

日本

生理学

雑誌

JOURNAL OF THE PHYSIOLOGICAL SOCIETY OF JAPAN

61巻 1号 1999

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〕 森本武利：生命哲学としての生理学…………… 1

INFORMATION…………… 3

CALENDAR…………… 11

RECORDS…………… 12

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」

熊谷 泉・津本浩平：ファージライブラリーによる抗体産生…………… 13

久米見啓・小澤敬也：造血幹細胞への遺伝導入…………… 23

学会抄録

第78回北海道医学大会生理系分科会…………… 31

第45回中部日本生理学会…………… 38

第91回近畿生理学談話会…………… 54

日本生理学会会則…………… i

日本生理学雑誌編集委員会選出内規…………… ii

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

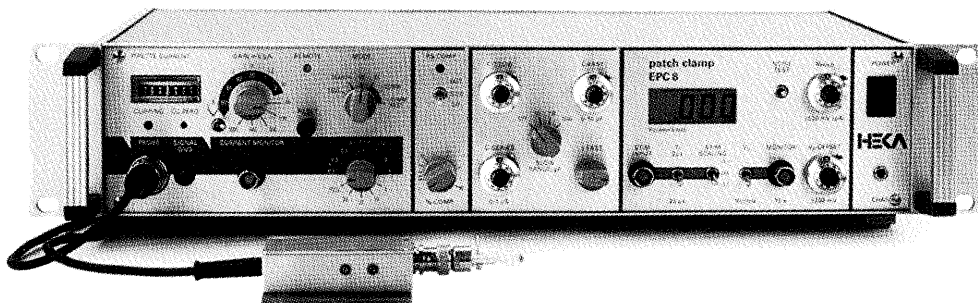
日本生理学会

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(1000pF)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

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1998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1999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. 黒島晨汎 (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. 黒島晨汎 (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. 黒島晨汎 (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10年度(1998)論文表題集中込み案内

日本生理学雑誌編集委員会

1999年4月末日を以ってご提出願います論文表題集は、1999年9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お願いします。

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(〒113-0033 東京都文京区本郷 3-30-10 布施ビル内)

平成10年度(1998)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10年度(1998)論文表題集 ( ) 部

## 目 次

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10年度(1998)論文表題集申込み案内

[巻頭言] 生命哲学としての生理学 (森本武利) ..... 1

**INFORMATION**

- 千里ライフサイエンス技術講習会 第18回  
 「レーザースキャニングサイトメトリーの理論と実際  
 —形態観察を実現したサイトメータ LSC—」 ..... 3  
 第8回インテリジェント材料シンポジウム 講演募集および開催概要 ..... 3  
 第9回歩行分析実習セミナーのお知らせ ..... 4  
 第12回 日本体力医学会スポーツ医学研修会開催案内 ..... 4  
 第5回「Computer Visualization Contest」 in “Computer Visualization Symposium '99” ... 7

**CALENDAR**

主な学会開催日程 ..... 11

**RECORDS**

会員消息 ..... 12

**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」  
 熊谷 泉・津本浩平：ファージライブラリーによる抗体産生 ..... 13  
 久米晃啓・小澤敬也：造血幹細胞への遺伝導入 ..... 23

**学会抄録**

- 第78回北海道医学大会生理系分科会 ..... 31  
 第45回中部日本生理学会 ..... 38  
 第91回近畿生理学談話会 ..... 54

- 日本生理学会会則 ..... i  
 日本生理学雑誌編集委員会選出内規 ..... ii  
 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

## 生命哲学としての生理学

京都府立医科大学第一生理学教室

森本 武利

医学領域のノーベル賞を、日本ではノーベル医学賞、ないしは医学・生理学賞と呼ぶことが多いが、英文では Nobel Prize in Physiology or Medicine である。これは、Alfred Nobel の遺言の中で、5つの分野の1つとして“the most important discovery within the domain of physiology or medicine”という言葉が使われているためと考えられる。Nobel が亡くなった19世紀末は丁度微生物ハンティングが華やかな時代で、ホルモンハンティングが始まろうとしていた時期に相当する。しかし physiology が基礎医学の代表として medicine すなわち治療医学と対等に扱われている。

Physiology の語源であるギリシャ語の physis は起源ないしは自然の意味を持つ。またラテン語の辞書では physiologia には生理学のほか自然についての知識および自然哲学という意味がある。すなわち physiology は基礎医学を包含した言葉であり、この語源を用いている言語圏の人たちにとっては、physiology or medicine という語には何ら抵抗がないのではなかろうか。そしてたとえ遺伝子ハンティングの時代となり、分子生物学の時代となってもこの語を変更することは問題にならないのであろう。

医学の歴史を遡るとき、医学を方向付ける多くの概念が、生理学者によって提供されてきている。実験医学は370年前の W. Harvey による循環の概念にまで遡ることが出来ることはいうまでもない。C. Bernard の milieu intérieur は130年前、Starling の法則およびホルモンの概念は100年前、W. Cannon の homeostasis の概念は60年前より医学分野に無くてはならない概念である。これらはいずれも impact factor のような過去2年のスケールで計られるものではない。Japanese Journal of Physiology の citation half life が長い所以でもある。

生理学に要求されるのは、素子の生理学に加え、それを体系付け研究を方向付ける哲学であろう。基礎の研究者のみならず、臨床やコメディカルの研究者にとっても、生理学は不可欠の分野であり、生体機能の解析とこれを裏付ける概念ないしは哲学を求めているのであろう。

生理学研究の面白さ、楽しさを次世代に伝え、若い研究者の生理学への参加を計ることは当然である。しかしフィールドを単に生理学教室に限りのではなく、これに加え臨床の若い研究者やコメディカルの研究者が、日常の臨床で、またフィールドで生じた疑問をど

んどんと生理学教室に持ち込める体制を醸成することが必要であろう。これらの問題を解決するための生理学的ツールを提供し、それをどの様に考えるか指針を示すことによって、生理学マインドを持った研究者を育てることが出来る。これらの研究者は臨床やそれぞれのフィールドに戻っても、生理学的な考え方を活用して研究を発展させ、生理学の裾野を拡げてくれることになる。またこれらの研究者や臨床の大学院学生の中には、生理学教室で素晴らしい研究を行い、生理学の面白さに取り憑かれて生理学者の道を選んだ例も少なくない。

我々も随分お世話になったガス分析器の開発者である P. F. Scholander が晩年に書いた自伝のタイトルは“Enjoying a Life in Science”である。生理学は80歳でもなお楽しむことの出来る Science である。世代を超え、実験科学としてまた生命哲学として楽しむことが出来るのが生理学であることを学生や若い臨床医、コメディカルの研究者に伝え、また生理学の研究を共に楽しみたいものである。

# INFORMATION

## 千里ライフサイエンス技術講習会 第18回 「レーザースキニングサイトメトリーの理論と実際 —形態観察を実現したサイトメータ LSC—

|    |                                                                                                                                                                 |      |                                                                                                                                                                                                                           |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 日時 | 平成11年2月26日(金) 13:00~17:00                                                                                                                                       | 定員   | 30名                                                                                                                                                                                                                       |
| 場所 | 千里ライフサイエンスセンタービル9階<br>(地下鉄御堂筋線千里中央駅北口すぐ)                                                                                                                        | 受講料  | 3,000円                                                                                                                                                                                                                    |
| 主催 | 財団法人千里ライフサイエンス振興財団                                                                                                                                              | 申込締切 | 平成11年2月6日(財団必着)                                                                                                                                                                                                           |
| 協賛 | オリンパス販売株式会社<br>株式会社千里ライフサイエンスセンター                                                                                                                               | 申込方法 | 氏名, 勤務先, 所属, 役職名, 所在地,<br>〒, 電話, FAX番号を明記の上, 郵便または<br>FAXで下記宛お申込下さい. 受講料はお申<br>込後に大和銀行・本店公務部・普通預金 No.<br>3093240財団法人千里ライフサイエンス振興財<br>団口座宛にお振込下さい. なお, お振込の際,<br>振込者名の前に <u>G18</u> とご記入下さい. ご送金<br>確認次第, 領収書兼参加証を送付いたします. |
| 演題 | 1. LSCの原理とアプリケーション紹介<br>オリンパス販売(株) 清松 芳正<br>2. LSCのための標本作製法デモンストレーション<br>3. 機器の操作デモンストレーション<br>4. LSCによる染色体変異および細胞動態の解析<br>—講演および機器による解析—<br>オリンパス光学工業(株) 佐藤 卓朋 | 申込先  | (財)千里ライフサイエンス振興財団 技術講習会係<br>〒565-0082 大阪府豊中市新千里東町1-4-2<br>千里ライフサイエンスセンタービル8階<br>TEL 06-873-2001 FAX 06-873-2002                                                                                                           |

## 第8回インテリジェント材料シンポジウム 講演募集および開催概要

|      |                                                                                                                                                         |           |                                                                                                                        |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 主催   | (社)未踏科学技術協会 インテリジェント<br>材料フォーラム                                                                                                                         | ④         | インテリジェントシステム(スマートス<br>トラクチャー, インテリジェントデバイス<br>など)                                                                      |
| 後援   | 科学技術庁(予定)                                                                                                                                               | ⑤         | 各分野でのインテリジェント材料とその<br>特性などに関する講演発表を募集します.                                                                              |
| 協賛   | 日本生理学                                                                                                                                                   | 講演申込締切:   | 平成10年12月18日(金)                                                                                                         |
| 日時   | 平成11年3月16日(火)                                                                                                                                           | A4判用紙に,   | ①講演題目, ②発表者氏名(講<br>演者に○印), ③所属, ④連絡先(TEL, FAX,<br>E-mail 併記), ⑤講演概要(200字程度)を<br>記載して下記宛お申し込み下さい(FAX,<br>E-mail での申込可). |
| 場所   | 青山学院大学 渋谷キャンパス                                                                                                                                          | 講演要旨原稿締切: | 平成11年2月15日(月)                                                                                                          |
| 講演内容 | 半導体, セラミックス, 金属, 無機, 有<br>機分子, 高分子, 生体分子, あるいはこれらの<br>複合系材料を基本構成とする種々のインテリ<br>ジェント材料について,<br>① 設計概念, 設計理論<br>② インテリジェント性の発現メカニズム<br>③ インテリジェント性の具体化と新機能 | 高木 賞:     | シンポジウム当日に最優秀論文発表を選                                                                                                     |

考し、懇親会時に「高木賞」を贈呈いたします。  
 参加費：会員5,000円、協賛団体会員8,000円、  
 非会員10,000円、学生2,000円  
 懇親会費：一律6,000円  
 申込先：〒105-0001 東京都港区虎ノ門1-2-8  
 虎ノ門琴平会館ビル

(社)未踏科学技術協会  
 インテリジェント材料フォーラム  
 「第8回インテリジェント材料シンポジウム」  
 TEL：03-3503-4681 FAX：03-3597-0535  
 E-mail：mitoh@snet.sntt.or.jp

## 第9回歩行分析実習セミナーのお知らせ

主催 臨床歩行分析研究会  
 日時 1999年3月25日(木)～28日(日) 4日間  
 場所 吉備国際大学  
 テーマ 関節モーメントとそのパワー  
 主任講師 江原義弘, 山本澄子  
 使用システム ELITE plus, キスラー床反力計  
 定員 24名  
 参加費 3万円 学生 1万5千円  
 申し込み方法 所属, 氏名, 連絡先(住所, 電話番号,  
 FAX, E-mail)を明記の上, 下記のいずれか  
 の方法でお申し込み下さい。定員になり次第締  
 め切ります。  
 葉書 〒716-8508 岡山県高梁市伊賀町8  
 吉備国際大学保健科学部理学療法学科  
 島中泰彦宛

FAX 0866-22-7560  
 E-mail hatanaka@kiui.ac.jp.  
 問い合わせ先 吉備国際大学保健科学部理学療法学科  
 島中泰彦  
 TEL 0866-22-9454(内)1730  
 関節モーメントを臨床で活用することに関心が高  
 まっています。関節モーメントは各筋群の活動には  
 ほぼ対応するからです。本セミナーでは、関節モー  
 メントの力学的な意味とその臨床応用を体験を通し  
 て学びます。今回は特に関節モーメントの生み出す  
 パワーについても計算します。これが正の時、筋群の  
 求心性収縮に対応し、負の時は遠心性収縮に対応し  
 ます。また余裕のあるグループには筋張力推定計算  
 をしていただくことも計画しています。ふるってご  
 参加ください。

## 第12回 日本体力医学会スポーツ医学研修会開催案内

日本体力医学会では、会員が体力科学に関する理解を深め研鑽する目的で、スポーツ医学研  
 修会を開催し、これまでに多数の会員の参加により成果をあげて参りました。

平成11年度も下記の要領でスポーツ医学研修会を開催しますので、ここにご案内いたします。  
 昨年と同様に、今回の研修会は講義を減らし実習を採り入れました。研修会は基礎医学コース、  
 運動処方・運動療法コース、スポーツ外傷・障害コースの3回に分けて行われますが、ご希望  
 のコースを単独で受講することも可能です。また、他の研修会や資格更新のための再教育の場  
 としてこの研修会を受講される方には、受講証明証を発行いたします。この研修会の講義・実  
 習で対象として取り扱うのは一般の人で、アスリートではありません。

平成11年1月

日本体力医学会学術委員会 スポーツ医学研修会実行委員会

栗原 敏 村山正博 小原 誠 吉岡利忠 本間生夫

福林 徹 武者 春樹 河野 照茂 鈴木 政登 久野 譜也

## 1. 会場

会場は東京慈恵会医科大学高木会館5階会議室・スポーツ医学科フィットネス室・臨床検査医学講座・生理学講座第2です。講義は高木会館で、実習はスポーツ医学科フィットネス室、臨床検査医学講座研究室、および生理学講座第2実習室で行います。

## 2. 日時および研修カリキュラム

### 第1回 基礎医学コース

5月7日(金)

|             |                     |
|-------------|---------------------|
| 10:00~11:40 | 運動と神経               |
| 13:00~14:40 | 運動と筋                |
| 14:50~16:30 | 運動と循環               |
| 16:40~18:20 | 運動と呼吸               |
| 18:30~      | 懇親会(会費3,000円, 参加自由) |

5月8日(土)

|             |                             |
|-------------|-----------------------------|
| 9:00~10:40  | 運動とエネルギー代謝                  |
| 10:50~12:30 | 代謝とホルモン(含, 水電解質代謝)          |
| 13:30~16:30 | 運動による心拍と血圧の変動(トレッドミルを用いた実習) |

### 第2回 運動処方・運動療法コース

7月9日(金)

|             |                     |
|-------------|---------------------|
| 10:00~11:40 | 体力テスト               |
| 13:00~14:40 | 運動処方の基礎             |
| 14:50~15:50 | メディカルチェック・外科        |
| 16:00~17:00 | 運動療法と許可条件(I)(運動器疾患) |
| 17:10~18:10 | メディカルチェック・内科        |

7月10日(土)

|             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| 9:00~10:40  | 運動療法と許可条件(II)(高血圧, 循環器・呼吸器疾患) |
| 10:50~12:30 | 運動療法と許可条件(III)(糖尿病, 肥満, 肝疾患)  |
| 13:30~16:30 | 運動処方の実際(トレッドミルを用いた実習)         |

### 第3回 スポーツ外傷・障害コース

11月12日(金)

|             |                        |
|-------------|------------------------|
| 10:00~11:40 | スポーツによる内科的障害           |
| 13:00~14:40 | スポーツにおける循環器障害          |
| 14:50~16:30 | スポーツにおける整形外科的外傷・障害(I)  |
| 16:40~18:20 | スポーツにおける整形外科的外傷・障害(II) |

11月13日(土)

|            |            |
|------------|------------|
| 9:00~10:40 | スポーツ現場への復帰 |
|------------|------------|

- 11:00~12:30 テーピングと筋力トレーニングの実際(実習)  
13:30~15:00 テーピングと筋力トレーニングの実際(実習)

注意：各コースのなかで講義時間が前後することがありますので、ご了承下さい。

### 3. 修了試験と称号について

第1回から第3回の全コースを受講した方は、所定の修了試験を受験することができます。修了試験の合格者には合格証を発行いたします。また、修了試験合格後、所定の手続きをとると、日本体力医学会健康科学アドバイザーの称号を取得することができます。修了試験は、平成11年11月14日(田)に東京慈恵会医科大学で行います。

### 4. テキスト

スポーツ医学〔基礎と臨床〕(日本体力医学会学術委員会監修、朝倉書店)を使います。テキストは当日配布いたします。

### 5. 受講料

1コース 30,000円

全コースの受講を原則としますが、定員に余裕があれば1コースずつの受講でも可能です。次年度以降にその年度に受講しなかったそのほかのコースを受講すれば、全コース受講後、修了試験を受験することができます。

受講料のほかにテキスト代5,000円をいただきます。

### 6. 受講資格と定員

日本体力医学会の会員であること。会員以外で受講される場合は、学会入会手続き完了後にお申し込み下さい。定員は各コース 約40名

### 7. 申し込み方法

受講希望者は、葉書、または電話で、日本体力医学会スポーツ医学研修会を受講したい旨、日本学会事務センターまでご連絡ください(下記参照)。

申込書をお送りいたします(申込書は体力科学6号におり込んでありますのでご利用いただいても結構です)。

定員に達し次第、締め切らせていただきますので、ご了承下さい。受講票、受講料などの連絡は、受講通知とともに後日ご案内させていただきます。

### 8. 申込書送付先および問い合わせ先

〒113-8622 東京都文京区本駒込5-16-9

財団法人 日本学会事務センター内

日本体力医学会スポーツ医学研修会 係

電話：03-5814-5800 FAX：03-5814-5823

日経サイエンス

# 第5回「Computer Visualization Contest」

## in “Computer Visualization Symposium '99”

### — 応募要項 —

主催：日経サイエンス社

協賛：株式会社ケイ・ジー・ティー 日本電子計算株式会社 日本シリコングラフィックス株式会社

協力：オリックス・レンテック株式会社 東京リースレンタル株式会社

後援：(社)可視化情報学会、画像電子学会、(社)情報処理学会、情報知識学会、(社)電子情報通信学会、(社)日本機械学会、(社)日本建築学会、(予定)(社)日本流体力学学会、日本映像学会、(社)日本コンピュータ支援外科学会、日本シミュレーション学会、日本計算工学会、日本バイオイメージング学会、(社)日本造船学会、(社)日本エム・イー学会、(社)日本ロボット学会、(財)マルチメディアコンテンツ振興協会、AVSコンソーシアム、日経CG、他

### 開催趣旨

総合科学論文誌「日経サイエンス」では、「データと人」「人と人」とのコミュニケーション手段である可視化技術の一層の普及を目的として「コンピューター・ビジュアルゼーション・コンテスト」を毎年開催してまいりました。

各専門分野から選出された委員により査読審査を行い、全応募論文の中から16作品を採択します。さらに“コンピューター・ビジュアルゼーション・シンポジウム'99”を開催し、採択された16作品のプレゼンテーションを行い、会場の参加者との情報交換、ディスカッションを行います。

コンテストは、シンポジウム中にコンテスト独自の審査委員会によって行われ、16作品の中から各賞が選ばれます。コンテストの審査については、単に学術的な優劣のみを評価するのではなく、独自の審査基準に照らして選考するものです。

16作品は、シンポジウム論文集に掲載するとともに、日経サイエンス1999年10月号(8月25日発売)およびホームページにて、約3万人の読者をはじめ、広く内容を紹介いたします。

何卒、奮ってご応募下さいませようお願い申し上げます。

## コンピューター・ビジュアルゼーション・コンテスト

### 賞

シンポジウムで発表された作品に、下記賞を授与します。

**AVS大賞** 1点 ————— 賞金30万円 賞状・トロフィー

**副賞「CVC第5回記念」～SIGGRAPH99にご招待!** (1名様)

※日本国内在住者に限ります。また、作品制作ソフトがAVSであるか否かは、審査の対象とはなりません。

**優秀賞「KGT賞」** 1点 ————— 賞金10万円 賞状・トロフィー

**優秀賞「JIP賞」** 1点 ————— 賞金10万円 賞状・トロフィー

**優秀賞「SGI賞」** 1点 ————— 賞金10万円 賞状・トロフィー

**優秀賞「日経サイエンス賞」** 1点 ————— 賞金10万円 賞状・トロフィー

**特別賞「ニューフロンティア賞」** 1点 ————— 賞状・トロフィー

※新分野での活用など、ユニークな作品を対象とします。

**特別賞「ヤング・ビジニア (Young Visineer) 賞」** 1点 ————— 賞状・トロフィー

※高専学生、大学学部学生を対象とします(日本国内在住者に限ります)。

**特別賞「静止画賞」** 1点 ————— 賞状・トロフィー

※静止画作品が、最優秀賞、優秀賞に選ばれた場合、その他の静止画作品のなかから選出します。

**「入選」** 8点 ————— 賞状を授与

※各特別賞は該当なき場合もあります。

### ● コンテスト審査委員会 (敬称略・五十音順)

委員長：太田次郎 (江戸川大学学長)

委員：大村皓一 (宝塚造形芸術大学教授)

戸川隼人 (日本大学教授)

藤代一成 (お茶の水女子大学教授)

松尾義之 (日本経済新聞社編集委員)

小林敏雄 (東京大学教授)

中嶋正之 (東京工業大学教授)

森 啓 (明星大学教授)

## ● エントリー分野

- (1) 「サイエンス」～宇宙,地球,環境,気象,地形,物理,化学,ミクロスコピックほか
- (2) 「エンジニアリング」～電気,機械,建築,土木ほか
- (3) 「流体」
- (4) 「医学・生物」～バイオ・メディカルほか
- (5) 「数学・統計」「情報」
- (6) 「教育コンテンツ」
- (7) 「VR,アーティストックCG」～景観設計,ゲーム,シミュレータほか
- (8) 「可視化システム・ソフト」～汎用ビジュアル化システムやソフトウェアツールの開発ほか
- (9) その他

※各エントリー分野より点数を採択します。なお,査読結果によっては,各分野の採択論文数が異なることがあります。  
※(6),(8)は今回より新設された分野です。

## ● コンテスト審査基準

日経サイエンスでは,“コンピューター・ビジュアル化”を,「人と人」,「人とデータ」との重要なコミュニケーション手段としてとらえ,審査においても,その点について,どれだけ達成できているのかを最も大きな判断材料といたします。具体的には,下記3要素を審査基準として,優れた作品を選出します。

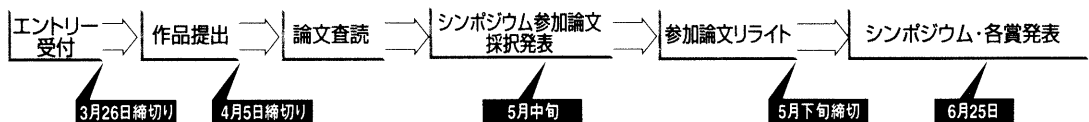
### (1) 可視化技術の先進性 (2) 可視化の意義・テーマの新規性 (3) 作品自体の説得力・表現力

※特に,「敢えて可視化する意義はあるのか」,「可視化することによって,どういったことが新たに理解できるのか」など,上記の“(2)可視化の意義”を重要な判断材料とします。

また,本コンテストは,論文内容の学術的優劣のみを審査するものではなく,計算などによって導き出されたデータを,対外的に,いかにわかりやすく,正確に,効果的に表現できているかという点についても重点を置き,審査します(例えば,レイアウト,色の使い方,文字の扱いなど)。

※シンポジウムにおけるプレゼンテーションの優劣は,コンテストの審査対象とはなりません。

## ● エントリーから発表までの流れ



### I. エントリー方法

※応募者全員にグラフ・コンター図作成ツール「Gsharp for Windows」(定価98,000円)の無料試用版(1年間の期間限定)を差し上げます。(提供:日本電子計算株式会社)

#### 1. エントリー用紙配布

CVC事務局あて,電話(TEL:03-3401-0611)または電子メール(cvc@cosmopia.co.jp)にて「エントリー用紙」をご請求下さい。

#### 2. エントリー用紙提出方法

・提出締切日:1999年3月26日(金)

・電子メール

事務局(cvc@cosmopia.co.jp)宛,件名を「CVC申込書」とし,①住所 ②氏名 ③所属 ④所属先所在地 ⑤電話・FAX ⑥本コンテストを知った手段(日経サイエンス,ダイレクトメール,ホームページ,学会誌,日経CGなど具体的に)を明記の上,お申込み下さい。折返し,事務局より送信する「エントリー用紙」に必要事項を入力の上,再度,ご返信下さい。

・FAX

エントリー用紙に必要事項をご記入の上,事務局宛(FAX:03-3401-5500)にご送付下さい。

#### 3. 応募確認通知

事務局より「応募確認通知」および論文提出の際に必要な「論文フォーム」を郵送,またはFAXします。

## II. 作品提出

1. 提出締切日 **1999年4月5日 (月)**

2. 提出物 (①②は必須)

①論文: 同じものを**3部**提出すること (和文, ヨコ26字×312行以内, A4・4枚, 論文内の画像・図表も文字数に含みます。詳細は「論文フォーム」を参照)。論文は, 次の要点を確認の上, 作成して下さい。

- ・研究内容の要約
- ・可視化の意義 (可視化することによって得られたメリットなど)
- ・制作環境・制作データ, ハード・ソフトの解説

②静止画 (ハードコピー) を必ず提出。同じものを**3枚**提出して下さい。

③静止画の他に動画を提出する場合は, **VHS**に**5分以内**で収録し, 同じ内容のものを**3本**提出して下さい。

3. 提出先

株式会社コスモピア 「CVC事務局」 ※電子投稿をご希望の場合は, 事務局までご連絡下さい。

## III. シンポジウム参加論文採択

- ・採択発表: 1999年5月中旬
- ・シンポジウムに参加する16作品は, 査読委員による審査の後, プログラム委員会を経て採択。
- ・全応募作品に対し, 採否結果・査読委員のコメント (査読内容) を報告します。

## IV. 日経サイエンス誌上での発表

- ・日経サイエンス1999年7月号 (5月25日発売) にて, シンポジウム参加作品の一覧を掲載。
- ・日経サイエンス1999年10月号 (8月25日発売) にて, 受賞作品をはじめとする入選作品の詳細を特集で掲載。  
※ 誌面掲載用原稿として, 受賞者に作品解説文の執筆 (編集作業の都合上, 1週間以内の執筆) をお願いします。

# コンピューター・ビジュアルリゼーション・シンポジウム'99

日時 : 1999年6月25日 (金) 午前 11 時～午後 5 時 (予定)

会場 : TEPIAホール (東京都港区北青山2-8-44 TEPIA 4 階) 営団地下鉄銀座線「外苑前」より徒歩5分

入場料 : 無 料 (事前登録制)

### プレゼンテーション時間

1作品15分間 (講演10分, 質疑応答5分)

### プレゼンターへの交通費

日本国内在住者に限り, 参加者1名分の交通費の半額を, 主催者で負担いたします。  
海外からの参加者は, 全額自己負担となります。  
「ヤング・ビジニア賞」へエントリーした場合, 交通費全額を主催者で負担いたします。

### シンポジウム参加の申込み

電子メール, FAX, はがきにて, **1.氏名 2.学校名もしくは勤務先名 3.郵便番号 4.自宅住所 5.電話番号 6.本シンポジウムを知った手段**を明記の上, CVC事務局「コスモピア」までお申込み下さい。折返し, 入場券をお送りします。

### 論文のリライトと論文集

査読内容を反映してリライトされた論文をまとめ, シンポジウムご来場の方に無料で配付予定。  
(なお, 第4回の論文集をご希望の方には, 特別価格・一冊2,000円にて頒布します。  
但し, 第5回CVCにエントリーされた方には, 無料で頒布いたします。)

※シンポジウム終了後に, コンテストの審査発表・贈賞式, 懇親会を実施いたします。

## ● 応募の取り決め事項

### I. 応募・出品の条件

#### 1. 応募資格

著作権を有する個人または団体・研究室など複数名による共同作品も可能。入選の場合、シンポジウムでの発表を応募条件とする。AVS大賞、特別賞「ヤング・ビジニア賞」は、日本国内居住者に限る。

#### 2. 応募論文・作品

応募者が著作権を有するオリジナル論文・作品であること。作品は、学会などで既に発表されたものでも受付けるが、1998年1月1日以降に制作されたものに限る。論文は、日本国内居住者は、日本語での応募とし、英文での応募は、海外の参加者に限る。

#### 3. 応募申込

所定の応募申込書に記入し、事前に本コンテスト事務局に届ける。応募申込書の提出によって、応募者は「コンピューター・ビジュアルセッション・コンテスト」の取り決めに従い、審査以前、審査期間中および期間後においても主催者が定めた諸規定に従うものとみなす。

#### 4. 締切日

作品提出締切日（1999年4月5日）を過ぎると、本コンテストへの参加資格を失うこともある。

#### 5. 著作権

作品自体もしくは論文中使用される画像・音声などの著作権については、応募前に必ず著作権者の許諾を得ること。

### II. 応募論文・作品の取り扱い

- 提出された論文・作品は、原則として返却しない。
- 応募論文・作品は、主催者が本コンテスト審査の発表・広報・宣伝のため、または、主催者もしくは主催者が認めた団体、法人などが営利を目的とせず「コンピューター・ビジュアルセッション・コンテスト」に関する広報・宣伝および普及・啓蒙活動のために、上映、放送、複製、印刷、展示する場合がある。
- 前項のため、論文・作品について著作権処理を必ず済ませること。万一、第三者から、権利侵害、損害賠償などの主張がなされた場合は、応募者が自らの責任と負担で処理するものとし、主催者は一切責任を負わない。
- 審査またはその他の理由により、主催者が応募論文・作品の複製および編集を行った場合は、複製物の保存・消去については、主催者に任されるものとする。
- 本コンテストの協賛者が、本コンテストに関わる広報・宣伝活動や、販売促進活動のために、応募論文・作品の使用許可を応募者に求めることがある。

### III. 応募の責任

- 応募に関する一切の費用は応募者の負担とする。
- 応募用紙や、論文・作品の輸送中に発生する可能性のある、不慮の事故の損傷や紛失についても、各自留意すること。
- 受賞および入選論文・作品に関する広報・宣伝資料、その他関係資料などの輸送のための費用は応募者の自己負担とする。

### IV. その他

この「取り決め」に明記されていない事項については、主催者の判断により決定する。その決定は、最終的なものであり、その決定に応募者が了解できない場合は、その決定がなされた後、7日以内に限り応募を撤回することができる。また、この「取り決め」および「応募要項」は、日本国において日本法に準拠してつくられた合意として解釈され、効力を有するものとする。また、何らかの紛争が生じた時は、東京における裁判管轄に服するものとする。

#### 応募申込み先・作品の送り先

#### 株式会社コスモピア「CVC事務局」

〒107-0062 東京都港区南青山2-5-9-2F

TEL.03-3401-0611 FAX.03-3401-5500

E-mail: cvc@cosmopia.co.jp

シンポジウム・コンテストの内容についてのお問い合わせ

#### 日経サイエンス社 CVC係

〒100-0004 東京都千代田区大手町2-3-6 三菱総研ビル13F

TEL. 03-5255-2831 FAX.03-5255-2863 E-mail: horigoh@tokyo.nikkei.co.jp

過去の入賞作品を日経サイエンスのホームページでご覧になれます！  
<http://www.nikkei.co.jp/pub/science/>

# CALENDAR

## 主な学会開催日程

| 開催日<br>(演題締切)                             | 名 称                                                                             | 会 場                          | 連 絡 先                                                                                                                                                |
|-------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 99. 3.16                                  | 第8回インテリジェント材料<br>シンポジウム                                                         | 東京：青山学院大学<br>渋谷キャンパス         | (財)末路科学技術協会 インテリジェント材料チーム<br>☎03-3503-4681 FAX：03-3590-0535<br>E-mail：mitoh@sent.or.jp                                                               |
| 99. 3.25-28                               | 第9回歩行分析実習セミナー<br>関節モーメントとそのパワー                                                  | 岡山：吉備国際大学                    | 吉備国際大学 保健科学部 理学療法 畠中<br>☎0866-22-9454(1730) FAX：0866-22-7560<br>E-mail：hatanaka@kiui.ac.jp                                                           |
| 99. 3.28-30<br>(98.11. 7)                 | 第76回日本生理学大会                                                                     | 長崎：長崎大学<br>文教キャンパス           | 長崎大 熱帯医研 環境生理<br>☎095-849-7820<br>FAX：095-849-7821                                                                                                   |
| 99. 5. 7- 8<br>99. 7. 9-10<br>99.11.12-13 | 第12回日本体力医学会スポーツ医学研修会<br>第1回基礎医学コース<br>第2回運動処方・運動療法コース<br>第3回スポーツ外傷・障害コース        | 東京：東京慈恵会医科大学<br>高木会館         | (財)日本学会事務センター内<br>日本体力医学会スポーツ医学研修会係<br>☎03-5814-5800 FAX：03-5814-5823                                                                                |
| 99. 5.19-21                               | GSSI-Sports Science Net Worum in Nagano 1999<br>～スポーツ医学の新しい研究パラダイム<br>の確立をめざして～ | 長野：軽井沢プリンスホテル                | 信州大 医 加齢適応研究センタースポーツ医学分野<br>☎0263-37-2682 FAX：0263-34-6721<br>E-mail：sakaiak@gipac.shinshu-u.ac.jp                                                   |
| 99. 5.22-23                               | 第14回日本生体磁気学会大会                                                                  | 岡崎：岡崎国立協同研究機構<br>コンファレンスセンター | 生理研 統合生理研究施設 金種<br>☎0564-55-7766 FAX：0564-52-7913<br>E-mail：biomag@nips.ac.jp<br>URL：http://www.nips.ac.jp/~kaneyo/                                  |
| 99. 5.25-28                               | 脳と意識に関する Tokyo '99 国際会議                                                         | 東京：国連大学本部<br>(渋谷区神宮前)        | ノートルダム清心女子大 情報理学研内<br>☎086-255-5636 FAX086-255-5090<br>E-mail：tokyo99@zoushoku.narc.affrc.go.jp<br>URL：http://www.ias.unu.edu/activities/tokyo99.htm |
| 99. 6.25                                  | コンピュータ・ビジュアライゼーション・<br>シンポジウム '98                                               | 東京：TEPIA ホール<br>(港区北青山)      | 日経サイエンス社 CVC 係<br>☎03-5255-2831 FAX：03-5255-2863<br>E-mail：horigoh@tokyo.nikkei.co.jp                                                                |
| 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                                                              |
| 99. 8.24-28                               | 第1回ICSDT 国際会議(第1回ナトリウム<br>依存性輸送蛋白質およびイオンチャネルの<br>調節と疾病に関する国際会議)                 | 静岡：コンベンション<br>アーツセンター        | 静岡県立大 薬 祐田<br>☎054-264-5673 FAX：054-564-5672<br>E-mail：suketa@ys.shizuoka-ken.ac.jp                                                                  |
| 99.11. 8- 9                               | 第39回日本脳波・<br>筋電図技術講習会                                                           | 東京：新宿朝日生命ホール                 | 日大 医 精神神経科学教室<br>☎03-3972-8111(2431)<br>FAX：03-3974-2920                                                                                             |
| 99.11.10-12                               | 第29回日本脳波・<br>筋電図学会学術大会                                                          | 東京：新宿京王プラザホテル<br>NSビル        | 日大 医 精神神経科学教室<br>☎03-3972-8111(2431)<br>FAX：03-3974-2920                                                                                             |

\*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                   |
|----------|-------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| 浅野 牧 茂   | 国立公衆衛生院 生理学衛生学部                     | 03-3441-7111(390) ・ 03-3447-6740  |                                  |
| 安 部 博    | 北海道大学 医学部 総合生理学講座                   | 011-706-7871 ・ 011-706-7871       |                                  |
| 井上 雅 仁   | 京都大学 霊長類研究所 行動神経<br>研究部門 行動発現研究分野   | 0568-63-0560                      | minoue@smtp.Pri.kyoto-u.ac.jp    |
| 今 井 一    | 岐阜大学 教育学部 保健体育講座                    | 058-293-3122                      | imai@cc.gifu-u.ac.jp             |
| 今 井 清 博  | 大阪大学 大学院医学系研究科 A 4<br>情報伝達医学専攻情報生理学 | 06-879-3623 ・ 06-879-3623         | kimai@physl.med.osaka-u.ac.jp    |
| 片山 敬 章   | 名古屋大学 医学部 研究科                       | 052-789-2965 ・ 052-789-2957       | keishok@tsuru.med.nagoya-u.ac.jp |
| 國 本 聡    | 日本大学 医学部 附属板橋病院 第二内科                | 03-3972-8111(2413) ・ 03-3972-1098 |                                  |
| 平野 丈 夫   | 京都大学 理学研究科 生物物理学教室                  | 075-753-4237 ・ 075-753-4229       |                                  |
| 福岡 大 太 郎 | 横浜みなとクリニック                          |                                   |                                  |
| 山下 謙 智   | 京都工芸繊維大学 繊維学部<br>応用生物学科             | 075-724-7734                      |                                  |

## ファージライブラリーによる抗体産生

熊谷 泉・津本 浩平

(東北大学大学院工学研究科生物工学専攻)

### I. はじめに

Kohler と Milstein によって1975年に発表された、細胞融合法を用いたモノクローナル抗体の作製法は、抗原特異性あるいは親和性が均一な抗体分子を手にするを可能にした。しかしながら、目的の機能を持つ(希望通りの特異性を持つ)抗体を常に得られるとは限らないことなど、問題が少なくなかった。近年報告されているファージ提示法による抗体の産生は、従来のハイブリドーマを用いたモノクローナル抗体作製とならぶ手法として、注目を集めている。とくに、細胞融合では得られないような、抗体分子の調製、あるいは免疫化による調製が困難なヒト抗体分子の作製などに、非常に有効であることが示されてきた。本稿ではファージ提示法について概観した後、抗体をファージ表面にライブラリーとして提示し選択することによって、目的とする抗体分子がどのように調製できるか、その長所あるいは問題点も含めて論じていく。

### II. 繊維状ファージ提示法

大腸菌に感染する繊維状ファージは、遺伝子工学において、部位特異的変異導入、DNA塩基配列決定における一本鎖DNA調製など、さまざまな用途に用いられている。繊維状ファージは、外被蛋白質として主にマイナーな外被蛋白質である遺伝子3産物のgp3、メジャーな外被蛋白質である遺伝子8産物のgp8を有している。gp3はファージ粒子一つあたり3~5個存在するとされており、ファージが感染するために大腸菌の繊毛に接触することが主な機能である。N末端ドメイン、C末端ドメインの

二つに分けることができ、前者は繊毛接触、後者はファージ粒子の形態形成に重要であることが示唆されている。またgp8はファージ粒子ひとつあたり数千個あり、ファージ粒子の形態形成に重要な役割を果たしている。遺伝子型と表現型が一体になっていて、かつ非常に単純なウイルスであることから、これら二つの外被蛋白質をコードする遺伝子に、目的の蛋白質をコードする遺伝子を融合させ、大腸菌内で遺伝子を発現させ、ファージ表面に提示させることになる。ここでは蛋白質の提示あるいは選択に多用される、gp3を用いた提示法についてまとめる。

ファージ提示法は当初、fdファージのgp3のN末端側数残基に、ある抗体が認識する抗原分子の遺伝子をランダムに挿入したライブラリーを作製し、大腸菌に感染させることにより得られるファージを用いて、抗体との結合を観察することにより、その抗体のエピトープマッピングを行うために構築された[1](図1)。その後、ランダムペプチドをファージ表面に提示したペプチドライブラリーから、目的の結合能を持つペプチド断片をスクリーニングする[2]方法への応用が試みられ、現在までにさまざまな工夫が施されたライブラリーが報告されている[3]。また、蛋白質分子の機能を保持したまま提示できることがわかり、さまざまな蛋白質分子が提示され[3]、その幾つかは機能解析もしくは機能変換に用いられてきた[4]。

しかしながら、ファージゲノムにそのまま蛋白質分子の遺伝子を挿入し提示を試みても、多くの場合遺伝子の欠損が起こることが観察されている。しかも高分子を提示させるためにfdファージの大腸菌への感染能が著しく低下する

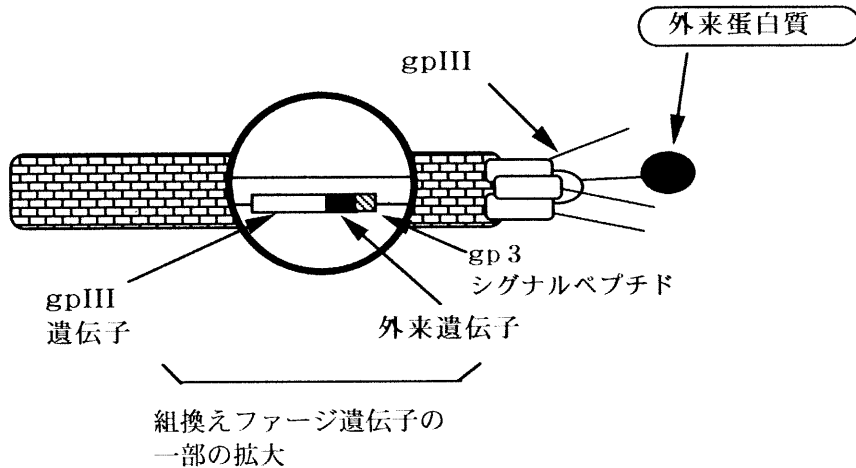


図1. ファージ提示系

ことも当初から分かっていた。そこで、ファージミドとヘルパーファージを用いる、gp3のN末端を欠損させて融合発現させるなどの改良が試みられている[4]。ファージミドを用いた方法は提示効率は低下するものの、蛋白質分子を提示させるのに効果的だと考えられている。しかし、gp3の融合蛋白質の大量発現は大腸菌に対して毒性を示すことから、やはり遺伝子の欠損に遭遇する場合も少なくない。その理由

の一つとして、プロモーターの制御が不十分であることや、構成的に働くプロモーターからの予期せぬ転写が起こることなどが挙げられる。実際、Krebberらはターミネーターをlacプロモーターの上流に挿入し、上流からの転写を抑制し、さらにグルコースを添加することにより発現を制御することが有効であることを報告している[5](図2A)。一方、筆者らのグループはファージミド上の遺伝子の読み枠をlacプロ

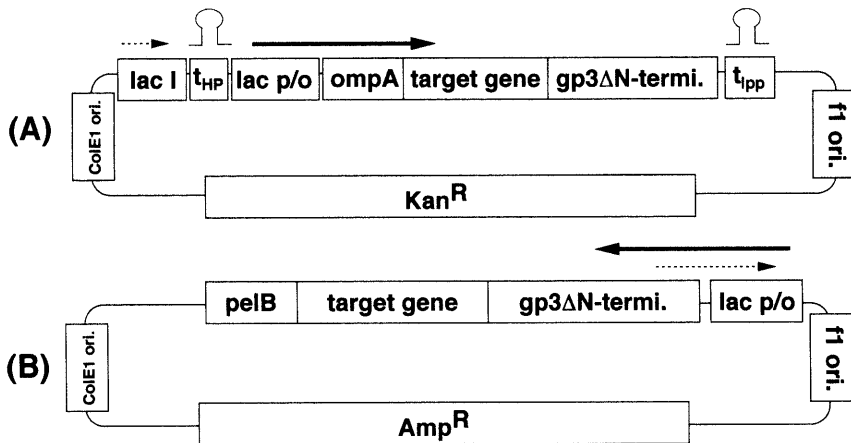


図2. ファージ提示系の改良

- より安定なファージ表面への提示のために、改良されたファージミドを示した。
- (A) lacプロモーターの上流にターミネーター導入し(tHP)、lacIからの転写を抑制したファージミド[5]。
- (B) lacプロモーターの逆方向に融合遺伝子を組み替えたファージミド。転写はgp3のC末領域に存在するファージ由来のプロモーターから始まる[6]。

モーターと正反対に置くことによって、gp 3のC末端ドメインに存在する、ファージゲノム上で gp 3 の下流にある gp 6 のためのプロモーターを利用する系を開発している [6] (図 2 B)。

### Ⅲ. ファージ提示法を用いた抗体断片の作製

生体内の免疫系における、抗体の産生機構について、その多くが既に解明されていることは

周知のとおりである。ファージ提示法を用いた抗体分子の産生も、その概念は、免疫系をまねることを基本としている(説明は文献7あるいは8に詳しい)。試験管内で、目的の抗体分子を選択するための方法論として要求される基本は抗体の遺伝子を取り出して、ファージ表面に、クローンによる差がなく安定に提示することにより生体内と同じ規模のライブラリーを構築することと、生体内での正の選択にあたる、パニ

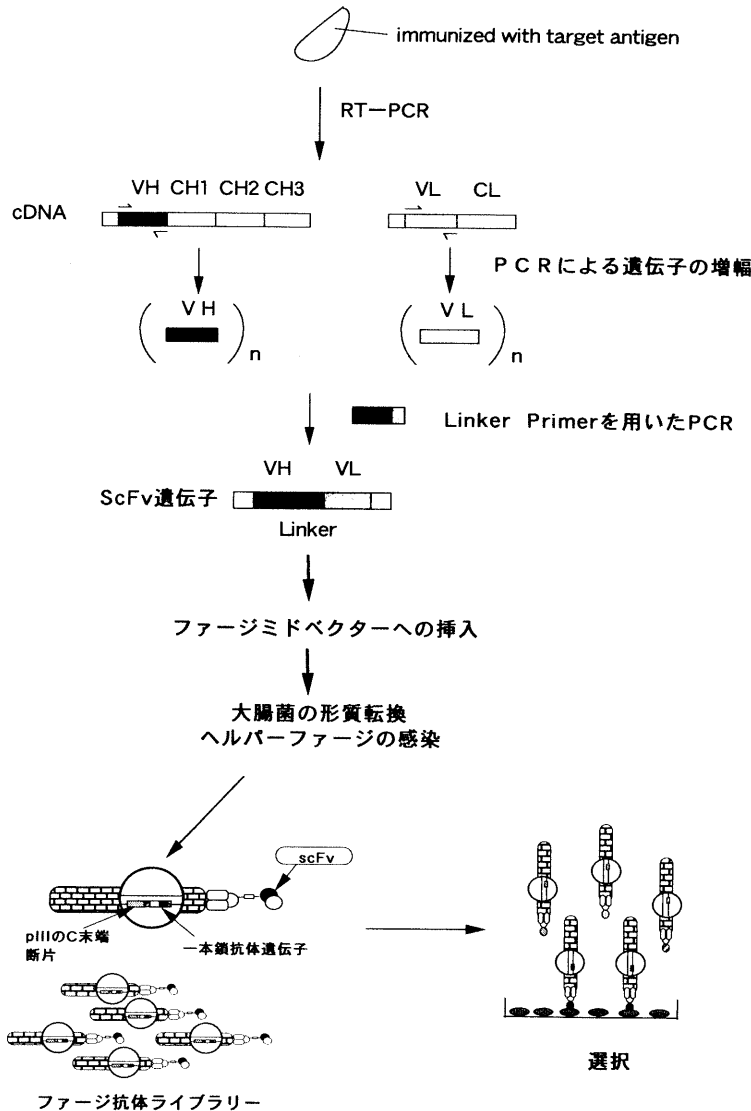


図3. 生体内免疫系を模倣した試験管内選択系による抗体分子の調製

ングによる選択を繰り返すことによる目的のクローン選択の二つである。実験技術として重要であるのは、(1) 抗体断片遺伝子の増幅、(2) ファージ表面への提示、(3) 目的の抗体断片の選択、(4) 可溶性抗体断片の調製、(5) 親和性の増大を目指した無作為変異の導入や可変領域の shuffling の五項目に分けることができる。図3にその大きな流れを図示した。本節ではこれらについて、筆者らの経験も踏まえて解説したい。

### A. 抗体断片遺伝子の増幅

ライブラリー作製の第一歩は遺伝子の調製にある。遺伝子の由来は、免疫したマウスの脾臓が一般的である。無論ハイブリドーマ化した細胞でもよい。ヒト抗体の場合は、白血球から調製することになる。mRNA の調製、ならびに

PCR 法による遺伝子の増幅を行うわけであるが、遺伝子増幅プライマーはファルマシア社と Novagen 社から販売されている。ファルマシア社が販売しているマウス抗体のためのプライマーは配列が公表されていない。Novagen 社のプライマーセットは数種類が用意されており、その増幅も効果的なようである。ヒト抗体については MRC のグループがプライマー配列を公表しており [9]、増幅の効率もよい。マウス抗体については、いくつかの研究グループによる報告がある [10,11]。PCR 法を用いた遺伝子の増幅にはつねに付きまとうことであるが、アニール温度が、特定の抗体断片遺伝子の増幅に非常に大きなファクターとなるので、細心の注意を払う必要がある。一本鎖抗体遺伝子の調製については次項で述べる。

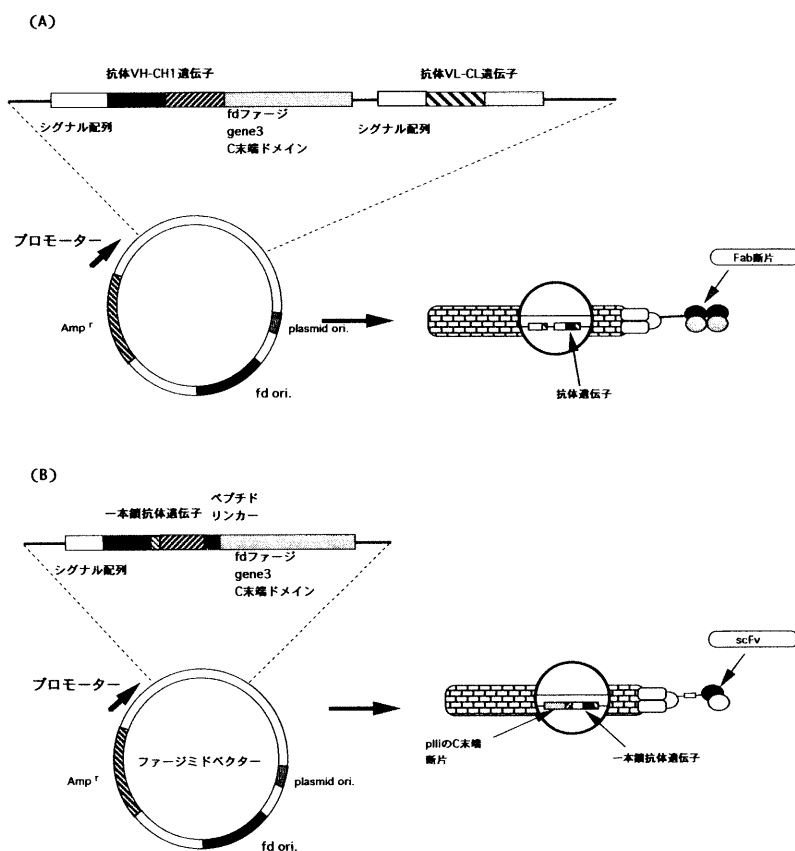


図4. ファージ提示系による抗体断片(Fab 及び scFv)の提示

## B. 繊維状ファージ表面への提示

繊維状ファージ提示法は目的蛋白質をファージコート蛋白質のN末端側に融合発現させるのが基本的戦略であり、抗体のように重鎖、軽鎖が存在する場合には工夫が必要となる。通常提示する抗体断片として、Fab断片の場合とFv断片の場合がある(図4)。Fv断片はドメイン間の相互作用が弱く、抗原存在下でない限り、非共有結合的にヘテロダイマーとして提示することは困難である。そこで実際にファージ表面にはペプチドリンカーで可変領域を結合し、一本鎖化する作業が必要となる[9,11]。一本鎖化は一般にPCRで行われるが、なかなかうまく行かないのが現実のようである。先に述べたように、できるだけ精製度の高い遺伝子を用いることは無論のこと、VH鎖とVL鎖を完全に等しい量でリンカープライマーと共に混合し、PCRを行わないと、一本鎖化した遺伝子が意図したように増幅しない。アニール温度も重要なファクターである。

その点から鑑みると、Fab断片として提示する場合は、一本鎖化するという作業がなく、かつ本来存在しないリンカーを結合させる必要がないという点で、より合理的であるといえる。この場合、片方の鎖をファージ表面に提示し、もう片方の鎖を大腸菌内で可溶性蛋白質として発現させることになるが[12]、提示効率や大腸菌での発現量の点で問題が生じることが多い。

増幅された遺伝子断片をファージ提示用のファージミドベクターに挿入する。この際の遺伝子断片はできるだけ精製されたものを用いることが肝心である。ライゲーションしたファージミドベクターの大腸菌への導入効率が、ライブラリーの大きさを決定することにもなるからである。ファージ提示のためのファージミドベクターそのものは数社から販売されている。しかしながら、大腸菌の形質転換効率にはどうしても限界があり、なかなか思うような規模のライブラリーは得られないのが現実である。より効率の高いコンピテントセルを用いたエレクトロポレーションを複数回行うなどの工夫が必要

となる。細胞内で組み換え反応を行わせ、ライブラリーの規模を飛躍的に高める方法も報告されている[13]。

## C. 目的の抗体断片を提示したファージの選択(パンニング)

ライブラリーが構築できたら次は目的の抗体断片を選択することになる。通常パンニングと呼ばれる方法で選択する。これはマイクロタイタープレート(96穴、あるいは24穴なども用いる)に抗原を非共有結合的に結合させ、適当なブロッキング剤でブロックした後、ファージライブラリーを加え、リン酸緩衝液で洗った後、溶出する。得られたファージを大腸菌に再感染させ、再び培養する。この操作を3~4回繰り返すことによって目的の機能を持つファージ分子を濃縮することになるが、プレートの材質、抗原の吸着効率、ブロッキング剤の相性などの問題により、各々の抗原ごとに至適条件を選び出さなければならない。ストレプトアビジンとビオチン化した抗原を用いた固定化法、あるいはプレートではなく、磁気ビーズを用いた方法が効果的な場合もある。

注意しなければならないのは、パンニング途中の遺伝子の欠損である。どのような理由であるかは明らかでないが、遺伝子の欠損は選択途中に頻繁に見られることであり、欠損のないことについて絶えずチェックを行うことが、意味のある選択を続行する上で重要である。

結合能の検出には酵素標識した抗M13抗体を用いたELISA法を用いることが多い。M13ファージを認識する抗体はファルマシア社やシグマから入手することができる。しかしながら、ファージ表面への提示効率等を考えると、この方法によってのみでは分子認識能を完全に議論しきれず、得られたクローンについて、可溶性分子として調製し、本当に目的の機能を持つ抗体分子であるかを確認する必要がある。

## D. 可溶性抗体断片の調製

目的のクローンが得られたら、いよいよ可溶

性抗体断片を調製できるということになるが、意図するように大量に目的の蛋白質が大腸菌を用いた分泌発現[14]により得られるとは限らない。一本鎖抗体の場合は、ペリプラズム画分や膜画分に不溶性の粒子としてしか発現しない場合が多く、変性剤で抽出後、巻き戻すという操作が必要となる。シグナルペプチドがプロセッシングされていることは、筆者らも含め、多くのグループによって報告されており、細胞膜からの分泌がうまく行かず、膜に残った状態になるようである。一方 Fab 断片については、理由ははっきり分かっていないが、大腸菌での分泌発現量は極端に少ない[15]。

精製については、標的抗原を用いた親和性クロマトグラフィーが効果的であるが、不可能である場合、カルボキシ末端側にヒスチジンタグを融合発現させ、金属キレートクロマトグラフィーを行う、あるいは FLAG ペプチドを融合発現させ、抗 FLAG ペプチド抗体によるクロマトグラフィーを行うなどが有効である。ヒスチジンタグによる精製は、その大腸菌での発現量が多くない場合に多く見受けられることであるが、しばしば非特異的吸着を伴い、さらなる精製が必要になることがある。また、ペプチドタグが大腸菌における発現量を減少させることもあり、注意が必要である。

#### E. 変異導入による親和性の増大

生体内の抗体産生では親和性の成熟と呼ばれる現象が知られており、最終的に非常に高い親和性を持つクローンが選択されることになる。生体内では CDR のみならず、定常領域にも変異がかかることにより親和性が向上することが知られている。とくに、免疫化していないライブラリーからは、解離定数の低いクローンを得ることはなかなか難しく、人工的な変異導入を施す必要が生じることが多い[8,9]。ファージ抗体では部位特異的な変異導入、error-prone PCR による無作為な変異導入などが考えられる[16,17]。無論 CDR に直接無作為変異導入を施すことは非常に効果的なようである。

Scripps 研究所の Barbas らによる、ファージ提示系により選択されたヒト抗体分子について、各々の CDR に段階的に無作為変異を導入し、パンニングにおいて洗浄の条件などを調節することにより、より結合能の高いクローンを選択し、選択された CDR を組み合わせることにより、HIV 表面抗原(gp120)に対する親和性をピコモルオーダーまで高めた[18]。同様に Marks らのグループは c-erb B-2 に対して、重鎖、軽鎖ともに CDR 3 に無作為変異を導入し、得られたクローンを組み合わせることによって、抗原に対する親和性をピコモルオーダーまで高めている[19]。これらは、抗体に対する突然変異導入が、抗体の親和性向上に非常に有効であることを示しており、様々な応用が期待される。また、もはや生体内で調製される抗体分子の親和性(ナノモルオーダー)をはるかに越えていることから、細胞表面にごくわずかしが存在しない抗原に対する高いターゲティング性を持つ抗体分子の作製など、臨床面からも今後大きな期待を持たせる。他に、VH または VL 鎖のどちらか一方を、ゲノムから切り出した断片に置き換え、構築したライブラリーを用いて親和性の高い分子を選択する方法(Chain-shuffling 法)も試みられている[20, 21]。

#### IV. 抗原存在下での可変領域相互作用を利用した新しい抗原定量法と抗原認識能変換への応用

III.一A. に述べたように、可変領域のみからなる抗体 Fv 断片は単独では VH と VL に解離しやすいが、抗原の存在下で安定化する場合が知られている。これを利用すると、あらかじめファージ表面には VH 鎖のみを提示し、VL 鎖を可溶性蛋白質として調製しておき、それらの会合を調べることによってサンプル中の抗原濃度が測定できる(図5A)。この方法により、従来から用いられている Sandwich 法の半分の手間で同程度の感度を得ることに成功した(Open Sandwich 法)[22]。この手法は、先に述べた Chain-shuffling 法とあわせて、片方の鎖

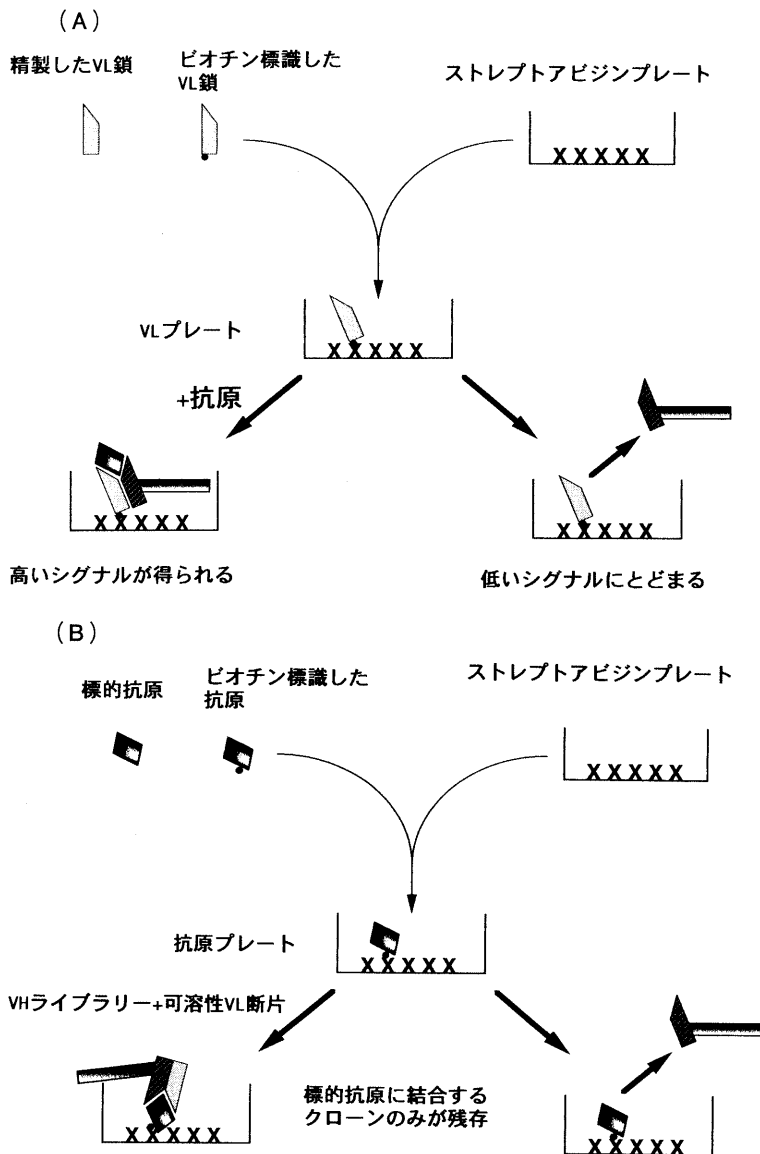


図5. Open Sandwich 法の概念と効率良い抗体分子の選択への応用

- (A) Fv断片が抗原の存在下で安定に存在することを利用した Open Sandwich 法. VH鎖をファージ表面に提示し, VL鎖と抗原を混合する. 三者が複合体形成する際, ファージ量をELISA法で定量することにより抗原の濃度を測定することが可能となる.
- (B) ファージ表面に提示するVH鎖に無作為変異を導入することによって, 目的の機能を持つ抗体分子の選択に用いることができる.

に無作為変異を導入してファージに提示し, もう片方の鎖を可溶性蛋白質として調製しておくことによって, 無作為変異導入した抗体分子の機能変換に用いることができる(図5B). 筆者

らは最近, 本来ヒトリゾチームを認識できない抗ニワトリリゾチーム抗体 HyHEL-10に, この方法を用いて認識能を賦与することに成功した[23]. 同時にシチメンチョウリゾチームに対

する特異性を持つがニワトリリゾチームに対する特異性を失った抗体，双方に特異性を持つ抗体を自在に得ることも出来ており，抗原認識能の変換が自在に行える系として応用が可能であろう。

## V. お わ り に

抗体分子の持つ，抗原に対する高い特異性と親和性を最大限に発揮できるのは，臨床面であろう。従来用いられている，細胞融合法による抗体分子の調製は，手間，時間はかかるものの依然として重要な位置を占めている。一方，細胞融合では得にくい抗体分子の作製は，本稿で述べたファージ抗体による調製が非常に有効であることがいくつかの例で示されつつある。二つの手法が合わさることで，抗体分子のさまざまな分野での有用性を飛躍的に高めることが期待される。

また，抗体断片を用いた多価抗体[24]，酵素など別の機能を付与した抗体断片の構築[25]は，微生物を用いた抗体分子の作製によって最も強力に推し進めることができる。ファージ抗体による機能改良，機能改変と併せることによって，より迅速な抗体分子の工学が可能となるであろう。

さらに，ファージ提示法は，蛋白質の機能変換，機能改良を行う上で最も有効な手段の一つであり，抗体分子に限らず，さまざまな蛋白質へ応用できる。実際，ヒト成長ホルモンの機能改良[26]，プロテアーゼ基質特異性の選択[27]，セリンプロテアーゼインヒビター[28]，DNA結合蛋白質の機能改変[29]に应用されているほか，トリプシン，アルカリ性フォスファターゼなど酵素分子の提示が報告されている[30]。構造既知，構造未知の蛋白質について，無作為変異導入を施した効果を迅速に評価できるファージ提示法は，機能改変，改良という観点から今後とも発展していくであろう。

## 謝 辞

本稿における筆者らの研究の一部は NEDO 提案公募型・最先端分野研究開発事業の助成を受けて行った。

## 文 献

1. Smith GP: Filamentous Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Viron Surface. *Science* **228**: 1315-1316, 1985.
2. Scott JK & Smith GP: Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library. *Science* **249**: 386-390, 1990
3. Bass S, Greene R & Wells JA: Hormone Phage: an Enrichment Method for Variant Proteins with Altered Binding Properties. *Proteins* **8**: 309-314, 1990
4. Clackson T & Wells JA: In vitro selection from protein and peptide libraries. *TIBTECH* **12**: 173-184, 1994
5. Krebber A, Burmester J & Plückthun A: Inclusion of an upstream transcriptional terminator in phage display vectors abolishes background expression of toxic fusions with coat protein g3p. *Gene* **178**: 71-74, 1996
6. Maenaka K, Furuta M, Tsumoto K, Watanabe K, Ueda Y & Kumagai I: A Stable Phage-Display System Using a Phagemid Vector: Phage Display of HenEgg-White Lysozyme (HEL), *Escherichia coli* Alkaline Phosphatase, and Anti-HEL Monoclonal Antibody, HyHEL 10. *Biochem Biophys Res Commun* **218**: 682-687, 1996
7. Marks JD, Hoogenboom HR, Griffiths AD & Winter G: Molecular evolution of proteins on filamentous phage: mimicking the strategy of the immune system. *J Biol Chem* **267**: 16007-16010, 1992
8. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE & Hoogenboom HR: MAKING ANTIBODIES BY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY. *Annu Rev Immunol* **12**: 433-455, 1994
9. Marks JD, Hoogenboom HR, Bonnert TP, McCafferty J, Griffiths AD & Winter G: By-passing Immunization: Human Antibodies from V-gene Libraries Displayed on Phage. *J Mol Biol* **222**: 581-597, 1991
10. Krebber A, Bornhauser S, Burmester J, Honegger A, Willuda J, Bosshard HR, Plückthun A: Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybridomas and spleen cell repertoires employing a reengineered phage display system. *J Immunol Methods* **201**: 35-55, 1997
11. Yamanaka H-I, Kirii Y & Ohmoto H: An improved phage display antibody cloning system using newly designed PCR primers optimized for

- Pfu DNA polymerase. *J Biochem* **117**: 1218-1227, 1995
12. Hoogenboom HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P. & Winter G: Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* **19**: 4133-4137, 1991.
  13. Waterhouse P, Griffiths AD, Johnson KS & Winter G: Combinatorial infection and in vivo recombination: a strategy for making large phage antibody repertoires. *Nucleic Acids Res* **21**: 2265-2266, 1993
  14. Pluckthun A & Skerra A: Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli*. *Meth Enzymol* **178**: 497, 1989
  15. Plückthun A: Mono- and Bivalent Antibody Fragments Produced in *Escherichia coli*: Engineering, Folding and Antigen Binding. *Immunol Rev* **130**: 151-188, 1992
  16. Riechmann L & Weill M: Phage Display and Selection of a Site-Directed Randomized Single-chain antibody Fv Fragment for Its Affinity Improvement. *Biochemistry* **32**: 8848-8855, 1993
  17. Deng S, MacKenzie CR, Sadowska J, Michniewicz J, Young NM, Bundle DR & Narang SA: Selection of Antibody Single-chain Variable Fragments with Improved Carbohydrate Binding by Phage Display. *J Biol Chem* **269**: 9533-9538, 1994
  18. Yang W, Green K, Pinz-Sweeney S, Briones AT, Burton DR & Barbas III CF: CDR Walking Mutagenesis for the Affinity Maturation of a Potent Human Anti-HIV-1 Antibody into the Picomolar Range. *J Mol Biol* **254**: 392-403, 1995
  19. Schier R, McCall A, Adams GP, Marshall KM, Merritt H, Yim M, Crawford RS, Weiner LM, Marks C & Marks JD: Isolation of Picomolar Affinity Anti-c-erbB2 Single-chain Fv by Molecular Evolution of the Complementarity Determining Regions in the Center of the Antibody Binding Site. *J Mol Biol* **263**: 551-567, 1996
  20. Kang AS, Jones TM & Burton DR: Antibody redesign by chain shuffling from random combinatorial immunoglobulin libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 11120-11123, 1991
  21. Marks JD, Griffiths AD, Malmqvist M, Clackson TP, Bye JM & Winter G: By-Passing Immunization: Building High Affinity human Antibodies by Chain Shuffling. *Biotechnology* **10**: 779-783, 1992
  22. Ueda H, Tsumoto K, Kubota K, Suzuki E, Nagamune T, Nishimura H, Schueeler PA, Winter G, Kumagai I & Mahoney WC: Open sandwich ELISA—a novel immunoassay based on the inter-chain interaction of antibody variable region. *Nature biotech* **14**: 1714-1718, 1996
  23. Tsumoto K, Nishimiya Y, Ueda H, Nagamune T, Ogasahara K, Yutani K, Tokuhisa K, Matsushima M & Kumagai I: Novel selection method for engineering of an antibody using the mechanism of Fv fragment stabilization in the presence of antigen. *Protein Engng* **10**: 1311-1318, 1997
  24. Kostelny SA, Cole MS & Tso JY: Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J Immunol* **148**: 1547-1553, 1992
  25. Wels W, Harwerth IM, Zwickl M, Hardman N, Groner B & Hynes NE: Construction, bacterial expression and characterization of a bifunctional single-chain antibody-phosphatase fusion protein targeted to the human erbB-2 receptor. *Biotechnology* **10**: 1128-1132, 1992
  26. Lowman HB & Wells JA: Affinity maturation of human growth hormone by monovalent phage display. *J Mol Biol* **234**: 564-578, 1993
  27. Matthews DJ & Wells JA: Substrate Phage: Selection of Protease Substrates by Monovalent Phage Display. *Science* **260**: 1113-1117, 1993
  28. Roberts BL, Marjkbald W, Ley AC, Kend RB, White DW, Guterman SK, Landner RC: Directed evolution of a protein: Selection of potent neutrophil elastase inhibitors displayed on M13 fusion phage. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2429-2433, 1992
  29. Rebar EJ & Pabo CO: Zinc Finger Phage: Affinity Selection of Fingers with New DNA-Binding Specificities. *Science* **263**: 671-673, 1994
  30. McCafferty J, Jackson RH & Chiswell DJ: Phage-enzymes: Expression and affinity chromatography of functional alkaline phosphatase on the surface of bacteriophage. *Protein Engng* **4**: 955-961, 1991



## 造血幹細胞への遺伝子導入

久米 晃 啓・小澤 敬 也

(自治医科大学分子病態治療研究センター遺伝子治療研究部)

### I. はじめに

造血幹細胞への遺伝子導入には、オンコウイルスの Maus 白血病ウイルスをベースとしたレトロウイルスベクターを用いるのが一般的である。アデノウイルスベクターは血球系への遺伝子導入効率が低く、また、一部の細胞に導入されたとしても、標的細胞内でエピソームとして存在することから細胞増殖とともに次第に失われていき、遺伝子発現は一過性である。また、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの場合も造血幹細胞への遺伝子導入効率は低く、遺伝子の組み込み効率も低い。ここではレトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞への遺伝子導入法について概説する。

### II. 造血幹細胞への遺伝子導入：総論

多能性造血幹細胞 (multipotential hematopoietic stem cell) は、自己複製能 (self-renewal capacity) を有するとともに、すべての成熟血球 (赤血球・顆粒球・単球/マクロファージ・血小板・リンパ球) に分化しうる多分化能 (multipotentiality) をもつ。すなわち、造血幹細胞は終末分化していく一方で、自己複製により造血系の維持を図っているわけである。したがって、造血幹細胞のゲノムに治療用遺伝子を組み込ませることができれば、遺伝子治療の永続的な効果を期待することができる。

造血幹細胞への遺伝子導入効率は現在でも満足すべきレベルに到達していないのが実情であるが、その理由の一つとして造血幹細胞の性質を挙げることができる。生体の中ではすべての造血幹細胞が常時働いているわけではなく、その中の一部のものが時折活性化され成熟血球を

供給していると考えられている。すなわち、定常状態では造血幹細胞プールの大部分は細胞周期の静止期 ( $G_0$  期) にあり、レトロウイルスベクターによる遺伝子導入効率が低いことの原因となっている (従来のオンコウイルス由来のレトロウイルスベクターでは非分裂細胞への遺伝子導入ができない)。

また、マウスに比べて霊長類の場合の方が、造血幹細胞への遺伝子導入効率が低いことが知られている。レトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入を行う場合、ウイルスエンベロープの標的細胞上のレセプターへの結合が最初のステップとなるため、エンベロープの種類により遺伝子導入可能な細胞種が規定される。すなわち、齧歯類のみに感染するエコトロピックウイルス (ecotropic virus) と、齧歯類以外にヒトを含めた様々な種の細胞にも感染することが可能なアンフォトロピックウイルス (amphotropic virus) があり、それぞれのレトロウイルスベクター作製のパッケージング細胞株が作られている。レセプター自体の解析も進んでおり、エコトロピックウイルスの場合は塩基性アミノ酸のトランスポーターであり、アンフォトロピックウイルスのレセプター (ラットでは Ram-1 [1], ヒトでは Glvr-2 [2]) はリン酸のトランスポーターであることが判明している [3]。なお、サル (gibbon) のレトロウイルスの gibbon ape leukemia virus のレセプターは Glvr-1 で、やはりリン酸のトランスポーターである [3]。造血幹細胞では、このアンフォトロピックウイルスのレセプターの発現レベルが低いと報告されており [4]、このことが霊長類の造血幹細胞への遺伝子導入効率が低いことと関連しているものと考えられている。

### Ⅲ. 造血幹細胞のソース

マウスの骨髄細胞を用いて実験する場合は、

予め 5-FU (5-fluorouracil) を投与することが多い。この処理により未分化細胞の濃縮と細胞周期への導入を行うことができる。具体的には、

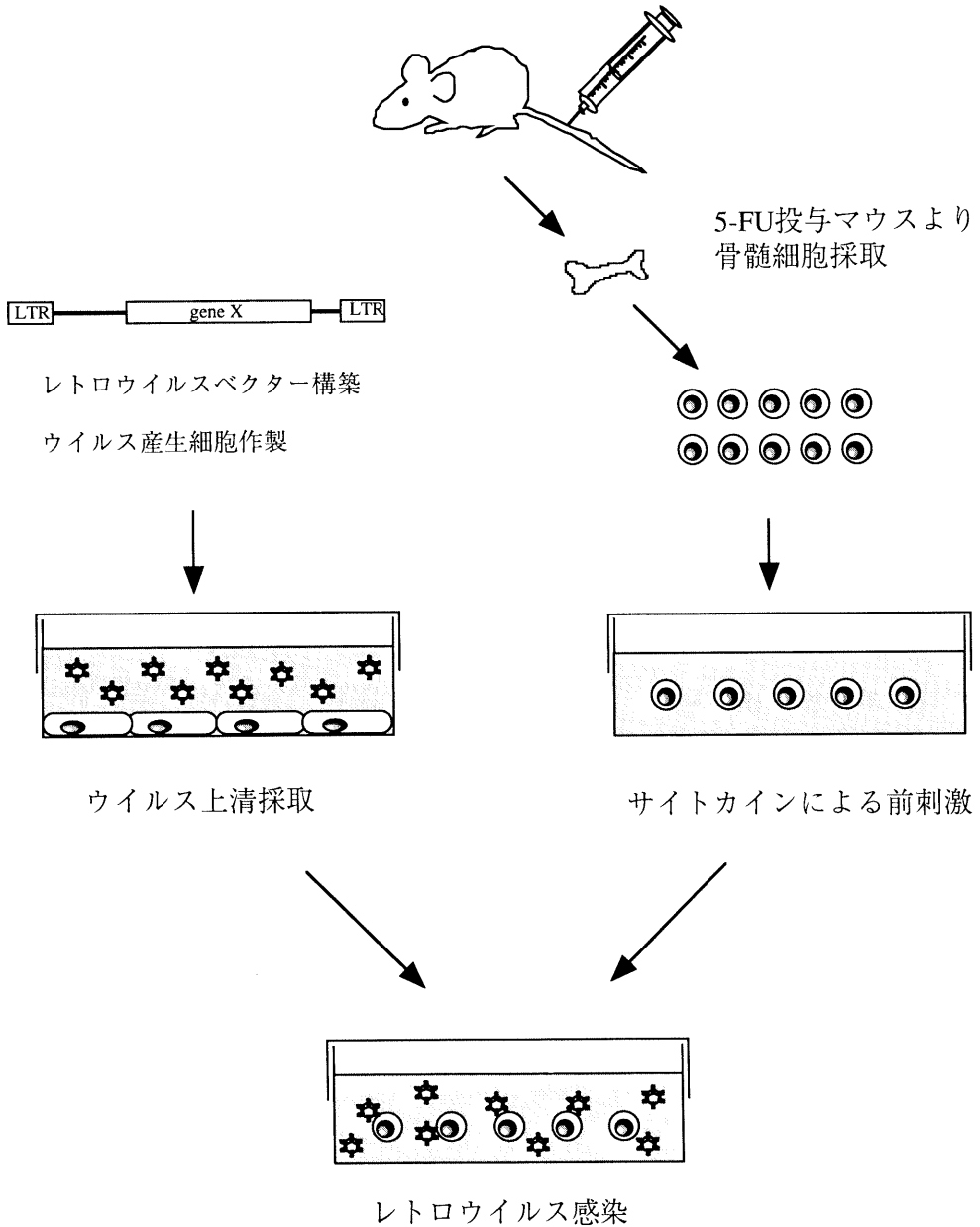


図1. レトロウイルスベクターによるマウス骨髄細胞への遺伝子導入. ウイルス上清を用いた *in vitro* 感染プロトコールを示す. 目的遺伝子 (gene X) を発現するように構築したベクターをパッケージング細胞に導入してウイルス産生細胞を作製し, ウイルス上清を得る. 5-FU 投与マウスより骨髄低密度単核細胞を採取し, サイトカインで前刺激した後, ウイルス上清中で培養して感染を行う.

6～8週齢のマウスに150 mg/kgの5-FUを腹腔内投与して48時間後に屠殺し、大腿骨・脛骨から骨髓細胞を採取する。無菌的に骨を取り出して両側の骨端を切り、22～23 G 針を付けたシリンジを使ってメディウムで骨髓を押し出すようにして集める。骨髓液はナイロンメッシュ(筆者らは300メッシュ)を通して骨片や凝血塊を除き、比重遠心法(Lympholyte-M等に重層して室温にて1500 rpm×30 min 遠心)により低密度単核細胞を採取する。C57BL/6 マウスの場合、未処置では1匹あたり $1\sim 2\times 10^7$ 個の細胞が得られるが、5-FU投与により分裂中の細胞が死ぬため、得られる細胞数は $1\sim 2\times 10^6$ 個程度に減少する。さらにこれらの細胞を分裂サイクルに入れて遺伝子導入効率を上げるため、通常サイトカイン(SCF: stem cell factor, IL-3: interleukin-3, IL-6, FL: Flk 2/Flt 3 ligand, TPO: thrombopoietinなどを適宜組み合わせる)により48時間ほど前刺激してからレトロウイルスの感染操作を行う(図1)。

ヒトの造血幹細胞のソースとしては、骨髓、臍帯血、末梢血が利用されている。前二者の場合は、そのまま十分な数の造血幹細胞が含まれているが、末梢血から造血幹細胞を採取する場合には、予めG-CSF(顆粒球コロニー刺激因子, granulocyte colony-stimulating factor)を数日間投与することにより造血幹細胞の末梢血への動員を図る。また、造血幹細胞をある程度濃縮しておいた方が、大量のベクターを必要とせず、遺伝子導入効率も高くなることが報告されている。現在提出されている臨床プロトコルでは、G-CSF投与後の末梢血CD34陽性細胞分画を用いることが多い。

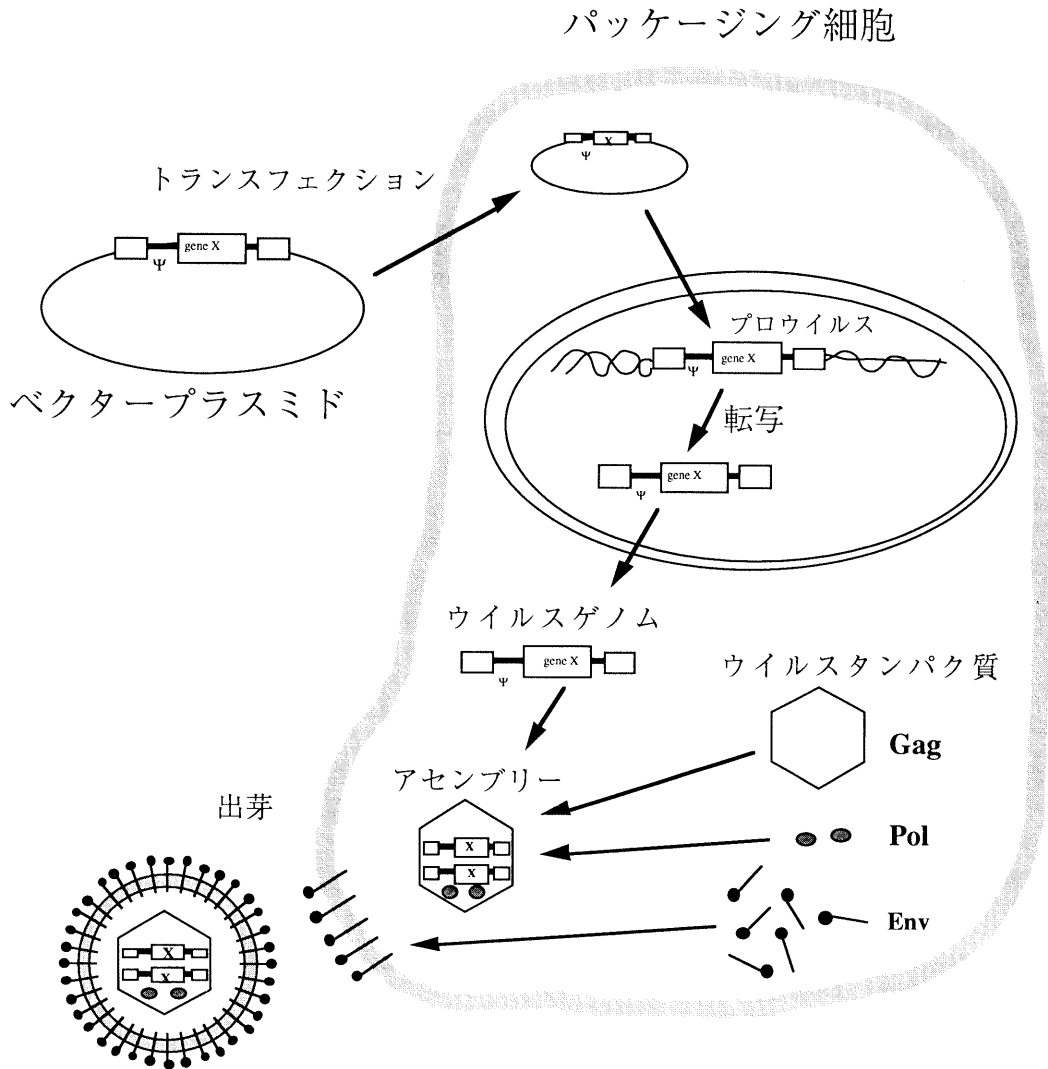
#### IV. レトロウイルスベクターの作製と遺伝子導入 [5,6]

レトロウイルスベクターを作製するには、まずウイルスゲノムのLTR(long terminal repeat)の間のgag(構造タンパク質)、pol(逆転写酵素)、env(エンベロープタンパク質)の大部分を取り除き、代わりに目的の遺伝子を挿入した

ベクタープラスミドを構築する(パッケージングシグナル配列=Ψは残す)。なお、LTRの部分にはプロモーターとしての活性や宿主細胞の染色体DNAへの組込みに必要な塩基配列が存在する。つぎに、このベクタープラスミドをウイルスタンパク質(gag, pol, env)を発現するように作ったパッケージング細胞株に導入すると、培養上清中にレトロウイルスベクターが産生されるようになる(図2)。

レトロウイルスベクターの骨格としては、MMLV(Moloney murine leukemia virus)のLTRとパッケージングシグナルを用いたものが多く、代表的なものとしてMFGやLXSNがある。しかし、宿主染色体に組込まれたMMLVのLTRプロモーターはメチル化などによりsilencingを受ける場合があり、またMMLV骨格の中には遺伝子発現を抑制するシスエレメントが複数存在する。そこでより良い発現を得るため、MPSV(myeloproliferative sarcoma virus)とMMLVとのハイブリッドLTRをもち、その他の部分にも改変を加えたベクター(MSCV, MNDなど)が開発された。導入遺伝子の発現方式については、LTRのプロモーターをそのまま利用するような構築にしたものと内部プロモーターを用いる場合があるが、前者の方が遺伝子発現効率が一般に良好である。

ベクタープラスミドに挿入する遺伝子については、単一のものを用いることもあるが、治療用遺伝子と選択マーカー遺伝子の2種類を用いることも多い(図3)。その場合、スプライシングを利用して一つの転写ユニットから二つの蛋白質を発現させる方法や、LTRのプロモーターと別に内部プロモーターを用いて転写ユニットを二つにする方法が従来とられてきた。しかしながら、いずれの場合も二種類の蛋白質をバランス良く発現させることは困難である。最近では、IRES(internal ribosome entry site)を利用することにより、一つの転写産物から二つの蛋白質を確実に発現させるdicistronic typeのベクターを利用することが多くなっている[7]。ただし、IRES依存性の翻訳レベルは、cap依



## 組換えレトロウイルス

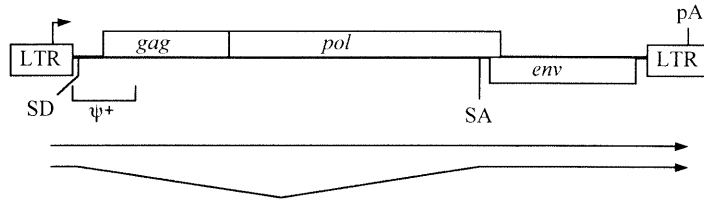
図2. 組換えレトロウイルス産生株の作製. パッケージング細胞(ウイルスタンパク質を高発現している)をベクタープラスミドでトランスフェクトし, ベクターをゲノムにもつ組換えレトロウイルスを得る.

存性のものに比べるとかなり低くなる(数分の一から十分の一). なお, 選択マーカー遺伝子としては, 従来薬剤耐性遺伝子を用いるのが一般的であったが, 最近は細胞表面マーカーの遺伝子を利用する研究も進んでいる[8,9]. いずれにせよ, ベクターに挿入する目的遺伝子やマーカー遺伝子のサイズ上の制約として, ウイ

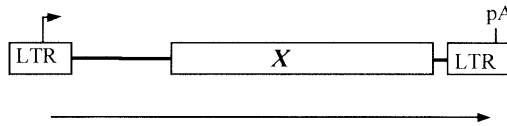
ルスゲノム全長(5'-LTR から 3'-LTR まで)が 10 kb 以上になるとパッケージング効率が悪化する点に留意する.

レトロウイルスのパッケージング細胞としては, 従来マウスの細胞(NIH3T3 線維芽細胞など)にウイルスタンパク質を高発現させたものが多用されてきた. 複製可能レトロウイルス

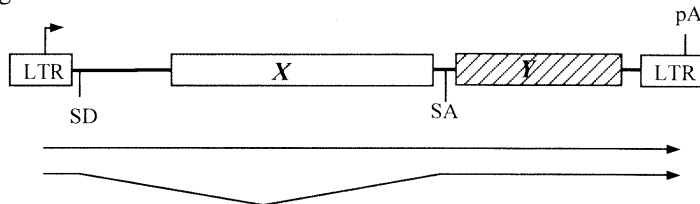
A. MMLV



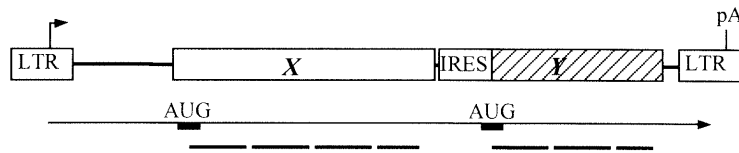
B. single gene



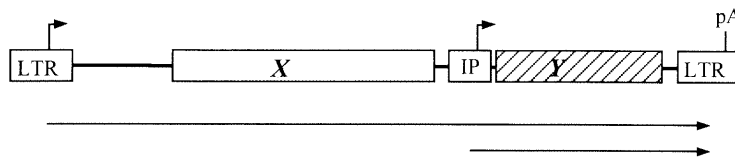
C. splicing



D. dicistronic



E. internal promoter



F. normal genomic structure

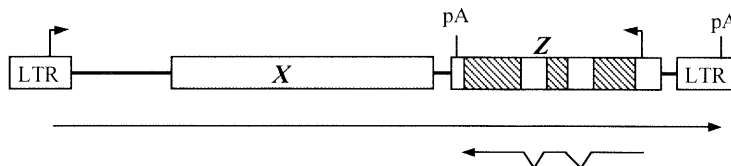


図3. 代表的なレトロウイルスベクターのデザイン。(A) MMLV プロウイルスゲノム。(B) LTR プロモーターでドライブされる単一遺伝子(X)をもつシンプルなベクター。(C) 二つの遺伝子(X, Y)をもつベクター。Y遺伝子発現のためにはRNA スプライシングが必要。(D) ダイシストロニックベクター。単一の mRNA から cap 依存性にX遺伝子が、IRES 依存性にY遺伝子が翻訳される。(E) “ダブルプロモーター”ベクター。Y遺伝子は内部プロモーター(IP)から転写される。(F) イントロン構造をもつ遺伝子(Z)を内包するベクター。通常Z遺伝子はウイルスゲノムの逆向きに挿入され、独自のプロモーターとポリA付加シグナルをもつ。LTR: long terminal repeat. gag, pol, env: MMLV viral genes. SD: splice donor site. SA: splice acceptor site. Ψ+: packaging signal extending to gag region. pA: polyadenylation signal. IRES: internal ribosome entry site. AUG: initiator codon. IP: internal promoter.

(RCR: replication competent retrovirus)が生じにくいように改良されたパッケージング細胞(GP+E86 & GP+envAm12,  $\Psi$ -CRE &  $\Psi$ -CRIP など)を含めて, ATCC などから数種が入手可能である. 最終的な標的細胞とウイルスの宿主域を考慮してパッケージング細胞を選び, ベクタープラスミドを直接トランスフェクトするか, いったんウイルスの形にして感染させるかしてウイルス産生細胞を樹立し, その培養上清をウイルス液として感染に用いる. しかしこのようにして得たウイルス産生細胞株は, クローン毎にウイルス産生量に大きなばらつきがあり, 高タイトルのウイルス産生細胞株を得るため多数(100個以上)のクローンをスクリーニングしなければならないことも多い.

最近, トランスフェクション効率が圧倒的に高い293細胞(ヒト胎児腎由来)を使ったパッケージング細胞がいくつか樹立された(BOSC23 & Bing, Phoenix-E & Phoenix-A など)[10]. これらにベクタープラスミドをトランスフェクトすると, 一過性にはあるが培養上清中に多量のウイルスが放出され, 高タイトルのウイルス液を得ることができる. レトロウイルスで発現ライブラリーを作りたい場合や, 多数のベクターを使って標的細胞に色々な遺伝子を導入したい場合など, 数日で目的のウイルスが得られるので便利である. 例えば, 第1日に $2 \times 10^6$ 個のBOSC23細胞を60mmデイスシュに撒き, 第2日に3~5mgのプラスミドDNAでトランスフェクトする(リン酸カルシウム法カリポフェクション法が良い). 第3日に培地を交換し(マウス血球用には $\alpha$ -MEMをデイスシュあたり3ml程度), 第4日にウイルス上清として採取し, 0.22~0.45mmのフィルターを通してそのまま感染に用いるか,  $-70^{\circ}\text{C}$ にて保存する.

以上が通常のエコトロピックまたはアンフォトロピックレトロウイルスベクター作製の概要であるが, エンベロープと中身のゲノムが異なったウイルスに由来するものも作ることができ, シュードタイプウイルスベクターと称す

る. その代表的なものは, レトロウイルスベクターのゲノムをVSV(小水疱性口内炎ウイルス vesicular stomatitis virus)のエンベロープ蛋白質(VSV-G)に包み込んだものである. このようなシュードタイプのものを作ることにより, 標的細胞の範囲を変えたり, ベクターの安定性を高めることが可能となる.

遺伝子導入の方法としては, レトロウイルスベクターを含む培養上清(ウイルス上清)を用いて標的細胞に感染させるのが一般的であるが, 遺伝子導入効率が低い場合はベクター産生細胞と標的細胞を共培養することもある. 造血幹細胞を標的とする場合は遺伝子導入効率が低いため, ウイルス上清を用いる場合はウイルス感染を通常3回位繰り返す(つまり3日間感染させる). この際, 遠心操作を加えると導入効率が上昇すると報告されている[11]. ベクター産生細胞との共培養あるいは骨髓ストローマ細胞存在下での遺伝子導入の方が効率は良好であるが, その代わりにフィブロネクチンフラグメント(C端側; 商品名はレトロネクチン)を用いると造血幹細胞への遺伝子導入効率が上昇する[12]. その機序としては, このフラグメントがレトロウイルス結合ドメインと細胞結合ドメインを含むため, レトロウイルスベクターが細胞に接触しやすくなることによると考えられている. レトロウイルスベクターは非常に不安定であり(半減期は数時間以内), 早くターゲット細胞に接触することが重要である. また, 造血幹細胞を細胞周期に入れ, 遺伝子導入の効率を上げることを目的として, 種々の造血因子を添加するのは前述したとおりである.

## V. レトロウイルスベクターの問題点

このベクターの問題点としては, 分裂細胞にしか遺伝子導入ができないこと, 遺伝子発現レベルが低いこと, 遺伝子が存在していてもその発現が必ずしも長期間持続するわけではないこと, ヒトの血中では補体により急速に不活化されてしまうこと, 長期的な安全性はまだ確認されていないことなどが挙げられる. また, 染色

体 DNA への組込み部位が決まっておらずランダムであることから、偶然癌遺伝子などの隣りに入り込みそれを活性化する可能性が懸念されている(挿入変異)。ただし、レトロウイルスが体内で増殖し感染を次々と繰り返さない限り、短期間の観察では大きな問題はないと考えられている。その意味で、RCR の発生を未然に防ぐパッケージング細胞株の開発が進められると同時に、レトロウイルスベクター作製時に RCR の混入がないようにロットごとに厳重なチェックが行われている。

## VI. おわりに

現在、非分裂細胞にも遺伝子導入可能なレンチウイルス由来のベクターの開発が進められている[13,14]。MMLV などオンコウイルス亜科に属するレトロウイルスと異なり、HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1) を代表とするレンチウイルス亜科のレトロウイルスは自らのゲノムの逆転写産物を能動的に核内へ輸送する機構を備え、非分裂細胞に対しても感染が成立する。大部分の造血幹細胞など静止期にある細胞や、神経・筋組織など終末分化した細胞への遺伝子導入に向けて、このような新しいベクターの開発に期待が寄せられている。

## 文 献

1. Miller DG, Edwards RH & Miller AD : Cloning of the cellular receptor for amphotropic murine retroviruses reveals homology to that for gibbon ape leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** : 78-82, 1994
2. van Zeijl M, Johann SV, Closs E, et al : A human amphotropic retrovirus receptor is a second member of the gibbon ape leukemia virus receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** : 1168-172, 1994
3. Kavanaugh MP, Miller DG, Zhang W, et al : Cell-surface receptors for gibbon ape leukemia virus and amphotropic murine retrovirus are inducible sodium-dependent phosphate symporters. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** : 7071-7075, 1994
4. Orlic D, Girard LJ, Jordan C et al : The level of mRNA encoding the amphotropic retrovirus receptor in mouse and human hematopoietic stem cells is low and correlates with the efficiency of retrovirus transduction. *Proc Natl Acad Sci USA* **93** : 11097-11102, 1996
5. Cepko C & Pear W : Transduction of genes using retrovirus vectors. In : *Current protocols in molecular biology*, Ed. Ausubel FM et al. Wiley, New York, suppl. 36 1996
6. Miller AD : Development and applications of retroviral vectors. In : *Retroviruses*, Ed. Coffin, JM, Hughes SH & Varmus HE, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1997
7. Migita M, Medin JA, Pawliuk R et al : Selection of transduced CD34<sup>+</sup> progenitors and enzymatic correction of cells from Gaucher patients, with bicistronic vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* **92** : 12075-12079, 1995
8. Mavilio F, Ferrari G, Rossini S, et al : Peripheral blood lymphocytes as target cells of retroviral vector-mediated gene transfer. *Blood* **83** : 1988-1997, 1994
9. Pawliuk R, Kay R, Lansdorp P, et al : Selection of retrovirally transduced hematopoietic cells using CD24 as a marker of gene transfer. *Blood* **84** : 2868-2877, 1994
10. Finer MH, Dull TJ, Qin L, Farson D & Roberts MR : kat : A high-efficiency retroviral transduction system for primary human T lymphocytes. *Blood* **83** : 43-50, 1994
11. Kotani H, Newton III PB, Zhang S, et al : Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy. *Hum Gene Therapy* **5** : 19-28, 1994
12. Hanenberg H, Xiao XL, Dilloo D et al : Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells. *Nat Med* **2** : 876-882, 1996
13. Naldini L, Blömer U, Gallay P et al : In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272** : 263-267, 1996
14. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ et al : Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* **15** : 871-875, 1997



## 第78回北海道医学大会生理系分科会

日 時：平成10年9月12日

会 場：旭川市ときわ市民ホール

当番幹事：旭川医大・生理学第二講座 坂本尚志

### 1. 延髄網様体刺激による前肢筋活動の抑制と $\alpha$ 運動細胞の興奮性変化

幅口竜也, 杉本純子, 斉藤和也, 坂本尚志(旭川医大第二生理)

除脳ネコの延髄巨大細胞性網様核(Nucleus reticular gigantocellularis: NRGc)に連続微小電気刺激(50~100 Hz, 30~50  $\mu$ A)を加えると, 四肢の筋活動は減弱, 消失する. このことは, 前肢及び後肢 $\alpha$ 運動細胞に共通する抑制機構が作用する事を推定させる. そこで本研究では延髄網様体への電気刺激が, 前肢 $\alpha$ 運動細胞にどのような抑制作用をもたらすのか, またその抑制効果と既に解明されている後肢 $\alpha$ 運動細胞への抑制効果とを比較検討し, 延髄網様から下行する筋活動抑制のメカニズムを検討した.

前肢伸筋及び屈筋の $\alpha$ 運動細胞の膜電位は, NRGc刺激により過分極側に移行した. また順行性スパイク発射及び逆行性スパイク発射は, NRGc刺激により抑制された. NRGcにtrain pulse刺激(3 pulses, 5 ms-interval)を加えると, 前肢 $\alpha$ 運動細胞にpeak latency約30 msのシナプス後電位(IPSP)が誘発された. またIPSPの潜時及びpeak latencyは共に約20 ms後肢 $\alpha$ 運動細胞において遅延していた.

以上の結果より, 延髄網様体刺激による筋活動の抑制の際には, 前肢及び後肢 $\alpha$ 運動細胞の双方に対して, シナプス後抑制が作用すると考えられ, また, その抑制には約10 m/sの伝導速度を持つ網様体脊髄路系が関与していると考えられた. この網様体脊髄路系が左右の前後肢の伸筋及び屈筋 $\alpha$ 運動細胞に抑制効果をもたらす, 姿勢筋緊張の制御に関わる神経機構を構成すると考えられた.

### 2. 舌下神経核およびpre-Böttinger complex内ニューロンの自発性バーストに及ぼす5-HTの影響

山崎裕, 渡邊昭彦, 青木藩(札幌医大・医・第二生理)

当教室では新生ラットの延髄スライス標本を用いてpre-Böttinger complex(PBC)および舌下神経核(XII)ニューロンの自発性バーストを細胞外同時記録することで, 呼吸リズムの発生源と考えられるPBCの性質

について研究を行ってきた. 本研究は興奮性 neurotransmitter の一種である5-HT(セロトニン)がPBCおよびXIIのニューロン活動に及ぼす影響について検討した. 生後0~2日の新生ラットを用いて, PBC, XIIを含んだ厚さ約900  $\mu$ mのスライス標本を作製し, 95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>混合ガスで飽和した人工脳脊髄液中([K<sup>+</sup>]=9.0 mM/L)で, PBCおよびXIIの自発性バーストをガラス微小電極を用いて細胞外同時記録した. 10分間安定した記録が得られた後, 5-HT(20  $\mu$ M)を灌流投与し, バースト頻度, 振幅, バースト幅を測定した.

5-HT投与によりPBCとXIIで同期してバースト頻度は増加した. 振幅およびバースト幅はPBCとXIIで応答が異なり, PBCでは振幅は減少し, バースト幅は半数で増加, 半数で減少した. XIIでは振幅, バースト幅とも増加するが多かった.

### 3. 延髄大縫線核内GABAニューロンの脊髄下行性軸索投射による呼吸抑制作用

青木藩, 宋剛, 里見肇(札幌医大・医・第二生理)

最近, 我々はネコを用いた実験で, 呼吸機能と関連する延髄縫線核群のうち, 特に大縫線核から延髄一上部頸髄の呼吸性ニューロン群, および横隔膜運動ニューロンにGABAを介した抑制性接続のあることを見出し, 報告してきた. 今回は延髄大縫線核内に実際にGABAニューロンが存在するか否か? またそのニューロンは脊髄の横隔神経核に軸索投射しているか否かを免疫組織学的二重染色法により検討した. ベントバルビタール麻酔下のネコの下部頸髄(C4-C5)の横隔神経核から二連ガラス微小電極を用いて横隔膜運動ニューロンの発射活動を記録し, その部位にナノリッターポンプを用いて二連電極のもう一方の電極からWGA-HRP(5%)を微量(15 nl ずつ2カ所, 2 mm間隔)注入した. 2日後に灌流固定を行い延髄を取り出した. その後, 凍結切片(40  $\mu$ m)を作製し, 延髄各レベルで切片をTMB法によるHRP発色と, GABA抗体を用いた免疫組織学的方法により二重染色を行った. GABA陽性ニューロンは延髄の大縫線核の他,

延髄網様体, 呼吸関連諸核 (VRG, DRG), 橋の NPB-Kölliker-Fuse nuclear complex 等に認められ, さらに HRP 法により二重標識されたニューロンは大縫線核, VRG の Bötzing complex などに限局して認められた。

これらの成績は, これまで報告してきた大縫線核の電気, 化学刺激による呼吸性ニューロン及び横隔膜運動ニューロン活動の抑制が GABA ニューロンによることを裏付けている。

#### 4. 覚醒サルの滑車神経電気刺激により生じる眼球運動の三次元解析

鈴木康夫, 安田 円, 福島菊郎, 新明康弘\* (北大統合生理, \*北大眼科)

外眼筋の解剖学的な配置は, 眼球の回転運動の自由度を3としている。しかし, 個々の外眼筋の三次元作用方向は, 静的な解剖学的な測定結果から推定されているに過ぎず, 眼位が個々の外眼筋の作用方向に与える影響も明らかにされていない。

本研究では, 頭部を固定した覚醒状態のニホンザル2頭 (MI, PU) を対象に, 脳幹部における滑車神経に対する微量電気刺激 (500 Hz, 250  $\mu$ s の陰性矩形波, 刺激強度 10~50  $\mu$ A, 刺激時間 25~200 ms) により誘発される左眼の眼球運動をサーチコイル法にて記録し, 誘発運動の特性, 眼位が誘発眼球運動に与える影響を検討した。

眼球運動の誘発方向の平均 (MI/PU) は, 矢状面では外転から内旋方向に  $65.4 \pm 14.0^\circ / 69.8 \pm 12.6^\circ$ , 前額面では外転から下転方向に  $68.5 \pm 13.6^\circ$ ,  $71.2 \pm 11.9^\circ$  と上斜筋の解剖学的作用方向にはほぼ一致していたが, 冠状面では下転から内旋方向に  $45.7 \pm 13.3^\circ$ ,  $44.9 \pm 9.9^\circ$  と上斜筋の作用方向より対応する後半規管の感度ベクトル方向に近かった。眼球運動の誘発方向は, 前額面では眼位との一定した相関を示さなかったが, 冠状面と矢状面では下転で回旋成分が増加する眼位との相関 ( $p < 0.01$ ) が認められた。

#### 5. 末梢神経移植による成ラット脊髄下行性経路からの軸索再生の試み

金谷邦人, 青木藩 (札幌医大・医・第二生理)

当教室では脊髄損傷に対し末梢神経の移植により脊髄下行性経路の軸索を再生させることを目的として動物実験を行ってきた。これまでに第1段階の実験として半切した頸髄に総腓骨神経を自家移植し, 数か月後

移植片内から自発性の呼吸性および非呼吸性神経活動を導出記録することに成功している。今回は第1段階で軸索再生が生じ, 神経活動を確認した移植神経遠位端を半切部を越え再び頸髄へ架橋移植し生着するか否かを調べた。実験動物は成ラット (8~12週齢) を用いた。第2頸髄左半側を切断後, 総腓骨神経 (20~30 mm) を採取し頸髄切断部吻側の前側索へ移植し, 移植神経遠位端は筋組織に縫合固定した。半切2か月後, 移植神経遠位端より自発性神経発射を記録した。移植手術19例中, 2か月以上生存は6例であり, その内3例において移植神経端より呼吸性神経活動が記録された。次に第2段階で移植神経断端を第4髄節内に移植し, 切断部の架橋を行った。この場合, 第4頸髄節の横隔神経核に近い部へ挿入した。再挿入後1か月生存したのは3例であり, その内1例において横隔神経から呼吸運動に同期する自発性神経発射が導出記録できた。KB染色を行った移植末梢神経の横断面には再生した有髄線維が多数観察され, その直径は小さく 1.8~4.5 (平均 2.8)  $\mu$ m であった。

#### 6. Adenosine 取り込み阻害による興奮性シナプス伝達の2相性抑制の機序の海馬スライスを用いた検討

成松英智, 青木藩 (札幌医大・医・第二生理)

Adenosine (Ado) 取り込み阻害薬は, Ado 神経伝達修飾系を介して興奮性シナプス伝達を2相性に抑制する。すなわち, 抑制に続き回復相を示す。我々は, この抑制の非持続性の機序を解明するため, 回復相の検証を行った。

ラット海馬スライスの Schaffer collaterals の電気刺激で誘発した CA1-field EPSP を細胞外微小電極法を用いて記録した。その initial slope を synaptic strength の指標として, 興奮性シナプス伝達の変化を観察した。

Dipyridamole (Dip, Ado 取り込み阻害薬) は2相性の field EPSP 抑制を示した。この Dip の作用は Aminophylline (非選択的 Ado 受容体遮断薬) で消失したが, DMPX (選択的 Ado 2 受容体遮断薬) には影響されなかった。

Calphostin C (PKC 阻害薬) は, Dip の作用の抑制相には影響せず, 回復相を抑えた。一方, 外因性 Ado および CCPA (選択的 Ado 1 受容体作動薬) の抑制作用は持続的であった。

これらの成績は, 1) Dip の2相性作用は Ado 1

受容体を介するが Ado 2 受容体を介さないこと、2) Dip の作用の回復相は、PKC を介した機序による内因性 Ado の細胞外濃度の低下に起因することを示す。

### 7. ヒト生物時計のフリーラン周期：経時変化と照度依存性

遠藤拓郎, 橋本聡子, 増淵悟, 本間さと, 本間研一 (北大・医・生理)

従来ヒト生物時計のフリーラン周期は25期間とされていたが、最近、低照度下で行われた短期間の隔離実験で24時間に近いフリーラン周期が報告されている。そこで、我々は健康被験者を隔離実験室でフリーランさせ、フリーラン周期の経時変化および照度依存性を解析した。12名の健康被験者を住居型隔離実験室で22日間(D1-D22)生活させ、直腸温リズム(有線サーミスターによる連続測定)、血中メラトニンリズム(隔離第1日目と15~18日目)、睡眠・覚醒リズムを測定した。次に2から12名の被験者を、室内照度(実測)100 lux, 50 lux, 0.1 lux 以下に設定して隔離実験を行い、血中メラトニンリズムからフリーラン同期を測定した最初の隔離実験でフリーランの程時変化で解析したフリーラン開始直後は、24.6 h (D2-D6)であったが、その後は24.8 h (D6-D10), 25.1 h (D12-D16)と有意に周期が延長し、25.2 h (D18-D22)となりプラトーに達した。また次の実験ではフリーラン周期は25.6 h (100 lux), 25.5 h (50 lux), 25.2 h (0.1 lux)となり、照度が下がるほど24時間に近づく傾向がみられた。

### 8. 非光刺激がヒトの生体リズムにあたる影響

橋本聡子, 本間研一, 宮崎俊彦, 増淵 悟, 本間さと (北大・医・生理)

光がヒトの生体リズムに影響することは既に知られているが、非光刺激については十分な検討がなされていない。そこで照度を予め低く設定した(<10 lux)隔離実験室を使用し、非光刺激として“睡眠時間の指定”を健康な成人学生を対象に負荷した。実験第1日目は任意に睡眠をとり、連続採血によりメラトニンリズムを測定した。起床後より約30時間にわたり被験者を断眠させ、習慣的な睡眠時刻より約8時間前進した時刻に睡眠時間帯を設定し、1, 4, 8日のいずれかの期間強制的に固定した。その間入床・起床のタイミングが外部からインターホンを通じて指示され、被験者はその時間内に入眠するように努め、時間外の睡眠は禁止された。睡眠時刻指定期間の最終日に連続採血を行

い、メラトニンリズムを測定した。その後4日間、被験者は睡眠時刻を指示されることなく過ごし(フリーラン条件)、3回目の連続採血を行い実験を終了した。直腸温は実験中、連続測定した。睡眠時間帯8日間指定後では、全被験者で睡眠覚醒リズムのフリーランは固定された時間帯から始まったが、4日間指定後には同調に個人差がみられた。睡眠時間の指定という非光刺激が睡眠リズムの同調には4日前後の日数が必要と考えられる。

### 9. 内的脱同調モデルとしての Methamphetamine 慢性投与ラット：松果体メラトニンリズムと行動リズムの乖離

増淵 悟, 本間さと, 石崎高司, 橋本聡子, 本間研一(北大・医・生理)

隔離実験下に於けるフリーランやリズム障害においては、メラトニンリズムあるいは体温リズムと睡眠覚醒リズムの位相が乖離する内的脱同調現象がみられる。この現象は人以外の動物では報告されていない。一方、Methamphetamine 慢性投与ラットでは、行動リズムが24時間周期の明暗条件から乖離することが知られており、このリズムは生物時計の局在である視交叉上核に依存しない。今回 Methamphetamine 投与ラットが内的脱同調を起こしているかどうかを確かめる目的で、行動リズムが昼夜逆転している状態で、松果体と血漿のメラトニンリズムを測定した(6点/日)。LD12:12の環境下で飼育した Wistar rat (雌)に対して Methamphetamine (Dainippon) を飲水中に混ぜて(0.01%)投与した。コントロール群に対して Methamphetamine 慢性投与ラットの活動期が昼夜逆転した時でも松果体及び血漿のメラトニンリズムは明暗条件に同調しており、実験動物において内的脱同調が再現できたものと考えた。

### 10. 単一視交叉上核細胞サーカディアン振動のカップリングメカニズム

本間さと, 白川哲夫\*, 勝野由美子\*, 中村 渉\*, 本間研一(北大・医・統合生理, \*北大・歯・小児歯科)

哺乳動物の生物時計が局在する視床下部視交叉上核(SCN)は、多数の振動細胞から構成されるが固有の周期をもつ個々の振動細胞が振動共役して固体のサーカディアン周期を発現するメカニズムは未だ不明である。本研究では、マルチ電極上に SCN 細胞を分散培

養し、単一神経細胞の自発発火頻度を数週から数カ月に渡り連続記録し、振動細胞カップリングメカニズムについて検討した。新生ラット SCN より細胞を単離し、培養4~10日後から、1ディッシュ当たり4~8電極より自発発火頻度を10秒毎に連続測定した。神経活動のサーカディアンリズムは、15分間の平均発火頻度を用いて解析した。2個の神経細胞のスパイク間相互相関を2m秒間隔で解析し、機能的結合を検討した。その結果、約80%のニューロンが発火頻度に連続5日以上サーカディアンリズムを示し、多数のSCN神経細胞がサーカディアン振動体をもつことが分かった。解析したディッシュの約1/4にサーカディアンリズム同調を示す神経が存在し、リズムが同期している2神経間には、興奮性あるいは抑制性結合を示唆する相互相関がみられた。相互相関を示す75対のニューロン中65対は興奮性結合であった。以上の結果、視交叉上核振動細胞は、神経間の興奮性結合で同期することが強く示唆された。

#### 11. 灌流系 GH3 培養細胞における *V. hilgendorfi-luciferase* 生物発光を利用した GH 遺伝子発現および分泌のモニタリングシステム

棚橋祐典, 勝野由美子, 本間さと, 本間研一, 近江谷克裕\*(北大・医・生理, \*静岡大・総合科学)

本研究では分泌型 *V. hilgendorfi* (VH) luciferase 遺伝子をレポーター遺伝子としてを使用しラット GH 産生下垂体腫瘍株化細胞 (GH3) に導入することにより、GH 遺伝子発現の発光モニタリングをおこなった。GH 遺伝子 promoter 下流に分泌型ルシフェーラス遺伝子 VLcDNA を組み込んだベクター (pGH-VHL) を作成し、GH3 へ transfection をおこない、stable 発現クローンを得た。遺伝子導入細胞を 25 mm culture insert 上にて培養し、灌流系システムにより30分毎、12時間の連続サンプリングをおこなった。発光測定は培養液に基質 luciferin 添加後のフォトカウントをルミノメーターにて測定した。灌流系のシステムでの発光測定では、灌流開始後2~3時間までは発光量が増加し、その後約10時間は安定した発光が認められた。さらに RNA 合成阻害剤の Camptothecin 投与し、GH 転写活性の変化についても検討した。また同時に、得られたデータでは発光量と GH 分泌量とに相関が示された。

#### 12. リアルタイム PCR (プリズム) を用いたラット弓状核および孤束核 NPY mRNA の定量と摂食行動

石崎高司, 本間さと, 安倍 博, 本間研一(北大・医・生理)

ラットにおいて輪回し行動や摂食行動などのリズムは明暗周期に同調するが、毎日一定時刻のみに摂食を制限する周期的制限給餌を行うと、それらの24時間パターンが変化し、給餌前ピークが見られるようになる。また、Neuropeptide Y (NPY) はラット摂食行動を促進する作用を持つと考えられている。今回我々は、室傍核に NPY ニューロンを投射している視床下部弓状核および脳幹孤束核をマイクロパンチ法で採取し、これらの神経核の NPY mRNA をリアルタイム PCR 法を用いて定量を行った。本実験では、神経核より total RNA を抽出した後、PCR 増幅される DNA 鎖に相補的な蛍光プローブを用いた RT-PCR にて一定量の NPY cDNA を得、定量的に増幅した。なお、遺伝子発現の内部標準物質として GAPDH を用いた。結果として、周期的制限給餌により室傍核 NPY 濃度は給餌後増加したのに対して、弓状核および孤束核 NPY 濃度は給餌前に増加し、給餌後減少した。また、弓状核および孤束核 NPY mRNA は給餌前に自由摂食群よりも増加していた。以上の結果から、周期的制限給餌下では室傍核における NPY の給餌前分泌の亢進だけでなく、弓状核および孤束核における NPY 合成の給餌前の亢進が示された。

#### 13. bHLH/PAS 転写活性因子遺伝子 *BMAL1* のラット視交叉上核における発現と光反応性

安倍 博, 本間さと, 波平昌一, 棚橋祐典, 本間研一, 池田正明\*(北大医生理, \*埼玉医大第一生理)

哺乳類体内時計におけるサーカディアン振動は、bHLH/PAS 因子である *BMAL1* と *CLOCK* が転写調節する *mPer1* が、その蛋白 (*mPER1*) のネガティブフィードバックを受けることにより発生すると考えられている。このことから *BMAL1* は、リズム発振に重要な役割を担っていることが考えられる。そこで本研究ではラット SCN における *BMAL1* 遺伝子 (*BMAL1*) mRNA の発現とそのサーカディアン変動および30分間光照射に対する反応を in situ hybridization 法により検討した。その結果、SCN において *BMAL1* mRNA の発現が見られ、その発現には明暗および恒暗条件下ともに主観的に夜にピークをもつ明瞭なサーカディアンリズムが観察された。光刺激に対しては、光

照射群での SCN における発現がコントロール群よりも有意に増大したが、その影響に位相依存性は見られなかった。これらの結果から、*BMAL1* が per サーカディアンフィードバックループにおいてサーカディアン振動そのものに大きく関わっていること、さらに体内時計の光同調において、光のノンパラメトリックな影響よりもパラメトリックな影響に関与することが示唆された。

#### 14. 生物時計関連遺伝子 *BMAL1* のラット脳内発現分布と昼夜変動

波平昌一, 本間さと, 安倍 博, 棚橋祐典, 本間研一, 池田正明\* (北大・医・生理, \*埼玉医大・生理)

*BMAL1* はマウス時計遺伝子 *clock* と共通した構造を持つ bHLH/PAS 型転写調節因子である。さらに最近、*BMAL1* が CLOCK とヘテロダイマーを形成することにより、マウスのサーカディアンリズムを支配している可能性が示唆されている。我々は *BMAL1* が、サーカディアンリズム振動体が局在するラット視交差上核において、その発現にサーカディアンリズムがあることを示した。しかしその他の発現部位については詳細に検討されていない。そこで、ラット *BMAL1* mRNA の発現を *in situ* hybridization 法を用いて、松果体と網膜、その他の脳の部位について検討した。その結果、*BMAL1* mRNA は松果体と網膜で強い発現が認められ、その発現に松果体では、サーカディアンリズムがみられ、網膜では、サーカディアンリズムは見られなかったが、光反応性が確認された。また、嗅球、海馬、小脳にも発現が認められ、SCN とは逆の位相で昼夜変動が認められた。以上のことから、*BMAL1* が時計遺伝子としてだけでなく、その他の機能にも関係した遺伝子であることが考えられた。

#### 15. 蝸牛刺激による自律神経系の変動

鎌田 勉, 亀倉更人\*, 松島純一\*\* (北大・歯・生理, \*北大・歯・麻酔, \*\*北大・医・耳鼻科)

蝸牛を音刺激・電気刺激した場合の血圧・自律神経活動におこる変動を調べた。動物実験ではラット、ウサギを使用し、ネブタールあるいはウレタンクロラロース麻酔下に実験を行った。音刺激は左耳近傍にスピーカーを置き、各周波数純音によりフリーフィールドで刺激し、電気刺激は耳朶を開け、白金線を正円窓に置いて矩形波により刺激した。血圧は大腿動脈を圧トランスデューサによって記録し、交感・迷走神経活

動は頸部の双極電極で記録した。音刺激では刺激時一過性に血圧が上昇ないし下降したが、常にその反応は起こらなかった。血圧変動に伴う顕著な徐脈・頻脈は見られなかった。神経活動の積分値の比較では血圧低下の際に迷走神経活動の上昇よりもむしろ交感神経活動の減少が伴うことがしばしば見られた。このことは三叉神経領域の刺激によりおこる血圧低下についても三叉迷走神経反射によっておこる場合と交感神経活動の低下による場合とがあることが、先我々のオトガイ神経電気刺激の場合に認められているが、これと相応すると思われる。なお人での同様な実験のため心電図 RR 間隔を周波数分析して自律神経活動の変化を見ようとしたが、動物においても人においても、上記の蝸牛の刺激による一過性の変化は低周波の検出を要する長時間の周波数分析では検出するに至らなかった。

#### 16. レーザードップラー眼血流計を用いたネコ網膜血流の測定

長岡泰司, 籠川浩幸, 吉田晃敏, 坂本尚志\* (旭川医大・眼科, \*旭川医大・第二生理)

高酸素および低酸素負荷におけるネコ網膜血流量 (RBF) と血管抵抗 (R) の変化を解析した。ネコはエンフルレン麻酔下で非動化し、呼吸管理した。RBF は、キャンノン眼底血流計 (Canon, Tokyo) を用い、動静脈交互に 1 分毎に血管径 (D) と血流速度を測定し、算出した。R は、平均血圧と前房内よりモニターした眼圧の差を眼灌流圧 (PP) とし、PP と RBF から算出した。高酸素 (100%, 10 分間) 負荷時、動静脈ともに RBF は減少し、動脈 RBF の変化に対応して R は増大した。RBF, R とも、負荷終了後 20 分後には負荷前の値に回復した。低酸素 (10%, 10 分間) 負荷時には平均血圧の変動を伴うことが多く、変動が小さい場合、動静脈ともに RBF は増加し、動脈 RBF の変化に対応して R は減少した。RBF, R とも、負荷終了 20 分後には負荷前の値に回復した。血圧が大きく増加した場合、RBF は増加したが、D は減少し、R は増大した。高酸素および低酸素負荷時に誘発される RBF の減少および増加は、網膜における R の増大および減少によるところが大きいと推測された。しかし、血圧の増加が大きい場合、RBF の増加は、必ずしも R の減少によると考えることができない場合があることが明らかになった。

### 17. 生体血漿内 $\text{HCO}_3^-$ 濃度の代謝性成分の解析

望月政司(西岡山病院・老人呼吸研究センター)

生体血漿内重炭酸イオン濃度,  $[\text{HCO}_3^-]^*$ , には,  $\text{PCO}_2$  に依存する呼吸性成分,  $[\text{HCO}_3^-]^*$ , と依存しない代謝性成分,  $\Delta[\text{HCO}_3^-]^*$ , がある.  $[\text{HCO}_3^-]^* = 4.93 \text{PCO}_2^{0.445}$ , と仮定した時, 動一静脈血間の  $\Delta[\text{HCO}_3^-]^*$  の較差 ( $n=89$ ) は,  $\text{PCO}_2$  とは無関係に 0 を中心とした分布を示した.  $\Delta[\text{HCO}_3^-]^*$  が  $\pm 7 \text{meq/l}$  の範囲内にある正常血漿 ( $n=197$ ) では, SID (strongion difference:  $[\text{Na}^+] + [\text{K}^+] - [\text{Cl}^-]$  及び, AG (anion gap) の  $[\text{HCO}_3^-]^*$  に対する回帰線は直線的で, SID, AG 共に, 回帰式で与えられる回帰成分と, 残りの分散成分に分けられた. 数値計算の結果では, SID と AG の回帰成分の差は  $[\text{HCO}_3^-]^*$  と等しくなった. 電気的中性維持の原則より, SID と AG の差は  $[\text{HCO}_3^-]^*$  であるので, SID と AG の分散成分 ( $\Delta\text{SID}$ , 及び,  $\Delta\text{AG}$ ) の差も,  $\Delta[\text{HCO}_3^-]^*$  と等しくなることが分かった. acidosis 90例, alkalosis 136例, 正常血漿 68例の計 294例の老齢患者の血漿では,  $\Delta\text{SID}$ ,  $\Delta\text{AG}$  の  $\Delta[\text{HCO}_3^-]^*$  に対する回帰線は 2次曲線となった. 又, 個々の測定例に於ける  $\Delta\text{SID}$ ,  $\Delta\text{AG}$  夫々の回帰線よりの偏差 ( $\Delta^2\text{SID}$ ,  $\Delta^2\text{AG}$ ) は互いに等しく,  $\Delta[\text{HCO}_3^-]^*$  とは無相関であった. 以上の結果より, 今後, 血漿内電解質濃度間の定量的関係を解明する可能性が示唆された.

### 18. ラット胎生期心室筋の静止膜電位の変化と内向き整流性 K チャネル

當瀬規嗣, 長島雅人, 山田陽一, 藪 英世\* (札幌医大・第一生理, \*金沢工大)

ラットの発生中期において, 将来心室となる部分は自動能を有しているが, 発達に連れ自動能は失われる. この変化に関わるイオンチャネルの性質をパッチクランプ法を用いて検討した. 胎生 12 日の心室筋細胞の静止膜電位は  $-40 \text{mV}$  程度であり, 大部分の細胞に自動能が認められた. 静止膜電位付近で内向き整流性 K 電流 ( $I_{K1}$ ) をわずかに観測した. 一方, 胎生後半である 18 日の心室筋細胞では静止膜電位は  $-70 \text{mV}$  前後であり, 自動能を呈する細胞はわずかであった.  $I_{K1}$  の電流量は 12 日に比較して 2 倍程度であった. 単一チャネル活動の観察では, 12 日では  $22 \text{pS}$  のチャネルのみが観察されたが, 18 日では  $22 \text{pS}$  に加えて,  $58 \text{pS}$  や  $37 \text{pS}$  のチャネルが多数観察されるようになった. したがって, ラットの発生期の膜電位の変化は大

き伝導度の  $I_{K1}$  チャネルの出現によると考えられた. そこで,  $I_{K1}$  チャネルをコードする Kir 2 ファミリーの遺伝子を検索したところ, Kir 2.1 と Kir 2.2 が発現していた. さらに mRNA の発現量の変化を知る目的で, 定量的 PCR カイネティクス分析法を用いて, 12 日と 18 日の遺伝子を比較した. その結果, Kir 2.1 は 18 日で 2 倍になるのに対し, Kir 2.2 は 17 倍に増大し, これが, 大きい伝導度のチャネルをコードしていると考えられた.

### 19. モルモット結腸粘膜筋板の収縮に及ぼす NAdr の効果と adrenergic neuron の分布について

石川一志, 尾崎 毅\* (旭川医大・基礎看護, \*生理学研究所)

粘膜筋板は消化管の全長にわたって存在するが, その詳細に関して不明の点が多い. しかも, 消化管各部位により発達の様子はかなり異なっており, 本筋の役割がどの部位でも同様であるとは考えにくい. 演者らは, モルモット近位結腸において, 粘膜筋板の運動に関する神経性調節について研究し, cholinergic neuron や, neurokinin-A neuron が収縮に関与する事を示してきた.

今回は, 上記実験と同様, 粘膜筋板の灌流条片標本を用いて, ノルアドレナリン (NAdr) の効果を検討した. NAdr は本筋のカルバコール刺激による収縮を容量一反応的に抑制した. この抑制効果は, propranolol では全く影響を受けず, phentolamine ではほぼ完全に阻止されたので,  $\alpha$ -受容体を介したものであると思われる. 免疫組織化学的に検討した結果では, 本腸管に分布する adrenergic neuron は外因性であり, 本筋は, 必ずしも従来いわれてきたような反射による局所的な微小運動に限らず, 全身的な自律神経性調節をも受けて結腸壁全体の運動に関与しているという可能性も考えられる.

### 20. ゴキブリの脳内におけるキノコ体外来性ニューロン終末の分布

山崎吉之・西野浩史・水波 誠(北大電子研)

ゴキブリの脳にはキノコ体と呼ばれる神経繊維の密集構造(ニューロパイル)があり, 学習と記憶の場であることが示唆されてきている. キノコ体は入力部位である傘部と, 出力部位である  $\alpha$  葉部と  $\beta$  葉部, そして傘部と二つの葉部を連結する柄部からなる. また, 外来性ニューロンと呼ばれるいくつかのニューロンが,

キノコ体と脳内の他のニューロパイルを連絡している。キノコ体を取り巻くニューロパイルには、キノコ体のような区画構造は見られない。

本研究では、キノコ体を取り巻くニューロパイルにおける外来性ニューロンの投射領域の分布を詳細に観察するため、外来性ニューロンに蛍光色素を注入し、その色素に対する抗体染色を試みた。その結果、ニューロパイル中の投射領域は4ヶ所に局在していることがわかった。即ち $\alpha$ 葉の前方部、 $\alpha$ 葉の側方部、柄部の後方の前大脳側角、そして前大脳側角の背側にある円形の領域、前大脳側角背部である。外来性ニューロンは、これら4つの領域にキノコ体からの出力を受け渡している。その一方で、 $\alpha$ 葉前方部、 $\alpha$ 葉側方部、前大脳側角からそれぞれ入力を受け取り、キノコ体傘部へ投射しているニューロンも存在する。このことは、キノコ体とこの領域の間で間接的な回帰性のネットワークが形成されていることを示唆している。

## 21. ハムスターの中脳・前橋網様体にある褐色脂肪による熱産生の緊張性抑制機構について

橋本眞明, 黒島晨汎, 有田 順\*, 柴田政章\*\* (旭川医大・第一生理, \*山梨医大・第一生理, \*\*山梨県環境研・生気象学)

冬眠動物の褐色脂肪組織(BAT)は活動期の体温維持はもちろん、冬眠に伴う大きな体温変動にも重要な役割を果たすと考えられているが、BATの代謝を制御する中枢神経性の制御機構については未明の部分が多い。

シリアン・ハムスターの後赤核野とその近傍に局所麻酔薬(10%塩酸プロカイン, 800 nl)を注入すると、BATの熱産生が増加し、電気刺激(1 mA, 0.1 ms, 10 Hz)や興奮性アミノ酸(0.01 M-グルタミン酸ナトリウム, 800 nl)の注入は、熱産生を低下させることがわかった。薬液注入兼用電極を慢性留置した無麻酔自由行動下の動物でも、電気刺激と局所麻酔薬微量注入の効果麻酔下と同様であった。環境温5℃では20℃に比べ、より低い刺激周波数から電気刺激に対する

BAT温度低下反応が観察された。

これらの結果は、ハムスターの後赤核野とその近傍にBAT機能を緊張性に抑制する神経細胞の存在を示唆し、その神経機構には環境温度の情報が伝えられ、通常の体温調節に関与していることを示唆する。シリアン・ハムスターは人工気候下でも冬眠することから、当該機構の冬眠期の体温変動への関与が今後の検討課題である。

## 22. 甲状腺ホルモン変化のラット褐色脂肪組織(BAT)熱産生およびリン脂質脂肪酸組成への影響

Saha S K, 大日向浩, 黒島晨汎, 大野都美恵\* (旭川医大・第一生理, \*北海道教育大・旭川校家庭科)

ラットBAT熱産生及びリン脂質脂肪酸組成と甲状腺ホルモンである triiodothyronine ( $T_3$ ) 投与及び甲状腺ホルモン合成抑制剤である methimazole (MZ) 投与の関係を検討した。 $T_3$  投与は肩甲骨間BAT重量、そのトリグリセリド量及びDNA量を増加させた。基礎及びnoradrenaline (NA) 刺激によるDNA  $\mu$ g 当たりのBAT in vitro 酸素消費量は対照群に比べて $T_3$  投与群では有意差が見られなかったが、BAT pad 当たりの酸素消費量は増加した。 $T_3$  投与はBATリン脂質脂肪酸組成には大きな影響を与えなかった。一方、MZ 投与はBAT重量及びそのトリグリセリド量を減少させたが、DNA量は変化しなかった。NA刺激によるDNA  $\mu$ g 当たり及びBAT pad 当たりの酸素消費量は対照群に比べてMZ投与群では有意な減少を示したが、基礎酸素消費量には変化が認められなかった。MZ投与はBATリン脂質のドコサヘキサエン酸(DHA)、アラキドン酸、パルミチン酸及びパルミトレン酸を減少させ、同時にリノール酸、ステアリン酸及びエイコサペンタエン酸を増加させた。BAT酸素消費量及びDHAレベルの間に正の相関が見られた( $r=0.404$ ,  $p<0.05$ )。この結果は、甲状腺ホルモンがBAT熱産生に重要であり、特にBATリン脂質のDHAがBAT熱産生に関係することを示唆する。

## 第45回中部日本生理学会

日 時：平成10年10月15～16日

会 場：アクトシティ浜松コンgresセンター

当番幹事：浜松医科大学 福田教夫・高田明和・寺川 進・高田由美子

### 中部生理学会会則制定について

日本生理学会の生理学中部談話会は1994年より中部日本生理学会という学会に改組された。それに基づいて規約を作る必要があると考えられ、国立生理研の山岸会員、名古屋大学医学部の久場会員、第45回中部生理学会当番幹事の高田が種々討議した結果下記の会則がまとめられた。この案は平成10年10月15日に開催された第45回中部生理学会の総会、評議委員会で承認された。今後各地方で学会への改組を望まれる場合の参考になるかと考え、日生誌に掲載して頂くことになった。

第45回中部生理学会当番幹事 浜松医大 高田明和

### 中部日本生理学会会則

- 1) 中部日本生理学会は中部地区の生理学研究の進歩のために、生理学の研究者の学術発表、学術交流、情報交換などに役立つ組織として設立された。
  - 2) 中部とは愛知県、岐阜県、三重県、福井県、石川県、富山県、長野県、山梨県、静岡県をさす。
  - 3) 中部日本生理学会は原則として年1回学術集会を開く。  
(学術集会は会員の研究発表を行い、情報交換、懇親の場とする)
  - 4) 生理学会員、および臨時会員は学術集会に参加することが出来る。
  - 5) 臨時会員は日本生理学会に入会后1年間、日本生理学会大会等の催しに出席し、発表することが出来る。
  - 6) 学術集会の経費は当番校が担当し、参加費その他の基金をあてる。
  - 7) 集会では評議委員会、総会を開催し、中部日本生理学会の運営上の問題を討議、決定し、さらに生理学会の種々の情報を会員に知らせる。
  - 8) 学術発表の抄録は日本生理学雑誌に発表する。
  - 9) 中部日本生理学会は事務局をもうけ、連絡窓口とする。事務局については評議委員会、総会で検討し、決定する。
  - 10) 各年次の学術集会は中部地区の研究施設に持ち回りで主催する。
  - 11) この規約は必要に応じて、中部日本生理学会の評議委員会、総会の議決により変更できる。
  - 12) この規約は平成10年11月より実施される。
- 付則；事務局は今後5年間は名古屋大学第一生理学教室(久場教授)が担当する。

### 1. マウス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、若園佳彦、中平健祐、池田一裕(生理学研究所・神経情報研究部門)

発達期小脳顆粒細胞における電位依存性  $K^+$  チャネルの役割を明らかにするため、 $K^+$  チャネル蛋白発現の経時変化および活動電位への影響を調べた。

特異的抗体を用いた免疫染色により、Kv4.2が新生仔マウスの小脳において内顆粒層および外顆粒層中のpremitratory zoneに発現していることが明らかとなった。この結果は、Kv4.2が最終分裂を終了して

移動を開始する時期から発現し始めることを示している。

次に、新生仔マウス小脳由来のmicroexplant cultureにおける顆粒細胞でKv4.2の発現変化を経時的に調べたところ、培養2日目の顆粒細胞ではKv4.2蛋白はほとんど認められなかったが、培養6日目ではKv4.2は顆粒細胞の細胞体に強く発現していた。この培養下顆粒細胞の成熟化に伴う活動電位の変化を電気生理学的に測定したところ、bipolar型の未成熟な顆粒細胞では外向き電流のみで活動電位を発生しないが、樹状突起を持つT-shape型の成熟細胞で

は大きな内向き電流と A-type 型の外向き電流を有し、高頻度の活動電位を発生した。この活動電位は  $1 \mu\text{M}$  の TTX 投与で消失し、 $1 \text{ mM}$  の 4-AP 投与により発火頻度が減少した。

今後は、 $\text{Kv}4.2$  の dominant-negative を顆粒細胞に発現させ、電流および活動電位に対する影響を解析する。

## 2. モルモット小腸上皮および単一パネト細胞における CFTR 発現の分子生物学的検討

津村剛彦\*, 三好毅志, 挟間章博, 岡田泰伸(生理研・機能協関, \*京大・医)

モルモット小腸パネト細胞は、cAMP 刺激に対して  $\text{Cl}^-$  チャネル電流の活性化で応答する(津村ら, 第74回日本生理学会発表)。小腸上皮には CFTR が発現し、これが cAMP 賦活性  $\text{Cl}^-$  チャネルの分子実体であるものと考えられている。そこで今回、モルモット小腸パネト細胞における CFTR の発現の有無を検討した。モルモット小腸クリプトを単離して RT-PCR を行ったところ、全クリプトレベルでは CFTR mRNA の発現が確認された。単一パネト細胞にホールセルパッチクランプ法を適用して、cAMP 賦活性  $\text{Cl}^-$  電流の活性化を確認したのちに、細胞質をピペット内に吸い取り、単一細胞 RT-PCR 法に供したところ、単一パネト細胞レベルでの CFTR mRNA の発現は確認できなかった。次に、モルモット CFTR の R ドメインの一部に対する抗体を用いて免疫染色したところ、CFTR 陽性細胞の存在が絨毛部分にもクリプト部分にも散在性に確認された。しかし、パネト細胞が存在するクリプト底部には CFTR 蛋白発現細胞の存在は確認できなかった。以上の結果から、パネト細胞には CFTR の発現は蛋白レベルでも mRNA レベルでも見られない可能性の高いこと、従ってパネト細胞の cAMP 賦活性  $\text{Cl}^-$  チャネルの分子実体は CFTR 以外のものである可能性の高いことが結論された。

## 3. 灌流ラット耳下腺のアミラーゼ分泌と水輸送

村上政隆, 吉村啓一\*(生理学研究所 分子生理, \*北大歯学部 口腔生理)

外分泌腺は、分泌刺激を受けると水輸送機構と開口分泌が両方活性化されるが、その相互作用については不明な点が多い。今回血管灌流ラット耳下腺を用い、アミラーゼ分泌と水分分泌を同時測定、水輸送機構と開口分泌の関連を検討した。分泌はイソプロテレノー

ル (Isp)  $1 \mu\text{M}$ 、カルバコール (CCh)  $1 \mu\text{M}$  の単独/同時投与で誘発した。Isp 単独では、水分分泌が誘発されず、唾液を採取できず、アミラーゼ分泌の測定は不可能であった。一方、CCh 単独で、アミラーゼ分泌は急速に増加し 1 分で最大約  $10 \text{ mg maltose}/30 \text{ s-g w.}$  に達した後急速に減少し 1.5 分～2 分でピークの  $1/10$  で安定した。水分分泌は緩やかに上昇し 2 分で最大値  $92 \mu\text{l/g-min}$  をとり緩やかに低下 5 分で約  $60 \mu\text{l/g-min}$  を維持し、アミラーゼ分泌と水分分泌は分離した。Isp を CCh 刺激に重畳するとアミラーゼ分泌は急速に上昇し、最大値  $15 \text{ mg maltose}/30 \text{ s}$  となり安定した。水分分泌は Isp 投与による影響は観察されなかったが、酸素消費は安定レベルより緩やかに増加した。本実験により、CCh と Isp の単独・同時投与によりアミラーゼ分泌が大きく変動するにもかかわらず水輸送は増強されないことが明らかになり、両者は独立して制御されることが示唆された。

## 4. 大腸重碳酸分泌機序

川俣幸一, 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) 腸管には、管腔側  $\text{Cl}^-$  により刺激される重碳酸分泌と管腔側短鎖脂肪酸により刺激される重碳酸分泌機序が存在している。マウス盲腸 In Vitro においてこれらの分泌機序を、pH stat 法によるアルカリ分泌速度を指標とし、その薬理学的特性から比較検討した。 $\text{Cl}^-$  により刺激される重碳酸分泌活性は、NPPB ( $0.1 \text{ mM}$ ) 管腔側投与によりほぼ完全に抑制された。また  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  の特異的阻害剤である Ouabain ( $1 \text{ mM}$ ) 漿膜側投与により分泌活性が大きく抑制された。Carbonic anhydrase 阻害剤である Acetazolamide ( $0.1 \text{ mM}$ ) 両側投与は抑制効果が弱かった。これに対し、Propionate により刺激される重碳酸分泌活性は Acetazolamide 両側投与により強く抑制され、また Ouabain, Dimethyl amiloride ( $0.1 \text{ mM}$ ) の漿膜側投与は各々ほぼ同等にアルカリ分泌活性を低下させた(約 20%)。NPPB 管腔側投与は抑制効果が薄かった。

【結論】  $\text{Cl}^-$  により刺激される重碳酸分泌活性は  $\text{Na}^+$  に強く依存し NPPB で完全に抑制される。短鎖脂肪酸により刺激される重碳酸分泌活性は  $\text{Na}^+$  に一部分依存し、また細胞内の  $\text{CO}_2$  の水和に大きく依存する。これらの結果は両機序によるアルカリ分泌活性が別々の独立した活性である事を示唆する。

### 5. ラット網膜におけるギャップ結合蛋白質の解析

山内理充, 日高 聡, 西川千恵子, 宮地栄一(藤田保健衛生大学医学部生理学Ⅱ)

【はじめに】我々は以前より, コイなどの変温脊椎動物を用いて, 網膜内二次ニューロンである水平細胞間に存在するギャップ結合の開閉調節機構について検索を行ってきた。今回はギャップ結合チャネルを構成する蛋白質であるコネクシン(CX)に注目し, Western blot 法ならびに免疫組織化学法を用いて, ラット網膜におけるコネクシンの分布および蛋白量について解析を行った。

【方法】4%抱水クロラル麻酔下に成熟白鼠より眼球を摘出後, 網膜を剝離した。網膜はSDSを含むsample bufferでhomogenateを行い, SDS-PAGE後にWestern blot法を用いてPVDF膜に蛋白を転写した。免疫組織化学用には網膜の凍結切片を作成し両者とも抗CX43, 32, 26抗体を用いて免疫反応性を検討した。

【結果・考察】Western blotにおいて, 各抗体で染色されるバンドが確認できたが, 抗CX43抗体においては分子量43のみならず41 kDa付近にも染色されるバンドが認められた。組織においては抗CX43, 26抗体染色で, 色素上皮細胞間のみ免疫反応が認められたが, 抗CX32抗体染色では陽性に染色される部位は認められなかった。

### 6. 外傷によるマウス水晶体の白濁化に関する研究: $^1\text{H-NMR}$ 及びラマン分光法による解析

中村浩二, 林 知也, 今井 一, 永井直樹, 桑田一夫, 曾我美 勝\*, 恵良聖一(岐阜大・医・第2生理, \*岐阜大)

水晶体は高度な透明度をもつ生体臓器の一つであるが, 外部からの衝撃や外傷に伴って容易に白濁化し, その透明度が失われることが知られている。今回我々は, マウスの水晶体を用い, 無傷のもの及びそれに外傷を加えた際の水晶体内の水構造の変化と水晶体タンパク質自身の構造変化とを, それぞれ $^1\text{H-NMR}$ 及びラマン分光法を用いて研究した。

実験材料は, ddY マウスから摘出した水晶体を用いた。 $^1\text{H-NMR}$ 測定は水晶体を十数個NMR用ガラス細管に入れ, 組織内水分子の縦緩和時間( $T_1(\text{H}_2\text{O})$ ), 分子間交差緩和時間( $T_{1S}(\text{H}_2\text{O})$ )を測定した。続いて同一試料を傷つけ, 直ちに同様に測定した。一方ラマン測定は, 無傷のものと傷をつけて白濁化した水晶体を,

それぞれ別々にラマンのセル内に静置して, レーザー光(488.0 nm)を照射して行った。

無傷の水晶体と傷をつけた水晶体とでは,  $T_1(\text{H}_2\text{O})$ 値に有意差は認められなかったが,  $T_{1S}(\text{H}_2\text{O})$ 値では傷をつけた水晶体の方が有意に短くなった。一方ラマン測定の結果では, 水晶体タンパク質自身の二次構造, Tyr, Trp 残基の微環境, さらにSH基の相対含量の変化は, いずれも両者間で認められなかった。これらのことから, 外傷に伴う水晶体の白濁化は, 水晶体タンパク質自身の構造変化によるものではなく, 水晶体タンパク質の高分子量集合体形成によるタンパク質-水分子間相互作用の変化に起因するものと考えられた。

### 7. マルトース結合蛋白質融合体として大腸菌に発現させたN端欠損ヒトチロシン水酸化酵素1型の精製

中島 昭, 森 啓至, 太田 明(藤田保健衛生大・医・第1生理)

カテコールアミン合成系の律速酵素であるヒトチロシン水酸化酵素1型(hTH1)は, 497個のアミノ酸からなるサブユニットがC端領域で結合した4量体を形成し, その触媒部位はC端に, 酵素活性調節部位はN端に存在すると考えられている。我々は, pET3cベクターを用いて大腸菌に発現させた一連のN端欠損hTH1変異体に対するドーパミンの酵素活性抑制作用を検討することにより, N端側のGly<sup>36</sup>-Arg<sup>37</sup>-Arg<sup>38</sup>-Gln<sup>39</sup>の配列がこの活性調節部位の中で重要な位置を占める可能性を報告してきた。しかしながら, これらのN端欠損hTH1変異体は凝集し易く精製が困難であったため, 一連の実験は菌体破碎上清を用いて行われており, それ故, このアミノ酸配列の重要性を更に明確に位置づけるためには, これらの変異体の精製は必要不可欠である。

今回, MALc2ベクターを用いて, wild-typeならびに35, 38, 44個のアミノ酸を欠失したN端欠損変異体を, マルトース結合蛋白質(MBP)融合体として大腸菌に発現後, その菌体破碎上清から amylose resinを用いた affinity chromatography 法および size-exclusion chromatography 法を用いて, それぞれ4量体成分として精製した。これら融合体は約90%の純度を示し, wild-typeの酵素活性は947 nmol/min/mgと, 非融合体として精製された既存の酵素検体と同等の活性を有していた。更に, ファクターXaおよびエンテロキナーゼを用いた酵素分解処理によって, hTH1部

分の MBP からの分離を試みた。

## 8. 多次元多核 NMR によるウシ $\beta$ ラクトグロブリンの $\alpha \rightarrow \beta$ 転移の研究

桑田一夫\*, 星野 大\*\*, 後藤祐児\*\*, 恵良聖一\* (\*岐阜大学医学部生理学第二講座, \*\*大阪大学たんぱく質研究所)

多次元多核 NMR を用い、典型的な  $\alpha \rightarrow \beta$  転移を示すウシ  $\beta$  ラクトグロブリン A の天然立体構造形成過程を研究した。  $\beta$  ラクトグロブリンは、TFE 50% 中では、59% の残基がヘリックス構造をとっていた。これと、二次構造予測とを比較した結果、実際にヘリックスを形成し易い領域を特徴づける事が出来、  $\beta$  ラクトグロブリンのフォールディング中間体でも、その部分が一時的にヘリックス構造を取っているのではないかと考えられた。実際、その領域のヘリックス含量は 36% と、ストップドフロー CD 測定による中間体のヘリックス含量、37%、と極めて近い値を示した。ヘリックス構造をとりやすい領域は、N 端側の A~D シート領域及び C 端側の  $\alpha$  ヘリックス領域に存在した。逆に、C 端側の E~H シートは安定で、中間体においても疎水性のコアを形成しているのではないかと考えられた。更に  $\alpha \rightarrow \beta$  転移の midpoint である TFE 15% 中でのスペクトルを詳細に観測した結果、N 端側の A~D シートはかなり壊れているが、C 端側の E~H シートは安定であることが分かった。以上の実験事実から、  $\beta$  ラクトグロブリンの中間状態では、N 端側の A~D シート領域がヘリックス、C 端側の E~H シート領域は  $\beta$  シート構造をとっており、天然構造は、N 端側のヘリックスが C 端側の  $\beta$  シートと相互作用することにより、  $\beta$  シートへと誘導されることにより出来上がる可能性が高い事が分かった。これは、分子内部で起こる  $\alpha \rightarrow \beta$  転移であるが、プリオン等に見られる  $\alpha \rightarrow \beta$  転移のメカニズムと類似している。

## 9. 高速液体クロマトグラフィーによるヒト血清アルブミンの酸化・還元状態の解析

今井 一, 林 知也, 中村浩二, 桑田一夫, 恵良聖一(岐阜大・医・第 2 生理)

ヒト血清アルブミン (HSA) は還元型アルブミン (HMA) と酸化型アルブミン (HNA) との混合物より成り、HNA はさらに HNA (CYS), HNA (GLUT), HNA (OXI) より成っている。特殊なカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) システムによる HSA

分析によって、HSA の HMA-HNA 動態は種々の疾患によって変化することが知られている。今回我々はこの HPLC システムを用いて長期間の運動鍛錬が及ぼす影響の解析として剣道鍛錬者群の血清、病的状態における解析として白内障患者の血清及び前房水中の HSA の HMA-HNA 動態を分析した。

通常トレーニング時の剣道鍛錬者群の HMA, HNA の割合である  $\bar{i}$ (HMA),  $\bar{i}$ (HNA) 値はコントロール群 (大学生 20 名) との間で有意な差は認められなかったが、今後の研究の方向性に対する有用な知見が得られた。また、白内障患者においてはごく微量しか採取できない前房水でも HMA, HNA の定量的解析が充分可能であることが明らかになった。健康成人男子に比し、白内障患者血清の  $\bar{i}$ (HMA) 値は有意に低値を示した。さらに前房水の  $\bar{i}$ (HMA) 値は  $\sim 0$  の症例も多数観測された。逆に前房水の  $\bar{i}$ (HNA) 値は非常に高値で、特に HNA (OXI) の割合が無視できないほど高値であった。これらのことより、本 HPLC システムによる前房水中の HSA の HMA-HNA 動態の解析は、今後白内障患者の臨床経過や合併症の程度を知るうえで非常に有用な方法であることが示唆された。

## 10. 活性化凝固因子による線溶系インヒビターの不活性化：凝固に伴う線溶活性増強反応の一機構

浦野哲盟, 井原勇人, 永井信夫, 高田由美子\*, 高田明和(浜松医大第 2 生理, \*基礎看護)

凝固系の活性化に伴い線溶活性が増強する現象は種々の機構により説明されている。今回 plasminogen activator inhibitor type I (PAI-1) を介する新しい機構を報告する。線溶は血漿中に存在する酵素前駆体である plasminogen を plasminogen activator (PA) が活性化することにより開始されるが、PAI-1 は tissue type PA (tPA) 活性を阻害することで線溶を開始段階で制御している。PAI-1 は Heparin や vitronectin 等の修飾因子と結合すると標的酵素特異性が変化し、tPA 以外にトロンビンや活性化 X 因子とも反応する。PAI-1 はこれらの酵素と高分子複合体を形成してその酵素活性を阻害すると共に自身の活性も失う。従ってこれらの凝固因子が大量に活性化されると一部が PAI-1 と反応し、PAI-1 活性を中和し、tPA 活性を相対的に増加させて線溶活性を増強する可能性がある。精製系及び血漿ユーグロブリン分画を用いた生理的な系でこれを証明する。

### 11. リンパ管リモデリングに関する実験的研究

伊古美文隆, 大橋俊夫(信州大学 医学部 第1生理学教室)

臓器移植や創傷治癒に関連して, リンパ管に再構築(リモデリング)の生ずることが知られている. この現象は, リンパ系が組織間隙から水分・蛋白や免疫細胞等の汲み上げを介して組織細胞周囲の内部環境における恒常性維持に重要な役割を演じており, 臓器・組織の機能を調節している生理現象と密接に関連しているものと思われる. しかしながら, リンパ管の切断が生じた場合どの様な機序によって再び既存リンパ管同志が疎通するのかという点に関してはほとんど解明が進んでいない. そこで, 今回私共は切断されたリンパ管の再疎通の生ずる時間経過について基礎的な検討を行った. 実験には白色家兔を用い, 片側膝窩リンパ節を摘出した後, 時間を追って節前と節後リンパ管の再疎通の様子をリンパ管造影により観察した. リンパ節の摘出を行わなかった場合, 造影により節前リンパ管・膝窩リンパ節・節後リンパ管が明瞭に描出された. これに対して, 摘出直後そして1週間後においては膝窩部に造影剤の貯留が認められるのみであり, 節後リンパ管は全く描出されなかった. さらに, 摘出3ヶ月後になると, 再び元と同様の節後リンパ管構造の描出されてくることや, 他の側副リンパ行路も認められるようになった. 以上の結果より, 数週から数ヶ月の時間経過によってリンパの流れは再疎通しうることが確認された. 今後, 新たに生じたリンパ流路の形態学的特質, そして, リンパ管再疎通に対して影響する因子についてより詳細に検討してゆきたい.

### 12. 運動による血中キヌレニンの増加について

中上 寧\*, 伊藤 康宏\*\*, 丸田 一皓\*\*\*(\*藤田保健衛生大学 衛生学部 生理学, \*\*臨床生理学, \*\*\*生化学)

【目的】健康維持のために運動は不可欠と考えられているが, 過剰な運動は必ずしも健康には良くない. 我々は適量な運動量の客観的測定法としてアミノ酸代謝を中心に実験を行っている. 今回, 必須アミノ酸であるトリプトファン(Trp)の代謝産物であるキヌレニン(Kyn)が, 比較的高い強度の運動によって増加することを見出した.

【方法】強度の運動負荷として20 Km 走と35分ハーフのサッカーの試合を, 健康科学的観点から被検者に危険の及ばない程度の負荷としてエルゴメーターによ

る1時間の運動(65% HRmax)を行い, 運動前, 直後, 24時間後に採血し Kyn 濃度を測定した. Kyn は HPLC により ODC カラムを用いて測定した.

【結果】20 Km 走では, 走行前の  $1.745 \pm 0.246 \mu\text{mol/l}$  に対して走行直後の Kyn 値は  $2.206 \pm 0.301 \mu\text{mol/l}$  と有意の増加 ( $p < 0.005$ ) を示した. サッカーでは試合前の  $2.280 \pm 0.332 \mu\text{mol/l}$  に対して  $2.935 \pm 0.352 \mu\text{mol/l}$  とやはり有意の差 ( $p < 0.001$ ) を示した. しかし, エルゴメーター負荷では負荷前値と負荷後値に有意の差は認められなかった. 今回, 我々の測定結果では負荷された運動強度はサッカーの試合のフル出場, 20 Km 走, エルゴメーターによる1時間負荷であり, サッカーの試合と20 km 走の場合は運動負荷に応じた上昇が見られたが, 軽度なエルゴメーター負荷では増加しなかった.

### 13. ハト水平半規管膨大部頂(クブラ)の構造

渡邊暢浩\*, 服部輝昭\*, 羽柴基之\*, 時々輪浩穂\*\*, 花市敬正\*\*\*, 渡邊悟\*\*\*\*(\*名市大耳鼻科, \*\*愛知県立看護大, \*\*\*名工大, \*\*\*\*保衛大)

半規管膨大部頂(クブラ)の機能解剖を明らかにするため, デキストラン誘導体-磁性酸化鉄超微粒子複合体(DM)(直径10 nm)磁性体を染色用に用いた. DMは黒色で組織染色に応用可能であることを示し, 今回この領域での有用性が期待された. また, 半規管内に加圧しその変化を測定し, 従来からいわれていたクブラの位置関係が swing door 様であるか, drum membrane 様であるかの解明に一助となると考えられた.

【方法】ハトにケタラール(150 mg/kg 体重)筋注し, 麻酔した後, ハト用頭位固定装置に水平半規管が水平となるように固定した. 次いで, 皮膚切開, 側頭骨削開し, 水平半規管及びその膨大部を露出した. 骨半規管を一部開放し, 膜半規管に小孔をあけ, 外径98  $\mu\text{m}$  のマイクロシリンジの針を小孔に挿入した. マイクロマニピュレータを用い, DMのごく少量を小孔の入り口に注入し, 観察耳と反対側に, 大同特殊鋼株式会社研究所から入手できた小型で強力な特殊磁石を設置した. DMの磁性を利用し, 内圧をかけることなく膨大部側へと約1時間かけてDMを引き寄せた. この間マイクロハイスコープシステムを用い最大200倍まで拡大し, 半規管およびその膨大部を観察しビデオに記録した.

マイクロマニピュレータで半規管内に圧を加え, 内圧の変化を Millar SPR-524を用いて測定した.

ネンプータルにて深麻酔後、標本に圧力がかからぬよう大きく削開し摘出した。摘出後直ちに、ドライアイス/アセトン(または液体窒素)に浸漬し凍結置換を行った。

#### 14. 低圧環境曝露が慢性痛ラットの疼痛反応に与える影響

佐藤 純, 水村和枝(名古屋大学・環境医学研究所・神経性調節分野)

気象変化が慢性痛を増悪する機構の解明を目的とし、慢性痛モデルの痛覚過敏に対する低圧環境曝露の影響を観察した。

坐骨神経を絞扼したラット(絞扼群)、坐骨神経露出までを施行したラット(対照群)、そして腰部交感神経を外科的切除し、絞扼または対照手術を施した群を作製した(交切+絞扼群, 交切群)。これらラットに、湿度60%室温22℃の低圧環境室内で気圧を8分で20 mmHg 減圧し15分間低圧曝露を行った。その際に測定した、足底に von Frey 毛を押しあて足を挙げた時の加圧値(VF 値)、足底にピン先を押しあて足を挙げている時間(挙上時間)を曝露前・後値と比べた。また別の絞扼ラットに3時間の連続曝露を行い、VF 値の変化を経時的に観察した。

絞扼群にみられた痛覚過敏(VF 値の低下と挙上時間の延長)は、曝露により増強した。また3時間の連続曝露では、曝露直後にみられた VF 値の低下が曝露時間が経つにつれて徐々に減少し、曝露3時間で消失した。一方、対照群と交切群の VF 値と挙上時間は曝露に影響されなかった。交感神経を切除した絞扼ラットでは曝露による痛覚過敏の増強はなかった。

以上より前線通過時に相当する低圧曝露が慢性痛モデルの痛覚過敏を増強することが分かった。また、この現象が交感神経除去ラットでみられないことから、メカニズムに交感神経興奮が介在しているものと考えられる。

#### 15. 微小重力環境曝露が自律神経系に及ぼす影響

神谷厚範, 道上大策, 傅 埼, 岩瀬 敏, 間野忠明(名古屋大学・環境医学研究所・自律神経分野)

宇宙飛行の後、地球に帰還する時には、失神にまで至ることのある起立耐性の低下が起ることが知られているが、詳細な機序は明らかではない。本実験の目的は、この起立耐性低下の機序を検討することである。被験者は16名の若年健康男性で、微小重力環境を模擬

する方法として2週間の6°ヘッドダウンベッドレストを行い、その前後に起立試験(60°, 15分間)を実施した。安静仰臥位および起立試験中に心拍数、収縮期および拡張期血圧、筋交感神経活動(マイクロニューログラフィー法)、血漿ノルエピネフリン濃度(高速クロマトグラフィー法)を測定した。ベッドレスト後には、前失神症状をきたしたりして起立試験を完遂できなかった被験者が8名(非完遂群)、完遂できた被験者が8名であった(完遂群)。起立負荷後、両群は、始めは同程度の筋交感神経活動および心拍数の増加を示し、血圧は保たれたが、非完遂群では、数分後に、筋交感神経活動が急に減少して、血圧が低下した。始めの1分間の筋交感神経活動の賦活化は、両群間に差はなかったが、最後の1分間では非完遂群が有意に低値であった。これらの結果より、一旦賦活化された筋交感神経活動の急激な低下が、微小重力環境曝露後の起立耐性の低下の一因であることが示唆された。

#### 16. 神経支配帯分布の推定を目的とした多点電極の上肢表層筋への応用

道上大策\*, 斎藤健治\*\*, 岡田守彦\*\*\* (\*筑波大学(現)名古屋大学環境医学研究所, \*\*筑波大学体育科学系, \*\*\*筑波大学先端学際領域研究センター)

【はじめに】 多点表面筋電図法によって、神経支配帯の分布を推定することができる。これまで、筋を取り出し、染色によってしか確認することができなかった神経支配帯を簡便で非侵襲的な表面筋電図で得られる意義は大きい。

また、神経支配帯の位置を知ることによって、解剖学的な基礎知識を得られるとともに筋活動記録の際の電極貼付位置の決定に有用な情報となることが考えられる。

しかし、報告されているほとんどが上腕二頭筋である。

【目的】 多点電極が他の筋にも適用可能であるかを確かめるため、詳細に調べられていない上肢表層筋の神経支配帯の分布の推定を行うとともにその際の計測上の留意点について検討した。

【神経支配帯の分布形状と留意点】 三角筋の神経支配帯は散在していた。

上腕二頭筋、上腕三頭筋、腕橈骨筋、尺側手根屈筋、第一背側骨間筋、小指外転筋と短母指外転筋の神経支配帯は、筋腹の中央部に分布していた。

より効果的に神経支配帯を推定するには、筋の特性

にあわせた電極のサイズ・形状に工夫することや、画像断層法によって筋の境界を明らかにすることが必要と思われる。

### 17. Effect of Lower Body Positive Pressure on Vasomotor Sympathetic Activity

Qi FU, Yoshiki Sugiyama\*, Atsunori Kamiya and Tadaaki Mano (Research Institute of Environmental Medicine, Nagoya University, \*Aichi Medical University)

10 healthy young men were exposed to graded LBPP at 10, 20, and 30 mmHg in supine position. Muscle sympathetic nerve activity (MSNA) from tibial nerve was suppressed (27%) at 10- and 20-mmHg LBPP. However, at 30-mmHg LBPP, MSNA tended to enhance but was still nearly at the control value. Mean arterial pressure was elevated (11%), total peripheral resistance markedly increased (36%), while stroke volume and cardiac output tended to decrease at 30-mmHg LBPP. Heart rate remained unchanged. Left atrial dimension significantly increased during 10- and 30-mmHg LBPP, indicating an increased cardiac filling. These results suggest that the inhibitory effect of the cardiopulmonary baroreflex on MSNA at 10- and 20-mmHg LBPP could be counteracted by the sympathoexcitatory effect of the intramuscular pressure-sensitive mechanoreflex at 30-mmHg LBPP. However, the increment of total peripheral resistance at 30-mmHg LBPP may not depend exclusively on this small enhancement of MSNA.

### 18. 筋ジストロフィー症は筋成長障害：中心核関連構造と細胞膜の連結

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・2生理, \*3生理, \*\*1生理)

筋ジストロフィー症(MD)のモデル動物である dy マウスの初期病態は、筋の変性(通説)ではなく成熟成長障害で、筋病変と症状の発現には骨の成長が関係しているらしいことを明らかにした(筋成長障害説: 一歩進めた筋-骨不均衡説)。dy 筋の成長障害として骨成長依存性筋成長障害を、また、それに関わる機械-化学変換器として筋核を想定している。dy 筋病変の発生過程に関して、今までに次のようなことを明らかにした: 1. 筋線維(筋細胞は多核の細胞体で糸のよ

うに細長いため筋線維と呼ばれる)が全身の筋では出来上がる10~14日齢頃、筋線維数は少なめだが、筋の様子はほぼ正常である、2. その後、多くの筋線維は成長できず細いままに留まっているが、一部の筋線維は肥大成長する(径に大小不同が目立つようになる)、3. 最初はほとんどの筋線維で核は周辺部にある(正常像)が、発育につれて中心核が増加する(周辺核も同時に持つ)、4. 中心核或いは核を多めに持つ筋線維は肥大傾向にある(中心核化=活性化?)。

本報告では、bupivacaine(局所麻酔剤)注射による損傷筋(正常マウスとラット)における筋線維の修復成長過程に見られる dy 筋病変類似の光顕像、特に興味深い像として中心核関連構造と細胞周囲膜との連結像などを紹介し、dy 筋病変の発生機序と生理的意味を考察する。

### 19. TGF- $\beta$ RII の通常分布と、除神経、筋肥大、筋修復に伴う変化

佐久間 邦弘, 渡辺 貴美, 浦本 勲, 戸塚 武(愛知県心身障害者コロニー, 発達障害研究所, 生理学部) *in vitro* の実験において、TGF- $\beta$  は衛星細胞(satellite cell)および筋芽細胞(myoblast)の増殖や分化を制御することが知られているが、*in vivo* の筋肉における TGF- $\beta$  およびその受容体(TGF- $\beta$  RII)の適応についてはほとんどわかっていない。本研究では筋肉の萎縮、肥大、修復時のこれらの蛋白の変化について、免疫組織化学および Western blot 法により検討した。TGF- $\beta$  RII は、slow-type の筋や、横隔膜には少なく、fast-type の筋に多く検出された。筋肥大にともない TGF- $\beta$  の増加と、TGF- $\beta$  RII の down-regulation が観察され、その変化は刺激10日後以降も続いた。Bupivacaine を用いて損傷を誘発した筋においても、TGF- $\beta$  の増加と、TGF- $\beta$  RII の down-regulation が観察されたが、その変化は刺激6日後にはみられなくなった。一方、除神経を施した筋では、TGF- $\beta$  の増加にともなう TGF- $\beta$  RII の変化は観察されなかった。以上のことから、筋の肥大や修復の際には、TGF- $\beta$  が大事な役割をしている可能性が示唆された。

### 20. アジュバント関節炎ラット脊髄後根神経節培養細胞におけるブラジキン反応の増大と NGF の役割

笠井聖仙, 田村良子, 小崎康子, 水村和枝(名古屋大学・環境医学研究所・神経性調節分野)

脊髄後根神経節には一次求心性線維の細胞体が存在

し、そのうち小細胞は痛覚に関与すると言われている。これまで神経成長因子(NGF)が培養2日目のカプサイシン感受性小細胞において、内因性発痛物質ブラジキニン(BK)に対する脱分極反応を増大させること、このBK反応はB2受容体を介することを報告してきた。炎症時において痛覚過敏が起これ、これにNGFが関与する報告が見られるが、その詳細については全く分かっていない。今回、慢性関節リウマチのモデル動物であるアジュバント関節炎ラット(AAラット)において、脊髄後根神経節培養小細胞( $<30\ \mu\text{m}$ )から細胞内記録を行い、BKに対する反応を調べ、正常ラットと比較検討した。正常ラットにおいてBK反応を示す細胞は急性分離およびNGF無添加の培養1~2日の細胞では殆ど見られなかった。これに対しAAラットのBK反応を示す細胞の割合は急性分離では10%、培養1日目には29%、培養2日目には53%と有意に増加した。このAAラットの培養後におけるBK反応の増加は、NGF添加して培養した正常ラットのものと同様であった。そこでAAラット培養細胞で培養液にNGF抗体を投与してみたところ、培養2日目におけるBK反応の増加は有意に抑えられた。このことは、NGFが痛覚受容器に可塑的变化を引き起こすことが慢性関節炎時の痛覚過敏の機構の1つであることを示唆している。

## 21. シナプス前終末のライアノジン受容体の特性と短期の可塑性の発現

成田和彦, 秋田天平\*, 黄 樹明\*, 久場健司\*(川崎医大・生理, \*名大・医・生理一)

カエル運動神経終末の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (胸皮筋)とMEPPの頻度(前者の条件下:縫工筋)は、低 $\text{Ca}^{2+}$ 高 $\text{Mg}^{2+}$ 液又はd-ツボクラリン含有リンガー氏液中で、50 Hzの持続性刺激により数分の時間経過で一過性に上昇(hump)し、このhumpは、TMB-8、ライアノジンやサブシガーギンにより消失した。hump中に刺激を短時間( $<1$ 分間)休止(ポーズ)すると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は直ちにTMB-8存在下のレベルに戻り、刺激再開により元の高いレベル(立ち上がり相)に戻るか、より高いレベル(下降相)に一過性に上昇後、元のレベルに戻る。hump後に短いポーズ( $<1$ 分間)を与えると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 及びMEPPの頻度は変化しないが、刺激再開後に急激に一過に上昇し、その大きさは刺激休止の時間が長い程大きい。刺激休止が長い場合( $>1$ 分間)には、休止の長さに比例して休止後の立ち上がりの速度が遅く

なる。一方、低 $\text{Ca}^{2+}$ 高 $\text{Mg}^{2+}$ 液中のEPPの振幅は、低頻度(1~10 Hz, 1~10分間)の条件刺激後、数10倍に増大し、30分間くらい続いた。以上の結果から、カエル運動神経終末にライアノジン受容体が存在し、繰り返しの $\text{Ca}^{2+}$ 流入により活性化準備され(プライミング)、次の $\text{Ca}^{2+}$ 流入により活性化後、次第に不活化され、短い期間の $\text{Ca}^{2+}$ 流入停止により直ちに脱不活化され、長い休止により脱プライミングされることが解った。又、この $\text{Ca}^{2+}$ 誘起性 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離は伝達物質の数10倍の“Potentiation”に寄与することが解った。

## 22. 長期増強により変化する海馬CA1領域の信号伝達

小谷 進, 高木 博\*, 鈴木龍雄\*, 榊原 学(東海大学開発工学部, \*信州大学医学部)

海馬CA3からCA1へ投射するシェーファー側枝と、CA1顆粒細胞樹状突起の間に形成するシナプスにおいて、CA3側から高頻度刺激を与えるとシナプス伝達に長期増強(LTP)を起こすことが知られている。このLTPは“学習”、“記憶”のモデルであると考えられることから、これを分子生物学的、行動学的に証明しようと精力的な検討がなされているが、未だ明確ではない。我々はこの問題を解決する方法の一つとして、多点同時記録法により神経回路レベルでの検討をしている。この多点電極記録法を用いて海馬CA1領域でのLTP誘導前後で神経回路の信号伝達特性の変化を詳細にした。電気刺激に対する応答は $8 \times 8$ (間隔 $250\ \mu\text{m}$ )の格子状に配置した電極基板より行った。ラット海馬スライスにはCA1錐体細胞の樹状突起に電極が沿うように配置した。テスト刺激及びLTP誘導を起こすテタヌス刺激(100 Hz, 1 s)は、CA3からCA1領域へ投射するシェーファー側枝から与えた。テスト刺激に対する応答を、集合EPSPと集合スパイクとしてCA1錐体細胞の樹状突起、細胞体に位置した合計6箇所から記録した。集合EPSPの傾きと、集合スパイクの振幅はテタヌス刺激投与後に40分以上に渡り増加した。集合スパイクの増加率は記録位置に関係なくほぼ一定であったが、集合EPSPの傾きの増加率は刺激位置の近位より遠位で顕著であった。この結果はLTP誘導により、樹状突起での信号伝達効率に変化が生じることを示唆するものであった。

### 23. 肝門脈領域 Na 感受機構の中樞投射: fMRI による検討

萩池昌信, 山口修, 藤木通弘, 李 憲, 森田啓之, 村上政隆\*, 瀬尾芳輝\*\*, 荻野孝史\*\*\* (岐阜大医学部・第一生理, \*生理学研究所・分子生理, \*\*京都府立医大・第一生理, \*\*\*国立精神神経センター研究所)

肝門脈領域には高張食塩水に特異的に応答する Na 感受機構が存在し, 高張食塩水の門脈内投与により肝臓神経活動が増加し中枢では最後野, 孤束核, 傍室核, 視索上核, 脳梁下組織に Fos の発現を確認している。今回, この内臓受容器からの中樞投射をニューロン活動に伴う血流増加として NMR 画像上に捉えることを目的として以下の実験を行った。麻酔下ラットを用いて高張食塩水投与時(門脈内, 下大静脈内)と肝臓神経電気刺激時(10 V, 50 Hz)に生理学研究所の ABX Biospec 47/40 (Bruker 社, 4.7 T)で NMR 撮影を行った。食塩水投与群では画素数64×64 pixel において脈絡叢, 脳梁下組織, 視索上核に血流の増加を認めた。また, その血流増加は門脈内投与時に急激であった。次に行った肝臓神経電気刺激群は画素数128×128 pixel において脈絡叢, 脳梁下組織, 視索上核に血流の増加を認め, 傍室核にも僅かながら血流増加を検出した。以上より内臓受容器からの中樞投射は NMR 画像上で捉えられる可能性があることが示唆された。しかしニューロン興奮の程度を反映しているかどうかは今後の課題である。

### 24. サル視覚前野ニューロンのマスキング刺激に対する応答

近藤秀樹, 小松英彦(生理学研究所 高次神経性調節)

視覚マスキングの一種であるメタコントラストは, 短時間提示される視覚刺激(テスト刺激)がその後に提示されるマスク刺激によって見えなくなる, あるいは見えが悪くなる現象である。サル V4 野ニューロン活動と刺激の見えの知覚との対応関係を調べるためメタコントラスト刺激提示時のニューロン活動を記録した。無麻酔のサルに注視課題を行なわせ, 細胞の受容野の内部にテスト刺激を提示し, テスト刺激とマスク刺激の時間間隔(SOA)を変えて, テスト刺激に対するニューロン活動がどのようにマスク刺激の影響を受けるかを調べた。その結果, マスク刺激によりテスト刺激に対する反応が抑制される細胞が見られた。多くの

細胞では SOA が 0 msec で最大の抑制を示し SOA が増加するとともに抑制が減少した。また 0 msec の SOA を中心に非対称に抑制される細胞も見られた。調べた39個の細胞の平均では 0 msec の SOA を中心に対称に抑制される結果となった。V4 細胞の抑制とマスキングの心理物理の結果を比較するとマスク刺激が後に提示されるときはともに SOA の増加と共に単調に抑制の減少が見られたが, マスク刺激が先行して提示される条件では両者の間に違いが見られた。

### 25. 培養視交叉上核組織のバソプレッシン分泌に対するメラトニンの作用

磯部芳明, 鳥居孝子, 西野仁雄(名古屋市立大学医学部 第二生理)

視交叉上核(SCN)は哺乳動物における概日リズムの中樞で, 位相を伴う約24時間の周期情報を他の脳部位へ伝えている。SCN からの出力に Vasopressin (AVP) 含有神経が関与し, SCN 組織中の AVP 含量は主観的昼の方が夜よりも高い自由継続リズムを示す。一方, 松果体から分泌されるメラトニン(Mel)も概日リズムに形成に関与する。Mel 分泌は SCN によって調節される。そこで, Mel の AVP 分泌に対する影響を SCN スライスカルチャーを用いて調べた。SCN を含む組織を DMEM/F12 に N2 を加えたメEDIUMで培養し, 24時間に亙り3時間毎に採取した培養液中の AVP 濃度は概日リズムを示した。メEDIUM中に Mel を添加(500 nM)すると AVP 分泌は抑制された。Mel のアンタゴニストであるルジンドール(10 μM)と Mel (500 nM)を同時添加すると AVP の分泌抑制は認められなかった。一方, 明暗周期下でラットに Mel(100 μg/100 gBW)を i. p. 投与すると, 輪廻し活動は明期, 暗期共に減少したが体温は明期で上昇, 暗期に下降した。以上の結果は松果体から分泌される Mel は視交叉上核からの AVP 分泌抑制を介して輪廻し活動や体温の概日リズムに影響する可能性を示すものと考えた。

### 26. Salivary melatonin rhythm as an index of day-night rhythmicity in humans.

S. S. Shavali, M. Inoue, M. Samejima, K. Uchida, Y. Morita and A. Fukuda (Department of Physiology, Hamamatsu University School of Medicine)

Melatonin, a major hormone from the pineal gland is known to exhibit circadian variations with low

day-time and high night-time levels in serum, cerebrospinal fluid or urine. Recent findings indicate its presence in human saliva. In order to observe day-night variations in salivary melatonin and compare it with corresponding serum melatonin levels, we collected saliva and blood simultaneously from six healthy volunteers (aged 25~47 years) at two different time points i.e., day-time (15.00 hrs) and night-time (03.00 hrs). In a second experiment, only saliva was collected from nine healthy volunteers (aged 19~47 years) once in every 3 hours during a 24 hour period to examine circadian rhythmicity in salivary melatonin in humans. After clotting, the blood was centrifuged and the serum was separated. The saliva samples were kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  for at least 24 hrs before thawing, and then centrifuged. Melatonin content in the serum and saliva was quantified by radioimmunoassay technique (RIA). Results from the first experiment indicated that a 65~72% of serum melatonin was present in saliva, and the day-night variations both in salivary and serum melatonin levels were found to be significant ( $p<0.001$ ). In case of second experiment, all volunteers except one showed a clear rhythmicity in their salivary melatonin profile with low day-time (Mean  $\pm$  SD;  $6.53 \pm 3.40$ ) and high night-time levels (Mean  $\pm$  SD;  $27.33 \pm 15.72$ ;  $p<0.01$ ). These results suggest that salivary melatonin can be used to assess day-night rhythmicity in humans.

### 27. モルモット気管平滑筋の carbachol による収縮に対する $\text{Cl}^-$ の作用

竹本正興, 荻野佳代\*, 山木健市, 富田忠雄\*(名古屋大学医学部第二内科, \*藤田保健衛生大学総合医科学研究所)

モルモット気管平滑筋は carbachol (Cch,  $1 \mu\text{M}$ ) によって脱分極し, 持続的収縮を起こす。この収縮は isoprenaline (ISO,  $30\sim 100 \text{ nM}$ ) によって再分極を伴って弛緩する。Cch による収縮の途中で  $\text{Cl}^-$  を isethionate で置換すると膜は僅かに再分極し, 弱い弛緩がみられ, ISO による弛緩が著明に弱くなる。同様に, Cch 収縮中に  $\text{Ca}^{2+}$  を除いたときの弛緩も  $\text{Cl}^-$  を除くことによって強く抑制される。これらの抑制効果は 5 分間程度の  $\text{Cl}^-$  除去でほぼ定常に達し,  $\text{Cl}^-$  の再投与により 1~2 分で回復はする。 $\text{K}^+$  を除いて

も ISO および  $\text{Ca}^{2+}$  除去による弛緩が抑制されるが,  $\text{Cl}^-$  除去液中では  $\text{K}^+$  を再投与したときの回復はみられない。 $\text{Cl}^-$  を  $\text{NO}_3^-$  や  $\text{Br}^-$  で置換しても同様の傾向がみられるが, isethionate よりも  $\text{NO}_3^-$  が, さらに  $\text{NO}_3^-$  よりも  $\text{Br}^-$  の方が抑制効果が弱い。 $\text{Cl}^-$  を除いたときの ISO による弛緩効果の抑制は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の調節機構, 恐らく細胞膜における  $\text{Ca}^{2+}$  の汲み出し過程の抑制によるものと推測されるが, この過程がどのような機序によるものか, あるいは  $\text{K}^+$  がどのように関与しているのかについては今後さらに追究する必要がある。

### 28. モルモット気管平滑筋の carbachol および thapsigargin による収縮に対する $\text{Na}^+$ 除去の作用

荻野佳代, 竹本正興\*, 富田忠雄(藤田保健衛生大学総合医科学研究所, \*名古屋大学医学部第二内科)

モルモット気管平滑筋における carbachol (Cch) による持続的収縮は外液の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度に依存し, 細胞外から流入する  $\text{Ca}^{2+}$  によって発生すると考えられる。筋小胞体(SR)への  $\text{Ca}^{2+}$  取込みを抑制する thapsigargin (TPG,  $3\sim 5 \mu\text{M}$ ) で 20 分処理した後  $\text{Ca}^{2+}$  を 10 分間除くと,  $\text{Ca}^{2+}$  を再投与したとき持続的な収縮が現れる。この TPG による収縮は SR の  $\text{Ca}^{2+}$  が枯渇することによって生ずる, いわゆる capacitative Ca influx によるものと考えられる。Cch による収縮も TPG によるものも nifedipine で僅かにしか抑制されない。 $\text{Na}^+$  を NMDG で置換しても TPG による収縮は抑制されないが, Cch による収縮は  $\text{Na}^+$  除去によって可逆的に 50% 程度に抑制される。Cch 収縮の抑制は細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の減少を伴っていて, 細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入の減少によるものと考えられる。 $\text{Na}^+$  除去による Cch の抑制は TPG の投与によってある程度弱くなるが, TPG で処理しさらに  $\text{Ca}^{2+}$  を除いた後では Cch の収縮は  $\text{Na}^+$  除去によって抑制されなくなる。Cch による収縮には  $\text{IP}_3$  による SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出が関与するものと  $\text{IP}_3$  が関与しない要素があり,  $\text{Na}^+$  除去は  $\text{IP}_3$  の産生を抑えることで収縮を減少させる可能性が示唆される。

### 29. モルモット胃幽門前庭部輪走筋の slow wave に対する carbachol の作用

畑 忠善, 富田忠雄(藤田保健衛生大学総合医科学研究所)

モルモット胃幽門前庭の輪走筋は 1 分間に 3~4 回

の頻度で、振幅が 30 mV 程度、持続 10 秒程度の slow wave とよばれる自発性の電気活動を発生する。この slow wave がどのようなイオン機序で発生するかはまだ不明であるが、筋小胞体から放出された  $\text{Ca}^{2+}$  によって活性化される非選択性の陽イオンチャネルを介した内向き電流が関与している可能性が考えられる。Carbachol (Cch) は muscarinic receptor を介し、筋小胞体から  $\text{Ca}^{2+}$  を放出したり、非選択性の陽イオンチャネルを活性化するとされるので、本実験では Cch によって slow wave がどのような影響を受けるかを調べてみた。Cch (0.1 ~ 1  $\mu\text{M}$ ) は濃度依存性に膜を脱分極する。脱分極が弱いときには slow wave の plateau 相を増大するが、頻度はわずかにしか増加しない。脱分極が大きくなると振幅の減少と頻度の増加が著明になる。 $\text{K}^+$  チャネル活性化剤の cromakalim (3 ~ 5  $\mu\text{M}$ ) による過分極で抑制された slow wave は Cch で回復する傾向を示すが、caffeine (2 ~ 3 mM) による slow wave の抑制は回復しない。Slow wave に対する低濃度の Cch の作用は比較的弱く、Cch が slow wave の発生機序に本質的な影響を与えているか疑問である。

### 30. モルモット胃幽門前庭部輪走筋における slow wave の発生に筋小胞体から放出される $\text{Ca}^{2+}$ が関与している可能性

富田忠雄, 畑 忠善(藤田保健衛生大学総合医科学研究所)

筋小胞体(SR)の機能に影響を与える薬剤としては、SR への  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みを抑制する thapsigargin (TPG) および cyclopiazonic acid (CPA), あるいは caffeine による  $\text{Ca}^{2+}$  放出機構を活性化する ryanodine, 逆に放出を抑制する ruthenium red (RuR) などが知られている。TPG (3 ~ 10  $\mu\text{M}$ ) および CPA (3 ~ 10  $\mu\text{M}$ ) は slow wave の持続時間を短くし、僅かな脱分極と共に、振幅を僅かに減少させ、次第に持続的収縮を引き起こして来るが、20分程度作用させても slow wave を消失させることはなかった。Ryanodine (3 ~ 10  $\mu\text{M}$ ) の作用は弱く、5分間程度では slow wave は殆ど影響を受けなかった。しかし、ryanodine を一度作用させた後に caffeine を与えると、caffeine を除いた後に持続的な収縮を引き起こした。この状態でも殆ど正常に近い slow wave が観察された。RuR (100 ~ 300  $\mu\text{M}$ ) は slow wave の発生頻度を僅かに低下させるが、膜電位、slow wave の振幅には著明な影響

を与えず、高濃度の RuR で長時間処理すると収縮を抑制した。RuR のみの作用は弱いにもかかわらず slow wave に対する caffeine の抑制を増強した。Slow wave の発生に SR からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出が関与していることを明確に示す結果は得られなかった。

### 31. モルモット腎盂平滑筋の自発的電気的活動の性質について

高野博充, 鈴木 光(名古屋市立大学第一生理学教室)

上部尿管系平滑筋は自発活動を示す。我々はモルモットの腎盂平滑筋細胞の自発電気的活動について調べた。腎盂平滑筋細胞は自発的に脱分極(Slow Wave)をしており、それは2つの型に分けられた。1) 脱分極相の立ち上がりが遅く、プラトー相を持たない。静止膜電位は -35 ~ -50 mV, 振幅は 15 ~ 20 mV, 発生頻度は毎分 5 ~ 6 回で 5% の標本に見られた。2) 脱分極相の立ち上がりが速く反復性のスパイクを伴い、引き続きプラトー相を持つ。膜電位は -40 ~ -60 mV, 振幅は 30 ~ 40 mV, 発生頻度は毎分 3 ~ 4 回。3) の細胞において、ニフェジピン 0.1  $\mu\text{M}$  やニフルミン酸 0.1 mM によってプラトー相の幅が減少し、Slow Wave は発生頻度が低下し、最後に停止した。CPA 10  $\mu\text{M}$  によって Slow Wave のプラトー相は延長し、振幅は減少し、次第に発生頻度が低下し、ついには停止した。DIDS は無効であった。BAPTA 30  $\mu\text{M}$  は Slow Wave の立ち上がり速度を増加させ、スパイクの振幅を増大させ、発生頻度を毎分 4 回から毎分 5 回に増加させた。これらの結果から腎盂平滑筋の自発活動の発現機序は尿道や消化管平滑筋のそれとは異なり、 $\text{Cl}^-$  チャネルだけでなく電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$  チャネルの関与や細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 、その貯蔵部位の関与等が推察された。

### 32. ウシ毛様体平滑筋に存在する $\text{M}_3$ ムスカリン作動性非選択性陽イオンチャネルの電気生理学的特性

高井 佳子, 高井 章(名大・医学部・眼科, 第 1 生理)

ウシ毛様体より酵素的に単離した平滑筋細胞を用いて、カルバコール(CCh)刺激に伴い開口する非選択性陽イオンチャネル電流をパッチクランプ法により記録した。全細胞記録では、細胞外を正常 HEPES-Krebs 液(HKS)で灌流、電極液は 100 mM-Cs-aspartate, 5 mM-BAPTA (遊離  $\text{Ca}^{2+}$ , 70 nM; pH7.0; NaOH で滴

定)を含む液で満たした。Cell-attach mode の記録には灌流液に100 mM-KCl を含む HKS を、電極液には0.5  $\mu$ M-CCh, 2  $\mu$ M-charybdotoxin, 2  $\mu$ M-apamin を含む HKS を用いた。液温は30℃に保った。全細胞電位固定下( $E_m = -40$  mV)で灌流液に2 M の CCh を30秒間投与すると、著明なノイズ状成分をもつ内向き電流が観察された。CCh 投与開始から5~15秒の反応が安定した部分の電流記録を2 kHz の取込み速度でデジタル化し、高速フーリエ変換により両側パワー密度スペクトル(PDS)を計算すると、単位コンダクタンス25 pS, 平均開口時間20 ms 程度と推定された。Cell-attach 法( $E_m = -70$  mV)でも単位コンダクタンス $24.3 \pm 2.8$  pS ( $n = 14$ ), 平均開口時間 $18 \pm 1$  ms ( $n = 8$ )と、ノイズ解析からの予想に非常に近い特性を持つチャンネルの存在が確認された。その際電極内に4-DAMP(100 nM: back-filling)を加えると、記録開始から10~20分後にこのチャンネルは観察されなくなった。

### 33. 微分干渉顕微鏡を用いての、浸透圧ストレスに対するマウス大腸クリプト細胞形態変化の解析

森川 歩, 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)

腸管上皮細胞は水、電解質の吸収分泌の調節において重要な役割を担っている。しかし、水、電解質がどのような経路を介して輸送されているのかは不明の点が多い。本研究ではマウス大腸クリプト細胞において微分干渉顕微鏡下で、浸透圧負荷をかけた時の細胞の形態変化を詳細に解析することで腸上皮細胞における水、電解質の移動経路を明らかにすることを目的としている。その結果、低浸透圧負荷を行うと、細胞容積の増大の後に細胞と細胞の間隙が拡大する事を観察した。このことから、低浸透圧負荷により細胞内に流入した水分が、細胞間隙に排出されていることが示唆された。つぎに、この細胞間隙への水の移動がどのような機序でおこるのか検討する目的で、イオン組成を変えた灌流液を用いて単離した上皮細胞に浸透圧負荷を行い細胞間隙の観察を行った。低浸透圧負荷用灌流液のカリウム濃度を上げた場合、先の実験で観察した細胞容積の増大の後の細胞間隙の拡大が抑制された。このことから低浸透圧負荷時の細胞間隙への水分の移動に対してカリウムの細胞内から細胞外への移動が関与していることが示唆された。

### 34. マウス膵腺房細胞質カルシウムイオン濃度の持続的上昇と細胞死：共焦点画像解析装置による解析

菅野富夫, 浅田尚登\*, 矢内原昇(矢内原研究所, \*北海道教育大学旭川校基礎医科学)

分泌、収縮のシグナルとしての細胞質カルシウムイオン濃度,  $[Ca^{2+}]_i$  の役割はよく知られている。多くの内・外分泌細胞の分泌反応を持続させるシグナルは,  $[Ca^{2+}]_i$  振動であることも確かめられている。光感受性物質 sulphonated aluminium phthalocyanine (SALPC) を細胞膜に吸着させ、光を30s 照射すると、遊離膵腺房標本を構成する腺房細胞に  $[Ca^{2+}]_i$  振動が発生・持続する[1]。この  $[Ca^{2+}]_i$  振動を解析するために、Indo 1 を取り込ませたマウス膵腺房標本を共焦点画像解析装置(RCM8000 Nikon)によって観察・記録した。光刺激によって各腺房細胞のG蛋白を同時に活性化させたにもかかわらず、特定の腺房細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  が上昇し、数秒の時間をおいて隣接細胞、続いて次の隣接細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  が上昇し、各腺房細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  振動は非同調性であった。照射時間を延長すると、腺房を構成する腺房細胞の一個の  $[Ca^{2+}]_i$  振動が持続的上昇に移行し、数分後には細胞表面の一部に水疱が形成され、破れて細胞質が流出した。この経過中、他の腺房細胞群の  $[Ca^{2+}]_i$  振動は持続していた。SALPC 吸着膜に光を照射すると、活性酸素が発生し、G蛋白とホスホリパーゼCの活性化を持続させ、IP<sub>3</sub> 受容体一貯蔵部位のフィードバック機構によって  $[Ca^{2+}]_i$  振動が発生すると考えられている[1]。この機構が破綻して、  $[Ca^{2+}]_i$  上昇が持続するが、細胞間結合が閉じ  $[Ca^{2+}]_i$  上昇は他の細胞に波及しないと考えられる。

[1] Cui, ZJ and Kanno T: J Physiol (Lond) 504: 47-55, 1997

### 35. 全反射照明で観察した単純型とフラッシュ型の開口放出反応

坪井貴司\*\*\*, 菊田敏輝\*\*, 櫻井孝司\*\*, 寺川進\*\* (\*日本学術振興会特別研究員, \*\*浜松医科大学 量子医学研究センター)

培養ウシ副腎髄質クロマフィン細胞の分泌顆粒をアクリジンオレンジ(3  $\mu$ M)を用いて5分間蛍光染色し、開口放出反応を高開口数(N. A.=1.65)の100倍の対物レンズから全反射光を導入する方法を用い、観察、記録を行った。細胞を微小電極刺激後、蛍光染色した分泌顆粒が消失する反応をリアルタイムで観察で

きた。この反応の約85%は、蛍光輝点が広がりながら消失するもの(フラッシュ型)であった。残りの約15%は、蛍光輝点が1ビデオフレーム(33 msec)で単に消失するもの(単純型)であった。そこで細胞に、クロライドチャンネル阻害剤である DIDS(100  $\mu$ M)を与えると、フラッシュ型が抑制され、単純型が増大した。一方、灌流液を低浸透圧溶液に交換した場合、フラッシュ型が増大し、単純型が抑制された。

### 36. 乳腺筋上皮細胞における細胞外 ATP による $Ca^{2+}$ シグナリング

中野春男, 古家喜四夫\*, 山岸俊一(生理学研究所・生体膜, \*京都工芸繊維大・応用生物)

乳腺筋上皮細胞においては、吸乳刺激により脳下垂体後葉から放出されるオキシトシンによって細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇し収縮を引き起こす。この収縮によって腺胞内に溜まったミルクが導管に排出される。我々は、細胞外 ATP ( $\geq 10$  mM) によっても細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇し、収縮を引き起こすことを見いだした。この反応は細胞内ストアからの  $Ca^{2+}$  遊離によって起こり、ATP 受容体の拮抗薬 suramin で抑制された。各種ヌクレオチドの効力が ATP = ADP > UTP > UDP の関係にあることから、 $P_{2U}$  型の ATP 受容体の存在が推定された。また、 $Ca^{2+}$  反応を起こさない濃度の ATP (1  $\mu$ M) 存在下にオキシトシン刺激をすると、オキシトシンによる  $Ca^{2+}$  反応の閾値濃度が下がり生理的範囲のオキシトシン濃度 ( $\geq 0.01$  nM) で反応するようになった。

乳腺腺胞において筋上皮細胞に隣接する分泌上皮細胞が、機械的刺激によって ATP, UTP 等のヌクレオチドを放出することが知られているので、ATP が局所的なシグナルとして筋上皮細胞の機能を調節していることは十分に考えられる。

### 37. tottering マウスの P-type $Ca^{2+}$ channel の解析

若森 実, 森泰生, 井本敬二(生理学研究所 液性情報)

tottering (tg) 及び leaner (tg<sup>la</sup>) マウスは P/Q-type  $Ca^{2+}$  channel をコードする  $\alpha 1A$  subunit に mutation があり ataxia 及び absence の症状を示すことが報告されている。しかし、これらのマウスの P-type  $Ca^{2+}$  channel の機能解析は行われていない。そこで、正常、tg 及び tg<sup>la</sup> マウスから小脳 Purkinje 細胞を急性単離

し P-type  $Ca^{2+}$  channel の電気生理学的性質をパッチクランプ法で解析した。細胞の膜容量は、3 マウス間で差が無かった。しかし、電流密度は正常 > tg > tg<sup>la</sup> の順であった。tg 及び tg<sup>la</sup> マウスに於ける電流密度の減少に伴う P-type 以外の  $Ca^{2+}$  channel による電流の補償は認められなかった。tg マウスに於いて、活性化曲線及び不活性化曲線が脱分極側に約 10 mV シフトした。また、2 秒間の  $> -20$  mV の矩形波により不活性化されない channel の割合は正常マウスに於いて約30%であったのに対し tg 及び tg<sup>la</sup> マウスに於いては約50%にすぎなかった。以上の様に tottering mutation は P-type  $Ca^{2+}$  channel の機能を変化させていることが明らかになった。

### 38. 脳スライスを用いた細胞内 $Cl^{-}$ イメージング 福田敦夫(浜松医科大学生理学第一講座)

抑制性伝達物質の GABA やグリシンは発達過程初期、神経損傷や脳虚血などの病態時、あるいはその抑制性神経活動の過剰高進時などでは逆に興奮性伝達物質として作用する可能性が近年注目されている。これらの伝達物質は  $Cl^{-}$  イオンチャンネルを開口させるため、種々の状態における応答方向性の変化は細胞内  $Cl^{-}$  濃度 ( $[Cl^{-}]_i$ ) 調節機構の破綻あるいは未熟性による  $[Cl^{-}]_i$  上昇に起因することが示唆される。このように、 $[Cl^{-}]_i$  調節機構は GABA/グリシン作用の脱分極/過分極の切り替えを発達・可塑性の一過程として、あるいは脳障害過程の一機序として司っている可能性があり、神経回路の発達・可塑性・病態を考える上で重要である。しかしながら、 $[Cl^{-}]_i$  調節機構が神経回路機能との関わり、特にその種類・機能・局在による  $[Cl^{-}]_i$  変化とそれに伴う抑制作用の変化についてはよくわかっていない。このような回路レベルの問題を解明するには、電気生理学的手法に加えて空間的解像度に優れた実験系が必要不可欠である。そこで我々は  $Cl^{-}$  感受性蛍光指示薬の MEQ を用い、脳スライスを用いた細胞内  $Cl^{-}$  動態の画像化による神経回路レベルでの  $[Cl^{-}]_i$  変化の多点同時記録法を開発した。幾つかの問題点も認められたが、空間情報を得られる点で有用な方法であった。大脳皮質では生後発達の過程で  $[Cl^{-}]_i$  の減少が認められ、それに伴い GABA による  $Cl^{-}$  の出入りが逆転することが明らかになった。

### 39. ニューロンの細胞膜興奮による $\text{Ca}^{2+}$ 伝播に於ける細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 遊離の役割

秋田 天平, 中山 晋介, 久場健司(名古屋大・医・第一生理)

培養ウシガエル交感神経節細胞において, 単一または数個の活動電位が引き起こす細胞質および核内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇の時間経過及び空間的な伝播について検討した. パッチ電極を通じて低濃度 ( $10 \mu\text{M}$ ) の Oregon Green 488 BAPTA-1 を細胞内に導入した条件下で共焦点レーザー顕微鏡を用いて x-t 線走査を行った結果, 単一ないし数個の活動電位により生じる細胞膜直下から中心部に向かう細胞質及び核内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇の空間的な伝播の速度に二相性があることが判明した. 細胞質及び核内いずれの場合も速い相は膜直下から  $1.5 \sim 3 \mu\text{m}$  までの範囲に認められ, それらは ryanodine ( $10 \mu\text{M}$ ) 及び thapsigargin ( $100 \text{nM} \sim 1 \mu\text{M}$ ) で有意に抑制されるが, どちらの阻害剤も短い ( $5 \sim 50 \text{ms}$ ) 脱分極刺激による細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入には影響しなかった. この結果はウシガエル交感神経節細胞においては生理的条件下で活動電位により活性化された  $\text{Ca}^{2+}$  誘起性  $\text{Ca}^{2+}$  遊離機構が, 細胞質及び核内の  $\text{Ca}^{2+}$  情報伝達に重要な役割を果たしている可能性を示唆する.

### 40. ラット海馬ニューロンのカルシウム応答と形態変化—レーザーマイクロスポットによるグルタミン酸局所投与の効果—

櫻井孝司, 寺川 進, 山本清二\*, 渡辺明彦\*\*, 腰本裕之\*\*, 菅 隆之\*\*, 平野雅彦\*\*, 岡崎茂俊\*\* (浜松医大・光子量子学, \*脳神経外科, \*\*分子バイオホトニクス研究所)

単離培養した新生ラット海馬ニューロンのグルタミン酸刺激によるカルシウム応答と形態変化を画像解析した. グルタミン酸は紫外パルスレーザーのマイクロスポット (直径  $1 \mu\text{m}$ ) 照射により caged-L-glutamate (CG) を光解除して投与した. 細胞体から約  $20 \mu\text{m}$  はなれた樹状突起近傍でグルタミン酸を局所投与した直後から, fluo-3 を負荷した細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇が検出された. カルシウム応答の強度, 持続時間, 伝播範囲は CG 濃度や照射したレーザーパルス数によく依存していた. NMDA 受容体拮抗薬はこのカルシウム応答に体して阻害作用を示した. レーザーの照射周波数や CG 濃度を上昇させて, 持続相を持つカルシウム反応が継続すると, 約20分後

に DNA 鎖の断片化を反映する顆粒状構造が核内に現われた. 従って, 樹状突起への擬似シナプス様のグルタミン酸入力で誘導された核のカルシウム反応は, 神経細胞死へつながる早期信号であると結論された.

### 41. セラミドによる内向き整流性カリウム電流の抑制における MAPKs の関与

増田 匡, 栗本拓也, 飛田秀樹, 西野仁雄(名古屋市立大学・医学部・第二生理学)

セラミドは細胞膜に存在するスフィンゴ脂質で, 培養オリゴデンドロサイト (OLGs) のアポトーシスを誘導し, 中枢の脱髄メカニズムを考える上で重要視されている. 我々は, セラミド (cer) が OLGs の静止電位の維持に重要な内向き整流性カリウム電流 ( $I_{\text{Kir}}$ ) を抑制することをみつけ, この cer による抑制作用は Ras-Raf シグナル系を介することを, Ras 中和抗体や Raf-1 アンチセンスを用いて報告した. 一方, N型カルシウムチャンネルおよび容量依存性クロライドチャンネルの調節が p38 MAPK および ERKs を介するとの報告がなされている. そこで, OLGs におけるセラミドの  $I_{\text{Kir}}$  抑制機構にこれらキナーゼが関与するかどうかをホールセルパッチクランプ法で調べた.  $10 \mu\text{M}$  cer 投与による  $I_{\text{Kir}}$  抑制作用は, SB203580 ( $20 \mu\text{M}$ ) や PD98059 ( $50 \mu\text{M}$ ) をビベット電極内より作用させ p38 MAPK および ERKs の働きを抑えた場合でも認められた. このことは OLGs での cer による  $I_{\text{Kir}}$  抑制メカニズムにおいて, これらキナーゼの関与はないことを示している.

### 42. 培養副腎髄質細胞における NO を介した情報伝達機構

李 憲, 藤木通弘, 萩池昌信, 山口 修, 森田啓之(岐阜大学医学部・第一生理学)

副腎髄質からのカテコールアミン (CA) 遊離に対する一酸化窒素 (NO) の影響を明らかにするために, 培養ウシ副腎クロム親和細胞において誘発される CA 遊離及び細胞内カルシウム濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) に対する NO の影響を検討した. 精製したクロム親和細胞では, NO 発生薬であるニトロプルシッド (SNP) および L-arginine はほとんど作用を示さなかった. 一方, クロム親和細胞とそれ以外の副腎髄質細胞の共存培養 (共存培養細胞) においては, SNP および L-arginine 刺激により CA 遊離の増加が見られた. さらに, 非クロム親和細胞を SNP で刺激した後, その上清を精製し

たクロム親和細胞に添加すると CA 遊離が増加した。しかしながら、非クロム親和細胞を SNP で刺激する時に細胞外液の  $\text{Ca}^{2+}$  を除いておくと、培養上清の CA 遊離活性は消失した。L-arginine 刺激により誘発される共存培養細胞からの CA 遊離は、アルギニン誘導体により抑制された。また、共存培養細胞においても、SNP 添加による静止時  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変化は見られなかった。これらの結果から、NO はまずクロム親和細胞以外の細胞に作用して液性因子を遊離させ、この因子がクロム親和細胞からの CA 遊離を増強することが明らかとなった。また、この液性因子の遊離は細胞外液からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入に依存していることが示された。

#### 43. 無拘束ネコの尾状核カルバコール刺激による行動変化と脳内神経伝達物質濃度の変動

奥村 哲, 松山 清治, 森 茂美(生理学研究所・生体システム部門)

本研究では動物の行動変化と脳内神経伝達物質の細胞外濃度変動がどのように対応するかを明らかにしようとした。このためネコ尾状核、視床(VA/VL核)及び吻橋網様核(NRPo)の3箇所マイクロダイアリシスプローベ(直径0.2mm/長さ2~3mm)を挿入し、動物行動変化に伴う脳内モノアミン・アミノ酸濃度の変動をHPLC法を用いて測定した。また動物行動の詳細な観察のためにVTR撮影に加えて、脳波、頸筋筋電図、眼球運動電位、PGO波も同時に導出・記録した。安静無拘束状態におけるネコの行動観察および脳内モノアミン・アミノ酸濃度を測定した後、尾状核に挿入したプローベ内をカルバコール(10~100mM)を含む人工脳脊髄液で1時間にわたり微小灌流した。この結果、動物の行動状態(behavioral states)は通常の睡眠・覚醒リズムを繰り返す灌流前の状態から、灌流後には長期に持続する徐波睡眠、頸筋の持続的緊張を伴う覚醒状態さらに興奮状態へと変化した。この覚醒・興奮状態は灌流停止後も数時間持続した。一方、尾状核の細胞外セロトニンおよびドーパミン濃度は灌流開始から約2時間にわたり増加した。また同時にGABAおよびタウリンの細胞外濃度はそれぞれ増加および減少した。以上より尾状核に対するコリン微小刺激は脳内モノアミン・アミノ酸レベルの変動を誘発し、動物の行動状態を覚醒・興奮状態に変化させることが示唆された。

#### 44. ニコチンによるラットの行動変化について

高田由美子\*, 高橋宏史, 浦野哲盟, 井原勇人, 永井信夫, 高田明和(浜松医大・\*基礎看護, 第二生理)

ニコチンをラットに投与すると側坐核からのドーパミン(DA)の放出をまさせたり、行動を促進することが報告されている。ニコチンは中枢のセロトニン系にも影響を及ぼす。我々はラットにモノアミノオキシダーゼインヒビター(MAOI)を投与すると脳内のセロトニンがまずと共に行動が増加することを報告した。今回は雄のウイスターラットにニコチンを14日間、皮下注射したときの行動の変化と14日目の脳内のドーパミンやセロトニンとその分解産物を測定、およびマイクロダイアリシスにより側坐核や線条体からのドーパミンやセロトニンの放出を測定した。行動の測定はスーパーメックス(空町機械)を使い、30分毎の行動を記録した。7時から19時までを明期、19時から7時までを暗期とした。ニコチン投与ラットではコントロールラットと比較して明期の行動が有意に増加し、暗期の行動が有意に減少した。特に注射後60分までの行動が著明に増加した。1日の合計では有意に減少した。ニコチン投与14日目の脳では、線条体で5-HIAA(セロトニンの分解産物)が有意に増加し、視床下部ではセロトニンと5-HIAAが有意に増加したが、何れの部位でもドーパミンとその分解産物に変化はなかった。ニコチンを側坐核や線条体に局所注入するとドーパミンの放出をましたが、セロトニンの放出はまきなかった。

#### 45. 3-Nitropropionic acid (3-NPA) 亜急性投与ラットにおける運動機能変化と組織傷害

武井教恵, 山本光晴, 熊崎路子, 櫻井輝美, 西野仁雄(名古屋市立大学・医学部・第二生理学)

3-NPAはミトコンドリア呼吸鎖毒で、ATPの欠乏やラジカルの産生によって細胞死をおこす。急性全身投与(3-NPA, 20mg/kg×2~3)では外側線条体動脈領域に局在する傷害が生じ、グリア細胞死、IgGの漏出が認められる。今回、ラットに3-NPAを初日に20mg/kg、以後2週間にわたり10mg/kgを皮下投与し、1)行動、2)組織、3)筋電図の変化を調べた。

3-NPAを投与した12匹中3匹に筋力の低下を伴う後肢の過伸展、歪曲足、歩行障害が現れ、pole hangingやrotarodテストが障害された。これらの障害は前肢より後肢に強く現れ、後肢の筋電図は低振幅となった。組織学的には、両側線条体中央部のニューロンの脱落、グリア細胞死、グリオーシス、炎症性細胞

の浸潤が認められたが、IgG の漏出は最も症状の重い 1 匹をのぞいて見られなかった。また、黒質ドパミン細胞の樹状突起の数の減少、細胞体の凝集・縮小化傾向が見られた。

以上、3-NPA を亜急性全身投与すると黒質・線条体系が特異的に傷害され、後肢の運動障害が出現した。

#### 46. ラット中大脳動脈虚血・再開通脳に対するメラトニン投与の効果

山本光晴, 武井教恵, 櫻井輝美, 熊崎路子, 西野仁雄 (名古屋市立大学・医学部・第二生理学)

中大脳動脈虚血・再開通モデルでは、線条体及び皮質に梗塞巣が生じ、再開通後に発生するラジカルの関与が指摘されている。今回、右中大脳動脈を遮断、1

時間後に再開通する虚血・再開通モデルラットを作製し、ラジカルスカベンジ作用が報告されているメラトニンを虚血前と再開通後10日間にわたり投与し、その効果を調べた。虚血動物は、対照及びメラトニン投与群ともに典型的な片側性姿勢障害(左手の内転・内旋)を示した。10日後、メラトニン投与群では対照群に比べ、片側性姿勢障害が半減し、線条体と皮質の組織傷害は軽減した。本モデルにおいては、皮質の組織障害の程度と IgG 漏出の程度は平行し、これらと姿勢障害がよく対応した。またアストログリアの消失と IgG の漏出が認められる虚血周辺部皮質では、錐体細胞が残存していることが観察された。これらの結果より、虚血・再開通モデルに対するメラトニンの作用について考察する。

## 第91回近畿生理学談話会

日 時：平成10年10月23日

会 場：近畿大学本部・11月ホール

当番幹事：近畿大学医学部生理学教室 秩父志行・松尾 理

### 1. 血管内皮細胞における t-PA 受容体を介した細胞内刺激伝達系の解析

深尾偉晴, 岡田清孝, 上嶋 繁, 田中勝喜, 松尾理 (近畿大学医学部第2生理学)

【目的】我々は血管内皮細胞表面にプラスミノゲンアクチベータ (t-PA) に特異的な受容体が発現されることを既に証明した。t-PA 受容体に結合した t-PA の酵素活性は著しく増強されることから t-PA 受容体は血管内皮細胞表面における線溶活性調節の中心的役割を担っていると考えられる。今回、t-PA が t-PA 受容体に結合した際に惹起されると思われる細胞内刺激伝達系について解析した。

【方法】培養ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) に t-PA を反応させた後、細胞内からチロシンリン酸化蛋白を検出、定量した。さらにプロテインキナーゼ C (PK-C) 系の影響を検討し、マップキナーゼ (MAPK, p44/42) の活性も測定した。

【結果と考察】HUVECs の細胞内チロシンリン酸化蛋白は作用させた t-PA の濃度依存的に増加し、t-PA を 50 nM で10分間反応させた際に最大2.5倍に達した。一方、30分後には MAPK 活性が減少した。チロシンキナーゼ阻害剤および PK-C の活性化剤および阻害剤の検討から、t-PA の t-PA 受容体への結合によってチロシンキナーゼ活性化を伴う PK-C の活性化が生じた後、短時間で PK-C が減少調節を受け、MAPK 活性が低下する経路が予想された。

### 2. 好中球の $O_2^-$ 産生と接着における細胞内情報伝達系の検討

富永恵子 (大阪市立大学医学部第2生理学)

【目的】GM-CSF や TNF は好中球の細胞内 ERK や p38 MAP キナーゼ (p38) を活性化する。当教室ではすでに、チロシンキナーゼ阻害剤のゲニステインが GM-CSF や TNF によるスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) 産生と接着能の亢進を抑制することを報告した。そこで、本研究において MAP キナーゼの好中球機能における役割を検討した。

【方法】FCS でコートした48穴プレートにヒト好中

球をのせ、GM-CSF や TNF で刺激した。 $O_2^-$  産生能はシトクローム C 還元法により、接着能はプレートに接着した細胞の蛋白量を定量して検討した。

【結果と考察】MEK-1 inhibitor は GM-CSF による  $O_2^-$  産生を完全に抑制し、p38 inhibitor は TNF による  $O_2^-$  産生を完全に抑制した。従って  $O_2^-$  産生に関し、GM-CSF では主に MEK-1/ERK が関与し、TNF では主に p38 が関与している可能性が示唆された。一方、GM-CSF や TNF による接着能の亢進は p38 inhibitor によりほぼ完全に抑制された。従って接着能に関し、p38 が重要であることが示唆された。以上より、 $O_2^-$  産生と接着能の亢進にはゲニステインで抑制可能な経路が関与し、各々共通する MAP キナーゼが介在するものの主たる経路が異なっている可能性が示唆された。

### 3. $Ca^{2+}$ 過負荷不全心における心力学的エネルギー学的研究

坂田 進, 大賀好美, 吉田謙一\*, 上月久治, 三澤裕美, 高木 都 (奈良医大, 第二生理・\*山田大学, 医, 法医)

【目的】ラット血液交叉灌流摘出心臓標本を用いて  $Ca^{2+}$  過負荷による不全心モデルを作製し、左室収縮期末圧容積関係 (ESPVR) 及び収縮期圧容積面積 (PVA) と一拍あたりの心筋酸素消費量 ( $VO_2$ ) との関係を検討する。

【方法】摘出心臓を別のラットの動静脈とつなぎ血液交叉灌流を行った。左心室内に挿入した薄膜風船への注水量の増減により左心室容積を変えて、等容性収縮を行わせた。 $VO_2$  は、冠静脈灌流量と動静脈酸素濃度較差との積を心拍数で割り算出した。コントロールの ESPVR と  $VO_2$ -PVA 関係を求めた後、1%  $CaCl_2$  を高濃度に達するまで冠注した後、20分間血液で washout して、同様の検討を行った。また、心筋細胞骨格蛋白フォドリンの分解の有無を Western blot により調べた。

【結果と考察】コントロールの ESPVR は曲線を示し、 $VO_2$ -PVA 関係は直線を示した。 $Ca^{2+}$  冠注停止後、

ESP は減少し、ESPVR は下方にシフトした。VO<sub>2</sub>-PVA 関係も下方に平行移動した。この心筋で、フォドリンの分解が認められたので、Ca<sup>2+</sup> 過負荷不全心モデルを作製することができたと結論される。

#### 4. ラットの寒冷および暑熱逃避行動に対する絶食の影響

依田珠江\*, 細野剛良, 彼末一之(大阪大学・医学部・\*第二生理, 保健学科)

体温調節には自律性調節と行動性調節がある。我々は動物の自然な行動に基づく行動性体温調節の解析装置を開発した(Chen et al. 1998, *Physiol. & Behav.*)。今回はラットの体温と行動性体温調節に対する絶食の影響を検討した。先ずラットを22℃の環境で飼育し4日間の絶食期間を設け、ラットの体温の変動を調べた。絶食中のラットの体温は活動期(暗期)には絶食前のレベルを保っていたが、非活動期(明期)の体温は絶食が長くなるにつれ低下する傾向を示した。次に、ラットが冷風あるいは温風が流入するチャンパー中のケージ内で特定の場所に移動すると、温風あるいは冷風が報酬として与えられる装置を用いて、寒冷逃避と暑熱逃避の実験を絶食前日と絶食1, 3日目の明期に行った。寒冷逃避実験では、逃避行動がコントロール時に比べ絶食中は有意に増加した。一方、暑熱逃避実験では絶食しても環境温、体温、行動数に大きな変化はなかった。絶食中、非活動期においてはエネルギーを節約する必要があるため、代謝を下げ、体温を低くしておくことが合目的である。したがってエネルギーの損失を防ぐため、自律性調節反応を抑え、行動性調節反応を増強させるシステムが働くかと推察される。

#### 5. 心筋スライスの Ba<sup>2+</sup> 拘縮時の酸素消費

三澤裕美, 上月久治, 坂田 進, 大賀好美, 岸 隆司, 高木 都(奈良医大, 第二生理)

ほぼ完全な機械的無負荷収縮時の心筋スライスの酸素消費量(VO<sub>2</sub>)は、主として基礎代謝と興奮-収縮関連に要する VO<sub>2</sub> であり、クロスブリッジサイクリングに要する VO<sub>2</sub> は検出されるほどは含まれていないと考えられる。今回は、心筋スライスにおける Ba<sup>2+</sup> 拘縮時のクロスブリッジサイクリングの亢進による VO<sub>2</sub> を検討した。

【方法】 ラット左心室より 300 μm の厚さのスライスを作成する。Ca<sup>2+</sup> フリーで VO<sub>2</sub> を測定し、続いて Ba<sup>2+</sup> 拘縮を起こしその VO<sub>2</sub> を測定する。

【結果】 Ca<sup>2+</sup> フリー Tyrode 液での基礎代謝による VO<sub>2</sub> は 2.30 ± 0.52 ml O<sub>2</sub>·min<sup>-1</sup>·100g<sup>-1</sup> (n = 6) であった。Ba<sup>2+</sup> 0.3~3 mM の濃度で VO<sub>2</sub> は 3.35 ± 0.52 ml O<sub>2</sub>·min<sup>-1</sup>·100g<sup>-1</sup> (n=31) まで濃度依存性に増大した。特異的筋小胞体(SR)Ca<sup>2+</sup>-ATPase 抑制薬 Cyclopiazonic acid 10 μM は Ba<sup>2+</sup> 拘縮によるスライス VO<sub>2</sub> を低下させなかった。機械的無負荷状態での心筋スライスは、Ba<sup>2+</sup> 拘縮により VO<sub>2</sub> の増大を来すことが明らかになった。さらに Ba<sup>2+</sup> 拘縮の VO<sub>2</sub> の増大は SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase によるものでないことが示唆された。

#### 6. マウス心ペースメーカー細胞の自律神経調節

豊田 太, 森田哲夫\*, 光家 保\*\* (京大・農・畜資, \*宮大・農, \*\*京大・医・生理)

寒冷馴化したモルモットの、単離心筋細胞の L 型 Ca チャンネルには G 蛋白依存性遅い不活性化機構が発現する。自律神経・内分泌調節の関与で心機能が調節せれると考えられる。

効果器細胞<--->自律神経・内分泌<--->脳をすべて対象にこれらのクロストークを研究する事は可能だろうか? (1) 効果器細胞への自律神経活動を測定でき、(2) その効果器細胞のバッチ膜電位固定ができて(3) 脳による自律神経調節を実験的にコントロールできればよい。心ペースメーカー細胞は心臓のイオンチャンネル・担体・受容体ほぼ全てを有する。この細胞への自律神経活動が定量化できれば(1)(2)を満たす。マウス心電図 RR 間隔変動の周波数解析を行った結果、1 分間の記録で周波数解析が可能で、すべて周波数で RR 変動パワーは迷走神経により、アトロピン存在下平均 RR 間隔は交感神経活動によることが示唆された。この方法で、寒冷暴露下の自律神経活動変化を定量的に解析した。また、心拍調節が脳内の 10 種類のモノアミン・神経ペプチドからなるシーケンシャルカスケードによってコントロールされていることが示唆された。

#### 7. モルモット心室筋細胞の“マクロパッチ”膜における Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> 交換電流の特性

松岡 達, 藤岡靖忠, 野間昭典(京都大学大学院医学研究科細胞機能制御学)

心筋 Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> 交換電流(I<sub>Na-Ca</sub>)の解析は、whole-cell clamp 法と、心室筋細胞“bleb”からのジャントパッチ法により、主に行われてきた。我々は

内径 3 ~ 7  $\mu\text{m}$  のピペットを用いて、単離モルモット心室筋細胞から、直接 inside-out patch (“macro patch”) の作成に成功し、 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交換電流の解析を行った。ピペット内に 5 mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在化に細胞質側に  $\text{Na}^+$  を与えると、外向き  $I_{\text{Na-Ca}}$  電流が誘発され、その電流は減衰した(時定数( $\tau$ ) $1.5 \pm 0.4$  s,  $\text{Na}^+$  依存性不活性化)。外向き  $I_{\text{Na-Ca}}$  は細胞質側  $\text{Ca}^{2+}$  で活性化され、半飽和濃度 ( $K_h$ ) は約 0.2  $\mu\text{M}$  であった。また細胞質側  $\text{Ca}^{2+}$  は  $\text{Na}^+$  依存性不活性化を抑制し、その  $K_h$  は約 2  $\mu\text{M}$  であった。これらの特徴は、bleb 膜の  $I_{\text{Na-Ca}}$ 、またアフリカツメガエル卵母細胞に発現させた NCX1 電流とよく一致した。“macro patch” 法は intact な細胞質膜の  $I_{\text{Na-Ca}}$  解析に有用な方法であると結論された。

#### 8. 唾液腺における capacitative $\text{Ca}^{2+}$ entry の cAMP による調節

吉田秀世, 中張隆司, 今井雄介(大阪医科大学 第一生理学教室)

細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  ストアの枯渇をひき起こす分泌刺激による細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入は capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry として知られている。この細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  流入機構は、細胞内の  $\text{Ca}^{2+}$  ストアからの Ca 放出が引き起こした cAMP 濃度の上昇により調節されている事が近年報告されている。本研究では細胞内 cAMP と  $\text{Ca}^{2+}$  上昇の関係を検討した。実験には、ラットの単離顎下腺腺房細胞を用い、これに fura-2 を負荷し、ARGUS/HiSCA を用いて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を測定した。実験は、細胞を EGTA (1 mM) を含む  $\text{Ca}^{2+}$ -free 溶液を灌流し、刺激を加えた。その後灌流液を  $\text{Ca}^{2+}$  を含む溶液に戻し  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内への流入を観察した。ACh, ionomycin では、 $\text{Ca}^{2+}$  を含む溶液に戻すと急激な  $\text{Ca}^{2+}$  流入が観察された。この効果が細胞内 cAMP の上昇を介したものであることを調べるために、isoproterenol (1  $\mu\text{M}$ )、forskolin (10  $\mu\text{M}$ )、DBcAMP (1 mM) を用いて刺激した。これら細胞内 cAMP の上昇を引き起こす薬剤単独投与では、 $\text{Ca}^{2+}$  を含む溶液で灌流した細胞に  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇を引き起こさなかった。しかし、細胞を EGTA (1 mM) を含む  $\text{Ca}^{2+}$ -free 溶液を灌流し、細胞内 cAMP の上昇を引き起こした後、灌流液を  $\text{Ca}^{2+}$  を含む溶液に戻すと、急激な細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇が観察された。この結果は capacitative  $\text{Ca}^{2+}$  entry の活性化には、EGTA 処理が必要であり、かつ cAMP が関与していること

が考えられた。

#### 9. 培養骨芽細胞における内向き整流性 $\text{K}^+$ チャネルの活性調節因子

藤本 勝久<sup>1,2)</sup>, 森 禎章<sup>2)</sup>, 山口 淳<sup>3)</sup>, 河崎 敦<sup>2)</sup>, 窪田 隆裕<sup>2)</sup>, 阿部 宗昭<sup>1)</sup>(大阪医大整形外科<sup>1)</sup>, 第二生理<sup>2)</sup>, リハビリセンター<sup>3)</sup>)

【目的】 骨芽細胞膜において内向き整流性  $\text{K}^+$  チャネルを同定し、その性質について検討を行った。

【方法】 マウス頭蓋冠由来培養骨芽細胞 (MC3T3-E1) を confluent に達した直後、トリプシン処理を行って細胞を単離し、この細胞に patch-clamp 法を適用した。

【結果】 このチャネルは、約 50 pS の単一チャネルコンダクタンスと内向き整流性を持っている。Cell-attached patch では、浴液の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が  $10^{-6}$  M の時に ionomycin (1  $\mu\text{M}$ ) を添加するとチャネルの活性が上昇し、これに PKC 阻害剤である GF 109203 X (5  $\mu\text{M}$ ) の投与するとチャネルの活性は低下した。一方 PKC 賦活剤である phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 10  $\mu\text{M}$ ) の添加によってチャネルの活性は上昇した。さらに、inside-out patch において、PMA の添加後に PKC (1 U/ml) を投与するとチャネル活性は上昇した。

【考察】 今回我々が見いだした内向き整流性  $\text{K}^+$  チャネルは、PKC によって活性化し、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇時の膜電位維持に関与している可能性が示唆された。

#### 10. パルス式色素希釈法による循環血液量測定の評価: Evans Blue による測定との比較

八重樫和宏, 伊藤倫之, 鷹股 亮, 河端隆志, 森本武利(京都府立医科大学 第一生理学教室)

Indocyanine green (ICG) を色素指示薬としたパルス式色素希釈法(日本光電工業製 DDG-2001)で人の循環血液量を測定した。これは生体組織透過光が動脈血と共に脈動することを利用して、ICG の血中濃度を指または鼻に装着したプローブで測定する方法である。ICG は肝臓からのみ排泄され、腸管での再吸収が無い。血中 ICG 濃度を経時的にプロットした片対数グラフを直線回帰してプローブ装着位置の ICG 出現時刻に外挿すれば初期分布濃度を得る。投与した ICG 量を初期分布濃度で割ると循環血液量を求めることができる。15歳から38歳までの健康人25名には、座位で30分

の安静後、Evans Blue 10 mg を肘静脈より注入し、10 および20分後に肘静脈より採血して血漿中の色素濃度を吸光法で測定した。次に肘静脈より ICG 20 mg を投与し、DDG-2001 により ICG 濃度の経時的变化を求めた。実験の結果、パルス式色素希釈法で求めた循環血液量は、Evans Blue で求めた値に比べ座位では20~30%程度高くなる事がわかった。さらに、仰臥位で測定したところ、両者の差は10%以下になった。

### 11. 眼優位可塑性：c-Fos 発現による可塑性評価と修飾系の関与

今村一之，中館和彦，渡辺恭良(大阪バイオサイエンス研究所・神経科学部門)

我々は、眼優位可塑性について、最初期遺伝子である c-fos のタンパク産物 (c-Fos) を指標とした免疫組織化学的評価を試みた。ネコの単眼の神経活動を抑え、暗順応後に他方の眼を視覚刺激すると、眼優位カラムに対応した c-Fos パッチが観察された。感受性期に単眼を1~2週間遮蔽し、暗順応後にそれぞれ、遮蔽眼、及び、正常眼に与えた視覚刺激により誘導される c-Fos 陽性細胞数を計測すると、ネコ、ラットともに遮蔽眼刺激によって第一次視覚野に誘導される c-Fos 陽性細胞は、層特異性をもって、有意に減少していることが明らかになった。次に、中枢ノルアドレナリン (NA)、セロトニン (5-HT) 系の関与について選択的な神経毒を用いた検討を行った。その結果、DSP-4 を投与した動物の視覚野では、正常眼視覚刺激によって誘導される c-Fos 陽性細胞数が有意に減少しており、単眼遮蔽の効果が検出されなかった。PCPA 投与動物でも遮蔽の効果が減弱していた。近年、記憶・学習に cAMP の増大とそれに伴う A-キナーゼ、CREB 活性化といった情報伝達系の重要性が示されてきたが、c-Fos は CREB の活性化によって転写が活性化される分子の一つである。今回の研究成績から、NA 及び 5-HT 系が、遺伝子発現を介して、眼優位可塑性の調節に重要な働きをしていることが示唆される。

### 12. ラット睡眠 REM 期における内臓・下肢血流分布の変化

本郷亜紀子，柳崎麻里，三木健寿(奈良女子大学生活環境学部 生活健康学講座)

【はじめに】我々は、ラットの睡眠 REM 期に動脈圧が上昇することを観察し、そのメカニズムとして総末梢血管抵抗の増加がその一因であることを報告した。

本実験では、内臓及び下肢への血流量を測定し REM 期の総末梢血管抵抗増加の詳細を検討した。

【方法】Wistar 系のラットを用い、脳波、頸部筋電図、心電図、動脈圧、中心静脈圧、前腸間膜動脈血流量 (Fms)、腹大動脈血流量 (Fab)、総腸骨動脈血流量 (Fil) を測定するための電極、カテーテル及びプローブを体内留置した。4 日以上回腹期の後、ラットの行動をグルーミング、グルーミング以外の運動、安静の覚醒時と睡眠時を Non-REM、REM の計 5 ステージに分け解析を行った。

【結果・考察】動脈圧は、REM 期に入ると徐々に上昇し始め REM 開始108秒後には REM 開始前102.6±0.5 mmHg から108.2±0.8 mmHg まで上昇した。Fab、Fil は REM 開始直後に急激に減少し始め、各々平均309±11Hz、302±12Hz 減少した。一方、Fms は、REM 期開始と同時に上昇し平均364±20 Hz 増加した。以上より REM 期における総末梢血管抵抗の上昇は、全身の血管が一様に収縮するのではなく、内臓の血管抵抗の減少を上回る下肢の血管抵抗の増加が生じることによって総末梢血管抵抗が上昇したと考えられる。

### 13. 加齢によるラット海馬 RSA 及び学習能力の変化

阿部泰之，豊澤敬一郎\*(神戸大・自然科学・知能科学，\*農・応用生理)

ラット海馬からは Rhythmic slow activity (RSA) と呼ばれる特徴的な脳波が観察され、歩行時などに観察されるタイプ1と REM 睡眠時や麻酔下で観察されるタイプ2に分類される。またタイプ2はアトロピン投与により消失するが、タイプ1は消失しない。海馬での老化現象は形態、生化学、及び電気生理学的な研究がなされているが、脳波に関する報告は極めて少なく、これら2つのタイプの RSA と老化との関連は未だ明らかではない。

本実験では、若齢(4カ月齢)、成熟(13カ月齢)及び老齢(24カ月齢)ラットの海馬 CA1 及び歯状回より記録した歩行時のタイプ1 RSA 及びウレタン麻酔下のタイプ2 RSA について FFT による周波数解析を行った。パワーに関しては両タイプとも若齢に比べ成熟及び老齢群で低下する傾向がみられた。一方、周波数に関してはタイプ1では加齢によって変化せず、コリン作動性とされるタイプ2で、老齢群でのみ周波数が低下していた。また水迷路実験により学習能力の加齢に

伴う低下傾向が確認された。これらの結果より、海馬 RSA は老齢ラットでも発生するが、コリン作動性システムでの減退が顕著に現われ、これが老化による高次機能減退に大きく関与していると考えられる。

#### 14. P-06 SHR から分離した水頭症モデルラットの特徴

千葉 惇, 太田善夫\*, 仲西宏元, 秩父志行(近畿大・医・第1生理, \*第1病理)

高血圧自然発症ラット(SHR)の中に出生時より頭蓋の膨隆のラットを選んで兄妹交配した結果、4世代目で雄雌共に90%以上頭蓋の膨隆を示すコロニーが得られた。この水頭症モデルラットの特徴について調べた。経時的に血圧、体重を測定しながら、頭蓋の膨隆のラットの症状(Softex type C-SM; レ線写真)を観察した。脳脊髄液圧は、カテーテルを側脳室および大槽内に挿入し、低圧力増幅器より記録した。また、頭部へ磁気刺激を与え、運動誘発電位(MEP)を腓腹筋より導出した。このSHR水頭症モデルラットの形態学的特徴は、大脳が全体的に腫大し、頭蓋縫合の開大や頭蓋骨の菲薄化していたが、中脳水道には顕著な拡張はなかった。最高血圧は正常SHRとは異なり、最高血圧は正常SHRと差はなく、10週齢で約200mmHgと一定値を示した。頭蓋の高さと切歯-外耳道開口部中央部の高さとの比は、正常ラットでは50%以下を示すのに対して水頭症ラットでは50%を超えていた。脳室内圧、大槽内圧は約6cm水柱で正常SHRやWKYとはほぼ同様で正常圧範囲内であった。MEPの閾値は高かった。以上より、正常圧水頭症モデルラットとして水頭症の病変の解明に有用なラットコロニーが得られた。

#### 15. アセチルコリン刺激時モルモット幽門腺細胞開口放出反応の細胞容積による調節

藤原祥子\*, 中張隆司, 今井雄介(大阪医科大学第一生理学教室, \*第二内科学教室)

モルモット幽門腺粘液顆粒細胞のアセチルコリン(ACh)刺激による開口放出反応を、ビデオ顕微鏡を用いて観察した。ACh刺激は濃度依存性に開口放出頻度を増加させると共に、細胞容積の減少も引き起こした。このAChによる反応は、ionomycinにより再現され、 $Ca^{2+}$ -free溶液、 $Ca^{2+}$ -channel blockerにより抑制された。これらの結果からAChの効果は、細胞内 $Ca^{2+}$ の上昇を介したものであることが明らかに

なった。

AChによる細胞容積の減少に対する、ion channel blockerの効果について検討した。 $K^+$ 、 $Cl^-$ -channel blockerは、AChによる細胞容積の減少を抑制した。これらion channel blocker存在下では、AChによる開口放出反応も著明に抑制された。一方で、bumetanideはAChによる細胞容積の減少を促進した。そしてbumetanide存在下ではAChによる開口放出反応も促進された。さらに灌流液の $Na^+$ を $K^+$ に置換すると細胞容積は増加し、AChによる開口放出頻度は著明に抑制された。これらの結果は、細胞容積変化が、開口放出を調節している可能性を示すものであった。

今回の結果は、ACh刺激によるモルモット幽門腺粘液細胞の開口放出反応には、細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の上昇が必要であり、同時にACh刺激による細胞容積変化も開口放出の調節に重要な役割を果たしていることを示すものであった。

#### 16. 大脳皮質血流量の中樞性調節には皮質ムスカリン受容体およびNMDA受容体の同時活性化が必須である

中井正継, 前田正信(国循センター研究所, 産業医大研究所)

賦活のような大脳皮質の活性化に際して、そのとき促進したエネルギー代謝機構に基質を補給するため、皮質血流量が増加する(皮質活動-血流量カップリング)。この現象を実現する機序を調べたので報告する。ラット71匹を麻酔、人工呼吸、頸髄切断のもとに頭頂骨に骨窓を設け、それを介して脳表を薬液灌流し、皮質血流量(レーザードップラー法)を測定した。上記のカップリングを発生させるため中心灰白質(PAG)尾側1/3外側部をNMDA微量注入により刺激した。PAG刺激およびAChやNMDA皮質投与は、皮質血流量を強力に増加したが、これはアトロピンおよびMK-801投与によって強力に抑制された。AChとNMDA間の相互増強作用はあってもわずかであった。従ってPAGは皮質にAChとglutamateを同時に放出させ、皮質のムスカリン受容体およびNMDA受容体を刺激することが明かである。関わる神経回路は前者はマイネルト核を起始とするコリン作動性皮質投射である(発表済)が、後者は視床皮質投射および皮質皮質投射であろう。その結果、皮質細胞成分(ニューロンとグリア)は活性化しエネルギー代謝が促進し、皮質NO産生も促進することを介して皮質血流量は増加する

(発表済)。他にKイオン放出促進や、アラキドン酸代謝促進も関与する可能性も大きい。

### 17. 海馬歯状回顆粒細胞の細胞内カルシウム動態：長期増強の誘発条件との関連性について

磯村宜和, 加藤伸郎(京都大学大学院 医学研究科 認知行動脳科学)

馬切片標本の貫通線維一状回顆粒細胞シナプスにおいて、高頻度刺激により長期増強 LTP を誘発するためには、脱抑制(GABA<sub>A</sub>受容体阻害)下での NMDA 受容体の活性化が必要であるとされている。これらの条件は高頻度刺激下での細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動態に影響を与えると考えられる。また細胞内 Ca<sup>2+</sup> 上昇も LTP の誘発に不可欠とされている。今回、ラット海馬切片標本に対しホールセル記録/Ca<sup>2+</sup> 画像法をもちいて、LTP を誘発する条件下での歯状回顆粒細胞の細胞内 Ca<sup>2+</sup> 動態について調べた。その結果、1) GABA<sub>A</sub> 受容体阻害剤ピクロトキシンの投与によって脱抑制をもたらすと、高頻度刺激により誘発される Ca<sup>2+</sup> 上昇は細胞体・樹状突起のどちらにおいても著明に促進された。

2) この脱抑制下での Ca<sup>2+</sup> 上昇は NMDA 受容体阻害剤 AP-5 によって抑えられ、3) L 型電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャンネル阻害剤ヴェラパミル、ニモジピンによっても有意に抑えられた。このことより、LTP を起こすような高頻度刺激による細胞内 Ca<sup>2+</sup> 上昇は、通常メジウム中では GABA<sub>A</sub> 受容体の働きを通じて強く抑えられており、脱抑制下では NMDA 受容体や電位依存性 Ca<sup>2+</sup> チャンネルに依存して誘発されると考えられた。

### 18. 肝性脳症の発症におけるグリア細胞の関与

玄番央恵, 松下宗嗣(関西医科大学第二生理学講座)

意識障害および羽ばたき振戦を主症状とする肝性脳症患者の剖検脳でアストロサイトの形態異常が報告されている。4群のチオアセタマイド投与ラット(TAA1D, TAA1.5D, TAA2D, TAA2.5D 群は初回投与後1, 1.5, 2, 2.5日目にフォルマリンで灌流固定; 2回目は初回投与から24時間後投与)及び対照ラットの神経学的検査を一定時間毎に施行後、深麻酔下で灌流、固定した。肝組織は TAA1D, TAA1.5D, TAA2D, TAA2.5D の順に異常所見が増大した。TAA 投与ラット(肝性脳症ラット)の高次脳機能および平衡機能は肝臓の異常度とはほぼ比例して低下したが、生得的反射は対照ラットと同様であった。画像解

析ソフトを用いて測定したアストロサイトの面積は、海馬、大脳基底核、視床下部、大脳新皮質、小脳においては肝性脳症群が対照群より有意に拡大していた(TAA1D 群或いは TAA1.5D 群が最大)が、一方中脳は両群間に差がなかった。他方肝性脳症群の活性型ミクログリア数は何れの脳部位でも対照群より有意に増加し、アストサイトと異なり TAA2, D群で著増していた。ニューロンは肝性脳症群と対照群の間に差はなかった。以上は2種類のグリア細胞に特有な、ニューロン先行性の活動異常が肝性脳症の発現に関与することを示唆する。

### 19. ラットの睡眠 REM 期における心拍出量と総末梢血管抵抗の変化

三木健寿, 本郷亜紀子(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・睡眠時の心拍出量と動脈圧を測定し、睡眠 REM 期の動脈圧調節に果たす総末梢血管抵抗の役割について検討した。

【方法】Wistar 系のラットを用い、脳波、頸部筋電図、心電図、心拍出量、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 1) グルーミング、2) グルーミング以外の運動、3) 安静期、4) Non-REM 期および 5) REM 期の5ステージにおける循環動態の変化を観察した。動静脈圧差と心拍出量から総末梢血管抵抗を求めた。

【結果・考察】ラットのグルーミングから安静、Non-REM 期にはその身体活動レベルの低下に従い動脈圧、心拍出量、心拍数は直線的に低下した。心拍出量は REM 期にさらに低下したが、動脈圧は REM 期に上昇した。結果、REM 期に総末梢血管抵抗が有意に増加していることが明らかとなった。Non-REM から REM 期への移行期において心拍出量は REM 期開始と同時に低下したが、総末梢血管抵抗は REM 期開始後徐々に増加し、結果動脈圧が上昇した。以上、ラットの睡眠 REM 期には心拍出量と総末梢血管抵抗が協調せずに変化し動脈圧の上昇が生じていることが明らかとなった。ラット睡眠 REM 期には動脈圧調節系が open-loop 化していることが示唆された。

## 20. ラット台形体内側核シナプスにおける high-fidelity 伝達の生後発達過程におけるカルシウムチャネルの役割

中馬奈保, 大森治紀(京都大・医・生理)

台形体内側核(MNTB)は聴覚系の中継核であり, 成熟動物では位相情報を保存したシナプス伝達(high-fidelity transmission)を行う。未成熟な(生後4~5日齢)MNTBシナプスでは興奮性シナプス後電流(EPSC)はタイミング, 振幅ともに大きくばらつき, 多数の非同期性の伝達物質放出が観察された。成熟に伴い(生後9日齢以降)EPSCは振幅が増大し, ばらつきも減少し, 伝達物質放出が同期化した。シナプス前終末のカルシウム電流量および活動電位一発あたりのシナプス前終末へのカルシウム流入量(fura-2を用いた顕微測光実験)は, 共に生後発達に伴い増大した。一方, 成熟したシナプスで外液のカルシウム濃度を下げても, 非同期性のEPSCは観察されなかった。しかし, 外液に $3 \mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$ , および $200 \text{ nM}$   $\omega$ -agatoxinを投与して部分的に機能を失ったカルシウムチャネルを作ると, 非同期性のEPSCが観察された。さらに, 未成熟なシナプスでは, シナプス前終末内にEGTAを投与すると, 非同期性のEPSCが消失した。以上から, 未成熟なシナプスではシナプス前終末のカルシウムチャネルとシナプス小胞の相互作用が弱く, 生後発達に伴ってより強い相互作用状態に変化すると推定された。

## 21. $\beta$ -アドレナリン受容体活性化によるシナプス伝達の修飾: ネコ視覚皮質スライス標本における検討

小林真之, 今村一之, 渡辺恭良(大阪バイオサイエンス研究所・神経科学部門)

$\beta$ -アドレナリン受容体は, ネコ大脳皮質視覚野において神経活動に依存した眼優位可塑性の調節に関与することが知られているが, 神経細胞活動に及ぼす影響については未だ不明である。我々はこの点を明らかにするため, ネコ大脳皮質視覚野のスライス標本に, 多電極培養皿を用いた誘発電位記録法および細胞内記録法を適用し,  $\beta$ -アドレナリン受容体アゴニストである Isoproterenol の効果を調べた。

白質の電気刺激による誘発電位を複数の電極から同時記録すると, Isoproterenol の灌流投与によって皮質浅層における誘発電位が増強された。そこで, 皮質II/III層の錘体細胞から細胞内記録を行ったところ, Isoproterenol の灌流投与によって静膜電位は脱分極し, 白質刺激による興奮性シナプス後電位の振幅が増大し, 減衰時間が延長した。このような効果は, NMDA受容体のアンタゴニストであるD-APVを予め投与すると消失した。これらの結果は,  $\beta$ -アドレナリン受容体がNMDA受容体を介して生じる電位を増強することにより興奮性シナプス伝達の効率を高めていることを示唆する。

## 22. 軸索再生後のネコ網膜神経節細胞の受容野特性

三好智満, 渡部真三\*, 福田 淳(大阪大・院医系・情報生理学講座(医学部第二生理), 発達障害研究所・\*生理学部門)

中枢神経系の一部である網膜神経節細胞は, その軸索が切断されても, 末梢神経を断端に移植することによって, 一部の細胞は逆行性変性を免れ軸索を再生することができる。軸索再生したネコの網膜神経節細胞の受容野特性を, teased fiber method による単一ニューロン活動記録によって調べた。その結果, 286個の受容野が決定でき, 殆どが生理学的にY・X・W細胞に分類可能であった。中でもY細胞の出現頻度が最も高かった。正常網膜の場合と同様に, どの偏心度においてもY・W細胞の受容野中心部はX細胞よりも大きい傾向を示したが, 網膜中心野より10度以内では, 正常網膜の場合と比べて特にX細胞の受容野中心部が拡大していた。自発活動頻度は殆どのY・X細胞において10 spikes/sec以下と, 正常よりも明らかに低く, 全く自発活動を持たない細胞も多かった。Y・X細胞のうち23%の細胞で受容野の周辺部が消失し, また34%の細胞で拮抗的周辺部の反応性が減弱していた。

以上より, ネコ網膜神経節細胞のいずれもが軸索再生可能で, しかも光情報の伝達能力を保持していることが明らかとなった。正常と異なる所見は, 軸索損傷・再生に伴う網膜内神経回路の可塑的变化を示唆するものと考えられる。

## 編集後記

生理学雑誌61巻1号をお届け致します。1号ということで、日本生理学会会則、生理学雑誌投稿規定、生理学領域における動物実験に関する基本的指針が掲載されています。生理学会も終わりほっとされている時期かと思えます。時間がありましたら目を通しておいて頂きたく存じます。

さて生理学雑誌の編集委員の構成が4月より変更になります。これまでの編集委員の人数では、全専門分野をカバーすることが困難であったため、各々の専門分野からの意見を拝聴しにくかったり、投稿論文、総説の適切なレビューアーの選択等に苦労してきました。このため編集委員の数が専門分野をほぼカバー出来るように増員されることになりました。また編集委員の任期も3年(再任を妨げない)と明記されました。新しく委員になられた先生宜しくお願い致します。

技術講座は毎号充実しております。一号には熊谷

泉、津本浩平先生と久米晃啓、小澤敬也先生から力作をいただきありがとうございました。是非ご一読下さい。

動物愛護に関する関心が高まり、動物実験施設の内部査察、倫理委員会の設置など動物実験の規制の方向に向かっているようです。正当なる規制は必要かも知れませんが、不適切な規制は whole animal を扱う研究の継続に支障をきたしかねません動物実験委員会等でこれらに対応するための基本方針と実験指針の原案を作成して頂き、会員に提示・合意して、生理学会全体としての基本方針と動物実験指を早急に作成する必要があると個人的に思います。会員のみなさま如何お考えでしょうか。

また恒例になっております生理学論文表題集の依頼が入っています。締め切りは4月末日ですので、御忘れにならないようご提出お願い致します。

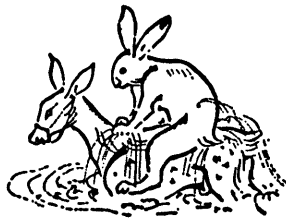
(佐々木成人)

### \*編集執行委員

#### 編集委員

|                     |                     |
|---------------------|---------------------|
| *金子章道(編集幹事)(感覚)     | 青木 藩(呼吸)            |
| 小野田法彦(感覚)           | 河南 洋(自律神経, 内分泌)     |
| *工藤典雄(運動, 発生・成長・老化) | 窪田隆裕(腎・体液)          |
| 黒島晟汎(環境)            | 小西真人(筋)             |
| 佐久間康夫(生殖)           | *佐々木成人(運動)          |
| *高田明和(血液)           | 菅屋潤壹(栄養・代謝・体温)      |
| *高松 研(神経化学)         | 土居勝彦(心臓・循環)         |
| *中島祥夫(運動)           | 成瀬 達(消化・吸収)         |
| *野崎修一(運動)           | *野村正彦(高次中枢, 行動・リズム) |
| *日地康武(感覚)           | 福田 淳(感覚, 高次中枢)      |
| *村上政隆(膜輸送)          | 吉岡利忠(体力)            |
| 小山なつ(H P担当)         |                     |

日本生理学会事務局：〒113-0033 東京都文京区本郷3-30-10 布施ビル  
 TEL：03-3815-1624 FAX：03-3815-1603 (勤務時間 10：30～18：30)  
 E-mail：psj@qa2.so-net.ne.jp  
 URL：http://www.soc.nacsis.ac.jp/psj/



# 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労のあった会員で、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 |

## 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。

## &lt;会費に関する事項&gt;

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。準会員の会費は年額9,500円とする。臨時会員の会費は年額4,000円とする。

## 日本生理学雑誌編集委員会選出内規

平成10年11月14日制定  
日本生理学雑誌編集委員会

1. 日本生理学雑誌編集委員会は執行委員と編集顧問により構成する。
2. 日本生理学会編集幹事は編集委員長を務める。
3. 編集委員の任期は3年とする。重任を妨げない。
4. 執行委員は毎月の編集業務を行う。
5. 編集顧問は雑誌の編集に関し、各自の専門領域から助言を行う。
6. 執行委員は若干名とし、事務局の所在地(現在は東京)周辺に所属する日本生理学会評議員から選出する。
7. 編集顧問は約20名とし、専門領域を勘案して選出する。
8. 本内規の改廃は日本生理学雑誌編集委員会が発議し、常任幹事会の承認を得るものとする。

## 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。写真や図はハード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

〒113-0033 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: 03-3815-1603

### 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 (JJJ) 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            | $\mu$ 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              | ジュール    |
| IgG       | immunoglobulin                                      | 電 荷                | クーロン    |
| I.P.      | intraperitoneal                                     | 電位差                | ボルト     |
| IPSP      | inhibitory postsynaptic potential                   | 電気抵抗               | オーム     |
| I.V.      | intravenous                                         | コンダクタンス            | シーメンス   |
| $K_m$     | Michaelis constant                                  | 電気容量               | ファラッド   |
| $Mg^{2+}$ | magnesium ion                                       | インダクタンス            | ヘンリー    |
| MAO       | monoamine oxidase                                   | 周波数                | ヘルツ     |
| mRNA      | messenger ribonucleic acid                          | 力                  | ニュートン   |
| NMDA      | N-methyl-D-aspartate                                | 照 度                | ルクス     |
| PAGE      | polyacrylamide gel electrophoresis                  | 照 度                | ルーメン    |
| RNA       | ribonucleic acid                                    | 磁 力                | ウェーバー   |
| SD        | standard deviation                                  | magnetic induction | テスラ     |
| SDS       | sodium dodecyl sulfate                              | モル濃度               | モラー     |
| SE        | standard error of mean                              | molecular weight   | mol     |
| tRNA      | transfer ribonucleic acid                           | 分子量                | ダルトン    |
| Tris      | tris (hydroxymethyl) aminomethane                   | 圧                  | パスカル    |
| TTX       | tetrodotoxin                                        | power              | ワット     |
| UV        | ultraviolet                                         | radioactivity      | ベケレル    |
|           |                                                     | 音 圧                | デシベル    |
|           |                                                     |                    | dB      |

Table 2. 単 位

| 物 理 量 | 単 位 名  | 記 号     |
|-------|--------|---------|
| 面 積   | 平方メートル | $m^2$   |
| 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  | $\mu$ s |
| 容 積   | リットル   | l       |
| 重 量   | グラム    | g       |

倍 数

| 倍 数  | 記 号   | 数 値        |
|------|-------|------------|
| 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・医療に応用され、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充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、本指針にのっとって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.

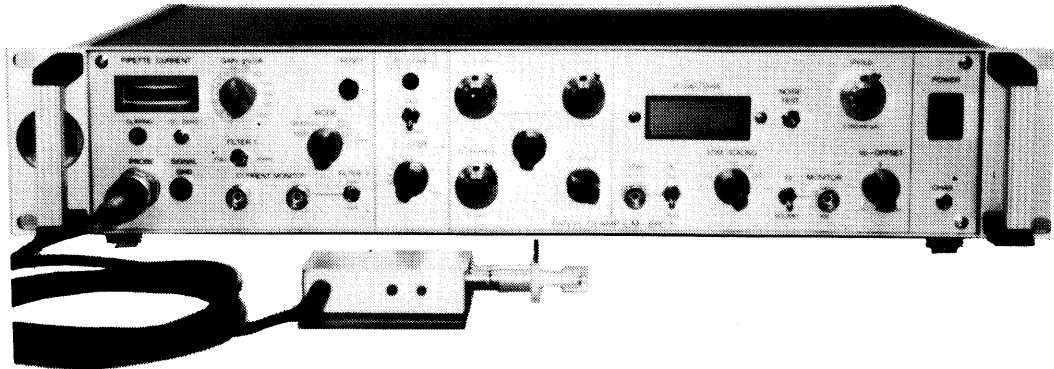
## II. Specific Recommendations

- (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

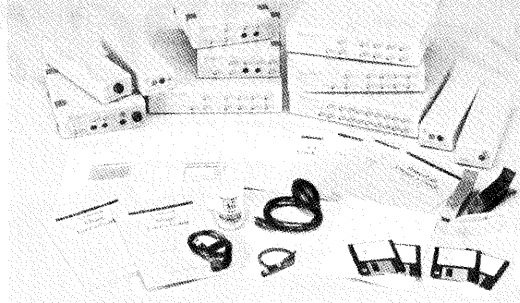
〒101-0047 東京都千代田区内神田2丁目6番11号 若松ビル2F  
TEL (03) 3258-1641 (代)

データ収録・解析システム

MacLabから

## PowerLabへ

名称が変更になりました!



PowerLabファミリー

## &lt;標準PowerLab Eシリーズ&gt;

PowerLab/200 標準 2ch入力  
 PowerLab/400 標準 4ch入力  
 PowerLab/800 標準 8ch入力

| PowerLab Eシリーズのサンプリング速度 |          |       |       |
|-------------------------|----------|-------|-------|
| 使用チャンネル数                | 最大サンプリング | Scope | Chart |
| 1                       | 100KHz   | ○     | バースト  |
| 2                       | 40KHz    | ○     | —     |
| 4                       | 1KHz     | ○     | 連続    |
| 8                       | 1KHz     | —     | 連続    |

## &lt;高速PowerLab Sシリーズ&gt;

PowerLab/4s 高速 4ch入力 PowerLab/8s 高速8ch入力  
 PowerLab/16s 高速 16ch入力

| 使用チャンネル数 | 最大サンプリング | Scope | Chart |
|----------|----------|-------|-------|
| 1        | 100KHz   | ○     | 連続    |
| 2        | 40KHz    | ○     | 連続    |
| 3        | 20KHz    | —     | 連続    |
| 4        | 20KHz    | —     | 連続    |
| 5        | 10KHz    | —     | 連続    |
| 6        | 10KHz    | —     | 連続    |
| 7        | 10KHz    | —     | 連続    |
| 8        | 10KHz    | —     | 連続    |

注：20KHzは、チャートスピード1,000cm/秒に相当します。

## ON-LINE FUNCTIONS

|             |                  |
|-------------|------------------|
| Raw data    | Cyclic Maximum   |
| Ratemeter   | Envelope Minimum |
| Frequency   | Envelope Maximum |
| Counter     | Differential     |
| Cyclic Mean | Integral         |

## OFF-LINE EXTENSIONS

|                      |
|----------------------|
| Arithmetic Functions |
| Normalise            |
| Differential         |
| Events               |
| Cyclic Variables     |
| Peak Histogram       |
| In Preparation       |
| Dose Response Suite  |
| Hemodynamics Suite   |
| Cardiology Suite     |

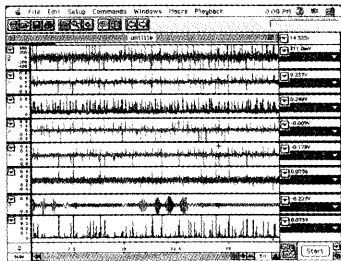
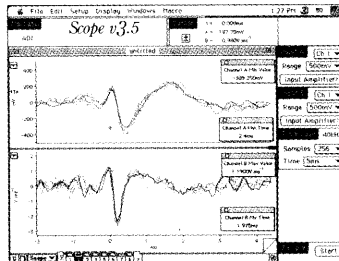
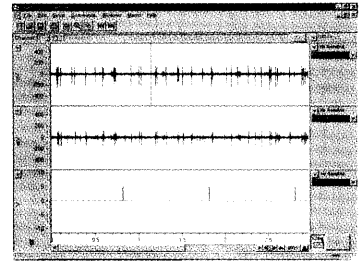
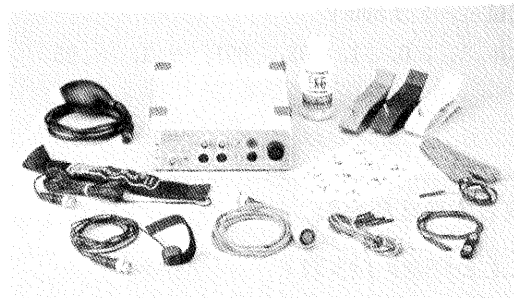
Chart  
マルチチャンネルチャートレコーダScope  
デジタルオシロスコープChart for Windows  
マルチチャンネルチャートレコーダ

Chart for Windowsのユーザには1年間の無償バージョンアップサービスが受けられますので、必ずユーザ登録して下さい。  
 その間にMac版Chart & Scopeと同等の機能にアップグレードします。

PowerLab/410  
基礎医学実習システム

PowerLab/410には2chのバイオアンプ、2chのブリッジアンプ、1chの刺激アイソレータを組み込まれた記録装置です。

特に基礎医学系の学生実習用として大変経済的で機能的なパッケージです。  
 ●トランスジューサ入力2ch●刺激アイソレータ出力1ch●ECG、EEG、EMG等バイオアンプ入力2ch●生体実習マニュアルが付いたPowerLab/リソースキットを発売中



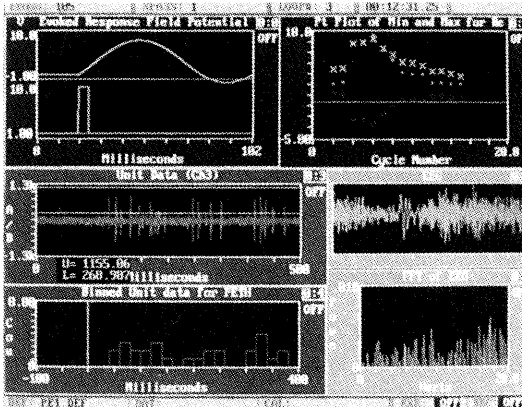
## BRC バイオリサーチセンター株式会社

本社 〒461-0001 名古屋市長区泉二丁目28番24号コタビル  
 TEL (052)-932-6421 FAX (052)-932-6755  
 東京支店 〒101-0032 東京都千代田区岩本町二丁目10番1号オカジマビル  
 TEL (03)-3861-7021 FAX (03)-3861-7022  
 東京第二営業所 〒286-0134 千葉県成田市東和田555番地5  
 TEL (0476)-20-1766 FAX (0476)-22-8625  
 E-mail: brc@po.ijnet.or.jp http://www.adi-japan.com/brc

# WorkBench & Discovery

## 生体シグナルリアルタイム解析装置

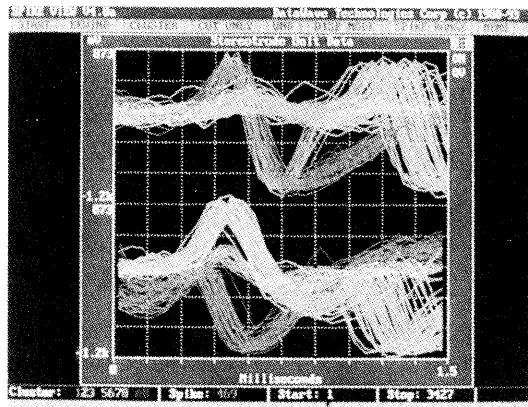
すべての作業を完全に自動化



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



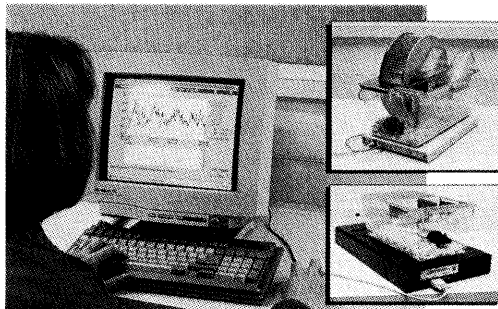
ディスクパリティは、多種多様のスパイクが含まれるアナログ信号から、あるパターンを持つスパイクのみを取り出したり、数種類のスパイクパターンに分類（クラスターカッティング）したりする、スパイク信号解析専用に開発されたシステムです。

E-ミッターは電池を使用しませんので、半永久的に使用できます!

## VitalView 小動物用テレメータシステム

マウス・ラット用心拍・体温・運動量測定用テレメータ

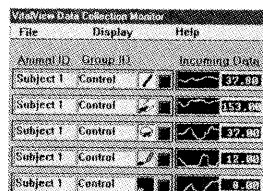
VitalViewデータ収録システムは同時に24チャンネルのテレメータ受信入力データをオンラインディスプレイします。マウス操作で個々のチャンネルデータをフォーカスできます。4000シリーズE-Mitterは、従来のテレメータの概念を打ち破る画期的なシリーズです。この革命的なデータ送信装置には電池が必要ありません。アニマルケージの下に設置したER-4000励起レーザーバから、送信に必要なパワーを送信部に常時供給します。



<VitalView 4000・3000シリーズ・テレメータシステム>

<VitalViewの便利さ>

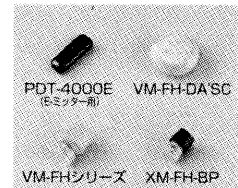
- セットアップや構成が簡単です。
- アーチファクトリーで信頼性の高いデータが得られます。
- E-Mitterシリーズは煩雑な電池交換がありません。
- オンラインでデータ処理しディスプレイします。
- 機能的で汎用性の高いデータ収録システムです。



<VitalViewメインウィンドウ>

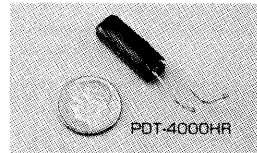
近日中にマウス・ラットの心電測定が可能、E-ミッターがそろいます。詳細は弊社「小動物用テレメータシステムカタログ」をご請求下さい。

<3000シリーズ用>



<各種送信器>

New! 心拍・体温・運動量測定用E-ミッター



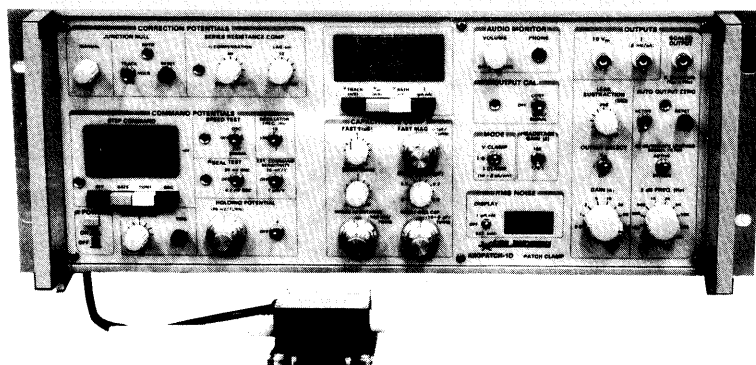
- E-ミッターシリーズ送信器
- PDT-4000E (体温・運動量用)  
サイズ: 22.1×8.2×5.3mm  
重さ: 1.5g
  - PDT-4000HR (心拍数・体温・運動量用)  
サイズ: 22.1×8.2×6.3mm  
重さ: 1.8g



バイオリサーチセンター株式会社

本社 〒461-0001 名古屋市中区東2丁目28番24号 (ヨコタビル4F) TEL (052) 932-6421 FAX (052) 932-6755  
東京 〒101-0032 東京都千代田区岩本町2-10-1 (オカジマビル) TEL (03) 3861-7021 FAX (03) 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 G $\Omega$ と500 M $\Omega$ 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 G $\Omega$ と50 M $\Omega$ 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 G $\Omega$ と50 M $\Omega$ 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 / 〒461-0004 名古屋市中区東一丁目25番1号  
TEL (052)937-7060代 FAX (052)937-5423  
TLX 444-3603 WDMC J

東京支社 / 〒157-0063 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1102号  
TEL (03)5384-6387 FAX (03)5384-6487

東日本地区発売元

(Physio-Tech)

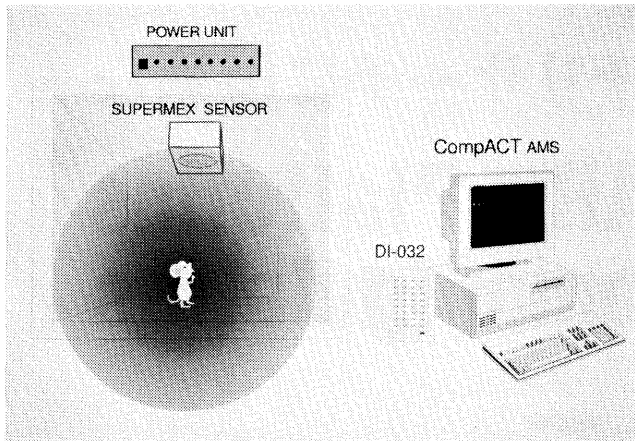
株式会社 フィジオテック

〒101-0047 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

ローコスト・マルチチャンネル型  
自発運動量測定システム

# SUPERMEX<sup>®</sup>

スーパーメックス PAT. P



- 小動物(マウス、ラット、マーモセット等)から大動物(イヌ、サル、ブタ)まで自発運動量を測定することが出来ます。
  - お手持ちの飼育ケージ、ラック用ケージ、代謝ケージ等を使用することができます。
  - マイクロダイアリシスやテレメータ測定等との並行測定を行なうこともできます。
  - 感度調整等の煩わしい操作は不要です。
  - 従来の自発運動量測定装置に比べ少ない予算で多チャンネルのシステム構成が可能です。  
(価格例: 4chシステム ¥1,500,000  
8chシステム ¥2,100,000)
  - 標準付属品のインターフェースで32ch、オプションで最大80chまでのデータを集録し、付属の運動量解析プログラムCompACT AMS及び周期計算プログラム(オプション)にてデータの集録、解析を行なうことができます。
  - 測定場所から離れた所でデータ集録を行なうことも可能です。
  - 増設は簡単にでき、費用も安価です。
  - 自発運動量に飲水量を加えた測定システムも用意されております。
- ★特許出願済みにつき粗悪な類似品には充分ご注意下さい。

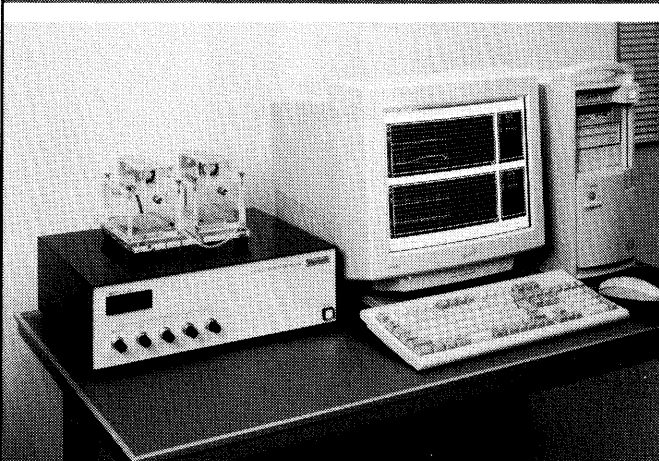
**Muromachi**

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(6302)1277 FAX 06(6302)5026  
URL : <http://www.muromachi.com>

## 小動物用代謝計測システム MODEL MK-5000



本システムは、エアータイトチャンバーを用いた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。
- チャンバ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。
- 各チャンバ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

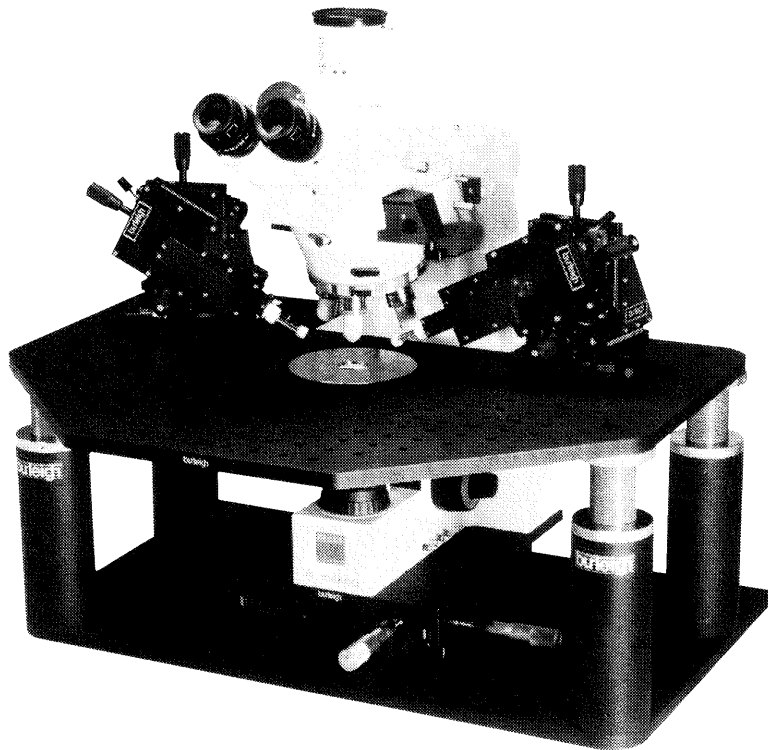
**室町機械株式会社**

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(6302)1277 FAX 06(6302)5026  
URL : <http://www.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:  
**ショーシン EM 株式会社**

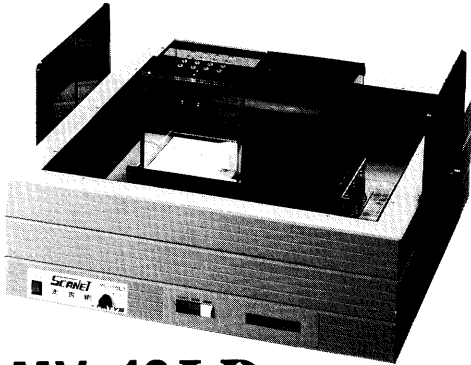
〒444-02 愛知県岡崎市赤浜町蔵西1番地14  
Tel.0564-54-1231 Fax.0564-54-3207

# 小動物行動測定の世界

# SCANETのTOYO

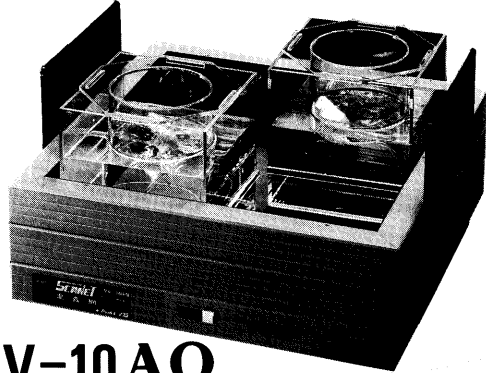
《スキャネットシリーズ》

● 薬物依存測定



**MV-10LD**

● 抗うつスクリーニング測定



**MV-10AQ**

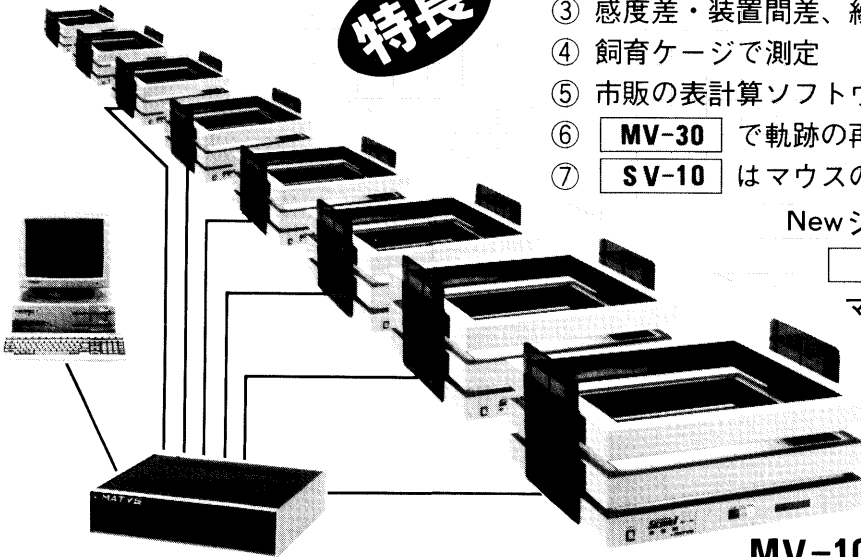
**特長**

- 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 / 〒930-0281 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) 6309-1231 ・ FAX (06) 6309-1250

# 新鮮切片作製装置

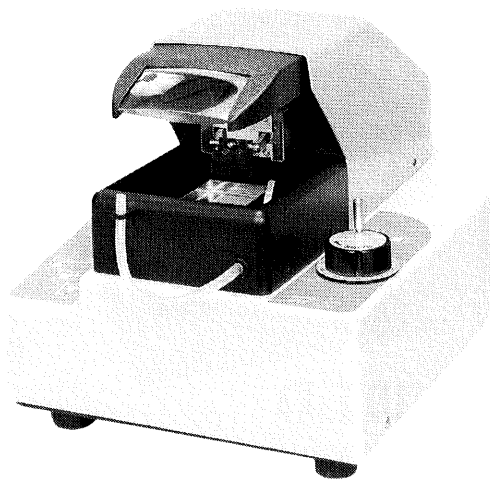
NEW

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耐久性を高めました。
- 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・ルーベ付                |
| 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 京都市左京区静市市原町1032-3  
TEL. 075-741-3069 FAX. 075-741-3026

# ThermoPlate

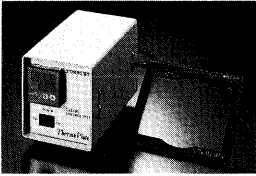
MATS-Uシリーズ  
サーモプレート MATSシリーズ PAT.P  
**TOKAI HIT**

## 顕微鏡ステージ自動温度制御システム

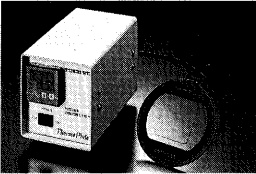
更なる品質・性能の向上を目指し「**UL規格取得・CE適合シリーズ：MATS-Uシリーズ**」を拡充  
豊富なラインアップでバイオテクノロジーをサポートします。

### MATS-Uシリーズ：UL規格・CEマーク適合

温度設定(室温~50℃)



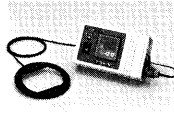
型式：MATS-U55S  
汎用タイプのプレート  
Sタイプ(平型フラット)  
をワールドワイドなコ  
ントローラーで制御す  
るUL規格・CEマーク  
適合機種。



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・ハイクレド・ノイズレス

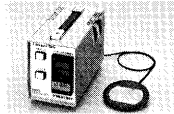
温度設定(室温~50℃)



スタンダード(温度精度:±0.3℃)  
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。



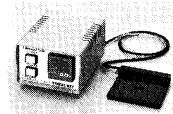
ハイクレド(温度精度:±0.1℃)  
シリーズレギュレーター方式電源  
により連続的な温度制御を行う高  
精度なコントローラー。  
プレートは倒立・正立顕微鏡用と各  
種取り揃えています。



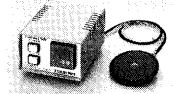
ノイズレス(温度精度:±0.1℃)シ  
ールド機構を組み合わせることにより、  
ノイズを軽減した直流タイプの高  
精度なタイプ。  
パッチクランプ・膜電位測定時の検  
体の温度管理に。

### 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

# パーソナルコンピュータベースの研究システム 基礎医学研究用システム

Biomedical Research System / **LEG-1000**

多岐にわたる基礎医学の研究に、  
先進の技術でデータ収集・処理・解析・レポートの  
作成までをトータルにサポートする、  
パーソナルコンピュータベースの  
研究用システムです。

## フレキシブルなシステム構成

各種ケーブル・プラグインタイプの小型ヘッドアンプ・システム本体・アナライザで構成されています。またソフトウェアで用意された各種VI（仮想計測器）とカスタマイズ機能により、実験目的に合わせたシステム構築に柔軟に対応します。

## 高精度ヘッドアンプ・ケーブル群

アイソレーション方式を採用し、電気的安全性が大幅に向上、デジタル化により外部雑音除去能力も向上。

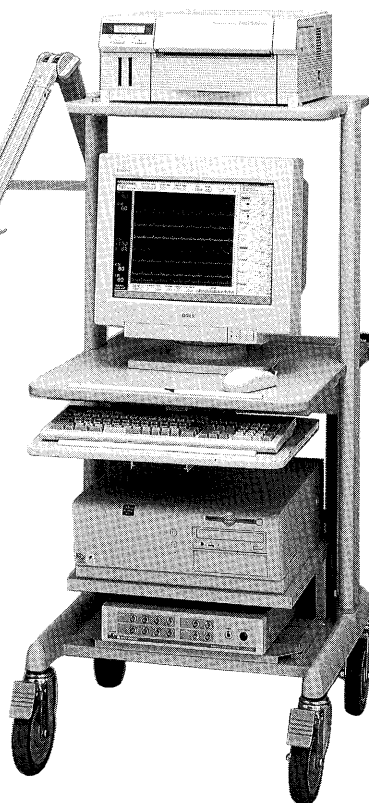
## ノートタイプ、デスクトップタイプのパーソナルコンピュータから選択。

動作環境は MS Windows95、測定データの解析・データファイル・レポート作成が容易。

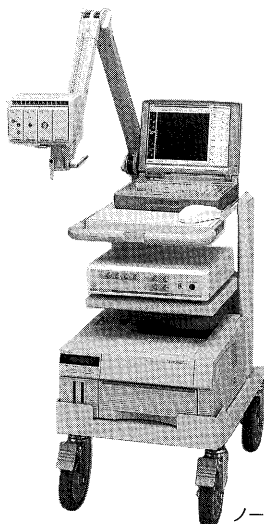
アンプはソフトウェアで管理、長期間安心してご使用いただけます。

16チャンネルまでの信号の同時計測・処理が可能。

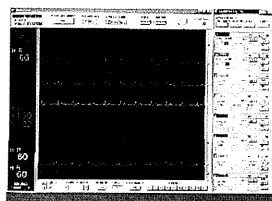
ポリグラフ等、既存装置からのアナログ信号の取り込みが可能。



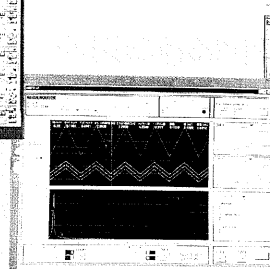
デスクトップ型パソコン構成



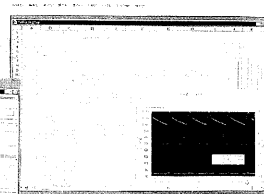
ノート型パソコン構成



POLY計測画面



VC計測画面



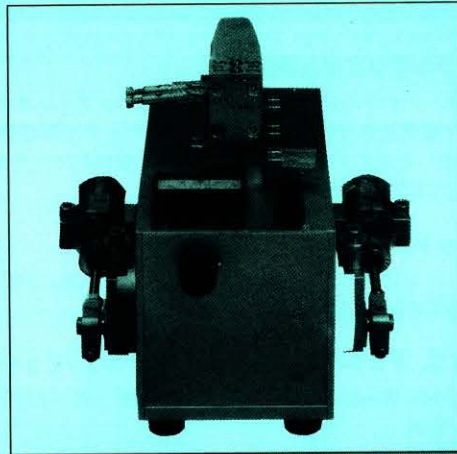
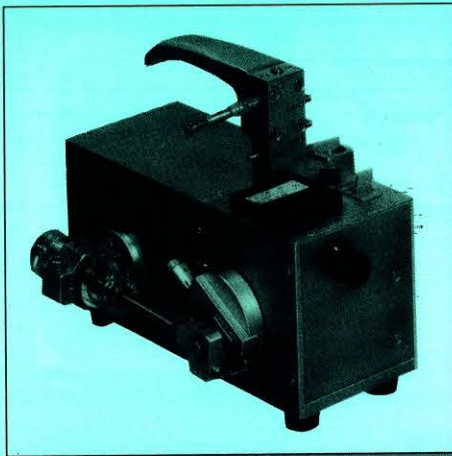
エクセル画面

**日本光電**

〒161-8560 東京都新宿区西落合1-31-4  
☎03(5996)8028

カタログをご希望の方は当社までご請求下さい。

# KN-55 KN式 小動物人工呼吸器



## 特長

- 従来のものより小型でコンパクトに設計された呼吸器です。
- スピードコントロールモーターの採用で呼吸回数は、無段階に連続可変が行なえます。
- タイミング弁の採用で、呼吸気量を正確に設定できます。
- 4種類のシリンダーを交換することにより、呼吸気量を更に精密に設定できます。  
(標準器には希望シリンダー1本付、他はオプション)
- シリンダーが1連式と2連式の2機種があります。

## 仕様

| シリンダーサイズ | 内寸×長さ     | 容量     |
|----------|-----------|--------|
| L        | φ24×L57mm | 約25ml用 |
| M        | φ20×L57mm | 約17ml用 |
| S        | φ14×L57mm | 約8ml用  |
| SS       | φ10×L57mm | 約4ml用  |

## 本体寸法

W95×D215×H120mm

※実用容量はストローク20mmですので異なります。

理化学器械・基礎医学器械・実験動物飼育機械器具・薬学研究器械・医科器械一般



株式会社 夏目製作所

〒113-8551 東京都文京区湯島2丁目18番6号  
 電話 03(3813)3251 FAX 03(3815)2002  
 千里技術開発室(千里ライフサイエンスセンタービル11F)  
 〒565-0082 大阪府豊中市新千里東町1-4-2  
 電話 06(6873)3251 FAX 06(6873)2045

編集兼  
発行人

金子章道  
東京都文京区本郷三丁目一〇  
布施ビル(四階)  
日本生理学会

印刷者  
印刷所

平田正  
山形県鶴岡市山王町一四一四  
鶴岡印刷株式会社

発行所

日本生理学会  
〒113-0028 東京都文京区本郷三丁目一〇  
布施ビル(四階)

電話

替A X 話

替〇〇〇

〇〇〇

〇〇〇

〇〇〇

〇〇〇

〇〇〇

〇〇〇

〇〇〇

〇〇〇

〇〇〇

〇〇〇

〇〇〇