのに必要なメモリーで全体を表すことができる。その結果ファイルは小さくてすむ。しかしその反面、これを読むにはそのバイナリーデータに対応した特別なプログラムが必要となる。

**dpi**：プリンターや画面の解像度を表すときに使う単位で、dot/inch の略。これが大き

ければより滑らかな線が表現できるが、それだけ必要なメモリーも増える。

**ビットマップ(bitmap)データ**：図形を表すのに、点の集まりとして表す方法。画素のデータが独立しているため、簡単に一部を切り取ったりできる反面、大きさを変えると画質が落ちるといった欠点がある。スキャナで取り込むときはこの形式で取り込む。

**ドロー(draw)データ**：図表を表すのに、数式化された線(または面)の集まりとして表す方法。大きさを変えても基本的に画質の劣化はなく、波形データを表すのに適している。

**マクロ(macro)機能**：マクロとはコンピュータ言語で、あるまとまった機械語の命令語の集まりをいうが、ここではキーボードから入力するコマンドの順序を記録したものという程度。実際にはあるキーに割り当てて(assign)、必要なときそのキーを押すとコマンド群が実行される(マクロの実行)。ある程度コマンドの使い方に慣れてきて、同じコマンドの入力に不自由を感じるようになってから用いるとよい。(蓮尾)

## B) Macintosh 編

### 1) システム構成の一例

今回の解説例におけるシステムの構成は以下のようになっている。

[ハードウェア]

- CPU : Apple PowerPC 8100/100 AV
- RAM : 32 MB    HDD : 1.2 GB
- Running system : System 7.5.5 E  
+ Japanese Language Kit Ver. 1.2
- 17インチカラーモニタ (SONY Multiscan 17 sfil)
- AxoData 用インターフェイスボード
- A/D, D/Aコンバーター : ITC-16
- \* 現在の Mac の PCI バスでは AxoData 用インターフェイスボードが使えない。
  - データ保管用外付け MO (230 MB 対応型)
  - スキャナ (Epson GT 6500)
  - 一般的な電気生理学のための機器  
Axoclamp 2 B (Axon Instruments)

メモリーオシロスコープ(日本光電)

電気刺激装置(日本光電)

- トリガー用
- 刺激パルス発生用

(Axoclamp 2 B の STEP COMMAND  
用及び Focal stimulation 用)

熱ペン式チャートレコーダ(日本光電)

DAT データレコーダ(TEAC)

[ソフトウェア]

- AxoData : データサンプリング用のソフト (Ver. 1.2.2)
- AxoGraph : AxoData で取り込んだデジタルデータを解析するためのソフト (Ver. 3.0)
- CANVAS : ビットマップデータも扱えるドロー系のグラフィックソフト (Ver. 5)
- SigmaPlot : Spread sheet のデータをグラフ化するソフト (Ver. 5)
- Photoshop : ビットマップデータを編集するためのグラフィックソフト (Ver. 4.01)

○接続例

デジタル処理と直接的には関係ないが、どういう機器があればよいかの参考にしていただくと幸いです(図4)。

接続の概要 :

- 細胞からの信号 : Axoclamp 2 B でピックアップされた細胞からの信号は、DAT データレコーダ、オシロスコープ、ITC-16 ADC INPUT 端子にそれぞれ平行に入力される。
- トリガー信号 : トリガー用電気刺激装置で発生させたトリガー信号は、オシロスコープ、ITC-16 TRIG IN 端子、DAT データレコーダ(後で録音されたデータからサンプリングし直すときに必要)、刺激用パルス発生用電気刺激装置にそれぞれ平行に入力される。
- 刺激用パルス : 電気刺激装置で発生させた Axoclamp 2 B の STEP COMMAND として細胞に与えるものと、AxoData で発生させた ITC-16 の DAC を経て Axoclamp 2 B

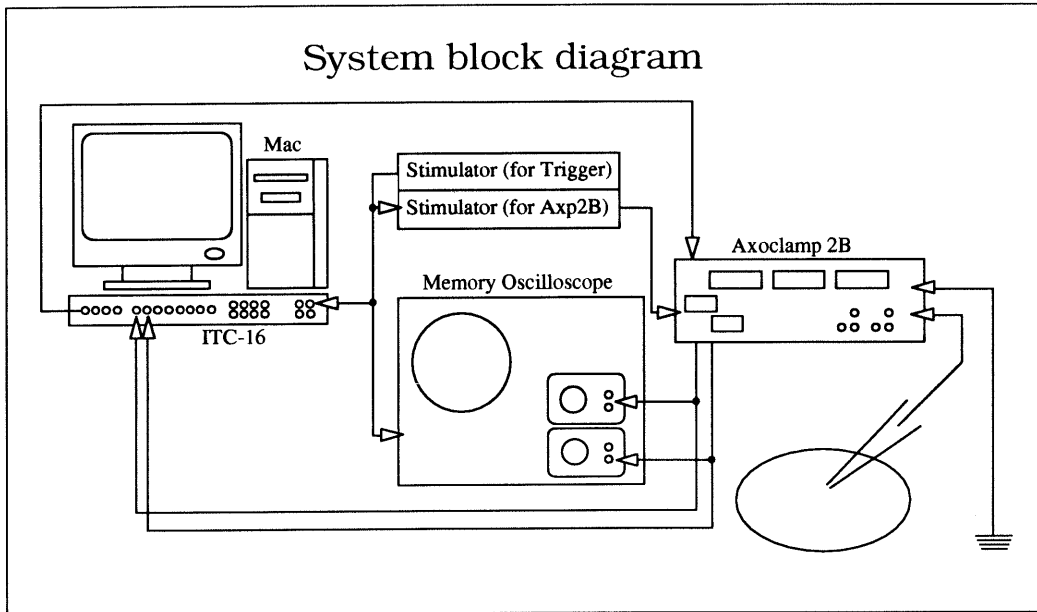


図4.

の外部刺激入力として与えるものの2系統を使う。

2) 全体の処理の流れ

○処理の流れの概要(図5)

[サンプリングされたデータの加工]

1. AxoData で evoked response を適宜サンプリングしてデータファイルとして保存する。
2. (実験が終わったら) AxoGraph で保存してあった AxoData のデータファイルを開き必要な計測を行う。
3. 計測結果はテキストファイルとして保存しておく。
4. 波形データの必要な部分のみを AxoGraph 上で表示しておいて、Copy & Paste で CANVAS の書類に転送する。
5. CANVAS 上で波形データの整頓を行う。
  - 波形トレースの配置
  - キャリブレーションバーの挿入
  - 文字の挿入
  - 不要な線(AxoGraph の X, Y 軸の線など)の消去
6. CANVAS の書類を保存し、必要に応じ

てプリントアウトする。

[スキャナで取り込んだデータの加工]

1. 必要なデータ部分よりやや広めにスキャンする。

スキャナによっては、チャート紙のグリッドを取り込まないように設定できるものもあり、この場合、後の作業(次の過程)がかなり軽減される(詳細は Scanning の項を参照)。

2. スキャン画像を保存(ファイルフォーマットは使用する画像ソフトが対応しているもの)し、Photoshop\* で開き、画像の不要部分(グリッドや実験中に書き込んだメモなど)を「消しゴム」ツールなどを使って消去する。

この時、後で CANVAS 上でキャリブレーションを入れるのに必要な、縦・横 1 cm の大きさがわかるように、グリッドの一部を残しておく。

\*Photoshop でなくても bitmap 画像が扱え

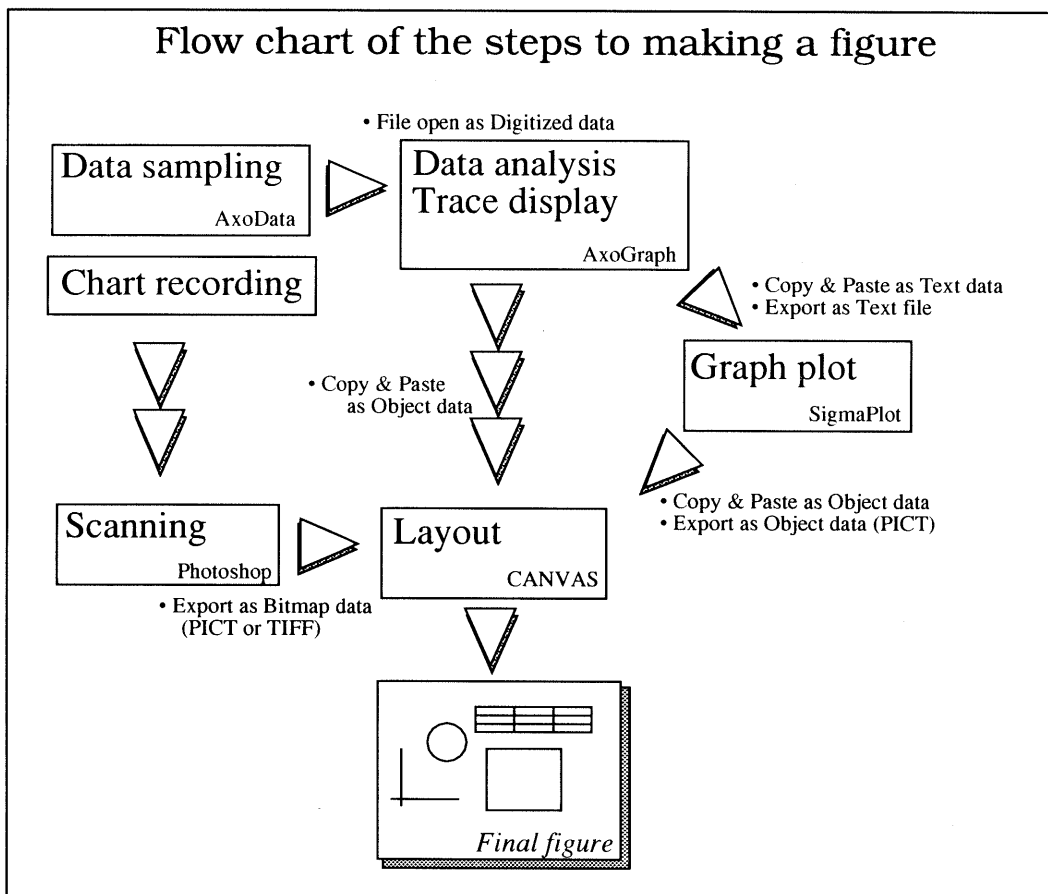


図 5 .

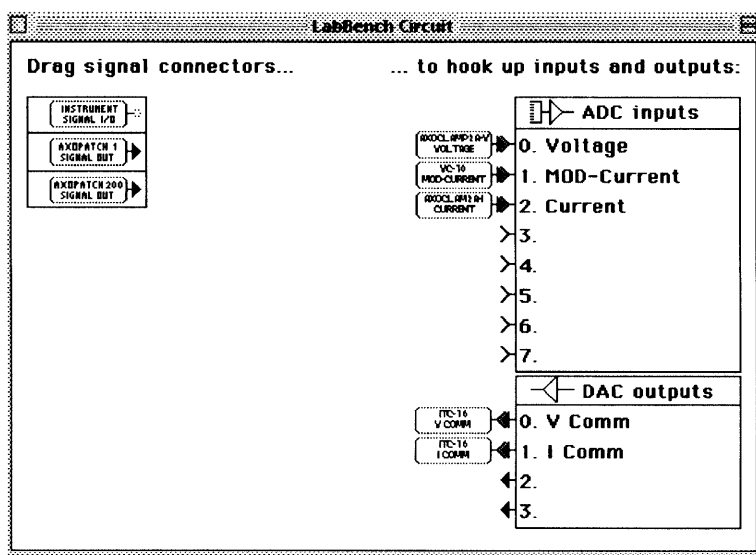


図 6 .

るソフトウェアならよい。

3. 編集した画像を PICT または TIFF フォーマットで保存する。
4. 保存した画像ファイルを CANVAS で開

き、キャリブレーションや文字など必要なものをレイアウトする。複数の画像を1ページに配するときには、この段階でレイアウトを仕上げる。

5. 編集が完成したらまずファイルを保存し、その後必要に応じてプリントアウトする。

それでは、これから個々のプロセスの詳しい説明に移る。

### 3) AxoData によるデータの取り込み

[LabBench の設定]

LabBench とは AxoData システムに於ける入出力のポートを決めるもので、以下のような GUI による設定を行う(図6)。

- 必要なチャンネル数だけの ADC (Analogue-Digital Converter), DAC (Digital-Analogue Converter) の設定をする。
- まず Gain の設定を行い、offset の設定は

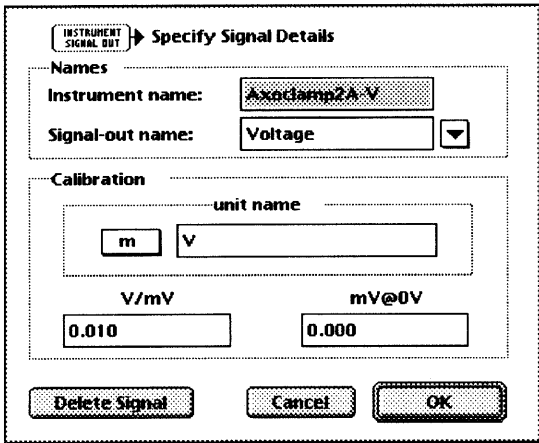


図 7.

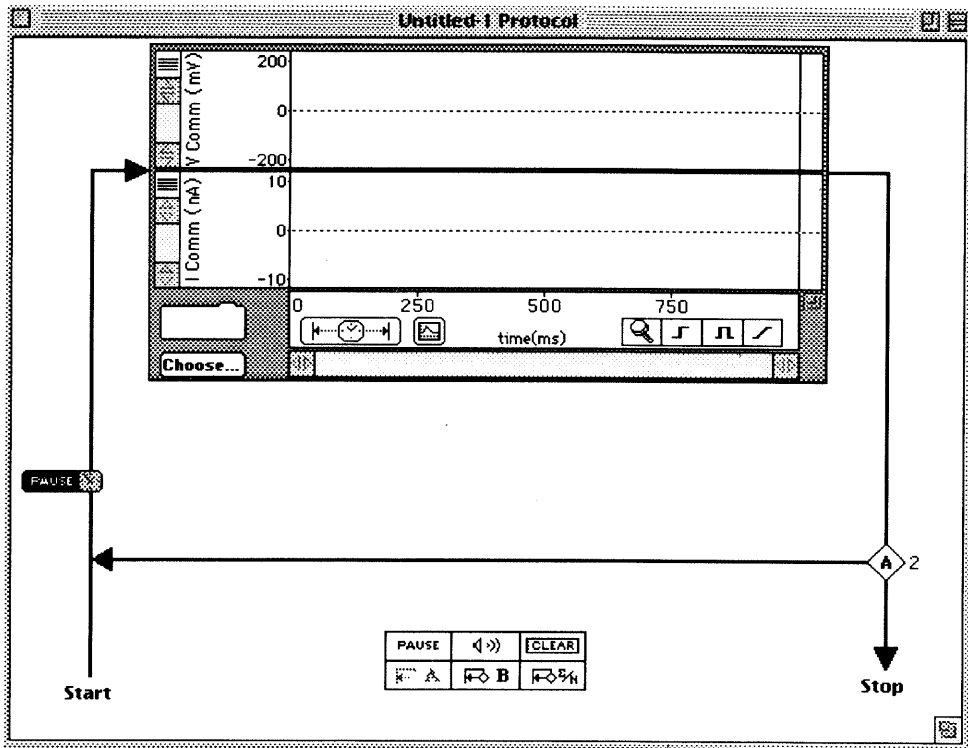


図 8.

実際に cell model を使ってサンプリングしながら調整する(図7).

\*Gain値は接続する実験機器により異なる

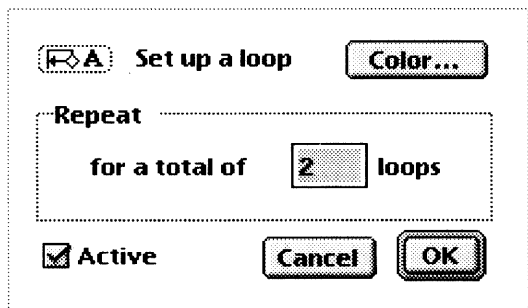


図9.

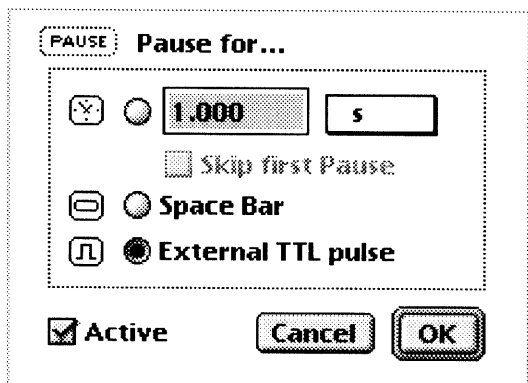


図10.

• DAC は AxoData から刺激を与えない場合も、最低1チャンネル分設定しておく。

(設定しないとモニタの表示がおかしくなることがある)。

• 設定値の確認は次のプロトコルの設定が終わってから、実際に cell model を使ってサンプリングを行い確認する。

\* LabBench のチャンネル数を後から増やすと、それまでのプロトコルファイルを使用する場合、プロトコルを修正しなくてはならないので注意すること。

[プロトコルの設定]

• ここでは実際のサンプリングの条件を設定する(図8)。

1. まず、1 trial に何回のサンプリングを行うのかを設定する(Loop の回数)(図9)。

\* 1 回のループで取り込まれた波形をトレースと呼ぶ。

\* 1 回の RUN (data file) には複数の trial を記録することができる(Loop B を利用)。

2. 次に各ループの開始をどのタイミングで行うのかを設定する(図10)。

通常は外部トリガー信号(TTL)を利用する。

3. 1 回のサンプリング時間の設定を行う。サンプリング周波数又は interval time の

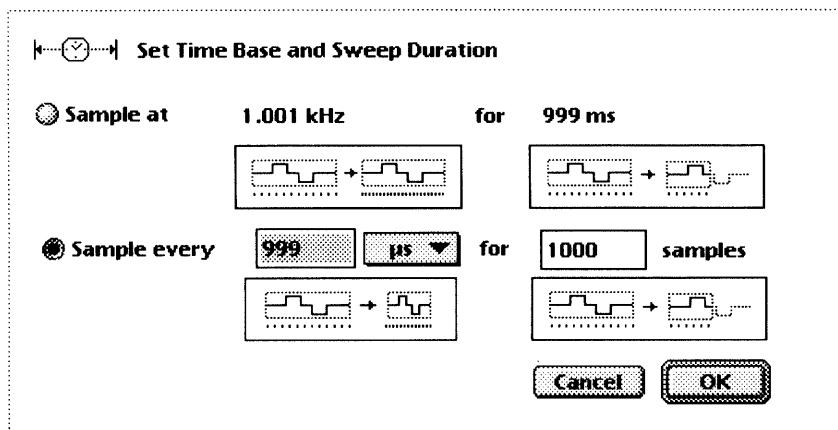


図11.

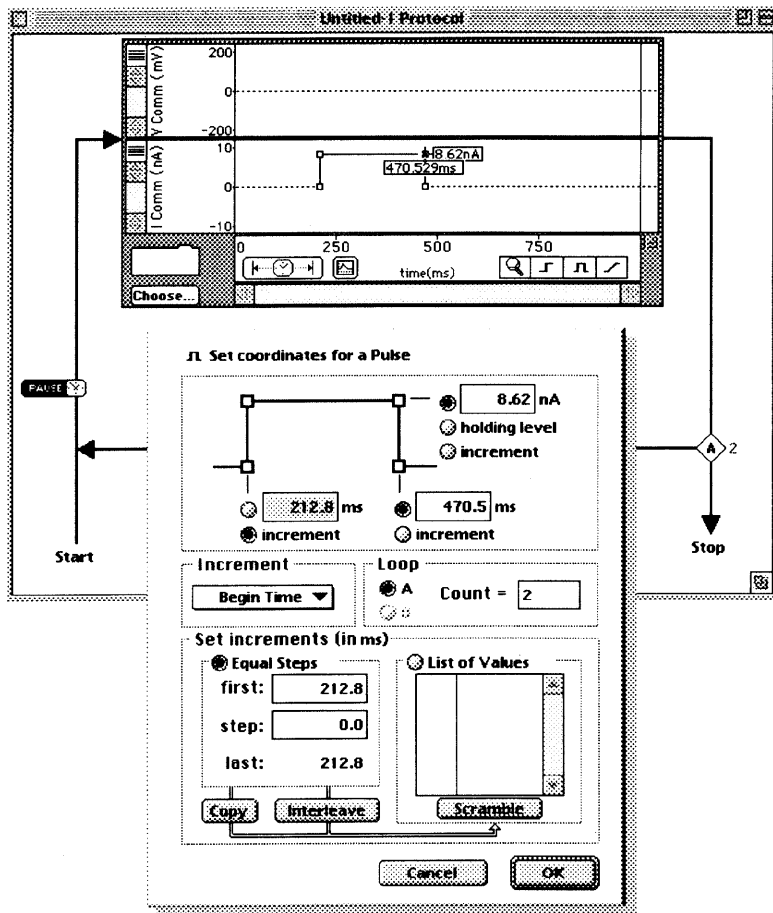


図12.

どちらでも設定可能である。全体のサンプリング時間はサンプリング周波数とサンプル数で決まり、AxoData のアプリケーションメモリー割り当てが少ないとサンプリングが制限されることがある(図11)。

4. AxoData から刺激を与える場合は、刺激パルスの設定を行う。だいたいの設定をマウスで行った後、パルスをダブルクリックして詳細設定画面を呼び出し、数値で正確なパルスプロトコルを設定する(図12)。

\* シナプス電位の記録など、AxoData からの出力が不要で単にサンプリングするだけの

プロトコルでは、この項目の設定は不要。

5. 設定が終わったら適当な名前を付けて保存しておく。

実験条件に合わせた複数のプロトコルを作っておいて、その都度切り替えながらサンプリングできる。また、実験条件に合わせて、その場で既存のプロトコルを修正しながらサンプリングする事もできるので、比較的柔軟に利用できる。

[設定の確認]

- LabBench, プロトコルの設定が終わったら、実際に実験機器を接続し cell model を利用して設定条件の確認, 各 ADC の

offset の調節を行いキャリブレーションを取る。

#### 4) AxoGraph によるデータの解析

○AxoGraph の基本操作：AxoGraph は基本として次の3種類のファイルを扱うことができる。1) AxoData のデータファイル(「AxoData」や MacLab 等のチャートファイル(「chart」), 2) AxoGraph のテキストエディタのファイル(計測結果の値などが表示される), 3) AxoGraph の波形データ(AxoDataの波形を元に編集・解析したものを AxoGraph の波形データとして保存したもの)。

それぞれはファイルを開くときにファイルメニューより以下のように区別される。AxoData 等のファイル：[open digitized...], AxoGraph での計測結果(テキストファイル)：[open text...], 編集しAxoGraph で保存し直した波形データ：[open...].

以下によく使う機能を紹介する。

#### ○Display options

[チャンネル/トレースの表示・非表示]：各チャンネル/トレースごとに表示・非表示が可能なので必要なチャンネル/トレースのみ表示する。

[チャンネル/トレース表示の方法]：各チャンネル/トレースをタイル状に(Tile), 積み重ねて(Pile), ずらしながら(Offset)表示できる。

[チャンネル/トレースのグループ化]：指定したチャンネル/トレースを一つのグループとして扱える。

[表示領域の設定]：各チャンネルごとにX軸の表示領域, 全チャンネル共通でY軸(時間)の表示領域を自由に設定できるので, 必要な部分を必要な大きさで表示する。

[Baseline subtraction]：全表示チャンネルを対象に, 任意に指定した領域をベースラインと仮定し baseline subtraction ができる(Revert to save を用いると元に戻すことができる)。

[表示オプション]：各波形トレースの色, 線の太さ, サンプリングポイントのマークの形などを設定できる。

○解析メニュー：ここではよく使うであろう解析メニューを紹介する。解析結果や計測値は, AxoGraph text ウィンドウ(予め開いておく)に自動的にテキストデータとしてペーストされる。

[Peak detection]：自動的に波形の最大/最小を検出する。

[Digital filter]：表示トレースに指定したバンド幅のフィルターを掛ける。

[Mouse/Cursors measurements]：マウスで指定したポイント/領域(区間の平均値など)の計測。

[Amplitude histogram]：データの値を元に指定した bin でヒストグラム表示を行う。

[Power spectrum]：波形データを元に FFT を掛け, 指定したセグメントごとの power spectrum の平均値を表示する。

[Curve fit]：指定した区間を元に curve fitting をおこなう(fitting function を自分で設定することも可能)。

○プログラムメニュー：AxoGraph ではC言語や Pascal などで解析モジュールを自作し, AxoGraph から呼び出して使うことができる。AxoGraph には既にいくつかのモジュールが付属しており, それらを使って複数のデータファイルのトレースを新たな別の一つのファイルにまとめたりできる。

#### 5) SigmaPlot を使ったグラフ作成

SigmaPlot は表計算シート上の数値データを元にグラフを作るソフトで, 1つの書類の中に複数の違ったグラフを作成でき, グラフのみからなる図の場合, このソフトだけで最終的な図まで作ることができる(Windows 版もある)。

以下にデジタルデータを SigmaPlot に取り込み, グラフを作成する手順を説明する。

[AxoGraph から SigmaPlot へ]

- AxoGraph で計測した数値データ(AxoGraph のテキストウィンドウに表示される)は, そのまま copy & paste で, 又は一旦テキストデータとしてファイル保存した後で SigmaPlot

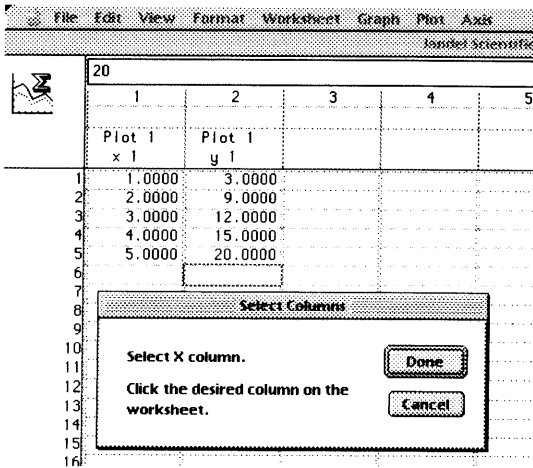


図13.

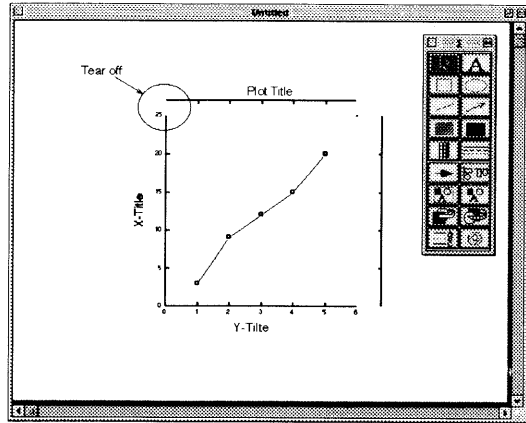


図14.

のワークシートにテキストデータインポートの形で取り込むことができる。取り込んだ数値データは1行ごとに一つの変数として扱われる。従って、例えば電圧-電流曲線の場合、1行目に電流量、2行目にそれに対応する膜電位変化量が入力される。後は、グラフ作成コマンドに従ってX軸の行、Y軸の行をそれぞれマウスで指定するだけで基本的なグラフを自動的に生成する。また作成されたグラフは、各軸の位置、軸のタイトルやシンボルマー

クの形、線の太さ、表示領域など細かに編集することができる(図13, 14)。

更に Curve fitting モジュールを持っているので、フィットさせたい曲線の式を入力し、計測データから最小二乗法による曲線の係数を割り出すこともできる(図15)。

一般の表計算ソフトほどではないが、行単位での定型計算(計算式はユーザーが自由に設定できる)も行えるので、2データ間の差をグラフにしたりと言った作業も比較的簡単にこな

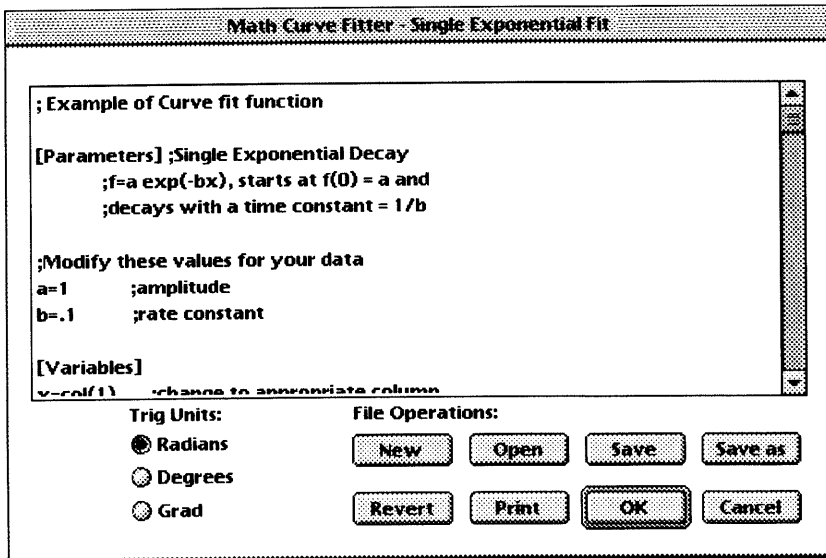


図15.

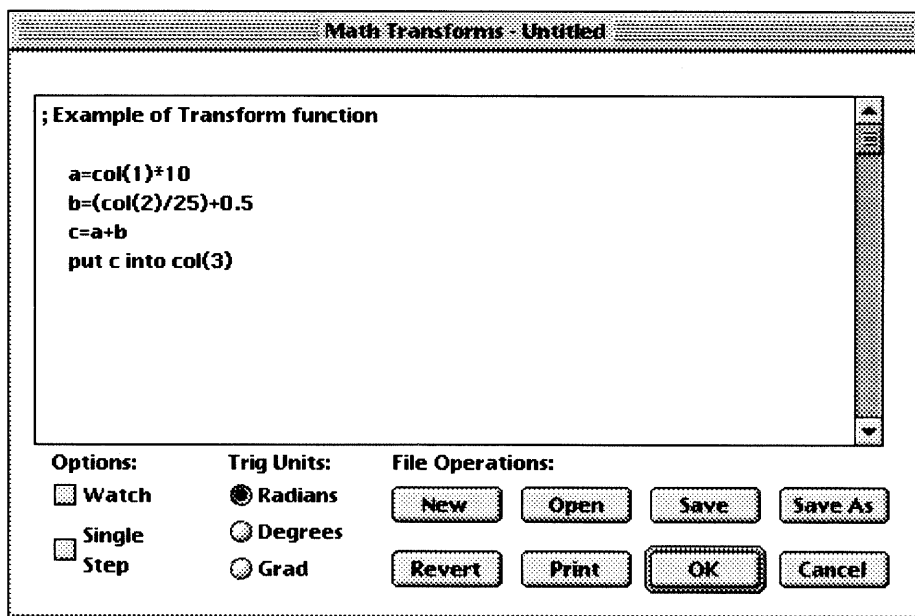


図16.

る(図16).

グラフができたらまず、ファイルとして保存し、それから必要に応じてプリントアウトする。ファイル保存をしておくと、プリント中にエラーが発生して Mac のシステムを再起動するハメになっても泣かずにすむ。また、他の図などと合わせて一つの図にしたい場合は、一旦グラフを高解像度 PICT で export した後、CANVAS などのレイアウトができるソフトで読み込み編集する。

#### 6) チャート紙に記録されたデータのデジタル化

一旦チャート紙に記録されたデータは、残念ながら数値データにコンバートすることは容易ではない。しかし、論文の図などに使用する目的であれば、数値データ化せずともスキャナを利用して bitmap 画像としてデジタル化すると、レイアウトなどの作業が簡単に行える。

[チャート紙からのスキャンニング]

#### ○大原則 ○

1. 解像度をあげてスキャンすれば細部の再現性はよいがファイルサイズが大きくなりすぎて、その後の作業効率が著しく損なわ

れる(場合によってはソフトが動かないこともある)。必要最小限の解像度を用いる。

2. グレースケールでスキャンするとモニター上での細部の再現性はよいが、レーザープリンタで出力するときは白/黒の2値画像の方がきれいに出力される(ファイルサイズも小さい)。

スキャンする時のポイントとなるのは画像の解像度と、多くのチャート紙に印刷されているグリッドである。解像度はチャート上の波形のサイズと最終的な図の中での大きさによって決まってくるが、経験上から割り出した概算式は

$$\begin{aligned} & \text{[スキャン解像度]} \\ & \times \text{[最終的な図での縮小/拡大率]} \\ & = \text{[出力機器の解像度]} \end{aligned}$$

となる。

例えば、画像をレイアウト上で1/4に縮小し、最終的に400 dpiのプリンタで出力する場合のスキャン時の解像度は、 $400 / (1/4)$  即ち 100 dpi 程度あればいいことになる。しかしながら、原図に非常に細い線が含まれており、それを残したい場合、100 dpi では細部がつぶれてしまっ

て、うまくスキャンできないことがある。こう言った場合、予め 400 dpi ぐらいでスキャンしておいて後から画像ソフト (Photoshop など) で解像度を落とす方が細部の再現性がよいので、目的に応じて適当な方法を選ぶ。チャート紙上に印刷されたグリッドの消去には大きく分けて 2 通りある。スキャナがドロップアウトカラー (その色を取り込まない) をサポートしている場合 (EPSON の GT シリーズなど)、グリッドの色 (例えば赤) をドロップアウトカラーに指定すると、赤い色を取り込まない (若しくは非常に薄くなる)。サポートしていない場合は、一旦カラー (256 色程度でよい) で取り込んだ後、Photoshop で赤のプレーン (R チャンネル) のみ残し、後の青と緑 (B, G チャンネル) を削除すると同じ様な効果が得られる。いずれの場合も、次の処理としてコントラストなどを調節し、波形のみが黒くなるように仕上げる (どうしても背景との識別が難しい場合は消しゴムツールで手作業で丹念にいらぬところを消す)。この時、後でキャリブレーションがわかるように、じゃまにならない部分のグリッドの一部を残しておくレイアウトをすときに楽である。

作業が終わったら、TIFF (LZW 圧縮は使わない) または PICT フォーマットで保存する。図中の文字やキャリブレーションバーなどはレイアウト時に (例えば CANVAS を用いて) ドローオブジェクトとして入れ直すので、場所や長さなどがわかる程度の荒さでよい。

#### 7) CANVAS でのレイアウト作業

[AxoGraph の波形データから CANVAS へ] : CANVAS での読み込み可能な画像データのフォーマットは PICT, TIFF, EPS などがあるが、AxoGraph の波形データの取り込みにはクリップボードを介した copy & paste でデータを持ってくるのが最も簡単で画質がよい。手順としては、

1. 予め CANVAS の新しい書類 (既にある書類に追加するときはその書類) を開いておく。メモリ不足で一度に両方開けないと

きは、一旦 AxoGraph でデータをコピーした後、AxoGraph を終了し、新たに CANVAS を開く。

2. AxoGraph で編集したい波形の X 軸・Y 軸表示範囲を整えてから、データをクリップボードへコピーする (通常のコピー操作)。
3. CANVAS に切り替えペーストする。この時、AxoGraph の設定によっては 4 倍の大きさでペーストされる (この方が印刷時の画質がきれい) ので、そのまますぐに (ペースト画像のみが選択状態にあるままで) グルーピングを行う。
4. グルーピングした状態でペーストした波形データを 1/4 にリサイズする (必要ならもっと小さくてもよい)。グルーピングし忘れると画像の構成要素 (軸や波形など) が、バラバラな位置でリサイズされ、後のレイアウト作業が面倒なので、もし間違ったら、すぐに作業の取り消し (undo : command + Z キー) を行い、グルーピングを行ってからやり直す。
5. 適当なサイズになったら、再びグルーピングを解除すると波形データ、X 軸、Y 軸、コメントなどがそれぞれ編集可能になるので、適宜必要に応じて編集する。
6. 波形データをリサイズする時はキャリブレーションを失わないように注意する。このためには、キャリブレーションバーを波形と一緒にグルーピングしておき、必ず一緒にリサイズされるように心がける。

\*ある程度編集を行ったら必ずファイルを保存しておく、不慮のシステムフリーズに見舞われたとき被害が小さくてすむ。

[スキャン画像から CANVAS へ] : 予め必要な部分のみに整理した画像を画像ソフト (Photoshop など) で作り、TIFF 又は PICT フォーマットで保存しておく。この時点では、取り込んだ画像内にキャリブレーションがわかるような部

分を残しておく。

1. 既にある CANVAS の書類に追加する場合は place コマンド、新たな書類として作るときは通常の open コマンドで画像データを開く。
2. 画像データ内のキャリブレーション情報を参考に、CANVAS の四角ツール(又は太い直線ツール)を用いて新しくキャリブレーションバーを作る(こちらの方が印刷時にきれいに印刷できる)。
3. 同様に画像データ内の文字(bitmap)を、CANVAS の文字(text)で置き換える。
4. CANVAS 上のスキャン画像データから、CANVAS で作りなおした部分(キャリブレーションバーなど)を消し去り、書類を CANVAS のフォーマットで保存する。
5. 画像データ及びそれに付随するテキストなどその配列が乱れては困るものは、ひとまとめにしてグループ化しておく。

[SigmaPlot のグラフから CANVAS へ]：予め SigmaPlot でグラフを完成させておく。グラフのみの図の場合は CANVAS で編集を加えなくとも SigmaPlot 上で作業は終わる。他の図形などと組み合わせた図を作成する場合は、予め SigmaPlot で必要なグラフを作り上げておき、SigmaPlot の export コマンドを用いてデータ(グラフ)を高解像度 PICT で保存しておく(前述)。

1. CANVAS で高解像度 PICT で保存したグラフデータを開き、X、Y軸の位置・軸のタイトル・シンボルマークの説明など必要な編集を加える。
2. 他の組み合わせるデータを同一書類内に

持ってきてレイアウトを行い仕上げる。(鶴崎)

## 最 後 に

デジタルデータは何度切り貼りしてもその劣化がないことが特徴ですが、データの量と使用するコンピュータの能力によっては、高品質の出力を得るには時間がかかりすぎるといったデメリットがあります。また、スキャン画像は拡大・縮小を行うと必ず画質の低下を伴う(後で、ある程度のデジタル的な補修は可能ですが・・・)ので、それを考えた上で最初のスキャンサイズを決めなければならないなど、デジタルなりのノウハウがあります。今回はそう言ったものの一部をまとめてみました。

Mac のソフトはどれもその操作性が似ているため、ソフトの操作自体を修得するのは簡単だと言われていますが、それでもやはりそれなりに使うためには、ある程度の時間が必要となります。これは Windows にしても同じです。従って、なるべく暇をみてはこういった編集作業を行って、操作手順やどうすればより少ない行程でより高品質の結果が得られるか、自分なりに試行錯誤してみる事が大事だと思います。コンピュータを使ってデータを処理し図を作ることのメリットの一つは時間をかけずに解析・編集できることです。極論すれば如何に(作業行程で)手抜きができるか!であるわけですから、従来のアナログ作業でそういった技術を習得するのに必要だった程度には、やはり時間と慣れが必要であることを忘れないで頂けると幸いです。

## 第76回北海道医学大会生理系分科会

日 時：平成9年9月13日(土) 9:30~15:30

会 場：ムトウビル講堂

当番幹事：北海道医療大学歯学部口腔生理学講座 猪股孝四郎

北海道の生理学会地方会は、北海道医学大会の分科会の一つとして毎年開催されています。しかし、これに参加される方は医学関係者だけでなく、理学部、獣医学部、教育学部等に所属される生理学の研究者です。従って、その研究内容も多岐にわたり、質問も思わぬ視点からのものもありました。今年度は幸いにも演題数が例年より少なく、一演題につき15分間をとることができました。そのために、活発な討論もできたように思っています。御参加くださった方々に感謝致します。  
(猪股 記)

×は臨時会員を示す

### 1. 体内時計の同調と強制運動スケジュール

宮崎俊彦, ×橋本聡子, 本間さと, 本間研一(北大, 第一生理)

運動により覚醒レベルをあげた強制睡眠覚醒スケジュールに体内時計が同調するかどうかを検討した。健康成人6名を15日間隔離実験室に滞在させた。睡眠起床時刻を指示することにより1日を23時間40分周期で生活をさせた。毎日、起床後3時間と7時間に2時間ずつ運動(心拍数140拍/分の強度で、15分間15分間隔で4回)を負荷した。メラトニンは1, 8, 14日目に留置カテーテル法を用い、RIAで測定した。照度はメラトニン分泌を抑制しない50lx以下とした。睡眠を許される時間帯は14日目には4時間前進させる結果となった。メラトニンリズムは6名中5名が0~1.5時間の位相前進、1名が5時間と位相後退を示した。運動を用いない睡眠覚醒スケジュールはすべて位相後退を示した。したがって、本実験の結果は運動が睡眠覚醒スケジュールの弱い同調作用を強化することを示している。本実験で行った程度の運動は血中メラトニンレベルには影響しないことが知られているので、同調強化はメラトニンを介した作用ではないと考えられる。昼間の覚醒レベルの上昇が睡眠覚醒リズムの振動力を高め、サーカディアンリズムに対する作用を強化したと思われる。

### 2. ラット視交叉上核培養神経細胞の電気活動リズム：マルチ電極ディッシュを用いた解析

×白川哲夫, ×小口春久, 本間さと\*, 勝野由美子\*, 本間研一\*(北大, 歯, 小児歯科・\*医, 第一生理)

ラット視交叉上核(SCN)分散培養系では、主要神経ペプチドであるバゾプレッシン(AVP)と Vasoactive

Intestinal Peptide (VIP)が同期したサーカディアンリズムを示し、培地条件がリズム同期に影響する。今回我々は、マルチ電極ディッシュ(MED)を用い、同一神経細胞から4日~2ヶ月に渡り発火頻度を連続測定し、個々の神経活動リズムの周期、リズム同期の有無を検討した。

生後2~3日の仔ラットのSCN細胞を単離し、 $10^5$  cells/30 mm<sup>2</sup>をMED上で培養した。1 mm<sup>2</sup>に64ある電極の内、4チャンネルより同時記録を行い、10秒毎の発火頻度を連続的に計測し、リズム解析を行った。

これまでに計測した53のSCN神経中46個で、サーカディアンリズムの発現がみられた。同一ディッシュ内の4神経の電気活動リズム周期は、必ずしも一致しなかった。また、異なる周期でフリーランする2神経細胞間での相互作用や、同一細胞でリズム周期がサーカディアンとサーカビディアン(約48時間)間を移行する例が観察された。AVPとVIPリズムが同期しているディッシュでは、個々の神経の電気活動リズムも同期する傾向がみられた。

以上の結果、視交叉上核の個々の神経細胞は独自のサーカディアン振動体を持ち、細胞間の同期・脱同期には、培地条件が影響すること、単一の神経が複数の電気活動リズムを表現しうることが明らかとなった。

### 3. 耳下腺および膵アミラーゼ活性維持における咀嚼の役割について

倉橋昌司, 猪股孝四郎\*(北海道医療大, 看護福祉, 生命基礎科学・\*歯, 口腔生理)

ラットにおいて、正常の耳下腺および膵外分泌機能の維持に、飼料の咀嚼に伴ういかなる刺激が重要であるかを明らかにすることを目的として、固さと水分含

量の異なる三種類の飼料の摂取による耳下腺および腭外分泌機能の変化を比較検討した。

8週令のウイスター系ラットを3群に分け、固形食、粉末食、粉末食に2倍量の水を加えた粥状食をそれぞれ2週間与え、その期間中の摂食量、摂水量および体重変化を記録した。1昼夜絶食後、ラットを屠殺し、耳下腺および腭を摘出し、湿重量およびアミラーゼ活性を測定した。

耳下腺重量は、固形食群に比較し、粉末食群および粥状食群で有意に減少したが、耳下腺アミラーゼ活性は固形食群と粉末食群の間で差はなく、粥状食群で著明に低下した。腭重量は3群の間で差はなく、腭アミラーゼ活性は固形食群と粉末食群の間で差はなく、粥状食群で有意に低下した。

ラットにおいて、正常の耳下腺および腭外分泌機能の維持に、固形食の咀嚼中に生じる持続的な乾燥刺激が重要であり、一方、固形食の味覚および咬合に伴う種々の刺激はさほど重量でないことが示唆された。

#### 4. 生体内外での血漿 $H^+$ 濃度の $PCO_2$ 依存性成分の比較

望月政司(西岡山病院, 老人呼吸研究センター)

生体内血漿の  $H^+$  濃度,  $[H^+]$ , は  $PCO_2$ -依存性成分,  $[H^+]*$ , と依存しない成分,  $\Delta[H^+]$ , から成り立っている。同一被験者でほぼ同時に動・静脈血を採取,  $[H^+]*$  を  $PCO_2$  の指数関数で近似し, 先ず,  $[H^+]$  の実測値より  $[H^+]*$  を差引き,  $\Delta[H^+]$  値を求める。次に, 静一動脈血間の  $\Delta[H^+]$  較差,  $(\Delta[H^+]_v - \Delta[H^+]_a)$ , の  $PCO_2$  較差,  $(PvCO_2 - PaCO_2)$ , に対する分布の回帰線が, 横軸と合致した時,  $\Delta[H^+]$  は  $PCO_2$  に無関係となり,  $[H^+]*$  の式は正しくなると考え,  $[H^+]*$ -関数の指数, 及び, 係数を求めた。精確な  $[H^+]*$  は次式で近似された。

$$[H^+]* = 5.15 \cdot PCO_2^{0.545}, \quad (\text{neq/liter}). \quad (1)$$

(1)式の  $[H^+]*$  を Henderson 式に代入し, それに対応する  $[HCO_3^-]*$  を求め, 更に,  $\Delta[H^+]$  が  $\pm 1$  neq/liter の範囲内にあるデータを選び, 同時に求めた SID ( $[Na^+] + [K^+] - [Cl^-]$ ) から  $[HCO_3^-]*$  を差引き, Anion Gap (AG) を算出した。  $[HCO_3^-]$  の実測値, AG 共に  $[H^+]*$  に対し直線的な分布を示した。その回帰線上の値を夫々  $\overline{[HCO_3^-]}$ ,  $\overline{AG}$  とすると, それらの値の間には, 次の関係式が見られた。

$$[H^+]* \cdot \overline{AG} / \overline{[HCO_3^-]} = K_{eff}. \quad (2)$$

$K_{eff}$  の値は, 30-60 Torr の  $PCO_2$  の範囲では一定で,

約 22 neq/liter となった。この結果, (1)式の  $[H^+]*$  が,  $PCO_2$ -依存性成分として妥当であることが示唆された。

#### 5. 昆虫気流感覚器のスケーリングとエネルギー感度について

下澤植夫, ×熊谷恒子, ×馬場欣哉(北大電子研)

レーザドプラ速度計と雑音相関法を用いて, 較正された気流速度刺激のもとで, コオロギの気流感覚毛の角変位の大きさと位相を, 広い周波数帯域で計った。毛の運動の実測値と気流が毛を引き倒す粘性力の流体力学的理論値を運動方程式へ代入し, 感覚毛の機械パラメータを最小自乗法で逆算した。

感覚毛の慣性モーメント, 毛を支えるパネの強さ, 毛の基部の摩擦抵抗は, それぞれ感覚毛の長さの4.3, 1.5, 2.8乗に従っていた。Torichogen および Tor-mogen 細胞による構造的スケーリングが, 最適周波数が長さの-1乗, 感度が0.5乗で変わる機能的フィルタレイを実現していることがわかった。

基部の摩擦抵抗は予想外に大きく, 気流と毛の間の流体力学的 Impedance とも整合しており, 感覚細胞による機械的エネルギーの吸収を思わせた。以前測定した感覚閾値流速を用いて閾値エネルギーを見積もると,  $10^{-20}$  [J] 近くであった。これは可視光フォトンのおよそ1/100であり, 分子1個の常温における運動エネルギー  $3kT/2$  に近い。

コオロギ気流感覚毛の機械受容細胞は, フォトン1個で動作する視細胞の100倍も高いエネルギー感度を持つが, 同時に大きな熱雑音にさらされながら動作している事が分かった。

#### 6. 骨格筋の興奮-収縮連関を修飾する2, 3の薬物の作用

高氏 昌, 筒浦理正(札幌医大・第一生理)

骨格筋における興奮-収縮連関過程, すなわち, T管膜から筋小胞体(SR)への情報伝達過程は, 諸種の要因, たとえば, 薬物の作用, 溶液のイオン環境の変化, あるいは筋疲労などにより影響されることはよく知られている。最近, T管膜および筋小胞体膜には, DHP 結合タンパク質およびリアノジン結合タンパク質がそれぞれ存在することが見出され, さらに, これらのタンパク質の化学的性質や, 興奮-収縮連関における役割などに関し, 多くの情報が得られている。しかし, T管からSRへの情報伝達の仕組みの詳細につ

いては、なお未解決の問題が残されている。

今回、われわれは、カエルの単一速筋線維を用い、その各種収縮（単収縮、ならびに、2相生カリウム拘縮の第1相および第2相）について、T管膜またはSR膜に作用するとみなされている2, 3の薬物: ryanodine, dantrolene (DAN), TMB-8 ならびに perchlorate などの作用を比較検討した。これらの薬物の作用を解析し、その作用機序に基づき、骨格筋の各種収縮の興奮-収縮連関の仕組みについて考察した。

### 7. 末梢筋収縮時の血糖吸収亢進に伴う筋交感神経活動の変化

×下野真博, ×中村孝夫, 河原剛一, ×楠 正隆\*, 原 努\*(北大電子研・\*愛知医大, 医)

我々はこれまでに、ラット座骨神経に電気刺激を加えて後肢末梢筋を20秒間強縮性収縮させたときの収縮筋糖代謝に、中枢神経系を介したフィードバック制御機構が関与していること、ならびにその制御系の遠心性経路が筋交感神経である可能性を示唆してきた。今回は後者の可能性を確かめるために、収縮肢座骨神経内筋交感神経の発射活動を、マイクロニューログラム法を用いて直接的に導出・記録した。筋交感神経活動は、その神経信号の単位時間当たりのバースト数で評価した。

その結果、血糖値が有意に低下する刺激終了直後に、筋交感神経バースト頻度も有意( $p < 0.01$ )に増加(刺激開始前 $45.5 \pm 21.0$ 対刺激終了後 $54.7 \pm 22.4$  bursts/min,  $n=6$ , mean $\pm$ SD)した。このとき血行動態の変化は観られず、本実験で観られた筋交感神経活動の亢進が、血行動態以外の機能を主に制御している可能性が示唆された。すなわち同時相に観られた末梢収縮筋糖代謝の亢進に関与している可能性が強く支持された。

### 8. Noise Analysis による心室筋内向き整流特性 $K^+$ 電流の外向き成分の解析

山田陽一, 當瀬規嗣, 長島雅人, 藪 英世(札幌医大, 第一生理)

内向き整流特性  $K^+$  電流(以下  $I_{K1}$ )は心室筋において外向き電流を発生することにより静止膜電位の形成に重要な役割を果たしている。生理的イオン環境下では  $I_{K1}$  の外向き電流がホールセルモードで記録されているが、シングルチャネルレベルでは全く観察されない。従ってホールセルモードで観察される内向き整流特性は必ずしもシングルチャネルレベルで完全に説明

されているとは言えない。そこでわれわれは生理的な細胞外  $K^+$  濃度においてモルモット心室筋よりパッチクランプ法のホールセルモードで記録した  $I_{K1}$  に対し、ノイズ解析を適用して  $I_{K1}$  のシングルチャネルレベルでの特性を求め、内向き整流特性について検討した。種々の濃度の  $Ba^{2+}$  により平均電流を減少させ、その分散値との関係より、単一電流値(UA)、開確率( $P_0$ )を算出した。維持電位を変化させても  $P_0$  に明らかな変化はなかったが、UA には内向き整流特性が認められた。ホールセルモードで観察される内向き整流特性はこの UA の内向き整流特性によると考えられた。さらに近年、内向き整流特性は細胞内に存在するポリアミン、 $Mg^{2+}$  が外向き電流をブロックするためと考えられているので、ポリアミン、 $Mg^{2+}$  の UA に対する影響も検討した。

### 9. モノクロタリン誘発肺高血圧症ラットにおける肺動脈平滑筋細胞の電気生理学的検討

×村木里誌, 山田陽一, 長島雅人, 當瀬規嗣, 藪英世(札幌医大, 医, 第一生理)

近年、急性単離された肺動脈平滑筋細胞(PASMC)に関する、パッチクランプ法を用いた電気生理学的検討が行われ、その特性についての報告が散見される。今回我々は、原発性及び、二次性肺高血圧症(PH)の病態における、PASMCの電気生理学的特性の変化を検討した。PHのモデルには、モノクロタリン(MCT)誘発肺高血圧症ラットを用い、左右主肺動脈のPASMCにホールセルパッチクランプ法を適用して、その電気生理学的特性について正常肺動脈ラットとの比較を行った。両群間においては、静止膜電位に変化を認めなかった。膜電位固定実験では、PH群で0 mV以上の脱分極電位において外向き電流が有意に減少していた。そこで、PASMCの外向き電流を構成する電流として報告されている各イオンチャネルの抑制薬と、 $Ca^{2+}$  チャネルを介する nisoldipine の間接的効果を検討し、電流減少には  $K_{Ca}$  電流の減少が顕著であることが分かった。一方、 $Ca^{2+}$  電流を Ba をキャリアとして測定したところ、PH群では正常群に比較して、電流密度の著明な減少を認めた。以上の知見より、PH群の平滑筋細胞では外向き、内向き電流ともに減少しており、膜伝導性が低下していることが明らかになった。

### 10. 視床下部腹内側核の電気刺激による褐色脂肪組織の血流増加と NO 合成酵素阻害剤の影響

内海 計, 大日向 浩, 岩元 純, 黒島辰汎(旭川医大, 第一生理)

視床下部腹内側核 (VMH) は熱産生器官・褐色脂肪組織 (BAT) の中枢性調節部と推定されており, 交感神経系を介して BAT 機能を制御すると考えられている。VMH の電気刺激は BAT 交感神経活動を亢進させ, BAT の熱産生および血流増加を引き起こすことが示されている。本研究は, VMH 刺激による BAT の血流増加に血管弛緩因子の一酸化窒素 (NO) が関与する可能性を検討した。

体重 300~350 g の雄の Wistar 系ラットを用いた。ウレタン麻酔後, BAT 直上にレーザー Doppler プローブとサーミスタープローブを留置し, BAT の血流量と温度を連続的に測定した。大腿静脈に挿入したカニューレより NO 合成酵素阻害剤である  $N^G$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) を投与した。

VMH の電気刺激 (100  $\mu$ A, 50 Hz, 30 sec) は, BAT 血流量を basal レベルの約 3 倍に増加させ, その温度を約 0.7°C 上昇させた。この BAT の血流増加と温度上昇は, L-NAME の投与によりほぼ消失した。以上の結果は, VMH 刺激による BAT 血流量の増加が, NO による血管拡張によって生ずることを示唆する。

### 11. ドコサヘキサエン酸の食餌性欠乏と非ふるえ熱産生

Saha Shyamal Kumar, 大日向 浩, 大野都美恵\*, 黒島辰汎(旭川医大, 第一生理, \*北海道教育大旭川校家庭科)

すでに我々は非ふるえ熱産生の主要な効果器・褐色脂肪組織 (BAT) の機能調節に膜リン脂質の n-3 多不飽和脂肪酸・ドコサヘキサエン酸 (DHA) が関与していることを報告した (Ohno et al., Jpn. J. Physiol. 46: 265-270, 1996)。本実験では, さらに DHA の BAT における意義を知るために, 慢性的に DHA 欠乏食を与えると非ふるえ熱産生にどのような影響をもたらすかについて検討した。Wistar 系オスラットに DHA 欠乏食を 4 週間食べさせた DHA 欠乏食群と DHA を補給した対照群の両群では, 安静時代謝には有意差が見られなかった。ノルアドレナリンを腹腔内注射した際の酸素消費量 (非ふるえ熱産生の指標) は両群ともに増加したが, その増加の程度は DHA 欠乏食群で有意に低かった。この結果は, DHA が BAT における非

ふるえ熱産生の促進的調節に関与していることを示唆する。また DHA 欠乏は BAT 重量および DNA 量には影響しなかった。一方, ノルアドレナリン刺激時の BAT の in vitro 酸素消費量には両群で有意差がみられなかった。今回 in vitro の結果では明らかでなかったが, 以上の結果は DHA が非ふるえ熱産生に関与していることを示唆する。

### 12. 脚橋被蓋核刺激による筋活動の抑制と $\alpha$ 運動細胞の興奮性変化

×幅口竜也, 高草木薫, 坂本尚志(旭川医大, 第二生理)

反射直立姿勢を維持する除脳ネコの脚橋被蓋核 (Pedunculo-pontine Tegmental Nucleus; PPN) には連続微小電気刺激 (10-60  $\mu$ A, 50 Hz, 5-10 s) を加えると後肢の筋活動を抑制する部位が存在する。本研究では, 筋活動抑制時における後肢筋  $\alpha$  運動細胞の興奮性変化を解析し, さらにこの抑制が橋網様体のコリン受容性細胞から始まる筋活動抑制系を介するか否かを検討した。

PPN に連続微小電気刺激を加えると後肢伸筋  $\alpha$  運動細胞の自発発射は停止し, 膜電位は過分極側に移行した。また屈筋  $\alpha$  運動細胞の膜電位も過分極側に移行した。末梢神経刺激による順行性スパイクの発射は抑制され, 逆光性スパイクの振幅は減少し, IS-SD delay, IS-SD block が認められた。さらに入力膜抵抗も減少した。またこの部位への train shock 刺激 (3 pulses, 5 ms-interval, 30-50  $\mu$ A) は peak latency が約 50 ms の IPSP を誘発した。次に橋網様体に Atropine sulfate を注入すると, PPN 刺激によるこれらの抑制効果は消失した。

これらの成績は, PPN 刺激による筋活動の減弱及び消失時には  $\alpha$  運動細胞にシナプス後抑制が作用していることを示唆する。また PPN 刺激による筋活動の抑制は, 橋網様体から下行するコリン受容性の筋活動抑制系を駆動したものと考えられる。

### 13. 基底核から脚橋被蓋核への GABA 作動性投射による筋緊張と歩行の制御

高草木 薫, ×幅口竜也, ×長岡泰司(旭川医大, 第二生理)

除脳ネコの脚橋被蓋核 (PPN) に連続微小電気刺激を加えると姿勢筋活動が減弱・消失する。またこの核は楔状核と共に歩行運動の発現に関与する。神経解剖学

的には、PPN から橋網様体にはコリン作動性投射が存在すること、PPN には黒質網状部から GABA 作動性入力が存在することが知られている。本研究では、PPN から橋網様体へのコリン作動性投射と基底核からこの核への GABA 作動性投射が筋緊張の制御と歩行運動の発現にどのような役割を持つかを検討した。除脳ネコにおいて、歩行運動を誘発する部位は PPN の背側部及び楔状核に、そして筋活動を抑制する部位は主に PPN の腹側部に分布していた。橋網様体に atropine を微量注入すると、PPN 刺激による筋活動の抑制効果は減弱したが、歩行運動は亢進した。また GABA<sub>A</sub> の拮抗物質である picrotoxin を PPN の背側部に注入すると歩行運動が誘発され、腹側部に注入すると筋活動の減弱・消失が観察された。これらの成績は、PPN を介して基底核から脳幹網様体への出力が歩行運動と姿勢筋活動レベルの統合制御に重要な役割を持つ事を示唆すると共に、この系の機能障害が基底核疾患における姿勢筋活動の異常や歩行運動障害の発現に関与することを推定させる。

#### 14. 前庭動眼反射と滑動性眼球運動の干渉により誘発される前庭動眼反射の適応性成分の性質・第2報

福島菊郎, ×佐藤寿和, ×セルゲイ クルキン\*, 福島順子\*\*, ×吉田直樹\*\* (北大, 医, 第二生理・\*科学技術振興事業団・\*\*北大医療短大)

前回、私どもは前庭動眼反射と滑動性眼球運動の干渉における適応機構を調べるため、基本的な眼球運動課題を訓練したニホンザルを用い、前庭回転刺激とスポット刺激を直交軸で正弦波状に与え、スポット刺激を追跡させる訓練を単一周波数で繰り返すことにより、本来出現しない前庭動眼反射が、訓練後にその課題に対応して誘発されることを報告し、応答の利得位相曲線から前庭積分器を介した応答であることを示唆した。今回はこのような適応性応答の性質を更に調べるために、回転刺激に対し 90° 位相をずらして与えたスポット刺激の追跡訓練を行わせ、結果を水平回転で垂直スポット刺激の場合と、垂直回転で水平スポット刺激の場合で比較した。訓練後、暗黒化で種々の回転周波数で調べると、両者の利得曲線は低い周波数帯域で異なり、水平回転の場合の方が利得が大きかった。更に、水平 ramp 刺激(最大加速度 660°/s<sup>2</sup>)で、垂直成分の応答潜時を調べると、本来の水平成分の潜時よりも遅れ、より複雑な経路を介することが示唆された。これらの結果をコンピューターモデルと比較すると、

前庭積分器にさらに滑動性眼球運動に関連した積分器を加えることにより、本結果は良く説明出来た。

#### 15. 滑動性眼球運動に関連したサル弓状溝後部の神経活動

田中真樹, 福島菊郎(北大, 医, 第二生理)

滑動性眼球運動の制御に弓状溝後部が関与することが最近明らかにされている。眼球運動課題を訓練したサルで弓状溝後壁を中心に単一神経細胞記録をおこない、滑動性眼球運動に関連した神経活動を調べた。

約70%の細胞は滑動性眼球運動に先行して発射した。多くの細胞では滑動性眼球運動の終了後、周辺に静止した指標を固視しているあいだにも神経活動の上昇がみられ、これらは眼球位置に対応した神経活動であると考えられた。滑動性眼球運動の方向を至適方向に180度反転させて神経活動をしらべると、約90%の細胞は至適方向と反対側に眼が動いているにもかかわらず、眼球が至適方向に加速されたときに活動した。しかし、約半数の細胞では、眼球が加速されるのにわずかに遅れて活動を変化させた。これらのことから、滑動性眼球運動に関連した神経活動は眼球位置・速度・加速度の成分を適当な割合で含有していると考えられる。さらに約30%の細胞では、指標が動きだす前に活動を徐々に増加させた。これらは指標の動く方向をランダムにしても変化せず、至適方向への指標の動きを予測して活動が上昇したものではないと考えられる。これらの持続的な活動は、固視点に対する注意あるいは要求される眼球運動の準備状態を反映していると考えられる。

#### 16. ヨーロッパモノアラガイの味覚嫌悪学習に対する生理学的・組織学的解析

×中村 浩, ×小島 哲, ×伊藤伊織, ×伊藤悦朗, ×鈴木英雄\*, 藤戸 裕\*\* (北大病理・\*早大理工・\*\*札幌医大生理)

ヨーロッパモノアラガイは嗜好性のあるショ糖と忌避性のある KCI とを組み合わせて提示することにより、ショ糖に対する咀嚼回数が減少し、嗜好性がなくなるという味覚嫌悪学習を習得する。

この学習が成立した個体においてその中枢神経系を生理学的に調べた結果、咀嚼リズム形成に関与する central pattern generator (NIM 細胞) において、その調節ニューロンである CGC 由来の IPSP が増強していることが確認された。この結果、CGC は NIM への

抑制を強くすることにより味覚嫌悪学習成立に関与していることが示唆された。

ところで唇および触角での化学受容に関与する神経分布、およびそれに続く介在神経細胞は同定されておらず、化学受容処理系の神経伝達経路については不明であった。そこでまず、唇および触角における末梢神経系の神経分布を組織学的に明らかにした。さらに蛍光色素を用いて、摘出した中枢神経系を神経束の切り口から染色した結果、染色された神経細胞は複数のクラスターを形成していることが分かった。さらに染色された細胞とこれらに投射する細胞との間には dye coupling は無く、電気シナプスに関与していないことが示唆された。

### 17. 舌下神経核および pre-Bötzing complex 内ニューロンの自発性 burst に及ぼす抑制性トランスミッターの影響

渡邊昭彦・青木 藩(札幌医大, 医, 第二生理)

新生ラット(生後1-5日)を用い、厚さ約900 $\mu$ mの延髄スライス標本を作製した。舌下神経核およびそのリズム発生源とみなされる pre-Bötzing complex 内ニューロンの自発性 burst を、ガラス微小電極を用いて細胞外同時記録した。両部位ニューロンの機能的接続様式や各種化学刺激に対する応答様式については本学会において既に報告したが、今回はリズムジェネレーターとしての基本的な性質を明らかにする目的で、自発性 burst に及ぼす抑制性トランスミッターの影響について検討した。10分間安定した記録 (burst 頻度: 4-12回/分) が得られた後、bicuculline (10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M), strychnine (10 $\mu$ M), picrotoxin (10 $\mu$ M) を灌流投与した。20分間の投与に対し、投与開始早期から burst 頻度は有意に増加し、投与中は増加した burst 頻度を維持した。また、高濃度の bicuculline 投与によっても burst が途絶することはなかった。抑制性トランスミッターは、リズム発生そのものではなく、modulator として関与していることが示唆された。

### 18. アメリカザリガニノンスパイキング介在神経の機能解剖学的解析

×彦坂 亮, 高畑雅一(北大, 病理, 生物科学)

ザリガニ・昆虫など無脊椎動物の中枢神経系では、活動電位を発生せずに働くノンスパイキング介在神経

が感覚系・運動系の両方に存在する。今回我々はこれら介在神経の機能的意義を探るため、細胞の電気緊張の構造を研究した。

神経細胞の電気緊張の構造は、樹状突起の三次元構造と受動的膜性質に規定される。不連続電流固定実験および共焦点レーザー走査型顕微鏡による定量的解析の結果、同一細胞の樹状突起における解剖学的・電気緊張的個体間変異および運動系と感覚系の細胞間での電気緊張の構造の差異が明らかになった。

この電気緊張の性質の違いがどのような機能的差異として現れうるかを、得られた結果に基づく細胞モデルを構築し、計算機シミュレーションで調べた。その結果、運動系の介在神経は感覚系のものに比べ、個々のシナプス入力を持続的な出力に変換するシナプス平滑化作用が強いことが判明した。この結果は、運動系においてノンスパイキング介在神経は、持続的な出力で運動神経の背景興奮性を調節するという、これまでの仮説を支持している。

### 19. ニホンザル大脳皮質聴覚野ニューロンの反応

鎌田 勉(北大, 歯, 口腔生理)

哺乳類大脳における音声信号の特徴抽出機構を調べるため、ニホンザルを用いて、聴皮質ニューロンの反応をみた。麻酔下で予め慢性実験のためのシリンダーを固定したのち、回復を待って、無麻酔覚醒下で白金イリジウム電極を刺入した。刺激音には鈍音、ホワイトノイズの他にニホンザルの音声を使用した。一次聴覚野を中心とする聴皮質から記録された197個のユニットの70%以上はこれらの刺激音のいずれにも反応した。鈍音に対する反応では比較的狭い周波数に反応し、特徴周波数が決められるものもあったが、広い周波数帯域に応じ、onのみならず、off反応も示すものがあった。特徴周波数の決められないものもあった。サルの音声に対しては on-phasic に応答するタイプと sustained に応答するものがあり、中間のタイプとして、強い on 反応とそれに続く sustained の成分をもつものがあった。サルの音声の内、coo音についてフォルマントを模擬した人口音を作成し、各フォルマント成分に対する反応と2つの成分を組み合わせた音に対する反応をみた。単一成分には反応するが組み合わせ音に対して反応しないもの、逆に単一成分には反応しないが組み合わせ音には反応するものがみられた。

## 第 30 回 東 北 生 理 談 話 会

日 時：平成 9 年 10 月 25 日(土)・26 日(日)

場 所：茂庭荘(仙台市)

当番幹事：東北大学歯学部口腔生理学講座 林 治 秀 刈田啓史郎

本学会は東北各県の大学が持ち回りでやっている。通常、東北大学が主催する場合は東北大学の施設を使うことが多いのであるが、本会は会員の親睦も重要な役割であると考えて、あえて仙台市郊外の施設にて、泊まり込みで行った。日程が、会場の都合で米国 Neuroscience Meeting と重なり、出席できない会員がでてしまったことは大変残念であった。なお、今回は、特別講演を入れたこともあり、全体の時間が延びないようにするため、講演 10 分討論 5 分の通常のセッションの他に、講演 5 分討論 5 分という新しい短いセッションを設けた。それにもかかわらず演題数が多く、時間に余裕がなく、十分な発表と討論を保障するという、やはりこの会の大きな目的を十分には果たせなかったことは、将来に課題を残した。また、本会はこれまで若手の会員にも座長の経験をする機会をつくっているが、これは定着してきていると思う。

(当番幹事 記)

×は臨時会員を示す

### 1. 開口度の違いが切歯咬合時の咀嚼筋活動におよぼす影響

宗形芳英(奥羽大, 歯, 口腔生理)

異なった開口度で咬合力を発揮する場合には、たとえその力が等しくとも咬合力の発生に関与する咀嚼筋群の筋活動は変化すると考えられる。本実験では切歯咬合時の咬筋、側頭筋の筋活動が開口度の違いでどのように変化するかを 8 名の有歯顎者で調べた。左側の咬筋および側頭筋(前腹)の筋電図を表面電極を用いて導出した。咬合力の記録は切歯間に介在させるブロック上に圧変換器を設置して行った。厚さ 10 mm のブロックを被験者が無理のない最大の力で咬んだ時の咬合力を測定し、その約 40% を基準の咬合力と定めた。被験者にブラウン管上の咬合力波形をモニターさせながら、基準の咬合力を 5 秒間一定に保持するように指示した。この基準の咬合力で 10, 18, 26, 34 mm の各ブロックを咬んだ時の両筋筋電図を記録した。その結果、多くの例において、開口度の増加にともなった咬筋活動の減少と側頭筋活動の増加が観察された。さらに、咬筋活動の減少が著しい例ほど、側頭筋活動が著明に増加する傾向が認められた。次に、咬筋筋力の下顎骨への作用方向を、咬合力が発揮される際の筋の硬さの変化から推測し、上記の結果と比較した。その結果、開口度の違いで筋活動が大きく変化する例ほど、咬筋筋力の作用方向がより前方を向くことが判明した。

### 2. Serotonin で引き起こされる脳血管収縮に対する tyrosine kinase inhibitor の抑制作用

×渡辺美喜雄, ×土肥 守\*, ×立木 光\*, 佐々木和彦, ×小川 彰\*(岩手医大, 医, 第 1 生理\*・脳神経外科)

摘出牛中大脳動脈の ring 状標本を Tyrode 液で灌流下、serotonin (5 HT) を投与すると等尺性収縮応答が記録される。この応答は、tyrosine kinase inhibitor の genistein や tyrphostin を前投与すると濃度依存性に抑制された。一方、high K<sup>+</sup> 溶液や caffeine で引き起こされる応答は殆ど抑えられなかった。さらに、phosphotyrosine phosphatase inhibitor の pervanadate を前投与すると上記 5 HT 応答は著しく増大した。以上のことから 5 HT で引き起こされる収縮は tyrosine kinase によるリン酸化の結果増強作用を受けている事が示唆された。

### 3. ヒト巨核球系細胞 (Meg-01) の分化と血小板特異受容体 (P2x-R) の出現

河 和善(東北大, 医, 生体情報学)

これまで、実験動物(マウス, ラット, モルモット)の巨核球を用いて、その細胞膜に ADP (adenosine diphosphate) に対する血小板特異受容体 (P2x-R) が発現している事を明らかにしてきた(J. Physiol. 495, 339-352, 1996)。本研究では、ヒトの血小板系細胞におけるこの受容体の動態を解明するため、白血病患者から樹立された、巨核球系 cell line (Meg-01) を用いた。40

mM ADP を Meg-01 細胞に Y-チューブより投与し、この時誘発される whole-cell の電流を patch 電極にて調べた。培地(10%FCS 添加の RPMI 1640)に PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate; 10 nM) を加えて Meg-01 細胞を分化させた場合は対照の場合に比べて約2倍の内向き電流が誘発され、TPO(thrombopoietin; 100 ng/ml)で分化を誘導した場合は約3倍の内向き電流が誘発された。両者を同時添加すると約6倍の電流振幅になった。ヒトにおいても、巨核球の分化・成熟に伴いこれらの受容体が発現し、血小板に組み込まれると考えられる。

#### 4. 排尿中枢パーリントン核のニューロン活動

×小山純正, 香山雪彦(福島医大, 第二生理)

排尿反射の中枢と言われているパーリントン核は、ノルアドレナリン作動性投射系の起始核である青斑核とアセチルコリン作動性投射系の起始核である外背側被蓋核の両核に接して、橋中心灰白質の底部に位置している。私たちは、夜間の膀胱充満が夜尿を起こさなくてすむのはノルアドレナリン、アセチルコリン投射系を興奮させて覚醒レベルを上げていることも関係していることを、これらの起始ニューロンの活動をウレタン麻酔下のラットで膀胱内圧を操作しながら記録することで示してきた。その研究の中で私たちは、現在まで報告の非常に少ないパーリントン核ニューロンと考えられる単一ニューロン活動も記録することができたので、それについて報告する。このニューロンは、ノルアドレナリン、アセチルコリンニューロンと違って幅の狭いスパイクを発する。膀胱が空の時は自発発火はなく、膀胱内圧を上げるとその圧に応じた持続性発火を起こす。膀胱内圧を少しだけ上げた状態に保つと発火頻度は変動して時々集中的に発火し、その発火開始から数秒(3~10秒)遅れて一過性の膀胱収縮がみられる。このような特性とそのニューロンの位置から、これらはパーリントン核のニューロンと考えて間違いないと考えられる。

#### 5. Caged IP3 を用いたマウス卵細胞質内カルシウム制御機構の検討

×高橋俊文, 高橋英嗣\*, 土居勝彦\*, ×廣井正彦(山形大, 医, 産婦人科・\*第一生理)

これまで我々は、マウス卵において受精時に見られる細胞内  $Ca^{+2}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の周期的変動 ( $Ca^{2+}$  oscillation) が卵の加齢と共に変化し、さらに Caged

$Ca^{2+}$  (Ni tr-5)を用いた解析より、加齢に伴う小胞体の  $Ca^{2+}$  再取り込み能の低下がその主要因であることを報告してきた(Molecular Reproduction & Development, in press). 哺乳動物卵細胞における  $Ca^{2+}$  oscillation は、小胞体膜上にある IP3 レセプターを介した  $Ca^{2+}$  放出経路が重要であることが知られている。そこで今回、小胞体の  $Ca^{2+}$  放出能と卵の加齢について検討を行った。紫外光照射により任意のタイミングで瞬時に IP3 を放出可能な Caged IP3 (Calbiochem) 0.5 mM を  $Ca^{2+}$  蛍光指示薬である Fluo-3(Dojindo) 1.5 mM と共に細胞内に微量(3~6 pM) 注入した。紫外光照射 後急激な Fluo-3 蛍光の上昇が見られ、その後数分以内に反応前値まで減少した。現在 Caged IP3 光解除後の Fluo-3 蛍光上昇速度から、卵の加齢と小胞体における細胞内カルシウム制御の関係を検討中である。

#### 6. コバルト投与による oxygen sensing 機構誘導の心筋虚血耐性に及ぼす影響

遠藤洋志, 徐 哲龍, 石幡 明, 高橋英嗣, 土居勝彦(山形大, 医, 第一生理)

生体が低酸素環境に暴露されると、数時間以内に様々な遺伝子の発現が誘導されることが知られている。例えば、培養心筋細胞では低酸素負荷後、解糖系酵素のひとつである pyruvate kinase や血管増殖因子である vascular endothelial growth factor などの遺伝子発現が著しく増大することが示されており、これらは細胞レベルでの虚血に対する適応反応と考えられる。そのメカニズムの詳細については不明であるが、低酸素刺激により細胞内ヘム蛋白を中心とした酸素センサー(oxygen sensing 機構)の存在が示唆されている。我々は、ラットにおいて oxygen sensing 機構を活性化することが報告されている  $CoCl_2$  の長期経口投与(5 mg/day)により、正常酸素環境下でも心筋細胞に虚血耐性を付与できるのではないかと考えた。 $CoCl_2$  投与後約6週間以内に、ヘマトクリットは対照群の  $48 \pm 1\%$  から  $56 \pm 2\%$  へ有意に増加し、oxygen sensing 機構の活性化が示唆された。現在、心臓の虚血再灌流モデルを用い、oxygen sensing 機構活性化と虚血後の心機能回復の関係を検討中である。

### 7. Bay K 8644 によるラット子宮筋培養細胞内カルシウム動態変化に及ぼすペオニフロリンおよびグリチルリチン塩の影響

吉崎克明, 福原紅子\*, ×榊引美代子, ×福島峰子\*\* (秋田大, 医短・\*秋田大, 医第2解剖・\*\*秋田東洋医学研究所)

ラット子宮筋培養細胞に Bay K 8644 (BK, 遅延性カルシウムチャネルアゴニスト) を作用させると, 作用後ゆっくりと細胞内カルシウム濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) レベルが上昇し, あるレベルに到達して一定となる. 上昇したレベルはメトキシベラパミル (D-600, 遅延性カルシウムチャネル阻害剤) の作用で元のレベルに戻る. 今回, BK (10 nM) によって惹起される現象に対するペオニフロリン (PF, 芍薬根主成分) およびグリチルリチン塩 (GLRS, 甘草根主成分) の影響を検討した. BK による  $[Ca^{2+}]_i$  レベル上昇に対して, PF (10  $\mu$ M) は BK の作用を抑制する傾向にある一方, GLRS (10  $\mu$ M) は影響しなかった. また, PF は  $PGF_{2a}$  誘発  $[Ca^{2+}]_i$  増加には影響しないが, 高カリウム濃度 (HK) 誘発  $[Ca^{2+}]_i$  増加に対して顕著な増強効果を示した. GLRS は  $PGF_{2a}$  および HK 誘発  $[Ca^{2+}]_i$  増加とともに抑制した. これらの結果から, PF は遅延性カルシウムチャネルを抑制するが, 脱分極による  $[Ca^{2+}]_i$  増加を増強する作用を持つ一方, GLRS は  $PGF_{2a}$  受容体を介した  $[Ca^{2+}]_i$  増加および脱分極による  $[Ca^{2+}]_i$  増加とともに抑制するが, 遅延性カルシウムチャネルに対しては影響を与えないと思われる.

### 8. アメフラシ神経節細胞でみられた Glutamate 投与による $K^+$ 電流応答

木村真吾, 佐々木和彦, 川崎 敏, 藤田玲子, 高島浩一郎, 松本光比古\*, 佐藤 誠 (岩手医大, 医, 第一生理・\*弘前大, 医療技術短期大学部物理)

アメフラシの口球神経節には glutamate を投与すると, 非常にゆっくりとした過分極応答を出す細胞がある. 同じ細胞で膜電位固定法下, glutamate 投与で発生した外向き電流応答の反転電位は,  $K^+$  の平衡電位付近であった. また外液  $K^+$  濃度の上昇で正方向に移行した. 300 micro M の trans-(±)-ACPD, NMDA または kainate 投与では静止膜に何ら変化はなかったが, AMPA 型受容体に対するアゴニストの quisqualate を投与すると glutamate と同様な応答が発生した. また, この quisqualate 応答は同濃度の AP-5, CNQX で抑制され, その抑制の強さは CNQX の方が

AP-5 より大きかった. さらに, この細胞に guanosine thiodiphosphate (GDP beta S) を細胞内注入しても, quisqualate 応答は全く抑制されなかった. 以上の結果から, この応答は従来から知られている AMPA 型受容体とは異なる受容体の活性化により,  $K^+$  チャネルが開いて発生することが示唆された.

### 9. 各種アミノ酸に対するマウス NMDA 受容体の反応

×坂田和実, 福島央之, ×小栗栖太郎, ×新貝御藏, 松本光比古\* (岩手大, 工, 情報・\*弘前大, 医短)

NMDA 受容体のグリシン結合部位に対する種々のアミノ酸の作用を調べた. 実験は以下の通り; マウス NMDA 受容体 epsilon 1, epsilon 2, zeta 1 サブユニット cRNA を合成し, アフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションした. 2種類のサブユニット組成 (epsilon 1+zeta 1, epsilon 2+zeta 1) の受容体を発現させた. 受容体が発現した卵母細胞の膜イオン電流を, 二電極膜電位固定法により測定した. 各アミノ酸は全て 10 mM L-グルタミン酸との混合物として投与された.

**【結果】** 基本的なアミノ酸20種類の内, 反応が得られたアミノ酸はD体及びL体のアラニン, セリン, システインであった. それらに対する Hill 係数は何れも 1.6程度であり, EC 50 は Cys>Ala>Ser の順であった. D体とL体に対する EC 50 を比較すると, いずれもD体に対する方が低かった. 以上の結果から, グリシン結合部位に結合し作用するアミノ酸には, メチル基程度の大きさまでの側鎖が有り, またL体よりもD体の方が親和性が高いことが明らかとなった. これらのデータから, グリシン結合部位に要求される構造について議論を試みる.

### 10. Type 1-Angiotensin II 受容体の2つのサブタイプ遺伝子のプロモーター

石幡 明, 片野由美\*, 土居勝彦 (山形大, 医, 第一生理・\*基礎看護)

ラット Type 1-アンジオテンシン受容体には  $AT_{1A}$  と  $AT_{1B}$  の異なる遺伝子が単離され, それぞれの組織特異的発現パターンより固有の転写機構が存在すると考えられることから,  $AT_{1B}$  遺伝子の発現調節について  $AT_{1A}$  遺伝子と比較した. ラット  $AT_{1B}$  遺伝子の 5' 上流領域は, 既知  $AT_{1B}$  遺伝子配列をもとにラット genomic DNA より PCR法 を利用して単離し解析

した。AT<sub>1A</sub> 遺伝子の 5' 上流領域(約 2.9Kb)および AT<sub>1B</sub> 遺伝子の 5' 上流領域(約 1.3Kb)をそれぞれホタルシフェラーゼリポーター遺伝子上流に挿入し、血管平滑筋細胞、Y-1 細胞にトランスフェクションし、プロモーター活性を発光法により測定した。得られた AT<sub>1B</sub> 受容体遺伝子 5' 上流領域には TATAbox (TATAAA), GCbox (TAGGCGGAGC); SP1 結合配列(CGCCCC), AP2 結合配列(CCAGGCC)などの転写調節配列が存在した。しかし AT<sub>1B</sub> 遺伝子には、AT<sub>1A</sub> 遺伝子に見られる AP1 結合配列, steroid hormone に反応するグルココルチコイド応答配列はなく、異なる転写機構の存在が示唆された。さらに生細胞での実際の遺伝子発現調節についてグルココルチコイド、PMA 及びアンジオテンシン II に対する転写活性の制御の相違をもとに検討する。

### 11. フォルボルエステルによる伝達物質放出増強のメカニズム

八尾 寛(東北大, 医, 生体情報)

中枢および末梢神経系において、シナプス前終末からの伝達物質放出が C-キナーゼ(PKC)により増強される。しかし、PKC がどのようなメカニズムにより伝達物質放出を増強するのかわかっていない。今回、ニワトリ胚毛様体神経節巨大シナプス前終末を用いて PKC の作用機序を解析した。フォルボルエステル phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) は、興奮性シナプス電流 E PSC を増強したが、nicotine の直接投与によるアセチルコリン受容体電流を促進しなかった。PMA は、シナプス前終末における伝達物質の素量放出を増強した。しかし、PMA は活動電位にともなうシナプス前終末への Ca<sup>2+</sup> 流入を促進しなかった。細胞外 Ca<sup>2+</sup> 濃度が高いとき、PMA による伝達増強は、わずかし認められなかった。PMA は、細胞外 Ca<sup>2+</sup>-EPSC 関係を、その最大値を変えずに低濃度側へシフトした。すなわち、PKC は、活動電位にともなう Ca<sup>2+</sup> 流入、開口放出部位の数、放出部位にあるシナプス小胞の数などを変化させることなく、シナプス小胞と形質膜の融合確率の Ca<sup>2+</sup> 感受性を充進させることにより、伝達物質放出を増強するものと結論される。細胞内 Ca<sup>2+</sup> センサーまたはその近傍の分子が PKC によりリン酸化されることが示唆される。

### 12. 虚血プレコンディショニングによる心筋酸素需要・供給バランスの変化

×徐 哲龍, 遠藤洋志, 石幡 明, 高橋英嗣, 土居勝彦(山形大, 医, 第一生理)

虚血プレコンディショニング(IPC)により心筋の酸素要求と供給のバランスがどのように変化するかを、ミトコンドリア呼吸鎖末端酵素である cyt aa<sub>3</sub> の酸化還元状態から検討した。SD ラットから摘出した心臓を Langendorff 装置で定圧(85 cmH<sub>2</sub>O)灌流した。左心室にバルーンを挿入し、左心室内圧(LVP)と心拍数を測定するとともに心仕事量(RPP)を計算した。cyt aa<sub>3</sub> の酸化還元状態は 603 nm と 620 nm の二波長反射分光法で推定した。40分間の定常灌流の後、30分間の持続性虚血とそれに続く30分間の再灌流を行ったものを対照群とした。一方、IPC 群では、同様の持続性虚血-再灌流に、5分間虚血+5分間再灌流を三回先行させた。対照群に比べ、IPC 群では再灌流時の心機能が有意に改善された。持続性虚血開始とともに cyt aa<sub>3</sub> は急速に還元されたが、虚血開始時点から50%還元までに要した時間(RT50)は対照群、IPC 群でそれぞれ14.1±5.4秒(n=10)および29.8±5.7秒(n=10, p<0.001)であった。また、IPC 群で二回目の短時間虚血において、RT50 は既に28.4±7.8秒に延長しており、RT50 の延長は一回の短時間虚血によって得られたことがわかった。以上の結果は、IPCにより虚血中の心筋酸素消費量が最大約50%低下し得ることを示唆する。短時間虚血(IPC)により獲得される酸素消費量低下は、その後の酸素供給低下(虚血)に際し、酸素要求と供給のバランスを改善することで、心筋の急激な脱酸素化を遅延させ得るものと思われる。

### 13. 宇宙実験の準備—NASA-NeuroLab (NL) 計画の Rehearsal—

山崎将生, 清水強, 長岡俊二\*(福島県立医大, 第一生理・\*宇宙開発事業団)

Space Shuttle を用いて神経生理系の実験を集中的に行う NL 計画が1998年4月のシャトル打ち上げを目指して進められている。我々は「微小重力環境における大動脈神経(AN)性圧反射機構の発達」という課題でこれに参加し、準備してきた。我々の実験は哺乳動物の発達を調べる7課題を統合したチーム研究として行うが、4年以上に亘る多数の準備実験の一つとして1997年8月には実験実施場所である Kennedy Space Center で Facility Trial Run (FTR) と称するリハーサ

ルを行った。FTR の目的はシャトル打ち上げ前と帰還後の実験を実際に行い、施設、機器等の適合性を確認することにある。我々は8日齢ラット8匹と母ラット1匹とを1組とする12組のラットを16日間宇宙で育て、その中の2組で帰還直後と30日後とに圧反射テストと組織検索を行う。そのためのポリグラフ3セット他全200点にのぼる物品を輸送し、NASAの現地調達品も含めた全ての使用機器の作動状態を確めた。また、動物の全組織は共同研究チーム内で共有するので、その実施方法を確かめ訓練した。宇宙実験の実施には本実験と寸分たがわぬ、かつ、大がかりな予備実験が必要である。

#### 14. 動物実験にかかわる情報公開問題

片平清昭\*, 清水 強\*\*\* (1福島医大, \*実験動物・\*\*第一生理)

1994年以来、JAVA 会員と称する者から福島県情報公開条例に基づいて福島県立医科大学(本学という。)における動物実験に関する公文書の開示請求がなされてきた。(1) 申請者は、1994年に福島県に対して「犬抑留等の管理業務委託契約書」と「犬払い下げ機関に対する立ち入り復命書」の公文書開示請求を行い、県は両文書共部分開示をした。(2) 1995年7月には、本学の「実験動物研究施設年報第2号」、「実験動物購入に関する支出負担行為調書・支出命令書」、および「動物実験計画書」の開示請求があり、本学は当該公文書の開示、ないしは部分開示を行った。(3) 上記(2)の部分開示について請求者から異議申立てがなされ、情報公開審査会において審議をし、その答申を受けた知事の命により1996年9月に本学は当該公文書の追加開示をした。動物実験反対運動の新たな手段として、今後、情報公開制度の活用や法的手段による活動が予想される。我々は、動物実験の必要性について各分野の学会を中心に学問上の立場から社会一般の理解を求めるよう努力することが重要であろう。

#### 15. G-蛋白(Gi/Go)を介する受容体応答の発現に共通した細胞内酵素系による正と負の feedback 機構について

佐藤 誠(岩手医大, 医, 第一生理)

我々はかつて次の様な作業仮説をネーチュアに発表した。(1989年)『抑制性シナプス伝達の中で transmitter-receptor 反応の結果、シナプス後膜の  $K^+$ -チャンネルが開く場合の分子機構には百日咳毒素

(PTX)感受性の G-蛋白、即ち  $G_i/G_o$  の活性化が必要であり、transmitter や receptor の種類には関係しない』

その後、我々は次の様な興味ある事実を発見した。即ち、この種の応答発現には、それを増強する正の feed-back 反応系とそれを抑制する負の feed-back 反応系が同一細胞内に存在する事である。正の feed back 系には CAM-kinase, Protein tyrosine kinase, MAP-kinase などが含まれ、負の feed-back 機構には Protein kinase C がある。また、それぞれの kinase の効果を減少して feed-back 量を調節する役目の Protein phosphatase も同細胞に存在する事が暗示された。更に、以上のリン酸化や脱リン酸化が起こる molecular site は、受容体と G-蛋白の間の信号伝達系の中にあるのであり、受容体と transmitter 間の信号伝達系、或いは G-蛋白と  $K^+$ -チャンネル間の伝達系の中にはないらしいと推論する事が出来た。

#### 16.C. elegans の移動運動の特徴抽出

×新貝御蔵, ×千葉 忍, ×日野沢 真(岩手大, 工, 情報)

C. elegans の移動運動を、野生株(N2)および幾つかの unc 変異株について CCD カメラで VTR に記録し、運動の特徴を計算機により解析した。前進・後退・停滞の各状態を識別し、それぞれの滞在時間、前進・後退の平均の速さを、また、移動時の体の曲げ具合(屈曲度)を求めた。これらの数値の組みで、野生株及び変異体の移動運動の特徴を捕らえた。野生株の例では、平均前進速度は 0.34 mm/s で解析した N2, unc 4, unc 25, unc 79 の中で最も大きく、前進状態の平均滞在時間は 15.2 s であり、屈曲度が頭部に近いほど大きい特徴はこれら変異株よりも顕著である。移動中の虫(N2)の画像をフーリエ解析することにより首振り運動(0.5~2 Hz)と移動の波状運動(3~8 Hz)とに特徴的な周波数を分離した。

#### 17. GLP-1 による膵 B 細胞の ATP-sensitive $K^+$ channel の抑制

泉井 亮, 菅 世智子, 菅野隆浩(弘前大, 医, 第一生理)

GLP-1 (glucagon-like peptide-1 (7-36)amide) は膵 B 細胞の cAMP/PKA 情報系と  $Ca^{2+}$  情報系にいずれも促進性に作用してインスリン分泌を促進させる。GLP-1 の  $Ca^{2+}$  情報系に対する作用は、 $Ca^{2+}$  流入を

増大させることであり、これは  $\text{Ca}^{2+}$  channel の活性化 (Suga et al., Diabetes, in press) とそれを開口させるための脱分極の発生による。今回、patch-clamp 法による膵B細胞の膜電位、電流の記録から、脱分極の発生機構について検討した。nystatin-perforation による電位記録では、GLP-1 に反応して活動電位が発生したが、これに先行して膜抵抗の増大を伴う脱分極を示す細胞と、膜抵抗の減少を伴う脱分極を示す細胞があった。cell-attached で記録した ATP-sensitive  $\text{K}^{+}$  channel (KATP) 電流は、patch 外に投与した GLP-1 によっては影響されなかった。しかし、電極内に GLP-1 が存在すると、KATP の開口確率は GLP-1 濃度依存性に減少した (0.2 nM, 0.15; 2 nM, 0.08; 20 nM, 0.03)。細胞膜内側に GDP- $\beta$ S が存在した場合でも GLP-1 の KATP 抑制効果はみられた。一方、conventional whole-cell で GLP-1 を投与すると、すべての細胞において cAMP/PKA 依存性に  $\text{Na}^{+}$  conductance が増大した。生理的条件下の膵B細胞では、GLP-1 は直接 KATP を閉鎖して、脱分極を生ずることが示唆される。

#### 18. 膵腺房細胞単離小胞体標本による $\text{Ca}^{2+}$ 誘発性 $\text{Ca}^{2+}$ 放出のカルモジュリンによる修飾

小澤輝高 (東北大学, 医, 生体機能制御学, 細胞生理)  
膵腺房細胞の小胞体には、カフェインまたは  $\text{Ca}^{2+}$  で活性化される  $\text{Ca}^{2+}$  放出機構が存在するが、その詳しい特性は不明であった。筋肉細胞等では、その放出機構がリアノジン受容体として同定され、カルモジュリン (CaM) によりその機能が修飾されることが知られている。今回、ラット膵腺房細胞の単離小胞体標本を用いて、カフェイン ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  放出に対する、CaM 並びに CaM 阻害剤の効果を検討した。単離小胞体標本中に  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  を取り込ませた後、カフェインを投与して  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  を放出させた。内因性の CaM の関与を調べるために、CaM 阻害剤 W-7 (120  $\mu\text{M}$ ) で小胞体標本を前処理しておく、カフェイン (5~30 mM) の効果が著明に抑制された。外因性に投与した CaM (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) は低濃度 (5~10 mM) でのカフェインの効果を促進した。サイクリック ADP リボース (cADPR) による  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  放出も、W-7 は著明に抑制した。次に、小胞体標本からの  $\text{Ca}^{2+}$  誘発性  $\text{Ca}^{2+}$  放出が、 $\text{Ca}^{2+}$  選択性電極を用いて観察されたが、その時の  $\text{Ca}^{2+}$  放出は、CaM による前処理によって促進された。以上の結果より、ラット膵腺房細胞の小胞体

に存在する、カフェイン (cADPR) または  $\text{Ca}^{2+}$  で誘発される、 $\text{Ca}^{2+}$  放出機構は CaM により修飾されることが示された。

#### 19. ラット耳下腺房細胞で見られる P2 受容体活性化による $\text{Na}^{+}$ 誘発性 $\text{Ca}^{2+}$ 放出

福土靖江 (東北大, 医, 生体機能制御, 細胞生理)

耳下腺房細胞では、ATP は  $\text{Ca}^{2+}$  流入に先だって大きな  $\text{Ca}^{2+}$  放出を起こす。私共はこの  $\text{Ca}^{2+}$  放出の機構について、P2Z 受容体の活性化によって細胞外からの  $\text{Na}^{+}$  が流入し、その結果、 $\text{Ca}^{2+}$  放出が起こるという考えを提案してきた。今回は耳下腺房細胞にある P2 受容体の同定とその  $\text{Ca}^{2+}$  放出の相違について調べた。 $\text{Ca}^{2+}$  放出を起こす強さの順序は、BZATP (P2Z 受容体の特異的アゴニスト) > ATP > UTP (P2U 受容体の特異的アゴニスト) であった。AMP, ADP,  $\alpha$ ,  $\beta$ -methylene ATP は無効であった。BZATP による  $\text{Ca}^{2+}$  放出は、外液を無  $\text{Na}^{+}$  にすると消失したが、UTP による  $\text{Ca}^{2+}$  放出には影響しなかった。BZATP は細胞内  $\text{Na}^{+}$  濃度を瞬時に上昇させたが、UTP は効果がなかった。ATP は UTP の反応を脱感作したが、UTP は ATP の反応を脱感作しなかった。以上の結果から次の事が示唆された: ATP は主として P2Z 受容体を介して陽イオン透過性チャンネルを開口させ細胞外からの  $\text{Na}^{+}$  流入によって  $\text{Ca}^{2+}$  放出を誘起する。又、わずかではあるが P2U 受容体を介して外液の  $\text{Na}^{+}$  に依存しない  $\text{Ca}^{2+}$  放出をおこす。

#### 20. ラット帯状皮質から一次運動野への神経投射について

×大塚達以, ×堀内健太郎, ×王 艶, 嶋 啓節, 丹治 順 (東北大, 医, 生体システム生理)

霊長類大脳皮質には一次運動野 (MI) を含め複数の運動関連領域が存在することが知られている。辺縁系とされてきた帯状皮質にも二つの運動関連領域があり、いずれも局在性をもって MI へ神経投射している。他方ラット帯状皮質から MI への神経投射については未だ詳しい研究が無い。本実験ではラットを用い帯状皮質から MI への投射に局在性があるか否かを検討した。微小電流刺激法により MI の運動マップを作成した後、少量の蛍光物質 (DY あるいは FBB) を顔、前肢あるいは後肢運動領域に注入し帯状皮質における逆行性標識細胞の有無および分布を調べた。その結果、

帯状皮質から MI 後肢運動領野への神経投射はほとんど見られなかったが、顔および前肢運動領野へは多くの神経投射が認められた。また、その投射には局在性があり MI の顔領野に投射する帯状皮質細胞は前肢運動領野に投射する細胞に比べて吻・腹側に多く認められた。

#### 21. 日本サル運動前野腹側部における眼球運動課題中の神経細胞活動と微小刺激効果

×藤井直敬\*, 虫明 元\*・\*\*・\*, 丹治 順\* (\*東北大, 医, 生体システム生理・\*\*科学技術振興事業団)

視覚誘導性眼球運動及び上肢到達運動課題遂行中のサル運動前野腹側部を微小刺激法によりマッピングし、課題中の神経細胞活動を記録した。微小刺激法では上肢および肩、首などの運動が誘発される部位とは別に眼球運動が誘発される部位が認められた。微小刺激で眼球運動が誘発されたその部位では、サッカードに関連する神経細胞活動が記録された。これらの結果について考察する。

#### 22. コンピュータを用いた迷路課題によるサルの問題解決の行動学的解析

×佐藤康弘\*, ×石川太郎\*, 虫明 元\*・\*\*・\*, 丹治順\* (\*東北大, 医, 生体システム生理・\*\*科学技術振興事業団)

サルの問題解決の行動学的分析を行う目的で、コンピュータを用いた迷路課題を開発した。これは、スクリーン上の二次元迷路内のカーソルを、両手のマニピュランダムで上下左右に動かし、ターゲットまで到達させる課題である。この課題で、複数の経路が可能などきどのような経路選択するか？ また迷路空間のパスをブロックしたときの経路選択への影響を調べたので報告する。

#### 23. 視覚到達運動におけるプリズム適応の左右手間転移

蔵田 潔(弘前大, 医, 第二生理)

視覚到達運動時にシフトプリズムを装着すると、およそ10~20回の試行でほぼ完全な適応の生じることがヒト同様にニホンザルでも確認されている。本研究では、ニホンザルをどちらの手を用いても視覚到達運動ができるように訓練した。その上で、一側の手のみによる到達運動時にプリズム適応が完成した後、それが反対側の手に転移するかどうかを、目標点の位置と

手の到達した点との差分をもとに検討した。その結果、若干の学習効果はみられるものの、左右間の転移が完全には起こらないことが明らかとなった。このことはプリズム適応における運動学習が左右脳ごとに起こることを示唆している。

#### 24. 海馬 CA1 領域の抑制性シナプスの可塑性

金子健也, 伊藤憲一, 佐々木寛, 加藤宏司(山形大, 医, 第二生理)

抑制性ニューロンは、脳の機能を維持するのに興奮性ニューロンと同程度あるいはそれ以上に重要であると考えられているが、これまでは興奮性ニューロンの研究に比べ、抑制性ニューロンのシナプスの可塑性に関する研究は極めて少ない。そこで著者らは、海馬スライス標本を用いて CA1 錐体細胞における抑制性シナプスの可塑性の一つである長期増強について調べたので報告する。実験は、CA1/2 の放線層を低頻度で刺激しながら錐体細胞からホールセルモードでシナプス後電流を記録する。その結果、膜電位を  $-80\text{ mV}$  に固定し、シナプス入力刺激を加えると、一過性の内向き電流とそれに続く緩徐な外向き電流が記録された。続いて興奮性レセプターであるグルタミン酸・レセプターの阻害剤(CNQX+APV)を灌流すると、内向き電流が消失し外向き電流のみが残った。更に、抑制性レセプターの阻害薬(Picrotoxin; GABA<sub>A</sub> receptor antagonist)を加えてやると、早い外向き電流(持続時間; 5~40 ms)が抑制され、遷時の長い外向き電流のみが残った。今回はこのピクロトキシンに感受性のある成分に付いて解析した。この電流は、高頻度のシナプス入力と脱分極刺激を組み合わせることで長期増強を誘導した。

#### 25. 長期増強誘導への低頻度入力刺激の効果

藤井 聡, ×伊藤智史, ×山崎良彦, ×吉岡成知, 加藤宏司(山形大, 医, 第二生理)

海馬 CA1 ニューロンへの興奮性入力線維束に予め 1 Hz の低頻度入力刺激を与えておくと、60分後にテタヌス刺激を与えても長期増強(LTP)が誘導されない(LTPの誘導抑制)。一方、先行する低頻度刺激の周波数を 5 Hz に増加させた場合や、低頻度刺激とテタヌス刺激との間隔を20分ないし100分にした場合は、テタヌス刺激で LTP が誘導された。以上から、LTP の誘導抑制では、低頻度刺激に周波数特異性があり、先行刺激とテタヌス刺激の間に時間依存性があると

結論した。また、低頻度刺激時に 2-amino-5-phosphonovalerate (AP5, 50  $\mu$ M) を与えると LTP の誘導は抑制されなくなることから、そのメカニズムに NMDA 型受容体の関与が示唆された。

#### 26. 断眠状態における身体のバランス保持機能

×小野芳秀, ×板橋幸一, ×鎌田真希, ×山田久信, ×宮崎 浩, 高橋彌穂(東北学院大, 人間情報)

ヒトは、睡眠を遮断し、眠くなった状態では、体の動きが鈍くなるばかりではなく、さまざまな外乱に対する身体のバランス保持機能も低下することが予想される。そこで演者たちは、この課題を定量的に調べるために、重心動揺計測装置を用い、断眠状態にしたヒトを被験者にしてバランス保持機能を計測した。実験中は常時脳波をモニターし、それを指標とした。また眼球運動も計測し、同時に被験者の表情もテレビでモニターした。その結果、脳波を指標とした脳の活動状態と体のバランス保持機能との間には密接な関係が存在することが判明した。

#### 27. 人工ニューラルネットワークを用いた脳内ヒスタミン(H<sub>1</sub>)受容体の分布に関する研究

×八巻 敦, ×樋口真人\*, ×伊藤正敏\*, ×Bereczki Daniel, 高橋彌穂(東北学院大, 人間情報・\*東北大, サイクロトロン RI センター)

近年、PET による脳内の受容体分布に関する研究が行われている。PET によって受容体の分布を定量的に調べるには、コンパートメントモデルを用いた解析によってトレーサの動態を表すパラメータの値を算出する必要がある。上記の目的のために、従来は数度の動脈採血が必要であった。そこで、演者たちは、人工ニューラルネットワークを応用することによって、動脈採血を行わずに動態パラメータ値の算出を試みた。具体的には、[<sup>11</sup>C]doxepin の組織への移行と、中枢ヒスタミン(H<sub>1</sub>)受容体との結合、および解離を表す動態パラメータ値の算出を行い、さらに、3-コンパートメント解析法、および Logan 等によるグラフィカル解析法との比較を行った。その結果、我々の新しい手法では、実験データに例えノイズが多く含まれていても、従来と同程度の精度と約20分の1の時間で、しかも動脈採血を行わずして、動態パラメータ値を算出することができた。

## 第 233 回 生理学 東京 談話会

日 時：平成 9 年 10 月 18 日(土) 午後 1 時より  
場 所：日本医科大学 本館 C 棟第一臨床講堂  
当番幹事：日本医科大学生理学 佐久間康夫 芝崎 保

第 233 回生理学東京談話会は 1997 年 10 月 18 日、日本医科大学臨床第一講堂で 30 人余の参加を得て開催された。シンポジウム「エストロゲン受容体研究の新展開」では、若手の先生方を中心に、受容体遺伝子の発現から、メッセージ、タンパクの発現に至る各段階について、最近発見された  $\beta$  受容体の話題も含め、現在進行中の成果を報告していただき、学ぶところが多かった。また、一般演題をお寄せいただいた先生方にも改めて御礼申し上げます。

×は臨時会員を示す

### 1. 神経系におけるカンナビノイド受容体は 2-アラキドノイルグリセロール受容体である

×杉浦隆之, ×小高友子, ×近藤佐知子, ×和久敬蔵, 石間祥生\* (帝京大学薬学部・\*石間神経科学研究所)  
大麻の成分である  $\Delta^9$ -テトラヒドロカンナビノールは、神経組織などに存在するカンナビノイド受容体に作用して活性を発揮すると考えられている。内在性カンナビノイド受容体リガンドとしてはアナンダミドが有名であるが、我々は 2-アラキドノイルグリセロールという一種のモノグリセリドが、カンナビノイド受容体の真の内在性リガンドであるという説を提唱している。今回は、2-アラキドノイルグリセロールの培養神経系細胞である NG 108-15 細胞に及ぼす影響を詳しく調べた。その結果、2-アラキドノイルグリセロールは nM オーダーという低い濃度で細胞内カルシウムイオン濃度の速やかな一過的な上昇を起こすこと、カンナビノイド受容体アゴニストとして知られている WIN 55212-2 にも同様の活性が認められるが、カンナビノイド受容体アゴニストとしての活性がない WIN 55212-3 には活性がみられないこと、アナンダミドの活性は弱いものに過ぎないこと、2-アラキドノイルグリセロールと WIN 55212-2 との間で cross-desensitization が観察されること、2-アラキドノイルグリセロールや WIN 55212-2 の作用はカンナビノイド CB1 受容体特異的アンタゴニストである SR 141716 A によって完全に消失することなどを明らかにした。2-アラキドノイルグリセロールの構造は受容体によって厳密に認識されていることなどから、カンナビノイド CB1 受容体は本来は 2-アラキドノイルグリセロール受容体であることが強く示唆された。

### 2. CCK-A-受容体欠損ラットにおける行動異常の一検討

×太田 稔, 金井節子, 増田正雄, ×小林 悟, ×三宅美帆, 宮坂京子 (東京都老人総合研究所, 臨床生理)

コレシストキニン (CCK) は、古典的かつ重要な消化管ホルモンのひとつであり、最近では、脳内に広く分布するニューロトランスミッターペプチドとして知られている。CCK の受容体には、膵臓、胆嚢や、脳の辺縁系に分布する A 受容体 (消化管型) と、胃と脳全体に分布している B 受容体 (脳型) の 2 種が知られている。

最近我々は、肥満と晩発性インスリン非依存性糖尿病を遺伝的に発症する系のラット (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty; OLETF) が、CCK-A receptor を持っていないことを発見した。そこで、中枢での CCK 受容体の機能分担を解明する目的で、OLETF ラットに行動異常があるかどうかを検討した。

その結果、CCK-A receptor を欠損している OLETF ラットでは、open field test で正常ラット (LETO) と比べ、探索行動 (locomotion と rearing) が有意に低値を示した。正常ラット (LETO) への CCK-A receptor antagonist (CR 1505) の投与は、探索行動を低下させた。正常ラット LETO と OLETF の両群とも CCK-B receptor mRNA 量、CCK mRNA 量、脳内 CCK 量には差はなかった。またシナプトソームからの CCK の分泌反応も、LETO, OLETF 両群とも差はなかった。

以上のことから、OLETF ラットの open field test での行動異常は、CCK-A receptor 欠損に基いて生じたと考えられた。

### 3. マイネルト核のコリン作動性神経による大脳皮質血管拡張機能の加齢変化

内田さえ, 鍵谷方子, 佐藤昭夫(東京都老人総合研究所, 自律神経部門)

前脳基底部マイネルト核のコリン作動性神経による大脳皮質血管拡張性調節機能の加齢変化を検討した。3~10カ月齢, 23~26カ月齢, 32~36カ月齢の3群のラットを用い, 麻酔下で実験を行った。前頭葉及び頭頂葉の大脳皮質局所血流をレーザードップラー血流計を用いて連続測定した。マイネルト核の電気刺激時(0.5 ms, 200  $\mu$ A, 90 s)の大脳皮質血流増加反応は, 23~26ヶ月齢では維持され, 32~36ヶ月齢では成熟群の約1/3に減弱した。この原因の可能性として, 第1にマイネルト核刺激により大脳皮質に放出されるアセチルコリン量の加齢変化を調べた。マイネルト核電気刺激時のアセチルコリン放出増加量は, 32~36ヶ月齢群で約半分に減弱していた。第2の可能性として, 脳血流調節に重要なニコチン受容体機能の加齢変化を調べた。はじめにニコチン静脈内投与(3  $\mu$ g/kg, 30  $\mu$ g/kg)が血圧に影響を与えずに大脳皮質局所血流を増加させることを明らかにした。この血流増加反応は, 加齢に伴い著しく減弱した。以上の結果から, 加齢に伴うアセチルコリン放出量低下およびニコチン受容体を介する脳血流増加反応の低下が, マイネルト核のコリン作動性神経による大脳皮質血管拡張性調節機能の加齢に伴う低下の原因である事が明らかとなった。

### 4. 神経起源の高血圧, この領域に内在の二つの非線形力学系, これらの結合に依る血圧波

宮川 清(信州大, 医, 生理)

前回, 「側圧負荷実験」に依り催起される血圧振動は, カオスを含め, 強制 van der Pol 方程式で現される事を報告した。この van der Pol 項は増大した交感神経放電の下, 細動脈平滑筋の「長さ-張力」時性が降伏点形成を含む非線形化, 弁機能を獲得, 動脈系全体がポンプ化するのに対応。強制項は高血圧に内在の logistic 力学系で, 脳血行を遮断すると血圧は logistic 曲線を描いて, 正常値の倍の値で飽和する。この領域での心拍出量と末梢抵抗とが相反的な変化を行う事に基づく。この系は離散時間上で発振する。この二つの系はこの実験に依って特異的に出現するのではなく, 高血圧領域に内在する。従って, 他の手段で血圧をこの領域に保持すれば, 同様の結果が期待出来る。Mayer の波乃至周期的第三級動揺の発生機序の研究

は一世紀以上に亙り, 未解決である。催起方法は, curare 投与・迷走神経切断・人工呼吸との組み合わせの古典的方法, 頭蓋内圧上昇, 脱血, 低酸素暴露, 総頸動脈の閉鎖, 寒冷暴露, 薬物適用等である。リズム発生機序は, 中枢説, 調節環起源説, 末梢血管説等があるが未解決。過去に取り扱われた Mayer の波は「側圧負荷実験」で得られたものと, 性状的に同一のものと判断される。これらの共通の発生条件は交感神経放電の増大で, 上の二つの力学系が構成され結合して生じたりミットサイクルと考えられる。催起方法に依り, 二つの力学系が発生しては居るが, 心機能の衰退し, 血圧を上げられない場合があり, 血圧は指標にならない。

### 5. Periodic Bent DNA in the Promoter Region of the Human Estrogen Receptor Gene

× Ryoiti Kiyama<sup>\*,\*\*</sup>, Kentaro Kuwabara<sup>\*\*\*</sup>, Yuko Wada-Kiyama<sup>\*\*\*</sup> and Yasuo Sakuma<sup>\*\*\*</sup>  
(\*Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, \*\*National Institute of Bioscience and Human-Technology, MITI and \*\*\*Department of Physiology, Nippon Medical School)

We determined DNA bend sites in the promoter region of the human estrogen receptor (ER) gene by the circular permutation assay. Among a total of five sites (ERB-4 to -1, and ERB + 1) mapped in the 3 kb region, three matched with the positions of the predicted periodicity while the other two did not. Most of the sites were accompanied by short poly (dA) · poly (dT) tracts including the potential bend core sequence A2N8A2N8A2 (A/A/A). Fine mapping of the ERB-2 site indicated that this A/A/A and the immediate flanking sequences containing motifs for the estrogen response element were the sites of DNA bending. This region had a higher affinity for the nuclear scaffold and was included in the core region of the nucleosome structure. However, binding of the nuclear factor (s) to the motifs and disruption of nucleosome structure occurred without ATP. These results suggest that a class of periodic bent DNA could act as a site of multiple interactions among the nuclear scaffold, core histones and nuclear factors.

## 6. エストロゲン受容体遺伝子の発現調節

×折笠千登世, ×林しん治\*, 佐久間康夫(日本医科大学, 第一生理・\*東京都神経研, 解剖発生)

脳内の $\alpha$ 型エストロゲン受容体(ER $\alpha$ )は、転写因子としてエストロゲンの働きを仲介し、細胞内で神経分化に関与する標的遺伝子に働いて転写量を調節し、その結果いろいろな神経機能を調節していると考えられる。生殖機能の内分泌調節に重要な、視床前野(POA)、弓状核(ARH)、腹内側核(VMH)には多数のER $\alpha$ 分子が存在するが、これらの脳領域におけるER $\alpha$ の遺伝子発現の調節機構については不明な点が多い。本研究では発生・生長に伴うER $\alpha$ の発現調節の機構を明らかにするために、雌ラットを用い出生当日からエストロゲンの投与(脱雌性化)を行い、脳内ER $\alpha$ の発現を検討した。ER $\alpha$ の特異的抗体を用いた免疫組織化学を行いER $\alpha$ のタンパクの出現を検討し、in situ hybridization 組織化学およびRT-PCR/Southern法を用いた解析によりmRNAの発現を検討した。その結果、エストロゲンの投与により、脳内ERタンパクは、POA, ARH, VMHのすべてにおいて減少したが、ER mRNAの発現は、ARH, VMHでは抑制され、POAでは抑制されなかった。この事実は、エストロゲンによるER $\alpha$ 発現調節のメカニズムが脳内部域によって異なることを示唆している。さらに、POAでみられた現象は、正常型ER $\alpha$ mRNAからスクレオチドの欠失あるいは付加がおり、ER $\alpha$ と分子が類似しているが性質の異なるタンパクが合成された可能性を示唆している。この現象を解明するため、ER $\alpha$ に特異的なprimerを用いたRT-PCR法によって、ER $\alpha$ cDNAの特定領域を部分増幅して変異型ER $\alpha$ の解析を行った。その結果、新生仔ラットの脳内で正常ERとexon 4を欠くER $\alpha$   $\Delta$ 4 isoformの存在を確認した。しかし、RNase protection assay法によりER $\alpha$   $\Delta$ 4 isoformの脳内での発現を検討したところ、雌雄による差や脳領域による差は検出されなかった。現在、POAでみられた現象の責任となる他の変異型ER $\alpha$ の解析をすすめている。

## 7. エストロゲン応答遺伝子の単離および機能解析

×折茂 彰, ×井上 聡, ×美野輪 治\*, ×池田和博, ×広井久彦, ×小川純人, ×渡辺 亨, ×野田哲生\*, ×村松正実(埼玉医科大学第二生化学・\*癌研究所細胞生物部)

エストロゲン受容体は、ステロイドホルモン、甲状腺

腺ホルモン、ビタミンDなどの受容体と同様に核内受容体スーパーファミリーに属しており、エストロゲンと結合して活性化されると、ゲノム上にあるエストロゲン応答配列(ERE)に結合し、近傍の標的遺伝子の転写を調節し、その後発現した種々の蛋白によりエストロゲンの作用が生じると考えられる。エストロゲンの作用機構を明らかにする目的で、以前我々はエストロゲン応答配列(ERE)を有した新規のエストロゲン応答遺伝子 efp (estrogen-responsive finger protein)を同定した。efpの発現様式の検討より、子宮内膜や卵巣の顆粒膜細胞や乳線の上皮細胞にてエストロゲン受容体 $\alpha$ の発現とco-localizeしていることがわかった。また、efpのエストロゲン応答性も子宮や脳組織において確認されており、これらの所見は生体内で、efpがエストロゲン作用を媒介している可能性を考えさせる。次にefpの生理作用を明らかにする為、efp gene targeting mouseを作製した。efpのRINGフィンガーマチーフに相当するexonを削除し、PGK-Neoカセットを逆向きに挿入したtypeのtargeting vectorを設計し、変異ES細胞を得てヘテロ接合体マウス、ホモ接合体マウスを作製した。ヘテロ接合体マウス、ホモ接合体マウスともにメンデルの法則通りに発生し、成長段階において特に異常を認めなかった。エストロゲン受容体 $\alpha$ の変異マウスで生じたような、不妊症や生殖器の低形成が起こることが強く予想されたが、現在のgenetic background(129SVとC57BL6の混合)では、そのような異常はまだ検出されていない。引き続きgenetic backgroundを変化させて、生殖器系を中心に異常を検索中である。恐らく他のエストロゲン応答遺伝子やRINGフィンガ-蛋白などによる代償機構が働いて、表現型の異常がマスクされているものと考えられる。逆にこれらの代償因子をefp変異マウスより単離する試みも現在進行中である。加えて、primary cultureでのin vitro系で細胞増殖能や形態変化なども追跡中である。

## 8. 新規エストロゲン受容体ER $\beta$ cxのクローニング、及び発現機能解析—骨由来培養細胞を用いたERサブタイプ間での発現、リガンド応答性の比較検討

×小川純人\*\*\*, ×井上 聡\*\*\*, ×渡辺 亨\*, ×広井久彦\*, ×石井康德\*, ×折茂 彰\*, ×細井孝之\*\*, ×大内尉義\*\*, ×村松正実\*(\*埼玉医科大学第2生化学教室・\*\*東京大学医学部老年病学教室)

【目的】閉経後骨粗鬆症において、エストロゲン低下

は主要な原因と考えられ、実際にエストロゲン製剤はその有効な治療薬として用いられている。エストロゲンは骨に対して基本的には骨吸収を抑制し、骨形成を促進する方向に働くと考えられるが、その作用機序の詳細は不明点が多い。そこでわれわれは、骨代謝をはじめとする多彩なエストロゲンの作用を説明するのに、従来知られていた  $ER\alpha$  以外のサブタイプの存在を想定し、ヒト精巣 cDNA ライブラリーよりスクリーニングを試みた。その結果、単離された cDNA は、1996年に報告された  $ER\beta$  に対して、リガンド結合領域の一部や、転写活性化領域 AF-2 が置換された新規のエストロゲン受容体アイソフォームをコードするものであることが明らかになった。これを  $ER\alpha_{cx}$  と名づけ、 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 、 $ER\beta_{cx}$  の骨由来培養細胞での発現を解析し、あわせてこれらの受容体間での、種々のリガンドに対する応答性を比較することにより、エストロゲンによる骨代謝調節機序について検討を加えた。

**【方法】** ラット  $ER\alpha$  の DNA 結合ドメイン (C 領域) をプローブに用いて、ヒト精巣 cDNA ライブラリーよりスクリーニングを行った。その結果得られたクローンの全塩基配列を決定し、染色体座を FISH (fluorescence in situ hybridization) にて特定した。また、HOS、Saos 2 などの骨由来培養細胞から、poly A RNA を抽出し、各々の受容体特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。また、エストロゲンをはじめ、タモキシフェンやラロキシフェンなどのリガンドを用いて、発現ベクターに組み込んだ上記  $ER$  それぞれと、ERE-レポータープラスミドとを各種細胞に導入し、CAT アッセイによって応答性の解析、比較検討を行った。

**【結果】** 上記スクリーニングの結果、3 個の独立したクローンが得られ、そのうち最も長いものを解析した。この cDNA がコードする蛋白は、 $ER\alpha$  に対して 48% の相同性を持ち、 $ER\beta$  と比較すると、リガンド結合領域の一部や、転写活性化領域 AF-2 が新規の配列に置き換わっている (C-terminal exchanged) という構造上の特徴を有していることから  $ER\beta_{cx}$  と命名された。また FISH の結果から、 $ER\beta_2$  は  $ER\alpha$  の染色体座 (6 番染色体) とは異なり、14q23 に位置していた。HOS、Saos 2 で  $ER\alpha$  のみならず  $ER\beta$ 、 $ER\beta_{cx}$  がともに発現していることが確認され、加えて種々のリガンドに対する  $ER\alpha$ 、 $ER\beta$  の応答性が示された。

**【考察】** 今回、新規エストロゲン受容体  $ER\beta_{cx}$  の単離に成功し、しかも  $ER\beta$ 、 $ER\beta_{cx}$  が骨由来培養細胞内で共存していることが明らかになった。これは、従来考えられてきた、リガンド依存的な on/off による、 $ER\alpha$  を介した骨代謝調節機序の他に、 $ER$  間でのクロストークによる、より複雑なメカニズムの存在を示唆するものである。また、これら骨由来培養細胞では、 $ER\alpha$  に比べて  $ER\beta$  の発現量を無視できず、今後  $ER\beta$  を介した骨代謝調節機序の解明が急がれる。

**【結論】** 新規エストロゲン受容体  $ER\beta_{cx}$  を同定し、骨由来培養細胞を用いて  $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 、 $ER\beta_{cx}$  間での発現量と、種々のリガンドに対する応答性の比較検討を行った。

### 9. 視床下部エストロゲン誘導性遺伝子について — 脳の性分化関連遺伝子の探索 —

×鈴木正寿、×西原真杉、×高橋迪雄 (東京大学大学院農学生命科学研究科、獣医生理)

脳の形態的、機能的性差は、ラットにおいては、周生期に精巣から分泌されるテストステロンが脳内で芳香化を受けて生成されるエストラジオールによって誘起される。そこで我々はこのような脳の性分化に関与する遺伝子を同定することを試みた。テストステロンプロビオネート投与群および無処置群の雌ラット cDNA を用いて cDNA サブトラクション法を行ったところ、上皮系の細胞の増殖を調節する成長因子であるグラニューリン (granulin: grn) の前駆体をコードする遺伝子を単離した。grn プローブを用いた in situ hybridization 法でこの遺伝子を発現する部位を組織学的に検討したところ、視床下部の腹内側核 (VMH)、弓状核 (ARC) において強く発現していた。また脳の性分化に重要とされる時期を含む出生直前から出生後 10 日において、雌雄ラットの視床下部における grn 遺伝子発現を Northern hybridization 法により検討したところ、grn 遺伝子は雄と雌で異なる発現パターンを示した。視床下部は脳内でも芳香化酵素、エストロゲン受容体両者の強い発現が見られる部位の一つであり、また VMH、ARC 内のシナプス結合パターンやその数は性ステロイドの影響をうけることが知られている。本研究の結果は、grn が視床下部における性分化誘導因子として機能している可能性を示唆するものである。

## 第44回中部日本生理学会

日 時：1997(平成9)年10月23日(木), 24日(金)  
 場 所：岡崎コンファレンスセンター  
 当番幹事：岡崎国立共同研究機構生理学研究所  
 生体膜部門 山岸 俊一  
 生体システム部門 森 茂美  
 機能協同部門 岡田 泰伸

前年の岐阜大学医学部の担当による会合の席で、岡崎には新しい会議場が出来るという話題も出て、生理学研究所が当番をというご指名を頂いた。

新しい会議場は三島ロッジのあるC地区に建設されて本年5月23日に竣工式が行われ、「岡崎コンファレンスセンター」と命名された。開催の当番幹事は生理研の森、岡田、山岸の3名で担当することになった。発表の方法は協議の末、すべてスライドによる口演、一題15分で募集することとした。予稿集の原稿は、予稿原稿(200~300字)でも、初めから抄録原稿(600字以内;日本生理誌掲載)でも良いこととした。

募集の結果は口演発表43題、参加者110名となり、150名用の中会議室にゆっくり座って会を進めるのに丁度良い規模となった。中部地区の研究者層は脳・神経系分野は少数派であり、神経、筋、消化管、細胞生理などバランスよく多分野にまたがっており、一堂に会して広い生理学分野の知見を得、活発に質疑応答ができた良い機会だったと思われる。晴天にも恵まれ、第7回のテニス大会(希望者参加)を最後に無事終了することが出来た。次回の第45回中部日本生理学会は、浜松医大の当番で開催される予定である。(山岸俊一 記)

×は臨時会員を示す

### 1. 筋ジストロフィー症 dy マウス：骨成長依存性筋成長障害と代償性筋線維成長

戸塚 武, 渡辺貴美, 佐久間邦弘, 浦本 勲(愛知県コロニー, 研究所, 生理学部)

筋ジストロフィー症(MD)は、筋線維が変性・脱落するために筋が萎縮していく病気だと考えられてきた。そして残念ながら、病因の解明はもとより、対症療法開発への糸口すら見いだされていない。この筋変性説に根本的な間違いがあるのではないだろうか。実際私たちは、モデル動物の dy マウスの初期病態が筋の変性ではなく成長障害であることを明らかにし、発症と病状の進行・悪化は発育に伴う筋と骨の不均衡の増大によるらしいと提唱してきた(筋成長障害説：一歩進めた筋-骨不均衡説)。最近、dy マウスと Duchenne 型 MD 患者の発症のタイミングが一致することを明らかにした。今のところ、dy 筋の成長障害の特徴として骨成長依存性筋成長障害を、骨成長依存性筋成長機構を担う機械-化学変換器として筋細胞核を、想定している。

さて、不思議なことに、成長不全の MD 筋中に、大多数の細い筋線維に混ざって少数の肥大筋線維が散在する。一般にこのような肥大筋線維は変性し始めた

膨潤細胞であると、漠然と考えられてきた。ところが、このような筋線維が実質的肥大細胞であることに一部の研究者は早くから気付いていた。私たちは、ほとんどの筋線維が成長できない dy 筋中で、一部の太い筋線維が成長を続けることを先に明らかにした。

最近、MD 筋の横断切片で、周辺核を多めに或いは中心核を含む筋線維が肥大傾向を示すことを見いだした。この現象を説明するため、核の機能的障害と、数或いは活性化による代償性肥大を想定している(細胞内部への移動による核の活性化?)。

### 2. 筋ジストロフィー症 dy マウス：dy 筋における筋分化制御因子(Myod Family)のタンパク発現の変化

佐久間邦弘, 渡辺貴美, 浦本 勲, 戸塚 武(愛知県コロニー, 研究所, 生理学部)

先天性筋ジストロフィー症のモデル動物である dy マウスの筋肉では、損傷後の筋線維の再生が円滑に行われていない可能性がある。筋線維の再生には、衛星細胞、成長因子(IGF-I, etc)ならびに筋分化制御因子(Myod Family)が重要であると考えられる。本研究では、Myod Family のタンパク発現の状態を、週齢の

異なる *dy* マウスにおいて調べた。生後 2, 4, 6, 7, 8, 10 週齢の前脛骨筋から得られた 8  $\mu\text{m}$  の横断切片に, MyoD, Myogenin, Myf-5, Myf-6 に対する抗体を用いて免疫組織染色を行った。2~10 週齢の normal マウスの筋には, MyoD Family のいずれの免疫活性も検出されなかった。2 および 4 週齢の *dy* マウスの筋では, normal 筋と同様にこれらのタンパクは検出されなかった。しかしながら, 6, 7, 8 週齢のいずれの筋においても, Myf-5 の免疫活性が, 萎縮した筋線維の細胞質や通常の筋線維の膜に観察された。Myf-6 の免疫活性は 7 週齢の筋で最も顕著にみられ, 萎縮した筋線維, 細胞外の間隙部分, その間隙に存在する単核球で検出された。一方, MyoD はいずれの週齢の筋においても検出されなかった。以上のことから, *dy* マウスの筋には, 筋分化制御因子を動員する能力を有するものの, *mdx* マウスと異なり MyoD タンパクを発現できない可能性が示唆された。

### 3. L型カルシウムチャネルミュータントを用いた興奮収縮連関の分子機構の解析

×中井淳一(生理学研究所, 液性情報研究部門)

骨格筋の興奮収縮連関では T 管の電位依存性 L 型カルシウムチャネルは筋小胞体のリアノジン受容体と蛋白質相互作用をし情報伝達を行っていると考えられている。T. Tanabe ら (Nature, 346, 567-569, 1990) は骨格筋と心筋 L 型カルシウムチャネルのキメラ解析よりカルシウムチャネルのリポート II とリポート III の間の細胞内ループ (II-III ループ) が骨格筋の興奮収縮連関に最も重要であることを明らかにし, II-III ループがリアノジン受容体との結合部位ではないかと予想した。今回 II-III ループ内のどの部分が興奮収縮連関に最も重要であるかを同定する目的で II-III ループの部分のキメラチャネルを作製し蛍光カルシウム感受性色素を用いて興奮収縮連関に及ぼす影響を調べた。その結果 727~743 の 17 個のアミノ酸が骨格筋の興奮収縮連関に最も重要であることを明らかにした。また骨格筋の L 型カルシウムチャネルでは II-III ループに存在する 687 番目のセリンが cAMP 依存性プロテインキナーゼにより容易にリン酸化されることが報告されている。そこで 687 Ser をアラニンに換えたミュータントを作製し興奮収縮連関に及ぼす影響を調べた。その結果 S687A ミュータントでは骨格筋型興奮収縮連関に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

### 4. モルモット胃輪走筋の自発性活動に対する浸透圧の影響

×畑 忠善, 富田忠雄(藤田保健衛生大学総医研)

モルモット胃幽門前庭部の輪走筋では 1 分間に 3~4 回程度の収縮を伴った自発性電気活動 (slow wave) がみられるが, その発生機序については未だ不明な点が多い。外液の NaCl の濃度を下げて浸透圧を低くすると (90~80%) 弱い脱分極と持続性収縮および自発性活動の頻度の増加がみられる。これらの作用は筋切片によってかなりの差がみられるが, 一般に自発性活動の頻度が高い (4/分程度以上) 試料では低浸透圧による頻度の増加は弱く, 持続性の収縮の上に相動性収縮の増強が現れるだけであるが, 自発性活動の頻度が低い場合, あるいは不規則な場合には低浸透圧の作用が著明で, 自発性活動の頻度が増し規則性になる。筋切片によっては低浸透圧によって slow wave の持続時間の延長とそれに伴って収縮の増大がみられる。収縮性反応は外液の  $\text{Ca}^{2+}$  を除くと消失するが, 収縮の増強, 膜の脱分極, 頻度の増加, 持続時間の延長などは Ca チャネル遮断剤 (1  $\mu\text{M}$  nifedipine) および Cl チャネル遮断剤 (200  $\mu\text{M}$  DIDS, 20  $\mu\text{M}$  NPPB) である程度抑制されるが, 消失することはない。低浸透圧の影響は細胞の膨潤によって細胞膜が伸展されることによって  $\text{Ca}_2^+$  の流入が起こることによって考えられるが, この経路には細胞容積に感受性を持つ Cl チャネルを介した細胞膜の脱分極によって活性化される膜電位依存性の Ca チャネルと Ca チャネル遮断剤に影響を受けない  $\text{Ca}^{2+}$  の流入経路とが含まれていると推測される。

### 5. モルモット胃輪走筋における自発性巨大矩形波電位の性質

富田忠雄(藤田保健衛生大学総医研)

モルモット胃幽門前庭の輪走筋は収縮を伴った自発性脱分極電位 (slow wave) を 1 分間数回の頻度で発生する。この電位の振幅は 30 mV 程度で, 立ち上がり速度は 0.1 V/秒以下である。典型的な slow wave の再分極相には肩がみられ, これは slow wave の底部を構成する第 1 要素によると考えられる。非常にまれに主に第 1 要素のみと推測される 40 mV 以上の, 立ち上がり速度の速い (1 V/秒程度) 巨大電位が記録される。細胞膜の K コンダクタンス ( $G_K$ ) を増加させる cromakalim (5  $\mu\text{M}$ ) で膜を過分極させると, 通常の slow wave は振幅が減少し, 小さい第 1 要素のみに変

化するが、巨大電位は振幅が増大する傾向はあっても減少することはない。

$\text{Ca}^{2+}$  を除くと slow wave が記録されている場合には弱い脱分極が起こり、振幅および立ち上がり速度が著明に減少するが、巨大電位が記録されている場合には膜は過分極し、その分だけ振幅は増大する。巨大電位は Ca チャネル遮断剤(nifedipine,  $1 \mu\text{M}$ )や Cl チャネル遮断剤(NPPB,  $20 \mu\text{M}$ )で殆ど影響を受けない。巨大電位の持続時間は  $G_{\text{K}}$  を抑える TEA ( $10 \text{mM}$ )や  $\text{Ba}^{2+}$  ( $0.2 \text{mM}$ )で影響を受けないが、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{K}^{+}$ 、あるいは  $\text{Cl}^{-}$  (glunonate, ise-thionate, aspartate 置換)を除くと短縮する。発生頻度は  $\text{K}^{+}$  あるいは  $\text{Ca}^{2+}$  を除くと低下するが、 $\text{Cl}^{-}$  を除くと増加する。恐らく巨大電位は間質細胞で発生し、周囲の平滑筋を脱分極することによって slow wave を誘発させるものと推測される。この電位のイオン機序については今後さらに解析しなければならない。

#### 6. モルモット気管平滑筋に対する弛緩薬剤の作用における筋小胞体の関与

×竹本正興、高木健三、荻野佳代\*、富田忠雄\*(名古屋大学医学部第2内科・\*藤田保健衛生大学総医研)  
モルモット気管平滑筋での carbachol ( $1 \mu\text{M}$ )による収縮は外液中の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に依存し、筋小胞体(SR)の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みを抑制する cyclopiazonic acid (CPA)や thapsigargin (TPG)であまり影響を受けないので、主に細胞外から流入する  $\text{Ca}^{2+}$  によって起るものと考えられる。この収縮はL型 Ca チャネルを遮断する nifedipine などの薬剤 ( $1 \sim 3 \mu\text{M}$ )で僅かにしか抑制されないが、isoprenaline (IPN)および sodium nitroprusside (SNP)で濃度依存性に抑制される。この場合の  $\text{IC}_{50}$  はそれぞれ  $15 \text{nM}$  および  $480 \text{nM}$  で、IPN に対しての方が SNP に対してより感受性が高い。これらの薬剤の濃度-弛緩曲線は両方とも CPA ( $10 \mu\text{M}$ )および TPG ( $10 \mu\text{M}$ )で同じ程度右側に平行移動する。もし、CPA および TPG の抑制作用が SR による  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みの抑制であれば、IPN および SNP の弛緩作用には SR による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の低下がある程度関与しているといえる。IPN は細胞内の cAMP を、SNP は cGMP を増すといわれているが、両方とも SR の  $\text{Ca}^{2+}$  の取り込みを促進するような結果が得られた。しかし、この場合の SR の関与の程度は弱く、主な弛緩機序は細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入の抑制であると考えられる。IPN による弛緩は  $\text{Ca}^{2+}$  流入の抑制

によるもので SR の関与はないという報告(Ito et al., Br. J. Pharmacol. 116: 2738-2742, 1995)は収縮に prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $100 \text{nM}$ )を用い、IPN の濃度が  $100 \text{nM}$  であったため弱い CPA の抑制作用しか認められなかったことによると考えられる。

#### 7. ラット摘出灌流肝の血管収縮反応について—ノルエピネフリンと血小板活性化因子の比較—

芝本利重、田中 聡、羽二生久夫、上門千哲、小山市三(信州大、医、第二生理)

我々は肝動脈と門脈の両方から灌流するイヌ摘出灌流肝標本を作成し、肝動脈、門脈、肝静脈の同時閉塞により測定される triple occlusion pressure (Pto)が、肝毛細管圧を反映することを報告してきた(Am. J. Physiol. 271: R 1130, 1996)。さらに、この Pto の測定により肝血管抵抗を門脈抵抗、肝動脈抵抗ならびに後毛細管抵抗である肝静脈抵抗に分け、血管作動性物質によりその肝血管収縮部位が異なることを示してきた。すなわち、ノルエピネフリンは主として前毛細管血管を収縮し、肝重量を減少させた。一方、血小板活性化因子(PAF)は門脈抵抗と肝静脈抵抗を同程度に増加させ、肝重量を増加させた。今回、同様のラット肝灌流標本を作成し、ノルエピネフリンと PAF のラット肝血管の収縮部位を検討した。その結果、両物質とも肝静脈の収縮は弱く、門脈を優位に収縮させた。また、肝動脈はノルエピネフリンには強く収縮したが、PAF に対する反応は弱かった。一方、肝重量はノルエピネフリンで減少し、PAF では減少せず増加した。種の違いにより血管作動性物質に対する肝血管の収縮反応は異なることが示唆された。

#### 8. 乳腺筋上皮細胞の単離培養とカルシウムシグナリング

中野春男、古家喜四夫\*\*、×古家園子\*、山岸俊一(生理学研究所、生体膜部門・\*組織培養・\*\*京都工業繊維大学応用生物学科)

乳腺筋上皮細胞は乳腺腺胞にあって分泌上皮細胞を籠状に取り囲み、授乳刺激により脳下垂体から放出されるオキシトシンに反応、収縮することにより腺胞内に溜まったミルクを排出する機能をもっている(milk ejection reflex)。筋上皮細胞の細胞レベルでの性質を明らかにするため、マウス乳腺筋上皮細胞の単離培養法を試み、その方法を確立した。2種類の酵素(ディスパーゼ、コラゲナーゼ)で分散した乳腺細胞に Per-

coll 密度勾配遠心法を用いることで筋上皮細胞を単離することができた。培養した筋上皮細胞は不規則な紡錘形であり、細胞内に規則的で密なアクチンフィラメントを持つことが NBD-phalloidin による蛍光像、及び電顕像によって示された。fura-2 を用いた細胞内  $Ca^{2+}$  濃度測光法により、オキシトシンによって細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が増加し、収縮を引き起こすことを見いだした。この反応は細胞外液の  $Ca^{2+}$  に依存せず、また L 型  $Ca^{2+}$  チャネル拮抗薬のニフェジピンによっても影響されなかった。オキシトシン以外にブラジキニン、アセチルコリン、ATP、アルギニンバソプレッシンによっても細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が増加した。これらの刺激薬による細胞内  $Ca^{2+}$  反応も細胞外液の  $Ca^{2+}$  に依存しなかった。

筋上皮細胞においては細胞内  $Ca^{2+}$  ストアから  $Ca^{2+}$  を遊離させることで収縮が起こることが明らかとなった。

### 9. 培養小脳顆粒細胞における電位依存性 $K^+$ チャネルの発現変化

×中平健祐, 柴田理一, ×若園佳彦, 倉橋 隆\*, 金子章道\*\*, 池中一裕(生理研, 神経情報・\*生理研, 情報記憶・\*\*慶大, 医, 生理)

我々は、神経細胞の分化成熟の過程を明らかにするため、小脳顆粒細胞の電気的興奮性獲得のメカニズムについて電位依存性  $K^+$  電流の変化に着目し検討した。まず、生理的低  $K^+$  濃度で顆粒細胞の分化を観察するため、永田博士らによって確立されたマウス小脳 microexplant culture 法を用いて、この培養系における顆粒細胞が培養経過に伴い explant から放射状に移動しクラスターを形成すること、移動中に双極型から T 字型へ脳内同様の特徴的な形態変化を示すことを明らかにした。そこで、パッチ電極内に蛍光色素を加えて細胞を標識し、形態変化と電気活動をパッチクランプ法で同時に記録した。双極型の顆粒細胞ではほとんど不活性化しない  $K^+$  電流が観察されたが、T 字型への形態的成熟に伴い速い不活性化成分を持つ電流成分が増大してくるを見いだした。この成分の不活性化の時定数は  $\tau=13.5$  msec で、外向き整流性の電位依存性を示し、約  $-20$  mV で不活性化された。また、5 mM の 4-AP ではほぼ完全にブロックされた。これらの知見からこの  $K^+$  電流は典型的な A-type であると考えられた。今後、この電流の活動電位に果たす影響と、この電流を担うチャネル遺伝子の同定を行

いたい。

### 10. 発達期小脳顆粒細胞における電位依存性 $K^+$ チャネルの発現変化

柴田理一, ×中平健祐, ×若園佳彦, 池中一裕(生理学研究所, 神経情報研究部門)

我々は先に、培養顆粒細胞の移動と形態変化に伴い A-type  $K^+$  チャネルが増加することを見いだした。そこで、in vivo においても顆粒細胞の移動に伴い A-type チャネルの発現が見られるかどうかを in situ hybridization 法を用いて検討した。

成体マウス脳より A-type チャネル候補の Kv4.2 と Kv1.1, delayed rectifier 候補の Kv3.1 をクローニングし、DIG でラベルしたプローブを作製、生後 3 日目から 10 日目のマウス小脳を標識した。その結果、Kv4.2-mRNA は、外顆粒層から内顆粒層への移動途中及び移動後に強く発現し始めることが明らかとなった。また、Kv3.1-mRNA は発達過程において外顆粒層、内顆粒層ともに発現が見られた。一方、Kv1.1-mRNA の発現は生後 7 日以降の内顆粒層から検出できた。これにより小脳顆粒細胞の成熟過程における細胞興奮性の変化には Kv4.2 および Kv3.1 が関与している可能性が示唆された。特に A-type チャネルである Kv4.2 は、活動電位の発火頻度や kinetics を調節することにより顆粒細胞の分化成熟に寄与しているものと思われる。今後は顆粒細胞の移動に伴う活動電位の変化の測定および kv4.2 の強制発現等を行っていく予定である。

### 11. 培養ニューロン間に同期したバーストの解析

中西圭子, 久木田文夫\* (愛知県コロニー発達障害研究所, 生理学部・\*生理学研究所, 生体膜部門)

ラット大脳皮質ニューロンを長期培養しネットワークを形成させ、任意の 2 つのニューロンの自発的電位活動をパッチクランプ法を用いて、同時測定した。調べた 59 pairs のニューロン間すべてで、同期したバーストが観察された。

電気刺激を加えた 52 pairs のニューロンのうち、20 pairs で EPSP が観察され、この中で 3 pairs は両方向性に EPSP が認められた。すなわち、同期してバーストしているニューロン間で、機能的シナプスの存在が確認できた。観察された response latency の平均は  $4.05 \pm 0.61$  msec であり、synaptic delay は  $1.5 \sim 1.9$  msec と推測された。

各々の pair のバーストの遅れ (burst latency) は、 $0.95 \sim 17.6$  msec (平均  $5.87 \pm 0.47$  msec) であり (ニューロン間距離  $37.5 \sim 600 \mu\text{m}$ ; 平均  $159 \pm 17 \mu\text{m}$ )、距離に対して弱い相関が認められた。synaptic delay との比較から、これらの同期してバーストしているニューロン間では、数個のシナプスを介して連絡していることが推測された。

培養した細胞層を cut してニューロン間の連絡を完全に遮断したところ、同期したバーストは認められず、それぞれのニューロンが独自の周期でバーストしていた。また小分子色素 lucifer yellow を細胞内注入したところ、他の細胞への移行は認められなかった。

これらのことから同期したバーストは、ギャップ結合や液性因子によってではなく、ニューロン間のシナプスを介した連絡によっておこっていると考えられる。

## 12. ラット上丘浅層ニューロンの電気生理学的特性

遠藤利朗, 伊佐 正 (生理学研究所, 統合生理研究施設)

哺乳類上丘の局所神経回路の構造を明らかにするため、17~21日齢のラット上丘スライス標本を用いて、whole-cell patch clamp 法により、上丘浅層のニューロン ( $n=144$ ) の電気生理学的特性、形態学的特徴を調べた。

定電流通電に対する電位応答から、浅層のニューロンは、1) 比較的一定の時間間隔で発火する regular spiking neuron ( $n=66$ )、2) 閾値付近で複数のスパイク発火によるバーストを示す burst spiking neuron ( $n=33$ )、3) 過分極通電に対して H 電流による voltage sag を示す regular または burst spiking neuron ( $n=13$ )、4) 上記以外の細胞 ( $n=32$ )、に分類できた。

biocytin での染色によって解析したこれらの細胞の形態的特徴は、1) は中~小型で、水平方向や垂直方向へ長い樹状突起をもつ細胞、比較的限局した範囲に樹状突起を伸ばす細胞等々であった。2) は中~小型で、比較的限局した範囲で、特に背側へ樹状突起を伸ばす細胞が多く見られた。3) は大型で、浅層腹側に位置する細胞体から背側へ、広範囲に樹状突起を広げている細胞であった。膜容量は、1)  $21.3 \pm 13.0$ 、2)  $22.3 \pm 7.5$ 、3)  $33.5 \pm 12.8$ 、4)  $16.9 \pm 8.2$  pF であった。

以上のように、ラット上丘浅層のニューロンの電気生理学的特性、形態学的特徴にある程度の相関が認め

られた。

## 13. ネコ歩行運動のリズム形成と腰髄介在細胞

松山清治, 中階克己, 久世文也, 松井利浩, 森 茂美 (生理学研究所, 生体システム研究部門)

脊髄の介在細胞群で構成される脊髄内神経回路網、たとえば central pattern generator、は歩行運動の基本的リズムを形成する際に重要な役割を果たす。本研究では歩行リズムの形成に関わる脊髄内局所回路網の同定を目的とした。実験動物としては上丘前縁と乳頭体後縁を結ぶ面で脳幹を離断した除脳・無動化ネコを用いた。歩行リズムを誘発するため中脳歩行誘発野に連続微小電気刺激を加え、後肢の伸筋および屈筋支配神経から神経群発射を記録した (fictive locomotion)。fictive locomotion 誘発時の介在細胞活動は neurobiotin (NB) -1 M KCl 溶液を封入した微小ガラス管電極を腰髄前索内に刺入し軸索内記録した。発射活動の記録後に記録電極より NB を軸索内に電気泳動的に注入した。注入 2~20 時間後に動物を灌流固定し、腰髄部の  $50 \mu\text{m}$  連続横断切片を作製した。これらの切片を ABC/DAB 法にて反応し NB 陽性線維および細胞を可視化した。記録できた大部分の介在細胞は歩行リズムに対応してリズム様発射を示した。また NB 標識軸索は腰髄の長軸上で  $5 \sim 32$  mm 追跡できた。標識軸索の多くは複数の軸索側枝を分枝し、髄節内の特定領域に多数の軸索側枝を分枝する傾向を示した。また一部の軸索では起始細胞を標識できたが、それらの軸索は中心管を越えて交叉し、反対側の前索内で複数の軸索側枝を分枝した。これらの軸索側枝の多くは介在細胞層を中心に投射し、一部の軸索側枝は運動細胞層に直接投射した。

## 14. トレッドミル上におけるサル歩行運動：四足および直立二足歩行運動の比較

中階克己, <sup>\*</sup>高須千慈子, 松山清治, 森 茂美 (生理学研究所, 生体システム研究部門)

成サル (ニホンサル: *M. fuscata*, Male,  $N=2$ , サル A: 体重  $7.1$  kg, サル B:  $9.8$  kg) にトレッドミル上での四足および直立二足歩行運動を学習させ、トレッドミル速度の変化にともなう歩容変化を比較した。トレッドミルの速度は  $0.4 \sim 1.5$  m/s の範囲で段階的に変化した。歩容の解析には高速ビデオカメラおよび画像解析システム (HVS-500: 250 frame/sec, Image Express, NAC) を用いた。サルの歩容は側面から連続撮影し、

得られた画像から着地相および遊脚相の持続時間を求めた。さらにサルは体幹(耳珠、肩・腰部)および四肢(肘・手・膝・足関節部)上の marking を指標として stick picture を作成し、体軸や四肢の運動軌跡さらには肩・肘・手・股・膝・足関節の関節角度を測定した。四足歩行運動の場合にはトレッドミル速度の増加にともないサルはその歩容を gallop にまで、直立歩行運動の場合には二足走行様式にまで変化した。特に直立歩行の際にはより深い前傾姿勢をとった。四足および二足歩行運動時にサルAはトレッドミル速度の増加にともない着地相の持続時間をそれぞれ 0.9 から 0.4 m/s, 0.8 から 0.3 m/s に短縮した。しかし遊脚相の持続時間は四足・二足歩行運動いずれの場合もトレッドミル速度の増加にかかわらず一定 (0.3 m/s, 0.2 m/s) であった。また四足および二足歩行運動中における肩・肘・手・股・膝・足関節の可動域はトレッドミル速度の増加にともないそれぞれ増大した。サルBにおいてもサルAと同様の成績が得られた。

#### 15. 遅延視覚探索課題遂行中のサル前頭連合野のニューロン活動

長谷川良平, ×加藤まどか, 三上章允(京都大学霊長類研究所, 行動神経)

サルの前頭連合野の視覚応答ニューロンは、注意のレベルや行動的文脈に応じてその活動を变化させる (e. g., Kodaka et al., 1997; Sakagami and Niki, 1994)。本研究では、このような視覚応答が行動の選択過程に関与していることを示すために、視覚探索課題を行っているサルの前頭連合野からニューロン活動を記録・解析した。行動課題は複数の視覚刺激(妨害刺激)の中から1つだけ異なる刺激(目標刺激)を選択する課題(孤立項目検索)であり、視覚刺激としてはキメの細かさの異なる4種類のチェックパタンを用いた。サルの反応にはサッカード眼球運動を用いた。選択過程を運動の実行過程から分離するために、刺激呈示(手掛期)と反応期との間に注視だけを行う待ち時間(遅延期)を挿入した。この課題を2頭のサルに訓練し、課題遂行中の背外側前頭連合野から161個のニューロン活動を記録した。その結果、7割以上の細胞が手掛期、遅延期、反応期のいずれかに活動した。これらのニューロンの多くは、目標位置や課題の難易度の違いに依存して活動変化を示した。このような結果は、前頭連合野が視覚探索におけるサッカード目標の選択過程に重要な役割を持っていることを示唆する。

#### 16. 仮現運動刺激に対するヒト運動視中枢(MT/V5)の反応特性

金桶吉起, ×文堂昌彦, 柿木隆介(生理学研究所, 統合生理研究施設)

二つの線分を交互に場所を変えて2~3秒ごとに提示すると、ヒトは仮現運動を知覚する。このような視覚刺激に同期して、ヒト運動視中枢(MT/V5)に特異的に反応が現れることが脳磁場測定にて確かめられた (Neuroreport 8, 677, 1997)。今回我々は、二つの線分間の距離と反応潜時を比較することにより、それが視覚刺激に対する単純な反応と考えるよりはむしろ、運動感覚を生成している過程を反映するらしいことを見出した。対象と方法: 3人の健康成人を対象に、上記の仮現運動視覚刺激に対する脳磁場反応を前回と同様の方法で記録した。線分間の距離は、0.05, 0.1, 0.2, 1.0, 3.0, 5.0度の6種を用いてそれらに対する反応潜時を測定した。結果と考察: 線分間の距離が大きくなると反応潜時は単調に短くなった。しかし仮現運動の方向には寄らなかった。また潜時の違いに関わらず脳磁場反応は同じ運動視中枢から起こっていると推定された。これらの結果は、記録された脳磁場反応が線分の on または off に対する線形的な反応ではなく、脳内で両刺激が非線形的に相互作用することにより作り出されるものであることを示す。また、ヒト運動視中枢は視覚刺激の網膜上位置に対する感受性が乏しいことから、線分間の距離による潜時差はその感受性のより高い下位中枢(V1-V2)との何らかの情報交換によっておこることが推測される。

#### 17. バーチャルリアリティ応用の視覚刺激による姿勢の変化

×川北哲也, ×久野慎介, 川上 治\*, 渡邊 悟\*\* (名古屋大学医学部眼科・\*神経内科・\*\*藤田保健衛生大学衛生学部生理学)

ヒトの姿勢制御は、前庭系、視覚系、体性感覚系情報の統合により行われている。中でも視覚系情報依存は大きい。今回我々は、バーチャルリアリティ(VR)応用の視覚刺激を Head Mounted Display (HMD) に投影し被験者に与えた。VR 画像はランダムドットで構成された立体画像で、両眼視による刺激であり、正弦波状に radial (深さ、すなわち前後方向) に 0.03~0.09 Hz でゆっくりと振動する。画像が眼前に迫ってくると、体は後方へ動き、画像が遠くに去ると前方へ動く。この様に深さ方向に動く画像による自己運動感

覚(vection)は左右, 上下方向に比べて強く感じられ, 視覚による姿勢変化が顕著に現れる. 刺激と眼球運動, vection, 更に姿勢調節について検討した.

#### 18. tPA-プラスミン系による脳組織 NCAM の分解

×遠藤 哲, 永井信夫, 浦野哲盟, 高田由美子\*\*, 高田明和, ×橋本賢二\* (浜松医科大学第二生理・\*歯科口腔外科・\*\*基礎看護学)

【はじめに】 組織型プラスミノゲンアクチベーター(tPA)はプラスミノゲンをプラスミンに活性化する分泌型セリンプロテアーゼである. 近年 tPA が記憶, 学習, 神経細胞死等に関与することが示唆されており, 中枢神経系においても tPA が生理的な機能を担っていると考えられている. 今回我々は中枢神経系での tPA-プラスミン系による細胞外蛋白質分解反応の基質としての NCAM の可能性を検討した.

【方法】 新生ラット脳 homogenate を用い, ヒト tPA (70 nM)およびラットプラスミノゲン (2  $\mu$ M)の存在下で PSA-NCAM の分解を, さらに成熟マウス脳 homogenate を用い, ヒト tPA (70 nM)およびヒトプラスミノゲン (2  $\mu$ M)の存在下での NCAM の分解反応を Western blotting を用いて検討した.

【結果および考察】 tPA, プラスミノゲンとの37 $^{\circ}$ C, 30分での反応により新生ラット脳 homogenate 内の PSA-NCAM の減少を認め, さらに成熟マウス脳 homogenate 内の 180 kd, 140 kd の NCAM の消失を30分で認め, 120 kd の NCAM も経時的に減少した. 以上より tPA-プラスミン系の活性化により, NCAM の代謝を介して神経ネットワークの可塑性に関与していることが示唆された.

#### 19. 脂肪細胞分化過程における PAI-1 の発現誘導

井原勇人\*\*\*, 高田明和\*, ×David J Loskutoff\*\* (\*浜松医大, 生理学第二・\*\*The Scripps Research Institute, La Jolla, CA U. S. A.)

インスリン抵抗性改善薬チアゾリジン誘導体はインスリン感受性を高め, グルコースの取り込みを増加させるだけでなく, 前駆脂肪細胞の分化を促進する. 近年, この誘導体が脂肪細胞分化におけるマスターレギュレーターとして作用するペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体(PPAR- $\gamma$ )のリガンドであることが報告された. 今回, 脂肪細胞分化過程における PAI-1 遺伝子発現に対するこれらの誘導体の効果について検討したので報告する.

前駆脂肪細胞 3T3-L1 を通常方法にて分化誘導した後, インスリン存在下, チアゾリジン誘導体ピオグリタゾンで細胞を処理すると, この脂肪分化を促進するだけでなく処理後72時間で PAI-1 mRNA 発現量が著しく増加した. しかし, インスリン, もしくは, ピオグリタゾン単独投与では, この PAI-1 mRNA の誘導現象は, 見られなかった. この誘導は, インスリン存在下でピオグリタゾン容量依存的に見られ, その他のチアゾリジン誘導体によっても, その PPAR- $\gamma$  の活性化能に応じて, 認められた. また, タンパク質レベルでも PAI-1 誘導が認められた. PAI-1 遺伝子はインスリンの存在下, PPAR- $\gamma$  の活性化を介して, 発現誘導されていることが示唆された. しかし, ピオグリタゾンあるいはインスリン単独投与では, 誘導されないことから, 活性化された PPAR- $\gamma$  の直接作用ではなく, 間接的な作用が示唆された.

#### 20. 活性化マクロファージから分泌される histamine releasing factor の特性

松井卓哉, 張 淑娟, 村瀬 豊, 塩野裕之, 酒井淳一, 岡田 忠, 梶江 勇(愛知医大, 第一生理)

活性化マクロファージが産生する TNF $\alpha$  や NO は細胞傷害性を示し, IL-3 や GM-CSF は好塩基球のヒスタミン放出能を有する. 最近 MIP-1 や MCP-1 が IgE 依存的に好塩基球, マスト細胞から即時的にヒスタミン放出を起こすことが報告されている. 我々は rat 腹腔活性化マクロファージの培養上清が緩徐なマスト細胞の脱顆粒反応を起こす報告をした. 本研究ではこの反応機序を解明するため上清中の histamine releasing factor (HRF) の特性を検討した. rat 腹腔マクロファージを接着法で純度90%以上に分離し 50  $\mu$ /ml LPS で刺激して24時間後の培養上清を採取した. 生物活性を長期維持する為に 3T3 fibroblast と co-culture したマスト細胞に活性化マクロファージ上清を添加して1, 7 時間後に fresh medium に交換して48時間インキュベートしたものと48時間反応させたものを比較すると, 48時間反応させた細胞に脱顆粒とヒスタミン遊離が認められた. 上清中の活性分画を hydroxyapatite, TSK-G 2000 sw を用いて部分精製を行ない, 分子量 100 kD の分画にヒスタミン遊離活性(HR: 59%)が見られた. 活性は抗 TNF $\alpha$  抗体, 56 $^{\circ}$ C30分間の熱処理では阻害されず, 100 $^{\circ}$ C30分間の熱処理(HR: 21.5 $\pm$ 11.6%), SBTI(HR: 26.3 $\pm$ 5.2%), cycloheximide(HR: 8.9 $\pm$ 1.5%)

で阻害された。以上の結果から緩徐な脱顆粒反応を起こす HRF は従来の TNF $\alpha$ , MIP-1, MCP-1, 窒素酸化物とは異なる熱安定で分子量 100 kD 以上の高分子プロテアーゼ様物質と考えられる。

## 21. Melatonin rhythm in the pineal organ of the lamprey in vitro is photosensitive

M. Samejima, <sup>\*</sup>S. S. Shavali, S. Tamotsu and Y. Morita  
(Department of Physiology, Hamamatsu University School of Medicine)

It has been proved that the pineal organ is the seat for circadian organization in several animal species. Growing evidence indicates that in some lower vertebrates such as fishes, the pineal itself is an essential component for the generation of circadian rhythm. In order to prove the importance of the pineal organ in circadian organization, we reported previously that the organ excreted melatonin into the medium in a LD entrained manner for at least 8 days when the pineal organ of the lamprey was cultured in the flowing medium of M199 at 20°C under 12:12-hr light:dark (LD) cycle. This rhythm is endogenous because the melatonin rhythm was persisted for up to 5 cycles under constant dark (DD) conditions. We present here the recent evidence that melatonin rhythm in vitro is photosensitive. (1) If the LD cycle in the culture was phase shifted i.e., the LD cycle was advanced or regressed for 6 hours, the melatonin rhythm was also found to be shifted and entrained to new LD cycle immediately. (2) When the organ was cultured under continuous illumination, the amplitude of the rhythm was gradually declined and then suppressed. These results strongly suggest the direct photoreceptive capabilities in the pineal organ which probably involved in the regulation of melatonin rhythm.

## 22. モルモット膵 EC 細胞の開口放出の観察

石原行雄, 桜井孝司, 寺川進(浜松医大, 光量子医学研究センター)

膵組織には EC(enterochromaffin)細胞が存在し、セロトニンを含んでいることが免疫染色法により知られている。しかし、その分泌機構や、生理的役割については知られていない。EC 細胞の分泌顆粒の開口放出を検討するために、ビデオ強化式微分干渉顕微鏡により、生きた膵組織を観察した。最終倍率、約10,000倍

で細片化した膵組織を観察すると、膵 EC 細胞は特徴的な楕円形を呈し、顆粒径が小さく(≈0.3 μm)、細胞内での顆粒の分布に極性がなく、腺房細胞やラ氏島細胞と区別することができた。膵 EC 細胞は、外分泌腺房内やラ氏島周囲にまばらに分布しており、孤立して存在する場合が多かった。外分泌細胞と EC 細胞を同時に観察しながら、高カリウム溶液の灌流によって刺激をすると、EC 細胞でのみ、いくつかの分泌顆粒が急激にその明るさを変えて消失する反応が認められた。一方、Muscarine 刺激では EC 細胞には殆ど反応が見られず、外分泌細胞でたくさんの顆粒の反応が見られた。腺房内にある EC 細胞の場合、分泌顆粒の開口放出する部位は基底側から腺腔側に広くひろがり、内分泌のみならず外分泌も行っている可能性が示唆された。標本を 4%パラフォルムアルデヒドで固定し共焦点レーザー顕微鏡(Ex. 488 nm)で観察すると、EC 細胞内に点状の蛍光が検出された。これによって顆粒内にアミンが含まれていることが確認できた。

## 23. モルモット単離小葉間膵管からの水分泌

石黒 洋, 成瀬 達(名古屋大学, 医学部, 第二内科)

モルモット膵から単離した小葉間膵管(径 100~150 μm)の管腔内 pH と管腔内容積をモニターして、膵導管細胞からの HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 分泌を見ると同時に水分泌の定量を試みた。表層灌流した膵管を穿刺し分泌液を排除後、BCECF-dextran 溶液を注入した。管腔内 pH (pH<sub>L</sub>)は顕微蛍光測光により測定した。1分間隔で取得した蛍光画像をバイナリーイメージに変換し管腔の面積を測定した。容積の変化率が面積の変化率の 3/2 乗になると推定して管腔内容積を算出した。1分間の管腔内容積の変化を分泌速度として単位上皮表面積当たりで表した。サッター社製のマイクロシリンジドライバーを用いて管腔に 0.5 nl づつ注入して分泌速度測定のカリブレーションを行い、計算方法が妥当であることを確認した。HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub> 非存在下では pH<sub>L</sub> は変化せず分泌も認められなかった。灌流液に HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub> を加えると pH<sub>L</sub> は一時的な低下に引き続いて急速に上昇し(>8.0), 基礎分泌(2.02±0.52 nl/min/mm<sup>2</sup>, mean±S.E.M., n=5)が認められた。secretin(10<sup>-8</sup>M)刺激により pH<sub>L</sub> はさらに上昇し、分泌速度は 3.52±0.62 nl/min/mm<sup>2</sup>(n=5)に上昇した。単離小葉間膵管は膵導管細胞からの水、イオン分泌を研究する良い実験モデルである。

#### 24. イカ Schwann 細胞のシングルチャネルの解析

筒井泉雄, ×井上 勲\* (生理学研究所, 生体膜・\*徳島大, 酵素科学センター)

神経をとりまく環境としての Schwann 細胞や glia 細胞は神経活動をささえる上でさまざまに重要な働きをしていると考えられている。イカの巨大神経においても Schwann 細胞は種々の働きをしていると考えられている。しかしその電気生理的な働きについては単離の困難さともない深く追求されていなかった。今回、イカ (*Dolichtheutis, Loligo*) 巨大神経のまわりと取り囲んでいる Schwann 細胞を単離することに成功し、その電気的生理的特性をホールセル、シングルチャネル両レベルで解析する事が可能となったので、それについて報告する。Schwann 細胞の主たるチャネルは Ca, K のチャネルであり、K チャネルは Ca チャネルを通して細胞内に導入される Ca で活性化を受けるチャネルである。この K チャネルは 40 pS の単一コンダクタンスを有し、細胞内側 Ca 濃度によって開口確率が変化する Ca 活性化チャネルであることが明らかになった。

#### 25. SH 基酸化還元剤による心筋 Na-channel の修飾とその分子機構

倉田康孝, ×張 国強, 今西 愿 (金沢医科大学, 生理学第二)

【目的】 イオンチャネル蛋白の SH 基はその構造・機能調節に重要な役割を担っている。SH 基修飾剤が各種イオンチャネルのイオン透過性に影響を与えることは知られているが、Na-channel への作用についての詳細は不明である。本研究の目的は、心筋 Na-channel 電流に対する SH 基酸化還元剤の効果を検討し、その分子機構を解明することである。

【方法】 モルモット心室筋細胞を酵素処理法により単離し、whole-cell patch-clamp 法により Na-channel 電流を記録した。Na<sup>+</sup> 電流に対する HgCl<sub>2</sub> (Hg<sup>2+</sup>), Thimerosal (RHg<sup>+</sup>), Dithiothreitol (DTT) の作用を比較検討した。

【結果】 HgCl<sub>2</sub> (1~50 μM) は心筋 Na-channel 電流を濃度依存性に抑制した。電流抑制率は膜電位非依存性 ( $\alpha \leq 0.14$ ) であり、IC<sub>50</sub> 値は 3.5~4.9 μM であった。一方、Thimerosal (50~100 μM) の Na<sup>+</sup> 電流抑制効果は軽度であった。Na<sup>+</sup> 電流抑制は不可逆的であったが、DTT (5~10 μM) の投与により電流抑制は解除された。これらの結果から、HgCl<sub>2</sub> の Na<sup>+</sup> 電流抑制作

用には、S-Hg<sup>2+</sup>-S 結合が関与していると考えられた。DTT 前処理により HgCl<sub>2</sub> の Na<sup>+</sup> 電流抑制作用は消失したが、Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> の投与により、可逆的電流抑制とともに HgCl<sub>2</sub> 効果の回復が認められた。

【総括】 SH 基の酸化 (S-Hg<sup>2+</sup>-S 結合形成) により Na<sup>+</sup> 電流の抑制が生じることが明らかとなった。複数の SH 基 (S-S 結合) の修飾により、多様なチャネル蛋白の構造変化とそれに伴うイオン透過性の変化が起こり得ることが示唆された。

#### 26. Mechanism of Inhibition by Glibenclamide of Volume-Sensitive Cl<sup>-</sup> Channels in Cultured Human Epithelial Cells

×Yan LIU, ×Takehiko TSUMURA\*, Shigetoshi OIKI & Yasunobu OKADA (National Institute for Physiological Sciences1, Okazaki 444; and \*Department of Internal Medicine, Kyoto University Faculty of Medicine, Kyoto 606, Japan)

In the preceding physiological society meeting we reported that glibenclamide inhibits the whole-cell current and accelerates depolarization-induced inactivation of volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channel in cultured human epithelial Intestine 407 cells. In the present study, we investigated the mechanisms by applying not only whole-cell but also single-channel recording techniques. Intracellular application of glibenclamide did not affect the Cl<sup>-</sup> current. At pH 7.5, extracellular glibenclamide, which is a weak acid (pKa=5.3), suppressed the current by reducing the open channel probability (P<sub>o</sub>) without significant changes in the single-channel conductance and in the open channel noise. The inactivation events took place at lower depolarizing voltages and with faster time courses in the presence of extracellular glibenclamide at pH 7.5. To clarify which form of glibenclamide, neutral or negatively charged form, is responsible, the effects of changes in the extracellular pH were investigated. The data indicated that the neutral form inhibits voltage-independently the current with much higher potency (IC<sub>50</sub> 1.7 μM) than the negatively charged form (IC<sub>50</sub> 576 μM), and that facilitation of voltage-dependent inactivation was largely induced by the negatively charged (but not neutral) form.

## 27. 容積感受性 $\text{Cl}^-$ チャンネルの細胞外カチオン依存性

清水貴浩, 岡田泰伸(生理学研究所, 機能協同研究部門)

ほとんどの細胞は, 浸透圧変化に応じて細胞容積を調節する分子機構を持っている. 低浸透圧条件下では, 調節性容積収縮(RVD)機構が働き, 細胞容積を元に戻す. このRVDには,  $\text{KCl}$ の流出が関与しており, 容積感受性  $\text{Cl}^-$  チャンネルが  $\text{Cl}^-$  流出を担っている. 最近ヒト造骨細胞において, この  $\text{Cl}^-$  チャンネルが細胞外  $\text{K}^+$  濃度の増加のみによっても活性化されることが報告された(Steinert et al., 1997). そこで今回, Intestine 407 細胞の容積感受性  $\text{Cl}^-$  チャンネルに対する細胞外  $\text{K}^+$  の効果について, パッチクランプ全細胞記録法を用いて再検討した. 等張条件下でも低張条件下でも, 細胞外溶液の high  $\text{K}^+$  溶液への置換は,  $\text{Cl}^-$  電流を活性化させることは観察されなかった. さらに, 他の細胞外カチオンの効果についても検討したので報告する.

## 28. ウシ毛様体単離平滑筋細胞における「非選択性陽イオンチャンネル」の各種陽イオン透過性の比較

高井 佳子,  $\times$ 三宅養三,  $\times$ 徳納博幸\*, 高井 章\*(名古屋大眼科・\*第一生理)

ウシ毛様体から単離した平滑筋細胞において, カルバコール(CCh)投与時に開口する選択性の弱い一種の陽イオンチャンネルの各種陽イオンに対する透過性を, 全細胞クランプ法により比較した. 電極は 100 mM-Cs $^+$ , 5 mM-BAPTA (pH 7.0) を含む液で満たした. まず細胞外を正常クレブス液(pH 7.4, 30°C)液で灌流した後, 同液中の全ての陽イオンを  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  または  $\text{Ba}^{2+}$  により等張的に置換した. 固定電位  $-40$  mV,  $[\text{Ca}^{2+}]_i = 70$  nM の時, CCh 刺激(2  $\mu$ M, 30 s)により内向きに流れた細胞膜面積あたりの電荷量の絶対値は, 各置換イオンについて次の通りであった [mean  $\pm$  sem (n) : (C/cm $^2$ ) :  $\text{Li}^+$ , 31  $\pm$  7 (9);  $\text{Na}^+$ , 24  $\pm$  6 (7);  $\text{Cs}^+$ , 20  $\pm$  5 (20);  $\text{Mg}^{2+}$ , 20  $\pm$  6 (7);  $\text{Ca}^{2+}$ , 14  $\pm$  5 (10);  $\text{Sr}^{2+}$ , 39  $\pm$  14 (14) そして  $\text{Ba}^{2+}$ , 28  $\pm$  8 (21)]. このように, 本チャンネルが各イオンをほぼ同等に通すことが確認された. なお, これらの電流は,  $[\text{Ca}^{2+}]_i = 200$  nM にすると, 5~10% に強く抑制された.

## 29. イヌ脳底動脈単離平滑筋細胞における浸透圧性伸張刺激による電位依存性カルシウム電流の増強

$\times$ 木村 誠, 小原一男, 中山貢一(静岡県立大, 薬, 薬理)

伸展誘発性収縮に電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャンネル(VDC)を介する外液からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入が関与すると考えられているが, VDC に対する機械的刺激の影響に関する報告は少ない. そこで, イヌ脳底動脈単離平滑筋細胞において, VDC に対する浸透圧性伸張刺激の影響についてホールセルパッチクランプ法を用いて検討した. 外液を等張液(321.6 mOsm/l, 150 mM mannitol)から低張液(155.5 mOsm/l, 0 mM mannitol)へ置換すると, 保持電位  $-80$  mV または  $-40$  mV から  $+10$  mV への脱分極刺激により VDC を通る  $\text{Ba}^{2+}$  をチャージキャリアーとする内向き電流( $I_{\text{Ba}}$ )は約40%増加した. このとき, 細胞容積は約2倍に増加した. しかし, 浸透圧変化は閾膜電位, ピーク電流を与える膜電位および逆転電位には影響を与えなかった. 浸透圧変化による  $I_{\text{Ba}}$  の増強は VDC 阻止薬の nicardipine (1 mM) で抑制されたが, 伸展活性化(SA)チャンネルを抑制する  $\text{Gd}^{3+}$  (10 mM) では抑制されなかった. また, 浸透圧変化は膜容量および活性化曲線や不活性化曲線には影響を与えなかった. 以上の結果より, 等張液から低張液への置換による浸透圧性伸張刺激は SA チャンネルを介さず, 直接 L-型 VDC を活性化する可能性が示唆された.

## 30. $\text{Cd}^{2+}$ による $\alpha_{1A}$ (P/Q 型) $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルの抑制及びその回復過程の解析

$\times$ 松野平宏史, 若森 実,  $\times$ 森 泰生, 井本敬二(生理学研究所, 液性情報研究部門)

$\text{Ca}^{2+}$  チャンネルのポア領域の機能を解明するため, クローン化された  $\alpha_{1A}$ (P/Q 型)チャンネルを BHK 細胞に発現させ,  $\text{Cd}^{2+}$  によるチャンネル抑制様式を patch-clamp (whole-cell) 法により解析した.  $\text{Cd}^{2+}$  は  $\text{Ba}^{2+}$  電流を用量依存性に抑制 ( $[\text{Ba}^{2+}]_o = 3$  mM の時,  $\text{IC}_{50} = 0.35$  mM) すると同時に, 電流の decay を加速した (additional block). しかし,  $\text{Cd}^{2+}$  は不活性化曲線や使用頻度依存性 (2 Hz) に影響を与えなかった. 後者に影響を与えなかった理由は, チャンネルがこの additional block から数 ms 以内に回復するためであった. 更に, 1  $\mu$ M  $\text{Cd}^{2+}$  存在下に test pulse の直前に強い脱分極を与えると, 電位 ( $V_{0.5} = 82$  mV for 2 ms) 及び時間依存性 ( $\tau = 0.39$  ms at 130 mV) に  $\text{Ba}^{2+}$  電流

の増強が見られた。この  $Ba^{2+}$  電流の増強は  $Cd^{2+}$  が強い脱分極により除去されたためと思われる。しかし、ほぼ同時に  $Cd^{2+}$  の再抑制が起こり電流の decay を加速した。この速度の解析から blocking rate coefficient は  $2 \times 10^8 s^{-1} M^{-1}$  程度で、 $Cd^{2+}$  の拡散限界速度に近い値であった。以上のことから、 $Cd^{2+}$  は open channel block を起こし、その結合部位はチャネルポアの外側の開口部付近にある事が示唆された。

### 31. 二光子励起レーザー顕微鏡による神経細胞内 $Ca^{2+}$ イメージング

中山晋介, 久場健司(名古屋大学, 医学部, 第一生理)

新しい蛍光測定法として、2光子励起レーザー顕微鏡が使われ始めている。この方法では、蛍光物質が光量の2乗に比例して励起されるため、焦点面付近の分子のみが発光し、全体としての蛍光物質の退色が遅く、光軸方向の解像度にも優れている。他方、熱効果が無視できないなどの問題点も指摘されている。今回、この技術を用いて、神経細胞内の  $Ca^{2+}$  イメージングを行った。

アルゴンレーザーにより駆動された超短パルスレーザー光(120~150 fs, 80 MHz)を、BioRad 社製走査装置を通じて、培養海馬神経細胞のスキャンを行った。神経細胞には、パッチ電極を介して  $Ca^{2+}$  感受性色素(Oregon Green BAPTA-1)を注入し、膜電位または細胞膜電流も記録した。また、分光光度計を用いて、2光子励起による蛍光波長スペクトルも確認した。

カレントクランプ下で培養海馬細胞は、自発的なバースト状の活動電位を示した。そしてこの現象にともなって、細胞体及び末梢において、 $Ca^{2+}$  濃度の上昇に対応する著明な蛍光強度の増加が観察された。

また、培養神経細胞の三次元  $Ca^{2+}$  イメージ構築のために、0.2  $\mu m$  ステップで100枚以上のスライスを行ったが、大きな退色はみられなかった。あわせて varicosity 形成部の観察も、可能であった。

### 32. 高K食ラットの腸K輸送の変化

野垣敦宏\*, \*\*, 花井洋行\*\*, 鈴木裕一\*, 林久由\*, ×金子栄蔵\*\* (\*静岡県立大学食品栄養生理・\*\*浜松医科大学第一内科)

生体Kバランス調節における腸K輸送の役割を明らかにする目的で、高K食を負荷したラットの腸のK分泌活性を、短絡電流の変化と  $^{42}K$  flux 測定により検討した。短絡電流を測定したところ、コントロ

ール食ラットでは、遠位結腸のみに基底状態のTEA感受性起電性K分泌活性は存在したが、高K食を負荷するとこのK分泌活性は亢進した。中位結腸では、高K食を負荷すると新たにこのK分泌活性が出現した。近位結腸では変化は無かった。Isoproterenol 投与により、コントロール食ラットでは、遠位結腸のみにTEA感受性起電性K分泌が増大したが、高K食を負荷すると遠位結腸ではこのK分泌はより増大し、中位結腸では新たにこのK分泌が出現した。近位結腸では、変化は無かった。同じ実験条件で、 $^{42}K$  flux を測定したが、コントロール食ラットの遠位結腸と、高K食ラットの近位結腸、遠位結腸では、Isoproterenol 投与によりTEA感受性K分泌が増大した。Net の  $^{42}K$  flux の変化量と短絡電流の変化量には有意な差は無く、短絡電流の変化はK分泌活性の変化量を示すことが確認された。apical 側にどのようなKチャンネルが存在し、K分泌に関与しているか調べるため、Isoproterenol 投与によるK分泌亢進に対し、iberiotoxin, charybdotoxin を投与したところ、約 200 nM の濃度で50パーセント抑制され、high-conductance Ca-activated K channel が関与している可能性が高いと思われた。

### 33. ラット大腸起電性 Na 吸収に対する cAMP の効果

土谷 庸, 鈴木裕一(静岡県立大学, 生活健康科学研究科, 人体生理学研究室)

cAMP がラット大腸起電性 Na 吸収に及ぼす影響を、Ussing Chamber 法を用い短絡電流(Isc)を指標として検討した。 $\beta$ アドレナリン作動薬 Isoproterenol (1  $\mu M$ ), 8Br-cAMP (1 mM), Forskolin (10  $\mu M$ ) はいずれも Amiloride 感受性 Isc をそれぞれ増大させた。また、PKA 阻害剤である H-89 (30  $\mu M$ ) 処理により、Amiloride 感受性 Isc 増大は抑制された。さらに、Nystatin (0.2 mg/ml) により Apical 膜を permeabilize した条件下では、Isoproterenol 刺激により、Na, K-ATPase が活性化された。以上により、細胞内 cAMP 濃度上昇は PKA を介して大腸起電性 Na 吸収を亢進し、Na, K-ATPase 活性化がそのメカニズムの一つとなっていることが明らかになった。

### 34. ねじ送り機構を使った等尺性筋収縮実習装置

小林宣泰, ×西村誠次, ×経澤華子, 洲崎俊男\*, ×三秋泰一\*, ×田畑繁之\*\* (金沢大学医学部保健学科作業療法学専攻・\*同理学療法学専攻・\*\*同医学

部工作係)

我々は、リハビリテーション関連専攻の生理学実習テーマとして、ウシガエル腓腹筋を用いた等尺性収縮を行っている。筋固定装置として、これまでラックピニオン機構を使った装置を使用してきた。この装置の欠点は、筋張力が大となるにつれて機構部が下がり、最初に設定した安静長を保ちがたいことであった。この欠点を除くため、このたび、ねじ送り機構を使用した実習装置を開発した。ねじ送り機構は、移動方向に対してゆるみの少ない機構であるので、これまでの装置に比べ、筋長をより一定に保つことができる。

この装置で学生が記録した刺激強度-張力曲線、0.5~20 Hz 刺激による強縮、疲労曲線の代表例を示した。ついで、体重 200 g のウシガエルを用い、長さ-張力曲線を試みに記録した。曲線は教科書に記載されているものとはほぼ同等のものが得られ、今後の使用にたえうることがわかった。

### 35. カエル運動神経終末のインパルスによるカルシウム上昇に対するノルアドレナリンとアデノシンの作用

×北村淳子, ×黄 樹明, 中山晋介, 久場健司(名古屋大学医学部, 生理学第 1 講座)

運動神経終末での伝達物質放出に対するアドレナリンの促進作用とアデノシンの抑制作用の機序を、カエル胸筋の神経筋標本に、微小電極法と光電子倍增管(と Fura-2)及び共焦点レーザー顕微鏡法(と Oregon green BAPTA)による細胞内  $Ca^{2+}$  測定法を応用し、分析した。

アドレナリンは、低  $Ca^{2+}$  高  $Mg^{2+}$  液と d-ツボクラリン添加リンガー液中のいずれに於いても、終板電位の大きさを 1.3~1.5 倍に増強し、この増強はアドレナリン除去後も数時間から 3 時間以上持続した。テタヌス刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  上昇は、アドレナリンにより変わらなかった。一方、アデノシンは、低  $Ca^{2+}$  高  $Mg^{2+}$  液中及び d-ツボクラリン添加リンガー液中で、終板電位を可逆的に抑制したが、テタヌス刺激による細胞内  $Ca^{2+}$  上昇は変えなかった。

以上の結果から、アドレナリンの促進作用とアデノシンの抑制作用は、開口放出機構又は伝達物質の動員機構が、それぞれ、促進及び抑制されることにより起こることが示唆される。

### 36. エンドセリンにより誘発される培養ウシ副腎随質細胞からのカテコールアミン遊離における種々のカルシウムチャンネルの関与

李 憲, 角岡 潔, 萩池昌信, ×山口 修, 荒木陽子, 渡邊和子, 森田啓之(岐阜大学医学部, 第一生理学)

これまでに、エンドセリン-1(ET-1)刺激により、副腎随質細胞からのカテコールアミン(CA)遊離が増加することが報告されている。しかしながら、その遊離の調節機構は明らかにされていない。最近、我々は、ETA 受容体は  $Ca^{2+}$  透過性非選択的陽イオンチャンネル(NSCC)と共役していること、また、その NSCC は受容体依存性  $Ca^{2+}$  チャンネル(ROC)阻害剤である SK & F 96365 により抑制され、電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネル(VOC)阻害剤である nifedipine によっては抑制されないことを明らかにした。今回我々は、ET-1 刺激により誘発される CA 遊離調節機構を明らかにするため、培養ウシ副腎随質クロム親和細胞を用いて、nifedipine, SK & F 96365 等の ET-1 誘発性 CA 遊離及び細胞内カルシウム濃度( $[Ca^{2+}]_i$ )に対する影響を検討した。ET-1 刺激により副腎随質クロム親和細胞からの CA 遊離および  $[Ca^{2+}]_i$  は、濃度依存的に増加したが、ET-3 ではこれらの増加は見られなかった。ET-1 誘発性 CA 遊離は、ETA 受容体特異的拮抗剤である BQ-123 によりほぼ完全に抑制されたが、ETB 受容体特異的拮抗剤である BQ-788 では抑制されなかった。外液  $Ca^{2+}$  非存在下においては、ET-1 誘発性 CA 遊離及び  $[Ca^{2+}]_i$  の増加は消失したが、nifedipine (1  $\mu$ M) には、一部分(対照群の約 70%)しか抑制されなかった。一方、SK & F 96365 は、これらの増加を対照群の約半分程度に抑制した。SK & F 96365 と nifedipine を併用した場合でも、その抑制効果は、SK & F 96365 単独の場合とほぼ同程度であった(対照群の約 50%)。これらの結果は、副腎随質クロム親和細胞において、ET-1 刺激に反応する 3 つの異なる  $Ca^{2+}$  流入経路(VOC, SK & F 96365 依存性 ROC, 及び、SK & F 96365 抵抗性 ROC)が存在することを示唆している。

### 37. N 端欠損ヒトチロシン水酸化酵素 1 型(hTH1)変異体酵素活性に及ぼすドーパミンの影響

中島 昭, 森 啓至, 太田 明(藤田保健衛生大学医学部第一生理学教室)

カテコールアミン生合成系の律速酵素である hTH1 は 497 個のアミノ酸からなり、その調節部位は N 端に

存すると考えられている。我々は一連のN端欠損 hTH1 変異体を大腸菌に発現させ、N端より52アミノ酸残基の間に、この調節部位の機能にとり重要な配列が存在することを前回報告している。今回は、N端より52アミノ酸残基の間に10種類のN端欠損 hTH1 変異体(29, 31, 33, 35, 37, 38, 39, 40, 44及び49個のアミノ酸)を新たに大腸菌に発現させ、各変異体の酵素活性をドーパミンと前孵置後測定することにより、N端側酵素活性機能調節部位を更に稠密に解析しようと試みた。

全長 hTH1 cDNA を鋳型にした PCR により NdeI 部位を 5' 側転写開始部位、BamHI 部位を 3' 側非翻訳領域に導入し wild-type 並びに上記10種類のN端欠損変異体を code する NdeI-BamHI 断片を作製した。これら断片を pET 3c ベクターに接続して大腸菌 BL 21 (DE 3) に transfect 後、IPTG により目的の酵素タンパク質の発現を誘導した。酵素検体として菌体破碎上清を用い、ドーパミンと前孵置後の酵素反応によって基質 L-チロシンより生成した L-ドーパを HPLC 法にて定量して TH 活性とし、酵素活性の至適水素イオン濃度に対するドーパミンとの前孵置の影響を検討した。

ドーパミンとの前孵置は wild-type よりN端側38個のアミノ酸残基欠損変異体に至る迄、その酵素活性を塩基性領域において濃度依存性に抑制したが、その程度は欠損の度合いに反比例していた。更に39個、40個、44個及び49個のアミノ酸残基欠損変異体においては、ドーパミン 10  $\mu$ M との前孵置による酵素活性抑制効果は認められなかった。以上の観察結果より、Gly<sup>36</sup>-Arg<sup>37</sup>-Arg<sup>38</sup>-Gln<sup>39</sup>-Ser<sup>40</sup> の配列が、N端側酵素活性調節部位の中で重要な位置を占める可能性が推定された。

### 38. <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C 3D NMR による $\beta$ ラクトグロブリンの帰属・構造・ダイナミクス研究

桑田一夫,  $\times$ 星野 大\*,  $\times$ 後藤祐児\*, 林 知也, 中村浩二, 永井直樹, 今井 一, 恵良聖一(1岐阜大学医学部生理学第二, \*大阪大学大学院理学研究科)

蛋白質の  $\alpha \rightarrow \beta$  転移は、プリオン仮説に見られるように、蛋白質の生理活性(プリオンでは病原性)に深い関わりを有すると考えられる。実際、 $\alpha \rightarrow \beta$  転移は多くの蛋白質で観測されているが、 $\beta$  ラクトグロブリンは極めて特徴的に現れる。 $\beta$  ラクトグロブリンの天然構造は  $\beta$  シートが多いが、立体構造形成の途中で、 $\alpha$  へ

リックスの多い中間体を形成することが知られている。また、興味深いことに、二次構造予測では、 $\alpha$  ヘリックスが多い。このことは、 $\beta$  ラクトグロブリンの巻き戻り中間状態では、アミノ酸配列上、隣合った残基間の相互作用が支配的であるが、天然状態ではエネルギー最小構造を実現するために、離れた残基間の相互作用が支配的であることを意味していると考えられる。

$\beta$  ラクトグロブリンの  $\alpha \rightarrow \beta$  転移を原子レベルで明らかにするために、我々は、<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C で均一に二重ラベルした  $\beta$  ラクトグロブリンを、Pichia Pastoris を用いて発現した。発現された  $\beta$  ラクトグロブリンは、天然のものと、円偏光二色性スペクトル及び COSY スペクトル(NMR)のレベルでは等しく、二次構造及び三次構造で同等であると考えられた。<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C で均一に二重ラベルされた  $\beta$  ラクトグロブリンを用いて、CBCACONH, HNCACB, NOESYHSQC, TOCSYHSQC, HCCHTOCSY 等の 3D NMR スペクトルを測定し、各残基の主鎖の帰属を行った。また二次構造及びオーダー・パラメーターを求め、立体構造と比較した。また変性に近く且つヘリックスの多い構造を実現するために、TFE 50%中における  $\beta$  ラクトグロブリンの帰属等も同様に行った。

### 39. 核磁気共鳴測定によるマウス下顎切歯における磁化移動現象の解析

中村浩二, 林 知也, 今井 一, 永井直樹, 桑田一夫, 恵良聖一, 曾我美 勝\*(岐阜大, 医, 第2生理,\*岐阜大)

生体組織は一般に、骨や歯牙などの硬組織とそれ以外の軟組織とに大別される。そのうち骨や歯牙などの硬組織内の生体高分子-水分子間相互作用の動的な研究は、これまでほとんど行われていなかった。そこで、生体硬組織における水分子への磁化移動現象の分子機構を研究するために、マウス下顎切歯をそのモデル系として用い、500 MHz <sup>1</sup>H-NMR によって歯牙組織内の水分子の縦緩和時間(T<sub>1</sub>)、交差緩和時間(T<sub>IS</sub>)を測定し、軟組織モデルとしてのマウス水晶体における水性状と比較研究した。その結果、軟組織同様、硬組織(歯牙組織)においても T<sub>1</sub>(H<sub>2</sub>O)よりも T<sub>IS</sub>(H<sub>2</sub>O)の方が組織内の水分子の挙動の相違をより鋭敏に反映していることが分かった。さらに、7.13 または -4.00 ppm を f<sub>2</sub> 照射したときの T<sub>IS</sub>(H<sub>2</sub>O)値は両組織間で有意差がみられなかったことから、組織内含水量の相違

のみならず、無機質や有機質の組成がかなり異なった歯牙組織でも、軟組織の場合と同程度の磁化移動現象が観測された。しかし、歯髄を含む歯牙と含まない歯牙(硬組織のみ)とを比較すると、歯髄を含まない歯牙組織では、水分子への磁化移動現象が相対的に生じ難くなっていることが確認された。

#### 40. ベクトル電子常磁性共鳴法による遅い分子運動の解析

林 知也, 中村浩二, 今井 一, 永井直樹, 桑田一夫, 恵良聖一(岐阜大, 医, 第2生理)

市販のウシ血清アルブミン(BSA)は、その中に含まれる微量のタンパク分解酵素によって、重水中、pD4.0 かつタンパク濃度7%以上でBSA\*ゲルと呼ばれる透明なゲルになることが知られている。今回我々は、BSAの溶液→ゲル変換に伴うSH基近傍の分子運動の変化を知るために、アルブミン唯一のSH基(Cys-34)をマレイミド・スピラベルでラベルし、遅い分子運動の測定に適したベクトル電子常磁性共鳴(EPR)法を用いてBSA溶液とゲル状態での解析を行った。測定されたスペクトルには、両状態ともに、SH基に結合し遅い回転運動を示すスピラベルと、BSA分子表面のリジン残基に結合し速い回転運動を示すスピラベルの2種類のシグナルが認められた。溶液とゲル状態での比較において、遅い回転運動を行うスピラベルの回転相関時間に相関する積分値を求めたところ、ゲル状態ではかなり大きな値を示した。このことは、BSAのゲル化に伴いSH基に結合したスピラベルの回転運動がかなり束縛されたことを示唆している。また、溶液とゲル状態での積分値をEPR装置の位相に対してプロットしたところ、両状態では全く異なる位相変化を示した。両状態での回転相関時間は異なっていると考えられるので、位相変化に対する積分値を求めることによって回転の運動状態の程度を知ることができると示唆された。

#### 41. ヒト血清アルブミンの病態生理

今井 一, 林 知也, 中村浩二, 永井直樹, 桑田一夫, 恵良聖一, 曾我美勝\*(岐阜大, 医, 第2生理・\*岐阜大)

Sogamiら(1984)は、ヒト血清アルブミンを還元型アルブミンと酸化型アルブミンとに分離観測できる特殊な高速液体クロマトグラフィ(HPLC)用カラムを見だし、このHPLCシステムを用いて各種腎疾患、

肝疾患、代謝性疾患、慢性関節リウマチ等の患者血清を多数分析した結果、還元型アルブミンと酸化型アルブミンの動態が生体内酸化還元緩衝能を良く反映していることを見だし、これを血清アルブミンの新たな生理機能として位置づけた。

運動に伴って活性酸素、フリーラジカルの生成が促進されることが近年報告されているが、生体内での酸化還元状態にどのような影響を及ぼすかについては、その直接的な知見はない。そこで剣道の夏季強化合宿を対象に血清アルブミンの酸化還元状態をこのHPLCシステムによって解析したところ、合宿前後の還元型アルブミンの割合( $f(\text{HMA})$ )はコントロール群と比較し、有意に低値を示した。しかし、通常トレーニング期間でのその値はコントロール群とはほぼ同値を示したことから、運動鍛錬者においては、通常トレーニングの中断が $f(\text{HMA})$ 値に影響を与えることが推測された。

#### 42. ミトコンドリア toxin (3-nitropropionic acid) 全身投与によるラット線条体特異病変形成と血液・脳関門破綻の時間経過について

島野泰暢, 熊崎路子, ×櫻井輝美, ×水野明宏, ×堅田武保, 西野仁雄(名古屋市立大学, 医, 第二生理)

3-nitropropionic acid (3-NPA)はミトコンドリア電子伝達系の機能不全を引き起こし、ATP産生を抑制する。3-NPAを1日1回ラットに全身投与(20 mg/kg, s. c.)すると、血液・脳関門(BBB)の破綻を伴う線条体特異病変を形成する。今回我々は、BBBの主な構成成分であるアストロサイトと血管内皮細胞のマーカー蛋白としてそれぞれグリア線維性酸性蛋白(GFAP)と第Ⅷ因子を用い、組織学的及び蛋白レベルでの解析を行い、病変形成への関与を検討した。BBB破綻の指標の一つであるIgGの血管外漏出は3-NPAの2回投与後3時間前後に始まり、漏出範囲はその後経時的に拡大した。同時に、GFAPの免疫反応性の低下及び第Ⅷ因子の免疫反応性の上昇が観察された。投与後5時間前後では、GFAP陽性のアストロサイトは線条体実質中より姿を消し、線維束内に異型アストロサイトが出現した。western blotting法を用いた蛋白レベルでの解析の結果、投与後5時間以降の線条体においてGFAPの断片化が認められたが、第Ⅷ因子は有意な変化を示さなかった。

#### 43. 2, 4-dinitrophenol (DNP) 投与によるラット線条体組織傷害

×水野明宏, 熊崎路子, 福田敦夫, 西野仁雄(名古屋市立大学, 医, 第二生理)

3-ニトロプロピオン酸(3-NPA, ミトコンドリア呼吸鎖 toxin)をラットに全身投与すると, アストログリアが強く傷害され, 線条体特異病変を生じることを前回報告した. 今回は, DNP(酸化的磷酸化 uncoupler)の脳組織傷害について調べた. DNP 投与(60~100 mg/kg, p. o.) 1時間以内に体温は43℃以上に急激に上昇し, 動物は recumbency, dyspnea に陥った. この時点で経心的に灌流固定を行い, 脳切片を MAP-2,

GFAP, IgG 抗体を用い免疫組織染色及び H-E 染色した. H-E 染色標本では線条体が脳皮質その他に比べて赤色に濃染された. 中・外側線条体領域の MAP 2 陽性細胞(ニューロン)が balloon 状に膨化し強く傷害され, 同部の血管が拡張することが認められた. アストログリアの変化は軽く, IgG の血管外漏出は認められず, 強い炎症像も認められなかった. またこれらの傷害は CA 3 においても軽度に出現したが, 脳皮質, CA 1, 歯状回では認められなかった. 3-NPA 及び DNP はともに NO<sub>2</sub>-基を持つミトコンドリア毒素であり, 線条体に強い組織傷害をもたらすが, その target 細胞は異なることがわかった.

## 第 90 回 近畿生理学談話会

日 時：平成 9 年 10 月 4 日  
 会 場：兵庫医科大学  
 当番幹事：兵庫医科大学第二生理 林 泰 正

近畿生理学談話会が年 1 回開催されることになってからずっと 9 月に開かれていたが、本学の都合により、今回は 10 月 4 日(土)に開催された。23 の演題について 1 会場で発表が行われた。演題数の関係で専門分野以外の研究をじっくり拝聴することができた。また、閉会が予定より約 30 分遅れるほど活発な討論があった。

評議員会は 30 名の評議員が参加して昼食時に行われ、新しく加入された奈良医科大学高木都教授と大阪歯科大学西川泰夫助教授が紹介された。最後に、次回の第 91 回近畿生理学談話会は、近畿大学医学部生理学教室秩父志行教授と松尾 理教授の当番幹事により平成 10 年 9 月頃開催されることが決定された。

(林)

×は臨時会員を示す

### 1. エンドセリンレセプターアンタゴニスト投与による移植肝細胞内元素動態におよぼす効果

×高屋 豊, ×山中若樹, ×今北正道, ×岡本英三, 佐々木貞雄\*, 中垣育子\*, 堀 清記\*(兵庫医科大学第一外科・\*同第一生理)

エンドセリンレセプターアンタゴニスト(TAK-044)の移植肝細胞内元素動態におよぼす影響を電子プローブX線微小部分分析法で測定し、検討した。雌性豚を用い、同所性全肝移植を行い、ドナー側では開腹時およびユーロコリンズ液保存中、レシピエント側では門脈および肝動脈血行再開前後、閉腹時、術後1週間後に肝生検し、肝細胞内の細胞質、ミトコンドリア、核の Na, P, S, Cl, K, Ca 濃度を測定した。TAK 非投与では Na, Cl は門脈再灌流後速やかに増加し、肝動脈再灌流後ピークを示し、Ca は門脈再灌流後より徐々に増加し、肝動脈再灌流後に著しく増加し、閉腹時にピークを示した。K は Ca と相反する動態を示した。P および細胞質、核の S は移植前後において著変を示さなかった。ミトコンドリアの S は細胞質、核に比して高値であったが、阻血中より徐々に減少し、肝動脈再灌流直前に最低値を示したが、肝動脈再灌流直後には急激に回復し、ほぼ移植前の濃度に戻った。これらの元素動態は一週間後に移植前値に回復した。TAK 投与では非投与でみられた門脈再灌流後の変化を抑制していた。TAK-044 のリンズ液内投与が阻血再灌流後の肝細胞保護に有用であることが示唆された。

### 2. 異なる環境温における軽強度長時間運動時の心拍変動

武村政徳, 小山勝弘, 賀屋光晴, 石垣 享, ×近藤尊子, ×Arijit Banerjee, 山下陽一郎\*, 辻田純三, 堀清記(兵庫医大第一生理・\*神戸 YMCA 学院)

自律神経活動の変化の評価として心拍変動解析が用いられている。呼吸周期に応じた高周波成分(HF)を副交感神経活動の指標とし、10秒前後の血圧変動に応じた低周波成分(LF)は圧受容器を介した副交感・交感神経両活動を反映するため、LF/HF を交感神経活動の指標としている。我々は環境温の違いや運動刺激による自律神経活動の変化を心拍変動解析を用いて報告してきた。今回、10℃および30℃の異なる環境温における安静および40%強度での120分間自転車ペダリング運動時の心拍変動を観察した。安静時、30℃において HF が低く LF/HF が高い違いを示した。運動開始後 HF は減少し、運動中も10℃と比較して30℃において低値を示した。また運動中 LF/HF は高値を示し、特に30℃において顕著であった。しかし、LF 成分のうち 0.1 Hz 前後の成分はむしろ10℃において高く増加傾向を示し、それ以下の成分は30℃において高値であった。このことから LF 成分はさらに分離して評価する必要性が示唆された。また、低強度の運動では環境温の違いによる自律神経活動の変化が顕著であることが心拍変動解析により示された。

### 3. 甲状腺機能低下症ラットの生体位駆出心における左心室の収縮期末圧容積関係の検討

大賀好美, ×李 進雄\*, 清水 悟, ×伊藤治男,

菅 弘之,\*高木 都(奈良医大, 第二生理・\*岡山大, 医, 第二生理)

**【目的】** 我々は最近ラット生体位心の収縮期末圧容積関係(ESPVR)は上に凸の曲線であることを明らかにした。イスではESPVRはほぼ直線であり、左心室心筋のミオシンアイソザイムは $V_3$ である。一方、正常ラット(11~13W)では $V_1$ である。本研究では甲状腺機能低下症ラットを作製して、その左心室のESPVRおよび変力作用薬のESPVRに与える効果を正常ラットと比較検討した。

**【方法】** ネプタール麻酔、人工呼吸、開胸下でラットの左心室尖部より3Frのコンダクタンスカテーテルと2.5Frのマикроノメータを挿入し、左心室圧容積ループを描記した。ついで、上行大動脈をゆるやかに閉塞しながら、ESPVRを求めた。実験後左心室のミオシンアイソザイムをゲル電気泳動により同定した。

**【結果】** 正常ラットではミオシンアイソザイムは $V_1$ で、ESPVRは上に凸の曲線を示し、薬理学的交感神経遮断で収縮性を下げても曲線であった。また、甲状腺機能低下症ラットでは $V_3$ に変化し、ESPVRはほぼ直線を示したが、ドブタミンで収縮性を亢進すると曲線になった。

以上の結果からミオシンアイソザイムはESPVRの非直線性に直接影響を与えず、正常ラットでは心収縮性が高いためにESPVRが曲線を示すと考えられる。

#### 4. 心筋スライスの酸素消費と motility に対する 2, 3-butanedione monoxime の効果

上月久治, 石立裕美, 坂田 進, 大賀好美, 清水悟, 岸 隆司, 菅 弘之\*, 高木 都(奈良県立医科大学, 第二生理・\*岡山大学医学部, 第二生理)

左心室一拍当りの心筋酸素消費量( $VO_2$ )と総機械的エネルギーを表わす収縮期圧-容積面積関係は直線を示す。その $VO_2$ 切片は基礎代謝と興奮-収縮連関に要する酸素消費であると考えられている。この $VO_2$ 切片について検討するため心筋スライスを用いてほぼ完全に機械的無負荷状態での心筋酸素消費に対する2, 3-butanedione monoxime(BDM)の影響を検討した。

**【方法】** ネプタール麻酔ラットの心臓左心室より300 $\mu$ mスライスを作成する。非刺激時の基礎代謝による酸素消費速度( $\dot{V}O_2$ )とフィールド刺激によるスライス収縮時の $\dot{V}O_2$ を測定した。スライスの動きは motility index(画像処理により弛緩、収縮時の面積差

を弛緩時面積で除して求めた指標)で評価した。

**【結果】** 正常 Tyrode 液での非刺激時および刺激時 $\dot{V}O_2$ はそれぞれ $1.69 \pm 0.41$ ,  $2.28 \pm 0.36$  ml  $O_2 \cdot$  min $^{-1} \cdot 100g^{-1}$ (n=6)であった。5 mM BDM は非刺激時、刺激時 $\dot{V}O_2$ ともに対照群に比べ変らなかったが、motility index は顕著な低下を示した。この結果はスライスの機械的無負荷収縮時の $\dot{V}O_2$ は主として基礎代謝と興奮-収縮連関に要する $\dot{V}O_2$ であることを示唆する。

#### 5. 光ファイバーを用いた骨格筋微小血管における酸素分圧の測定

八重樫和宏, 伊藤俊之, 森本武利(京都府立医科大学, 第一生理)

我々は組織の微小血管を流れる血液の酸素分圧測定法を開発した。あらかじめ麻酔下に、ラットの大腿部骨格筋の筋膜に2本の光ファイバー(直径250 $\mu$ m)を、先端を平行に隣接させて接着した。酸素感受性の蛍光物質を包含したリボソーム(血液中の半減期は約10時間)をラットの静脈内に投与した後、1本の光ファイバーよりパルス状のレーザー光(波長488 nm)を照射し、他方の光ファイバーより組織からの蛍光を受光してこれを光電子増倍管へ導いた。フォトンカウンティングにより蛍光の減衰を計測し、この蛍光寿命をStern-Volmerの関係式を用いて酸素分圧に変換した。リボソームが血管外に漏出しないため、この測定方法では組織を栄養する微小血管内の酸素分圧が測定される。

手術翌々日よりラットをトレッドミル上で750, 1100, 1500 m/hrと段階的に運動させ、蛍光を観測した。運動開始後、大腿部骨格筋の血流の増加に伴う蛍光信号の増強が観測されたが、血管内の酸素分圧の変化は必ずしも減少せず個体による差が大きかった。今後は、運動強度やトレーニング効果なども考慮し、この方法で測定される局所と筋全体の血流及び酸素代謝を総合的に検討する必要がある。

#### 6. 近赤外線レーザー照射が微小循環に及ぼす影響

前川恭代, 伊藤俊之\*, ×細川豊史, 八重樫和宏\*, 森本武利\*(京都府立医科大学, 麻酔科・\*第一生理)

近赤外波長域( $\lambda > 800$  nm)での低レベルレーザー照射により、疼痛緩和や創傷治癒の促進が臨床的に認められているが、その機序は良く分かっていない。そこで今回、ラット腸間膜を用い、レーザー照射が微小

循環に及ぼす影響について検討した。

Wistar ラットを用い、麻酔下に開腹して小腸腸間膜を密閉チェンバー内に固定した後、径が約 10~20  $\mu\text{m}$  の細動脈を含む部位にレーザー照射を行い、照射前後で細動脈の赤血球速度(二窓法)と血管径(ビデオ画像)を測定比較した。単一血管への照射効果を比較するため、レーザー照射は、(1) 細動脈を含む径 ~ 1 mm の範囲を照射(広範囲照射群)、(2) 細動脈上に ~ 20  $\mu\text{m}$  のレーザービームを照射(spot 照射群)の二方法で行った。また(1)では血管反応における NO の関与を調べる目的で、NO 合成阻害剤の N-nitro-L-arginine methyl ester 投与下(L-NAME 群, 5 mg/kg/hr i.v.)にレーザー照射を行って比較した。

広範囲照射群, spot 照射群ともに、有意な細動脈の拡張と赤血球速度の上昇が認められ、spot 照射によって血流が増加したことは、レーザー照射時の血流増加が組織温上昇によるものではないことが示唆された。さらに、L-NAME 群では赤血球速度の上昇は認められたが細動脈径の拡張は認められず、NO がレーザー照射による血流増加の一因となっていることが示唆された。

#### 7. ラット顎下腺における水輸送経路の検討：腺房と腺細胞の体積変化の測定

中張隆司, 今井雄介(大阪医科大学, 第一生理)

唾液分泌は、腺細胞のイオン(主に NaCl)の能動輸送により形成された腺腔と間質の浸透圧勾配により駆動される浸透流であると考えられている。灌流ラット顎下腺を用い腺の水透過性を測定した実験結果は、顎下腺上皮の水透過性は非常に高く、10 mosM の浸透圧差が腺腔と間質の間にあれば定常的な分泌が維持できることを示している。唾液腺における水輸送経路は、細胞経由と細胞間隙経由のものが提唱されている。しかし2つの水輸送経路のうちいずれが主たる経路なのか、いまだ結論をみていない。腺細胞膜と、腺房上皮の水透過性を比べるため、ラット単離顎下腺腺房を用い、同一腺房を用い、腺房細胞と腺房の体積変化を低張負荷とアセチルコリン(ACh)刺激時にビデオ顕微鏡を用い測定した。

非刺激時の腺房細胞に低張負荷を加えると腺房容積は、一過性の速い膨化をした後ゆっくりと増加した。ところが、腺房細胞容積はゆっくりとした増加を示したのみであった。また一過性の腺房容積の変化は、細胞容積の変化より速い時間経過であった。一方で、腺

房を ACh (5 オM)で刺激すると、腺房容積は、一過性の膨化をした後、ゆっくりと減少した。ところが腺房細胞容積は、ゆっくりとした減少のみを示した。また一過性の腺房容積の変化は、細胞容積の減少より速い時間経過であった。この一過性の腺房容積の膨化に一致して一過性の腺腔の膨化が低張負荷時、ACh 刺激時に、ビデオ顕微鏡で観察された。このように腺房と腺房細胞の容積変化の差は、腺腔体積の変化により説明できた。

腺腔の拡大が、腺細胞の容積変化より速いことは、水が細胞よりは細胞間の経路から腺腔へ供給されていることを示している。すなわち、細胞間水輸送経路の水透過性は、細胞膜の水透過性よりも高いことを示している。これらの結果から、細胞間水輸送経路が唾液分泌にとって重要であることが確認された。

#### 8. オッポサム腎近位尿細管細胞膜に存在する内向き整流性 $\text{K}^+$ チャネルの cGMP による活性化

久保川 学, 森 禎章, 藤本勝久, 荒木倫利, 窪田隆裕(大阪医科大学, 第二生理)

培養オッポサム腎近位尿細管(OK)細胞膜には約 90 pS の内向き整流性  $\text{K}^+$  チャネルが存在し、蛋白燐酸化酵素 A (PKA) および C による制御を受けている。今回さらに、このチャネル活性に対する cGMP の影響をパッチクランプ法を用いて検討した。

Cell-attached patch におけるこの  $\text{K}^+$  チャネル活性は、浴液に db-cGMP (100  $\mu\text{M}$ ) あるいは心房性  $\text{Na}^+$  利尿ペプチド (ANP, 10 nM) を投与すると上昇した。これらの活性上昇は cGMP 依存性キナーゼ (PKG) の選択的阻害剤である KT 5823 (10  $\mu\text{M}$ ) 存在下で阻止されたが、PKA 阻害剤である KT 5720 (200 nM) には影響されなかった。Inside-out patch におけるチャネル活性は浴液への cGMP (100  $\mu\text{M}$ ) 単独投与では変化しないが、PKG (500 U/ml) 投与で著明に上昇した。

以上より、OK 細胞に存在するこの  $\text{K}^+$  チャネルは、細胞内の cGMP 増加で活性化され、これは PKG による蛋白燐酸化の結果であり、PKA 非依存性であると考えられた。また、ANP は近位尿細管細胞内の cGMP を増加させるアゴニストの一つであると考えられた。

### 9. KIR 6.2 および KIR 6.1 サブユニットによる ATP 感受性 K チャネルの細胞内ヌクレオチドゲート機構の制御

鷹野 誠, 謝 来華, ×大谷秀夫\*, 堀江 稔\*(京都大学医学研究科, 細胞機能制御学 1・\*循環器病態学)

ATP 感受性 K チャネル (KATP) は二回膜貫通型内向き整流 K チャネル (KIR 6.1, KIR 6.2) とスルフォニルウレア受容体 (SUR1, SUR 2a, SUR 2b) から構成される。KIR 6.1 および KIR 6.2 を同一種類の SUR 1 と共に COS 7 細胞株に発現させたところ、ATP 結合モチーフは SUR 1 上のみしか存在しないにもかかわらず、再構成された KATP のゲート機構には、著しい差異が見いだされた。すなわち KIR 6.2/SUR 1 は無 ATP 溶液中で自発的に活性化され、rundown した場合にのみ MgUDP で再活性化された。また細胞内 ATP に対し高い感受性を示した (IC<sub>50</sub> = 18 μM)。一方 KIR 6.1/SUR 1 は無 ATP 溶液中では活性化されず、MgUDP 依存性に活性化され、細胞内 ATP による抑制効果の弱い KATP であることが判明した (IC<sub>50</sub> = 365 μM)。このゲート機構の差をもたらず部位を同定するため、KIR 6.1 の膜貫通部位の前後で N 端および C 端を KIR 6.2 と交換したキメラ (2-1-1, 1-1-2, 2-1-2) を作成した。2-1-1 のゲート機構は KIR 6.1 と有意な差はなく、1-1-2 は ATP 感受性のみ KIR 6.2 に近い値を示したが、チャネルの活性は KIR 6.1 と同様 MgUDP に依存した。2-1-2 は無 ATP 溶液中で自発的に活性化され、KIR 6.2 に類似したキネティクスを示した。

### 10. イオンチャネルフラックスを介する心筋細胞容積調節

×佐々木紀仁, 光家 保, 鷹野 誠, 野間昭典(京都大学医学研究科細胞機能制御学)

今回、イオンチャネルフラックスと心筋細胞容積変化との関係を定量的に解析するためにモルモット単一心室筋細胞において、パッチクランプ法により膜電流を記録すると同時に edge detecting device を用いて細胞幅を測定した。ニスタチン法による whole cell clamp 下に 200 μM pinacidil により K<sup>+</sup> コンダクタンスを増加させ、過分極あるいは脱分極電位に保持することにより持続的な内向きあるいは外向き電流を発生させると、電流量に比例して、それぞれ細胞幅の増加と縮小をきたした。この実験条件下では膜 K<sup>+</sup> イオン Flux はパッチ電極からの 1 価陽イオンの供給に

よって完全に補償されており、細胞全体のイオン量是不変であると考えられる。にもかかわらず細胞容積変化が生じたことは、細胞膜下に限局した空間での浸透圧によって細胞幅の変化が生じていることを示唆している。この仮説を検証するため、微量ガラスピペットを浸透圧試験液を単一細胞の一部分にのみ与えた。細胞幅は低浸透圧液を与えた部分で増加したが、等張液の部分は逆に減少した。全く逆の変化を高張液の実験で観察した。これらの結果は、膜イオンチャネルを介するイオン流により細胞容積は有意に変化し、細胞内では、水の移動度より溶質の移動度が大きいと考えることにより説明できる。

### 11. 褐色脂肪細胞におけるノルアドレナリンと細胞外 ATP による細胞内 Ca<sup>2+</sup> の制御

尾松万里子・北里 宏(滋賀医科大学, 第二生理)

褐色脂肪組織は哺乳類における主要な非ふるえ熱産生器官であり、交感神経終末から放出されるノルアドレナリンによって支配されている。ラットを寒冷暴露すると、血中ノルアドレナリン濃度が上昇し、2週間ほどで褐色脂肪組織が数倍に増大して寒冷馴化を起こすことが知られており、ノルアドレナリンが細胞の分化増殖を促進することも報告されている。また、単離細胞への短時間のノルアドレナリン投与が細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度を上昇させることが古くから報告されているが、その詳細は明らかではない。今回、単離培養褐色脂肪細胞における単一細胞の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度を蛍光指示薬 Fura-2 を用いて測定し、ノルアドレナリンと細胞外 ATP による効果を検討した。

細胞にノルアドレナリンを与えると細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度は徐々に上昇し、ホルモンを取り去るまで一定値を維持した。この反応は主として α<sub>1</sub>-アドレナリン受容体を介するものと思われた。一方、細胞外に ATP を与えると、アドレナリン受容体を介さずに細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度が一過性に上昇した。この反応は細胞外カルシウムを必要としなかった。これらのことから、ノルアドレナリンと細胞外 ATP による細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇は、それぞれ独立の機構によって起こると考えられた。

### 12. マウス α<sub>2</sub>-antiplasmin 遺伝子のクローニングとそのターゲティング

岡田清孝, 松尾 理(近畿大学医学部第二生理)

【目的】 線溶系の inhibitor である α<sub>2</sub>-antiplasmin

( $\alpha_2$ -AP)の遺伝子欠損マウスを作製し、 $\alpha_2$ -APの生理的役割を解明する目的で、マウス $\alpha_2$ -AP遺伝子のクローニングと解析を行い、そのtargeting vectorを作製した。

【方法】マウス $\alpha_2$ -AP DNAはP1 phageのマウス129 genomic libraryよりPCR法を用いてスクリーニングした。得られたクローンをHindIIIで分解しpUC19 vectorにsubclon化した。DNAの塩基配列解析と制限酵素 mappingを行なった。また、マウス $\alpha_2$ -AP DNAのtargeting vector pPNT、 $\alpha_2$ -APを作製し、マウス129 R1胚性幹(ES)細胞に電気穿孔法で挿入しSouthern blot法でスクリーニングした。マウス $\alpha_2$ -AP蛋白質はマウス血漿より精製した。

【結果】得られた約25 kbのマウス $\alpha_2$ -AP DNAのintron-exon接合部はGT/AG配列に従い決定した。マウス $\alpha_2$ -AP DNAのexon 2-10のサイズはヒトと同一であったが、intronはかなり異なっていた。マウス $\alpha_2$ -AP遺伝子は491個のアミノ酸配列をコードし、精製 $\alpha_2$ -AP蛋白質のN末端アミノ酸配列はVal-Asp-Leu-Pro-Gly-で、exon 3に存在する塩基配列に対応した。Targeting vector pPNT、 $\alpha_2$ -APはexon 2からexon 10の一部までを除去させたもの(蛋白質のコード領域を完全に除去)を作製し、目的とするES細胞はprobesを用いて確認した。

【考察】得られたtargeted ES細胞による $\alpha_2$ -APの遺伝子欠損マウスを作製し、それを用いた解析により $\alpha_2$ -APの生体内での役割の詳細が解明できるであろう。

### 13. 赤血球酸素解離曲線の自動測定 (3)

×A. H. Mohammed Mawjoed, 今井清博(大阪大学医学部, 第一生理)

我々は、以前に開発したヘモグロビンの酸素解離曲線自動記録装置を用いて赤血球浮遊液試料から全血の酸素解離曲線に一致する解離曲線を得るための手法の検討を行ってきた。その結果、積分球を用いた分光測光法によって散乱光によるノイズを減らすことが有用であり、単色光の波長は470 nmが適切であること、また、Bis-Tris-propane(BTP)緩衝液を用いると全血に近い解離曲線が得られることを見出した。今回、BTP緩衝液を用いて標準条件下(pH 7.4, 37°C)での測定の再現性、Bohr効果の強さ、緩衝液浸透圧濃度の影響を検討し、光顕による赤血球の形態観察を行った。50%酸素飽和時酸素分圧 $P_{50}$ は $26.7(\pm 0.3 \text{ SD})$

mmHg, Hill係数 $n_{\max}$ は $2.76(\pm 0.07 \text{ SD})$ , Bohr係数値は $-0.48$ となり、全血の値に一致した。浸透圧濃度の増加と共に $P_{50}$ は増加する傾向を示した。今回の各実験条件下では赤血球の形態は正常であった。今回の研究により、赤血球浮遊液を用いて全血の酸素解離曲線を得る手法が確立された。

### 14. マウスの呼吸抵抗測定の試み

橋本正史(大阪府立公衆衛生研究所)

オシレーション法によりマウスの呼吸抵抗を求めた。この方法をマウスのような極めて小さい動物に適用した場合、流速の変化が極めて小さく、通常の呼吸による流速の変化の中から外圧の変動( $\Delta P$ )によって生じた流速の変化( $\Delta \dot{V}$ )を捉えにくい。本研究では、Speakerより発生する一定周波数(15 Hz)の振動圧(P)を体にかける方法を用いた。円筒状のプラスチックの片方の断面にゴムシートを張り、丸く穴を開けてマウスの顔面に密着してマスクし、もう一方の断面に400メッシュのスクリーンを2重に張り、呼吸により生じるマスク内外の圧差と差圧トランスデューサーを用いて測定し、 $\dot{V}$ を求めた。上記の問題を解決するため、検出された $\dot{V}$ (マスク内外の圧差)とPは、オシレーターの出力を参照信号として、参照信号と同期する振動成分のみDC変換し増幅するロックインアンプを用いて $\Delta \dot{V}$ と $\Delta P$ を求めた。4種類の基準抵抗管を用いて作成した検量線内挿して求めたBALB/cマウスの呼吸抵抗値は $3.7 \sim 5.0 \times 10^3 \text{ CmH}_2\text{O}/l/\text{sec}$ で、Mead(J Appl Physiol 15, 325-336, 1960)の求めたモルモットの呼吸抵抗値とCrosfillとWiddicombe(J Physiol 158, 1-14, 1961)の求めた各種動物の肺抵抗と体重の関係より推定される値とほぼ範囲が一致した。

尚、本研究では兵庫医科大学研究技術部の大滝武氏の協力を得た。

### 15. 高血圧症モデルラットの脳・脊髄に対する磁気刺激効果と病変との関係

千葉 惇, 仲西宏元, ×太田善夫\*, 秩父志行(近畿大, 医, 第一生理・\*第一病理)

高血圧症モデルラットで血圧上昇に伴う脳病変の変化を磁気刺激(マグステム M200)による誘発筋電図で調べた。無麻酔下でオス15週齢の3系統の高血圧症易発性ラット(SHR, SHRSP, M-SHRSP)と正常血圧ラット(WKY, SD)を用いた。磁気刺激部位は、脳、脊髄(C3, T9, L4, S2, Ca2)上で、誘発電位は右

腓腹筋より導出した。刺激後に脳、脊髄を摘出し、HE染色にて病変を検索した。WKYとSDラットにおいて、磁気刺激により脳では7～8 msecの潜時をもつ運動誘発電位(MEP)が、頸椎部では長潜時の下行性の電位変化が認められた。脊髄上刺激では、前根と後根の切断よりH波、M波と推定された。SHRと対照のWKY、SDの脊髄のT9やL4レベルでのH波発達曲線におけるH波出現と消失が、磁気刺激強度の増加とともに起こった。SHRSPでは病変(出血、軟化、浮腫)のある脳や脊髄においてH波の消失が低刺激で起こった。脳卒中や脳軟化のあるM-SHRSPでは、MEPは観察されず、H波の消失、F波の異常波が観察された。以上より高血圧症モデルラットでは磁気誘発筋電図の応答と、病変との対応が明らかとなった。

#### 16. 頸髄前方圧迫における病態生理学的検討

×宮脇淳志, ×夫 徳秀, ×荒川 晃, ×圓尾宗司, 佐々木貞雄\*, 中垣育子\*, 堀 清記\*(兵庫医科大学整形外科・\*同 第一生理)

我々は脊髄前方からの急性圧迫モデルを作製し、急性圧迫を受けた際の脊髄を膜電位感受性色素をプローブとした共焦点レーザー走査顕微鏡法(Confocal Laser Scanning Microscopy: CLSM)を用いて、脊髄の形態・機能の観察を行い、また、電子プローブX線微小部分分析法(Electron probe X-ray micro analysis: XMA)を用いて脊髄軸索及び髄鞘内元素濃度の変化を分析し、運動誘発電位(MEP)の振幅変化と併せて考察した。

ビーグル犬の脳運動野電気刺激でのMEPを導出しつつ、前方よりスクリューによって急性圧迫を加えた後、Talovの運動機能評価法で、5段階評価した。脊髄を摘出後、膜電位感受性色素を滴下し、CLSMで形態と観察蛍光強度を観察、測定した。また、電子顕微鏡に装着されたエネルギー分散型X線分析装置で脊髄軸索及び髄鞘の細胞内元素濃度を測定し解析を行った。

圧迫された脊髄はいびつに変形し辺縁は不整で、その蛍光強度も麻痺の程度に比例して低下していた。元素濃度はコントロールと比較してK、Caの上昇を認め、後方部でより変化が大きかった。

以上よりCLSMでは細胞膜の障害程度を定量的に説明され、元素濃度分析より細胞膜の機能不全が強く示唆された。

#### 17. 非ふるえ熱産生の視床下部内神経機構

陳 小明, 細野剛良\*, 依田珠江, 福田 淳, 彼末一之\*(大阪大学医学部, 第二生理・\*保健学科)

視床前野(PO)は温度感受部位として体温調節に重要な役割を果たしており、そこに存在する温感受性ニューロンが熱放散の遠心性信号を送り、一方冷感受性ニューロンが熱産生の遠心性信号を送る、とこれまで考えられていた。しかし我々は熱産生のふるえの調節にも温ニューロンが主に働いていることを最近明らかにした(Y.-H. Zhang et al., 1995)。そこで本研究ではもう一つの熱産生反応である非ふるえ熱産生調節におけるPOの温、冷ニューロンの役割について検討した。また視床前野からの遠心路がどこを通るかについても検討した。

実験はWistar系雄ラット(300–500 g)62匹で行い、少なくとも3週間5℃の環境温、14:10 h明暗の部屋で飼育し寒冷順化させた。ラットはウレタンで麻酔し(1.4 g/Kg)、手術台に固定、肩甲骨の後5 cmを切開して熱電対を褐色脂肪組織の下に入れ、温度(Tbat)を測定した。視床前野(PO)には熱極或いは薬物投与用のカニューレを、視床下部腹内側核(VMH)に電気刺激用の電極を埋め込んだ。直腸温(Tre)も熱電対で測定しTbatとともに連続記録した。

まず、VMHを電気刺激し(0.075–0.3 mA, 33 Hz, 0.5 ms)、TbatがTreより明らかに先行して上昇することを確認後、POを41.5℃に加温しながら、再びVMHを電気刺激するとTbatの上昇は全く起こらなかった。同様に、VMH刺激に対するTbatの上昇はPOに興奮性のアミノ酸であるD, L-ホモシステイン酸を投与によっても抑えられた。この結果は視床前野の温度が上がると興奮する温感受性ニューロンが褐色脂肪組織に抑制性の信号を送ることを示唆する。実際、POとVMHの間で視床下部を切断するとTbatは上昇するので、POからは定常的に抑制性信号が送られていることを示唆する。さらにTbatの上昇は外側部(外側視床下部)のみの切断でも起こる。POからの信号は内側前脳束を下行するものと思われる。

#### 18. ラットの睡眠REM期における循環動態と交感神経活動の変化

三木健寿, 高庄敦子(奈良女子大学, 生活健康学講座)  
【はじめに】ラットを用い、覚醒・睡眠時の交感神経活動と動脈圧を測定し、睡眠時の神経性動脈圧調節機構について検討した。

【方法】 Wistar 系のラットを用い、脳波、頸部筋電図、心電図、腎交感神経活動、動脈圧、中心静脈圧測定のための電極およびカテーテルを慢性留置した。ラットの明期における覚醒・睡眠のステージの変化にともなう交感神経活動および循環動態の変化を観察した。覚醒期は 1) グルーミング、2) グルーミング以外の運動、3) 安静期、そして睡眠期は 4) Non-REM 期と 5) REM 期に分けて解析した。

【結果・考察】 ラットのグルーミング、安静、Non-REM 期にはその身体活動レベルの低下に従い動脈圧、腎交感神経活動、心拍数は直線的に低下した。しかし、REM 期には動脈圧は上昇し、腎交感神経活動および心拍数は低下し、この直線関係からずれた反応を示した。腎交感神経活動は Non-REM から REM 期に移行すると同時に抑制され Non-REM 期に比べ約 50% 低下した。心拍数は REM 期に 20 拍/分の低下を示した。しかし、動脈圧は REM 期になると徐々に上昇した。以上、ラットの睡眠 REM 期には圧受容器反射による交感神経性動脈圧調節系が他の覚醒および Non-REM 期と異なることが明らかとなった。

### 19. サルの発声運動における小脳の関与

玄番史恵, 久宝真一, 松崎竜一(関西医大, 生理)

サルの大脳皮質表面と 2.0-3.0mm 深部に設置した電極により運動前野、顔面運動野および体性感覚野から、発声に先行する表面-陰性、深部-陽性(浅層性視床大脳皮質応答)のフィールド電位(発声準備電位)を記録した。右側小脳半球を切除すると、左側の顔面運動野と運動前野腹側部の発声準備電位が消失し、発声が変わった。残存の左側小脳核を電気刺激し、右側の運動前野腹側部と顔面運動野の埋め込み電極から表面-陰性、深部-陽性のフィールド電位を記録した。以上から小脳-大脳皮質投射の神経回路が発声時に作動することが示唆された。このことを明らかにする目的で以下の実験を行った。麻酔した 4 匹のサルの小脳外側核と中位核を電気刺激し、反対側の顔面運動野および運動前野腹側部の背側部分から表面-陰性、深部-陽性のフィールド電位を記録した。別の 4 匹のサルの顔面運動野と運動前野腹側部に蛍光色素(Fast Blue, Diamidino Yellow)、大脳と対側の小脳核に WGA-HRP を注入した結果、小脳核から顔面運動野への投射は主に視床後外側腹側核吻側部で中継され、運動前野腹側部上部への投射は視床 X 領域で中継されることが判明した。以上から小脳-視床後外側腹

側核吻側部-顔面運動野投射および小脳-視床 X 領域-運動前野腹側部投射回路の発声運動への関与が示唆された。

### 20. 迷走神経電気刺激による視床髄板内核群の侵害受容ニューロン活動への影響

西川泰央, 岩住征紀, 吉田 洋, 小山なつ\*, 横田敏勝\*(大阪歯大, 生理・\*滋賀医大, 第一生理)

疼痛伝導路内側系の主要中継核である視床髄板内核群の侵害受容ニューロン活動に及ぼす迷走神経求心路刺激の影響を調べて、疼痛伝導路内側系への迷走神経求心性入力に修飾効果を検討した。

実験にはウレタン・クロラローズで麻酔したネコを用いた。視床単一ニューロン活動の導出には、2% pontamine sky blue 含有の 0.5M 酢酸ナトリウム溶液を充填したガラス毛细管微小電極を使用した。犬歯歯髄、第二頸神経背側枝、大内臓神経求心路および中脳網様体への電気刺激(試験刺激)に対する反応に及ぼす頸部迷走神経電気刺激(条件刺激)の影響を条件刺激-試験刺激間隔をそれぞれ変えて調べた。そして、ニューロン活動の記録部位および脳幹の刺激部位は組織学的に同定した。

試験刺激に反応する侵害受容ニューロンを髄板内核である束傍核および外側中心核から検出したところ、髄板内核侵害受容ニューロンには迷走神経条件刺激によって興奮するもの、抑制されるものおよび影響を受けないものが認められた。また、疼痛伝導路内側系では、迷走神経求心性入力による視床への上行性抑制は認められなかった。

### 21. 視床後外側核への音入力：視床網様体核の前背側部経由

× 畠田猛真, 木村晃久, × 間 三千夫, 玉井靖彦(和歌山県立医科大学, 第一生理)

視床の様々な部位は音入力を受けている。音刺激に応答するニューロンの検索実験で、我々は内側膝状体(GM)以外に視床枕(Pulvinar; PL)、視床後外側核(N. lateralis posterior; LP)、視床後内側核(N. lateralis medialis; LM)、膝上核(Supragenulate nucleus)や正中中心核(N. centrum medianum; CM)でも音に反応するユニットが見られることを猫を用いて確認した。そこで、LP についてこの音刺激の入力源を検索する目的で、タングステン入り微小ガラス管電極を用い、音刺激(ホワイトノイズ)に反応するユニットを細胞外記

録にて確認した後、その部位に WGA-HRP の細胞外注入を行い、逆行性ラベルを用いて検索した。その結果、HRP ラベルされた細胞体は視床網様体核(thalamic reticular nucleus; RE)の前背側部のみ認められ、GM, 上丘(SC), 下丘(IC)など脳幹部にはみられなかった。このことから、LP で記録される音刺激で応答するニューロンは、下位脳幹からの上行路は考えられず RE からの入力を想定した。そこで、RE の前背側部で細胞外記録を行ったところ音に反応するユニットがみられた。この部位は従来から言われている RE の聴覚部である腹外側部とは異なる。また、この部位に WGA-HRP 細胞外注入を行ったところ、逆行性にラベルされた細胞体は LP, RE の腹外側部, 上丘腕(BCR)にみられた。

以上のことより LP に対する音入力新しく見つかかった音入力に反応するニューロンのある RE の前背側部からの可能性があり、この RE の前背側部への音入力は、従来からいわれている RE の聴覚部である腹外側部か、あるいは脳幹の BCR から来ている可能性がある。ちなみに RE の腹外側部は、GM から大脳皮質への投射する軸索の側枝が投射するといわれている。

## 22. 正中中心核への音入力：上丘および橋延髄網様核からの上行路

×堂西倫弘, ×畠田猛真, 木村晃久, 玉井靖彦(和歌山県立医科大学, 第一生理)

音に反応するニューロンは、視床の内側膝状体以外に視床枕(Pulvinar; PL), 視床後外側核(N. lateralis posterior; LP), 視床後内側核(N. lateralis medialis; LM), 膝上核(Supragenulate nucleus)や正中中心核(N. centrum medianum; CM)で記録される。この内側膝状体以外の視床核に入力する上行経路を猫を用いて検索した。

まず、音刺激(ホワイトノイズ)に反応するニューロンのある LP の部位に WGA-HRP を注入して LP に至る求心路の検索をしたが、LP に終末する細胞体は下位の脳幹部に見られなかった。それに対して LM から CM にかけての同様の検索では、上丘(Superior colliculus; SC)および橋延髄網様核(Nucl. pontomedul-

lary reticular formation; PRF)に HRP 染色細胞体が見られた。次に、CM と SC および CM と NPO にそれぞれ微小電極を挿入して、それぞれの部位で音入力に対するニューロンの応答を確かめた後、CM と SC および CM と NPO 部位間の順行性および逆行性のニューロン応答を調べた。その結果、CM と SC 間および CM と NPO 間のいずれにも順行性および逆行性のニューロン応答を認め、CM への音入力それぞれ SC および NPO を経由して入力していることを確かめた。

これらの結果は音入力も視床の内側膝状体を経由する一次感覚入力以外の上行路が視覚入力の膝状体外経路と同様に存在することを示している。また、CM は髄板内核群に位置し、脳幹網様体に始まる脳賦活系の視床部分であり、この部位に対する音の入力は脳賦活系との関係において面白いものがある。

## 23. アデノシン誘発性タウリン遊離に関与するアデノシン受容体

秦 順一, 賀来智宏, 林 泰正(兵庫医大, 第二生理)

アデノシン輸送抑制薬によって内因性アデノシンを上昇させると、高  $K^+$  誘発性タウリン遊離は増加するが、海馬拮抗性抑制の発生は減少する [Kaku et al., Brain Res., 658 (1994) 39-48; Hada et al., Eur. J. Pharmacol., 305 (1996) 101-107]。今回、アデノシンによる高  $K^+$  誘発性タウリン遊離の増加に関与するアデノシン受容体のサブタイプを同定するために、ラット海馬内微小透析法を用いて検討した。

0.5 mM アデノシンは高  $K^+$  誘発性タウリン遊離を増加させた。2  $\mu$ M PIA (選択的アデノシン  $A_1$  受容体作動薬)は高  $K^+$  誘発性タウリン遊離に対して影響を与えなかった。20  $\mu$ M CGS 21680 (選択的アデノシン  $A_{2A}$  受容体作動薬)と 1  $\mu$ M DPCPX (選択的アデノシン  $A_1$  受容体拮抗薬)は高  $K^+$  誘発性タウリン遊離を増加させた。1 mM DMPX (アデノシン  $A_2$  受容体拮抗薬)は CGS 21680 の効果を遮断した。これらの結果から、アデノシンはラット海馬内のニューロンとグリア細胞からアデノシン  $A_{2A}$  受容体を介して高  $K^+$  誘発性タウリン遊離を増加させることが証明された。

## 第49回日本生理学会中国四国地方会

日 時：平成9年11月7日(金)  
 場 所：岡山国際交流センター，国際会議場  
 当番幹事：岡山大学医学部生理学第一講座 松井秀樹  
 岡山大学医学部生理学第二講座 菅 弘之  
 岡山大学歯学部口腔生理学講座 足立 明

日本生理学会中国四国地方会は11月上旬の金曜日開催が恒例となっている。今回は竣工間もない岡山国際交流センター内の国際会議場を会場に選んだ。設備の完備した本格的な会議場ではあるが、岡山県所有の建築物で入り口に案内板を出すことが許されず、参加者が迷うのではないかと懸念したが、そのようなことも無くスムーズな運営ができた。JR 岡山駅西口前という至便さでも大変に好評であった。

会員参加者108名に加え、前回評議委員会の申し合わせにより、初めての試みとして学部学生の聴衆としての参加を許可し無料とした。岡山大学医学部では当日が生理学実習と重なっていた事もあり、体験学習として学生に参加を促したところ、96名の学生が参加し、学会開始時には椅子が不足するほど盛況であった。講義、実習とは異なる最新の研究発表に接して学生たちは印象深かった様子である。生理学の将来を担う学部学生達への啓蒙活動の一環としても価値ある試みと思われた。次回以降もこの試みは継続される予定である。またいくつかの大学からは学部学生が共著発表者として参加していたことも申し添えておきたい。

評議会では新任教授の小坂博昭教授(香川医科大学第二生理学)、松川寛二教授(広島大学医学部保健学科)が紹介された。次回は愛媛大学医学部第二生理学講座の前田信治教授の主催で11月6日(金)に行われる予定。次回は山口大学医学部第一生理学講座の小林誠教授の主催で行われることが決まった。なお、山口大学医学部生理学は今後の地方会活動を中国四国地方会に一本化することが小林教授より報告され了承された。

多くの方々に参加していただき、活発な討論をしてくださった事に感謝致します。また、座長をお引き受けいただきました先生方にお礼申し上げます。

×は臨時会員を示す

### 1. カルシニューリン遺伝子の新しい機能的側面— Death Suppressor bcl-2 を標的とするアポトーシス 制御因子として—

近藤英作<sup>\*,\*\*</sup>、松井秀樹<sup>\*</sup>(岡山大、医、<sup>\*</sup>生理・<sup>\*\*</sup>病理)

セリン/スレオニン・フォスファターゼ2Bであるカルシニューリンは、最初ウシ脳から精製クロニングされ中枢神経系に豊富に発現する蛋白である。Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性シグナル伝達経路で活性化され細胞増殖・分化や細胞周期、NFATなどの転写制御因子、神経系ではレセプターを介した情報伝達調節機構にかかわっていることが知られており、またリンパ球系では移植免疫にかかわるサイクロスポリンAとの反応機序が主に解析されてきた。従って、カルシニューリンはフォスファターゼとしての機能を介し多様な生命現象に関わるマルチポテンシャルファクターである。今回我々は新たにカルシニューリンが

death suppressor としてよく知られる Bcl-2 を特異的にターゲットイングしアポトーシス制御因子として細胞死制御機構をコントロールしていることを in vitro 遺伝子導入系で証明したのでこれを報告する。

### 2. P19 細胞においてレチノイン酸により誘導される転写因子 ATBF1 発現の解析

×田井祐爾、×三浦 裕<sup>\*</sup>、徳田雅明、×玉置大器<sup>\*\*</sup>、畠瀬 修(香川医大、医、<sup>1</sup>生理・<sup>\*</sup>名市大、医、細菌・<sup>\*\*</sup>Univ. of Calgary)

ホメオドメインは DNA 結合モチーフであり、発生、分化、パターン形成に重要な働きを有する。Zn フィンガーも DNA 結合モチーフであり、幅広い遺伝子発現調節にかかわっている。1(AT-motif binding factor 1)は4個のホメオドメインと23個の Zn フィンガーを有する巨大な転写因子で幅広い機能が予想され、特に神経細胞分化に伴い発現は増加する。マウスの胚性腫

瘍細胞株 P19 細胞をレチノイン酸(RA)で神経分化させた系でも ATBF1 の発現が誘導されるが、短時間 RA 刺激で ATBF1 が誘導されることは知られていない。短時間 RA 刺激で誘導される ATBF1 の発現パターンと、神経分化誘導に関与する転写因子 AP-2 と Oct-3 の mRNA の経時的発現パターンを RT-PCR を用いて調べた。

### 3. T3-L1 細胞の水輸送機構

×岩佐佳子, 嶽本和久, ×張 文穎, 広野 力, 柴芳樹(広島大, 歯, 口腔生理)

T3-L1 細胞は細胞外液を低浸透圧にすると細胞内に水を輸送し、空胞として水を貯蔵する。細胞外液から  $\text{Cl}^-$  を除去すると空胞形成が抑制されたが、 $\text{Na}^+$  を除去してもこの空胞形成は抑制されなかった。また、 $\text{Cl}^-$  チャネルの阻害剤 DPC や  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  トランスポーターの阻害剤 DIDS によって空胞形成が抑制された。 $\text{Cl}^-$  電流を測定したところ DPC, DIDS によって顕著に抑制された。これらのことから、細胞内への水の輸送には細胞膜での  $\text{Cl}^-$  輸送が必要であることが示唆された。

### 4. 低Kイオン条件下での細胞周期調節蛋白質の発現量と局在

細川敬子\*, 山口久雄, 池原敏孝, 吉崎和男, 宮本博司\*(徳島大, 医, 1生理・\*徳島文理大, 家政)

無血清培地(K-CDM)の  $\text{K}^+$  を  $\text{Rb}^+$  で置換培養(Rb-CDM)した同調 HeLa 細胞は、細胞周期の G1 初期で進行を停止する。この時、insulin, LDL を添加するとその進行は回復した。このような低  $\text{K}^+$  条件下で、cyclin B, D, E, retinoblastoma(RB)蛋白と P16 について、二次抗体法で細胞周期の各期におけるその発現量と局在を観察した。細胞周期の各時期の指標は  $^3\text{H}$ -チミジンの取込みから求めた。cyclin B の発現量は細胞周期の時間経過と共に増加し G2 期で最大値を示した。cyclin D1 は G1 初期から増加し始め、G1 後期でピークを示し S 期に入ると減少した。また cyclin E は S 期から増加を示した。PSTAIRES は K-CDM と比べて Rb-CDM では僅かに減少したが、細胞周期を通じて一定値を示した。cyclin D1-cdk 阻害蛋白質である P16 は S 期以降増加し、また、insulin, LDL 濃度と共に増加したが、G2 期では減少し始めた。cyclin D1-cdk によってリン酸化される RB 蛋白は時間経過と共に増加したが、insulin, LDL 濃度の増加と

共に減少した。一方、P16 は RB 蛋白質の発現量と負の相関関係を示した。従って、低  $\text{K}^+$  条件下での insulin, LDL のような細胞増殖因子は、RB 蛋白質の発現量を減少させることによって、細胞周期の進行を回復させていることが示唆された。

### 5. 各種ナトリウムチャンネルのグラヤノトキシン感受性比較

木村隆広, 石井秀将, 焼広益秀, 井本敬二\*, 瀬山一正(広島大, 医, 1生理・\*生理研, 液性情報)

植物毒であるグラヤノトキシン(GTX)は電位依存性  $\text{Na}^+$ -チャンネルに特異的に結合し、その活性化の電位依存性を過分極方向へシフトさせ、かつ不活性化過程を取り除く作用を持つ。このため、GTX と  $\text{Na}^+$ -チャンネルとの関係を調べる事で  $\text{Na}^+$ -チャンネルについての情報を得る事ができる。実験にはカエル心室筋の  $\text{Na}^+$ -チャンネル、カエル後根神経節(DRG)の TTX 非感受性  $\text{Na}^+$ -チャンネルと TTX 感受性  $\text{Na}^+$ -チャンネル、CHO 細胞にラット脳の  $\text{Na}^+$ -チャンネルの  $\alpha$  サブユニットを発現させたもの、計4種類のチャンネルを使用して GTX に対する感受性について検討した。GTX についても GTX I と  $\alpha$ -dihydrograyanotoxin II ( $\mu\text{H}_2$ -GTX II)の2種類について比較した。その結果 DRG の TTX 非感受性ナトリウムチャンネルと CHO が、これらの毒に対して感受性が高い事がわかった。このことより、GTX はナトリウムチャンネル  $\alpha$  サブユニット内に結合すると推測される。

### 6. 反復刺激で誘発されるカエル運動神経終末の $\text{Ca}^{2+}$ 誘起性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離

成田和彦, 越智和典, 久場健司\*(川崎医大, 生理・\*名古屋大・医・1生理)

トノサマガエル運動神経を低  $\text{Ca}^{2+}$  (0.2 mM), 高  $\text{Mg}^{2+}$  (10 mM) 溶液中で反復刺激(50 Hz)し続けると、微小終板電位(MEPP)頻度は数10秒のうちに比較的ゆっくりとした一過性の上昇(transient rise)を示し、またしばしばオシレーションを伴うことが観察されている。共焦点レーザー顕微鏡を用いた Indo-1 及び Oregon green の蛍光変化の観察から、transient rise は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )の上昇を伴うことが示された。これらの MEPP 頻度及び  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の transient rise は TMB-8 (4~10  $\mu\text{M}$ ) や Ryanodine (10~50  $\mu\text{M}$ ) で抑制されることから  $\text{Ca}^{2+}$  誘起性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離(CICR)が関与することが示された。NaCN (2 mM) で

は transient rise は抑制されずに、むしろ促進され、Thapsigargin (1 ~ 8  $\mu$ M) では可逆的に抑制された。transient rise の直後に短い時間 (5 ~ 60秒) 刺激停止し、再び反復刺激を与えると、停止時間に比例した高さの transient rise が再び起こり、これも Thapsigargin により抑えられた。これらの結果から反復刺激により Thapsigargin に感受性を持つ  $Ca^{2+}$  貯蔵所から Ryanodine 感受性チャネルを介する  $Ca^{2+}$  誘起性  $Ca^{2+}$  遊離が起こることが示唆された。

### 7. 脳内 DHA 量の変化が記憶学習能力に与える影響～DHA 長期投与とラットを用いた検討～

蒲生修治, 橋本道男, <sup>×</sup>Md. Shahdat Hossain, 原俊子, 榎村純生(島根医大, 1生理)

ドコサヘキサエン酸(DHA)は中枢神経の細胞膜に高濃度に含まれ、中枢機能発現への関与が指摘されている。今回我々は、DHA が記憶形成に与える影響を検討するために、魚油無配合飼料で継代飼育した第三世代の5週齢雄ラットに DHA (300 mg/kg/day) の長期経口投与を行い、8方向放射状迷路を用いて記憶学習能力の評価を行った。DHA 投与群は対照群と比較して参照記憶に関わる学習成績が有意に向上したが、作業記憶には影響がみられなかった。これらのラットから大脳皮質、海馬、及び小脳を採取し、組織の脂肪酸組成を分析したところ、DHA 投与群の大脳皮質と海馬で有意な DHA 量の増加が観察されたが、小脳では変化が認められなかった。DHA 投与群の大脳皮質では、過酸化脂質レベルの有意な低下も観察された。大脳皮質と海馬は記憶機能の集積部位と考えられている。DHA がこれらの部位に選択的に蓄積した事は、DHA が両部位の機能発現に関与する可能性を示唆している。更に DHA は、大脳皮質においては過酸化脂質の生成を抑制し、神経細胞を保護する可能性が示唆された。

### 8. 軽微低脳温・プロベントフィリン併用投与による脳蘇生効果

柳瀬尚人, 片岡喜由(愛媛大, 医, 1生理)

スナネズミ一過性前脳虚血モデルで、虚血再灌流1時間後より32℃、5時間の低脳温処置を施すと、虚血負荷7日後に残存する海馬 CA1 ニューロンの大部分が虚血負荷30日後には死滅してしまう。そこで、軽微低脳温の薬物補充療法として、脳保護薬として知られているキサンチン誘導体プロベントフィリン(PPF)が

慢性期の海馬 CA1 ニューロンの脱落を抑止するかどうか検討した。

虚血処置として、1%ハロセン維持麻酔下で脳温および直腸温を37~37.5℃に維持し、スナネズミの両側総頸動脈を5分間血流遮断した。虚血後の脳温測定は、テレメトリーシステムを用いた。実験群は、無処置群(単純虚血群)、低温処置単独群(虚血後1~6時間、32℃の低温処置)、PPF 単独投与群(虚血再灌流1時間後より1日1回10mg/kg 腹腔内投与、14日間連続)、低温処置・PPF 併用投与群(PPF の初回投与は虚血再灌流1日後)の4群とした。虚血負荷30日後の無処置群、低温処置単独群および PPF 単独投与群の海馬 CA1 残存ニューロン数の割合は、それぞれ約6%、4%、15%で、ニューロン蘇生効果は観察されなかった。一方、低温処置・PPF 併用投与群の残存ニューロン数の割合は、約60%で、有意なニューロン蘇生効果が観察された。以上のことより、低温ストレスを軽減するための短時間の軽微低脳温の薬物補充療法として、PPF がある程度有効であることが判明した。

### 9. 一過性前脳虚血後の低体温法における脳循環代謝

<sup>×</sup>岡 左永子<sup>1</sup>, 中村丈洋<sup>1,2</sup>, 宮本 修<sup>1</sup>, 山神真<sup>4</sup>, 住谷和則<sup>3</sup>, <sup>×</sup>池上 容<sup>5</sup>, 豊島哲彦<sup>1</sup>, 岡田泰士<sup>4</sup>, 根本哲郎<sup>3</sup>, 林田嘉朗<sup>5</sup>, <sup>×</sup>長尾省吾<sup>2</sup>, 村上哲英<sup>6</sup>, 板野俊文<sup>1</sup>(<sup>1</sup>香川医大, 生物・<sup>2</sup>脳神経外科・<sup>3</sup>基礎スポーツ医・<sup>4</sup>香川大, 保健体育・<sup>5</sup>産業医大, 応用生理・<sup>6</sup>倉敷芸術科学大, 生理)

実験的低体温における復温の影響について検討をした。砂ネズミ一過性前脳虚血モデルを用い虚血直後より、moderate hypothermia 群として脳温30.5℃、4時間、deep hypothermia 群として脳温24℃、2時間の低体温を行った。グループ分けを復温時間により、moderate hypothermia で M-standard 群(30分)、M-fast 群(15分)、M-slow 群(90分)、また deep hypothermia で、D-standard 群(60分)、D-fast 群(30分)、D-slow 群(180分)、階段状に復温した D-stepwise 群の合計7群について検討した。laser Doppler による脳血流、酵素を用いた微少環流透析法による細胞外乳酸値を測定し、1週間後の海馬 CA1 領域の組織学的検討を行った。組織学的に全群で神経細胞死抑制効果がみられたが、D-fast 群のみ有意に低下していた。脳血流は全群において、冷却で低下し復温で回復するが、D-fast 群

のみ回復不良を認めた。乳酸値およびグルタミン酸値は D-fast 群のみ復温での上昇を認めた。砂ネズミにおいて30℃以下の低体温からの短時間の復温は、脳血流の回復を遅らせ、細胞外乳酸値が上昇することから、脳循環代謝の不均衡が生じたものと考えられる。

#### 10. 神経細胞によるマイクログリアの活性化

首藤聡子, 田中潤也, 徳 和子, 前田信治(愛媛大, 医, 2生理)

神経細胞傷害の際、マイクログリアの急速な活性化がおこるが、その機序は明らかではない。今回我々は、神経細胞がマイクログリアの機能と形態に及ぼす影響を共培養系を用いて検討した。ラットマイクログリアと大脳皮質神経細胞を共培養すると、マイクログリアは活性化型とされるアマーバ型となり、電子顕微鏡による観察では、マイクログリア細胞質にゴルジ体と分泌顆粒の著しい発達が見られた。また、神経突起との間にシナプス様の接着構造の形成も観察された。機能的には、マイクログリアが神経細胞と直接接触していると、活性酸素産生能の増強がみられたが、近傍に存在するだけでは活性化は著明ではなかった。さらに、神経細胞の膜分画をマイクログリアに添加することにより、活性酸素産生能は増強したが、膜分画を事前にトリプシンあるいはノイラミナーゼで処理することにより、膜分画の活性化能は消失した。これらの結果は、マイクログリアの活性化には神経細胞膜との直接の接触が重要であり、特に神経細胞膜表面に局在する糖蛋白質の関与を示唆している。また、神経細胞によるマイクログリアの活性化は比較的急速におこり、虚血時などに見られる急速なマイクログリアの活性化機序を説明できる可能性がある。

#### 11. 培養静止型マイクログリアの実現

田中潤也, 徳 和子, 首藤聡子, 前田信治(愛媛大, 医, 2生理)

マイクログリアは、中枢神経系においてマクローファージと同様の機能を発揮しうる中胚葉由来のグリア細胞であり、幼若期や病的条件下では活発な貪食能を示す。一方、成熟した正常脳実質には、貪食能のない突起を伸展した静止型マイクログリアのみが存在する。静止型マイクログリアの役割については現在も明らかではない。その理由の一つとして培養系で静止型マイクログリアを安定に実現することが困難であったことが挙げられる。我々は、マイクログリアが培養液

中のセリンとグリシンの濃度に依存して活性化されること、両アミノ酸濃度が5 $\mu$ M以下となると、マイクログリアは一酸化窒素、活性酸素産生能、ライソゾーム酵素活性、代謝活性などが著しく低下した機能的静止状態となることを見出した。また、このような機能的静止状態にあるマイクログリアをラミニンとフィブロネクチン含む細胞外マトリックス上で培養することにより、突起を伸展し、かつ、マクローファージ様機能の低下した静止型マイクログリアを培養系において実現することに成功した。この培養静止型マイクログリアは、何らかの神経栄養因子様物質を分泌しており、そのコンディショントメディウムは大脳皮質神経細胞の生存期間を延長し、一酸化窒素により誘導される神経細胞死を著しく抑制した。

#### 12. ラット肩甲間褐色脂肪組織に及ぼす超音波刺激の効果

妹尾広正, 森田雄介,  $\times$ 神谷章平\*,  $\times$ 秋本龍二\*(徳島大, 医, 2生理・\*ホーマイオン研究所)

哺乳動物におけるエネルギー収支の調節に重要な役割を果たしている褐色脂肪組織(BAT)の熱産生機能は、この組織に豊富に分布する交感神経末端から放出されるノルアドレナリン(NA)の役割が大きい。今回われわれは、微小透析法を用いて、自由行動下のラット肩甲間BATにおける細胞外遊離NAの連続的測定を試み、同時に、BATに対する超音波刺激の影響について検討した。

【方法と結果】 ウィスター系雄性ラット11匹をエーテル麻酔下で肩甲間BATに透析プローブを挿入、薄い円盤状容器に入れた超音波振動子を肩甲間BAT直上皮膚に固定した。リングル液を毎分2mlで灌流し、2時間後、オンラインで13分毎連続的に透析液中のNAを測定した。NA遊離の安定時期に、超音波刺激([1MHz超音波, 61Hz変調の断続波, 0.8~1.0W/cm<sup>2</sup>, 30秒間刺激+1分間休み]の9回反復)したところ、刺激前に比べて細胞外NA遊離が有意に上昇することを観測した。

【考察】 本研究は、自由行動下のラット肩甲間BATにおける細胞外NA遊離を微小透析法を用いて初めて連続的に測定したものであり、超音波刺激の結果は、BATにおけるNA遊離による熱産生に対して超音波刺激が有効に作用することを示唆している。

### 13. flunitrazepam の腹腔内投与がラット睡眠中の 血圧・心拍数に及ぼす影響

×坂田三恵, ×斎藤大輔, 勢井宏義\*, ×佐野勝徳, \*森田雄介(徳島大, 総合科学, 行動科学・\*徳島大, 医, 2生理)

REM 睡眠期において血圧は大きく変動し, 血圧の相動的上昇に先行して海馬シータリズムの周波数が大きくなる. 一方, benzodiazepine 系薬物は海馬シータリズムを徐波化する. 今回我々は flunitrazepam (FNZ) を腹腔内投与したラットにおける血圧変動及び脳波周波数の解析を行い, REM 睡眠期の海馬シータリズムと血圧変動の関係を検討した. 実験は, 血圧測定用送信機及び皮質・海馬脳波, 眼球運動, 筋電図記録用電極の植え込み手術を施したラットを用いた. 実験日の12時に生理食塩水, FNZ 0.01 mg/kg, 0.02 mg/kg の腹腔内投与を行い, 以降6時間のポリグラフ記録を行った. 投与はランダムに, 48時間以上の間隔をあけて行われた. FNZ は睡眠量及び睡眠期の血圧・心拍数の平均値に影響を与えなかった. NREM 睡眠期の脳波デルタ帯域のパワーを濃度依存的に減少させた. FNZ 0.01 mg/kg 投与はREM睡眠期の海馬シータリズムの周波数を小さくし, 血圧 CV % を抑制した. REM 睡眠期において, 海馬シータリズムと血圧 CV % は FNZ に対し, 投与濃度及び投与後の時間経過について関連性があることが示された.

### 14. Leptin receptors levels in the female rat: reproduction.

×L. E. Johnstone, S. Takahashi, F. Okutani & T. Higuchi\* (Dept. Physiology, Kochi Medical School & \*Dept. Physiology, Fukui Medical School)

Leptin restores fertility in sterile obese mice and rats and as a result may have a role in reproductive capability and function. Therefore we have examined plasma leptin levels in female rats during the estrous cycle, and during late pregnancy and lactation. We found a significant increase in plasma leptin during the dark, when feeding is greatest, compared to light levels. However this diurnal variation is abolished as the cycle enters estrous. This decrease may result from estrogen induced increases in food intake. During late pregnancy, d 16-d 20, leptin levels are significantly elevated in the dark period compared to light period. On d 21, through d 22/23, expected day of par-

turition and parturition itself leptin levels remain low with no dark period increases. As lactation progresses through d 1, 2, 6, 13 upto d 20 there is no resumption of diurnal variation as seen during late pregnancy despite the large food intake consumed during lactation. Leptin secretion induced by increased food intake maybe decreased or inhibited. It maybe one of the essential requirements of lactation to remove the effects of this satiety factor. We have therefore examined the level of leptin receptors in the brain and reproductive tissues in these reproductive states.

### 15. スフィンゴ脂質の in situ 内皮細胞における細胞質 $Ca^{2+}$ 濃度および NO 産生に対する作用

最上紀美子, 轟池田奈津子, 大村昌人, ×吉田一樹, 小林 誠(山口大, 医, 1生理)

正常 Krebs 液中で sphingosylphosphorylcholine (SPC) は, ウシ大動脈弁 in situ 内皮細胞の細胞質  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の持続的な上昇を用量依存性に引き起こしたが, sphingosine は  $[Ca^{2+}]_i$  に影響を与えなかった. 無  $Ca^{2+}$  溶液中では, 20  $\mu$ M SPC による  $[Ca^{2+}]_i$  の一過性の上昇のみ認められ, 持続的な  $[Ca^{2+}]_i$  の上昇は消失した. 以上のことから, SPC は細胞内ストアからの  $Ca^{2+}$  の放出だけでなく, 細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入を引き起こすことが示唆された.

また, 2,3-diaminonaphthalene 法を用いて NO 産生に対する作用を検討したところ, SPC により NO 産生は増加したが, sphingosine は NO 産生には, ほとんど影響がなかった.

以上のことから, スフィンゴ脂質情報伝達系は in situ 内皮細胞の生理的機能において重要な役割を果たしている可能性が示唆された.

### 16. 咽・喉頭領域の水受容器による胃運動の抑制

小橋 基, 足立 明(岡山大, 歯, 口腔生理)

咽・喉頭領域の水刺激の胃運動におよぼす効果を調べた. 咽・喉頭領域の水刺激によって, 胃運動の著明な抑制が見られたが, 0.9% 食塩水による刺激ではこのような抑制は見られなかった. この抑制は両側の上喉頭神経切除で消失した. また, 上喉頭神経の中樞端刺激により同様の抑制が観察された. これらの結果から, 咽・喉頭領域の水受容器からの求心性情報が上喉頭神経を介して胃運動を抑制的に調節することが明らかとなった. このような抑制は, 食物が胃に到達する

以前に胃平滑筋を弛緩させ、胃の受け入れ弛緩を促進するのに役立っていると考えられる。

### 17. ラット大腸運動に対する上喉頭神経求心性刺激の効果

×山本真紀, 岡田博匡(川崎医療福祉大, 臨床栄養)

除脳イヌの大腸運動が上喉頭神経の求心性刺激により促進されることを以前報告した。しかし、ラットの大腸運動に対する効果については報告が見られないので、この実験を行った。

【実験方法】 生後10週齢のSD系ラットを用い、動物はクロラロース麻酔および同麻酔下に除脳された。近側結腸と遠側結腸内に小ゴム球を挿入し、その内圧変動と積分曲線を記録した。刺激は1 msec, 6~10 V, 10, 20, 50 Hz。

【結果】 麻酔初期には上喉頭神経の求心性刺激によって反射反応が出現しないが、3時間後になると、反応が誘発されるようになった。麻酔動物では近側結腸運動の抑制、遠側結腸運動の促進効果が引き起こされた(5例)。他方、除脳動物では近側結腸で抑制(17例)と促進(9例)の両様の効果が引き起こされ、遠側結腸では著明な促進効果が誘発された。近側結腸の促進効果は迷走神経切断後、遠側結腸の促進効果は骨盤神経切断後には消失した。これらの結果から、ラットの上喉頭神経刺激によって近側結腸に促進および抑制が誘発されるが、促進は迷走神経を遠心路、抑制は多分内臓神経を遠心路として発現し、遠側結腸に誘発される促進は骨盤神経を遠心路として発現すると結論される。

### 18. ギムネマ酸の腸管平滑筋に及ぼす弛緩作用とNO関与の可能性について

×駱 鴻, 井元敏明, 日地康武(鳥取大, 医, 1生理)

ギムネマ酸は、インドや東南アジア地域などに分布するガガイモ科の植物ギムネマシルベスタ(*Gymnema sylvestre*)の葉より抽出されるトリテルペン系配糖体で、小腸における糖の吸収抑制、糖尿病ラットのブドウ糖負荷試験の改善などさまざまな作用がある。今回、我々はギムネマ酸の腸管平滑筋運動に及ぼす作用とNOの関与につき検討した。雄性WistarラットのTreitz 韌帯下5 cm から30 cm の間の小腸から得た長さ約1 cm のリング状標本をorgan bath中に浸漬し、輪走筋の収縮による張力を記録した。高KCl(45 mM)で拘縮した標本に、ギムネマ酸を含むギムネマ水抽出物(GW, 0.8~8 mg/ml)を投与すると、輪走筋がGW

の濃度に依存して弛緩することが観察された。GWの投与前にNOS阻害剤を入れておくと、GW投与による弛緩が有意に抑制された。また、GWは輪走筋の自発的な律動性収縮に対しても濃度に依存してその頻度を減少させたが、NOS阻害剤はGWのこの作用を抑制した。以上のことから、GWはラット小腸輪走筋に対して弛緩作用を示し、その作用にNOの生成が関わっている可能性が示唆された。したがって、GWの糖吸収への作用は能動輸送の抑制のほかに、小腸の運動抑制によりUnstirred Layerなどを調節し、腸管内にある栄養物の受動輸送を通じて吸収を遅延する可能性が考えられる。

### 19. 蛍光 CCD 生体顕微鏡による拍動心におけるNADH 蛍光計測システムの試作

×小笠原康夫, ×望月清一, ×松本健志, 梶谷文彦(川崎医大, 医用工学)

我々はこれまで、心筋微小循環系において細動静脈血管の血管径動態・血流動態を直接観測できるCCD生体顕微鏡を開発し、冠微小循環の特徴を明らかにしてきた。本研究では心筋の代謝機能評価を行うために、NADH 蛍光の観測システムを試作した。システムは、蛍光フィルタ付レンズ部(420~570 nm)、CCD撮像素子(40万画素)、励起光源(100 W 水銀キセノンランプ、~360 nm)より構成されている。本システムでは、解像度に制約のある高感度カメラ等を使用せずに、NADH 蛍光動態が簡便に観測できる点に特色がある。ラット摘出灌流心においてNADH 蛍光を計測した。灌流途絶直後から心筋表面全体のNADH 蛍光は全体的に増加し、30秒後に再灌流を行うとNADH 蛍光が消失する部分が縞状に生じた。すなわち、微小循環レベルにおける再灌流の不均一性がわかった。

### 20. ニードルプローブ型 CCD 生体顕微鏡による脳血流調節機構の解析

辻岡克彦, 新名健治, 山根正信\*(川崎医大, 生理・\*川崎医療短期大)

脳循環の調節機構を解明するためには、脳微小血管の生体内における動態観察が必要である。本研究ではニードルプローブ型 CCD 生体顕微鏡を使用することにより、脳微小血管の生体内における動態観察を行った。10%CO<sub>2</sub> 負荷により頸動脈血流は著明に増加したが、この時、脳表細動脈直径の著明な拡張を認めた。コントロール、アデノシンの頸動脈内投与でも頸動脈血

流の増大と、それに対応する脳表細動脈の直径の増加を認めた。これらの細動脈径の拡張は全般的であったが、血管サイズ別にみると特に直径 75  $\mu\text{m}$  以下の細動脈で顕著であり、この部分で主として血流調節が行われていることを示唆した。これに対しアンギオテンシン II の頸動脈内投与では頸動脈血流の減少と脳表面の細動脈径の収縮を認めたが、他の拡張が全般的であるのとは異なりこの収縮は局所的であった。

### 21. 心タンポナーデによる低血圧時の腎交感神経活動に対する 7-Nitroindazole の影響について

\*王 幼平\*, 村上 宏, 米山弘人, 西田育弘,  
 ×前田 肇\*, 小坂博昭(香川医大, 2生理・\*1外科)  
 心タンポナーデの進行にともない腎交感神経活動は、体血圧を維持しつつ神経活動が上昇する(Phase I), 体血圧の急激な下降に一致した神経活動の急激な低下(Phase II)の二相性の変化をとる。この交感神経活動の Phase II の変化は、心臓求心性神経が関与し、ナロキソンの前投与により消失することがわかっている。最近の報告によると Nitric Oxide(NO)は、交感神経活動の制御に密接な関係があり、また opioid との関係も論じられている。今回の実験では、比較的選択的 nNOS 阻害剤の 7-Nitroindazole (7-NI) を投与した意識下の家兔をもちいて交感神経活動の Phase II の変化に対する NO の影響を調べた。7-NI 投与により、Phase II における腎交感神経活動の急激な低下は消失し、活動は高い状態が維持された。これらのことから、心タンポナーデにおける交感神経活動の Phase II の変化には NO の中枢性の関与が強く示唆された。

### 22. L-Arginine improved baroreflex function in prehypertensive Dahl salt-sensitive rats

× Ikeda, K., × Oka, M., × Chen, Q. H., Nishida, Y.,  
 × Zhou, M. S., Murakami, H., Yoneyama H., and Kosaka H. (Dept. Physiology, Kagawa Medical School)

The effect of L-arginine on baroreflex function in prehypertensive Dahl salt-sensitive (S) rats and its possible mechanisms were investigated. The arterial pressure, heart rate, aortic nerve activity (ANA), and renal sympathetic nerve activity (RSNA) were recorded in urethane anesthetized S and Dahl salt-resistant (R) rats. Baroreflex curves were obtained by relating %ANA to mean arterial pressure (MAP), %RSNA to MAP, and %RSNA to %ANA during ramp

increases and decreases in MAP. There is no difference in gain of %ANA-MAP curve between R and S rats. The gain of %RSNA-MAP curve and of %RSNA-%ANA curve in S rats were significantly reduced compared with those in R rats. Infusion of L-arginine did not alter the gain of %ANA-MAP curve, but increased the gain of %RSNA-%ANA curve in S rats. Our results suggested that L-arginine improved the baroreflex function in S rats, not by altering the afferent baroreceptor sensitivity, but by modulating the central and/or efferent sympathetic nervous system.

### 23. 腎血管でみられた交感神経支配の局在

松川寛二, 白井幹康\*, 和田哲也, 二宮石雄(広島大, 医, 保健・\*国立循環器病センター, 心臓生理)

腎血管は交感神経支配を豊富に受けているが、その支配様式については不明な点が多い。腎臓に終末する腎神経束を数本分離し、それぞれの神経束を電気刺激した際にみられる腎葉間小動脈枝の局所応答について X線血管造影を用いて調べた。pentobarbital 麻酔ネコを用いて、腎臓に投射する神経束をできる限り多く(2~5本)分離し刺激電極を埋めこんだ後、その中枢側を切断した。30秒間の神経刺激中(10v, 10Hz, 1ms)に、X線を曝射し大腿動脈から腎動脈起始部に挿入したカテーテルから造影剤を注入し腎実質内血管像ならびに血管内径変化を可視化した。その結果、腎神経束の刺激により内径 300~500  $\mu\text{m}$  に対応した葉間小動脈の収縮(内径の著明な減少)が観察された。この血管収縮は刺激頻度に依存して起こり、10Hz 以上の刺激では小動脈は殆ど完全に閉塞した。また、この血管収縮は prazosin で抑制されたので  $\alpha_1$  受容体を介して発現すると思われる。興味ある所見は個々の神経束の刺激効果はそれぞれの異なる葉間小動脈枝に特異的に出現したことである。以上から、交感神経節細胞および節後神経線維は機能局在を持って分布する、すなわち各神経線維はそれぞれ異なる腎局所の血管を支配すると思われる。

### 24. 意識ネコの片腎摘出前後でみられる腎交感神経活動

和田哲也, 清水順市, 松本睦子, 村田潤, 松川寛二(広島大, 医, 保健)

【序論】最近の研究により、反対側の腎機能や血流を

調節する腎交感神経活動(以下 RSNA)は腎臓摘出術直後は減少するが、経過を追うごとに増加することが明らかにされた。しかし、この実験は異なる麻酔下ラットを用いて行われており、意識下の同一個体において RSNA はどのように変化しているかについてはまだ良くわかっていなかった。そこで今回我々は意識下ネコを用いて RSNA を長時間記録し、片腎摘出により RSNA がどのように変化するかについて検討した。

【方法】 意識下ネコ(n=3)を用いて第一手術として動静脈カテーテル、RSNA 及び心電図用電極を留置し、術後より毎日5時間、RSNA、心拍数(HR)および動脈血圧(AP)を同時記録した。また、電極留置から2~4日目に片腎摘手術を施行した。

【結果】 RSNA の平均値は術後時間経過と共に減少したが、腎摘により全例増加した。腎摘前に生理食塩水(40~50cc)を10分間で静注した場合、RSNA は反射性に減少したが、腎摘後この RSNA のボリューム負荷応答は減弱した。

【考察】 RSNA の増加は片腎摘出による反対側腎臓の機能及び重量の代償性に関与する考えられる。また、片腎摘出はボリューム負荷に対する腎交感神経活動の反射性応答を修飾ことが示唆された。

## 25. 除脳ネコにおける自発床歩行時の腎交感神経活動

村田 潤, 清水順市, 松本睦子, 和田哲也, 松川寛二(広島大, 医, 保健)

【研究目的】 除脳ネコにおける自発的床歩行時の腎交感神経活動(RSNA)を実際に記録し、床歩行時のフィードフォワード制御、フィードバック制御について交感神経活動のレベルで検討した。

【方法】 大脳および間脳吻側部位で離断された除脳ネコを用いて自発的床歩行時の RSNA、動脈血圧(AP)、心拍数(HR)、前肢上腕三頭筋の筋電図を同時記録した。また床歩行時の応答について sinoaortic denervation(SAD)前後で比較した。

【結果】 RSNA、AP および HR は床歩行中増加した。この RSNA 増加は歩行開始時の筋活動と同時にあるいはそれに先行して出現し、AP の上昇にともない減少した。SAD を行った場合、RSNA、AP および HR は SAD 前と同様に歩行開始と一致して増加したが、この増加は SAD 前に比べ保たれやすい傾向にあった。

【結論】 除脳動物の RSNA は中枢性に制御を受け床歩行中増加し、また動脈血圧反射が作用している場合

RSNA は床歩行中の昇圧により動脈血圧受容器を介したフィードバック制御を受けることを明らかにした。除脳動物においても RSNA に対するフィードフォワード制御、フィードバック制御の機能は残されており、これらは間脳尾側部および脳幹で発生することが示唆された。

## 26. Hybrid logistic 関数によるフェレット右室乳頭筋の張力時間曲線の数式化の試み

畑島峰子, 清水壽一郎, 毛利 聡, 實金 健, 荒木淳一, 菅 弘之, 石川哲也\*, 小武海公明\*, 栗原敏\*(岡山大, 医, 2生理・\*東京慈恵医科大, 2生理)

我々はこれまでに Hybrid logistic(以下 HL)関数を用い、イス摘出交叉灌流心標本における左室圧時間曲線および右室乳頭筋張力時間曲線を数式化し、その良好な fitting 精度について報告してきた。今回はフェレット右室乳頭筋単離標本を用い、その張力時間曲線の数式化を行った。これまでの報告と同様に HL 関数による fitting 精度は非常に高かった( $r=0.9997 \pm 0.0002$ )。さらに他の代表的な関数と fitting 精度を比較するのみならず、初期長の変化および灌流液カルシウム濃度の変化がこれらの fitting 精度および HL 関数の各係数に及ぼす影響について検討したので報告する。

## 27. 期外収縮後心収縮性一過性振動現象の温度依存性の解析

×水野 樹, ×鈴木俊輔, ×河野晋久, ×實金 健, ×清水壽一郎, 松原広巳\*, 荒木淳一, 菅 弘之(岡山大, 医, 2生理・\*循環器内科)

我々はイス摘出交叉灌流心左室において、心拍間隔の変化に伴う心収縮性の一過性振動現象(TMA: Transient Mechanical Alternans)の数式化  $y = a \cdot \exp\{- (x-1)/\tau e\} + b \cdot \exp\{- (x-1)/\tau s\} \cos\{\pi(x-1)\} + 1$  に成功した。今回我々は TMA に対する心筋温変化の影響を解析した。期外収縮連結時間を変えて期外収縮後第1拍目から得られる期外収縮後増強曲線の a と b の和の減衰時定数は温度によって変化しなかった。しかしその成分 a 及び b の減衰時定数は心筋温上昇に伴い、前者は増加傾向を、後者は減少傾向を示した。期外収縮後増強曲線は筋小胞体の  $Ca^{2+}$  動態を表すと考えられているが、TMA の温度依存性の解析により、温度依存性の異なる2つの  $Ca^{2+}$  動態成分の存在が示唆された。

**28. 普通食およびトレッドミル訓練が食餌性肥満ラットの体脂肪率および血中インスリン濃度等に及ぼす影響について**

×周 偉, ×永田 晟\*, ×李 進雄, 荒木淳一, ×實金 健, 高木 都\*\*, 菅 弘之(岡山大, 医, 2生理・\*早稲田大学人間科学部・\*\*奈良県立医科大, 2生理)

我々は、普通食およびトレッドミル訓練がヒトの肥満に類似した高脂肪飼料誘発肥満ラットの体脂肪率、摂食効率及びインスリン作用に及ぼす影響について研

究した。高脂肪飼料誘発肥満ラットにおいて、摂食効率(体重増加量/摂取エネルギー)の上昇、高インスリン血症、肝細胞膜インスリン受容体結合能の低下が認められた。トレッドミル訓練および普通食+トレッドミル訓練は肥満ラットの肝細胞膜インスリン受容体の結合能を高め、高インスリン血症を抑制する働きがあった。とりわけ、普通食+トレッドミル訓練は肥満ラットの体重増加を抑制し体脂肪率を減少させた。これらの代謝変化が高脂肪飼料誘発肥満ラットにおいてダイエット効果を発揮していると考えられる。

## 編集後記

春めいた暖かい日も見受けられる時期になってしまいましたが、60巻1号をお届け致します。諸般の事情により大幅に遅くなりましたことをお詫び申し上げます。

日本生理学会雑誌も60巻に入りました。学会の歴史はもう少し古く、本年3月の金沢大会で75回を数えるわけですが、60という数字には一つの輪廻を感じ入る次第です。今回の巻頭言は、千葉大学中島祥夫先生から戴きました。昨年末に文部大臣から大学審議会に諮問された「21世紀の大学像と今後の改革方策について」に関するご意見が述べられています。本来政策は国家100年の計と唱われたように長期的視野に立ったものでなくてはならないと考えますが、昨今の教育改革はどう考えても近視眼的で改善を見ることはないように思われます。大学設置基準の大綱化による見直しを行っている最中の諮問では、いったい何を期待でき

るのか。そうは申しても御上の命とあらば従うしかないのが平民の定めではありますが。

Trends では IUSP のサテライト会議“Physiome Project”の報告が川崎医科大学梶谷文彦先生から寄せられています。生体構成素子が明らかにすべく進められた Genome Project は、あと10年足らずのうちに終了するものと思われます。ここで得られた大きな成果をもとに、生体機能を構成的に解析し理解することが次にくる目標と考えられます。最近20年物質解析技術の隆盛に圧される傾向にあった生理学が装いを新たに体制を強化して活躍することが期待されています。さらに、Profile では生理学研究所の伊佐 正先生の脳統合機能へのロジカルな研究への力強い抱負が述べられています。新進気鋭の研究者を迎え、21世紀へ向けて生理学の自己主導型の機構改革が進むものと期待されます。

(高松 研)

### 編集委員

|            |           |             |
|------------|-----------|-------------|
| 金子 章道(幹事)  | 野村 正彦     | 野崎 修一       |
| 中島 祥夫      | 佐々木 成人    | 高松 研        |
| 青木 藩(北海道)  | 土居 勝彦(東北) | 工藤 典雄(関東)   |
| 小野田 法彦(中部) | 福田 淳(近畿)  | 日地 康武(中・四国) |
| 河南 洋(九州)   |           |             |



# 日本生理学会会則

(平成8年4月4日改訂)

1. 本会は日本生理学会と称する。
2. 本会は生理学の進歩発展をはかることを目的とする。
3. 本会は毎年1回大会を開いて会員の業績を発表討議し、総会および評議員会を開いて会務を評議する。大会の開催は前もって全会員に通知し演題を募集する。なお会員は各所在地において適宜地方会をつくり、業績を発表討議することができる。
4. 演題あるいは抄録を発表するため邦文機関誌の日本生理学雑誌を発行し、欧文の The Japanese Journal of Physiology を編集する。

5. 会員は正会員、特別会員、名誉会員、準会員、賛助会員、臨時会員とする。正会員は、本会の趣旨に賛同する同学者で評議員の紹介あるものに限る。学会および機関誌に業績を発表することができ、また日本生理学雑誌の頒布を受ける。

特別会員は多年本会に功勞のあった会員で、評議員から推薦され総会の賛同によって定められる。

名誉会員は、本会に多大の貢献のあった外国人で、評議員から推薦され 総会の賛同によって定められる。

賛助会員は本会の趣旨に賛同し、本会を支援する個人または団体とする。

準会員は学校、図書館、研究所等の団体で会誌の頒布のみを受ける。

臨時会員は、一年間に限り本会の主催する大会および地方会に会員と連名で業績を発表することができる。

会員の会費は別に定める。

6. 本会の役員には評議員、常任幹事、監事および当番幹事がある。
7. 評議員は本会の中核となる会員であって、評議員の推薦により選考委員会を経て評議員会に附議して決定される。

評議員会は毎年大会の際開催され本会に必要な事項を評議する。

評議員会は地区別に定数の常任幹事を選出し、日常および緊急の会務を委嘱する。

8. 常任幹事の中に庶務・会計・編集等幹事をおく。

9. 常任幹事会で選ばれた2名の監事が本会の会計を監査する。
10. 当番幹事は大会の開催を引受けた評議員であって、大会の一切の事務を行なう。大会終了後次回当番幹事に事務引継を行なって任期を終わる。この任期中は常任幹事会・評議員会および総会を招集しこれを司会する。
11. 常任幹事会は必要に応じて各種の専門委員会を設け委員を委嘱することがある。必要に応じその委員は常任幹事会に出席し専門事項の審議に参加する。
12. 本会の会計年度は毎年1月に始まり12月に終わる。
13. 本会の事務報告は総会および日本生理学雑誌に発表する。
14. 本会の事務所は東京都文京区本郷3-30-10布施ビル(4階)内におく。
15. 本会則を変更するには評議員会の決議を経て総会の承認を得なければならない。

## 附 則

### <常任幹事会に関する事項>

全国を8地区に分け、常任幹事は各地区の評議員の互選により選出される。地区及び定員は下表による。任期は3年とし重任を妨げない。各地区の評議員は、地区の定員に相当する数以内の氏名を所定の投票用紙に記入して投票を行う。投票は無記名とする。投票用紙に同一氏名を複数記入した投票は無効とする。得票数同数の場合は入会順、年長順に順位を決定する。欠員を生じた場合は、常任幹事会の議を経た後、次点者を以てこれにあてることができる。この場合の任期は前任者の残任期間とする。選挙事務は選挙管理委員会に委嘱する。選出された常任幹事の氏名は日本生理学雑誌上に報告する。

| 幹事の選出区分定員         | (計31名) |
|-------------------|--------|
| 北海道地区             | 2名     |
| 東北地区              | 2名     |
| 関東地区(新潟を含む・東京を除く) | 5名     |
| 東京地区              | 7名     |

|        |    |
|--------|----|
| 中部地区   | 5名 |
| 近畿地区   | 4名 |
| 中国四国地区 | 3名 |
| 九州地区   | 3名 |

#### <会費に関する事項>

正会員の会費は年額8,000円とする。但し在学中の者については5,000円とする。特別会員・名誉会員の会費は免除される。准会員の会費は年額9,500円とする。臨時会員の会費は年額4,000円とする

#### 内 規

- 1) 評議員選考基準：多年本会員として在籍し相当の生理科学の業績発表があり、満5年以上の研究歴があるもので本会評議員の推薦がなければならない。
- 2) 評議員は The Japanese Journal of Physiology を購読するものとする。
- 3) 会費滞納の会員は会員の資格が自然消滅する。
- 4) 庶務幹事は必要な場合に限り日本生理学会代表と称することができる。
- 5) 本会に次の常置委員会をおく。日本生理学雑誌編集委員会、The Japanese Journal of Physiology 編集委員会、評議員選考委員会、選挙管理委員会。
- 6) 文部省科学研究費補助金審査委員候補者の選出方法は別に定める。

## 日本生理学雑誌投稿規定

平成8年4月4日改訂

### 目的

本誌は日本生理学会の機関誌で、会員相互の情報交換の場を提供することを目的とします。

### 発行形態

会合通知、公募案内、研究会の報告など INFORMATION, PROFILE, TRENDS, CALENDAR, OPINION などは毎月発行します。原著、地方会抄録、生理学実験法講座は年4回(1, 4, 7, 10月)の発行となります。

### 投稿

会員に知って欲しいニュース、情報の提供をお願いします。研究成果の発表のための原著、短報の投稿は日本生理学会会員に限られます。原著、短報は査読を行い、掲載の採否は編集委員会で決定します。

日本生理学雑誌に投稿される原稿はハードコピーと共にフロッピーディスクでご提出下さい。原著の場合は、採択の通知を受け取られた後、フロッピーディスクをご提出下さい。ハードコピーはA4用紙に1行40字、20行(1枚800字)でプリントして下さい。本誌1ページは約1,600字と考えて下さい。図は大きさにもよりますが、ほぼ400字に相当します。写真や図はハーフトーンの場合には光沢のある印画紙に焼き付けて下さい。線画の場合でコンピュータグラフィックを使用して作成した場合には、レーザープリンタで出力したものであればそのままで結構です。印画紙に焼き付ける必要はありません。

フロッピーディスクのフォーマット、使用したマイコンの機種、ワープロソフトは一般に使われているもの(Macintosh, NEC PC98 シリーズ, IBM PC およびその Compatible, DOS/V 機)なら何でも結構ですが、ディスクのフォーマット、使用したマイコンの機種、ワープロソフトおよびファイル名を明記して下さい。印刷所および学会事務局でどうしても対応できない場合には著者にご協力を求めることがありますので、予めご承知置き下さい。

### 原稿の送り先

〒113 文京区本郷3-30-10 (布施ビル4階)

日本生理学会事務局 日本生理学雑誌編集委員会

TEL: 03-3815-1624

FAX: 03-5684-2539

### 投稿の締め切り

会合通知、公募案内など締め切り日のある件については掲載号の前々月の20日が締め切り日となりますが、余裕を持って早めにお送り下さい。

### 掲載料

会合通知、公募案内、研究会の報告など INFORMATION, PROFILE, TRENDS, CALENDAR, OPINION などの欄に掲載希望の記事は無料で掲載します。

原著、短報、テクニカルノートなどの投稿原稿には掲載料をいただきます。掲載料は原稿の長さ、図や写真の量に応じ、そのつど事務局からお知らせします。別刷りは有料です。

総説、実験技術講座など編集委員会が依頼する原稿の掲載には著者負担はありません。ただし、100部を越える別刷りは有料です。

### I. 原著

A. 原著論文は日本語とし、長さに制限はありません。2部提出して下さい。

B. 表紙(原稿の第1ページ)には、表題、欄外見出し、著者名、所属およびその所在地、電話番号、FAX番号、原稿の枚数、図、表の数、別刷り希望部数、編集者への希望などを書いて下さい。

C. 日本語の要旨と5つ以内のキーワードをつけて下さい。要旨は400字以内、はじめに表題、著者名、所属をつけて下さい。

D. 動物名、外来語は原則としてカタカナを用いて下さい。略語、単位、単位記号は巻末の用法に従って下さい。これは Japanese Journal of Physiology (JJP) の投稿規定と同一です。

E. 図、表、写真の説明も日本語で書いて下さい。本文の欄外にそれぞれ挿入すべき部位を指定して下さい。

F. 項目分けは I, II, ……とし、下位項目は A, B, ……、さらにその下は 1, 2, ……、最下位の項目は a, b, ……として下さい。

### G. 文献の記載法

1. 本文中の引用箇所には出現順に [ ] 内に番号を付けます。1つの事柄に複数の論文を引用する場合には [1, 5, 7], あるいは [8-13] のように書きます。

著者名を引用する場合、3名以上の連名のときは、“ら”あるいは“et al.”とします。

例1：高木ら [1] によれば……

例2：Hodgkin & Huxley [2] によれば……

2. 末尾文献リストは Japanese Journal of Physiology (JJP) の投稿規定に従って下さい。すなわち、本文中の出現順に並べ、1. から順に番号を振ります。著者が連名の場合でも省略せず、全員の名前を記載します。

3. リストは著者名：表題、雑誌名(省略形)、巻、開始ページ-終了ページ、西暦年号の順に記載します。例：

1. Watanabe S-I & Murakami M: Phototransduction in cones as examined in excised membrane patch. *Jpn J Physiol* **42**: 309-320, 1992

2. Ueda Y, Kaneko A & Kaneda M: Voltage-dependent ionic currents in solitary horizontal cells isolated from the cat retina. *J Neurophysiol* **68**: 1143-1150, 1992

3. Tokizane T: Studies on the paradoxical phase of sleep in the cat. In: *Progress in Brain Research*, Ed. Tokizane T & Schade JP, Elsevier Publ Co, Amsterdam, Vol 21 B pp 230-268, 1965

4. 河村 悟：視細胞における順応調節蛋白質。生物物理 **32**: 180-185, 1992

コンマは複数の著者の区切りだけに使用し、イニシャルは大文字でスペースを入れないなどの点にご注意下さい。

H. 校正は投稿者の責任において初校のみとします。

## II. 短報, 研究方法 (テクニカルノート)

1. 刷り上がり 4 ページ以内とします。

2. 図, 表は 4 点以内です。

3. その他は原著に準じて下さい。

## III. 総説, 解説, 実験技術講座

A. 内容は専門外の人にも分かるようにお書き下さい。

B. 図, 表, 文献リストを含め, 刷り上がりが 15~20 ページを目安にして下さい。

C. 執筆要項は原著に準じますが, 原稿の提出は 1 部で結構です。

## IV. 学生教育, 学会印象記, 資料など

A. 刷り上がり 2~4 ページを目安とします。

B. 執筆要項に特別な指定はありません。

## V. 談話会抄録

A. 談話会の幹事は刷り上がり 1 ページ程度の会全体のまとめを書いて下さい。

B. 談話会抄録は下記のように, 表題, 口演者名, 所属を記載し, 本文は 400~600 字程度 (図, 表は不可) とします。ただし, 予稿を作った場合でその分量がこの範囲を大幅に超えないものであれば, 予稿をそのまま使用できます。抄録も原則としてフロッピーディスクでお願いします。

[抄録見本]

赤血球膜タンパク質の酸化的重合化と微小循環

鈴木一郎, 山田一夫 (北西大, 医, 第一生理)

赤血球毛細血管を通過する際に外力により受動的に変形させられる。その変形能は……

Table 1. 定義せずに使用して良い略語

| 略                | 語 | 定                                                              | 義 |
|------------------|---|----------------------------------------------------------------|---|
| ACh              |   | acetylcholine                                                  |   |
| AChE             |   | acetylcholinesterase                                           |   |
| ACTH             |   | adrenocorticotrophic hormone                                   |   |
| ADP              |   | adenosine 5'-diphosphate                                       |   |
| AMP              |   | adenosine 5'-monophosphate                                     |   |
| ATP              |   | adenosine 5'-triphosphate                                      |   |
| <sup>14</sup> C  |   | carbon isotope                                                 |   |
| Ca <sup>2+</sup> |   | calcium ion                                                    |   |
| cAMP             |   | cyclic AMP (adenosine 3':5'-monophosphate)                     |   |
| CAT              |   | choline acetyltransferase                                      |   |
| cDNA             |   | complementary deoxyribonucleic acid                            |   |
| cGMP             |   | cyclic GMP (guanosine 3':5'-monophosphate)                     |   |
| CM-cellulose     |   | O- (carboxymethyl)-cellulose                                   |   |
| CNS              |   | central nervous system                                         |   |
| CoA              |   | coenzyme A                                                     |   |
| CSF              |   | cerebrospinal fluid                                            |   |
| ConA             |   | concanavalin A                                                 |   |
| DEAE-cellulose   |   | O- (diethylaminoethyl)-cellulose                               |   |
| DNA              |   | deoxyribonucleic acid                                          |   |
| EDTA             |   | ethylenediaminetetra-acetate                                   |   |
| ECG              |   | electrocardiogram, electrocorticogram                          |   |
| EEG              |   | electroencephalogram                                           |   |
| EGTA             |   | ethyleneglycol-bis-(β-amino-ethyl ether)N,N'-tetra-acetic acid |   |
| ELISA            |   | enzyme-linked immunosorbent assay                              |   |
| EM               |   | electron microscope                                            |   |
| EMG              |   | electromyogram                                                 |   |
| EPSP             |   | excitatory postsynaptic potential                              |   |
| GABA             |   | γ-aminobutyric acid                                            |   |
| GDP              |   | guanosine 5'-diphosphate                                       |   |

|                  |                                                     |                    |               |
|------------------|-----------------------------------------------------|--------------------|---------------|
| GMP              | guanosine 5'-monophosphate                          | キログラム              | kg            |
| GTP              | guanosine 5'-triphosphate                           | ミリグラム              | mg            |
| HEPES            | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid | マイクログラム            | $\mu\text{g}$ |
| HPLC             | high performance liquid chromatography              | ナノグラム              | ng            |
|                  |                                                     | ピコグラム              | pg            |
| HRP              | horseradish peroxidase                              | 重力加速度              | xg            |
| 5-HT             | 5-hydroxytryptamine (serotonin)                     | エネルギー              | J             |
| IgG              | immunoglobulin                                      | 電 荷                | C             |
| I.P.             | intraperitoneal                                     | 電位差                | V             |
| IPSP             | inhibitory postsynaptic potential                   | 電気抵抗               | $\Omega$      |
| I.V.             | intravenous                                         | コンダクタンス            | S             |
| $K_m$            | Michaelis constant                                  | 電気容量               | F             |
| $\text{Mg}^{2+}$ | magnesium ion                                       | インダクタンス            | H             |
| MAO              | monoamine oxidase                                   | 周波数                | Hz            |
| mRNA             | messenger ribonucleic acid                          | 力                  | N             |
| NMDA             | N-methyl-D-aspartate                                | 照 度                | lx            |
| PAGE             | polyacrylamide gel electrophoresis                  | luminous flux      | lm            |
| RNA              | ribonucleic acid                                    | 磁 力                | Wb            |
| SD               | standard deviation                                  | magnetic induction | T             |
| SDS              | sodium dodecyl sulfate                              | モル濃度               | M             |
| SE               | standard error of mean                              | molecular weight   | mol           |
| tRNA             | transfer ribonucleic acid                           | 分子量                | Da            |
| Tris             | tris(hydroxymethyl)aminomethane                     | 圧                  | Pa            |
| TTX              | tetrodotoxin                                        | power              | W             |
| UV               | ultraviolet                                         | radioactivity      | Bq            |
|                  |                                                     | 音 圧                | dB            |

Table 2. 単 位

| 物 理 量 | 単 位 名  | 記 号           |
|-------|--------|---------------|
| 面 積   | 平方メートル | $\text{m}^2$  |
| 長 さ   | メートル   | m             |
| 時 間   | 日      | d             |
|       | 時間     | h             |
|       | 分      | min           |
|       | 秒      | s             |
|       | ミリ秒    | ms            |
|       | マイクロ秒  | $\mu\text{s}$ |
| 容 積   | リットル   | l             |
| 重 量   | グラム    | g             |

倍 数

|      |       |            |
|------|-------|------------|
| キロ   | k     | $10^3$     |
| メガ   | M     | $10^6$     |
| ギガ   | G     | $10^9$     |
| テラ   | T     | $10^{12}$  |
| デシ   | d     | $10^{-1}$  |
| センチ  | c     | $10^{-2}$  |
| ミリ   | m     | $10^{-3}$  |
| マイクロ | $\mu$ | $10^{-6}$  |
| ナノ   | n     | $10^{-9}$  |
| ピコ   | p     | $10^{-12}$ |
| フェント | f     | $10^{-15}$ |

昭和63年12月19日制定

## 「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」

### Guiding principles for the care and use of animals in the field of physiological sciences.

## 日 本 生 理 学 会

動物実験に際しての実験計画立案の科学性と動物の福祉の立場に立った倫理的規範は、すでに「実験動物の飼養及び保管等に関する基準、昭和55年総理府告示」、*「International guiding principles for biomedical research involving animals. CIOMS 1984」*、「Guide for the care and use of laboratory animals, DHEW Publication No. (NIH)85-23 1985」、「動物実験に関する指針、日本実験動物学会1987」、「サル類を用いる実験遂行のための基本原則、日本霊長類学会1986」等に示されており、本学会もこれらの精神をふまえて「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」を制定する。

生理学の教育、研究の場では動物実験は殆ど必須の手段となっている。そして動物実験を通じて行われた生理学の教育、研究は生命現象の理解と解明に大きな役割をはたし、この研究成果は、医学・医療に应用され、人類福祉のためにはかり知れない貢献をした。今後、日本における生理学教育の一層の充実と生理学研究の飛躍的な発展のため、生理学実験者が主として脊椎動物を用いる動物実験にあたって、科学的な動物実験計画の立案と動物の福祉の観点に十二分な配慮をするため、ここに基本的指針を定める。生理学領域の実験者は以下の指針を遵守し厳正適格な実験を遂行しなければならない。

### I. 基本的事項

(1) 動物実験の目的が生理学的知識の向上と人類福祉に役立ち、動物の福祉にも配慮したものでなければならない。

(2) 動物実験にあたっては、科学的な観点から最も適正な種属と数量を選択しなければならない。

(3) 実験にあたっては、保定や麻酔薬の投与などにより実験動物に不必要な苦しみや痛みを与えないよう充分な配慮をしなければならない。特に痛覚の研究や実験の性質上、軽い麻酔しか用いられない実験を行う場合には、予め動物実験委員会などの意見を聞いた上、倫理的な観点から動物に与える苦痛を最小限にする配慮が必要である。

(4) 実験終了後、動物を処分する場合には「実験動物の飼養及び保管等に関する基準」(昭和55年)に定められているところに従い、速やかに安楽死させなければならない。

(5) 実験動物には適切な給餌、給水を行い、可能な限り清潔で快適な環境で飼育するよう心がけねばならない。

### II. 特記事項

(1) 動物実験を実施するにあたっては、専用区域を設け、動物の福祉に配慮した整備された施設で行わなければならない。又、施設の管理、運営のため必要な組織や体制を整備して、有能な専従の飼育技術者を配置して動物飼育に万全を期する必要がある。

(2) 実験者は科学的な計画を立案し、適正な供試動物の選択、実験方法の検討、必要な飼育条件の確保をはかる必要がある。実験計画の立案にあたっては実験動物学の専門家などの助言をもとめることが望ましい。

(3) 供試動物の選択にあたっては、実験目的に則して遺伝学的及び微生物学的品質を考慮する必要がある。飼育管理については管理者の指示に従わなければならない。

(4) 実験者は動物の入手にあたり、検収と検疫を的確に行い、入手時及び飼育期間中の動物の状態を記録し、保管しておく必要がある。この作業は管理者に委嘱する事ができる。

(5) 物理的、化学的に危険な物質、あるいは病原体等を扱う動物実験においては、人の安全の確保や、飼育環境の汚染により動物が障害を受けたり、実験結果の信頼性が損われないよう配慮する必要がある。なお、実験施設周辺の汚染防止についても十分に注意を払う必要がある。

(6) 実験者は各研究機関の「動物実験委員会」の規定、指示にしたがわなければならない。

(7) 研究成果の論文発表にあたっては、本指針にのっとり実験を遂行したことを付記することが望ましい。

## **Guiding Principles for the Care and Use of Animals in the Field of Physiological Sciences**

The Physiological Society of Japan

Animal research requires detailed planning and must be executed incorporating not only scientific principles, but also ethical considerations and a regard for animal welfare. Important regulations and guidelines to meet these requirements are contained in the following publications : —

'Standards Relating to the Care and Management, etc. of Experimental Animals, Notification of Japanese Prime Minister's Office, 1980' ;

'International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, CIOMS, 1984' ;

'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHEW Publication No. (NIH) 85-23, 1985' ;

'Guide for Animal Experimentation, Japanese Association for Laboratory Animal Science, 1987' ; and

'Guiding Principles for Animal Experiments using Non-human Primates, Primate Society of Japan, 1986' ;

In furtherance of these objectives and in response to enquiries from members, The Physiological Society of Japan (hereafter called "The Society") recommends compliance with 'Guiding Principles for the Care and Use of Animals in the Field of Physiological Sciences'.

Animal experiments are an unavoidable necessity in pursuing teaching and research activities in the field of physiological sciences. Results obtained from such programmes have contributed much to understanding the scientific function of the living body. Their application to medical and veterinary science and therapeutics have played an important role in the development of human and animal health and welfare. So that even greater developments in education and research in this field may take place, The Society urges all Japanese Physiologists to adopt these guiding principles. It is The Society's intention that all animal experiments should be designed and conducted on a valid scientific and ethical basis and that sufficient consideration must be given to animal welfare.

### **I. General Principles**

- (1) Animal experiments are to be undertaken only for the purpose of advancing physiological knowledge, and enhancing the well-being of humans and animals.
- (2) Consideration should be given on a scientific basis to the most suitable species of animals to be used and the numbers required.
- (3) Investigators should employ anesthesia, sedation and correct handling techniques appropriate to the procedures to be performed in order to avoid unnecessary pain and stress in the animals. In particular, before investigators proceed to conduct an experiment using only a light level of anesthesia, or employing a neuromuscular blocking agent, an application should be made to the Animal Research Committee in their institutes. This procedure is especially recommended and where permission is given it will be on an assurance that the intensity and duration of the pain are estimated to be minimal, consistent with achieving

the objective of the experiment.

- (4) When animals are to be disposed of after experiments have been completed, they should, in accordance with notification issued from Prime Minister's Office (1980), be killed humanely by administering a lethal dose of anesthetic or by some other recognised means taking into account their species and size.
- (5) Experimental animals must be accommodated in proper housing, and provided with sufficient food and water, thus protecting their welfare and maintaining them in a hygienic environment.

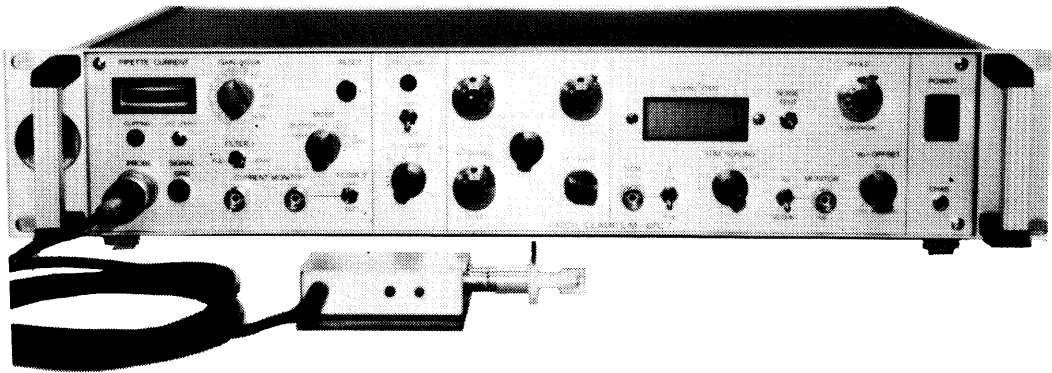
## II. Specific Recommendations

- (1) Animal experiments must be performed in specially designated areas where adequate facilities are available in order to ensure the welfare of the animals. The organization and management of the experimental animal facilities must be well planned and the animal caretakers concerned with husbandry and routine care must be competent to perform their tasks in a satisfactory manner.
- (2) In conformity with a well-defined experimental protocol, each experimenter must have assessed the suitability of the species of animal to be used and of the experimental methodology selected. Animals maintained in satisfactory conditions should be used. Consultations with, and advice from, experienced laboratory animal scientists are recommended.
- (3) The experimenter must select with care the species and strain of animals most suitable for the experimental purpose in terms of genetic and microbiological quality. The person in charge of the facility is responsible for seeing that the relevant regulations and internal rules are followed.
- (4) The experimenter should inspect the animals and provide for quarantine conditions in a proper manner. Records of the animals both during the breeding stage and when issued for use must be maintained. This work may be delegated to the Manager of the animal facilities.
- (5) Full consideration must be paid to the avoidance of compromising results by protecting the animals from environmental contamination in the animal facilities. The safety of humans handling physically and chemically hazardous substances or pathogens must also be assured. In addition, special attention should be given to the maintenance of good hygienic practices throughout the animal facilities, with due regard to the fabric of the building and its equipment.
- (6) All experimenters must comply with regulations and decisions made by the Animal Research Committee in that institute.
- (7) All experimenters are urged by The Society to conform with these guiding principles and recommendations. That they have done so should be stated by investigators when they report their experimental work for publication purposes.

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 (50GΩ), 20nA (500MΩ)
- 周波数応答 : 100KHz (500MΩ)
- 電位増幅度 : X10
- 測定モード : VC, CC, CC+COMM
- Rs補償 : 1-100MΩ
- 容量補償 : 0-10pF (First)  
: 0.2-10pF, 2-100pF (Slow)
- ホールド電位 : ±200mV
- オフセット電位 : ±50mV
- 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 愛知県岡崎市赤波町蔵西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)

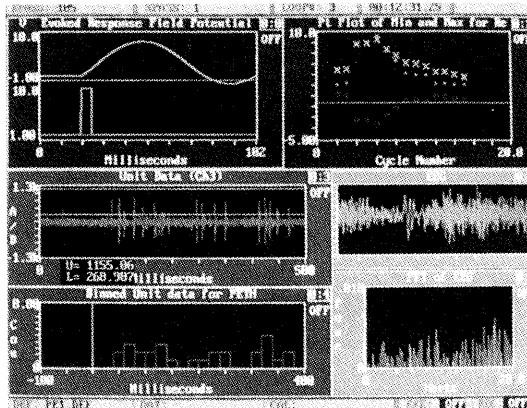
株式会社 フィジオテック

〒101-0047 東京都千代田区内神田2丁目6番11号 若松ビル2F  
TEL (03) 3258-1641 (代)

# WorkBench & Discovery

## 生体シグナルリアルタイム解析装置

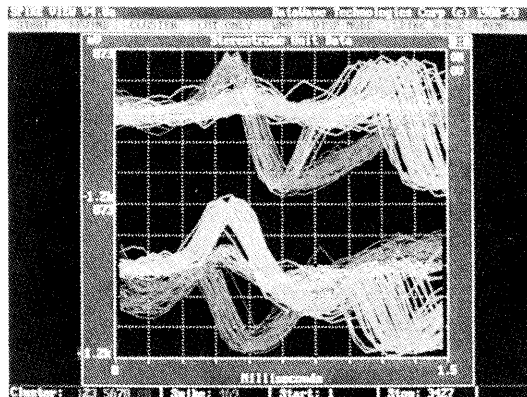
すべての作業を完全に自動化



ワークベンチシステムは、EEG、ECG、EMG、ERG等のあらゆる生体信号を取り込み、リアルタイムで多種多様な演算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組み合わせるだけで、サンプリング調整、画面表示、データ記録、演算・解析処理、印刷等が簡単に自動化できます。

## マルチ・シングルユニットオンライン解析装置

クラスターカッティング解析



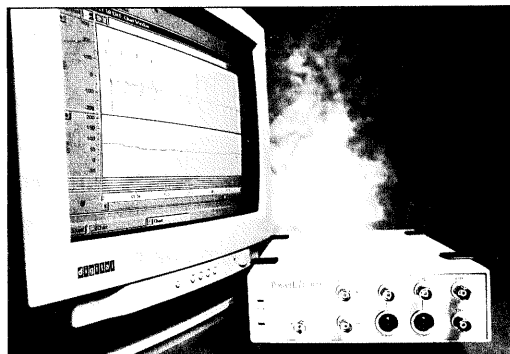
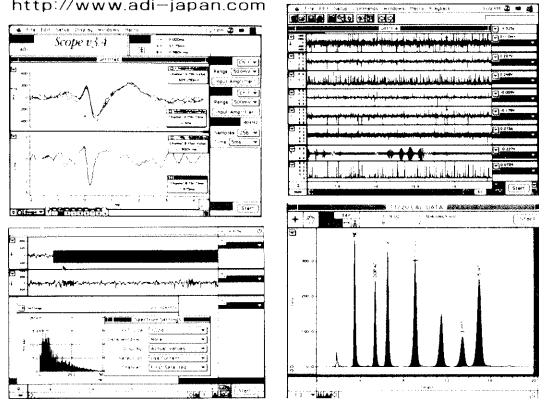
ディスカバリーは、多種多様のスパイクが含まれるアナログ信号から、あるパターンを持つスパイクのみを取り出したり、数種類のスパイクパターンに分類（クラスターカッティング）したりする、スパイク信号解析専用開発されたシステムです。

Macintosh 及び Windows 対応シグナルプロセッサー

## Mac Lab (Mac 対応ソフト: Chart/Scope) Power Lab (Windows 95/NT 対応ソフト: Win Chart)

マルチプラットフォーム化を実現!!

Mac 専用のデータ記録解析システム Mac Lab に新しく Windows 対応型の Power Lab シリーズが加わりクロスプラットフォーム化を実現しました。Mac 上でも PC 上でも高性能なチャートレコーダ、ホリグラフ、XYレコーダ、デジタルオシロスコープとして機能し、従来の煩雑な作業を一挙に軽減します。  
<http://www.adi-japan.com>



Mac Lab/Power Lab は……  
特殊なプログラミングを必要とせず、ユーザーの既存の記録作業をシステム化します。現在、幅広い分野で測定、記録、解析、シミュレーション、教育用に活躍しています。

### 演算

- 差分、積分 (平均、加算平均)
- 波形間の Subtract 等 (四則演算)
- 拡大、縮小(振幅、スケール、タイム)
- データホールド、カウント
- スティムレータ、シグナルジェネレータ
- レードメータ、ペリオドメータ
- FFT (Real, dB, ハミング処理他)、整列
- スムージング、オートベースウォン
- アルタイム X-Y プロット
- 単位変換、キャリブレーション、演算表示
- タイムベース外部機器コントロール
- ベースライントラック

### 記録

- ハードディスクレコーディング
- インメモリーレコーディング
- 圧縮記録で長時間記録が可能。(EEGで1MBあたり約2時間/100Hz/1CH)
- SCSI接続により1台のコンピュータで複数台同時記録が可能。(例32CH等)
- ClassicIIからPower Book、Power Macまで接続可能。

日本総代理店



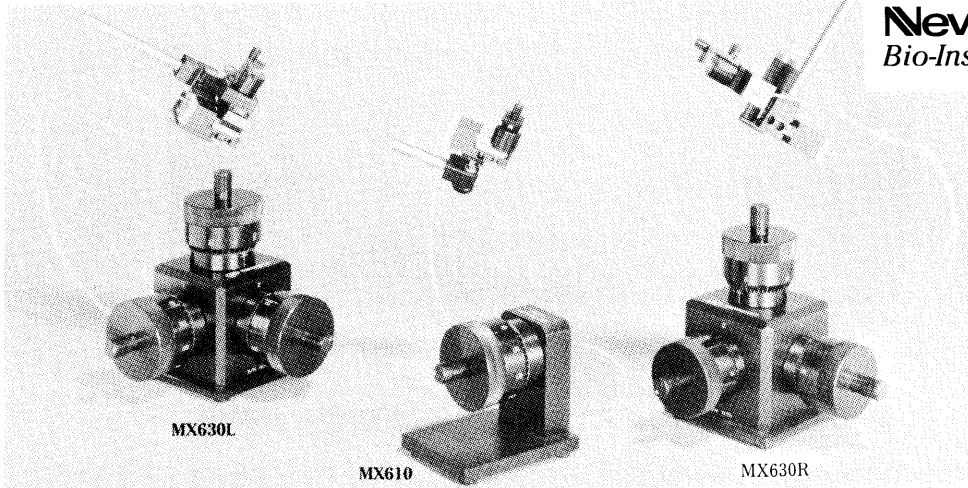
## バイオリサーチセンター株式会社

本社 名古屋市長区泉 2-28-24 (ヨコタビル4F) ☎052(932)6421 FAX052(932)6755  
東京 東京都千代田区若木町 2-10-1 (オカジマビル) ☎03(3861)7021 FAX03(3861)7022

# 水圧式マイクロマニピュレータ



Newport  
Bio-Instruments



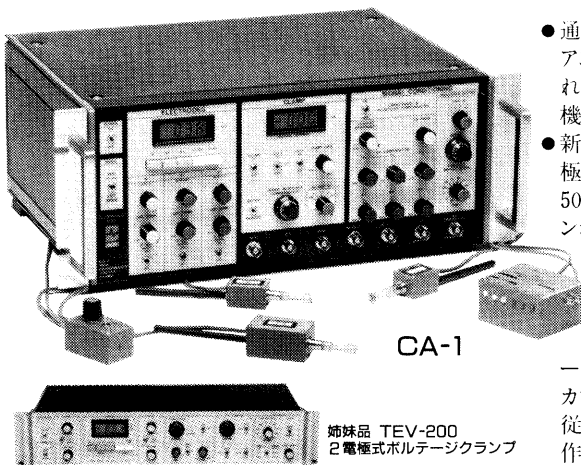
- コンパクトで遠隔操作型
- 低ドリフトで驚くべき安定性
- 高い分解能
- スムーズで応答性に優れた駆動
- 顕微鏡や粗動マニピュレータへのセッティングが簡単

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。



- 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ノバ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 $\mu\text{s}$ 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.Francis Benzanillaとの業績によるものです。

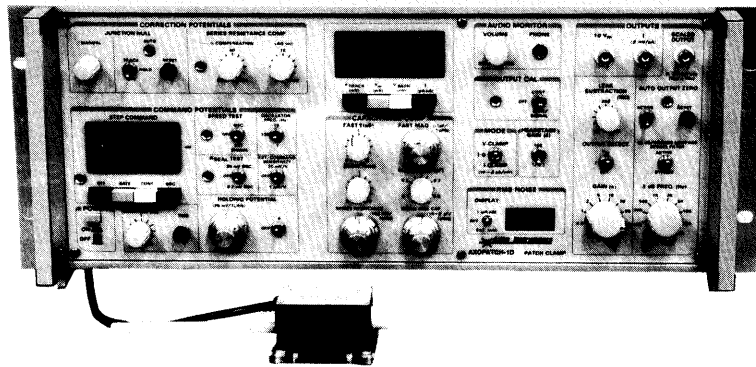
日本総代理店

**BRC**

バイオリサーチセンター株式会社

本社 名古屋市東区泉2-28-24(ヨコタビル4F) ☎052(932)6421 FAX052(932)6755  
東京 東京都千代田区岩本町2-10-1(オカジマビル) ☎03(3861)7021 FAX03(3861)7022

# 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 名古屋市東区葵一丁目25番1号  
TEL (052) 937-7060 FAX (052) 937-5423  
TLX 444-3603 WDMC J  
東京支社/〒157 東京都世田谷区粕谷三丁目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

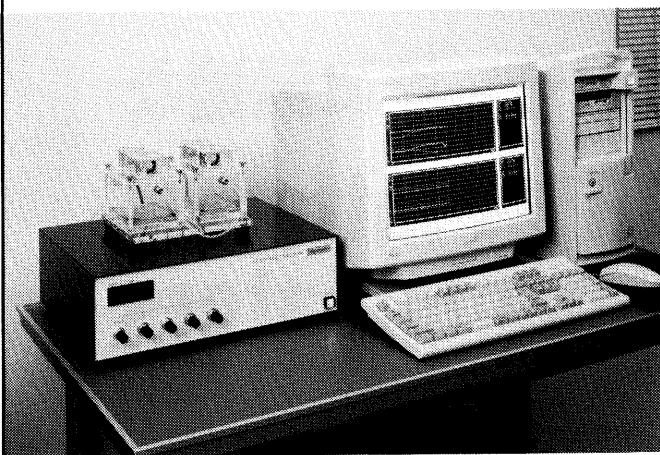
(Physio-Tech)

株式会社 フィジオテック

〒101 東京都千代田区内神田2丁目6番11号  
若松ビル2F

TEL (03) 3258-1641 (代)

# 小動物用代謝計測システム MODEL MK-5000



本システムは、エアタイトチャンパーを用いたO<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>ガスによる代謝計測システムです。本システムを使用することにより、従来は困難であったラット・マウス等の小動物のリアルタイム呼吸代謝モニターを実現することができます。

## ■主な特長

- 高精度O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>センサーの採用により正確にモニターできます。
- チャンパー内のガスは小型ファンにより偏向なくミキシングされます。
- コンピュータによる全自動サンプリング。
- 各チャンパーは独立して計測を行うことができます。
- トレッドミル(オプション)を併用することにより運動時の代謝計測を行うこともできます。

**Muromachi**

総発売元

**室町機械株式会社**

本社 東京都中央区日本橋室町4-2-1 大辻ビル  
〒103-0022 TEL 03(3241)2444 FAX 03(3241)2940  
大阪営業所 大阪市淀川区木川東4-5-3 オバル新大阪ビル  
〒532-0012 TEL 06 (302)1277 FAX 06 (302)5026  
E-mail : sales@muromachi.com

# ラット・マウス用 非観血式血圧測定装置

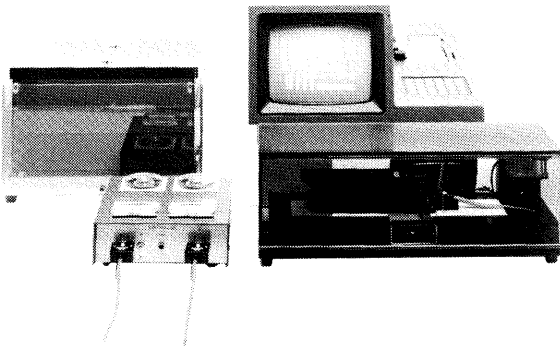
## MODEL MK-1100

\* 収縮期血圧 /

\* 平均血圧 /

\* 拡張期血圧(計算値) /

\* 脈拍数 / の安定した測定に



## ■特長

- 脈拍信号を音で聞くことができます。(音量の調節可)
- 連続測定機能及び高速測定機能の追加により測定時間が大幅に短縮。
- 400mmHg 迄加圧可能ですのでSHRSPも測定できます。
- 高速印字機能 / 全ての測定データは、音の静かな高速一マルプリンタにより約1秒間で打ち出されます。また、平均値の他にSD値も打ち出されます。
- タイムスタンプ機能 / テータ印字の際に計測時の時間も印字されます。
- 画面コピー機能 / 付属のプリンタで画面のハードコピーを行なえます。
- マーマセットやスングスの測定を行なうこともできます。
- R232C出力が標準装備されています。
- センサーの感度はMK-1000型と比較して約5倍アップしています。

**Muromachi**

総発売元

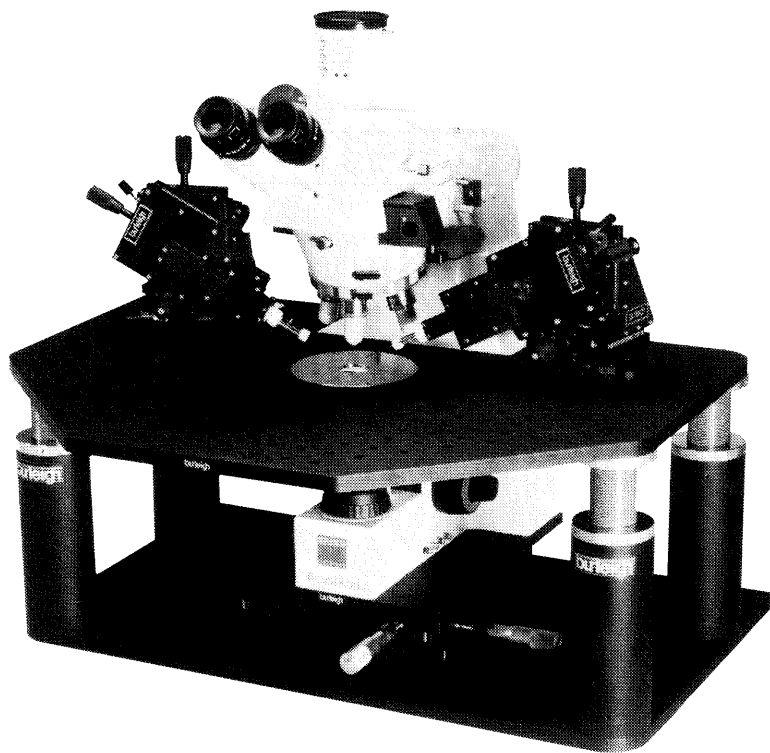
**室町機械株式会社**

本社 東京都中央区日本橋室町4-2-1 大辻ビル  
〒103-0022 TEL 03(3241)2444 FAX 03(3241)2940  
大阪営業所 大阪市淀川区木川東4-5-3 オバル新大阪ビル  
〒532-0012 TEL 06 (302)1277 FAX 06 (302)5026  
E-mail : sales@muromachi.com

**burleigh**

The Power of Precision  
in Life Science.

スライスパッチリサーチに最適な  
**GIBRALTAR™ Platforms  
& Micromanipulators**



写真は: GIBRALTAR™プラットフォームと新型 Piezoelectric micromanipulator PCS-5400 型

◆詳しい資料をご請求下さい

バーレイ社 日本代理店:  
**シヨージン EM 株式会社**

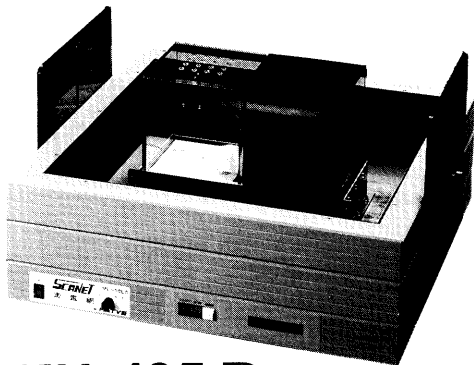
〒444-02 愛知県岡崎市赤浜町蔵西1番地14  
Tel.0564-54-1231 Fax.0564-54-3207

# 小動物行動測定の世界

# SCANETのTOYO

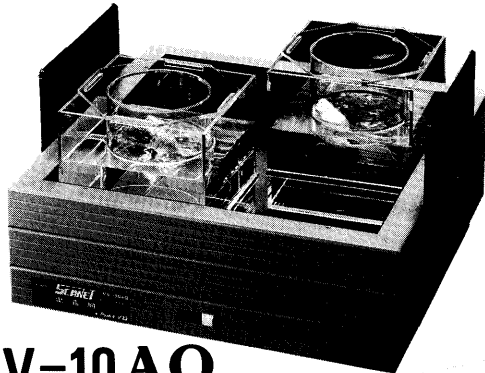
## 《スキャネットシリーズ》

● 薬物依存測定



**MV-10LD**

● 抗うつスクリーニング測定



**MV-10AQ**

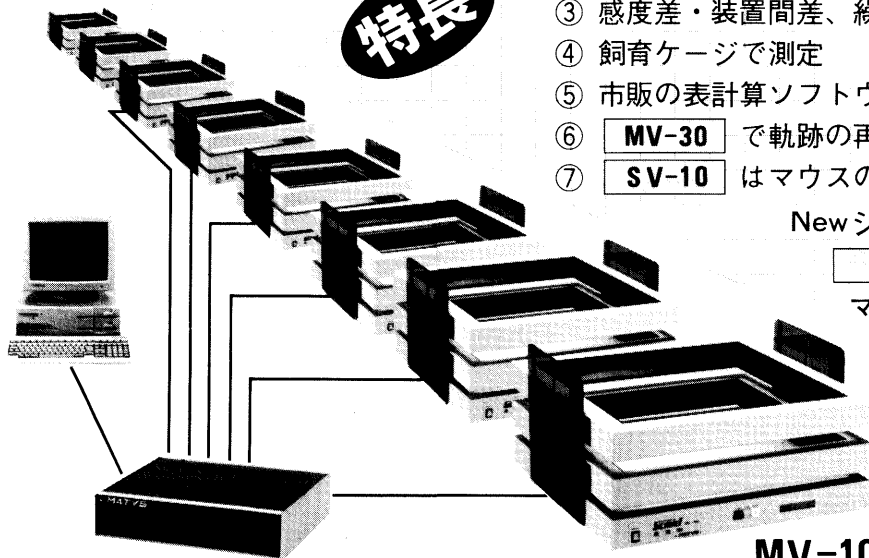
**特長**

- ① High Density SCANNER
- ② 立ち上がり用センサも高密度配置
- ③ 感度差・装置間差、繰り返し誤差なし
- ④ 飼育ケージで測定
- ⑤ 市販の表計算ソフトウェア使用可能
- ⑥ **MV-30** で軌跡の再現
- ⑦ **SV-10** はマウスの測定に最適

Newシステム

**MV-10 MT**

マルチタイプは  
最高です。



**MV-10 システム**



**MATYS**

メイティス

製造元 **東洋産業株式会社**  
医用機器事業部

本社・工場 / 〒930-02 富山県中新川郡舟橋村舟橋415  
TEL (0764) 62-1881(代)・FAX (0764) 64-1500  
(医用機器事業部直通)

TEL (0764) 64-1577 ・ FAX (0764) 64-1477

● 東京営業所 / TEL (03) 3401-6596 ・ FAX (03) 3478-5369

● 大阪営業所 / TEL (06) 309-1231 ・ FAX (06) 309-1250

# 新鮮切片作製装置

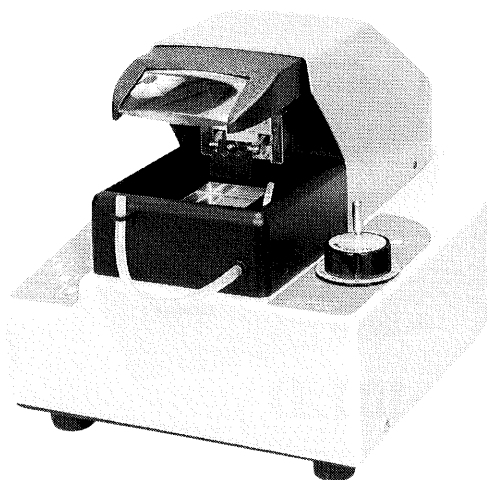
NEW

DSKマイクロスライサー® DTK-1000

さらなる進化！ より薄く、よりダメージの少ない新鮮切片を

## ●旧タイプとの違い

- ①ボディを樹脂で覆ったことにより生理食塩水、バッファ等の浸透を防ぎボディを腐食させることがなくフレームを強化し強震をより少なくしました。
- ②刃ホルダーは波の立たない静かな形状により切断面のダメージが著しく少なく、また刃角度調整に手間取らないワンタッチ方式を採用しました。
- ③刃の作動部の改良により振動を抑え持久性を高めました。
- ④試料台が最大20mmまで上下作動するようになりました。
- ⑤蛍光灯付拡大鏡が収納式になりました。



## ■仕様

|        |                           |
|--------|---------------------------|
| 電源     | AC100V 1A 50/60Hz         |
| 照明     | 4W蛍光灯・ルーペ付                |
| 試料サイズ  | W30×D30×H20mmまで           |
| 切片の厚み  | 10~500 $\mu$ m(固定した試料を含む) |
| 刃の往復数  | 0~15サイクル/sec 可変式          |
| 刃の前進速度 | 0~5mm/sec 可変式             |
| 外寸     | W300×D430×H295mm          |
| 重量     | 24kg                      |

## 主な研究用途

- 生理学・薬理学  
電位差測定、電極位置確認
- 脳神経外科学
- 組織化学・細胞学  
特に電顕レベルの酵素組織化学
- 植物組織学

\* 詳しい資料・文献・デモンストレーションは下記までご請求ください。

# DOSAKA EM CO., LTD.

**D.S.K** 堂阪イーエム株式会社

〒601-11 京都市左京区静海市原町1032-3  
TEL. 075-741-3069 FAX. 075-741-3026

# ThermoPlate

MATS-Uシリーズ  
サーモプレート MATSシリーズ PAT.P  
**TOKAI HIT**

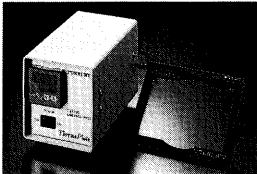
## 顕微鏡ステージ自動温度制御システム

更なる品質・性能の向上を目指し「 $\text{UL}$ 規格取得・ $\text{CE}$ 適合シリーズ：MATS-Uシリーズ」を拡充  
豊富なラインアップでバイオテクノロジーをサポートします。

### MATS-Uシリーズ：UL規格・CEマーク適合

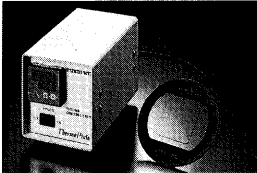
温度設定（室温～50℃）

型式：MATS-U55S  
汎用タイプのプレート  
Sタイプ（平型フラット）  
をワールドワイドなコ  
ントローラーで制御す  
るUL規格・CEマーク  
適合機種。



型式：MATS-U55R30  
（ホフマン対応）

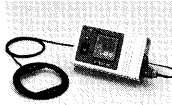
倒立顕微鏡用で、ホフ  
マンモジュールシ  
ョン対応のプレートR30  
タイプ（丸型）をワ  
ールドワイドなコ  
ントローラーで制  
御するUL規格・  
CEマーク適合機種。



### MATSシリーズ：スタンダード・ハイグレード・ノイズレス

温度設定（室温～50℃）

スタンダード（温度精度： $\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ ）  
薄型でコンパクトな省スペース設計。  
しかもPID制御と無接点リレーを  
採用したコントローラー。  
プレートは倒立・正立・実体顕微鏡  
用と各種取り揃えています。



ハイグレード（温度精度： $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ）  
シリーズレギュレーター方式電源  
により連続的な温度制御を行う高  
精度なコントローラー。  
プレートは倒立・正立顕微鏡用と各  
種取り揃えています。

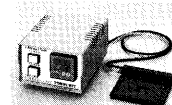


ノイズレス（温度精度： $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ ）シ  
ールド機構を組み込むことにより、  
ノイズを軽減した直流タイプの高  
精度なタイプ。  
パッチクランプ・膜電位測定時の検  
体の温度管理に。

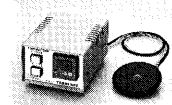


### 冷却・加温兼用・冷却専用プレート

温度設定（3～50℃）（室温～3℃）



STタイプ（正立・実体顕微鏡用）  
MATS-555ST（3～50℃）  
MATS-500ST（室温～3℃）



RTタイプ（倒立顕微鏡用）  
MATS-555RT（3～50℃）  
MATS-500RT（室温～3℃）

**Nikon**：株式会社 ニコンインステック **OLYMPUS**：オリンパス販売株式会社 にもお取り扱い頂いて居ります。

製造・販売元

（詳しくは弊社宛お問い合わせ頂けますようお願いいたします。）

**TOKAI HIT** 株式会社 東海ヒット 〒418 静岡県富士宮市源道寺町306-1 TEL.0544-24-6699 FAX.0544-24-6641

# 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

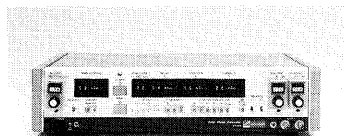
## パッチ / ホールセルクランプ用増幅器 CEZ-2400

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。

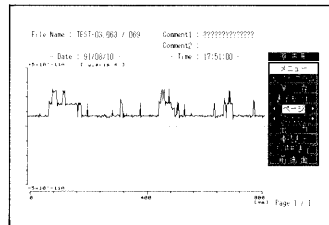
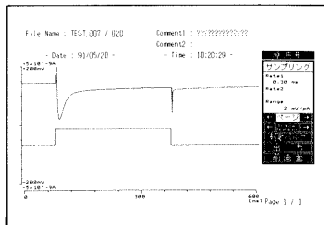
### ステップパルスジェネレータ SET-1201

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** 東京都新宿区西落合1-31-4 〒161  
 ☎03(5996)8028

カタログをご希望の方は当社までご請求下さい。

