

日本

生理学

雑誌

JOURNAL OF THE PHYSIOLOGICAL SOCIETY OF JAPAN

61巻

4号

1999

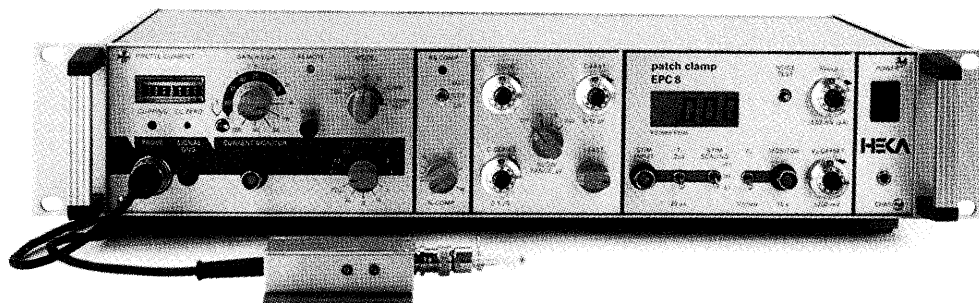
〔巻頭言〕 丹治 順：考える楽しさ.....	85
<i>INFORMATION</i>	87
<i>CALENDAR</i>	89
<i>RECORDS</i>	90
<i>PROFILE</i>	91
総 説	
神野耕太郎・佐藤容子・佐藤勝重・持田 啓 膜電位感受性色素をもちいた計測を解析法.....	94
実験技術法講座	
シリーズ「生理学者のための分子モニタリング技術講座」	
高田明和：生理学者のための分子モニタリング技術講座の連載にあたって.....	135
松田博史：SPECT による脳循環動態および神経伝達機能測定	137
中田 力：fMRI：実践のための基礎知識	155
学会抄録	
第31回東北生理談話会.....	169
第234回生理学東京談話会	177
第50回日本生理学会中国四国地方会.....	181
第49回西日本生理学会.....	189

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

## 目 次

|                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------|-----|
| 〔巻頭言〕 考える楽しさ(東北大学医学部生体システム生理 丹治 順).....                                    | 85  |
| <b>INFORMATION</b>                                                         |     |
| 第16回バイオメカニズム・シンポジウム参加要領.....                                               | 87  |
| 平成11年度第10回生理学研究所生理科学実験技術トレーニングコース<br>“生態機能の解明に向けて” ー分子・細胞レベルからシステムまでー..... | 88  |
| <b>CALENDAR</b>                                                            |     |
| 主な学会開催日程.....                                                              | 89  |
| <b>RECORDS</b>                                                             |     |
| 会員消息.....                                                                  | 90  |
| <b>PROFILE</b>                                                             |     |
| 「生理学者群像」(當瀬規嗣).....                                                        | 91  |
| (田中光一).....                                                                | 93  |
| <b>総 説</b>                                                                 |     |
| 神野耕太郎・佐藤容子・佐藤勝重・持田 啓：<br>膜電位感受性色素をもちいた計測と解析法.....                          | 95  |
| <b>実験技術講座</b>                                                              |     |
| シリーズ「生理学者のための分子モニタリング技術講座」                                                 |     |
| 高田明和：生理学者のための分子モニタリング技術講座の連載にあたって.....                                     | 135 |
| 松田博史：SPECTによる脳循環動態および神経伝達機能測定.....                                         | 137 |
| 中田 力：fMRI：実践のための基礎知識.....                                                  | 155 |
| <b>学会抄録</b>                                                                |     |
| 第31回 東北生理談話会.....                                                          | 169 |
| 第234回 生理学東京談話会.....                                                        | 177 |
| 第50回 日本生理学会中国四国地方会.....                                                    | 181 |
| 第49回 西日本生理学会.....                                                          | 189 |

## 巻頭言

## 考える楽しさ

東北大学医学部生体システム生理  
丹 治 順

少しばかり趣向を変えて、「生理学者群像」という観点から話を進めてみようと思う。私にとって忘れられない「生理学者」の記憶痕跡として、二つご紹介したい。イギリスの某大学生理学教室の、高名なM教授にお会いしたとき、まず驚かされたのは、頭脳の明晰さである。著書を読んで感じていた論理構成の完璧さと美しさから、並外れた知力を想定してはいたものの、いざお会いしてみると、研究の深さと、会話のなかにほとぼしり出る知性に、あらためて感動せざるを得なかった。M教授の論文が一点非のうちどころが無い理由も自明であった。ところがいざ研究室を見せていただいたとき、その古風なことに驚きを禁じ得なかった。およそ現代風の利器といえる装備・器具が無く、古ぼけた脳脊髄固定装置と実験器具が並んでいるのみであった。これで充分研究ができるし、コンピューターなどは不要とおっしゃるM教授の説明には納得しても、研究室の狭く寒々とした光景はあまりにも寂しかった。最も気になったのは、若手研究者が見当たらないことで、ここしばらく大学院生などはいないということであった。絞り込んだ研究テーマから離れようとせず、すでに確立された手法で、あくまでも完全を期する研究者としての姿勢に頭が下がる思いではあったが、その挙げ句、研究の後を継ごうとする若者が絶えてしまった現実に限りない哀惜を感じながら、このうえもなく典雅なキャンパスをあとにした。

もう一つの記憶は、J. Neurophysiology の編集者会議に際しての体験である。最近 Impact Factor が低落傾向にある。この傾向に歯止めをかける方法は無いものか。Impact Factor なるものは、単なる1企業が2年間という極めて安易な調査で論文引用の尺度として公表しているもので、へんばな情報でしかない。しかしそれがここまで広まってしまい、利用(悪用)されてしまうと、放置できないではないか。それならば Impact Factor が上がる人工的方策を考えて、逆用を計るのも悪くはなからう。そのための具体策はいくつもある。そんな議論が行われていた。しかし複数のメンバーから異論が出された。特にG教授のコメントは強烈であった。Impact Factor が低くなろうと、それを問題にする方がおかしい。掲載論文自体の価値を見ぬくこともできず、小児的な発想で Impact Factor の数字いじりによって問題を処理しようなどという者は学者ではない。そのような人種を相手にする必要などあろうか。そもそも J. Neurophysiology は長期的な展望のもとに系統的な研究を行い、その成果をもとに新たな学説を提唱するような論文を扱うので、論文の Turnover Cycle は長いのが当然であり、その評価が確立するのに数年を要するのが通例である。つまり Impact Factor などは超越した価値を持つ論文を掲載することがこの雑誌の使命である。その発言の迫力で、人工的方策の話は沙汰やみとなった。

生理学とは何かという問いの答えには、「…の機序を追求する」、「…のはたらきを考える」という表現が多いことからしても、生理学は“考える”学問であり、知恵の学問といつてよからう。多くの先人達は生命現象を見つめ、多様な手法で生命の現場に立ち入り、“どうしてなのか”と問い続けてきた。そして生理学者の多くは、考えることを確かに楽しんできた。しかしその反面、生理学者は一般に、自らの属するコミュニティや研究環境の改善・発展について、“知恵”を働かせることに消極的であり過ぎたのではなからうか。平たく言えば、研究ポジションの確保や研究費の拡充、もっと大事なことは若手研究者の参入促進への努力を軽視する傾向は無かっただらうか。ある時、若者の多く集まるセミナーで「生理学者の印象を表現すると？」と問うてみたところ、「まじめ、慎重、正統的、論理的」という反面、「保守的、批判的、懐疑的、消極的、暗い」というものや、「お高くとまっている」等という答えもあった。これから医学・生物学の研究を志そうという若者たちにとって、生理学者群像の与える印象がネガティブであったとすれば、是非ポジティブに変えたいものである。

これは言い尽された感があるが、生理学研究の手段と可能性が今ほど急拡大した時代は無からう。テクノロジーの進展とコンピューター利用の普及に加え、分子生物学の発展は、いままで夢にも思わなかった(あるいは今までは夢に過ぎなかった)研究を一挙に可能にしてしまった。筆者の属する脳の高次機能を知ろうとする研究分野についても、技術革新とコンピューター導入の次には分子生物学的技術の利用が盛んに行われる気運が見えている。たとえば局所的・要素的機能脱落法として、リセプターアゴニスト・アンタゴニストの利用は重宝であるが、やがて遺伝子工学的技術の導入も本格化しそうである。Anti-sense ablation や遺伝子組み替えウイルスによる特異的機能脱失法、あるいはロックアウト動物の応用等も、現状では中枢性機能研究については問題が多いとはいえ、まもなく問題点を克服する技術と知恵が生まれよう。大切なことは、生理学者はそのような挑戦的な研究の欠陥をあげつらい、論理的に稚拙であるなどといって冷ややかに傍観するのではなく、むしろ共同研究者として積極的に参加し、使い物になる技術に仕上げることに貢献することではなからうか。

生理学者の特技は機能を考えることにある。単にどこに何があるかという、物質の同定だけを目指す、いわゆる“物取り”的研究には、生理学者は満足しない。そのような研究は、ゲームにたとえれば、詰め将棋の世界である。生理学者はむしろ全局を見通しながら、一手ずつを進め、その意味を考えようとする。そのような生理学者こそ、最近ますます急進展する分子生物学的研究の知見を把握し、統合することによって、複雑な生命体の機能を理解する研究の新たな方向を先導する適役者ではなからうか。新しい道具と戦略がこれほどまでにそろってきたいま、それらを使って意味のある作戦に仕上げる知将が必要である。それが、これからの生理学者の分担すべき役割ではなからうか。次世代の生理学者には、広い研究分野の理解のうえに多領域が参加する共同研究の主役を勤めながら、考えることを楽しむように望みたいものである。その実現のためになすべきことがいかに多くはあっても。

# INFORMATION

## 第16回バイオメカニズム・シンポジウム参加要領

開催日：1999年8月3日(火) 午後1時受付開始，  
午後1時30分演題開始予定  
～5日(木) 正午終了予定，昼食  
後，現地解散

開催場所：ホテルタングラム 長野県上水内郡信濃  
町古海 鉄道：JR信越本線・妙高高原  
駅よりバスで約10分 車：上信越自動車  
道・妙高高原ICより約20分。

夜話：未定

登録料：正会員14,000円 学生8,000円

予稿集：登録料には予稿集代が含まれています。

予稿集のみの代金は6,000円です。

希望者は当日受付またはシンポジウム事  
務局までお申し込み下さい。発送の場合  
は送料込みで6,500円です。

宿泊料：2泊6食 1人/部屋 42,000円  
2人/部屋 36,000円  
4人/部屋 32,000円

(4人部屋は少々狭く感じられるかも知れません)

申込締切：6月30日

申込方法：申込書に記入し，下記シンポジウム事務  
局宛に郵送，もしくはFAXにてお申し  
込み下さい。また申込書送付後，なるべ  
く早い時期に登録料，宿泊料等の合計金  
額を下記口座宛にお振り込み下さい。シ  
ンポジウム当日のお支払いには応じられ  
ませんので，あらかじめご了承下さい。

申込先：第16回バイオメカニズム・シンポジウム  
事務局

〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1  
東京大学大学院理学系研究科人類学教室内  
木村 賛 ☎ 03-3812-2111 内線 4490  
FAX 03-3818-7547

問合せ先：〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1  
東京大学大学院理学系研究科人類学教室内  
☎ 03-3812-2111 内線 4490  
FAX 03-3818-7547

木村 賛，上田 裕，荻上真理

または

〒113-0015 東京都板橋区栄町35-2  
東京都老人総合研究所運動機能部門  
☎ 03-3964-3241 内線 2476 or 3130  
FAX 03-3579-4776

西澤 哲(nisizawa@center.tmig.or.jp：  
つながらない場合はcenterを省いて再  
度お送り下さい)

ホームページ：[http://www.biol.s.u-tokyo.ac.  
jp/anthro/seitaikikou/biomech.html](http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/anthro/seitaikikou/biomech.html)

振込口座：郵便振替 00170-8-83876

第16回バイオメカニズム・シンポジウム  
事務局(・をお忘れなく！)

第16回バイオメカニズム・シンポジウム実行委員会  
木村 賛(委員長)，足立和隆，安倍希美，石田明允，  
江原義弘，河合俊宏，斉藤之男，菅野重樹，鈴木三  
夫，高橋秀雄，田中 繁，谷江和雄，福永哲夫，持  
丸正明，山崎信寿，西澤 哲(幹事)

## 平成11年度 第10回 生理学研究所 生理科学実験技術トレーニングコース

“生体機能の解明に向けて” 一分子・細胞レベルからシステムまで

日 時：平成11年8月2日(月)～6日(金)

場 所：岡崎国立共同研究機構生理学研究所

プログラム：

[講演] 平成11年8月2日(月) 13:00～

3日(火) 11:10

「神経科学の道具としての非侵襲的脳機能画像：機能的MRIとPET」

定藤規弘(生理学研究所)

「細胞間をシールする分子機構：新しい接着分子群クローディング」

月田承一郎(京都大学医学部)

「グルタミン酸受容体チャネルの分子構造と機能」

小澤 滯(群馬大学医学部)

[実習] 平成11年8月3日(火) 13:00～

6日(金) 15:00

テーマ

「連合学習の成立と遺伝子発現変化」

小幡邦彦(神経化学)

「生殖細胞活性時(受精時)のCa<sup>2+</sup>変化と画像解析」

毛利達磨(細胞内代謝)

「パッチクランプ及びデータ解析法」

山岸俊一, 岡田泰伸(生体膜, 機能協関)

「1. 脳内N-結合型糖鎖発現パターンの解析

2. 脳神経系の各種初代培養法と遺伝子導入法」

池 中 一 裕(神経情報)

「組み換え発現系を用いたイオンチャネル活性測定」

井本敬二(液性情報)

「ジーンターゲット法」

八木 健(高次神経機構)

「電気生理学及び心理物理学的手法による視覚メカニズムの解析」

小松英彦(高次神経性調節)

「神経ネットワークの標識・同定」

松山清治(生体システム)

「スライスパッチ法」

伊佐 正, 重本隆一(高次脳機能, 脳形態解析)

「免疫電顕法による受容体局在の解析」

重本隆一(脳形態解析)

「ホールセル記録と細胞内染色」

川口泰雄(大脳神経回路論)

「脳機能画像の統計処理」

定藤規弘(心理生理学)

「医学生物学用超高圧電子顕微鏡操作実習」

有井達夫(形態情報解析)

「脳磁図を用いたヒト脳機能の研究」

柿木隆介(感覚・運動機能)

「霊長類眼球運動の記録解析法」

伊佐 正(高次脳機能)

内容についてはホームページをご覧ください。

募集人員：約90名

受講料：9,500円

対象：学部学生, 大学院生(修士・博士), 若手研究者(Postdoctoral fellow 含む)

宿泊は個室ロジまたはホテルを手配いたします。

申込方法：ホームページ, E-mail または FAX にて募集要項を申請してください。

募集締切：6月12日(土)

連絡先：〒444-8585 岡崎市明大寺町西郷中38

生理学研究所 神経情報部門 池 中 一 裕

FAX：0564-55-7843

TEL：0564-55-7840

E-mail：training@nips.ac.jp

HomePage:http://www.nips.ac.jp/

主 催：岡崎国立共同研究機構 生理学研究所

共 催：日本生理学会・日本神経科学学会

## 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. 5. 8      | 第15回臨床神経生理学東京談話会                                                               | 東京：東大山上会館                       | 都精神研 精神生理 橋本<br>☎03-3304-5701 FAX：03-3329-8035<br>E-mail：ihashi@prit.go.jp                                                                            |
| 99. 5.13-14   | 日本膜学会第21年会                                                                     | 東京：日本膜学会長井記念館                   | 日本膜学会事務局<br>☎03-3815-2818<br>FAX：03-3815-2818                                                                                                         |
| 99. 5.19-21   | GSSI-Sports Science Net Work Forum in Nagano 1999 ～スポーツ医科学の新しい研究パラダイムの確立をめざして～ | 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：sakaiaak@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コファレンスセンター         | 生理研 統合生理研究施設 金桶<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 FAX：086-255-5090<br>E-mail：tokyo99@zoushoku.narc.affrc.go.jp<br>URL：http://www.ias.unu.edu/activities/tokyo99.htm |
| 99. 6. 5      | 第14回神経組織の成長・再生・移植研究会学術集会                                                       | 名古屋：名古屋市立大学 医学部教育棟11F           | 名市大 第二生理<br>☎052-853-8134 FAX：052-842-3069<br>E-mail：hitoo-n@med.nagoya-cu.ac.jp                                                                      |
| 99. 8. 3-5    | 第16回バイオメカニズム・シンポジウム                                                            | 長野：ホテルタングラム<br>(長野県上水内郡信濃町古海)   | 東大院理学系 人類学教室 木村<br>☎03-3812-2111(4490) FAX：03-3818-7547<br>URL：http://www.biol.s.u-tokyo.ac.jp/anthro/seitaikikou/biomech.html                        |
| 99. 8.24-28   | 第1回ナトリウム依存性輸送蛋白質およびイオンチャネルの調節と疾病に関する国際会議                                       | 静岡：静岡県コンベンションアーツセンター(Gran Ship) | 静岡県立大 薬 高木, 原田<br>☎054-264-5670 FAX：054-264-5672<br>E-mail：suketa@ys7.u-shizuoka-ken.ac.jp<br>URL：http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/icsdt           |
| 99. 8.22-25   | 第4回頭・頸部運動制御国際シンポジウム                                                            | 東京：東京医大 臨床講堂                    | JCS：日本コンベンションサービズ(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回ナトリウム依存性輸送蛋白質およびイオンチャネルの調節と疾病に関する国際会議)                         | 静岡：コンベンションアーツセンター               | 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                                                                   |

\* 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送りください。

## RECORDS

## 会 員 消 息

## &lt; 転 勤 ・ 異 動 &gt;

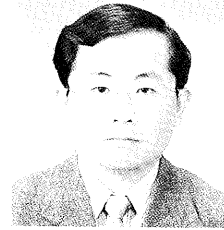
| 氏 名   | 勤 務 先 名 ・ 部 署 名                                                          | 勤 務 先 (TEL ・ FAX)                 | E-MAIL ADDRESS                  |
|-------|--------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| 石橋英俊  | 東邦大学 医学部 第一生理                                                            | 03-3762-4151(2335) ・ 03-3762-8148 | ishiba@med.toho-u.ac.jp         |
| 小林敏生  | 福島県立医科大学医学部 衛生学講座                                                        | 024-548-2111(2201) ・ 024-548-5765 | tkobaya@cc.fmu.ac.jp            |
| 佐々木 隆 | 熊本体力研究所                                                                  | 096-354-8111                      |                                 |
| 佐治真理  | 北里大学 医療衛生学部 生理学教室                                                        | 0427-78-8311 ・ 0427-78-8153       | saji@ahs.kitasato-u.ac.jp       |
| 坂口昌之  | THE ROCKEFELLER UNIVERSITY,<br>Laboratory of Cardiac/Membrane Physiology | 1-212-327(8617) ・ 1-212-327-7589  | sakagum@rockvax.rockefeller.edu |
| 須川 誠  | 中外製薬㈱中央研究所 育成研究センター                                                      | 03-3987-0607(397) ・ 03-3985-7079  | sugawamk@gt.chugai-pharm.co.jp  |
| 惣谷昌夫  | 愛媛大学 医学部附属病院 麻酔科蘇生科                                                      | 089-960-5383 ・ 089-960-5386       | soutani@anschutz.m.hime-u.ac.jp |
| 嶽本和久  | 国立岡崎共同研究機構生理学研究所<br>細胞内代謝研究部門                                            | 0564-55-7713                      |                                 |
| 田中育郎  | 自由が丘病院 食物栄養部                                                             | 096-338-3111(142) ・ 096-338-3123  |                                 |
| 田中健一  | 岡山大学 医学部 分子細胞医学研究施設<br>神経情報学部門                                           | 086-235-7410 ・ 086-235-7412       |                                 |
| 田中美智子 | 宮崎県立看護大学                                                                 | 0985-59-7711 ・ 0985-59-7711       | tanaka@mpu.ac.jp                |
| 田中勳作  | 東北文化学園 大学開学準備室                                                           | 022-233-3330(471) ・ 022-233-7941  | tanaka@tmin.ac.jp               |
| 田村徹太郎 | Universtiy of South Dakota<br>Dept of Anatomy and Stru                   |                                   | ttamura@usd.edu                 |
| 辻井洋一郎 | 名古屋大学 医学部 保健学科 理学療法専攻                                                    | 052-719-1346 ・ 052-719-1346       | yotsujii@met.nagoya-u.ac.jp     |
| 土屋勝彦  | 長崎大学 環境学科 自然環境保全講座                                                       | 095-843-1836 ・ 095-843-1836       | tsuchiya@net.nagasaki-u.ac.jp   |
| 坪川涼子  | 理科学研究所 脳科学総合研究センター<br>神経構築研究チーム                                          | 048-462-1111(6438) ・ 048-462-4698 |                                 |
| 殿広利之  | 三共(株)神経科学研究所                                                             | 03-3492-3131(3811) ・ 03-5436-8566 | tono-t@po.iijnet.or.jp          |
| 西池季隆  | 大阪府立 羽曳野病院                                                               | 0729-57-2121                      |                                 |
| 西岡伸子  | 桐生短期大学 看護学科                                                              | 0277-76-2400(510) ・ 0277-76-9454  | VFG07016@nifty.serve.or.jp      |
| 広瀬智道  | 日本医学技術専門学校                                                               | 0422-34-2161 ・ 0422-34-2165       | caino1@blue.ocn.ne.jp           |
| 福島真知世 | 二葉栄養専門学校                                                                 | 0422-21-1367                      | caino1@blue.ocn.ne.jp           |
| 古林俊晃  | 東京大学大学院 医学研究科 脳神経医学専攻<br>臨床神経精神医学講座                                      | 03-3815-5411(3790) ・ 03-5800-6548 | furubayaashi-ky@umin.ac.jp      |
| 堀 あいこ | 京都大学大学院 情報学研究科 知能情報学専攻<br>生体情報処理分野                                       | 075-753-3144                      | ahori@tom.life.h.kyoto-u.ac.jp  |
| 堀川順生  | 豊橋技術科学大学 知識情報工学系                                                         | 0532-44-6891 ・ 0532-44-6873       |                                 |
| 松村 潔  | 京都大学大学院 情報学研究科<br>知能情報学専攻 生体情報処理分野                                       | 075-753-3143 ・ 075-753-3143       | matsu@i.kyoto-u.ac.jp           |
| 村井恵良  | 熊本大学 医学部 第二薬理                                                            | 096-373-5082 ・ 096-373-5082       |                                 |
| 森田之大  | 聖隷クリストファー看護大学 生理学研究室                                                     | 053-439-1400                      | ymorita@jade.dti.ne.jp          |
| 小川 正  | 岡崎国立共同研究機構生理学研究所<br>高次神経性調節部門                                            | 0564-55-7864 ・ 0564-55-7865       | ogawat@nips.ac.jp               |
| 柿澤 昌  | 金沢大学 医学部 第二生理                                                            | 076-265-2172 ・ 076-234-4224       | sho@med.kanazawa-u.ac.jp        |
| 坂井信之  | 広島修道大学 人文科学研究科 心理学                                                       | 082-848-2121(2284)                | n-sakai@nsl.shudo-u.ac.jp       |
| 有賀豊彦  | 日本大学 生物資源科学部 農芸化学科                                                       | 03-3421-8121                      |                                 |

## PROFILE

「生理学者群像」

### 當 瀬 規 嗣 君

札幌医科大学医学部生理学第一講座  
平成10年10月1日就任



私は数学が大嫌いだった。物理学はいつも赤点ぎりぎりだった。英語は高校に入った途端に異次元の言語と化した。地道に公式を覚えたり、練習問題を解いたり、単語を暗記するような作業がとても鬱陶しかった。それにも増して、それを教師に強制されるのがとてもいやだった。だから、スポーツも大嫌い。でも、生物は好きだった。プランクトンを顕微鏡で観察するのが好きだった。放課後、理科教室が薄暗くなって顕微鏡が見られなくなるまで(光源のついた顕微鏡なんてなかった)、ただ、見つめていた。模型を作るのも大好きだった。一人で気ままに、でも、熱中して作っていく濃密な雰囲気が好きだった。でも、法則を覚えなければならないラジオ工作は大嫌いだった。試しに作ったゲルマニウムラジオは雑音すら出さなかった。そんな私が医学部へいく気になったのは、「お前なんか、手に職をつけなきゃ、のたれ死にする！」の元教師であった親父の一喝だった。確かに、このままではイカン。「このままじゃ、学校の先生ぐらいにしかなれんゾ!!」親父の次の言葉は決定的だった。それからの付け焼き刃では現役は無理。自由な時間がある浪人を経験して、ようやく大学に滑り込んだ。(試験当日に猛吹雪がこなかったら無理だったろう)

大学に入っても性根が変わるはずもなく、気ままに過ごした。数学は相変わらずで、いつも再々試。物理の毛利先生には迷惑をかけた。物理だけでも何とかしようとサークルに入ったが、合宿で飲んだことしか覚えていない。そんな、私が基礎医学を志したのは、偶然にも、ある教授の“イオンチャンネル”の講義を聴いたからだった。とにかく、不思議で、魅力的だった。イオンが膜を“滝が流れ落ちる”ように横切って行くという。生命現象が次々数式に還

元されてゆくのも驚きだった。数学、物理の真の意味を知った思いだった。もう、聴診器もメスも遠くにかすんでいった。「イオンチャンネルをやりたい」の一念でその教授、菅野盛夫先生(現、北海道大学大学院医学研究科情報薬理学講座)の講座の門をたたいてしまった。そして、「イオンチャンネルをやりたいなら、武者修行だ」との教授の強い勧めで、生理学研究所の入澤 宏教授(高次神経性調節部門)の研究室に約2年間、部屋住みとなったのだった。入澤先生には、研究者のあるべき姿と研究の真の面白さを見せていただいた。感動の日々だった。学位取得後、菅野教授の寛大な配慮で米国留学、そして生理学への完全転向とスムーズに運び、薮 英世教授(札幌医科大学医学部生理学第一講座、現、札幌医科大学名誉教授)のご指導で何とか生理学者らしくなってきたところだ。「発生期心筋のイオンチャンネルの機能と構造の解析」という現在のテーマは薮先生の全面的ご支援がなければ、スタートできなかった。

さて、私は学生達に対して、先生として教壇に立っている。なんという人生の皮肉であろうか。だからこそ、まず教育に対する抱負を、表明しなければならぬ。私は、教室であまり講義に積極的でない学生たちの気持ちは痛いほど分かる。それは、ひとえに講義が面白くないのである。しかし、興味を引く講義は聞こうと思っている。いや、面白い講義を熱望している。教授がこの潜在的な要求に答えられなければ、大学なんて意味がない。国家資格を得るためのモラトリアムの期間に墮してしまふ。面白い講義を語る能力は私にはまだないが、面白くない講義ならよくわかる。まず、聞き取りにくい講義。声の大きさではない。(マイクぐらいどこにでもある)何を

云いたいのか明らかでない講義である。曰く「胃の消化液は酸性です。つぎ、膵液はアルカリ性です。腸液は…」違いは判るが、何故違うか云わなければ、ただ暗記を強いるのに等しい。それから、ひたすら板書する講義。これでは、学生はただの速記者である。講義中に内容を理解する事は全く出来ない。理解できなければ、講義のあとで本を読んでも、講義を受けなくて本を読んでも、等価になる。講義の価値は見いだせない。そして、極めつけは用語、事項を羅列するのみで、暗記を要求する講義である。「丸暗記させるわけではない！」と反論する先生も多かったが、事項を羅列するなら、教科書の方がはるかに優秀だし、プリントでも配れば板書で汗を流す必要もない。第一、こういう講義は、結果的に丸暗記しなければ突破できない試験と連動しているからたちが悪い。丸暗記はコンピュータのRAMみたいなもので電源が落ちれば、何も残らない。

学生は、教師にゴキゲンをとってもらいたいのではない。興味を持てる面白い話を聞きたいのだ。教員にそれぞれの学問を語ってもらいたいのだ。だから、

底の浅いカリキュラム改革では、学生に見透かされる。大学が危機に陥ったのは、大学の根幹である学生に対する“講義”をないがしろにしたからだ。スモール・グループにしても、チュートリアルを導入しても、教育法を伝授しても、大学教員が教育を“雑用”とやっている限り、“講義が増えて忙しい”等と嘆いている限り、改善などしない。研究ばかりやっても、教育し後輩を育てなければその研究は死に絶えるのである。私は自分の研究がかわいい。研究の将来の生命を保証するため、講義に全力を注ぎ、学生と語らい、あわよくば、沢山の後輩を育てたいと考えている。

#### 略 歴

- |       |                       |
|-------|-----------------------|
| 昭和59年 | 北海道大学医学部卒業            |
| 昭和63年 | 北海道大学大学院医学研究科修了(医学博士) |
| 昭和63年 | 北海道大学助手(医学部第二薬理)      |
| 平成6年  | 札幌医科大学助教授(医学部第一生理)    |
| 平成10年 | 札幌医科大学教授(医学部第一生理)     |

## 「生理学者群像」

## 田 中 光 一 君

東京医科歯科大学難治疾患研究所分子神経科学  
平成10年9月1日就任



平成10年9月1日付で、東京医科歯科大学難治疾患研究所分子神経科学の教授に就任しました(前任者は角田名誉教授で、聴覚機能という名前でした)。私は、昭和59年に新潟大学医学部を卒業し、精神科教室に入局しました。精神科に入局して三ヶ月後、医局の先輩である古谷野先生(現京都大学医学部生理学講座講師)から佐賀医科大学でシナプス伝達の電気生理的研究をしてみないかと誘われ昭和59年9月から佐賀医科大学生理学講座助手として久場教授(現名古屋大学生理学講座教授)のもとで、シナプス伝達・イオンチャネルの電気生理学的研究を行いました。この研究の過程で、イオンチャネルの分子の実体解明が必要であると思ひ、昭和61年に新潟大学医学部大学院に入学し、脳研究所神経化学部門の佐武教授のもとで、イオンチャネルの生化学的研究を行いました。当時、イオンチャネルや神経伝達物質の分子の実体は、京都大学の沼教授・中西教授のグループにより次々に明らかにされつつあり、その成功の原動力は分子生物学の導入にありました。そこで、大学院3年生後半から卒業までは京都大学医学部免疫研究施設の中西教授のもとで、分子生物学を学び、神経伝達物質受容体(サブスタンスP及びニューロテンシン受容体)の分子の実体解明に成功しました。当時の中西研究室は、イオンチャネル・神経物質受容体の単離に関してはまさに世界のメッカであり、日々でてくるデータが世界をリードする結果であり、非常に充実した研究生活でした。大学院修了後、平成2年4月から理化学研究所国際フロンティア思考ネットワーク研究チーム(伊藤正男チームリーダー、現理研脳科学研究所所長)で、基礎科学特別研究員として勤務し、脳にとって重要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の濃度制御に大切なグルタミン酸トランスポーターの単離に成

功し、平成5年6月から国立精神神経センター神経研究所疾病研究第四部室長として赴任し、現在に至っております。卒業後、一貫して神経科学領域の基礎研究を続けてきました。神経科学の研究は、学際的で電気生理学・生化学・分子生物学・発生工学・心理学すべてを用いた統合的アプローチが必要です。私は幸いにして各分野の一流の先生から教えることができました。この7年間(理化学研究所以降)はグルタミン酸トランスポーターに着目し、ボトムアップ方式のアプローチで、その単離や分布・薬理学的特性の解析から、欠損マウスを用いた個体レベルにおける機能を研究してきました。今後は、トップダウン方式のアプローチも取り入れ、現代科学最大の謎である脳機能の解明に全力を尽くしたいと考えています。

いろいろな学問を学んできて、現象の解析を通じそのメカニズムにせまる生理学の重要性を益々感じている今日この頃です。意欲のある若い研究者の参加を期待します。

## 略 歴

昭和59年3月 新潟大学医学部卒業  
昭和59年9月—昭和61年3月 佐賀医科大学生理学講座助手  
昭和61年4月—平成2年3月 新潟大学大学院医学研究科  
平成2年4月—平成5年5月 理化学研究所国際フロンティア基礎科学特別研究員  
平成5年6月—平成10年8月 国立精神神経センター神経研究所疾病研究第四部室長  
平成10年9月—現在 東京医科歯科大学難治疾患研究所教授





## 膜電位感受性色素をもちいた計測と解析法

神野耕太郎・佐藤容子・佐藤勝重・持田 啓

(東京医科歯科大学医学部・生理学第二講座)

### § 1. はじめに

1970年代から L. B. Cohen のグループを中心にして開発されてきた膜電位感受性色素 (voltage-sensitive dyes) をもちいる膜電位活動の光学的計測/イメージング法は、最近4~5年の間にめざましい発展をみせ、計測システムの市販化にもなっており、現在ではすでに神経科学を中心として心臓生理学や細胞生理学の領域で popular な計測法のひとつになってきている。従来、活動電位など、細胞膜の電位変化は、1940年代後半に Hodgkin と Huxley によってヤリイカ巨大神経軸索の興奮現象の解析にもちいられた細胞内電極 (voltage wires) や、Ling と Gerard (1949) によって開発され導入されたガラス管微小電極を細胞内に刺入して測定するのが通常の方法である。しかしながら、計測/実験方法で一般的に云えることであるが、これらの電極法にもおのずと適用限界がある。膜電位感受性色素をもちいて膜電位変化を記録するいわゆる光学的計測法は、電極法の適用限界を補完するというかたちで発展してきた。電極法と光学的方法は原理的にはちがっており、微小電極法が電気化学を基礎としているのに対して、光学的方法は膜電位に感受性をもつ色素を膜に吸着させて、膜電位の変化をその色素の光学的シグナルに変換して検出するという光量子化学的反応を基礎にしている。

この膜電位の光学的計測法は、1950年代初期における Hodgkin と Huxley の Na 説に基づく神経興奮の現象論的定式化のあとをうけて、興奮の分子レベルでのメカニズム、あるいは、興奮にともなう膜高分子の conformational changes を解析するために行われた実験から派

生的に開発されて発展してきたものである [1-3]。このことは、30年以上も経過したいま、忘れ去られているように見えるが、その開発の歴史のなかには今なお教訓的なことが数多くふくまれている。

本稿では膜電位感受性色素をもちいた膜電位の光学的計測法/イメージング法について、その開発の背景にふれながら、計測法、解析法とそれらの原理および適用や問題点について、physiology のできるだけ広い範囲から実測例をあげてまとめてみることにする。

### § 2. 膜電位感受性色素

細胞膜に吸着したり、細胞内にとり込まれたりする色素の多くは、その程度に大なり小なりの差はあるが、細胞膜の電位に依存して光学的(吸光とか蛍光の)性状が変化することが、スクリーニングの過程で見出されている。したがって、膜電位感受性色素 (voltage-sensitive dyes) というのは、特に厳密に定義されているわけではなく、便宜上、「膜電位変化に対して比較的大きいレスポンスを示す色素」というぐらいの意味でもちいられている。

膜電位変化に対して大きな感受性を示す色素は、まず、L. B. Cohen のグループによって、2000種類にも及ぶ色素が、ヤリイカ巨大神経軸索をもちいて、膜電位固定法と光学的計測を組み合わせた方法で(後述)スクリーニングされ、その中から選び出された [4-7]。これが、膜電位の光学的計測法開発の最初のステップである。[この過程で、日本感光色素研究所(現 林原生物化学研究所・岡山市)が合成に協力してくれた。]色素のスクリーニングが行われた段階では、色素の構造と膜電位感受性との関係は全

く不明であり、どのような色素が膜電位に対して感受性が大きいのか、また感受性のメカニズムはどうなっているのかというようなことを理論的に推測できる状態ではなかったため、スクリーニングは経験的に、かつ枚挙的になされた。そのような過程でメロシアニン(merocyanine)系、オキソノール(oxonol)系、スタイリル(styryl)系の色素が選出され、さらに、新しいいくつかの類似化合物が合成されて[e. g. 8 a], 「膜電位感受性色素」という名称が定着してきている。[はじめのころは、potential probes とか potential dyes というような呼称がもちいられたこともある。] なお、メロシアニン系には、メロシアニンのほかメロシアニン・オキサゾロン系(merocyanine-oxazolone dye)、メロシアニン・ローダニン系(merocyanine-rhodanine dyes)がある。図1に一般にもちいられている代表的な膜電位感受性色素を示した。[ここでNKの記号がついている色素は林原生物化学研究所/感光色素研究所から入手できる。]

**膜電位感受性色素の分類:** 膜電位依存性の光学的変化を示す色素は、まず、①膜電位変化に応じて迅速な変化を示す色素(fast-response dyes)と、②比較的ゆっくりした応答を示す色素(slow-response dyes)の2つのカテゴリーに分類される。これと対応づけて、fast-response dyesの光学的変化を“fast signals”, slow-response dyesの変化を“redistribution signals”と呼ぶこともある。

メロシアニン系色素やオキソノール系色素の一部、スタイリル系色素はfast-response dyesに属しており、ニューロンや心筋細胞における活動電位のような一過性の迅速な膜電位変化の検出にもちいられている。一方、シアニン系色素やオキソール系色素の一部がslow-response dyeに属し、非興奮性細胞のsuspensionなどで、かなりゆっくりした膜電位変化をfollowするのに適している。なお、一般的に、fast-response dyesは膜に対して非透過性であり、slow-response dyesは膜を透過する。こ

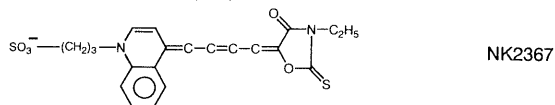
れに応じて、光学的変化のメカニズムも両者ではちがっている[9-11]。本稿では、fast-response dyesを主題にして述べる。

光学シグナルにはどのような種類があるか：現在測定される光学シグナルは、主として、吸光シグナルと蛍光シグナルであるが、実験の条件や測定対象によっては複屈折性(birefringence)、二色性(dichroism)の測定も有効である[これについては後でも述べる]。これらの中からどれを選ぶかは測定する標本の種類に応じて決められる。また、それに依ってもちいる色素も選択する必要がある。したがって、膜電位感受性色素はカルシウムイオン指示薬のように細胞の種類を問わず一意的に使用できるものではないことに注意する必要がある。すなわち、「あの細胞にこの色素が有効であるから、この細胞にもこの色素を用いてよい」ということにはならない。

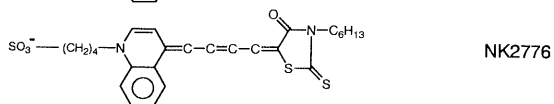
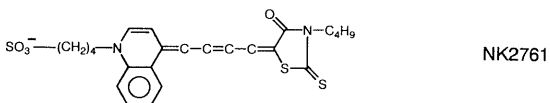
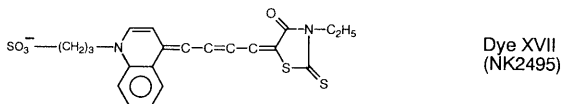
ここで、膜電位感受性色素の化学的特性について少しばかりふれておく[12]。まず、化学構造と色に関しては、メチル基が長くなるほど長波長域に吸収帯があることはよく知られているとおりである。また、メチル基が長くなるにしたがい、一般的には他の物質に吸着しやすくなり、吸着したときの吸光、蛍光の変化量が大きくなる傾向がある。したがって、膜電位感受性色素では、メチル基が長いほうがよいといえる。じっさい、メロシアニン・ローダニン系色素でこれは示されている。しかしながら、メチル基が長くなると、色素の親水性が減少し、水に対する溶解度が小さくなり、かつ安定性が低下し退色が速くなる傾向を示す。また、合成も難しくなる。

fast-response dyesのなかでオキソノール系色素、スタイリル系色素は種類は少ないが、メロシアニン系色素には多くの種類がある。例えば、われわれの実験室でよくもちいているメロシアニン・ローダニン系色素では、その構造の中の、左右の複素環にはそれぞれ多くの種類があり、核の置換基、窒素原子に結合している基、メチル基の数を変えたときの組み合わせを

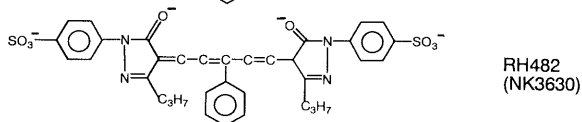
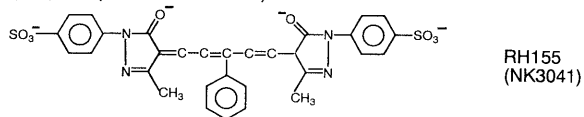
**Merocyanine-Oxazolone Dye (absorption)**



**Merocyanine-Rhodanine Dyes (absorption)**



**Oxonol Dyes (absorption / fluorescence)**



**Styryl Dyes (fluorescence)**

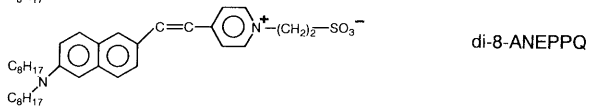
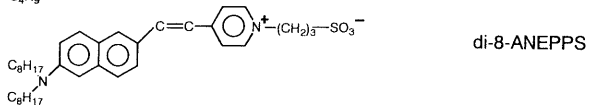
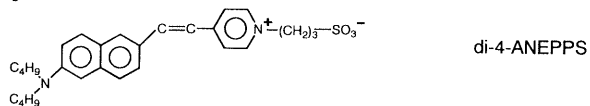
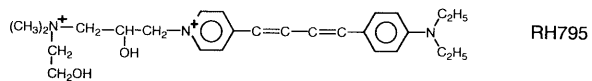
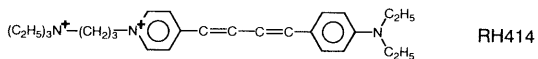


図1. 一般的によくもちいられている膜電位感受性色素 (fast response-dyes)

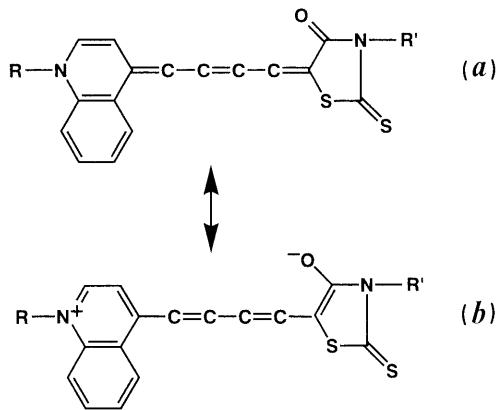


図2. メロシアニン・ローダニン系色素(NK 2761)の極限構造

考えると莫大な数になる。

メロシアニン・ローダニン系色素(NK 2761)を例にとって考えてみると、この色素は図2に示すような2つの極限構造をとることができる。メロシアニン系色素では非イオン性(a)の構造が主体である。低(非)極性溶媒中では色素はほとんど(a)の構造であるが、極性溶媒中ではその極性(誘電率)が大きくなると、イオン型である(b)の構造が安定化されるため、この効果が現れて色素の吸収スペクトルが変化する。このさい、波長スペクトルは、短波長側へシフト

トするか、あるいは長波長側へシフトする。そのシフトの大きさは、両端に結合している複素環相互の電気的性質によって変わるが、メロシアニン系色素の中には溶媒の極性プローブとしてもちいることができるほど溶媒の極性に敏感なものがあるのはこの構造のためである。さらに、この性質は色素が存在するまわりの環境(溶媒の極性、吸着する相手の電気的性質や疎水性環境)の影響を受けてスペクトルを大きく変化させる原因になっており、膜電位感受性色素としての特性もここから生じていることが推察される。

### § 3. 膜電位と光学シグナルの対応性

膜電位と色素の光学的変化との対応関係は、膜電位感受性色素の探索の過程で、ヤリイカの巨大神経軸索の膜電位固定(voltage-clamp)とそれにとまなう吸着色素の吸光、蛍光、複屈折性、二色性の変化を調べることによって検討された[4-7].

図3に、メロシアニン系色素(Dye I)とメロシアニン・ローダニン系色素(Dye XVII)を吸着させたヤリイカ巨大神経軸索で静止電位から過分極側ならびに脱分極側の50 mVのレベル

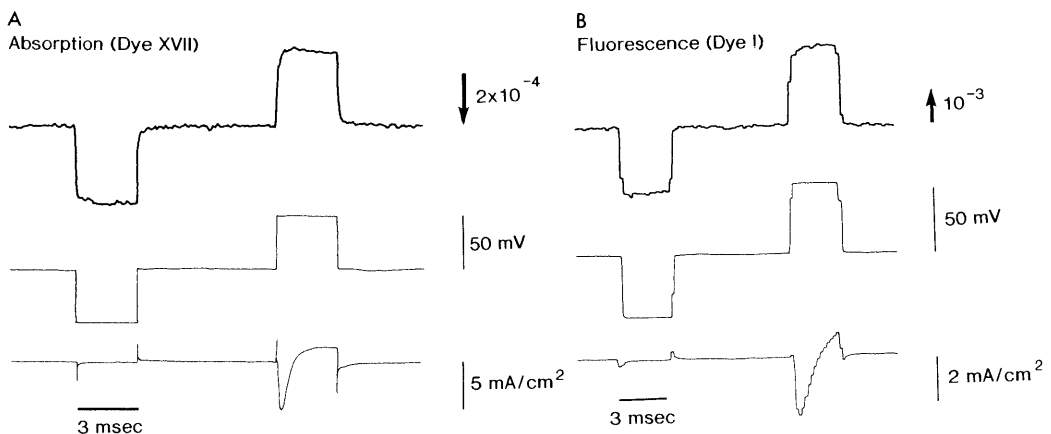


図3. A. メロシアニン・ローダニン系色素(Dye XVII)で染色したヤリイカ巨大神経軸索の膜電位固定にとまなう吸光変化。測定波長 750nm. B. メロシアニン系色素(Dye I/Merocyanine 540)で染色したヤリイカ巨大神経軸索の膜電位固定にとまなう蛍光変化。励起波長 570 nm, 蛍光波長 610 nm < [4,5].

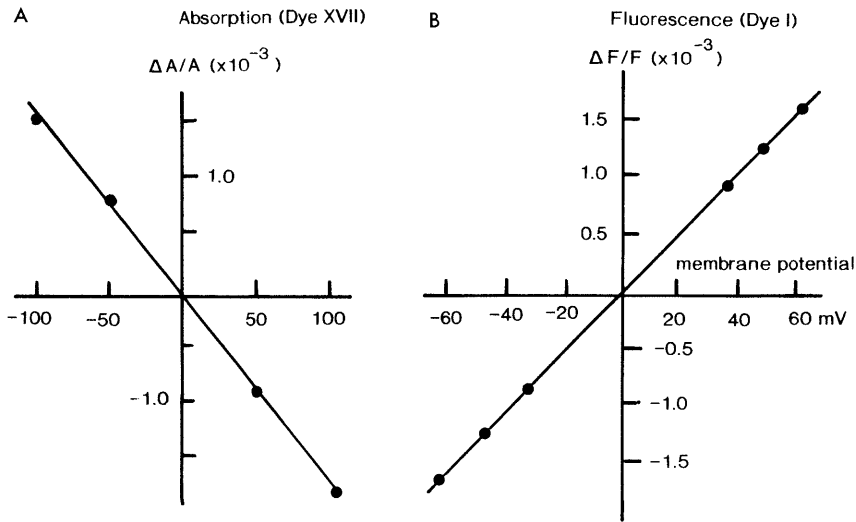


図4. メロシアンin・ローダニン系色素(Dye XVII/NK 2495)で染色したヤリイカ巨大神経軸索の吸光変化(A), およびメロシアンin系色素(Dye I)で染色したヤリイカ巨大神経軸索の蛍光変化(B)と膜電位の関係. 原点は静止電位に対応する[4,5].

に膜電位を固定し, それにともなう吸光(A), あるいは蛍光(B)の変化を同時記録した例を示す. この記録で, 上段は吸光あるいは蛍光変化, 中段は膜電位, 下段は膜電流である. この記録からわかるように, 吸光, 蛍光ともに, 膜電位に応じて変化しているが, 膜電流との対応性は見られない. ということは, 吸光や蛍光の変化は膜電位の変化にともなう二次的变化であり, 膜のコンダクタンスの変化とは関係がないことを示している. ここで, 矢印の向きは吸光, 蛍光ともに増大の方向を表している. したがって, メロシアンin系色素(Dye I)の蛍光は膜電位の過分極にともなう減少し, 脱分極に応じて増大していることがわかる. 一方, メロシアンin・ローダニン系色素(Dye XVII)の吸光は過分極で増大, 脱分極で減少する.

以上のような膜電位固定による実験で得られた光学シグナルの大きさを, 膜電位に対してプロットしたのが図4である[4,5]. このプロットからわかるように, 静止電位から過分極側ならびに脱分極側へ  $\pm 100$  mV 以内の範囲(すなわち, 生理的範囲)では膜電位と蛍光, 吸光, 複屈折性, 二色性の変化は近似的に直線関係で

対応づけられる. 一般に, 光学的変化(シグナル)の大きさは, 背景強度に対する蛍光や吸光強度の変化の比(fractional change:  $\Delta F/F$ ;  $\Delta A/A$ )として表される. [通常, 光学的シグナルのsizeとはこのfractional changeのことである.] なお, 図5Aに, メロシアンin・オキサゾロン系色素(Dye I)の複屈折性の変化についての記録を示し, 図5Bにメロシアンin・ローダニン系色素(Dye XVII)の複屈折性と膜電位の関係を示す[5,6].

このような膜電位と光学変化のfractional changeの間の直線関係はほとんどすべての膜電位感受性色素で成立することがわかっており, これが光学的膜電位計測の(準)定量性の拠りどころとなっている. さらに, この直線関係は心筋細胞でも成立することが示されている[13].

吸光度の変化は通常, 測定対象とする標本に対する透過光の変化として測定される. したがって, 透過光の変化を吸光変化に変換しなければならないが, 次の簡便式をもちいて吸光変化を求めることができる[5].

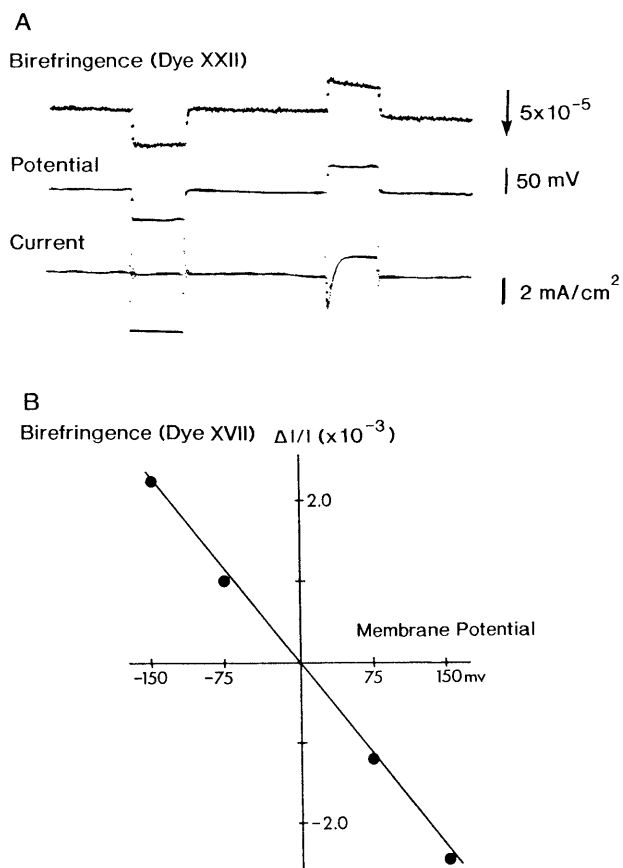


図5. メロシアンin・ローダニン系色素(Dye XXII)で染色したヤリイカ巨大神経軸索の膜電位固定にともなう複屈折性の変化(A), および膜電位と複屈折性変化の関係(B). 原点は静止電位. 測定波長は720 nm [5,6].

$$\Delta A/A =$$

$$-\Delta T / (T_{\text{before}} - T_{\text{after staining}}) \quad (1)$$

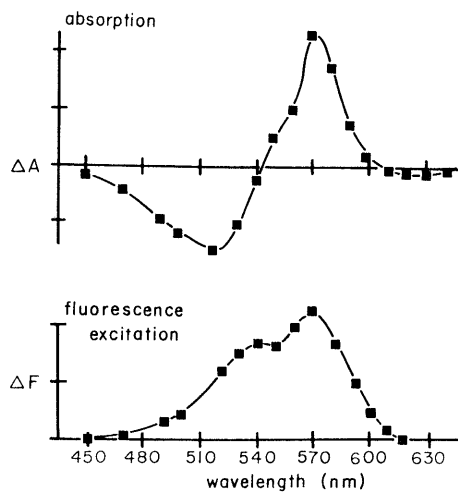
ここで  $\Delta A$  は吸光変化,  $\Delta T$  は透過光強度の変化,  $A$  は吸光の背景強度,  $T_{\text{before}}$ ,  $T_{\text{after staining}}$  はそれぞれ染色前後における透過光の背景光強度を表わす.

#### § 4. 光学シグナルの波長スペクトル

膜電位変化にともなう光学変化(シグナル)は, 当然, 入射光の波長に依存して変化する. それは“action spectrum”と呼ばれ, 色素の種類によって異なるスペクトルを示す. 動物や細胞の種類によっても微妙な違いがみられる [e.

g. 14]. したがって, 使用する色素については, 測定する標本ごとに, action spectrum を調べて, 最適波長を決めることが必要となる. 図6 Aに, Dye I の吸光, および蛍光の action spectra [5], 図6 Bに Dye XVII の吸光, 偏光, 二色性, 複屈折性の action spectra [5]をまとめて示した. この図6 Bでみられるように, 吸光シグナル, 偏光性シグナル, 二色性シグナル, 複屈折性シグナルの action spectrum は異なったパターンを示す. このような action spectra の特性を利用すれば, 膜における色素の配列状態とか神経組織内における活動ニューロンの配列パターンなどについていろいろな情報が得られる可能性がある(未発表データ).

A. Dye I



B. Dye XVII

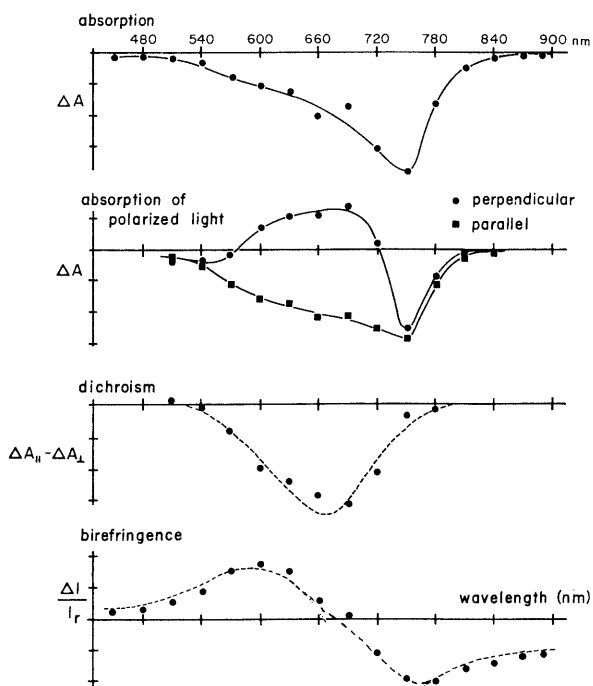


図6. A. Dye I の吸光と蛍光変化の波長スペクトルの比較. B. Dye XVII (NK 2495) の吸光, 偏光, 二色性, 複屈折性変化の波長スペクトルの比較[5].

これらの action spectra は生理的食塩水(あるいは水)や、エタノールに溶かしたときの色素の波長スペクトルとは一致しない。したがって、色素溶液の波長スペクトルから最適な波長を求めることはできないことに注意する必要がある。

### § 5. 膜電位感受性色素の選別基準

ここで、膜電位感受性色素の選別基準をまとめておく。図1にリストアップした色素が、膜電位感受性色素として選び出されるまでには、多くのテストがくり返され、さらに、膜電位固定法をもちいたテストの結果に基づいて、合成と改良が重ねられてきた。その過程で、次のようなことがらが検討された[e. g. 15].

- ①背景光に対する光学的変化ができるだけ大きい：すなわち fractional change が大きい；
- ②信号対雑音比が大きい；
- ③細胞機能に対する毒性や薬理作用、さらに、光化学的 (photodynamic) 毒性ができるだけ小さい；
- ④色素が退色しにくい：すなわち退色時間ができるだけ長い；
- ⑤活動電位のような一過性の電位変化をモニターするために膜電位変化に対する応答時間 (時間定数) が短い；
- ⑥できるだけ低濃度で使用できる。

現在用いられている色素の fractional change は  $10^{-4}$  ~  $10^{-3}$  オーダーのものが多いが、蛍光では  $10^{-2}$  ぐらいの色素もある。fractional change に加えて重要な因子は信号対雑音比であるが、これについては §9 で詳しくとりあげることにする。通常用いられている fast-response dyes としては膜電位に対する応答時間が  $5.0 \mu\text{sec}$  以下であり、これは活動電位をじゅうぶん follow できる時間分解能である。

**毒性と退色：**膜電位感受性色素をもちいるとき、それが細胞に与える毒性や薬理作用はかなり serious な問題となる。毒性には色素そのものが内在的にもっている毒性と、色素が光の照

射を受けることによって生じる光化学的 (photodynamic) 毒性がある。毒性は channels, receptors, 代謝など、いろいろな機能について個別的にチェックしなければならないが、電位活動だけを問題とする場合はシグナルが発現するか否かでその毒性の有無を一応知ることは出来る。光化学的毒性は、膜電位感受性色素のスクリーニングでは、膜電位固定したときの内向きの  $\text{Na}^+$  電流が減衰するはやすさ(時間)を調べることによってきびしくテストされた。光化学的毒性の強い色素の場合、光照射をうけない状態では内向き電流に変化はみられないが、光を照射した瞬間から、急速に減少していくのがみられる [5]。このような光化学的毒性を示す典型的な色素は Merocyanine 540 (Dye I) であるが、これは一回目の刺激で誘発されるシグナルの検出にはもちいられるが、くり返し実験には向かないということになる。またメロシアニン・オキサゾロン系色素 (NK 2367) は不安定で退色時間が短い、膜電位に対する応答時間が他の色素に比べて短い ( $< 2 \mu\text{sec}$ ) という長所がある [16]。これらの例でみられるように、上記の条件をすべて満足する色素を探し出すことは難しいので、各々の色素がもつ長所を考慮して、測定目的に応じて適当な色素を選択することが必要になる。

---

測定対象とする標本の染色は、通常、色素 ( $0.1 \sim 0.5 \text{ mg/ml}$ ) を溶かした生理的食塩水に標本を  $5 \sim 30$  分間浸したあと、色素をふくまない生理的食塩水で置き換えるだけでよい。溶液中の色素濃度が大きいと浸透圧のため細胞が収縮する可能性がある、出来るだけ色素の濃度は低い方がよい。生理的食塩水に溶け難い色素では界面活性剤、Pluoronic F-127 (high molecular-weight surfactant polyol) を加えることによって溶けやすくなることもある [5]。

---

### § 6. ニューロンの活動電位とシナプス後電位

ここまでは、ヤリイカ巨大神経軸索について

膜電位固定法で得られた結果に基づいて、膜電位依存性の光学的変化の基本的性状について述べてきたが、活動電位やシナプス後電位にともなう光学的変化、すなわち、活動電位とシナプス後電位の光学的計測に話を移す。

**活動電位：**活動電位にともなう光学的変化もまた、まず、ヤリイカ巨大神経軸索で記録され、これがニューロン電位活動の光学的計測の端緒となった[4-6]。これに続いて、巨大フジツボやヒルなど無脊椎動物の神経節細胞で活動電位に対応する光学シグナルが記録され[17,18]、膜電位感受性色素が、ヤリイカ巨大神経軸索だけでなく単一の神経細胞にも適用できることが証明されたが、これは膜電位感受性色素の適用

範囲が広がるきっかけとなった。

無脊椎動物の神経節細胞は比較的大きく、ガラス管微小電極を細胞に刺入して記録される活動電位とそれにとまなう光学的変化が直接比較できる。図7は巨大フジツボの神経節細胞(supraesophageal ganglion cell/メロシアニン・オキサゾロン系色素(Dye XXII : NK 2367)で染色)における活動電位と吸光シグナルの同時記録例(A) [18]と、ヒルの神経節(segmental ganglion)の細胞(P cell : スタイリイル系色素(RH 237)で染色)における活動電位と蛍光シグナルの同時記録例(B) [8a]である。なお、これらの図には電位活動の光学的計測システムの基本的構成を模式的に図示した。

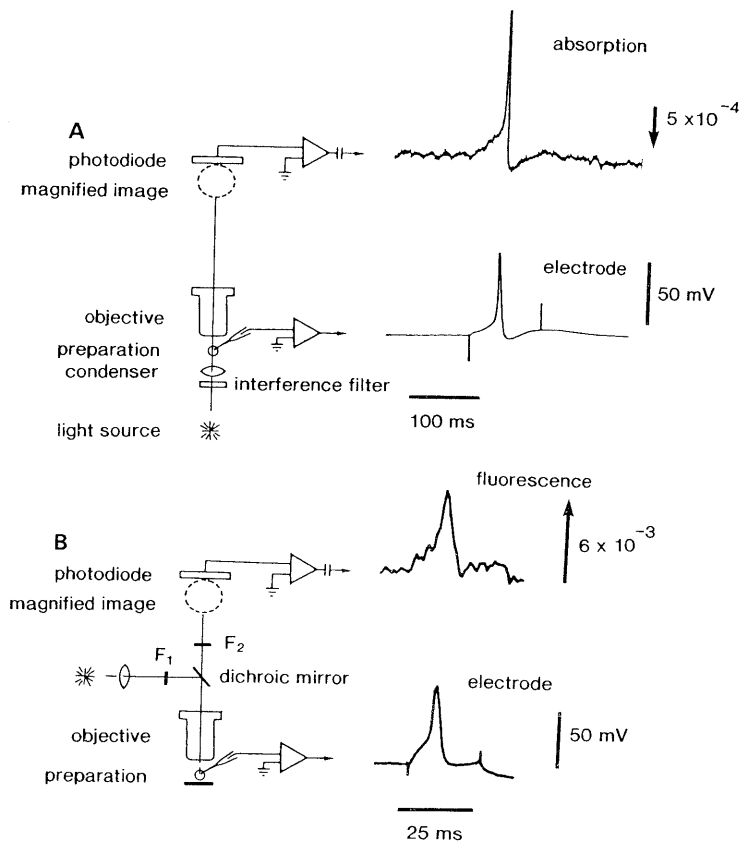


図7. メロシアニン・オキサゾロン系色素(NK 2367)で染色した、巨大フジツボの神経節細胞における、微小電極法による活動電位とそれにとまなう吸光変化の同時記録[18]。B. スタイリイル系色素(RH 237)で染色したヒルの神経節細胞における活動電位と蛍光変化の同時記録[8a]。

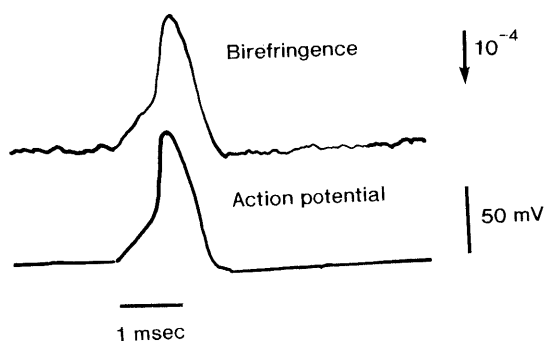


図8. Dye XXII (NK 2367)で染色したヤリイカ巨大神経軸索の活動電位と複屈折性変化の同時記録[6].

この記録例でみられるように、電気刺激によって誘発される吸光シグナル、蛍光シグナルはガラス管微小電極によって記録される活動電位と形状、時間経過ともにほとんど一致し、吸光シグナル、蛍光シグナルが活動電位をよくコピーしている。さらに、膜電位感受性色素の複屈折性シグナルや二色性シグナル(入射光の垂直成分、水平成分で得られるシグナル)も活動電位によく一致する。図8に複屈折性シグナルと活動電位の同時記録例を示す。

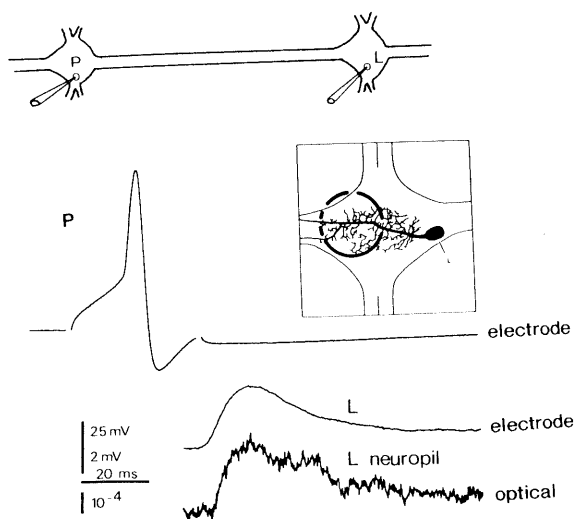


図9. ヒルの神経節内における運動ニューロン(RH 461で染色)の樹状突起から記録された興奮性シナプス後電位と吸光変化の同時記録. 励起波長546 nm, 蛍光波長610 nm < [2b].

シナプス後電位：興奮性のシナプス後電位も膜電位感受性色素をもちいた光学的シグナルとして、巨大フジツボやヒルの神経節内の単一ニューロンから記録され、光学的計測法がシナプス機能の解析にも有効であることが示された。ヒルの神経節(segmental ganglion)内における運動ニューロン(L-motoneuron)の樹状突起から光学的に記録された例が図9である[8b].

### § 7. 心筋細胞の活動電位と光学シグナル

心筋細胞における活動電位の光学的計測は基本的には神経細胞の場合と同じであるが、心筋細胞の場合、活動電位と連関した収縮(拍動)由来の光散乱の変化(シグナル)が入り込んでくるのが問題になる。したがって、活動電位を光学的に記録するためには、拍動による光散乱の成分を極力抑えることが要求される。一方、活動電位依存性の吸光や蛍光シグナルと連関した拍動依存性の光散乱シグナルを記録することによって興奮-収縮連関を解析することもできる[19].

拍動による光学シグナルの成分を抑えるためには、通常外液の  $Ca^{2+}$  濃度を低くする方法がとられているが、最近、収縮抑制剤(2,3-butanedione monoxime: BDM)を併用して測定する方法ももちいられている[20].

図10は、メロシアニン・ローダニン系色素(NK 2761)で染色した蛙の心房筋から、 $low-Ca^{2+}$  の Ringer 液中で活動電位(細胞内記録)と光学シグナルを同時記録して比較したものである[21]. 光学(透過光)シグナルは、700 nm と 610 nm (カエル心房筋においてメロシアニン・ローダニン系色素の action spectrum で吸光変化がゼロになる波長)で心房標本の5ヶ所から同時記録している(この方法については後述する). 波長700 nm では、光学シグナル“a”は細胞内電極で記録した活動電位に同期したスパイク状のシグナルだけで、これは610 nm でほとんど消失している。記録“b”, “c”, “d”では、700 nm で記録された光学シグナルは活

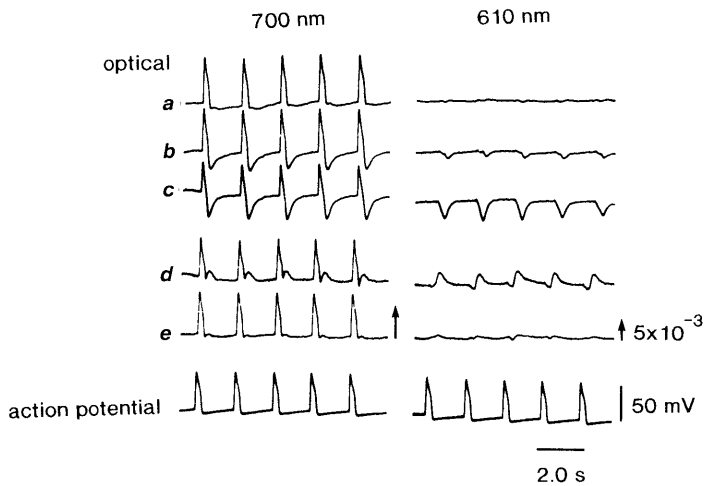


図10. NK 2761 で染色したカエル心房標本における自発性活動電位と透過光変化の同時記録. 測定波長 700 nm および 610 nm [21].

動電位に同期したスパイク状のシグナル(上向き)とそれに続く, *b*, *c*では下向き, *d*では上向きのシグナルの2つ(第一成分, 第二成分と呼ぶことにする)の成分から成り立っており, 610 nm では第一成分は消失し, 第二成分だけが記録されている. 活動電位との比較から, 上向きのスパイク状の第一成分のシグナルは活動電位に対応する吸光変化であり, 第二成分のシ

グナルは収縮(拍動)に起因した光散乱の変化であることがわかる. この光散乱変化の方向は収縮(拍動)の大きさや一個の photodiode の受光領域における収縮のトポロジカルな性状によって変動する.

心電活動は蛍光法によっても計測されているが, 吸光シグナルよりも蛍光シグナルの方が大きい fractional change が得られる傾向がある.

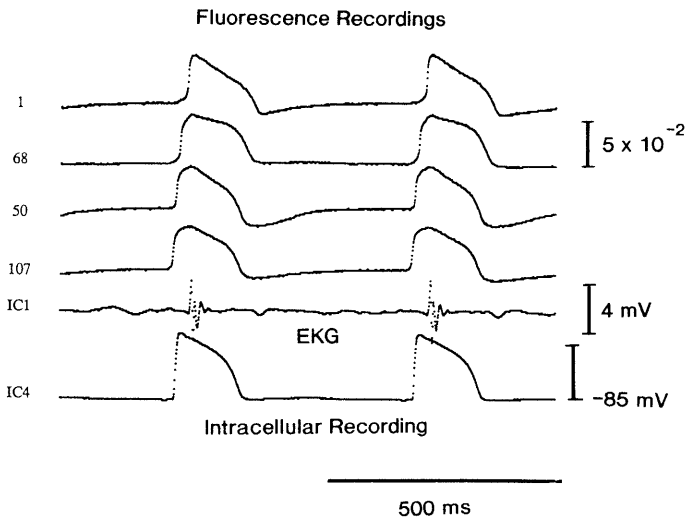


図11. スタイリル系色素(di-4-ANEPPS)で染色したモルモット心室筋の活動電位, 心電図, 蛍光変化の同時記録[22a].

図11は Langendorff 灌流でモルモット右心室をスタイリル系色素(di-4-ANEPPS)で染色し、自発性活動電位の細胞内記録、心電図、および蛍光シグナルの記録を同時に行った例である[22a]。この記録でも、細胞内電極によって記録された活動電位と蛍光シグナルの時間経過および形状がよく一致していることが示されている。なお、この計測は通常の Ringer 液中で行われているにもかかわらず、拍動による artifact が無視できるほど小さい。これについては §14でまた述べることにする。

### § 8. 骨格筋横行小管の膜電位変化

骨格筋線維(skeletal muscle fiber)における光学計測は、興奮-収縮連関に関与する横行小管(transverse tubular system: T-system)膜における電位変化を検出するためにもちいられている。微小電極をもちいて T-system の電位変化を記録することは技術的に不可能である。そのため、形質膜(表面膜)に発生した活動電位が T-system に伝播することは間接的な実験で示唆されているながらも、T-system の膜電位変化は直接的には測定されていなかった。それは、膜電位感受性色素をもちいてはじめて記録された。図12は、表面膜における細胞内電極による活動電位とメロシアン・ローダニン系色素(Dye XVII/NK 2495)をもちいた T-system の膜

電位の光学シグナルを同時記録した例である[23]。表面膜の活動電位は刺激後 0.53 ms でピークに達しているが、それに続く T-system の活動電位に対応する吸光シグナルは表面膜の活動電位にやや遅れて発生し、1.07 ms でピークに達していることがわかる。表面膜の活動電位と吸光シグナルのピークの時間差は活動電位が表面膜から T-system へ伝わる時間に対応する。

さらに、興奮-収縮連関の過程で、T-system における電荷移動(charge movement [24,25])と T-system の膜電位との関係が膜電位感受性色素をもちいて調べられた[26]。図13は表面膜の膜電位を 0, -20, -30, -40, -60 mV のレベルに固定して、それにとまなう T-system の膜電位をメロシアン・ローダニン系色素(NK 2495)の吸光シグナル(右のトレース)として記録し、それと電荷移動(charge movements: 左のトレース)を比較したものである。図13Bは固定された表面膜の膜電位に対して T-system の吸光変化と電荷移動量、 $Q/Q_{max}$  をプロットしたものである。ここで、電荷移動量  $Q/Q_{max}$  は、Boltzmann の式を用いて次のように表される。

$$Q/Q_{max} = 1 / \{ 1 + \exp(V_{mid} - V) / k \} \quad (2)$$

$V$  は表面膜の膜電位、 $V_{mid}$  (in mV) は電荷が

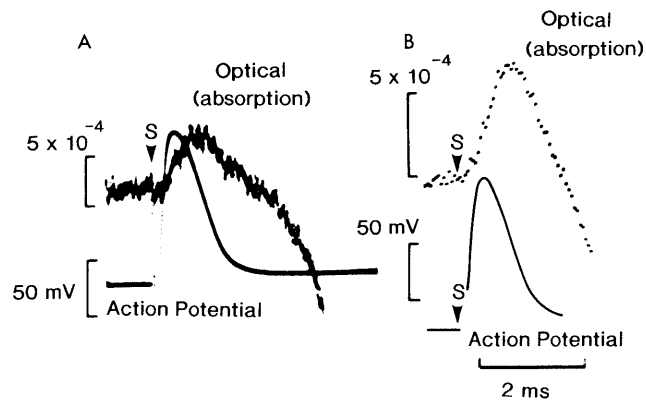


図12. メロシアン・ローダニン系色素(Dye XVII/NK 2495)で染色した骨格筋の T-system から、吸光シグナルとして記録された活動電位。Aは single sweep で記録。B は 4 回の trials を加算平均して記録[23]。

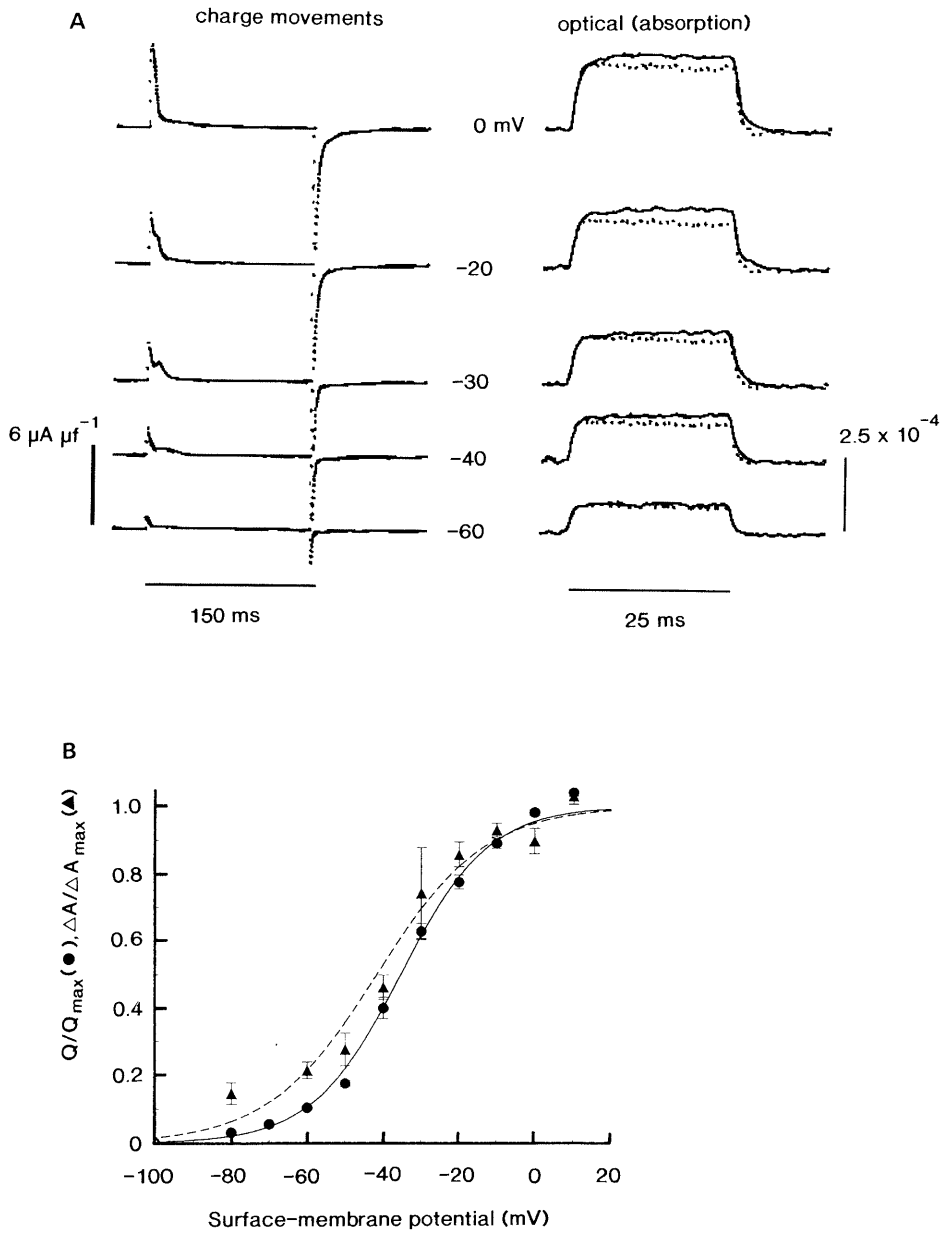


図13. A. 骨格筋の電荷移動と光学的(吸光)シグナルとして記録した T-system における電位変化との関係. 表面膜を膜電位固定して記録. B. 表面膜電位と電荷移動量および T-system における吸光変化(電位変化に対応)との関係[26].

50%だけ移動したときの膜電位,  $k$  は傾斜を表すパラメータ (slope constant) である.

この実験で, 表面膜の膜電位と T-system の膜電位の関係は S 字状曲線で, 非線形性を示し

ている. さらに, T-system における膜電位の変化と電荷移動量 (charge movement) は平行していることがよく示されている. さらにこのグラフから, T-system の膜電位と電荷移動の関

係も非線形性であることがよみとれる。膜電位感受性色素をもちいたこの実験によって表面膜の膜電位変化、T-systemでの膜電位変化および charge movement 間の定量的関係が捉えられたことは光学的計測の新しい適用として注目してよい。

### § 9. 信号対雑音比

膜電位変化を光学的シグナルに変換して記録する場合、信号対雑音比 (signal-to-noise ratio : S/N 比) は深刻な問題となる。一般に、光学計測は noise と artifact との戦いであるといわれる所以でもある。光学計測がやや popular な方法となった現在、シグナルの波長依存性や S/N 比に注意を払わない傾向がしばしばみられるが、これは得られた imaging やデータの解析に信頼性を欠く結果を招きかねないし、また計測に緊張感を感じさせないことにもなるので注意しなければならない。

じっさいの測定では次のような雑音が問題となる。①ショット雑音 (shot noise), ② detector 内の暗電流による雑音, ③光源の光量の変動による雑音, ④電気回路, シールドイング, 周辺光による雑音, ⑤被検体の微小な動きによる雑音。

このなかで、③~⑤のような外来性の雑音はその発生源を点検して除去することができるが、ショット雑音は光電子発生の確率的な不規則性により、これが光電流自体の雑音となったもので、これを除くことはできない。

Detector (photodiode) で受ける透過光シグナルあるいは蛍光シグナルとショット雑音の比、 $(S/N)_T$ ,  $(S/N)_F$  は次のように表すことができる [27]。

$$(S/N)_T = (\Delta I/I) \cdot (2q \cdot \gamma)^{1/2} \cdot I^{1/2} \quad (3)$$

$$\gamma = (1/4) \cdot \Delta F \quad (\Delta F \text{ は帯域幅})$$

I : detector が受ける透過光強度

q : detector の量子収率

$$(S/N)_F = (\Delta F/F) (2\gamma q)^{1/2} \cdot (gF)^{1/2} \quad (4)$$

F : 被検体からの蛍光強度で入射光強度に比例する。

g : detector の受光領域に関係する装置定数。

$\Delta I/I$  あるいは  $\Delta F/F$  は、1つの色素および実験系では一定と考えてよい。さらに、 $S/N = k \cdot I^{1/2}$  と表されることから、じっさいの実験では、得られたシグナルとノイズ比 (S/N) を背景光強度 (入射光強度に比例する) の平方根に対してプロットして、上の関係式と照らし合わせることにより、雑音がショット雑音近くまで小さくなっているか否かチェックすることができる。もし、S/N と背景光強度の平方根との間に直接関係が成り立つなら、ほとんどショット雑音まで追い込んだと考えてよい。

図14にその例をあげる [28]。これは3種類のメロシアンニン・ローダニン系色素 (NK 2761, NK 3360, Dye XXIII) について、ニワトリ胚の脳幹に誘発された吸光シグナル (S) とノイズ (N) の比、S/N を入射光強度の平方根に対してプロットしたものである。このプロットで、入射光強度がある値以上のところでは、S/N 比と入射光強度との間には直線関係が得られている。このことから測定にもちいられる入射光強度では、ノイズはショット・ノイズのレベルまで追いこまれていると考えてよい。

さらに、この S/N 比と  $I^{1/2}$  の間には次のような経験式が導きだされている [文献28の Appendix 参照]。

$$S/N = k \cdot I^{1/2} - [\alpha - \alpha \beta / (I^{1/2} + \beta)] \quad (5)$$

ここで k,  $\alpha$ ,  $\beta$  は色素の種類や測定対象とする標本の種類によって決まる定数である。この式は、われわれの計測における雑音は、通常の計測でもちいられる入射光強度の範囲では光量子の量子的性質に依存するが、入射光強度の小さいところではそれとは関係のない因子がまぎれ込んでいることを示している。後者の成因については少なくとも現時点では不明であるが、おそらく、装置定数あるいは暗電流に関係していることが考えられる。さらに、これとは別に、detector が受けるフォトン数と S/N 比の関係が求められている [e. g. 35]。

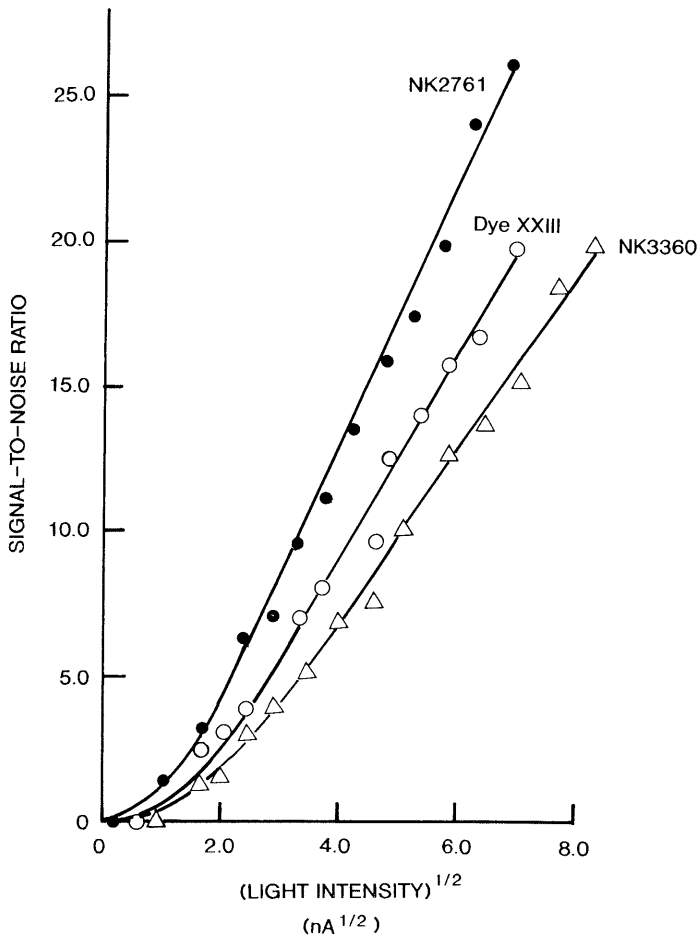


図14. 3種類のアロシアニン・ローダニン系色素について、ニワトリ胚脳幹で得られた S/N比と照射光強度の関係[28].

## §10. Multiple-Site Optical Recording Methods

膜電位感受性色素をもちいた膜電位活動の光学的計測法の利点は、①微小電極を刺入できないぐらい小さい細胞やそれらの突起 (processes) から電位活動を記録できる、ということに加えて、②測定対象の多数分画領域 (部位) や多数の細胞から電位活動を同時に記録することができる、ことである。

電位活動を多領域から同時記録するシステム (multiple-site optical recording system) は光学系に光学顕微鏡 (大型が操作的に便利である) をもちいて組み立てられている。その基本構成は

図15にも示したように、膜電位感受性色素で染色した標本を chamber に固定し、それを載物台上にセットする。これに所定波長の光 (通常、可視光線) を入射し、対物鏡を通して実像面 (image plane) に結像した標本の拡大実像に受光器を置いて標本からの光学シグナルを detect する。通常、受光器としては photodiode がもちいられる。

前節までは、ほとんどが一つの photodiode をもちいた記録例をとりあげたが、この single photodiode 法からスタートして、多数の細胞や標本の多数領域から電位活動を記録する方法が発展してきた。したがって、multiple-site 計

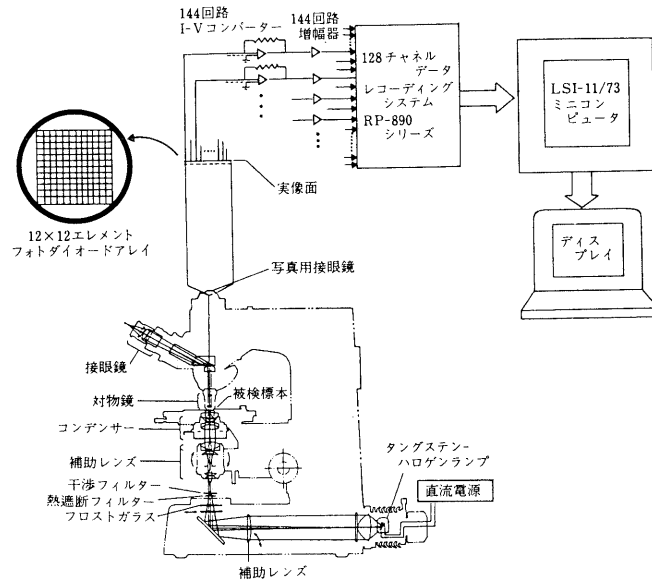


図15. 12×12-element photodiode array をもちいた128領域同時計測システム(東京医科歯科大学医学部第二生理学教室) [37, 40].

測の原理は基本的には single photodiode 法と同じである。

多数細胞や多領域から光学シグナルを同時記録する方法は、まず、single-photodiode を light guides (optic fibers) の先端に取り付けたものを何本か作り、それらの他端を実像面上に並べて標本の実像の複数領域から光学シグナルを同時記録する方法が導入された [17, 29, 30, 31]。これが multiple-site optical recording method の出発点である。

optical fibers をもちいた light guide 方式は、実験の目的や実験対象によってはまだその有用性は決して失われていない。これをもちいることによって工夫次第ではいろいろな実験ができることを指摘しておく。われわれは、この方法を適用することによって脳の深部からの光学シグナルの検出を試みている [32]。なお、この light-guide (optic fiber) 方式と、次に述べる photodiode array を組み合わせたシステムも開発されていることも付言しておく [33]。

photodiode array 方式： light guide 方式で

は、最高16ヶ所の領域からの同時記録ができたが、それ以上測定領域を増やすことには、顕微鏡の実像面のスペースなどシステム構成の面から限界がある。そこで、新しい方法として、複数個の photodiode をマトリックス型にならべた multi-element photodiode matrix array 法が導入された [34-37]。この photodiode array 方式には現在、①多素子 silicon photodiode array をもちいて、電位活動を多領域から parallel read-out 方式で同時計測するシステムと、② CCD カメラや128×128ピクセルアレイをもちいて、フレーム方式でシグナルを呼び出す serial read-out 方式がある [38]。われわれは serial read-out 方式には経験がないので、ここでは、われわれがもちいている parallel read-out 方式について述べる。

photodiode array には、5×5(MD 25)、10×10(MD 100)、12×12(MD 144)-element photodiode array (Centronics, Croydon, UK) をはじめとして、16×16-element photodiode array (Argus-50 PDA/浜松フォトニクス) がもちいられている。[Argus-50 PDA はすでに市販されている。]われわれの研究室では、現在12×

12-element photodiode array (MD 144) と 34 × 34-element photodiode array (後述) をもちいて自作した計測システムを使用している。われわれの計測システムと他研究室で組み立てられた計測システムおよび市販品の構成と原理は基本的にはすべて同じである。

**12×12-element photodiode array 計測システム**：これは 1.4 × 1.4 mm の silicon photodiode を 144 個、12 × 12 のマトリックス型に配列したもので、各エレメント間は 0.1 mm 幅で絶縁されている。これらの各エレメントからの光電流は、各エレメントと連絡した 144 個の I-V コンバータによって、電圧信号に変換されてから、144 個のアンプファイアによって各々増幅されて記録系へ送り込まれる (図 15) [37]。

レコーディングシステムとしては、128 チャンネル PCM データレコーディングシステム (RP-890 シリーズ：NF 回路設計ブロック) をもちいている。これはメインプロセッサ、I/O プロセッサ、ウェブメモリおよびカセット式 VTR から構成されており、I/O プロセッサでアナログ信号はデジタル信号に変換されてメインプロセッサに入り、続いて、ビデオ信号に変換されて記録される。記録された信号はコンピュータ (LSI-11/73 minicomputer：Digital Equipment Co.) へ転送され、シグナルの表示や解析が行われる。ソフトウェアは、われわれの研究室で独自に開発したものをを用いている。アナログデータの入力部である I/O プロセッサは 16 チャンネルからなり、これを増設して最高 128 チャンネルにして 144ヶ所のうち 128ヶ所からの光学的シグナルを同時記録することができるように構成されている。なお、この装置では、心電活動のリズム解析を行えるように PCM データレコーディングシステムをもちいているが、この代わりに通常はマルチプレクサーがもちいられている。

**1020-element photodiode array recording system**：このシステムは、主として中枢神経系のニューロン活動を計測することを目的としてわれわれの研究室で設計されて組み立てられ

た [39,40]。そのさい、次のような性能が保持されていることを基本的条件とした。

- ① single sweep で活動電位が識別できると同時に、シグナルの波形からシナプス後電位の識別と定量的解析ができるだけの十分な時間分解能と S/N 比を有している。
- ② 秒オーダーの持続時間をもつ電位変化もできるだけ歪なく記録できる。
- ③ 長時間 (分オーダー) の連続記録において、色素の退色等によるドリフトを測定を中断することなく補正できる。
- ④ 透過光測定の場合、透過光がもっとも大きい部分における (透過光) 強度が full scale に近い値に測定条件を設定すると、光の透過が小さい部分の測定精度が不十分となる可能性がある。そこで、透過光が大きい部分で saturation することなく、同時に、透過光が小さい部分もできるだけ高い精度で測定することができるようにする。

測定システムは基本的には 12 × 12-element photodiode array system と同じで、光学系 (顕微鏡)、検出ユニット、プリアンプ、マルチプレクサー・ユニット、AD - 変換ユニットから構成され、コンピューターをもちいてシステム全体の制御やデータの記録を行うように設計されている。1020-element photodiode matrix array はわれわれの研究室でデザインしたものを浜松ホトニクス(株)に特注して作製した。この array では 34 × 34 個の element (photodiode) が matrix 状に配置されているが、実像面に合わせて四隅の element は一部省略し、全体としてほぼ円形状の受光面を持つようにしてある (図 16)。この測定システム構成の模式図を図 17 に示した。

データの取り込み、表示、解析などのソフトウェアは、すべてわれわれの研究室で開発したのをもちいている。(言語は大部分 RT-11 (ver. 5.0) の OS 上で FORTRAN と Macro-11 のアセンブラ言語である。) この計測システムの開発によって、標本の 1020ヶ所の分画領域から膜電位変化を parallel read-out 方式で同時記録することができるようになった。次節から、

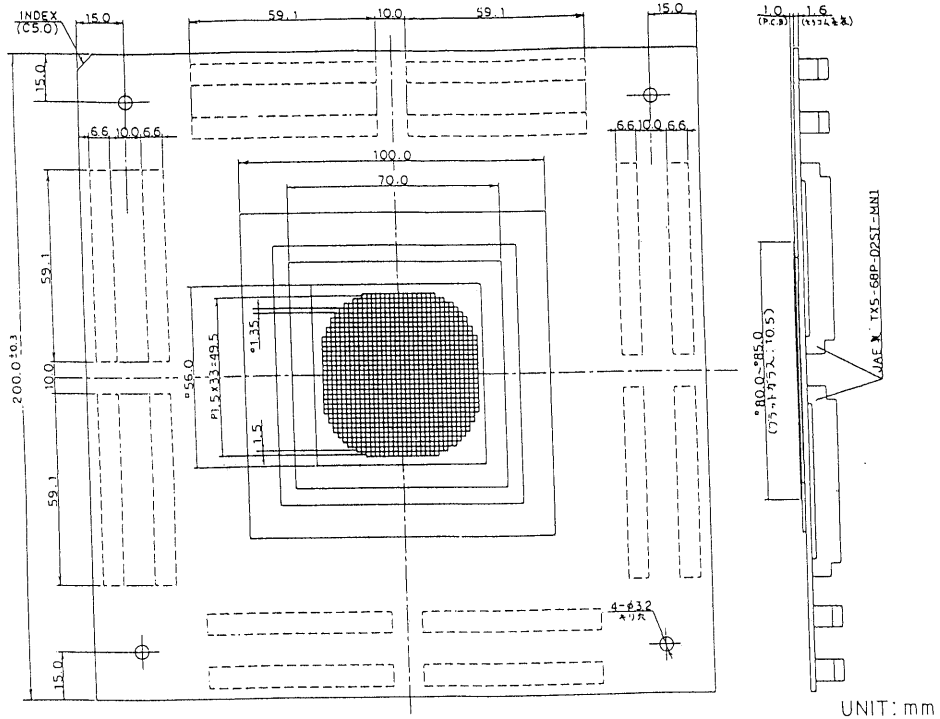


図16. 1020-element photodiode array の構成図[39,40].

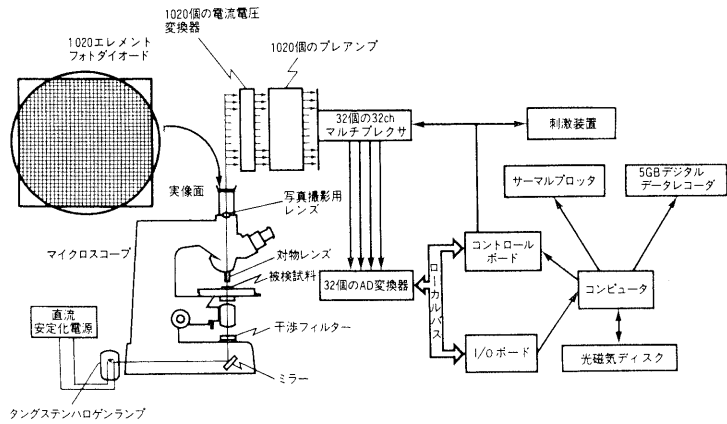


図17. 1020-element photodiode array をもちいた1020領域同時計測システム(東京医科大学医学部第二生理学教室) [39,40].

multiple-site optical recording methods の適用について述べる。

### §11. Slice Preparations

神経系で multiple-site optical recording

methods がもっともよくもちいられている測定対象は脳や脊髄などの slice 標本である。これは、slice 標本が比較的 simple な系であること、電気生理学的実験によくもちいられていること、が背景になっている。

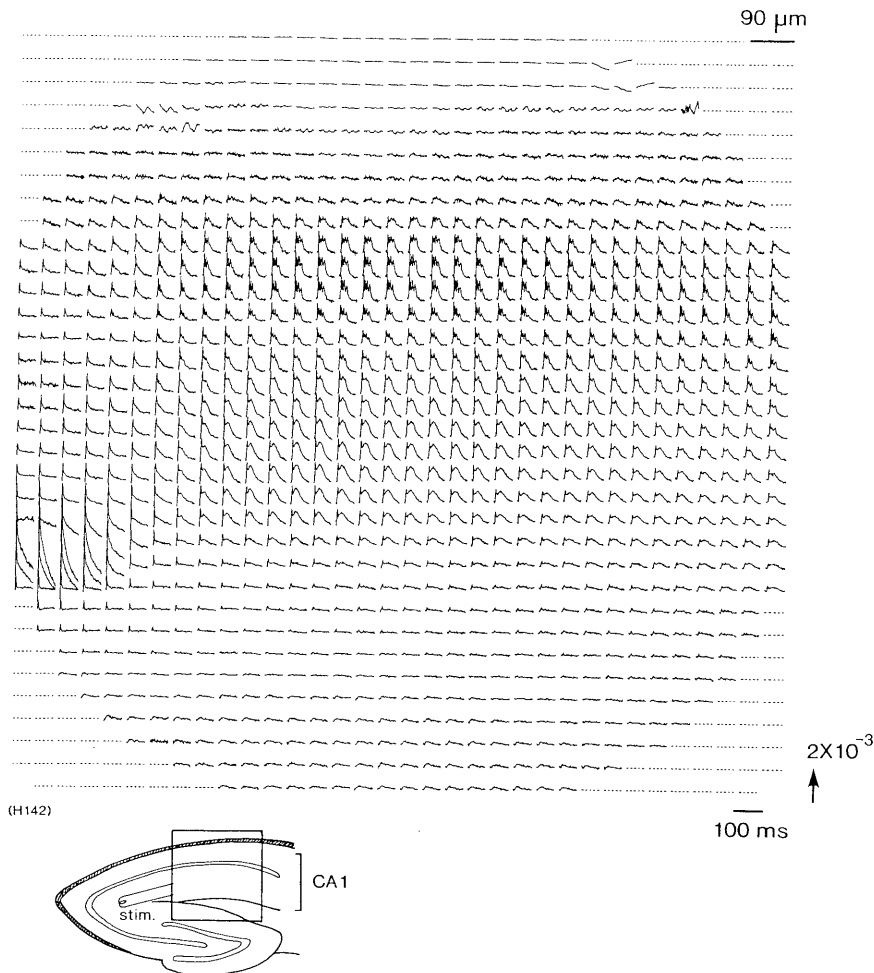


図18. ラット海馬スライス標本(RH 482/NK 3630で染色)で Schaffer 側枝の電気刺激によって誘発された吸光シグナルの1020ヶ所からの同時記録例[41].

図18は1020ヶ所の分画領域からニューロンの電位活動を同時記録した例である[41]. ラット海馬から厚さ  $300 \mu\text{m}$  の slice 標本をつくり, これを oxonol 系色素(RH 482/NK 3630)で染色したあと, Schaffer 側枝の電気刺激によって誘発されたニューロン電位活動を 1020-element photodiode array recording system をもちいて1020ヶ所の分画領域から波長  $700 \text{ nm}$  で同時記録したものである. 一つの photodiode は  $41 \times 41 \mu\text{m}^2$  の領域からシグナルをひろっている.

この記録で, 放射線維層(stratum radiatum)

では活動電位に対応するスパイク状のシグナルと, それに続くシナプス後電位に対応するシグナル, 錐体細胞層(stratum pyramidale)と多形細胞層(stratum oriens)では multiple discharge に対応する光学的シグナルが捉えられている. われわれは現在, これらのシグナルの波形やそれらの場所的分布を調べることによって海馬におけるニューロン活動の時間的・空間的パターン形成の解析を行っている.

もうひとつ, Onoda のグループによる serial read-out 方式(Deltaron 1700; Fuji Photo Film)をもちいてニューロン電位活動伝播を

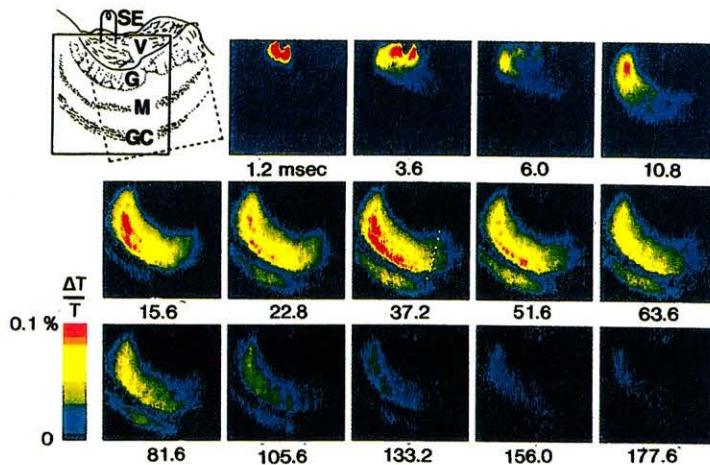


図19. oxonol 系色素 (RH 482/NK 3630) で染色したモルモット嗅球のスライス標本で、前鋤鼻神経層の電気刺激で誘発されたニューロン活動の光学的マッピング [42].

imaging 化した例を図19に示す [42]. モルモット嗅球 (accessory olfactory bulb) の slice 標本を oxonol 系色素 (RH 482/NK 3630) で染色し、前鋤鼻神経層 (anterior vomeronasal nerve layer) の電気刺激によって誘発されたニューロン活動の伝播過程を real-time optical imaging で示している. これによって、ニューロン活動の空間的/時間的なひろがりが見事に写しだされているのがわかる.

1) 無脊椎動物の神経節などでは一つの neuron から電位活動を光学的に記録することができるが [17,18], 脊椎動物における中枢神経系の neuron は小さいので、一つの photodiode がひろいあげるシグナルは単一ニューロンでなく、一つの photodiode の受光領域における複数のニューロン、すなわち、ニューロン群からのシグナルを detect している. したがって、脊椎動物の中枢神経系や神経節では、膜電位感受性色素をもちいた光学的計測法は単一ニューロンにおける計測ではなく、neural-population level における電位活動の解析に威力を発揮する. シグナルの fractional change は近似的に一つの photodiode の受光領域にふくまれる活動性ニューロンの数に比例す

る. なお、記録されるシグナルは焦点面からのシグナルが主体になっていると考えてよい. 一方、この性状を利用して、焦点面をずらしながら記録することによって、ニューロン応答領域の三次元的解析をすることができる [43]. これはいわゆる光学切片法 (optical sectioning) と同じ手法である.

2) slice 標本を測定対象とする場合、電位変化に応じた色素の吸光変化は、透過光 (transmittance) の変化として検出することになる. したがって、透過光の変化のなかには、細胞膜に吸着した膜電位感受性色素の吸光変化だけでなく、細胞の膨潤や収縮、細胞間スペースの変化、さらに slice の厚さの変化に起因する内因性の光散乱 (light scattering) の変化が紛れ込んでくる. これらには生理学的にはあまり意味のない artifacts のほかに、膜電位変化と共役した変化であることもあるので注意が必要がある. したがって、吸光変化の測定にさいしては光散乱の変化がふくまれていないかどうかを check する必要がある. その check の処方には①波長依存性を調べる; ②白色光でシグナルが検出されるか否かを調べる; ③染色しない標本で透過光変化がみられるか否かを調べる、という方法がある. 一方、膜電位感受性色素に

よる吸光変化と内因性の光散乱変化の同時記録によって、ラットの下垂体における興奮-分泌連関[44]や、ニワトリ胚脳幹で glutamate あるいは GABA によって誘発される脱分極と共役したニューロンの膨潤や収縮[45,46]が捉えられている。

3) imaging (画像化)では電位活動のひろがりの時間的/空間的パターンを視覚化して捉えるという点では便利であるが、光学的変化をすべていっしょにして画像化しているため、画像化された電位活動にとりこまれる成分、例えば活動電位とシナプス後電位などの判別ができない。したがって、シグナルの記録を併せて行い、imaging とシグナル波形を比較することが必要となってくる。さらに、画像の中には artifacts も noise もすべてふくまれてしまうので、それらを画像化している危険性もあることに細心の注意を払う必要がある。極端な場合、noise あるいは artifacts だけを画像化している cases が見受けられることも指摘しておく。

4) 電位変化の光学的計測で注意しなければならぬもうひとつの因子に光散乱によるシグナルや imaging の“ぼけ”(blurring)がある[35]。したがって、シグナルや画像の解析をするときこれを考慮する必要がある。特に画像化ではこれは serious である。光散乱強度は波長の  $n$  乗(一般に  $n > 4$ : Rayleigh 散乱のとき  $n = 4$ )に反比例するので、action spectra でピーク波長が2つある場合は、波長の大きい方が光散乱の影響は小さいことになる。

## §12. “まるごと”動物における脳皮質のニューロン活動

“まるごと”動物における脳皮質のニューロン電位活動の光学的計測は、まず(1983年, 1985年) L. B. Cohen の研究室で、サンショウウオの嗅球[47]、およびラットの体性感覚野と視覚野[48]でなされたが、これをきっかけとして膜電位感受性色素をもちいた in vivo 光学的計測法に新しい適用面が開かれた。

図20にラット体性感覚野皮質におけるニューロン活動を光学シグナルとして記録した例をあげる。まず、ラットの体性感覚領域に対応する部分の頭蓋骨を除去して露出した脳皮質を styryl 系色素 RH414: 2 mg/ml solution で100分間浸して染色し、一本のヒゲを動かすことによって体性感覚野に誘発されたニューロン電位応答を蛍光シグナルとして128ヶ所の分画領域から同時記録したものである。蛍光シグナルはダイクロイックミラーをもちいた落射蛍光法によって記録されている。このシグナル群は一本のヒゲの動きによる機械的刺激によってそのヒゲに対応する一つの barrel 皮質に誘発されたニューロン応答に対応する。なお、この記録では32回の刺激によって誘発されたシグナルを加算平均している。

“まるごと”動物の脳皮質を光学的計測の対象とするとき、serious な問題となるのは、動物の呼吸運動、心拍、血流に起因する noise と artifact である。図20に示した測定では、filter の使用と subtraction によって呼吸運動、心拍動による noise を除去する方法がとられている[47]。

図21に Kamino と Grinvald による記録例をあげて、noise の混入とその除去効果の実例を示す。顕微鏡の載物台を取り外し、styryl 系色素 RH414 で染色した視蓋部を対物鏡の下に位置するようにして、カエルを“まるごと”のまま固定した。この視蓋部をダイクロイックミラーを通して 540 nm の励起光で照射し、眼球の光照射刺激によって視蓋皮質に引き起こされた電位活動に対応する蛍光シグナル(波長 580 nm)を、 $10 \times 10$ -element photodiode array をもちいて96ヶ所の部位から同時記録した。視蓋皮質は、色素(2 mg/ml)をふくむ Ringer 液を5分間隔で120分間連続で皮質に滴下(約 1 ml)して染色した。

光照射刺激としては、持続時間 150 m 秒の白色光のフラッシュをライトガイド(光学繊維)を通して角膜に直接照射した。図21 A は、呼吸、

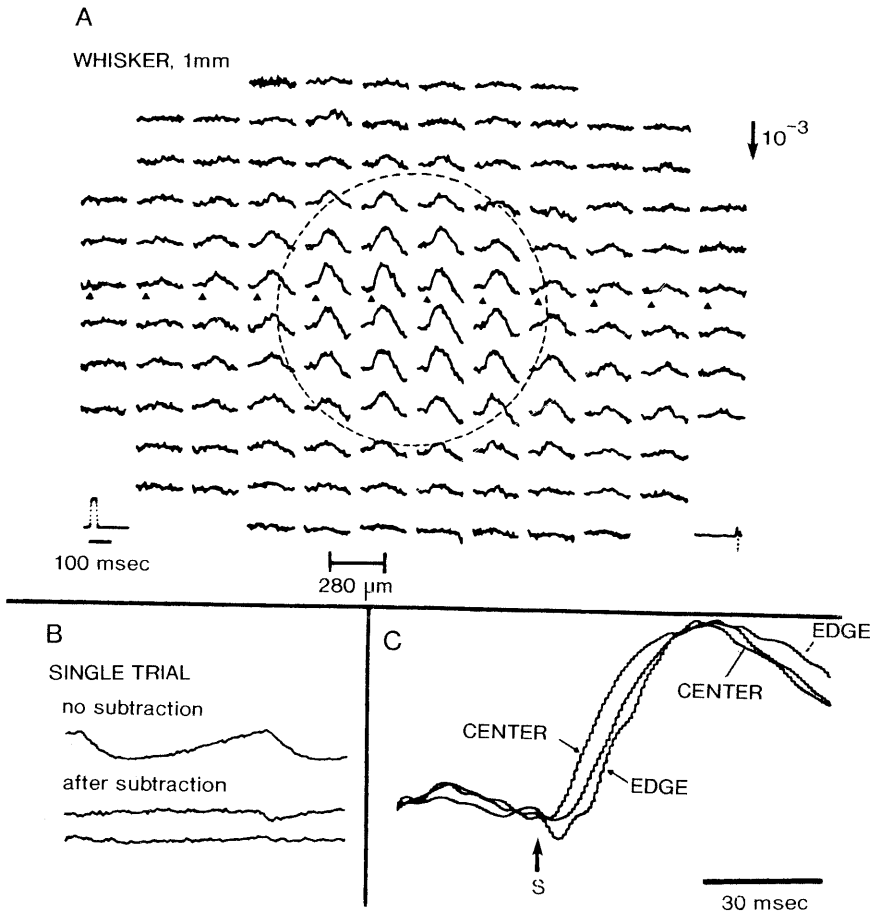


図20. A. 一本のひげの刺激によって、ラット大脳皮質の体性感覚野に誘発されたニューロン活動の光学的記録. ラットの大脳皮質を露出し、膜電位感受性色素 RH 414 (2 mg/ml) で100分染色した後、一本のひげ (whisker) を動かして (1 mm の偏位)、誘発されるニューロン活動を蛍光シグナルとして124ヶ所から同時記録している. 32回の加算平均処理とデジタルフィルタによりノイズの低減化を行っている. 光学的シグナルは、大脳皮質上の測定点の位置に対応して表示されており、上側が内側、左側が後側である. 測定領域の中央部で最も大きなシグナルが観測され、周辺に向かってシグナルは小さくなっている. なお、中心部と辺縁部の間には、シグナルの発現に delay がみられる (C). B. subtraction による拍動由来のノイズの除去 [48].

心活動、血液循環ともに保存したままの状態で見られる。また、脳皮質における微小血管では拍動流はみられず、乱流も生じていない。ただ、血管内における赤血球の不連続的な流れが顕微鏡下で観察できる。

示した記録で、ノイズは血管の走行に沿ってみられる。また、脳皮質における微小血管では拍動流はみられず、乱流も生じていない。ただ、血管内における赤血球の不連続的な流れが顕微鏡下で観察できる。

この noise を消去するため、心室にカニユーレを挿入してカエルを“まるごと”そのまま、酸素で飽和したリンゲル液を層流で全身灌流しながら測定することを試みた。その結果、図21

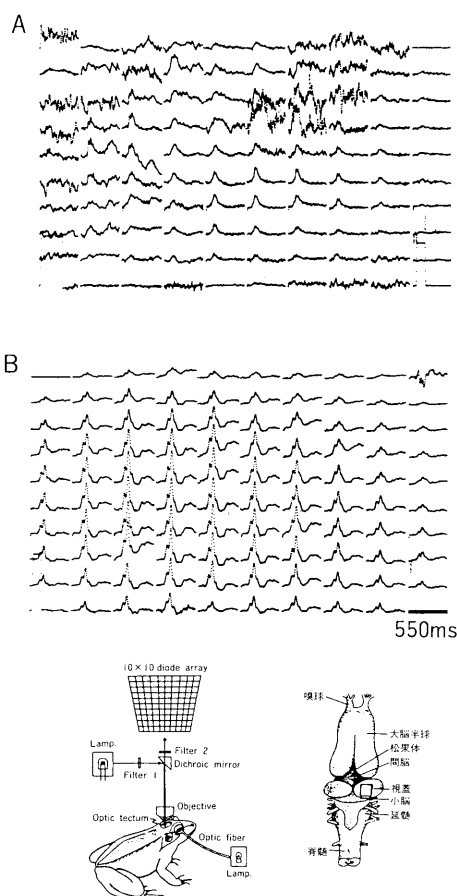


図21. カエル (*Rana ridibunda*) の右眼を光照射 (150 ms のフラッシュ) 刺激して右視蓋部 (optic tectum) の96ヶ所の領域から誘発電位を蛍光シグナル (励起波長 540 nm, 蛍光波長 580 nm) として同時記録したもの。ディテクターは  $10 \times 10$  エレメント・マトリックス型フォトダイオードを使用。シグナルの配列は記録位置の配列に対応する。視蓋部皮質はスタイリル系色素 (RH 414) で染色した。Aは生理的な血液循環状態で記録し、Bは Ringer 液の全身灌流状態で記録したもの。図の下側に測定方法、カエル脳の様式図を示す。視蓋の正方形で囲んだ部分からシグナルを検出した。(Kamino K. and Grinvald A., 1983)

Bに示したように noise は除去され、きれいなシグナルを記録することができた、このような灌流のもとでも、約3時間にわたりシグナル記録が可能であった。

ここに示したのは、noise 処方の一例であるが、計測対象、計測条件に応じて適切な対策を

講じる必要がある。それには、ルーチン化された処方箋はないといってよい。

もうひとつ、音刺激によって聴覚野に誘発された皮質ニューロン応答の光学的計測例をあげる。Taniguchi のグループは、モルモットに二つの短い音刺激 (持続時間 30 ms) を周波数の組み合わせを変えて 70~100 ms の間隔で与えたときに、スタイリル系色素 (RH 795) で染色した大脳皮質聴覚野 (anterior (A) および dorso-caudal (DC) 領域) に誘発された蛍光シグナルの解析をおこなった [49]。その結果、①第2音に対する応答は、第1音に対するものと比べ抑制される；②抑制は同一周波数の組み合わせで強く；③第2音の遅れが 50 ms 以下では応答はほぼ完全に抑制される；④異なった周波数の組み合わせでは抑制は同一周波数のときよりも弱い；さらに、⑤抑制の度合いには部位による違いがある、ということが見出された。

図22は、二音連続刺激によってモルモットの 大脳皮質聴覚野に誘発されたニューロン応答の光学的なマッピングである。「A」は144ヶ所から同時記録された蛍光シグナルで、点線はA領域 (左側) と DC 領域 (右側) の境界を示している。20 kHz の2音連続刺激 (20~20 kHz) では、第一音に比べて第2音に対応する応答がどの領域でもほとんど現れていないことが示されている。「B」は 20 kHz と 10 kHz の2音連続刺激に対する応答で、第2音に対応する応答が現れている。「C」はニューロン応答の大きさの疑似カラーマッピングで、右から 20~20 kHz, 20~10 kHz, 10~20 kHz, 10~10 kHz, 最上段が第一音 (Masker) に対する応答マップで、下の三つは 70, 90, 110 ms 遅れて与えられた第二音 (Probe) に対する応答が示されている。このマップで同じ周波数の組み合わせでは強い抑制により応答が見られないが、異なる周波数の組み合わせでは弱い応答が現れているのが見られる。

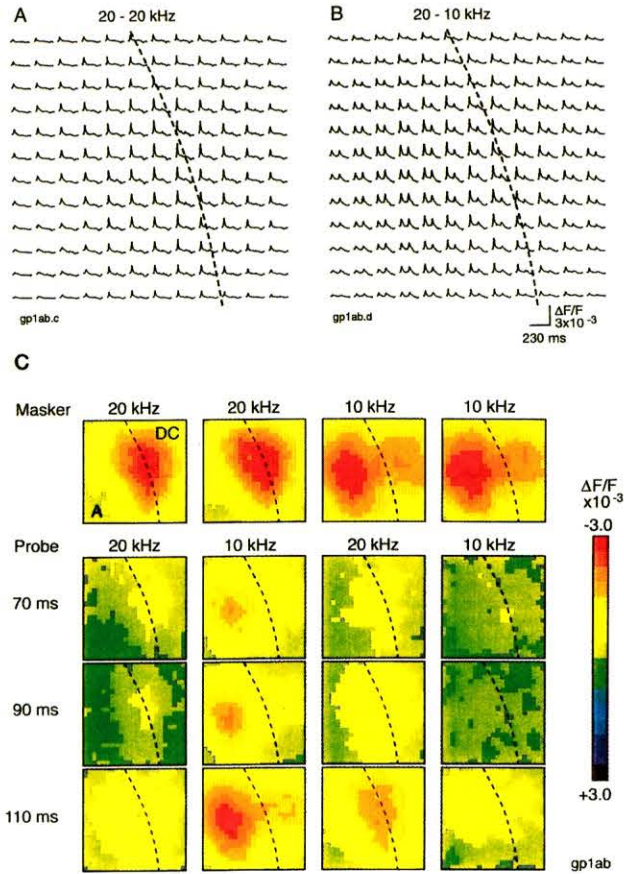


図22. モルモットに二音連続刺激を与えたとき大脳皮質聴覚野 (RH 795で染色) に誘発されたニューロン応答の光学的マッピング. A/B. 144ヶ所から同時記録された光学的シグナルを測定分画領域に合わせて表示. 点線はA領域(左側)とDC領域(右側)の境界. C. ニューロン応答の疑似カラーマッピング. 赤, 緑, 青は各々強い興奮, 静止レベル, 強い抑制を表している [49].

### §13. Embryonic Neuro-Electrophysiology

複雑きわまりない脳機能を解析しようとして, いろいろなアプローチが考えられ, また試みられているが, そのひとつとして, 個体発生的アプローチがある. しかしながら, この方向の研究は, 分子生物学的手法を基軸にして, おもに形態形成 (morphogenesis) に集中しており, “形態形成” に対応する “機能形成” の研究は立ちおくらせている. じっさい, “morphogenesis” というコトバはあるが, これに対応した “functiogenesis” というコトバをわれわれはまだ持ち合わせていない.

これは, 初期胚における中枢神経系のニューロンやグリア細胞がきわめて微小で, かつ機械的に脆弱であり, 微小電極を刺入することができないため, 従来の電気生理学的方法の適用が技術的にきわめて難しいか, あるいは, ほとんど手がつけられないことに起因している. またパッチクランプ法の適用もうけつけない. いわゆる生理学的という意味での, 機能発生/機能形成, を研究しようとする場合, 幼若胚の中枢神経系は, まことにやっかいなしろものである, ということである. そこで, われわれは, 個体発生にともなう中枢神経系の機能発生/機能形成/機能構築過程, を解析するため, 膜電位感

受性色素法による膜電位活動の光学的計測を導入した。

われわれが機能発生/機能形成/機能構築の光学的計測/イメージングとして、まず選んだ対象は、ニワトリ、ラット胚における神経節、脳神経核である。現在では、脊髄、さらに大脳皮質にまで及んでいるが、ここでは、脳幹延髄と脊髄についての測定例をあげることにする。

迷走神経応答[50,51]: 図23は孵卵8日目のニワトリ胚から摘出した脳幹を merocyanine-rhodanine 系の膜電位感受性色素(NK 2761)で

染色したあと、吸引電極で迷走神経を電流刺激( $8 \mu\text{A}/5 \text{ msec}$  の脱分極性の矩形波電流)したとき延髄部に誘発されたニューロンの電位応答を、1020素子のフォトダイオードアレイをもちいて光学的に1020ヶ所の分画領域から同時記録したものである。この図で、「A」は摘出した intact 脳幹標本、「B」は迷走神経の位置(レベル)で切り出したスライス標本からの記録である。ニューロン応答は刺激した側の延髄部に限局した領域に発現している。DiI をトレーサーとした形態観察との比較から、この応答領域は

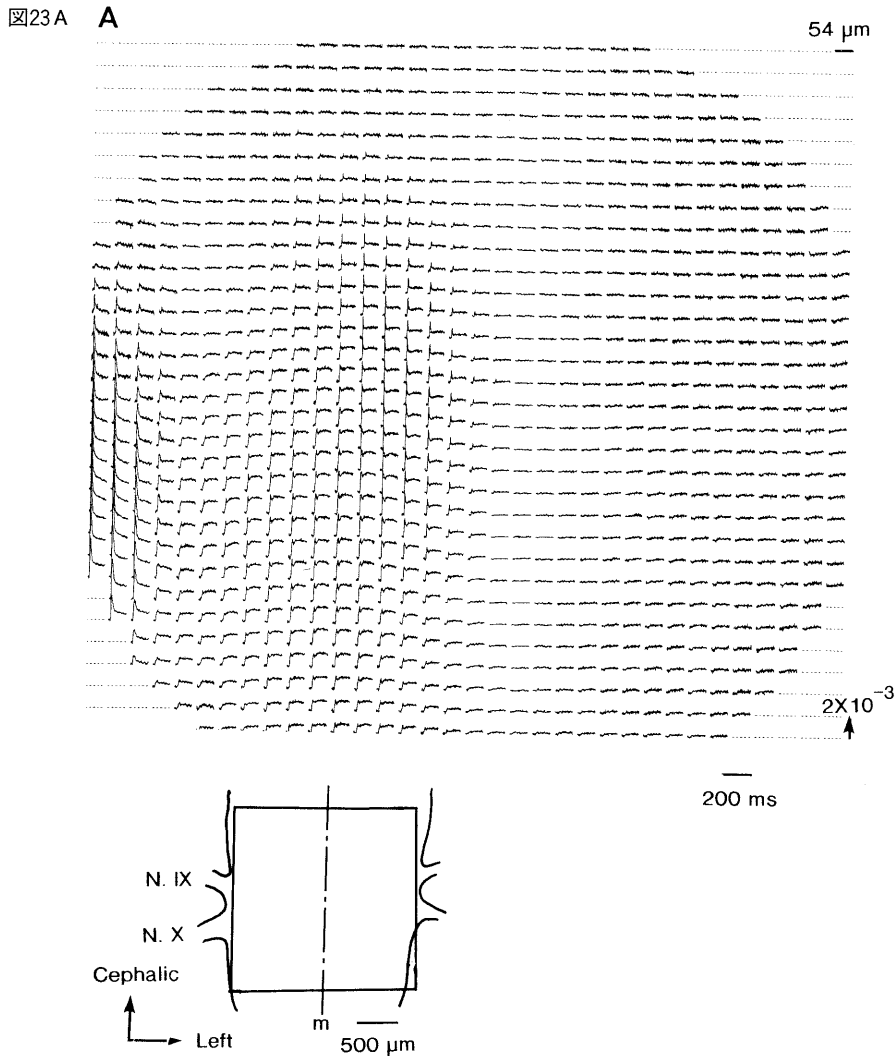


図23B

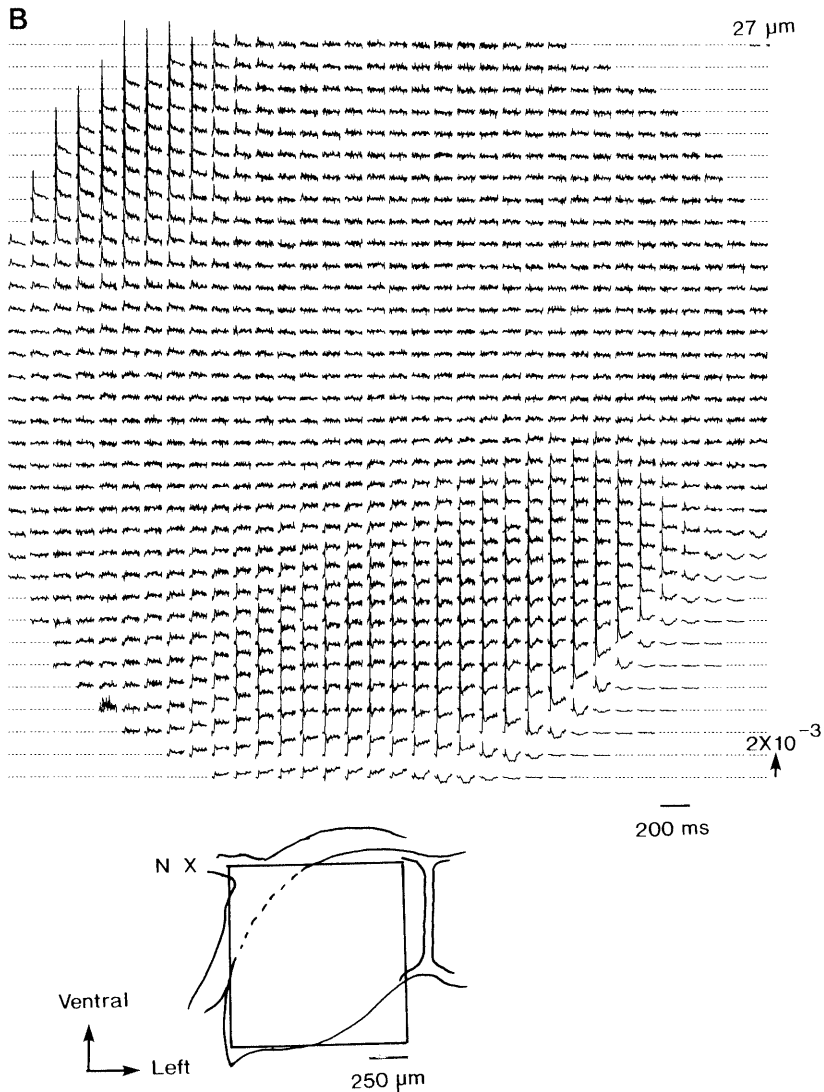


図23. A. 孵卵8日のニワトリ胚から摘出した脳幹のインタクト標本で、右迷走神経を吸引電極で刺激( $8 \mu\text{A}/5 \text{msec}$ )したときに誘発された光学的シグナルを、1020チャンネル同時測定システムにより、図左下に示した領域から同時に検出した。一回の掃引で得られたシグナルを示す。B. 迷走神経レベルで切り出したスライス標本についてAと同じ刺激法によって誘発された光学的シグナルの1020ヶ所からの同時記録。A, B, とも標本はNK 2761で染色[39].

孤束核と迷走神経背側運動核に対応しており、それらは部分的に重なり合っていることが示唆された。

この記録から、誘発された光学的シグナルは、速いスパイク状の成分に加えて、それに続く時間経過の遅い成分の2つの相(phase)により構

成されている。速いスパイク状の成分は、活動電位由来のシグナルであるが、これに続く時間経過のゆっくりした遅いシグナルは、1) 連続刺激で次第に減衰し(シナプス疲労に対応)、2) 細胞外液からの  $\text{Ca}^{2+}$  の除去、 $\text{Mn}^{2+}$  や  $\text{Cd}^{2+}$  の添加によって抑制あるいは消滅する。

このことから、この遅いシグナル成分は孤束核におけるシナプス後電位に対応していることが結論された。

この遅いシグナルは、キヌレン酸 (kynurenic acid) で特異的に抑制され、さらに、APV によりその後期相 (later phase) が、CNQX によりその初期相 (early phase) が、それぞれ特異的に抑制される。これらのことから遅いシグナルはグルタミン酸を伝達物質とする興奮性のシナプス後電位 (EPSP) に対応し、そのシグナルの初期相 (early phase) は non-NMDA 型、後期相 (later phase) は NMDA 型の受容体機能に対応しており、この発生段階で、NMDA および non-NMDA タイプの受容体がすでに分化形成されていることが示された。

一方、迷走神経線維束は運動神経線維と知覚神経線維をふくんでおり、これを吸引電極で刺激するとき、運動神経に対しては逆行性刺激 (antidromic)、知覚神経線維に対しては順行性刺激 (orthodromic) になる。したがって、迷走神経背側運動核に対応する領域で記録される速いスパイク状のシグナルは、運動神経細胞における逆行性の活動電位であり、孤束核に対応する領域におけるスパイク状のシグナルは、知覚神経終末における順行性の電位活動であることを示している。

ここに示したように、生理学的、形態学的、薬理学的の処方を用いることによって、シグナルの波形を解析して、その生理学的構成要素を明らかにすることができる。

図24はラット胚延髄で迷走神経刺激によって誘発される活動電位とシナプス後電位の“embryogenesis”を捉えたものである。この図

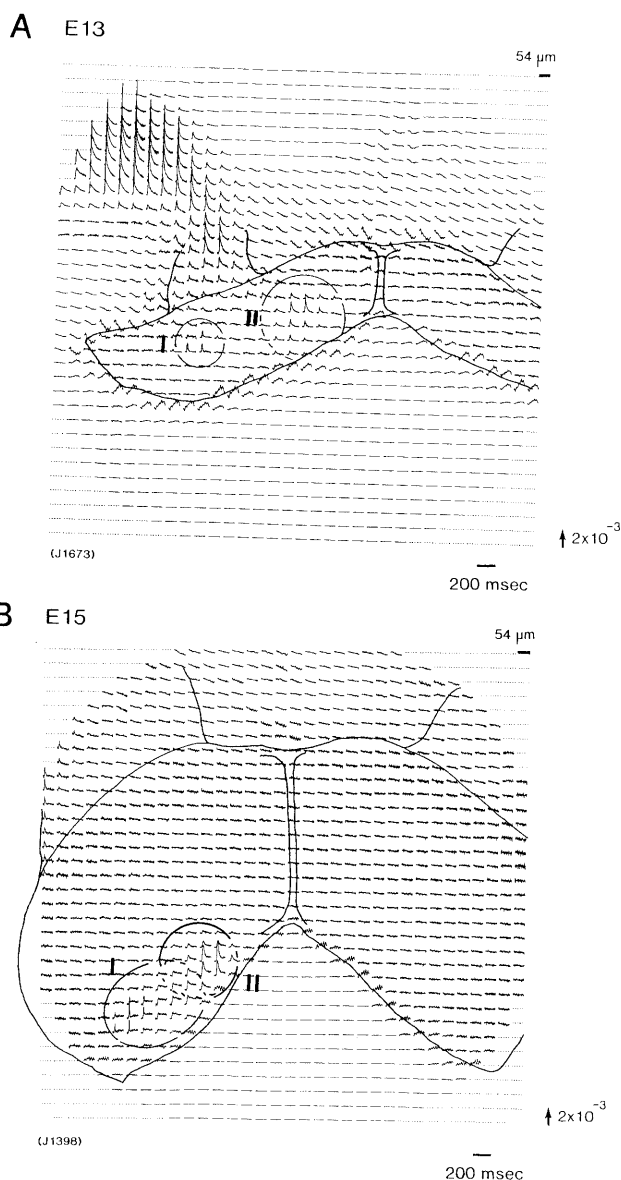


図24. 胎生13日目および15日目のラット胚から切り出した脳幹スライス標本で、迷走神経を吸引電極で刺激したときに、延髄に誘発された光学的シグナルの1020チャンネル同時測定例(A: 胎生13日, B: 胎生15日)。図Aの丸で囲んだI, IIの領域は、それぞれ孤束核、迷走神経背側運動核に対応する[51]。

で、「A」は胎生13日目のラット胚の脳幹から迷走神経の位置で切り出したスライス標本をメロシアン・ローダニン系色素で染色し、迷走神経を電流刺激( $8 \mu\text{A}/5 \text{ msec}$  の脱分極性の矩形波電流)したとき延髄部に誘発されたニュー

ロン活動の記録である。この記録で、刺激した側の延髄背側に二つの応答領域(領域Ⅰ, 領域Ⅱ)があることが識別できる。

迷走神経刺激によるニューロン応答は、ラット胚では胎生期12日にはじめて発現するが、12~14日目の胎生期における光学シグナルはスパイク状のシグナルだけであり、これは、電気生理学的、薬理学的特性から、刺激により誘発された活動電位のシグナルであることが示された。さらに、形態観察との比較から、二つのニューロン応答領域は、孤束核(領域Ⅰ)および迷走神経背側運動核(領域Ⅱ)に対応しているこ

とが示された。

個体発生の段階がすすみ、胎生15日目以降のラット胚になると、刺激によって誘発される光学的シグナルは、速いスパイク状の成分と、時間経過の遅い成分の2つの相(phase)により構成されるようになる。図24Bは胎生15日目のラット胚で記録した光学的シグナルである。速いスパイク状の成分は、活動電位由来のシグナルであるが、これに続く時間経過のゆっくりした遅いシグナルは、先述のニワトリ胚と同じように、孤束核におけるシナプス後電位に対応していることが明らかにされている。

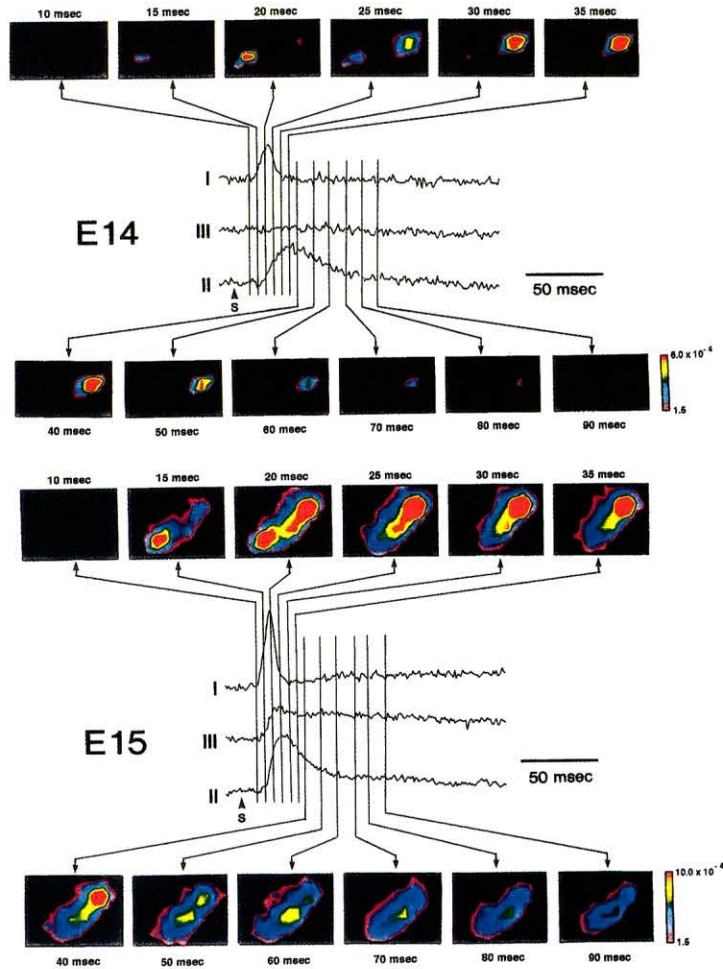


図25. ラットの胎生期の脳幹スライス標本で、迷走神経を吸引電極で刺激したときに、延髄に誘発された光学的シグナルの spatiotemporal mapping (A: 胎生14日, B: 胎生15日). 3ヶ所で得られた光学的シグナルと比較してある [51].

一方、胎生15日目のラット胚では孤束核、迷走神経背側運動核に加えて形態的には疑核が形成されていることが観察されるにもかかわらず、これに対応するニューロン応答はまだ発現していない。これは、「形態形成」と「機能形成」は時間的にずれて進行することを示している。ここに、「機能形成」と「形態形成」との間の相関性におもしろさがある。「形態形成」がさらに「機能的に組織化される」ことが「機能形成」につながるのであろう。

図25には、胎生14日目と15日目のラット胚脳幹スライス標本で迷走神経刺激により延髄に誘発されたニューロン活動を疑似カラー表示で示した。この疑似カラーマップで、迷走神経刺激により延髄に誘発されたニューロン応答は、発現位置とシグナル波形との比較から、まず孤束核に発現し、次第に広がっていくこと、背側運動核における逆行性の活動電位は孤束核における順行性の活動電位よりやや遅れて発現することを示している。

脊髄ニューロン回路の形成 [52]：図26は、孵卵8日目 (Hamburger-Hamilton stage 33) のニワトリ胚から切り出した脊髄のスライス標本で、脊髄神経後根 (the 5th lumbosacral spinal

nerve) を刺激することによって脊髄神経後根→脊髄後角→中間帯→脊髄前角という経路に沿って誘発されたニューロンの電位活動を光学的シグナルとして多数分画領域から同時記録し、それをイメージング化したものである。刺激後6 m 秒後には後角にニューロン活動が誘発され、それは次第に広がっていき、60 m 秒後には、ニューロン活動は前角へ伝えられ、そこでまた広がっていく過程がよみとれる。光学的多領域同時計測法で得られる記録ではそのほとんどが、まだ興奮の広がりパターンを捉えるだけにとどまっているが、ここに示した記録はニューロン回路に沿った電位活動を記録することに成功した例のひとつである。またこの実験では、この発生段階で、mono-synaptic connections と poly-synaptic connections が形成されていること、およびそれらの分布領域がはじめて明らかにされた。

#### §14. 心電活動

multiple-site optical recording methods は心臓における興奮波伝播のマッピングやパターン解析、不整脈波の解析に適用されている [e. g. 21, 53-57].

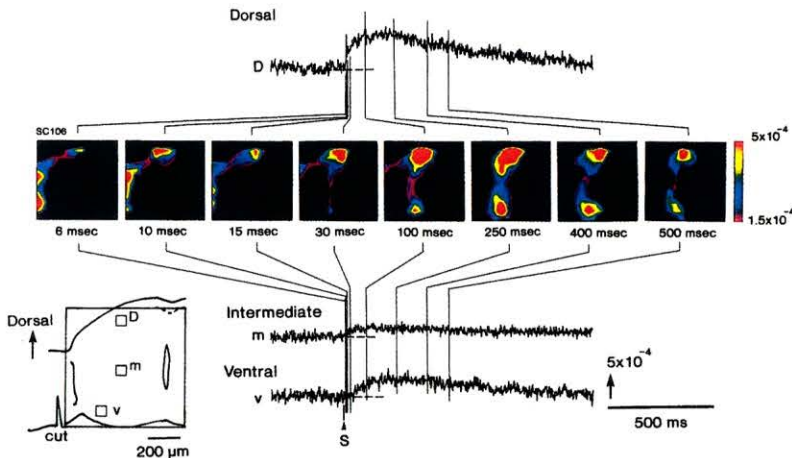


図26. 孵卵8日目 (H-H stage 33) のニワトリ胚から LS-5 のレベルで切り出した脊髄のスライス標本で脊髄後根の刺激によって、脊髄神経根→脊髄後角→中間帯→脊髄前角という経路に沿って誘発されたニューロン電位活動の光学的イメージング・マップ [52].

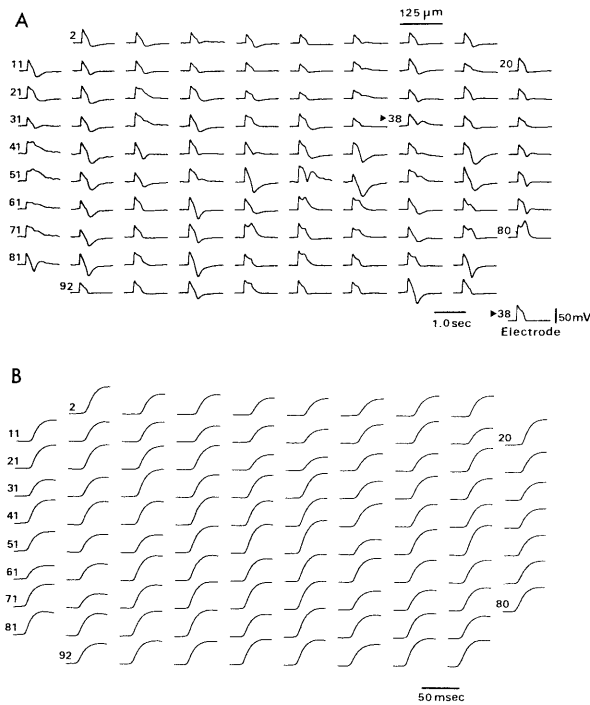


図27. カエル心房の95ヶ所の領域からの自発性活動電位の同時記録. 心房はNK 2761で染色して700 nmの入射光で測定. A, Bともにマトリックス表示で, シグナルの並びはフォトダイオードのエレメントの並びに対応する. Bは, 掃引時間を速くして記録[21].

図27は摘出した心房標本をメロシアン・ローダニン系色素(NK 2761)で染色し, 自発性活動電位を光学的(吸光)シグナルとして95ヶ所から同時記録した例である[21]. 測定は低濃度の $\text{Ca}^{2+}$ をふくむRinger液中でなされているが, 記録「A」でみられるように, 光学シグナルは活動電位に対応する光学シグナルとそれに続く小さな収縮に由来する光散乱変化によるシグナルの2つの成分をふくんでいる. 図27Bに示した記録は, sweep時間を早くして(図27Aに示したsweep時間の20倍)得られたもので, 活動電位由来のシグナルの初期相だけがトレースされており, 活動電位の立ち上がりのタイミング(delay)を比較することができる. photodiode arrayの標本上の位置をずらすことによって, 128ヶ所の同時記録を4~5部位で行い, それを組み合わせると, 自発性活動電位のdelayの違いから, 興奮波の伝播パターンを等時線で示したのが図28である. ここで, 活動電位が最

も早く立ち上がっている領域, すなわちペースメーカー部位を基準としてシグナルの立ち上がりの時間のdelayを計測している. このマッピングはペースメーカー部位に発生した自発性の興奮波伝播の様子をよく表している.

心電活動の光学的計測は, 摘出した“まるごと”の心臓(intact-heart preparation)でもなされている. 図29はG. Salamaらによってもちいられている計測法である[22 b]. 膜電位感受性色素で染色した心室の外側壁にガラス板を押しつけておいて, ダイクロイックミラーをもちいて光照射(励起光)し, 電位活動に由来する蛍光変化を $12 \times 12$ -element photodiode arrayをもちいて検出している. この方法は, ガラス板を押しあてることによって心臓の拍動を抑制した準等尺性収縮の状態で蛍光変化を計測できること, 心臓を灌流しながら計測できるという利点がある. 図30は, この方法をもちいて得られた記録例である. モルモットの心臓をLangen-

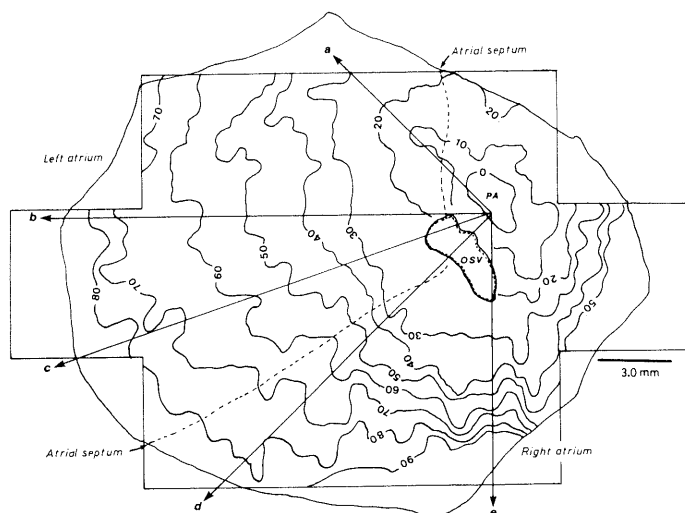


図28. 発性活動電位の多領域同時計測の記録から作成した興奮波の等時線マップ. 方向によって興奮伝播の速さに違いがみられて, b, c方向で速く, e方向でゆっくり伝播している [21].

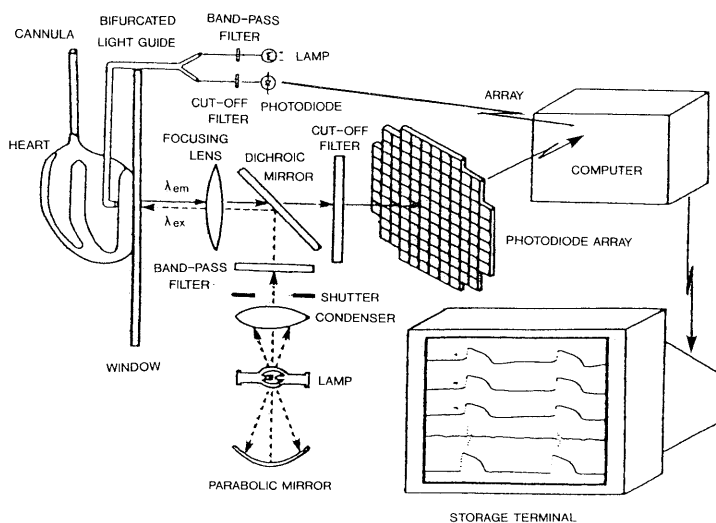


図29. 摘出した“まるごと”の心臓 (intact heart preparation) の心電活動の光学的計測システムの模式図 [22b].

dorff 灌流法によってスタイリル系色素 (RH 421) で染色し, 励起波長  $520 \pm 20 \text{ nm}$ , 蛍光 (emission) 波長  $645 \text{ nm}$  で, 自発性活動電位由来の蛍光シグナルを124ヶ所から同時記録している.

### §15. Ontogenetic Cardio-Electrophysiology

個体発生において心臓は他の器官に先がけてもっとも早く機能を開始する器官である. 器官としての心臓の形成は, まず, 左右一対の中胚葉由来の心臓原基が融合することから始まる. ニワトリ胚でこの心原基融合が始まるのは, 7

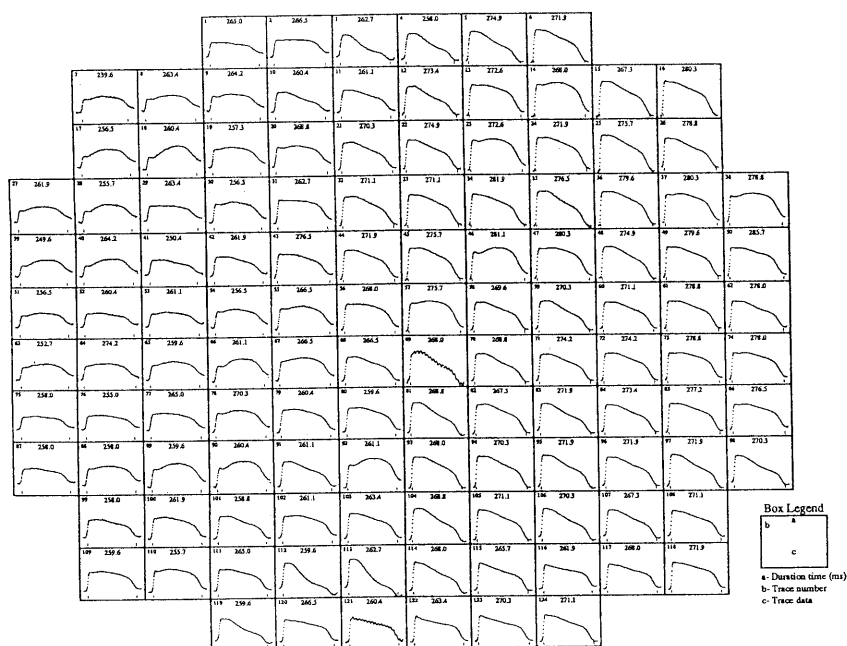


図30. 抽出した“まるごと”の心臓(スタイリル系色素/RH421で染色)の心電活動を蛍光シグナルとして124ヶ所の分画領域からも同時記録した例. 励起波長  $520 \pm 20$  nm, 蛍光波長 645 nm [22b].

体節期中期(ふ卵25~28時間)であり, これによってプリミチヴな管状心が形成され, 9体節期中期(ふ卵約30時間)になると最初の自発的でリズムカルな心拍動が開始する. この心臓形成の初期相では, 心臓を形づくる細胞は, きわめて小さく, 脆弱であるため, 微小電極を刺入する事が不可能であり, 通常の電気生理学的手法を適用できない. このような方法論的制約のため, 心機能の初期発生についての研究は完全に立ち遅れてきた.

そこで, Kamino のグループは, これに膜電位の光学的測定法を適用して, 心機能の初期発生, 特に電気活動とそれに関連した機能の発生, 形成過程を追跡し, 自発性活動電位の発生学的起源, ペースメーカー電位の発達とリズム形成, ペースメーカー領域の形成と局在化, 興奮伝播パターンの形成, 興奮-収縮連関の形成と心拍動の開始などについて明らかにすることができた[58,59].

自発性活動電位の起源[60]:心筋細胞におけ

る自発性の電気的興奮能形成の個体発生的起源については, アリストテレスが「心機能は発生はかなり早い時期に発現する」と示唆して以来, その正確な時期は捉えられないまま長い間謎につつまれていたが, それは, 光学的測定法を導入したわれわれの研究ではじめて明らかにされることになった.

図31は6体節期の心臓原基から測定されたものである. 記録された光学的シグナルは, きわめて小さく, これは電位活動が小さく, かつ活動性細胞数が少ないことを反映している. さらに光学的シグナルは限局した狭い領域に発現しているが, これは活動性細胞が場所的に限局して発現していることを示しており, シグナルが同期していることは, これらの活動性細胞が電気的に連絡し合っていることを示している. このような事実から, 未融合の心臓原基にペースメーカー能を持った細胞群がすでに発現していることがはじめて明らかになった.

ペースメーカー領域の微小測量[61]:心臓原

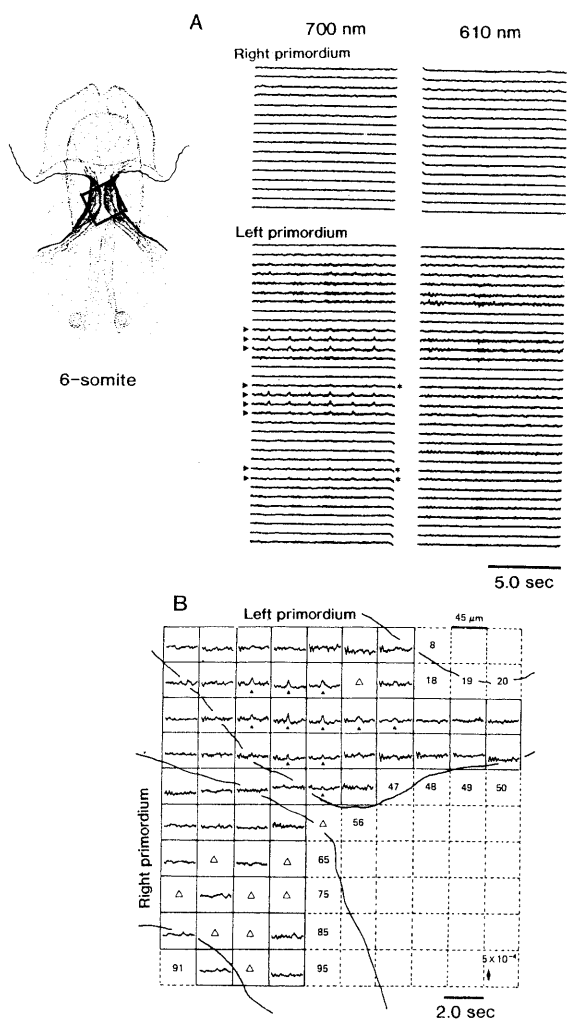


図31. 6体節期ニワトリ胚の融合以前の心臓原基から光学的に記録された自発性活動電位。これによって、心臓原基細胞にリズムカルな自発性の電氣的興奮能が形成されていることが初めて示された。Aは10秒間の連続記録(波長700nm)で、リズムカルなシグナルが左心臓原基から記録され、これは610nmで消失していることがわかる。Bはシグナルを photodiode の並びに合わせて配列してある [60].

基が融合した後の7体節期から9体節期にかけて、自発性の活動電位はしだいに発達し、心臓全体にわたって広がるようになる。

光学的多領域同時記録によってトレースされる自発性活動電位に由来する光学的シグナルの立ち上がりには、測定領域ごとに興奮の伝播に伴ってわずかなタイミングの違い(delay)がみられる。活動電位が最も早く立ち上がっている領域がペースメーカーに対応し、ここから興奮

波が心臓全体に伝播している。このペースメーカー領域のより詳しい解析を行うため、測定システムの光学系の拡大倍率を上げて、より高空間分解能の測定を行った。

図32は、9体節期初期のニワトリ胚で、心房原基を含んだ心臓の左側の部分から自発性活動電位を光学的シグナルとして同時記録した例である。縦横10×10の枠はフォトダイオードアレイの各エレメントの並びに対応している。活動

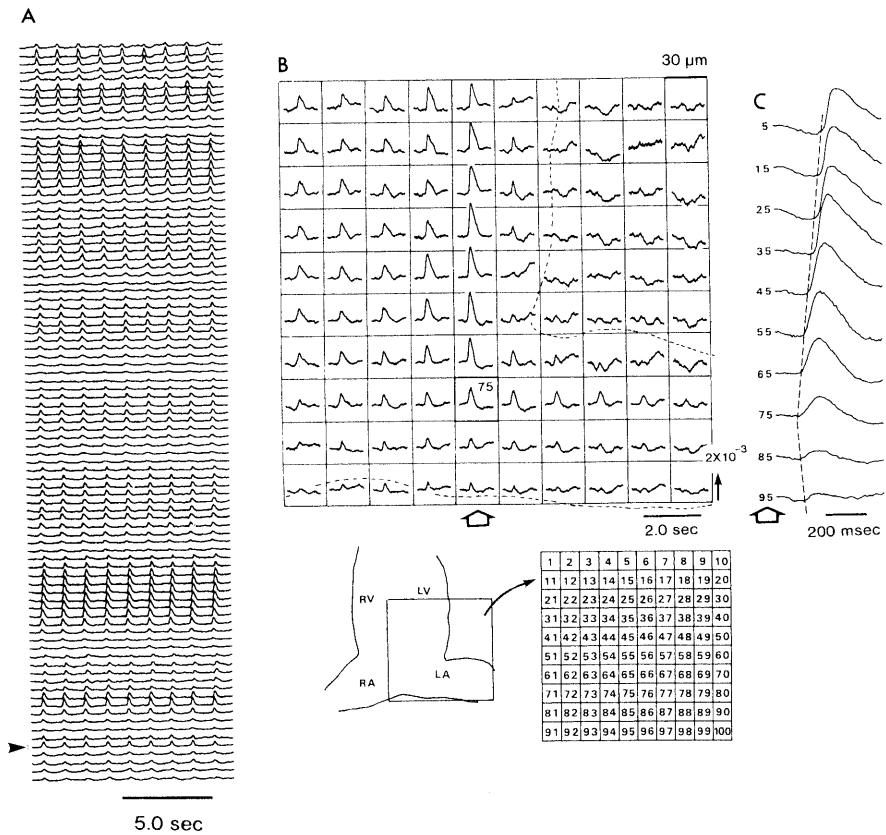


図32. A. 9 体節期ニワトリ胚心臓の多数部位から光学的に同時記録した自発性電位活動の10秒間の連続記録. 矢印の部位(トレース)で活動電位は最初に発現し, 他の部位へ広がっているのがわかる. B. シグナルを photodiode の位置に合わせて配列. 75の位置に最初の活動電位が発現している. C. 部位75をふくむ左から5行目の10ヶ所の領域で記録されたシグナルの立ち上がり時間の比較[61].

電位は, 左の心房原基の領域75において最も早く立ち上がっており, ペースメーカーはこの領域の周辺に存在するものと考えられる.

この記録から, われわれは次のような手順で, ペースメーカー領域の位置と大きさを同定した. これをわれわれは「微小測量」法と名づけた.

1) 各測定領域における光学的シグナルの立ち上がりのタイミングの delay を領域75を基準として測る.

2) 各測定領域の中心と領域75の中心との直線距離を横軸にとり, 縦軸に delay をとってプロットを行う(図33). このプロットで, シグナルの delay と距離の間には直線関係が成り

立っていることから, 興奮波は, ペースメーカーから心臓のすべての方向に向かって, 同心円状に等速度で伝播していることがわかる(図33). 直線の勾配の逆数から興奮の伝播速度が求められる. この心臓では 1.3 mm/sec である.

3) さらに, この直線は原点を通らず, 横軸を原点から離れた点でよぎっている. このことは興奮波の発生する場所がある領域を持っていることを示している. そこで, 直線を横軸に外挿すると, その外挿値は  $21 \mu\text{m}$  である. したがって, この例では, ペースメーカー領域の広さは約  $1,400 \mu\text{m}^2$  となる.

このようにして, 8~9 体節期の100例の鶏胚心臓について, ペースメーカー領域の大きさ

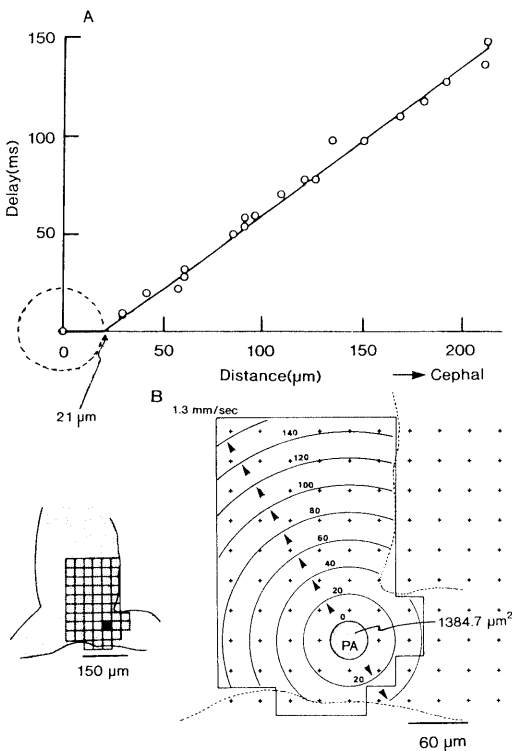


図33. 図32で示した記録をもとにして、興奮波が最初に発現した位置からの直線距離に対して興奮波の立ち上がり時間(delay)をプロットして作成したグラフ(A). および興奮の等時線マップ(B). PAがpacemaking areaに対応する[61].

を測った結果、ペースメーカー領域の半径は、8体節期で  $25.2 \pm 5.3 \mu\text{m}$  ( $n = 35$ ), 9体節期で  $24.9 \pm 5.1 \mu\text{m}$  ( $n = 65$ ) という値が得られた。このことから、この時期の心臓のペースメーカー領域の大きさは、 $1,200 \sim 3,000 \mu\text{m}^2$  であることがわかる。この結果は、8体節期から9体節期にかけて、心臓全体の大きさが序々に成長してゆくのに対し、ペースメーカー領域の大きさは余り変化しないことを示している。

形態学的には、この時期の心臓は、ほぼ単層に並んだ直径約  $5 \mu\text{m}$  の心筋細胞の層から形成されていることが電顕像から得られている。したがって、心臓形成初期相においては、ペースメーカー領域は、60~150個の細胞から成るシート構造で構成されていると考えることができる。このことは、心臓形成期においても、ペー

スメーカーは単一の細胞ではなく、ペースメーカー能を持った複数個の細胞が機能的に強く結合した細胞群によって構成されていることを示している。

ペースメーカー領域の位置は、7~8体節期においてはまだ固定的ではなく、流動的であるが、発生段階がすすみ、9体節期になると左の心房原基に局在するようになり、11体節期になると、さらに左静脈洞原基に移動してくる[62].

このようなペースメーカー領域の形成、局在化には、ペースメーカー電位の場所的勾配が重要な役割をしていることも明らかにされた[63-65].

#### §16. 補遺：光学計測により最近提示された新しい概念/仮説

膜電位感受性色素をもちいた細胞膜電位活動の光学的計測法による実験結果から最近提示された興味ある概念、仮説のいくつかについてつけ足しておく。

軟体動物アブリシアはエラ周辺の刺激によってエラを引っ込めるという反射行動を示す。L. B. Cohen のグループは、サイフォン(siphon)皮膚の軽い機械的刺激(light-mechanical touch)や感覚神経の電気刺激によって、神経節(abdominal, pleural, pedal, cerebral ganglia)内のニューロン集団(neural population)に誘発される電位活動を光学的に同時計測することによって、神経節内における情報処理は単純な集中回路(dedicated circuit)ではなく分散システム(distributed system)であるという概念(仮説)を打ち出した[66,67]. さらに、これに関連して感覚神経のくり返し刺激による神経節内におけるニューロン応答の trial-to-trial variations とその整合性(consistency)についても新しい概念を提示している[66].

中枢神経系における情報処理機構に関する研究で、単一ニューロン活動を解析するか、ニューロン集団の相互活動を解析するか、のいずれの場合でも、従来の研究は、ほとんどが、なんらかの刺激を与えたときのニューロン活動の変化

を解析してきた。そして、その変化の基準となる刺激前の自発性活動は、ランダムな定常状態であることを前提としている [68]。A. Grinvald のグループは膜電位感受性色素をもちいた光学的計測によって、ネコの視覚野のニューロン集団の活動状態を多数領域から同時記録して得られた結果の解析から、この従来の考え方(仮定)に対して疑問を投げかけ、新しい概念を提示している [69,70]。すなわち、ニューロン集団の周期的な相関活動”ongoing activity”は、刺激のないときでも常に自発的に発生しており、その同調性はそのニューロン集団内だけでなく、かなり離れた集団の間でもみられることを示した。これは、中枢神経における情報処理機構の研究に新しい視点を与えたものとして注目してよい。

一方、われわれのグループは、孵卵 7~10 日のニワトリ胚脳幹に、従来明らかにされている GABA リセプター (GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub>, GABA<sub>C</sub>) とは性状の異なる新しい GABA リセプター (GABA<sub>D</sub>-receptor と名づけた) が存在する可能性を示した [71]。さらにラット胚における延髄で、新しいタイプの Ca-spike を見出し、新しい Ca<sup>2+</sup>-channels の存在を示唆している [72]。これらは、中枢神経系の発生過程で何らかの役割りを果たしている可能性があり、光学的計測ではじめて見出されたものとして注目してよいだろう。

本稿から読みとっていただけると思うが、電位活動の光学的計測法は、決して固定的に体系化されたものではなく、これからも改良が加えられながら、その適用範囲は広がっていくべき実験技術であるといつてよい。したがって、これまでの方法にこだわることなく、新しい色素の合成、計測と解析に必要なコンピューター・プログラミングをふくめて新しい計測システム、データ解析法を開発していくべきであり、そこが腕の見せどころともなる。補足的に膜電位感受性色素をもちいた光学的計測についての最近のレビューを 2 つつけ足しておく [73,74]。

## 参 考 文 献

- 1) Cohen LB : Changes in neuron structure during action potential propagation and synaptic transmission. *Physiol. Rev.* **53**, 373-418, 1973
- 2) 神野耕太郎 : 膜電位の光学的検出とポテンシャル・プローブ. *生物物理* **18**, 105-119, 1978
- 3) 神野耕太郎 : ニューロン活動の光学的測定背景と展開. *神経科学レビュー* 5 (伊藤正男, 橋本博太郎編) pp. 155-187, 1991
- 4) Cohen LB, Salzberg BM, Davila HV, Ross WN, Landowne D, Woggoner AS & Wang CH : Changes in axon fluorescence during activity : molecular probes of membrane potential. *J. Memb. Biol.* **19**, 1-36, 1974
- 5) Ross WN, Salzberg BM, Cohen LB, Grinvald A, Davila HV, Woggoner AS & Wang CH : Changes in absorption, fluorescence, dichroism, and birefringence in stained giant axons : optical measurement of membrane potential. *J. Memb. Biol.* **33**, 141-183, 1977
- 6) Gupta RK, Salzberg BM, Grinvald A, Cohen LB, Kamino K, Leshner S, Boyle MB, Woggoner AS & Wang CH : Improvements in optical methods for measuring rapid changes in membrane potential. *J. Memb. Biol.* **58**, 123-137, 1981
- 7) Grinvald A, Kamino K, Leshner S, Cohen LB, Wang CH & Woggoner AS : Larger fluorescence and birefringence signals for optical monitoring of membrane potential. *Biophys. J.* **21**, 82a, 1978
- 8a) Grinvald A, Hildesheim R, Farber IC & Anglister L : Improved fluorescent probes for the measurement of rapid changes in membrane potential. *Biophys. J.* **39**, 301-308, 1982
- 8b) Grinvald A, Salzberg BM, Lev-Ram V & Hildesheim R : Optical recording of synaptic potentials from processes of single neurons using intracellular potentiometric dyes. *Biophys. J.* **51**, 643-651, 1987
- 9) Woggoner AS & Grinvald A : Mechanisms of rapid optical changes of potential sensitive dyes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **303**, 217-242, 1977
- 10) Woggoner AS : Dye indicators of membrane potential. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **8**, 47-68, 1979
- 11) Loew LM : Design and characterization of electrochromic membrane probes. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **6**, 243-260, 1982
- 12) 安井茂夫 : 膜電位感受性色素. 「感光色素」日本感光色素研究所編, pp. 117-133, 1997
- 13) Morad M & Salama G : Optical probes of membrane potential in heart muscle. *J. Physiol.* **292**, 267-295, 1979
- 14) Ross WN & Reichardt LF : Species-specific effects on the optical signals of voltage-sensitive dyes. *J. Memb. Biol.* **48**, 343-356, 1979
- 15) Cohen LB & Salzberg BM : Optical measurement

- of membrane potential. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **83**, 35-88, 1978
- 16) Salzberg BM, Obaid AL & Bezanilla F : Microsecond response of a voltage-sensitive merocyanine dye : Fast voltage-clamp measurements on squid giant axon. *Jpn. J. Physiol.* **43** (suppl. 1), S37-S41, 1993
  - 17) Salzberg BM, Davila HV & Cohen LB : Optical recording of impulses in individual neurones of an invertebrate central nervous system. *Nature* **246**, 508-509, 1973
  - 18) Grinvald A, Salzberg BM & Cohen LB : Simultaneous recording from several neurones in an invertebrate central nervous system. *Nature* **268**, 140-142, 1977
  - 19) Kamino K, Hirota A & Komuro H : Optical indications of electrical activity and excitation-contraction coupling in the early embryonic heart. *Adv. Biophys.* **25**, 45-93, 1989
  - 20) Sakai T, Hirota A, Momose-Sato Y, Sato K & Kamino K : Optical mapping of conduction patterns of normal and tachycardia-like excitations in the rat atrium. *Jpn. J. Physiol.* **47**, 179-188, 1997
  - 21) Komuro H, Sakai T, Hirota A & Kamino K : Conduction pattern of excitation in the amphibian atrium assessed by multiple-site optical recording of action potentials. *Jpn. J. Physiol.* **36**, 123-137, 1986
  - 22a) Loew LM, Cohen LB, Dix J, Fluhler EN, Montana V, Salama G & Wu J-Y : A naphthyl analog of the aminostyryl pyridinium class of potentiometric membrane dyes shows consistent sensitivity in a variety of tissue, cell, and model membrane preparations. *J. Memb. Biol.* **130**, 1-10, 1992
  - 22b) Kanai A & Salama G : Optical mapping reveals that repolarization spreads anisotropically and is guided by fiber orientation in guinea pig hearts. *Circ. Res.* **77**, 784-802, 1995
  - 23) Nakajima S & Gilai A : Radial propagation of muscle action potential along the tubular system examined by potential-sensitive dyes. *J. Gen. Physiol.* **76**, 751-762, 1980
  - 24) Schneider MF & Chandler WK : Voltage dependent charge movement in skeletal muscle : A possible step in excitation-contraction coupling. *Nature* **242**, 244-246, 1973
  - 25) Chandler WK, Rakowski RF & Schneider MF : A non-linear voltage dependent charge movement in frog skeletal muscle. *J. Physiol.* **254**, 245-283, 1976
  - 26) Jong D-S, Stroffekova K & Heiny JA : A surface potential change in the membranes of frog skeletal muscle is associated with excitation-contraction coupling. *J. Physiol.* **499**, 787-808, 1997
  - 27) Grinvald A, Frostig RD, Lieke E & Hildesheim R : Optical imaging of neuronal activity. *Physiol. Rev.* **68**, 1285-1366, 1988
  - 28) Momose-Sato Y, Sato K, Sakai T, Hirota A, Matsutani K & Kamino K : Evaluation of optimal voltage-sensitive dyes for optical monitoring of embryonic neural activity. *J. Memb. Biol.* **144**, 167-176, 1995
  - 29) Grinvald A, Salzberg BM, Cohen LB, Kamino K, Waggoner AS, Wang CH & Ti D : Simultaneous recording from twelve neurons in the supraesophageal ganglion of *Balanus nubilus* using a new potential sensitive dye. *Biol. Bull. (Woods Hole)* **151**, 411, 1976
  - 30) Salzberg BM, Grinvald A, Cohen LB, Davila HV & Ross WN : Optical recording of neuronal activity in an invertebrate central nervous system : Simultaneous monitoring of several neurons. *J. Neurophysiol.* **40**, 1281-1291, 1977
  - 31) 神野耕太郎 : 膜電位の光学的測定. 「実験生物学講座 5 : 電気的測定法」平本幸男, 竹中敏文編. 丸善, pp.215-233, 1982
  - 32) 佐藤容子 : 光ファイバーセンシングを用いた中枢神経系深部電気活動の光学的測定システムの開発. 平成7年度科学研究費補助金(試験研究B(2))研究成果報告書. 1996
  - 33) Rohr S & Kucera JP : Optical recording system based on a fiber optic image conduit : Assessment of microscopic activation patterns in cardiac tissue. *Biophys. J.* **75**, 1062-1075, 1998
  - 34) Grinvald A, Cohen LB, Leshner S & Boyle MB : Simultaneous optical monitoring of activity of many neurons in invertebrate ganglia using a 124-element photodiode array. *J. Neurophysiol.* **45**, 829-840, 1981
  - 35) Cohen LB & Leshner S : Optical monitoring of membrane potential : Methods of multisite optical measurement. In : *Optical Methods in Cell Physiology*. De Weer P & Salzberg BM (eds), Wiley, New York, pp.71-99, 1986
  - 36) Wu J-Y & Cohen LB : Fast multisite optical measurement of membrane potential. In : *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*. Mason WT (ed), Academic Press, pp.389-404, 1993
  - 37) 神野耕太郎, 広田秋彦, 酒井哲郎, 小室仁 : 活動電位の光学的測定 - Multiple-site optical recording について - . *生物物理* **26**, 138-143, 1986
  - 38) Ichikawa M, Iijima T & Matsumoto G : Real-time optical recording of neuronal activities in the brain. In : *Brain Mechanisms of Perception and Memory*. Ono T, Squire LR, Raichle ME, Perrett DI & Fukuda M (eds), Oxford Univ. Press, New York, pp.638-648, 1993
  - 39) Hirota A, Sato K, Momose-Sato Y, Sakai T & Kamino K : A new simultaneous 1020-site optical recording system for monitoring neural activity using voltage-sensitive dyes. *J. Neurosci. Meth.* **56**, 187-194, 1995
  - 40) 神野耕太郎, 広田秋彦, 酒井哲郎 : 細胞膜電位

- 活動の光学的マルチサイト同時計システムの開発. 中谷電子計測技術振興財団十周年記念誌, 249-276, 1995
- 41) Momose-Sato Y, Sato K, Arai Y, Yazawa I, Mochida H & Kamino K : Evaluation of optimal voltage-sensitive dyes for monitoring hippocampal neural activity. submitted
  - 42) Sugai T, Sugitani M & Onoda N : Subdivisions of the guinea-pig accessory olfactory bulb revealed by the combined method with immunohistochemistry, electrophysiological and optical recordings. *Neuroscience* **79**, 871-885, 1997
  - 43) Sato K, Momose-Sato Y, Sakai T, Hirota A & Kamino K : Responses to glossopharyngeal stimulus in the early embryonic chick brainstem : Spatiotemporal patterns in three dimensions from repeated multiple-site optical recording of electrical activity. *J. Neurosci.* **15**, 2123-2140, 1995
  - 44) Salzberg BM, Obaid AL & Gainer H : Large and rapid changes in light scattering accompany secretion by nerve terminals in the mammalian neurohypophysis. *J. Gen. Physiol.* **86**, 395-411, 1985
  - 45) Sato K, Momose-Sato Y, Arai Y, Hirota A & Kamino K : Optical illustration of glutamate-induced cell swelling coupled with membrane depolarization in embryonic brain stem slices. *Neuroreport* **8**, 3559-3563, 1997
  - 46) Momose-Sato Y, Sato K, Hirota A & Kamino K : GABA-induced intrinsic light-scattering changes associated with voltage-sensitive dye signals in embryonic brain stem slices : Coupling of depolarization and cell shrinkage. *J. Neurophysiol.* **79**, 2208-2217, 1998
  - 47) Orbach HS & Cohen LB : Optical monitoring of activity from many areas of the in vitro and in vivo salamander olfactory bulb : A new method for studying functional organization in the vertebrate central nervous system. *J. Neurosci.* **3**, 2251-2262, 1983
  - 48) Orbach HS, Cohen LB & Grinvald A : Optical mapping of electrical activity in rat somatosensory and visual cortex. *J. Neurosci.* **5**, 1886-1895, 1985
  - 49) Horikawa J, Hosokawa Y, Nasu M & Taniguchi I : Optical study of spatiotemporal inhibition evoked by two-tone sequences in the guinea pig auditory cortex. *J. Comp. Physiol. A* **181**, 677-684, 1997
  - 50) Momose-Sato Y, Sakai T, Hirota A, Sato K & Kamino K : Optical mapping of early embryonic expressions of  $Mg^{2+}$ -APV-sensitive components of vagal glutaminergic EPSPs in the chick brainstem. *J. Neurosci.* **14**, 7572-7584, 1994
  - 51) Sato K, Momose-Sato Y, Hirota A, Sakai T & Kamino K : Optical mapping of neural responses in the embryonic rat brainstem with reference to the early functional organization of vagal nuclei. *J. Neurosci.* **18**, 1345-1362, 1998
  - 52) Arai Y, Momose-Sato Y, Sato K & Kamino K : Optical mapping of neural network activity in chick spinal cord at an intermediate stage of embryonic development. *J. Neurophysiol.* **81**, 1889-1902, 1999
  - 53) Sawanobori T, Hirano Y, Hirota A & Fujii S : Circus-movement tachycardia in frog atrium monitored by voltage-sensitive dyes. *Am. J. Physiol.* **247**, H185-H194, 1984
  - 54) Dillon S & Morad M : A new laser scanning system for measuring action potential propagation in the heart. *Science* **214**, 453-456, 1981
  - 55) Salama G, Lombardi R & Elson J : Maps of optical action potentials and NADH fluorescence in intact working heart. *Am. J. Physiol.* **252**, H384-H394, 1987
  - 56) Muller W, Windisch H & Tritthart HA : Fast optical monitoring of microscopic excitation patterns in cardiac muscle. *Biophys. J.* **56**, 623-629, 1989
  - 57) Rohr S & Salzberg BM : Characterization of impulse propagation at the microscopic level across geometrically defined expansions of excitable tissue : multiple site optical recording of transmembrane voltage (MSORTV) in patterned growth heart cell cultures. *J. Gen. Physiol.* **104**, 287-309, 1994
  - 58) Kamino K : Optical approaches to ontogeny of electrical activity and related functional organization during early heart development. *Physiol. Rev.* **71**, 53-91, 1991
  - 59) 神野耕太郎 : 心臓の発生と調律の発現. 心電図 (日本心電学会誌) **18**(S2), 32-54, 1998
  - 60) Hirota A, Kamino K, Komuro H & Sakai T : Mapping of early development of electrical activity in the embryonic chick heart using multiple-site optical recording. *J. Physiol.* **383**, 711-728, 1987
  - 61) Kamino K, Komuro H, Sakai T & Hirota A : Functional pacemaking area in the early embryonic chick heart assessed by simultaneous multiple-site optical recording of spontaneous action potentials. *J. Gen. Physiol.* **91**, 73-591, 1988
  - 62) Kamino K, Hirota A & Fujii S : Localization of pacemaking activity in early embryonic heart monitored using voltage-sensitive dye. *Nature* **290**, 595-597, 1981
  - 63) Sakai T, Hirota A, Fujii S & Kamino K : Flexibility of regional pacemaking priority in early embryonic heart monitored by simultaneous optical recording of action potentials from multiple sites. *Jpn. J. Physiol.* **33**, 337-350, 1983
  - 64) Kamino K, Komuro H & Sakai T : Regional gradient of pacemaker activity in the early embryonic chick heart monitored by multisite optical recording. *J. Physiol.* **402**, 301-314, 1988
  - 65) Sakai T, Yada T, Hirota A, Komuro H & Kamino K : A regional gradient of cardiac intrinsic rhythmicity depicted in embryonic cultured multiple

- hearts. *Pfluger. Arch.-Eur. J. Physiol.* **437**, 61-69, 1998
- 66) Tsau Y, Wu J-Y, Hopp H-P, Cohen LB, Schimino-vich D & Falk CX : Distributed aspects of the response to siphon touch in *Aplysia* : Spread of stimulus information and cross-correlation analysis. *J. Neurosci.* **14**, 4167-4184, 1994
- 67) Wu J-Y, Cohen LB & Falk CX : Neuronal activity during different behaviors in *Aplysia* : A distributed organization? *Science* **263**, 820-823, 1994
- 68) 櫻井芳雄 : ニューロン集団の相関活動をみる. *科学* **66**, 784-792, 1996
- 69) Arieli A, Shoham D, Hildesheim R & Grinvald A : Coherent spatiotemporal patterns of ongoing activity revealed by real-time optical imaging coupled with single-unit recording in the cat visual cortex. *J. Neurophysiol.* **73**, 2072-2093, 1995
- 70) Arieli A, Sterkin A, Grinvald A & Aertsen A : Dynamics of ongoing activity : Explanation of the large variability in evoked cortical responses. *Science* **273**, 1868-1871, 1996
- 71) Momose-Sato Y, Sato K, Hirota A, Sakai T, Yang X-S & Kamino K : Optical characterization of a novel GABA response in early embryonic chick brainstem. *Neuroscience* **80**, 203-219, 1997
- 72) Momose-Sato Y, Sato K & Kamino K : Optical identification of calcium-dependent action potentials transiently expressed in the embryonic rat brainstem. *Neuroscience*, **90**, 1293-1310, 1999
- 73) Ebner TJ & Chen G : Use of voltage-sensitive dyes and optical recordings in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* **46**, 463-506, 1995
- 74) Wu J-Y, Lam Y-W, Falk CX, Cohen LB, Fang J, Loew L, Prechtl JC, Kleinfeld D & Tsau Y : Voltage-sensitive dyes for monitoring multineuronal activity in the intact central nervous system. *Histochem. J.* **30**, 169-187, 1998



## 生理学者のための分子モニタリング技術講座の連載にあたって

日本生理学会教育委員会

委員長 高田 明和

日本生理学会教育委員会ではいままで「生理学者のための技術講座」を日生誌上に連載してきた。今回最近非常に進歩している神経系の分子モニタリングについてこの分野で最も業績を発表しておられる専門家をお願いして連載を始めることにした。

脳の研究、脳の仕組みについては専門家の間だけでなく、一般人の間でも非常に関心が高まっている。そしてその解析もいままでの微小電極による電気生理学的手法、脳波、誘発電位などの測定によるものから、無侵襲的に脳の活動を記録する方法、また脳内の目的とする領域に微小なカニューレを挿入して、脳の機能にともなう生化学的変化を記録する方法、さらに動物の脳を剔出し、その切片などの生化学的解析をおこなう方法など様々である。

これから中枢神経の研究を始めようとする者にとっても、また現在他の分野ではどのような発展が見られているのかを知ろうとするものにとっても、モニタリングの手法をまとめて記載された連載を参考にすることは非常に有効と思われる。

今回横浜市立大学の加藤武教授、浜松医大の中原大一郎教授、埼玉医大の野村正彦教授にお手伝い頂き、分子モニタリングの最先端の研究をしておられる研究者を選んでいただき、執筆をお願いした。各執筆者は快く依頼をうけてくださり、ここに「生理学者のための分子モニタリング技術講座」を連載する運びとなった。

内容としては 1) オンラインフローシステムの利点と欠点についてのデータの解析、2) 蛍光色素をもちいた今までの神経科学研究の概説と将来性、3) マイクロダイアリシスの原理、応用、将来性、4) PET、SPECT の原理、5) 光 CT、脳磁図の現状、6) fMRI で何が分かるか、7) メッセンジャーの解析などである。この連載がこの分野のますますの発展と生理学者がこの分野を勉強する場合の有用な糧となることを期待したい。

また「分子生物学技術講座」と同様にこのシリーズも単行本化して発刊されることが企画されている。

下記に連載の項目を記すが、掲載の順序はこの通りではない。

### 生理学者のための分子モニタリング技術講座

- 1) マイクロダイアリシスと PET の併用によるドーパミン生合成—代謝のインビボ測定(サル、ヒト)

渡辺 恭良 (財)大阪バイオサイエンス研究所神経科学部門

- 2) 表面および深部組織の細胞内カルシウムイオン濃度のインビボ測定(ラット等)

宮川 厚夫 浜松医科大学光量子医学研究センター

光テクノロジー(ホトニクス)研究部門 客員教授

- 3) 培養細胞のエキソサイトーシス(カテコラミン, アセチルコリンの測定)  
寺川 進 浜松医科大学光量子医学研究センター  
細胞フォトン研究分野 教授
- 4) マイクロダイアリシス法による神経伝達物質の測定(動物)  
“総論”  
加藤 武 横浜市立大学大学院総合理学研究科分子認識部門 教授  
中原大一郎 浜松医科大学心理学 教授
- “学習と行動”  
野村 正彦 埼玉医科大学生理学第一講座 教授
- “自発行動”  
高田 明和(高橋宏史) 浜松医科大学生理学第二講座 教授
- 5) インビボボルタンメトリー法によるモノアミン物質の測定(ラット)  
榛葉 俊一 東京都精神医学総合研究所 神経生理部門 副参事研究員
- 6) オンライン酵素センサーを用いたグルタミン酸, アセチルコリン, GABA のリアルタイム測定(スライス脳)  
丹羽 修 日本電信電話株式会社 NTT 基礎研究所  
物質科学研究部 分子機能グループ 主幹研究員
- 7) PET によるレセプター活性のインビボ測定(サル)  
塚田 秀夫 浜松ホトニクス中央研究所 PET センター 専任部員
- 8) セカンドメッセンジャー(カルシウム/CAM キナーゼ・)活性の可視化(スライス脳)  
工藤 佳久 東京薬科大学生命科学部 生体高次機能学研究室 教授
- 9) PET によるセカンドメッセンジャー(シアソシルグリセロール)の画像化(サル)  
井戸 達雄 東北大学サイクロトン・ラジオアイソトープセンター 教授
- 10) 脳内一酸化窒素のインビボ測定(ラット)  
横山 秀克 山形県テクノポリス財団生物ラジカル研究所  
計測法開発研究部 主任研究員
- 11) SPECT (single photon emission computed tomography)による脳血流量のインビボ測定(ヒト)  
松田 博史 国立精神・神経センター 武蔵病院 放射線診療部長
- 12) fMRI による脳機能解析  
中田 力 新潟大学脳研究所脳機能解析学 教授

## SPECT による脳循環動態および神経伝達機能測定

松 田 博 史

(国立精神・神経センター武蔵病院放射線診療部)

### I. はじめに

近年の脳高次機能の解明に大いに威力を発揮しているのが、ポジトロン放出断層撮像法 (Positron Emission Tomography; PET) や単光子放出コンピュータ断層撮像法 (Single Photon Emission Tomography; SPECT) による非侵襲的核医学的脳画像診断法である。これまで動物の研究レベルで止まっていた神経生理学的脳機構や認知機能などの解明が、生きたままのヒト脳において次々と非侵襲的に行えるようになり、各種の知覚系における認知機能の脳局在とニューラルネットワークが明らかになりつつある。

PET ではポジトロン (陽電子) を使用する。電子の反粒子であるポジトロンは、陽電子崩壊 ( $+\beta$  崩壊) によって原子核から放出されると、周辺組織の電子と出会い消滅する。そのとき電子の質量に見合った一対の消滅放射線 (511 KeV) をお互い正反対の方向 (180度) に放出する。この1対の消滅放射線を体外周囲に張り巡らした検出器によって同時計測することにより、その位置を同定することができる。つまり、PET では、ポジトロンを放出するアイソトープ ( $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$  および  $^{18}\text{F}$  など) で標識された薬剤を投与し、その体内分布や脳内分布を PET 装置 (検出器) を用いて計測し、血流量や酸素代謝、糖代謝などの生体機能を断層画像化するものである。ただし、これらのポジトロン放出核種は、半減期が約2分~2時間ときわめて短く、おのおの研究施設や病院内に小型サイクロトロン (加速器) の設置が必要である。適用に応じてポジトロン放出核種を製造し、自動合成装置などを用いて目的とする放射性医薬品の標識を

行う。さらに、安全性のチェックなど品質管理を各自で行う必要がある。このように現状では、PET 検査を実施するためには多くの費用と人手を要するのが欠点である。そのために、多くは研究目的に使用されることが多い。

一方、SPECT では、従来から臨床で用いられてきたガンマカメラと同様に、投与した放射性薬品から出される  $\gamma$  線を検出してその位置を決定する。SPECT での放射性医薬品は、ほとんどが  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  または  $^{123}\text{I}$  で標識される。それらの半減期はそれぞれ6時間および13時間であり、医薬品メーカーから供給される。例えば、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$  は、核異性体転移により  $^{99}\text{Tc}$  に変化する際に 140 KeV のエネルギーを有する1本の  $\gamma$  線を放出する。したがって、特定の方向からのみの  $\gamma$  線を検出するためのコリメータ装着が必須となる。このことにより、PET に比べ、SPECT ではまだ感度と画像分解能が低くその定量性にも様々な難点がある。しかし、最新の装置は、技術の進展により7~8 mm の分解能 (PET の分解能は3~4 mm) と定量性にも信頼性の高いものが開発されてきている。サイクロトロンなどの装置は必要がなく、簡便で安価な SPECT 装置は、本邦では1,300台以上が臨床の場で使用されている。また、PET で得られた成果は、つぎつぎと SPECT に技術転換されている。

今や PET の一部の検査や SPECT の脳血流検査は医療保険の適応となり、また、後に述べる神経伝達機能系のイメージングも、近い将来、保険適応になると期待されている。PET のみならず SPECT 装置の性能向上および画像解析技術の革新にともない精神医学領域などへもおおいに応用され、治療に直結した情報が得られ

ていくものと思われる。本稿では、SPECT による脳循環測定および神経伝達機能について述べる。

## II. 脳循環動態

脳循環を表すパラメータには、脳血流量 (Cerebral Blood Flow; CBF), 脳血液量 (Cerebral Blood Volume; CBV), 脳血管内平均通過時間 (Mean Transit Time; MTT), 脳血管抵抗 (Cerebral Vascular Resistance; CVR) などがある。脳血流量は脳組織単位重量あたりの毎分流量 (ml/100 g/min), 脳血液量は脳組織単位重量あたりの血管容積 (ml/100 g), 平均通過時間は分(とき)に秒) で表現される。脳の局所において  $MTT = CBV/CBF$  という関係があり, また CBV と CVR は反比例する。脳血流は脳代謝, および神経細胞の機能的活動度と密接に関連し, 生理的条件下ではこれらは比例する。このため脳血流情報より間接的に神経細胞の機能的活動度を知ることができる。しかし, 脳血管障害などの病的条件下では, これらはしばしば乖離する。

正常脳では, 血圧の変動に対して脳血流を一定に維持しようとする自動調節能が働く。この調節には自律神経が関与していると考えられている。この機構により, 平均動脈血圧が 60 mmHg から 150 mmHg 程度まで変化しても脳血流はほぼ一定に保たれる。この自動調節機構は, 血圧変動による脳血管灌流圧の変化に対して, 脳血管径(すなわち血管抵抗)を制御することによってなされる。高血圧ではこの自動調節域がより高い血圧レベルに移動し, 長期の降圧治療では再び正常域近くにまで回復する。また, 内頸動脈閉塞などの慢性の灌流圧低下では自動調節域はより低い血圧レベルに移動する。自動調節域を越える血圧レベルでは血圧と脳血流量は正比例するようになる。これを, breakthrough phenomenon といい, 正比例するようになる点を breakthrough point という。脳血流量は脳血管容積を反映し, これにより脳血流の主要な調節因子である血管径の変化を推定しうる。平均通過時間は, 血管内を通過する血液の

速さを示すものである。

炭酸ガスは脳血管を最も強力に拡張する物質である。動脈血中の二酸化炭素分圧は, 20~60 mmHg の間では脳血流量と正の相関にあり, 1 mmHg の変化につき脳血流は 4~5% 変動する。その他に, 脳血流に影響を与える因子としては, 頭蓋内圧, 血液粘稠度などがある。

ヒトにおける最初の脳血流測定は, 1945年の Kety-Schmidt による  $N_2O$  法<sup>1)</sup> であるが, これは大脳半球または全脳の平均血流量を知るのみである。その後, 脳の局所ごとの血流量が測定されるようになり, 局所脳循環測定といわれるようになった。測定結果は, 脳の形態に従った脳循環パラメータの分布像として表現される。最近では, 後述の新しい脳血流シンチグラフィ用剤が開発され, SPECT 装置を用いることにより三次元脳血流断層像が得られるようになり, 一般病院でも脳血流情報を容易に評価することが可能になった。

## III. 脳血流 SPECT 用放射性医薬品

脳循環代謝の測定には次の3種類のトレーサが用いられる。まず, 血液脳関門を通過せず, 脳血液量の測定や脳血管内平均通過時間の測定に用いる血管内トレーサとして,  $^{99m}Tc$ -赤血球や  $^{99m}Tc$ -ヒト血清アルブミンがある。脳血流測定に用いるため, 血液脳関門を自由に通過し, すみやかに脳組織に拡散し洗い出される拡散性トレーサとしては,  $^{133}Xe$  ガスまたは注射液がある。最後に, 脳血流測定に用いるため, 血液脳関門を通過し, すみやかに脳組織に拡散した後, 脳内に長くとどまる蓄積型トレーサとして, N-isopropyl- $[^{123}I]$  p-iodoamphetamine ( $^{123}I$ -IMP),  $^{99m}Tc$ -hexamethylpropylene amine oxime ( $^{99m}Tc$ -HMPAO),  $^{99m}Tc$ -ethyl cysteinate dimer ( $^{99m}Tc$ -ECD) がある。脳血流測定用のトレーサは, 血液脳関門をなるべく自由に通過しなければならない。この通過性の指標として, permeability surface area product (PS product) がある。これは, 単位断面体積あたりの透過率(permeability)と通過する血管の総表面

積 (surface area) の積で表される。PS product が高いほど、初回循環でのトレーサの脳内摂取率 (Extraction Fraction; EF) が高くなり、高血流域でも忠実に脳血流量を反映することができる。脂溶性の高いトレーサほど PS product は高く、水溶性になるに従って低下する。f を脳血流量とすると、 $EF = 1 - \exp(-PS/f)$  という関係が想定されている<sup>2)</sup>。現在使用されている脳血流用トレーサの特徴を以下に述べる。

a)  $^{133}\text{Xe}$

$^{133}\text{Xe}$  は組織内で産生も代謝もされない不活性ガスであり血液脳関門を自由に通過しうる拡散性物質である。1979年、Kanno と Lassen<sup>3)</sup> により、 $^{133}\text{Xe}$  クリアランス法による従来の2次元の脳血流測定を SPECT を用いた3次元測定に応用しようという試みが報告された。この方法では採血することなく非侵襲的に脳血流量を算出することが可能である。 $^{133}\text{Xe}$  の投与量は吸入法で 1.85 GBq 強必要である。統計雑音軽減のため画像マトリクスが粗く解像力に劣るのが最大の欠点である。また、高速に投影データを収集するダイナミック SPECT 装置が必要である。利点は、非侵襲的に繰り返し脳血流測定が可能なことである。

b)  $^{123}\text{I-IMP}$

1980年に開発された N-isopropyl- [ $^{123}\text{I}$ ] p-iodoamphetamine ( $^{123}\text{I-IMP}$ ) は中性の脂溶性物質である<sup>4)</sup>。静注後、ほとんどが肺に取り込まれ、その後、動脈血中に放出される。血液中の  $^{123}\text{I-IMP}$  は、血液脳関門を通過し、最初の循環ではほぼ100%脳内に取り込まれる。投与量の約8%が脳に取り込まれ、以後長時間脳内に停滞する。脳の放射能は投与後20~30分でピークに達する。脳内での代謝産物は脂溶性の p- [ $^{123}\text{I}$ ] iodoamphetamine であるが、この物質の脳内挙動は  $^{123}\text{I-IMP}$  とほぼ同等である。血液中には p- [ $^{123}\text{I}$ ] iodobenzoic acid などの水溶性代謝産物が存在するが血液脳関門が正常の場合には脳内には取り込まれない。 $^{123}\text{I-IMP}$  の脳内停滞機序に関しては大容量で親和性の低い細胞成分に結合しているという説が有力であ

る<sup>5)</sup>。 $^{123}\text{I-IMP}$  の脳内分布は時間とともに緩徐に変化する。静注後1時間以内の早期像では脳血流の多寡に応じて皮質および中心灰白質で高く、白質で低い脳内分布を示す。一方、静注後3時間以降の晩期像では灰白質と白質の放射能の差は軽減し、より均一な集積様式を示す。 $^{123}\text{I-IMP}$  の早期像で集積低下を示した部位が晩期像で他の部位と集積の差がなくなる現象を再分布と呼んでいる。当初この現象は脳組織の生存能力を示し、脳代謝とも関連するのではないかと報告されていた<sup>6,7)</sup>が、われわれの実験的脳虚血における検討<sup>8)</sup>では否定的な結果であった。臨床的にも再分布の意義は現在疑問視されている<sup>9)</sup>。しかし、高血流域においても  $^{123}\text{I-IMP}$  の脳放射能と血流量の比例直線性は良好であり、 $^{123}\text{I-IMP}$  は優れた脳血流トレーサーである。 $^{123}\text{I-IMP}$  の脳血液分配係数は20以上と極めて高く、血液中の放射能が低い。また、血球中では代謝されない。このことにより、 $^{123}\text{I-IMP}$  では脳血流の絶対値を採血により測定することが可能である<sup>10)</sup>。

c)  $^{99\text{m}}\text{Tc-HMPAO}$

SPECT 用の脳血流シンチグラフィ用剤として重要な条件は脳組織への高い集積率と、長時間にわたる脳への停滞である。この条件を満たす  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  標識薬剤として  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -hexamethylpropyleneamine oxime ( $^{99\text{m}}\text{Tc-HMPAO}$ ) が開発された<sup>11)</sup>。 $^{99\text{m}}\text{Tc-HMPAO}$  は  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  標識キットであり緊急時にも対応しうる。調製直後の標識率は90%前後であり、徐々に低下していく。投与された  $^{99\text{m}}\text{Tc-HMPAO}$  は、その約5%が脳に集積する。初回循環での脳への摂取率は80~90%である。 $^{99\text{m}}\text{Tc-HMPAO}$  の血中濃度は高く、血球内での代謝および血清蛋白との結合のためとされている。脳血流量は脳実質の4%前後であり、通常は脳血流シンチグラフィにおいて脳血液プールの無視できる。しかし、脳動静脈奇形など脳血管床が増大した場合には脳血液プール像が脳血流像を修飾することが報告されている<sup>12)</sup>。 $^{99\text{m}}\text{Tc-HMPAO}$  は脳実質内において速やかに脂溶性化合物から水溶性化合物に代

謝される。この代謝にはグルタチオンが関与すると推定されている<sup>13)</sup>。この脳内での水溶性化合物への代謝速度は一定であり脳血流に対して十分に速いわけではない。従って、特に高血流の場合には脂溶性の<sup>99m</sup>Tc-HMPAOの一部は脳内で代謝されずに血液中へ逆拡散する。この静注後ごく初期の逆拡散により脳組織内での停滞率は高血流の場合ほど低下する。このことが<sup>99m</sup>Tc-HMPAOの脳血流シンチグラフィにおいて健常部と血流低下部位の濃度コントラストが低下する原因となる。この逆拡散を数学的に補正しようという試みがLassenら<sup>14)</sup>により開発された。その式は以下のごとくである。

$$F_i = F_r \cdot \frac{\alpha \cdot (C_i/C_r)}{[1 + \alpha - (C_i/C_r)]} \dots\dots\dots(1)$$

ここで $F_i$ は領域*i*の脳血流量、 $F_r$ は参照部の脳血流量、 $C_i$ は領域*i*のSPECT像での再構成カウント、 $C_r$ は参照部の再構成カウントである。 $\alpha$ は補正係数であり、参照部位として小脳を選んだ場合には1.5、脳平均を選んだ場合には2.0が至適値であると報告されている<sup>15-17)</sup>。<sup>99m</sup>Tc-HMPAOは静注後ごく初期にはこのように逆拡散を示すものの、その後の脳放射能は長時間安定であり再分布という現象はみられない。この脳内分布が静注後数分以内のごく初期に決定し、以後不変という性質は脳血流トレーサーとして臨床的に極めて有用である。何故なら、投与さえしておけば後に撮像はいつでも可能なため緊急時や種々の負荷検査に適するからである。

d) <sup>99m</sup>Tc-ECD

<sup>123</sup>I-IMPは剤型が標識済み注射液のため緊急時に対応することができず、また前述のとおり<sup>99m</sup>Tc-HMPAOは標識キットであるものの標識率が低く、しかも経時的に劣化するという欠点を有する。これらの欠点を補うべく、新しいキット製剤である<sup>99m</sup>Tc-ethyl cysteinyl dimer(<sup>99m</sup>Tc-ECD)が開発された<sup>18,19)</sup>。<sup>99m</sup>Tc-ECDはエステル基を導入したdiamine-dithiol(DADT)化合物である。本剤は血液脳関門を通過して脳実質内に取り込まれ、エステ

ラーゼの作用により酵素的分解を受け水溶性化合物に代謝される。このため、血液脳関門通過性を失い、脳実質に保持される。血液中でも<sup>99m</sup>Tc-HMPAOと同じく水溶性化合物に代謝される。<sup>99m</sup>Tc-ECDの初回循環における脳の摂取率は<sup>99m</sup>Tc-HMPAOよりやや低く、約60~80%である。放射化学的純度は調整後徐々に上昇し、30分以後は97~98%台とプラトーに達し、24時間後においても劣化しない。このため、投与時点が不確定なてんかん発作時の検査などには最も適したトレーサーである。投与量の約6%が脳に集積し、以後1時間あたり平均約4~6%の割合でゆっくりと洗い出される。脳以外の組織での洗い出しはよりすみやかであり主に腎尿路系より排泄される。血液中の放射能も<sup>99m</sup>Tc-HMPAOより速く洗い出される。このためバックグラウンドの少ない良好な画質が得られる。静注後ごく初期の脳から血液中への逆拡散が<sup>99m</sup>Tc-HMPAOと同様に存在するが、その速度は<sup>99m</sup>Tc-HMPAOより低い。このため血液脳分配係数は<sup>99m</sup>Tc-HMPAOより高い。前述のLassenらによるSPECT像の逆拡散の補正において至適の $\alpha$ 値は<sup>99m</sup>Tc-HMPAOより高く2.59と報告されている<sup>20)</sup>。他の薬剤との比較では、血流低下部位と健常部位との濃度コントラストの比は、皮質では<sup>123</sup>I-IMPよりも劣るが、中心灰白質では<sup>123</sup>I-IMPよりも優れ、また、いずれの部位においても<sup>99m</sup>Tc-HMPAOより優ると報告されている<sup>21)</sup>。一方、<sup>99m</sup>Tc-HMPAOや<sup>123</sup>I-IMPで捉えられるぜいたく灌流が<sup>99m</sup>Tc-ECDでは検出できないとされており、その部位におけるエステラーゼ活性の欠如によるものと考えられている<sup>22)</sup>。

脳放射能は投与後2分でプラトーに達し、脳内分布は投与後1時間程度までほぼ不変であり、脳実質外の放射能が洗い出されるため、投与直後より良好な画質の像が得られる。その後は軽微ながら脳内分布は変化し、中心灰白質の相対的集積増加が認められる。逆に大脳皮質の集積は相対的に減少する。しかしこの変化の程度は<sup>123</sup>I-IMPに比べればごく僅かである。こ

の脳内分布が緩やかに変化する点において  $^{99m}\text{Tc-ECD}$  は、脳内分布が経時的にほとんど変化しない  $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$  と異なる。しかし、各部位の放射能はすべて経時的に徐々にあるが脳血流量とは無関係に減少し、 $^{123}\text{I-IMP}$  でみられるような再分布は示さない。これは  $^{99m}\text{Tc-ECD}$  が血液中でも代謝され、もはや血液脳関門を通過しえないからである。

#### IV. 脳血流 SPECT 正常像

多検出器ガンマカメラ回転型装置による高解像度脳血流 SPECT ( $^{99m}\text{Tc-ECD}$ ) の正常像とその解剖シエマを Fig. 1a-c に示す。脳血流は神経細胞の豊富な大脳および小脳皮質、また中心灰白質で多く、白質では少ない。この血流量に比例して脳血流トレーサの分布が決定される。定性的な正常の脳血流 SPECT 像の特徴は以下に列記するごとくである。

(1) トレーサの集積はほぼ左右対称である。

- (2) 白質の集積は非常に少ないため、現時点での SPECT 装置では脳室と区別することはできない。
- (3) 閉眼では後頭葉皮質、視覚領の集積が開眼時よりも低い。
- (4) 前頭葉皮質の集積は、開眼では後頭葉皮質のそれと同程度、閉眼ではそれよりも高い。
- (5) 淡蒼球は白質成分が多いため、被殻に比べ集積が低い。
- (6) 橋底部は白質成分が多いため、橋被蓋に比べ集積が低い。
- (7) 側頭葉下部において、海馬傍回などの内側側頭葉皮質は外側側頭葉皮質に比べ集積が低い。
- (8)  $^{99m}\text{Tc-HMPAO}$  では小脳皮質の集積が他のトレーサに比べて高く、 $^{99m}\text{Tc-ECD}$  では後頭葉内側皮質の集積が他のトレーサに比べ高い傾向にある<sup>23)</sup>。
- (9) 小児では、小脳皮質の集積は大脳皮質のそ

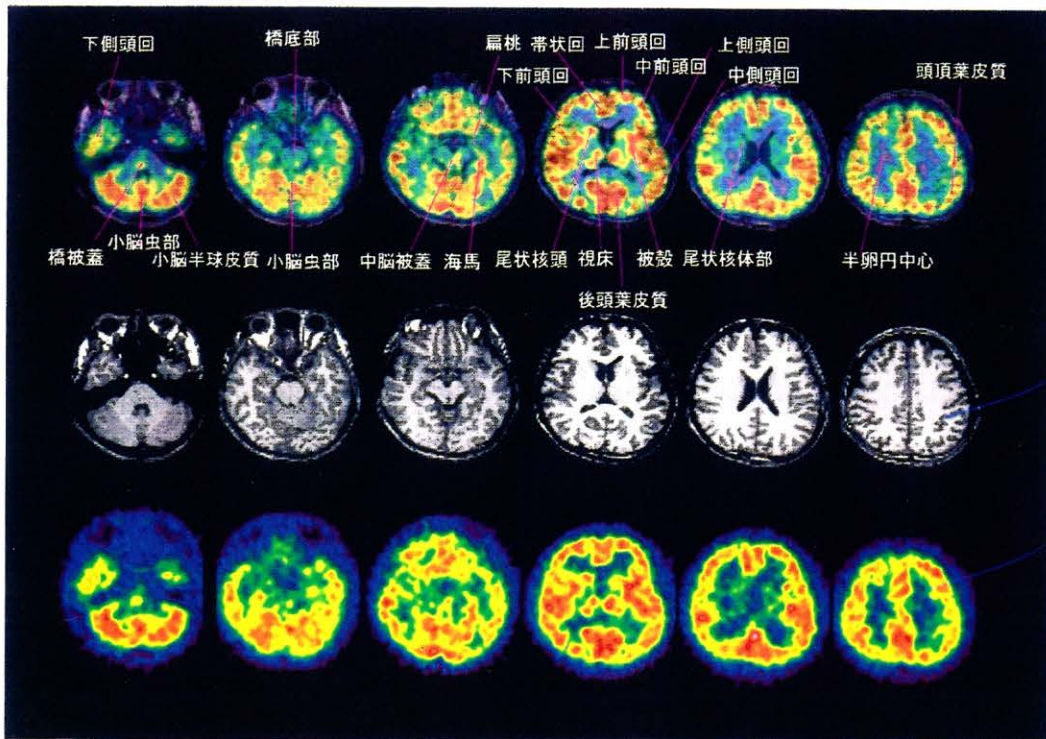


Fig. 1 a. 正常者における脳血流 SPECT と MRI の T1 強調画像の横断像と機能解剖図譜。上段；両者の融合画像，中段；T1 強調画像，下段；脳血流 SPECT 画像。

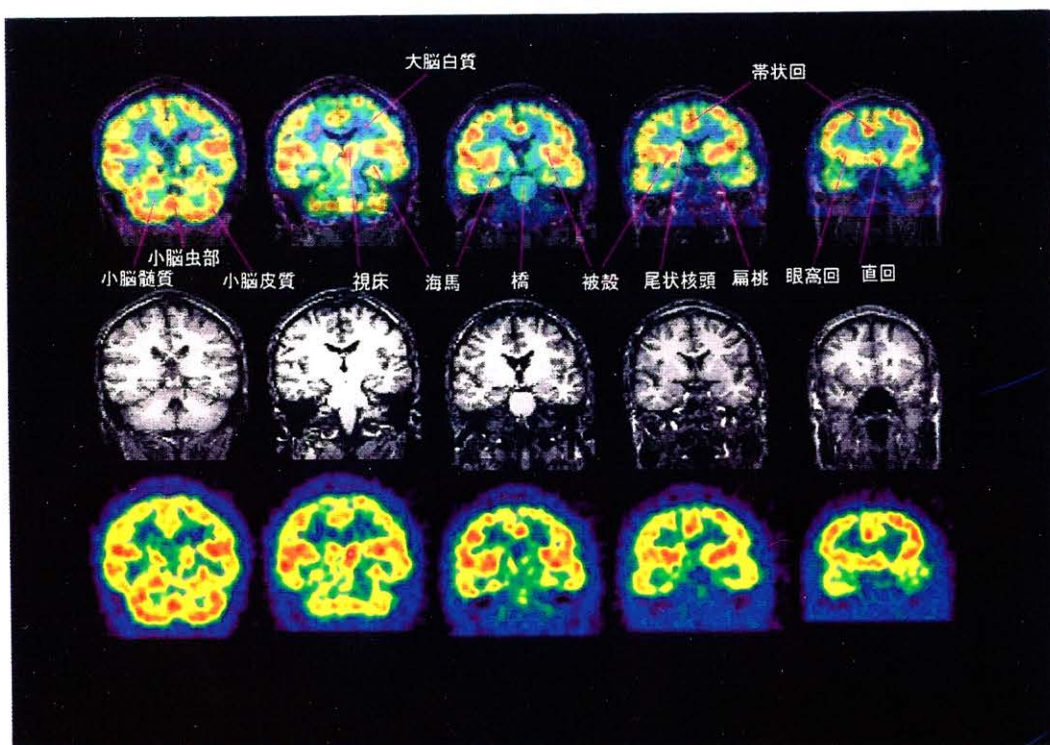


Fig. 1 b. 正常者における脳血流 SPECT と MRI の T1 強調画像の冠状断像と機能解剖図譜.

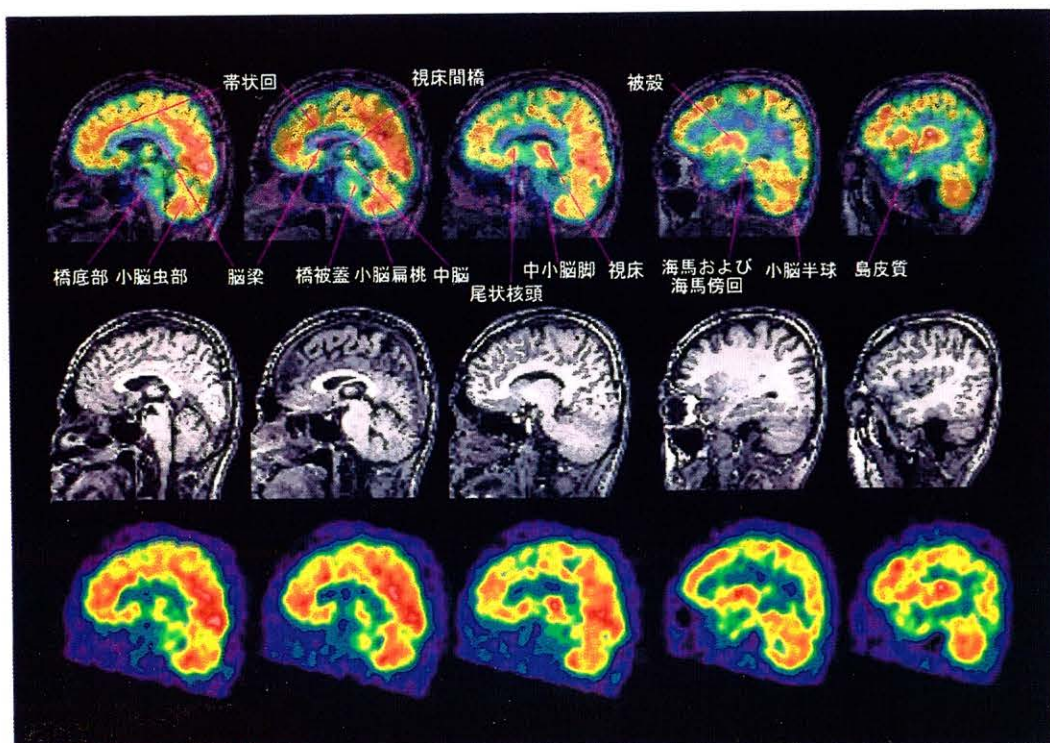


Fig. 1 c. 正常者における脳血流 SPECT と MRI の T1 強調画像の矢状断像と機能解剖図譜.

れに比べて相対的に低く<sup>24)</sup>、加齢とともに差がなくなり、老齢になると逆転する。

- (10) 新生児から幼児にかけては、脳の発達に応じて脳血流分布が変化する。生後まもなくは中心溝周囲の感覚・運動野皮質、視床、脳幹、小脳虫部で血流が高い。次に頭頂葉、側頭葉、後頭葉皮質や基底核、小脳皮質の血流が高くなり、その後、生後6ヶ月以降、前頭葉皮質の血流が高くなってくる<sup>25)</sup>。

## V. 脳血流の定量化

脳血流 SPECT による定量的評価はびまん性脳血流低下の検出、経過観察、治療効果の判定などに必須であり、半定量的評価法と真の定量的評価法に分かれる。半定量的評価法とは脳血流分布を数値化する手法であり、現在まで種々の報告がなされている。左右比が最も一般的であるが、小脳または全脳平均に対する集積比の報告も多い。ただし、これらの方法では、びまん性の血流低下は検出しえない。また、神経投射系を介して、ある病変が他の遠隔部位に抑制または興奮を引き起こすことがある。このため局所病変が全脳に影響を及ぼすため、参照となる健常部は必ずしも正常血流を有するとは言えない。これらの半定量的評価法の欠点を克服するため真の定量的評価法が必要となる。真の定量的評価法とは、脳血流の絶対値もしくはそれに比例する指数を求める方法である。また、トレーサの集積率の変化が脳血流の変化率に比例するものであれば、何らかの負荷を行った場合、前後でそれぞれ脳血流の絶対値を求めなくても変化率を知ることができる。以下に、SPECT による代表的な脳血流測定法について述べる。

### (a) <sup>133</sup>Xe 吸入または静注法

前述の Kanno と Lassen による <sup>133</sup>Xe クリアランス法による3次元測定では<sup>1)</sup>、測定単位となる画素ごとの計数率が非常に低く統計雑音が大いいために、画素ごとの時間放射能曲線を直接解析することは困難である。彼らはこの問題を解決するために、10～15分の測定時間を1分ごとに区切り、各区間ごとに時間積分した統

計雑音の小さいデータより解析する方法を開発した。この方法は時間積分法と呼ばれている。この方法の概要は以下のごとくである。脳の時間放射能曲線を約1分ごとに積分し、それを全測定時間の曲線下面積で除す。これを各ピクセル単位で行い、各々の正規化した計数値時系列  $Q_1, Q_2, \dots, Q_n$  を得る。一方、各ピクセルの時間放射能曲線は、<sup>133</sup>Xe 吸入または静注法の場合、入力曲線  $Ca(t)$  と脳よりのクリアランス曲線  $e^{-kt}$  の重畳積分  $Ca(t) * ke^{-kt}$  で表される。この式を用いて、被験者の入力曲線に対して  $k$  値を変化させることにより多数のシュミレーション曲線を作成する。このシュミレーション曲線を前述のごとく区間積分して正規化すれば、同曲線の正規化された多数の時系列  $q_1, q_2, \dots, q_n$  が得られる。これらの実測値の時系列  $Q_1, Q_2, \dots, Q_n$  とシュミレーションによる時系列  $q_1, q_2, \dots, q_n$  を最小自乗法で比較し最適の  $k$  値を求める。血流量は、得られた  $k$  値に<sup>133</sup>Xe の脳血液分配係数  $\lambda$  を乗ずることにより計算できる。このように、各ピクセルすべての血流量を計算し、それを画像として表示する。本法は sequential pictures 法と呼ばれている。これに対して時間放射能曲線の初期部分のみを用いる early picture 法がある。入力曲線  $Ca(t)$  は、実際には終末呼気曲線より推定される。肺が正常機能を有する場合、<sup>133</sup>Xe の動脈血中濃度と終末呼気曲線は相似形となることが知られている。このことにより採血することなく非侵襲的に脳血流量を算出することが可能である。局所の脳血液分配係数は全脳平均の報告値1.15を、全測定時間での局所の総計数率を全脳平均の総計数率で除した値を用いて比例配分することにより求めている。<sup>133</sup>Xe の投与量は静注法で 1.48 GBq 弱、吸入法で 1.85 GBq 強必要である。静注法の場合、入力曲線をなるべく正確にとらえるため30秒間ぐらいのゆっくりとした投与が望ましい。吸入法の場合、<sup>133</sup>Xe の吸入時間は1分である。呼吸状態が不良の場合は静注法の方が効率よく<sup>133</sup>Xe を体内に送り込めるため有利である。画像マトリクスは、統計雑

音軽減のため32×32または64×64である。このため解像力に劣るのが最大の欠点である。一方、利点は、非侵襲的に繰り返し脳血流測定が可能なことであり、二酸化炭素や種々の薬剤に対する血管反応性を負荷前後で評価しうる。

(b)  $^{123}\text{I}$ -IMP 静注法

$^{123}\text{I}$ -IMP による脳血流の定量化法としては、持続動脈採血によるマイクロスフェアに準じた方法<sup>10)</sup>が最も普及しており信頼性も高い。脳組織において代謝を受けない拡散性トレーサーを用いた場合、脳血流値は一般に次式により求められる。

$$F = \frac{Cb(T)}{\int_0^T Ca(t) \cdot e^{-k(T-t)} dt} \dots\dots\dots(2)$$

ここでFは脳血流量(ml/100 g/min), Cbは測定時間Tにおける脳の放射能濃度(Bq/100 g), Caは時間Tにおける動脈血中の真の $^{123}\text{I}$ -IMP濃度(Bq/ml), kは脳から血液への逆拡散定数(/min)である。kはF/100を $^{123}\text{I}$ -IMPの平衡状態における脳組織と血液の物質濃度比(脳血液分配係数,  $\lambda$ )で除したものに等しい。 $^{123}\text{I}$ -IMPの $\lambda$ は、ヒトの脳において20以上と高く、測定時間Tが短ければ脳組織よりの逆拡散をほぼ無視しうるため、式(2)は次のごとく簡略化しうる。

$$F = \frac{Cb(T)}{\int_0^T Ca(t) dt} \dots\dots\dots(3)$$

さらに式(3)は動物実験でマイクロスフェアにより臓器血流値を測定する際に用いられる次式と同等である。

$$F = \frac{R \cdot Cb}{N \cdot A} \dots\dots\dots(4)$$

ここで、Rは持続採血ポンプによる採血速度(ml/min), Aは採取した全動脈血の放射能(Bq), Nは動脈血中の未代謝の $^{123}\text{I}$ -IMPの割合を示し、オクタノール抽出法により算出する。この式(4)では動脈血の放射能測定が1回で済むので実用的である。測定時間Tは5分が妥当である。高速に断層像を得ることができる

SPECT装置を用いた場合は、静注5分後における脳の放射能Cbを得ることができる。しかし、通常のガンマカメラ回転型SPECT装置を用いた場合は脳の放射能濃度がプラトーに達した20~30分後からしか撮像できない。このため2次元測定により脳の時間放射能曲線を得、5分後とSPECT撮像開始直前の放射能比から断層像における5分後の脳局所の放射能を推定する方法<sup>26)</sup>が一般的である。

持続動脈採血法以外では、標準入力曲線を用いて1回の動脈採血データから推定する方法があり、より簡便な検査法となっている<sup>27)</sup>。

(c)  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO および  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD 静注法

$^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO および  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD による脳血流の絶対値測定は報告されてはいるものの、頻回の動脈血採血を必要とし日常臨床への応用は困難である。また、このトレーサーは脳組織内のみならず血液中でも速やかに、血液脳関門に対して脂溶性の拡散性物質から水溶性の非拡散性物質に代謝される。このため脳への入力となるトレーサー濃度を正確に測定するためには採血後迅速な脂溶性成分の抽出操作が必要となり、非常に煩雑である。しかし、われわれの開発した方法によれば、採血することなく解像力を保ったままで簡便に精度よく脳血流を測定することができる。以下にその詳細を述べる。

(解析理論) 血液と脳組織の間のトレーサー交換モデルに基づくと、血液から脳への一方向性のトレーサー移行は次式のごとく表わされる<sup>28)</sup>。

$$B(t) = ku \cdot \int_0^t A(\tau) d\tau + V_n \cdot A(t) \dots\dots\dots(5)$$

ここでA(t)は測定時間(t)における動脈血中濃度、tは時間、 $k_u$ は血液から脳への一方向性の流入速度定数、 $V_n$ はトレーサーの非特異的初期分布容積である。式(5)の両辺をA(t)でわると、

$$\frac{B(t)}{A(t)} = ku \cdot \frac{\int_0^t A(\tau) d\tau}{A(t)} + V_n \dots\dots\dots(6)$$

$B(t)/A(t)$ をX軸に、 $\int_0^t A(\tau) d\tau / A(t)$ をY軸にグラフ上でプロットすると、直線の傾きが $k_u$

となりY切片が  $V_n$  となる。

(測定方法)

仰臥位にて 370-555 MBq の  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO または  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD を右肘静脈に静注する。静注直後より大視野ガンマカメラにて心臓から脳へのトレーサの通過を前面から128×128のマトリクスサイズにて1秒毎80~110フレーム記録する。不正形の関心領域を大動脈弓( $\text{ROI}_{\text{aorta size}}$ , 128×128のマトリクスサイズの場合約55ピクセル)と大脳半球( $\text{ROI}_{\text{brain size}}$ , 約300ピクセル)に設定し, 1秒毎の時間放射能曲線を得る。関心領域設定にあたっては, 大動脈弓と左右大脳半球の関心領域設定を容易にするためにフレームを適宜加算する。それぞれの曲線にスムージング処理を行う。大動脈弓の時間放射能曲線と大脳半球のそれには時間的ずれが存在するため, 両者のピーク時間または立ち上がりの時間を合わせるべく脳の時間放射能曲線を左方へ偏位させる。各パラメータの単位は, B (t) が大脳半球の関心領域における毎秒あたりの総計数率,  $k_u$  が  $\text{ROI}_{\text{brain size}}/\text{ROI}_{\text{aorta size}}$ /秒, A (t) が大動脈弓の関心領域における毎秒あたりの総計数率,  $V_n$  が  $\text{ROI}_{\text{brain size}}/\text{ROI}_{\text{aorta size}}$  である。式(6)をグラフ上にプロットするとトレーサ投与後30秒以内の8~14秒間において直線部分が得られる。このことは, この方法が  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO および  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD にも応用可能であり, しかも血液から脳への一方向のみの動態を示す時間帯が短いながら存在することを示唆するものである。投与後約30秒以降では測定点が直線から下方にはずれるようになる。この時間以降では脳から血液へのトレーサの逆拡散が生じてくること, および血液内での拡散性トレーサから非拡散性トレーサへの代謝が生じてくるために式(6)の仮定が成り立たなくなることを示すものと考えられる。グラフ上のプロットから得られた傾き  $k_u$  は脳と大動脈弓と関心領域の大きさの比に依存する。以下の式により両者の関心領域の大きさの比を1:10と正規化し関心領域の大きさに依存しない指数を求め, これを Brain Perfusion Index (BPI) とした。

$$\text{BPI} = 100 \cdot k_u \cdot \frac{10 \cdot (\text{ROI}_{\text{aorta size}})}{(\text{ROI}_{\text{brain size}})} \dots\dots\dots(7)$$

BPI と  $^{133}\text{Xe}$ -SPECT の early picture 法で得られた脳血流量の相関係数は  $r = 0.926$  ( $P = 0.0001$ ), 直線回帰式は  $Y = 2.75X + 17.7$  であった<sup>29,30</sup>。また, 別の11人の患者において,  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO と  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD の BPI を比較したところ, 両者には  $r = 0.935$  と極めて高い相関が得られ, この両者の直線回帰式と前述の  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO の BPI と  $^{133}\text{Xe}$ -SPECT 脳血流測定法による直線回帰式から,  $^{99m}\text{Tc}$ -ECD の BPI を  $Y = 2.60X + 19.8$  の直線回帰式で  $^{133}\text{Xe}$ -SPECT の early picture 法で得られた脳血流量に換算することが可能である<sup>31</sup>。この方法により19~87歳の73人の健康正常人から得られた大脳平均血流量は  $48.8 \pm 5.2 \text{ ml}/100 \text{ g}/\text{min}$  であり, 加齢と弱い負の相関を示している (Fig. 2a)。

この大脳平均血流量から局所脳血流量を算出するために, 式(1)で示される Lassen らの提唱した  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO による SPECT 画像の濃度コントラスト補正法<sup>14</sup>)を用いる。補正係数  $\alpha$  は理論的には次の式により求められる。

$$\alpha = \frac{k_3}{k_{2r}} \dots\dots\dots(8)$$

$$k_{2r} = \frac{k_{1r}}{\lambda} = \frac{E \cdot F_r}{\lambda} \dots\dots\dots(9)$$

ここで  $k_3$  は脳組織内で脂溶性のトレーサーが水溶性に代謝される速度定数,  $k_{2r}$  は参照部において脳内から血液中へトレーサーが代謝されないまま逆拡散する速度定数,  $\lambda$  は脂溶性トレーサーの血液脳分配係数,  $K_{1r}$  は参照部での血液中から脳内へのトレーサー移行速度定数であり, 式(9)のごとく1回循環での血液から脳への摂取率Eと参照部の脳血流量  $F_r$  の積で表わされる。1回循環での血液から脳への摂取率は脳血流量Fが高くなるほど低下することが報告されているが, 通常この補正は行われていない。Lassen らのコントラスト補正法においては, 脳血液分配係数  $\lambda$  および  $k_3$  は一定と仮定されており,  $^{99m}\text{Tc}$ -HMPAO ではそれぞれ報

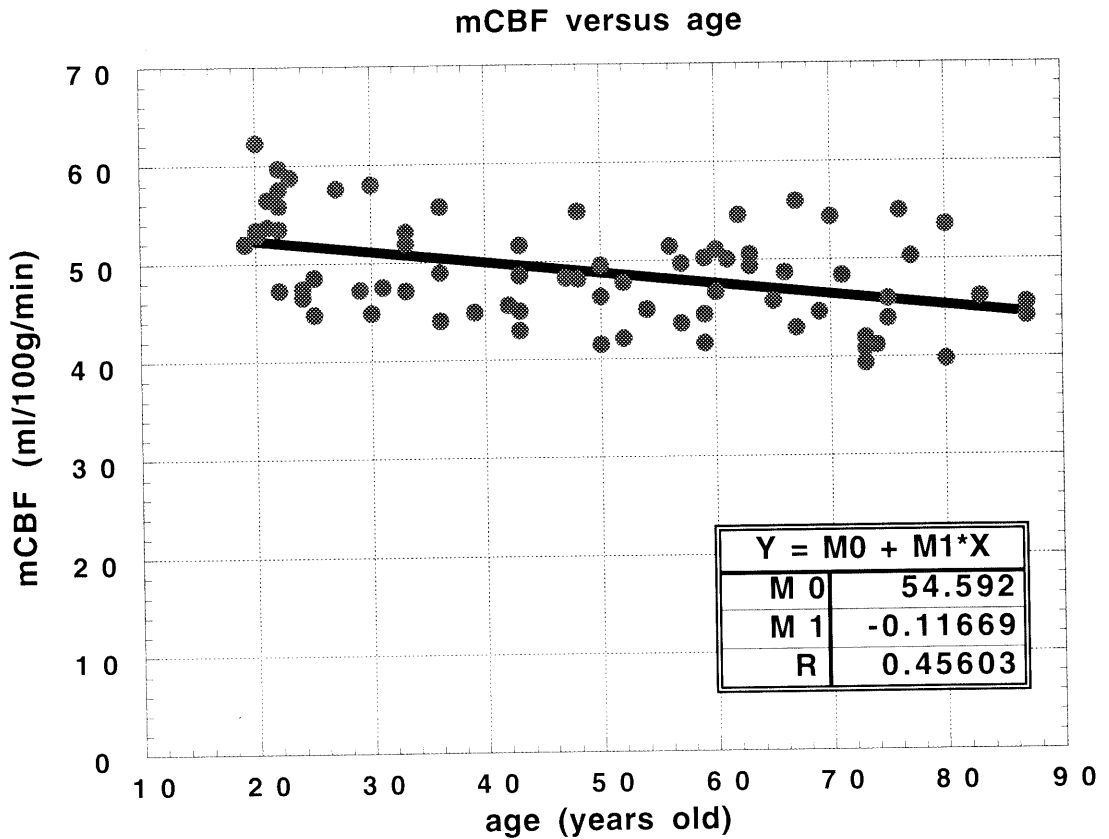


Fig. 2 a. 19~87歳, 正常者75人の大脳平均血流量と加齢との関係. 加齢により軽度の低下をみる.

告値  $0.67 \text{ ml/g}$  および  $0.80/\text{min}$  を<sup>14)</sup>, <sup>99m</sup>Tc-ECD ではそれぞれ報告値  $1.33 \text{ ml/g}$  および  $0.57/\text{min}$  を<sup>20)</sup>代入する. このようにして求められる補正係数  $\alpha$  は, 参照部の脳血流量が  $20 \sim 60 \text{ ml}/100 \text{ g}/\text{min}$  と変化した場合, <sup>99m</sup>Tc-HMPAO では  $3.2 \sim 1.2$  に分布し, <sup>99m</sup>Tc-ECD では  $6.3 \sim 2.1$  に分布する. この補正係数が高くなればなるほど, 逆拡散補正の程度が少なくなる.  $\alpha$  値が低い <sup>99m</sup>Tc-HMPAO では参照部脳血流量に依存した変動  $\alpha$  値を用いるべきであるが,  $\alpha$  値が高い <sup>99m</sup>Tc-ECD では報告されている平均  $\alpha$  値の  $2.59$  を固定値として用いても得られる局所脳血流値の誤差は少なく, 臨床的に十分な精度を有する.

## VI. データ解析法

PET や SPECT による従来の画像診断は, 頭部 CT や MRI などと同様に主として視察と ROI (region of interest) の解析によって行われてきた. しかし, 定量的な様々なパラメータの表現が可能な PET/SPECT 画像の潜在性を十分に生かし切っているとは言い難い.

最近, Statistical Parametric Mapping (SPM)<sup>32)</sup> が画像解析に多く用いられるようになってきた. SPM は, 形態の異なる各個人の脳機能情報を, Talairach の標準脳に合うように変形することによって脳形態の個人差をなくし, さらに  $8 \sim 20 \text{ mm}$  のフィルタをかけることでノイズと脳機能局在の個人差を吸収する. これらの操作により, 脳画像のボクセル単位での

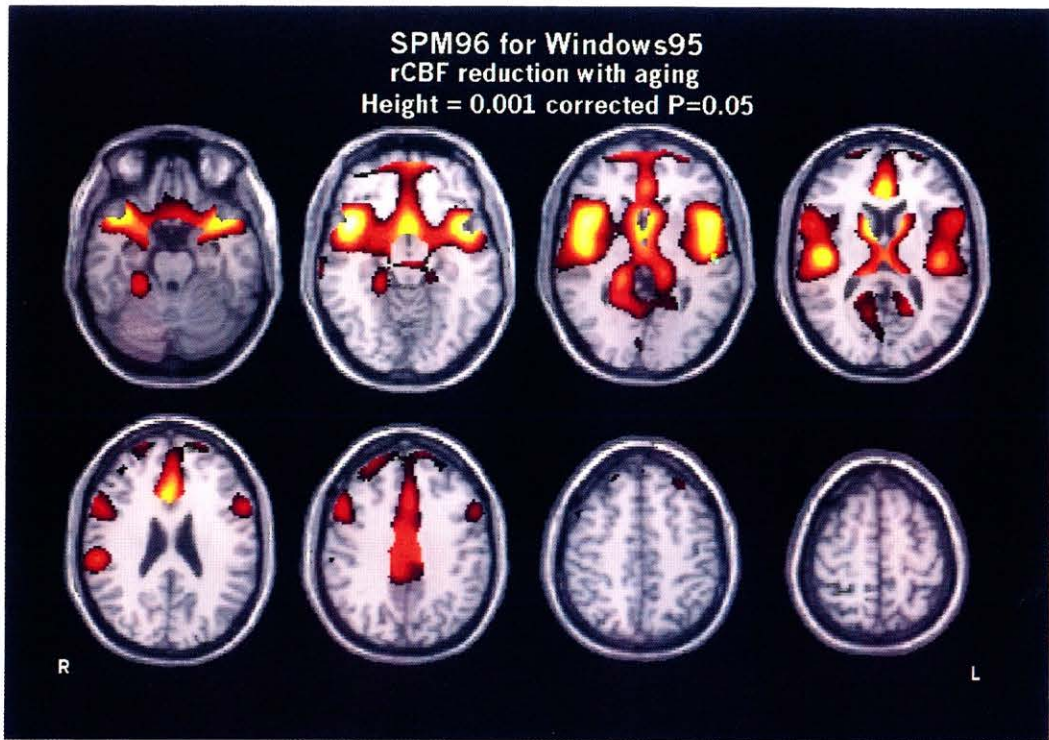


Fig. 2 b. Statistical Parametric Mapping (SPM)による局所脳血流量と年齢との関連の解析. 標準脳の MRI, T1 強調画像上に加齢により統計学上有意の血流低下を示す領域がカラースケールで投影されている. 両側シルビウス裂周囲と帯状回前部で血流低下が著しい.

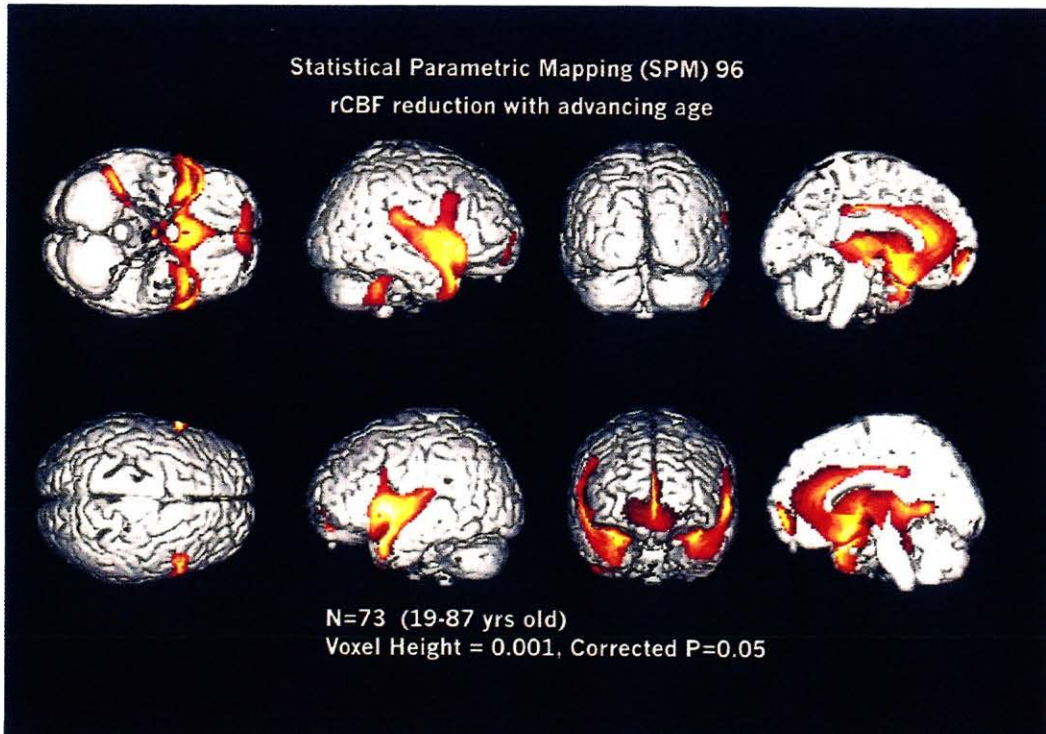


Fig. 2 c. 標準脳の 3次元ボリュームレンダリング上への Fig. 2b の統計処理結果の投影.

統計検定が可能となった。脳局所の各ボクセル毎の t 検定を行うことにより、賦活によって有意に血流が変化した部位やグループ間で血流に有意の差がみられる部位などを検出する。さらに、局所脳血流と年齢や症状評価スケールなどの相関を求めることも可能である (Fig. 2b, c)。得られた t 値は標準正規分布に従う Z 値に変換後、3 次元脳上の投影図として表示される。この方法は、局在診断の精度を飛躍的に向上させ、世界的な標準手法となりつつある。

SPM では、各人の脳の定量値そのものを扱うことが望ましいが、例えば、脳血流は様々な要因 (血中二酸化炭素濃度や心理状態、検査誤差など) によって個人間および個人内変動が大きいため、その全脳血流量を  $50 \text{ ml}/100 \text{ g}/\text{min}$  に正規化することによって (ANCOVA, Proportional Scaling)、微細な局所脳血流量の変動や差違、相対的な脳血流分布としても解析する

ことができる。SPM の応用として、正常データベースと個々の症例の脳血流を比較することで、視察では判定困難な病変を同定もしくは再確認することにも利用できる (Fig. 3a, b)。SPM の問題点として、局所的な脳萎縮や粗大な脳損傷が存在すると脳形態の標準化が困難となることもあるが、この場合、非線形変換処理をせず一部の線形変換のみで標準化をおこなえば、ある程度の標準化は可能である。また、SPM は画像解析ソフトウェアである Matlab のマクロとして開発され、UNIX 上で作動するため、高価な初期投資が必要であったが、最近では PC-UNIX 上でも動作が確認されている。さらには、Windows 95 上で動き、全く他のソフトウェアを必要としない簡易版の SPM がフリーウェアとしてインターネット上に公開されている。

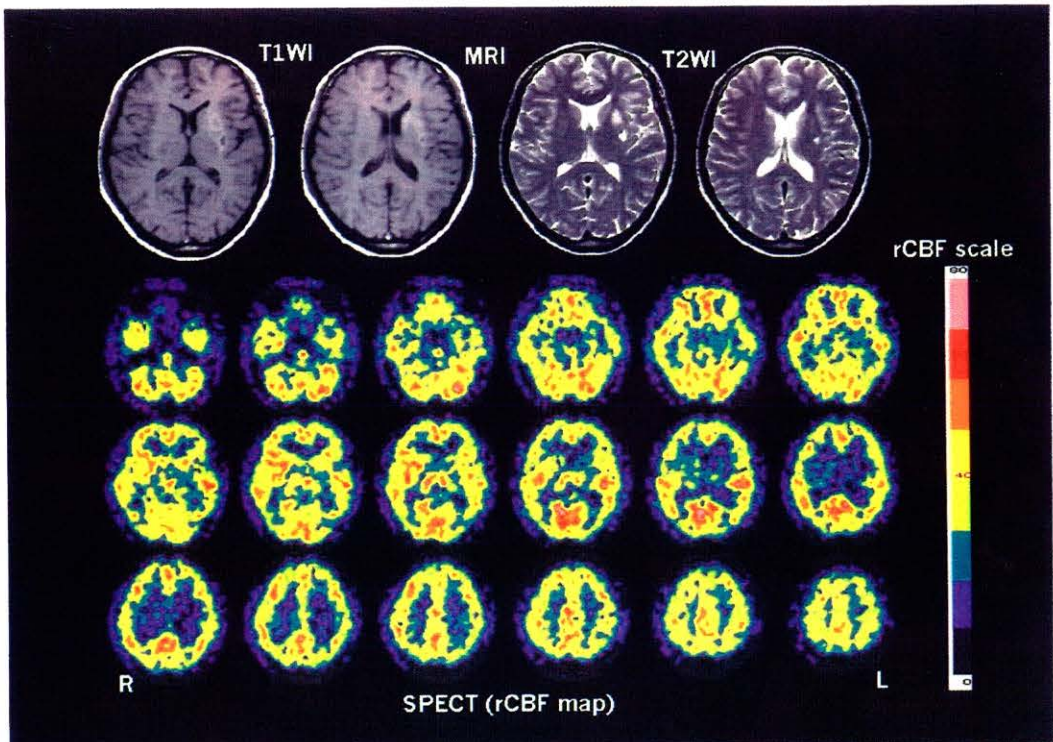


Fig. 3 a. 左中大脳動脈穿通枝領域の出血性脳梗塞例の MRI 画像と  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -ECD による脳血流 SPECT 画像。

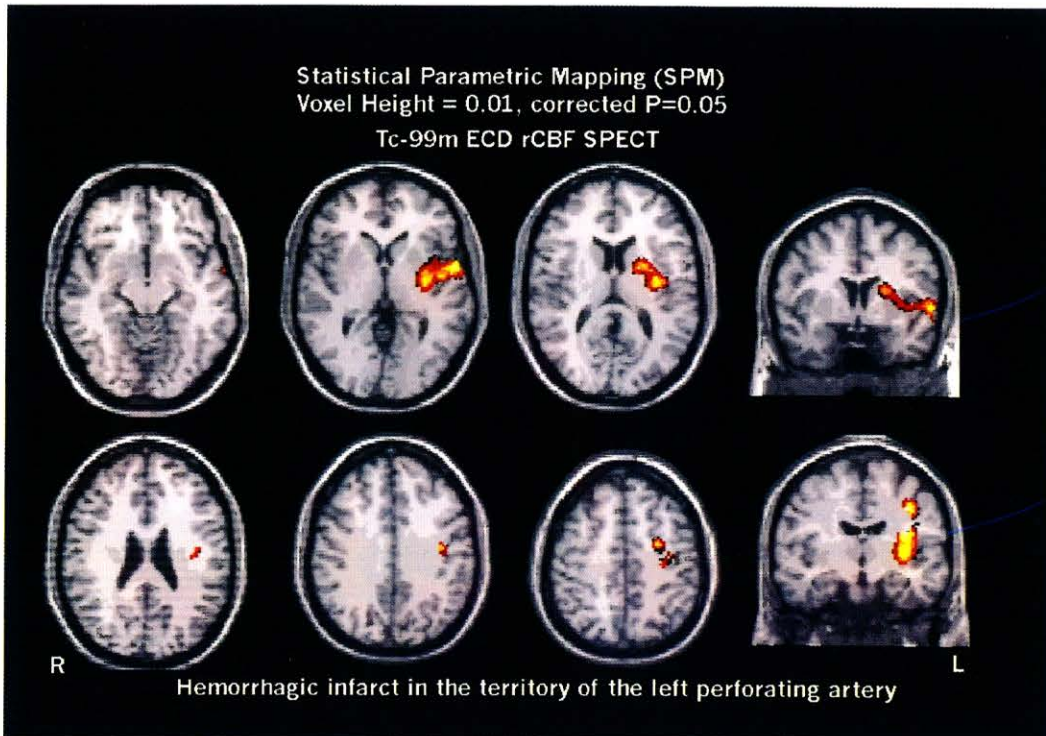


Fig. 3 b. 同症例の SPECT を正常データベースと SPM により統計的に比較解析した結果を標準脳の MRI 上に表現. 有意の血流低下部位および範囲が明瞭に評価できる.

## VII. SPECT による神経伝達物質・受容体のイメージング

神経伝達物質・受容体のイメージングは、PET により行われてきたが、近年は一般臨床での利用をめざして SPECT 製剤の開発およびその臨床応用に関する研究が盛んになってきている。

### (a) 中枢性ベンゾジアゼピン受容体

本邦で既に臨床治験が終了し、近々に保険適用が期待される神経伝達機能イメージングとして  $^{123}\text{I}$ -iomazenil による中枢性ベンゾジアゼピンイメージングが挙げられる<sup>33)</sup>。ベンゾジアゼピン受容体は中枢性と末梢性のサブタイプがあり、脳において中枢性ベンゾジアゼピン受容体は主に神経細胞に、末梢性ベンゾジアゼピン受容体は主にグリア細胞に存在する。この中枢性ベンゾジアゼピン受容体に対するイメージン

グ用剤として、本邦で既に臨床治験が終了している  $^{123}\text{I}$ -iomazenil が挙げられる。 $^{123}\text{I}$ -iomazenil は中枢性ベンゾジアゼピン受容体の antagonist または partial inverse agonist としての薬理的性質を有する。その中枢性ベンゾジアゼピン受容体に対する親和性、特異的結合は PET で用いられる  $^{11}\text{C}$ -flumazenil よりも高く、投与 2～3 時間後には特異的結合部位を反映した画像となる。すなわち、大脳皮質、小脳皮質の集積は高いが、基底核や脳幹部の集積は低く、白質の集積は極めて低い (Fig. 4)。精神・神経疾患への臨床応用としては、てんかん焦点の検出が挙げられる<sup>34～36)</sup>。てんかん性異常発射が、焦点での GABA 作動性ニューロンの機能低下によるシナプス抑制低下に起因するというシナプス伝達異常説が存在する。ベンゾジアゼピン受容体はこの GABA<sub>A</sub> 受容体と共役し、またシナプス抑制に関与する GABA—ベンゾ

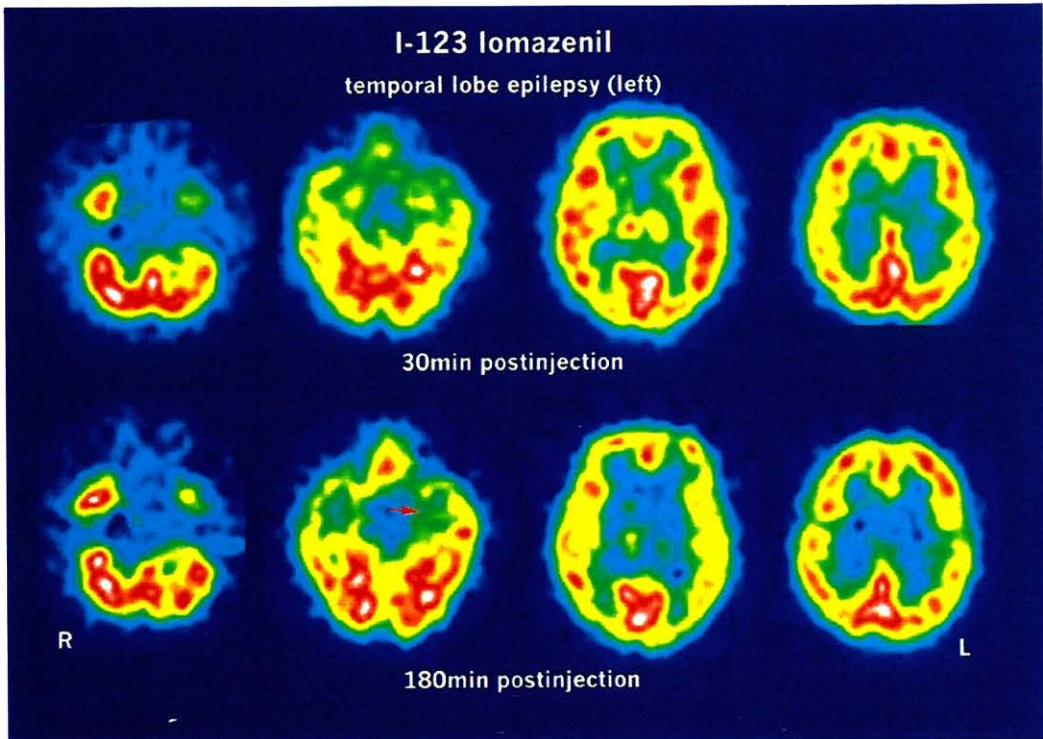


Fig. 4. 側頭葉てんかんにおける  $^{123}\text{I}$ -iomazenil SPECT の投与30分後と180分後の SPECT 画像。180分後では、中枢性ベンゾジアゼピン受容体の分布に従い、基底核、脳幹部、白質の集積が低い。矢印で示す左内側側頭部の集積低下は、てんかん焦点を示す。

ジアゼピン複合体のマーカであるため、てんかん焦点でこの受容体数の減少が検出される。 $^{123}\text{I}$ -iomazenil は脳血流 SPECT よりも発作間欠期のてんかん焦点の検出において感度、特異度、的確度とも優る。てんかん手術により摘出された海馬のオートラジオグラフィでは、中枢性ベンゾジアゼピン受容体の濃度は神経細胞の密度に高く相関して減少しており、本イメージングは神経細胞の密度を描出しよう<sup>34)</sup>。また、中枢性ベンゾジアゼピンイメージングで検出される集積低下部位は、 $^{18}\text{F}$ -FDG による糖代謝でみられる発作間欠期の集積低下部位より狭く限局しており、焦点の局在をより明瞭化しうる。他の応用としては脳血管障害における神経細胞残存の評価が挙げられる。脳血流は梗塞巣を中心に広範囲で低下し、さらに神経線維連絡を介して遠隔部位でも低下する。このため、治療の対象となる生存能力を有する脳組織の評

価は脳血流 SPECT のみでは困難である。神経細胞密度を示す  $^{123}\text{I}$ -iomazenil SPECT は生存可能な神経細胞の評価に有用である<sup>37)</sup>。中枢性ベンゾジアゼピンは抗不安作用を有し、従来から不安障害の病因における GABA<sub>A</sub>/ベンゾジアゼピン受容体の関与が示唆されている。Schlegel ら<sup>38)</sup> および Kuikka ら<sup>39)</sup> はパニック障害における iomazenil SPECT での異常を報告しているが、異常な部位、集積程度には差異がみられ未だ一定した結果は得られていない。

#### (b) ドパミン D<sub>2</sub> 受容体

ドパミン D<sub>2</sub> 受容体に対しては、 $^{123}\text{I}$ -IBZM および、それよりも親和性が4倍ほど高い  $^{123}\text{I}$ -ヨードベンゾフラン (IBF) が開発された<sup>40)</sup>。 $^{123}\text{I}$ -IBF は D<sub>2</sub> レセプターに加え D<sub>3</sub> レセプターにも同様な親和性を有するとされている<sup>41)</sup>。このリガンドを用いて、パーキンソン病と線条体黒質変性症などの症候性パーキンソン

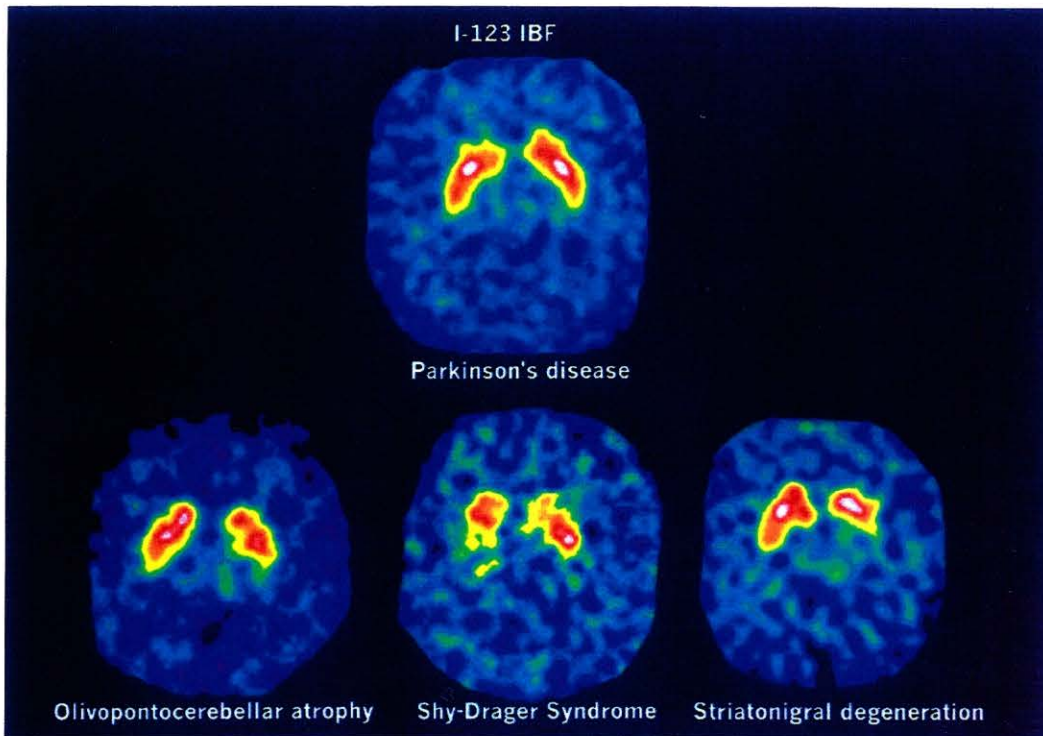


Fig. 5.  $^{123}\text{I}$ -IBF 投与 2 時間後における  $\text{D}_2$  ドパミン受容体 SPECT 画像. パーキンソン病では両側の線条体に良好な集積が認められるが, 多系統萎縮症では, 線条体への集積が不均一に低下し, 左右差も強い. 両疾患の鑑別に極めて有用である.

ニズムとを鑑別することが可能である (Fig. 5). パーキンソン病では線条体への集積が保たれているが, 症候性パーキンソニズムでは低下する<sup>42,43</sup>. また, 精神疾患におけるこのイメージングの応用として, 向精神薬の  $\text{D}_2$  レセプタの占拠率を測定することにより, 向精神薬の選択および至適投与量の決定に役立つと期待されている.

#### (c) ドパミントランスポータ

コカインの結合部位でもあるドパミントランスポータは神経終末に存在し, シナプス間隙に放出されたドパミンを神経終末に再取り込みして神経伝達を終了させる働きを持つ. 近年, このトランスポータのイメージング用剤が開発され, ドパミン神経細胞のマーカーとして研究が進んでいる.  $^{123}\text{I}$ - $\beta$ -カルボキシオードフェニルトロパン ( $^{123}\text{I}$ - $\beta$ -CIT) はセロトニン (5 HT) とドパミンの両方のトランスポータイメージング

用剤である<sup>44</sup>. 前者は投与後 1 ~ 3 時間の早期の画像から得られ, 後者は投与 1 日後の後期の画像から得られる. 精神・神経疾患への臨床応用としては, ドパミントランスポータイメージングによるパーキンソン病の早期診断と重症度診断が可能であり, 特に被験で強い集積低下がみられる<sup>45,46</sup>. また, 5 HT トランスポータイメージングでは, うつ病での内側前頭葉皮質での集積低下, パニック障害での大脳皮質でのび慢性集積増加が報告されている. また, ドパミントランスポータイメージングにおいても, 向精神薬服用中の分裂病患者において線条体の集積低下がみられている<sup>47</sup>.

この他に, ムスカリン性アセチルコリン受容体, アセチルコリン神経終末, ドパミン  $\text{D}_1$  受容体, セロトニン  $\text{S}_2$  受容体等を描出するリガンドが開発されている.

## Ⅷ. お わ り に

核医学の最大の特徴は、目的に応じたトレーサの使用により、種々の情報を区別して表現できることにある。今後の脳の核医学の主力は脳血流から神経伝達機能イメージングに移行していくものと期待される。これらの核医学的機能情報を MRI など得られた情報と相補的に用いることにより種々の精神・神経疾患の治療に直結した情報を得ることが可能となると思われる。また、核医学の欠点である乏しい空間解像力を補うため、日常臨床レベルでの MRI 等との重ね合わせ手法が用いられる必要がある。

## 文 献

- 1) Kety SS: The theory and application of the exchange of inert gas at the lungs and tissues. *Pharmacol Rev* **3**: 1-41, 1951
- 2) Crone C: The permeability of brain capillaries to non-electrolytes. *Acta Physiol Scand* **64**: 407-417, 1965
- 3) Kanno I, Lassen NA: Two methods for calculating regional cerebral blood flow from emission computed tomography of inert gas concentrations. *J Comput Assist Tomogr* **3**: 71-76, 1979
- 4) Winchell HS, Horst WD, Braun L, Oldendorf W H, Hattner R, Parker H: N-isopropyl- $^{123}\text{I}$  p iodoamphetamine: single-pass brain uptake and washout: binding to brain synaptosomes and localization in dog and monkey. *J Nucl Med* **21**: 947-952, 1980
- 5) Mori H., Shiba K, Matsuda H, Tsuji S, Hisada K: Characteristics of the binding of N-isopropyl-p- $^{125}\text{I}$  iodoamphetamine in the rat brain synaptosomal membranes. *Nucl Med Commun.* **11**: 327-331, 1990
- 6) Creutzig H, Schober P, Gielow P, Friedrich H, Becker H, Dietz HS, Hundeshagen H: Cerebral dynamics of N-isopropyl- $^{123}\text{I}$  p-iodoamphetamine. *J Nucl Med* **27**: 178-183, 1986
- 7) Defer G, Moretti JL, Cesaro P, Sergeant A, Raynaud C, Degos JD: Early and delayed SPECT using N-isopropyl p-iodoamphetamine iodine 123 in cerebral ischemia. A prognostic index for clinical recovery. *Arch Neurol* **44**: 715-718, 1987
- 8) Matsuda H, Tsuji S, Oba H, Shiba K, Terada H, Kinuya K, Mori H, Sumiya H, Hisada K: Autoradiographic analysis of iodoamphetamine redistribution in experimental brain ischemia. *J Nucl Med* **31**: 660-667, 1990
- 9) Gupta S, Bushnell DL, Mlcoch A, Eastman G, Barnes WE, Fisher SG: Utility of late N-isopropyl-p- (iodine-123) -iodoamphetamine brain distribution in predicting outcome following cerebral infarction. *Stroke* **22**: 1512-1518, 1991
- 10) Kuhl DE, Barrio JR, Huang S-C, Selin C, Ackermann RF, Lear JL, Wu JL, Lin TH, Phelps ME: Quantifying local cerebral blood flow by N-isopropyl-p- $^{123}\text{I}$  iodoamphetamine. *J Nucl Med* **23**: 196-203, 1982
- 11) Neirinckx RD, Canning LR, Piper IM, Nowotnik DP, Pickett RD, Holmes RA, Volkert WA, Forster AM, Weisner P, Marriott JA, Chaplin SB: Technetium-99m d, l-HM-PAO: A new radiopharmaceutical for SPECT imaging of regional cerebral blood perfusion. *J Nucl Med* **28**: 191-202, 1987
- 12) Hayashida K, Nishimura T, Imakita S, Uehara T: Filling out phenomenon with technetium-99m HMPAO brain SPECT at the site of cerebral ischemia. *J Nucl Med* **30**: 591-598, 1989
- 13) Neirinckx RD, Bürke JF, Harrison RC, Forster AM, Andersen AR, Lassen NA: The retention mechanism of Tc99m-D, L-HMPAO: intracellular reaction with glutathione. *J Cereb Blood Flow Metabol* **8** [Suppl 1]: S4-S12, 1988
- 14) Lassen NA, Andersen AR, Friberg L, Paulson OB: The retention of Tc99m-D, L-HMPAO in the human brain after intracarotid bolus injection: a kinetic analysis. *J Cereb Blood Flow Metabol* **8** [Suppl 1]: S13-S22, 1988
- 15) Yonekura Y, Nishizawa S, Mukai T, Fujita T, Fukuyama H, Ishikawa M, Kikuchi H, Konishi J, Andersen AR, Lassen NA: SPECT with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -d, l-hexamethyl-propylene amine oxime (HM-PAO) compared with regional cerebral blood flow measured by PET: effects of linearization. *J Cereb Blood Flow Metabol* **8** [Suppl 1]: S82-S89, 1988
- 16) Gemmel HG, Evans NTS, Besson JAO, Roeda D, Davidson J, Dodd MG, Sharp PF, Smith FW, Crawford JR, Newton RH, Kulkarni V, Mallard JR: Regional cerebral blood flow imaging: a quantitative comparison of technetium-99m-HMPAO SPECT with  $\text{C}^{15}\text{O}_2$  PET. *J Nucl Med* **31**: 1595-1600, 1990
- 17) Inugami A, Kanno I, Uemura K, Shishido F, Murakami M, Tomura N, Fujita H, Higano S: Linearization correction of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled hexamethyl-propylene amine oxime (HM-PAO) image in terms of regional CBF distribution: comparison to  $\text{C}^{15}\text{O}_2$  inhalation steady-state method measured by positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metabol* **8** [Suppl 1]: S52-S60, 1988
- 18) Walovitch RC, Hill TC, Garrity ST, Cheesman EH, Burgess BA, O'Leary DH, Watson AD, Ganey

- MV, Morgan RA, Williams SJ: Characterization of technetium-99m-L, L-ECD for brain perfusion imaging, Part 1: Pharmacology of technetium-99m ECD in nonhuman primates. *J Nucl Med* 30: 1892-1901, 1989
- 19) L veill  J, Demonceau G, De Roo M, Rigo P, Taillefer R, Morgan RA, Kupranick D, Walovitch RC: Characterization of technetium-99m-L, L-ECD for brain perfusion imaging, Part 2: Biodistribution and brain imaging in humans. *J Nucl Med* 30: 1902-1910, 1989
- 20) Friberg L, Andersen AR, Lassen NA, Holm S, Dam M: Retention of <sup>99m</sup>Tc-bicisate in the human brain after intracarotid injection. *J Cereb Blood Flow Metab* 14 [Suppl 1]: S19-S27, 1994
- 21) Matsuda H, Li YA, Higashi S, Sumiya H, Tsuji S, Kinuya K, Hisada K, Yamashita J: Comparative SPECT study of stroke using Tc-99m ECD, I-123 IMP, and Tc-99m HMPAO. *Clin Nucl Med* 18: 754-758, 1993
- 22) Nakagawara J, Nakamura J, Takeda R, Okumura T, Seki T, Hayase K, Satoh K, Suematsu K: Assessment of postischemic reperfusion and diamox activation test in stroke using <sup>99m</sup>Tc-ECD SPECT. *J Cereb Blood Flow Metabol* 14 (Suppl 1): S49-S57, 1994
- 23) Patterson JC, Early TS, Martin A, Walker MZ, Russel JM, Villanueva Meyer H: SPECT image analysis using statistical parametric mapping: comparison of technetium-99m-HMPAO and technetium-99m-ECD. *J Nucl Med* 38: 1721-1725, 1997
- 24) Chiron C, Raynaud C, Mazi re B, Zilbovicius M, Laflamme L, Masure MC, Dulac O, Bourguignon M, Syrota A: Changes in regional cerebral blood flow during brain maturation in children and adolescents. *J Nucl Med* 33: 696-703, 1992
- 25) Chugani HT, Phelps ME, Mazziotta JC: Positron emission tomography study of human brain functional development. *Ann Neurol* 22: 487-497, 1987
- 26) Matsuda H, Seki H, Sumiya H, Tsuji S, Tonami N, Hisada K, Fujii H, Kobayashi H: Quantitative cerebral blood flow measurements using N-isopropyl- (Iodine 123) p-iodoamphetamine and single photon emission computed tomography with rotating gamma camera. *Am J Physiol Imaging* 1: 186-194, 1986
- 27) Iida H, Itoh H, Nakazawa M, Hatazawa J, Nishimura H, Onishi Y, Uemura K: Quantitative mapping of regional cerebral blood flow using Iodine-123-IMP and SPECT. *J Nucl Med* 35: 2019-2030, 1994
- 28) Patlak CS, Blasberg RG, Fenstermacher JD: Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data. *J Cereb Blood Flow Metabol* 3: 1-7, 1983
- 29) Matsuda H, Tsuji S, Shuke N, Sumiya H, Tonami N, Hisada K: A quantitative approach to technetium-99m hexamethylpropylene amine oxime. *Eur J Nucl Med* 19: 195-200, 1992
- 30) Matsuda H, Tsuji S, Shuke N, Sumiya H, Tonami N, Hisada K: Noninvasive measurements of regional cerebral blood flow using technetium-99m hexamethylpropylene amine oxime. *Eur J Nucl Med* 20: 391-401, 1993
- 31) Matsuda H, Yagishita A, Tsuji S, Hisada K: A quantitative approach to technetium-99m ethyl cysteinyl dimer: a comparison with technetium-99m hexamethylpropylene amine oxime. *Eur J Nucl Med* 22: 633-637, 1995
- 32) Friston KJ: Analyzing brain images: principles and overview: In *Human Brain Function*, Frackowiak RSJ, Friston KJ, Frith CD, Dolan RJ, Mazziotta JC (eds), 1st ed, Academic Press, San Diego, 1997, pp25-41
- 33) Beer HF, Bl uenstein PA, Hasler PH, Delaloye B, Riccabona G, Bangerl I, Hunkeler W, Bonetti EP, Pieri L, Richards JG, Schubiger PA: In vitro and in vivo evaluation of iodine-123-Ro 16-0154: a new imaging agent for SPECT investigations of benzodiazepine receptors. *J Nucl Med* 31: 1007-1014, 1990
- 34) Johnson EW, de Lanerrolle NC, Kim JH, Sundaresan S, Spencer DD, Mattson RH, Zoghbi SS, Baldwin RM, Hoffer PB, Seibyl JP: Central and peripheral benzodiazepine receptors: opposite changes in human epileptic tissue. *Neurology* 42: 811-815, 1992
- 35) Kurokawa K, Jibiki I, Matsuda H, Fukushima T, Tsuji S, Yamaguchi N, Hisada K: Comparison of benzodiazepine receptor and regional cerebral blood flow imaging of epileptiform foci in hippocampal kindled rabbits: a study with in vivo double tracer autoradiography using <sup>125</sup>I-Iomazenil and <sup>99m</sup>Tc-HMPAO. *Brain Res* 642: 303-310, 1994
- 36) Schubiger PA, Hasler PH, Beer-Wohlfahrt H, Bekier A, Oettli R, Cordes M, Ferstl F, Deisenhammer E, De Roo M, Moser E: Evaluation of a multicentre study with Iomazenil-a benzodiazepine receptor ligand. *Nucl. Med. Commun.* 12: 569-582, 1991
- 37) Hatazawa J, Satoh T, Shimosegawa E, Okudera T, Inugami A, Ogawa T, Fujita H, Noguchi K, Kanno I, Miura S, Murakami M, Iida H, Miura Y, Uemura K: Evaluation of cerebral infarction with iodine-123-iomazenil SPECT. *J Nucl Med* 36: 2154-2161, 1995
- 38) Schlegel S, Steinert H, Bockisch A, Hahn K, Schloesser R, Benkert C: Decreased benzodiazepine receptor binding in panic disorder measured by IOMAZENIL-SPECT. A preliminary report. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 244: 49-51,

- 1994
- 39) Kuikka JT, Pitkänen A, Lepola U, Partanen K, Vainio P, Bergström KA, Wieler HJ, Kaiser KP, Mittelbach L, Koponen H: Abnormal regional benzodiazepine receptor uptake in the prefrontal cortex in patients with panic disorder. *Nucl Med Commun* **16**: 273-280, 1995
  - 40) Kung MP, Kung HF, Billings J, Yang Y, Murphy RA, Alavi A: The characterization of IBF as a new selective dopamine D-2 receptor imaging agent. *J Nucl Med* **31**: 648-654, 1990
  - 41) Laruelle M, van Dyck C, Abi Dargham A, Zea Ponce Y, Zoghbi SS, Charney DS, Baldwin RM, Hoffer PB, Kung HF, Innis RB: Compartmental modeling of iodine-123-iodobenzofuran binding to dopamine D2 receptors in healthy subjects. *J Nucl Med*, **35**: 743-754, 1994
  - 42) Brücke T, Podreka I, Angelberger P, Wenger S, Topitz A, Kufferle B, Müller Ch, Deecke L: Dopamine D2 receptor imaging with SPECT: studies in different neuropsychiatric disorders. *J Cereb Blood Flow Metabol* **11**: 220-228, 1991
  - 43) Buck A, Westera G, Sutter M, Albani C, Kung HF, vonSchulthess GK: Iodine-123-IBF SPECT evaluation of extrapyramidal diseases. *J Nucl Med* **36**: 1196-1200, 1995
  - 44) Neumeyer JL, Wang S, Gao Y, Milius RA, Kula NS, Campbell A, Baldessarini RJ, Zea Ponce Y, Baldwin RM, Innis RB: N-w-Fluoroalkyl analogues of (1R)-2- $\beta$ -carbomethoxy-3- $\beta$ -(4-iodophenyl) tropane ( $\beta$ -CIT): radiotracers for positron emission tomography and single photon emission computed tomography imaging of dopamine transporters. *J Med Chem*, **37**: 1558-1561, 1994
  - 45) Innis RB, Seibyl JP, Scanley BE, Laruelle M, Abi-Dargham A, Wallace E, Baldwin RM, Zea-Ponce Y, Zoghbi S, Wang S: Single photon emission computed tomographic imaging demonstrates loss of striatal dopamine transporters in Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11965-11969, 1993
  - 46) Seibyl JP, Marek KL, Quinlan D, Sheff K, Zoghbi S, Zea Ponce Y, Baldwin M, Fussell B, Smith EO, Charney DS: Decreased single-photon emission computed tomographic [ $^{123}\text{I}$ ]  $\beta$ -CIT striatal uptake correlate with symptom severity in Parkinson's disease. *Ann Neurol* **38**: 589-598, 1995
  - 47) Kuikka, J. T., Tiihonen, J., Bergstroem, K. A., Karhu J, Hartikainen P, Viinamäki H, Länsimies E, Lehtonen J, Hakola P: Imaging of serotonin and dopamine transporters in the living human brain. *Eur J Nucl Med* **22**: 346-350, 1995

## fMRI：実践のための基礎知識

中 田 力

(新潟大学脳研究所・脳機能解析学)

(カリフォルニア大学・神経内科学)

(カリフォルニア工科大学・ベックマン研究所)

(東北大学・学際科学研究センター)

### はじめに

機能的磁気共鳴画像 functional magnetic resonance imaging (fMRI) は高速撮像された MRI 画像を元画像として施行される。従って、 $MR^1$  を知らずして fMRI は語れない。問題は MR が極端に学際的でまた守備範囲の広い学問であり、MRI だけを対象としても、その理論と実践の適切な理解にかなりの努力と時間が必要なことである。残念ながら、現在、この「獲得の難しさ」は「知識無くして fMRI が施行できる」との風潮へと転換されてしまっている。

Nernst equation を知らない神経生理学者が存在しないように、MR を知らない fMRI の研究者は存在し得ない。この小論では、MR を賄いとしない研究者に、fMRI を理解するための最低条件となる知識を供給する目的で書かれている。

### MRI の基礎知識

#### MRI コントラスト因子

MRI の画像はデジタル画像である。従って、画像上で認識される形態は他のデジタル画像同様ピクセル間のコントラストによって作られている(図1)。それぞれのピクセルの輝度は対応する部位の信号強度に比例し、その点では CT, PET, SPECT など他の画像法となんら異なる所はない。MRI の特異性はそのコントラストを決める要素、コントラスト因子 contrast mechanics の複雑さにある。

従来のどの画像法をとってみてもコントラ

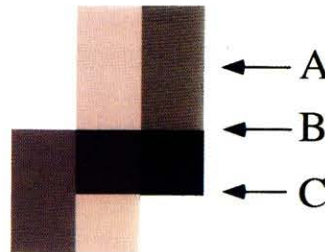


図1：デジタル画像におけるコントラスト解像度の原理。

A：隣接したピクセルの示す輝度が同一であれば、その輝度の絶対値に拘わらずピクセル間の線は現れない。B：隣接したピクセルの示す輝度の差が同じであればそれぞれの絶対値に拘わらずピクセル間の線は同じような明瞭さで判別できる。C：ピクセル間の線は隣接したピクセル間の輝度に差があればあるほどはっきりとする。

トを決定する物理特性は一つだけであった。例えば CT では組織の電子密度に比例した X 線の attenuation coefficient であり、PET/SPECT では放射性同位元素の密度に比例した  $\gamma$  線の強さである。ところが、MRI におけるコントラストは同時にいくつもの物理特性に依存性がある。

MRI 画像構築のための信号は水分子の水素原子核 proton がもたらす NMR 現象に由来する<sup>2</sup>。従って、MRI 画像のコントラスト因子となる物理特性は水分子の置かれた環境に基づき、基本的には水分子の分布とその分子運動の結果として捉えることができる。

MRI 画像のひとつのピクセルにおける信号強度、 $I$ 、はその基本因子を変数に見立てて、

$$I = f[\rho, T_1, T_2, D_{app}]$$

と表すことができる。これは極端に単純化した関係式ではあるが、MRIのcontrast mechanicsの基本を理解するには便利な関係式である。

$\rho$ はスピン密度 spin density とよばれ信号を出す水素原子核の密度、従って、単位体積あたりに存在する水分子の数と理解される。通常これは組織に依存した定数であるが、magnetization transfer を考慮すると変数として扱わなければならない。

$T_1$  と  $T_2$  はそれぞれ spin-lattice relaxation time と spin-spin relaxation time と呼ばれる緩和時間でNMRの基本特性である。その詳細な解説はNMRの教科書に譲るが、基本的には水分子の置かれた環境による回転運動の自由度を表す因子であると理解すればよい。

$D_{app}$  はみかけの拡散係数 apparent diffusion coefficient で水分子の微視的並進運動を対象とした因子である。生体において「拡散」と同様に捉えられる微視的運動には軸索流などの微細並進運動が含まれることから「みかけ apparent」が付加されている。巨視的な水分子の移動はMR angiography (MRA)に代表される「ながれの画像」の中で独立して取り扱われ、静止断層画像のコントラスト因子としては  $D_{app}$  のみが問題となる<sup>3</sup>。

MRIはこれらの因子が様々に影響を与えた複合効果として完成される。基本となるものはそれぞれの因子が画像コントラストに与える影響を「強調」した「強調画像 weighted images」であるが、目的に応じて様々なコントラストが開発されている<sup>4</sup>。

## $T_2^*$ コントラスト

fMRIでは複数の元画像から統計的に賦活部位を探る統計画像の手法を用いる(下述)。従って、まず基本となる元画像をMRIで獲得することになり、続いて、脳賦活を元画像の輝度変化として付加する作業が必要となる。言い換えれば、既に極めて複雑な因子の複合効果として

生まれるMRIの上に、もう一つ賦活に伴う僅かな輝度変化をもたらす因子を付け加えてひとつのMRI画像を獲得する作業である<sup>5</sup>。

賦活にともなう輝度変化を探る最も一般的なものが deoxy-Hb の磁化率効果を用いる手法で、BOLD<sup>6</sup>効果と呼ばれている(Appendix I)。MRIにおいて「磁化率効果 magnetic susceptibility effect」という用語は「共鳴信号をもたらす水素原子核 proton 以外の物質の磁化によって引き起こされる画像変化」を表現する一般用語として用いられている<sup>7</sup>。通常は、「磁化率の違いから起こる局所磁場の乱れによる画像変化」、すなわち、artifactの代名詞として用いられている。副鼻腔内の空気によるartifactなどがその代表例である(図2)<sup>8</sup>。磁場の乱れがひどくなると形態の歪みや消失となるが、極わずかである場合は局所部位の信号低下に止まる。BOLD効果とは deoxy-Hb のもたらすわずかな磁化率効果による信号変化を意味する<sup>1,2)</sup>。

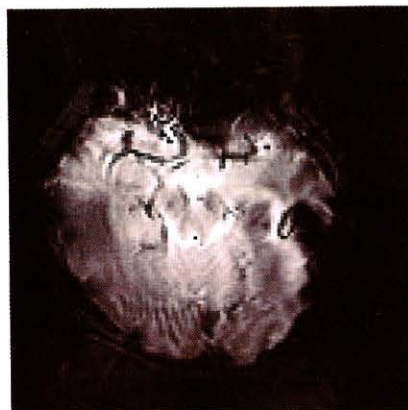


図2：狭義の磁化率効果。

錐体内の空気などによる磁場の乱れが重篤なartifactを生じている。deoxy-Hbの磁化率効果を利用したBOLD機能画像では、このようなartifactを抑えることができない。

磁化率効果に最も敏感なMRIコントラスト因子は  $T_2^*$  (みかけの  $T_2$ , tee two star と読む)である。 $T_2^*$  は水分子の物理特性そのものに関した因子ではなく、「磁場の不均一性」を

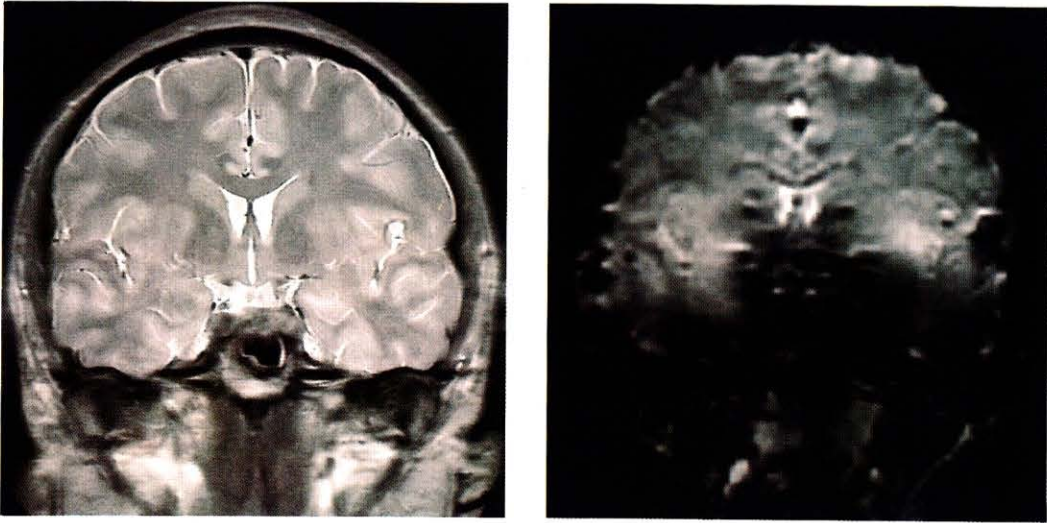


図3：最適化の重要性.

同一部位を全く同じ条件下で構造画像用に artifact を抑えた fast spin echo (SE) で撮像した場合と fMRI 用に GRE-EPI で撮像した場合の比較. 装置の最適化を図らずに一般的な装置を使用した場合, fMRI の元画像に致命的な artifact を生ずることが分かる.

表す因子である. 従って, 本質的に上述した通常の MRI コントラスト因子とは性格を異にする. BOLD 効果の本質は磁化率効果であり, 従って, 通常の spin echo 法による画像では現われにくい. BOLD 効果をより強く表すためには  $T_2^*$  強調画像<sup>9</sup>を用いなければならないが, これは同時に artifact も増強する(図3).

言い換えれば, fMRI とは  $T_2^*$  強調画像に内因する artifact の中から, 脳賦活に伴うと思われる  $T_2^*$  変化を取り出す作業である. 従って, fMRI の施行において第一に要求されることは, 高速撮像法で取得された  $T_2^*$  強調画像で磁化率効果による artifact の出現を抑えることである<sup>10</sup>.

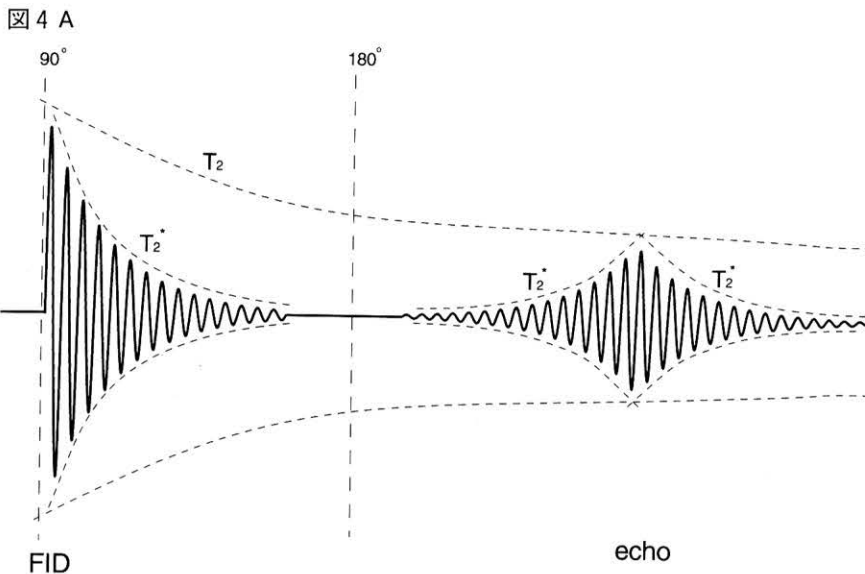


図 4 B

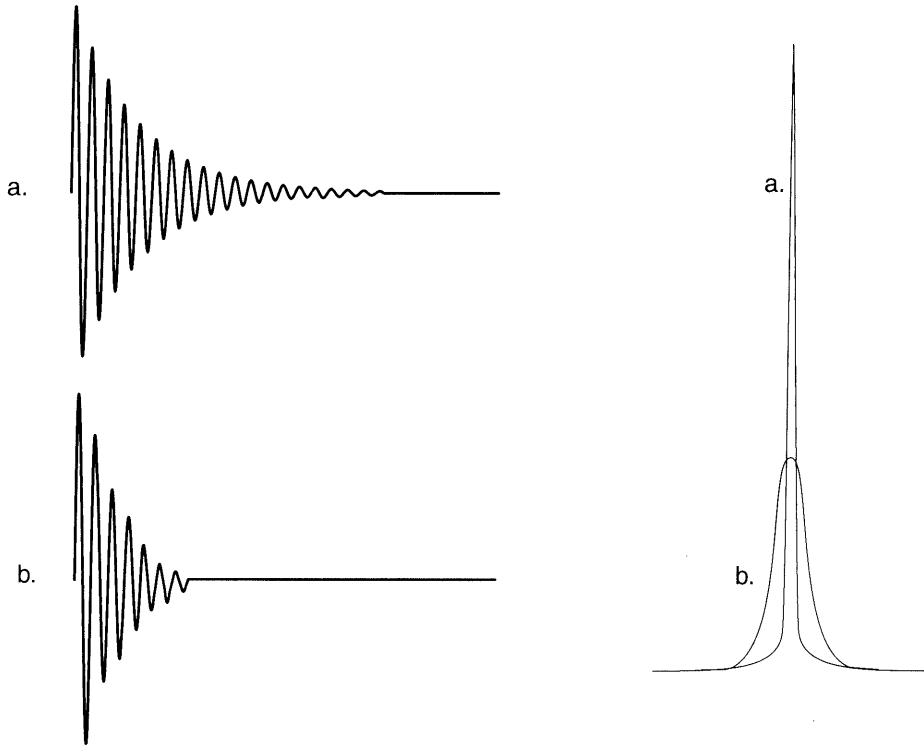
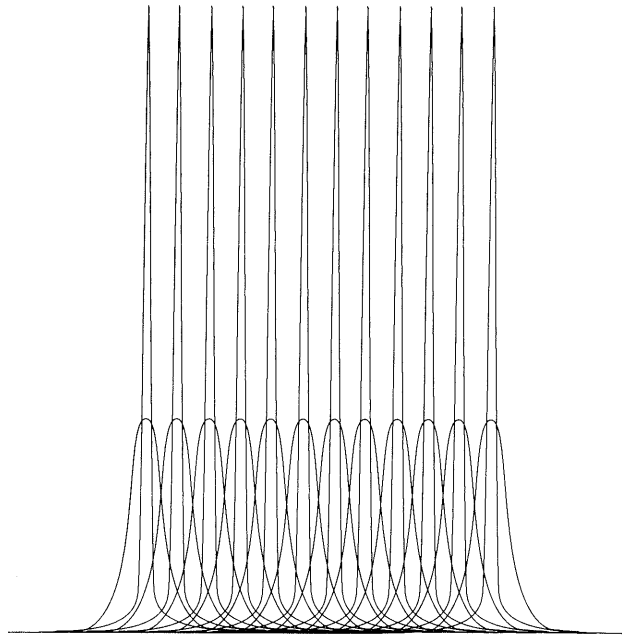


図 4 C

図 4：  $T_2^*$  の画像信号への影響を現す模式図。

- $T_2^*$  とは  $T_2$  そのものではなく、実際の信号の decay envelop 自体を表す時定数でみかけの  $T_2$  とも呼ばれる。
- $T_2^*$  の短縮は Fourier 転換後のスペクトルでは半値幅の上昇を招き、結果として画像輝度の判定に用いられる高さの低下につながる。しかし、面積は変化しない。a：  $T_2^*$  の長い場合、b：  $T_2^*$  の短い場合。
- 半値幅の変化は隣接したピクセルの信号強度判定に影響を与える (convolute した関数の高さが増える可能性がある)。

$T_2^*$  変化の画像への効果も特殊である。図 4 a-c に  $T_2^*$  の特性を表す模式図を示す。 $T_2^*$  の変化による信号の変化は対象とするピクセルの画像輝度となる信号の高さに変化を及ぼすが、面積は一定に保たれる。ここが、一般のコントラスト因子と異なる点である。従って、 $T_2^*$  の変化は対象とするピクセルの輝度変化と同時に隣接するピクセルの輝度変化をもたらすことになる。

#### Partial Volume Effect

デジタル画像はピクセルのコントラストで作られている。しかし、実際に生体から信号を取り出す作業はピクセル(二次元)の状態では不可能で、ピクセルの厚さ(スライス厚)を考慮したボクセル voxel (三次元)でなされる。従って、最終的なピクセルの輝度はボクセル内の水分子

が示す信号強度の平均値から成っている。ここから、partial volume effect と呼ばれる現象が起きる(図 5)。

Partial volume effect は構造画像の観点からも重要であるが<sup>11</sup>、fMRI では更に大きな問題となる。また、MRI での slice definition は CT<sup>12</sup>、PET<sup>13</sup>、などのように実際の X 線、 $\gamma$  線などの collimating によるものでなく信号の半値幅で行う<sup>14</sup>。その結果、MRI では partial volume effect が画像化されたスライスのみならず隣接したスライス間でも現れる。Partial volume effect に対する対策なしでは隣接したスライス内の輝度変化が賦活にともなう輝度変化として捉えられてしまう可能性が残る。

#### 実践のための基礎知識

脳賦活にともなう deoxy-Hb 局所濃度変化

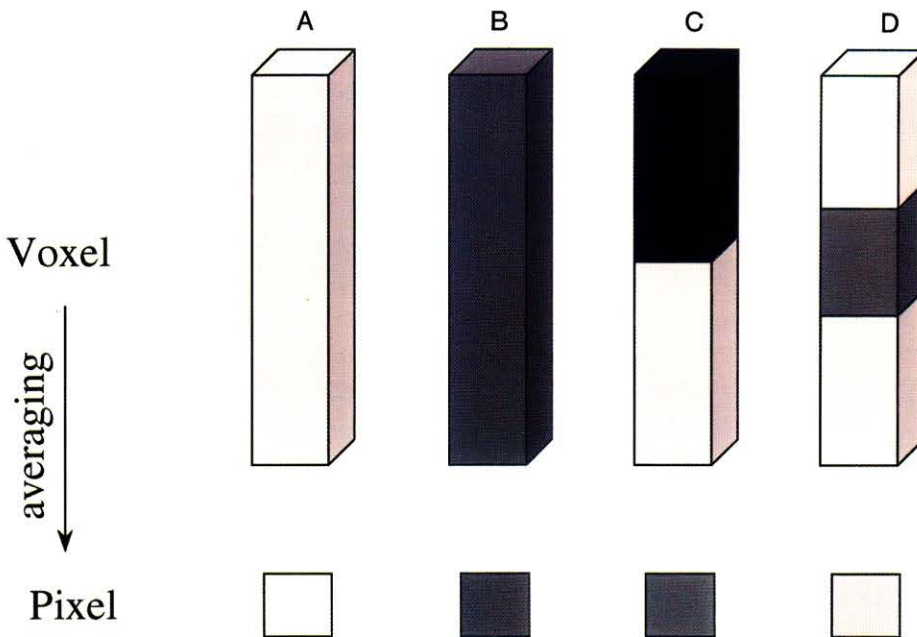


図 5：partial volume effect.

ピクセルで与えられる輝度の gray scale はボクセル内の信号強度の平均値であり、どのような信号強度を持った組織がどのように同一のボクセルに分布するかによって最終的なピクセルの輝度が決定される。fMRI の場合を例として、以下のように考えれば分かりやすい。

- A) 賦活された皮質が均一に存在する場合
- B) 賦活されない皮質が均一に存在する場合
- C) 賦活された部位と賦活されない皮質よりも低い信号強度を示す部位とが共存する場合 (最終結果は、賦活されないと表示される。)
- D) 様々な信号強度をもった部位の複合体の場合(実際の状態に最も近い場合。)

脳賦活による deoxy-Hb 濃度変化は二相性を示すと言われる<sup>15</sup>。神経細胞の活動上昇はまず酸素消費の増加をもたらす、deoxy-Hb 濃度が上昇する (initial dip)。数秒の遅れで始まる脳血流量 cerebral blood flow (CBF) の増加は消費を遥かに凌ぐ酸素量を供給し、結果として、deoxy-Hb 濃度はかえって大きく減少することになる。前者は MR 信号の低下 (negative BOLD) をもたらす、課題負荷後 2 ~ 4 秒前後でピークを迎える。後者は MR 信号の上昇 (positive BOLD) として現れ、課題負荷後 6 ~ 8 秒前後で最大となる (図 6)<sup>3)</sup>。

現在、BOLD 機能画像の対象となるものは positive BOLD である。厳密に言えば、神経活動を正確に反映するものは酸素消費の上昇であり、CBF の増加ではない。従って、negative BOLD による機能画像を施行すべきであると主張する研究者も多いが、基礎研究の域から脱し

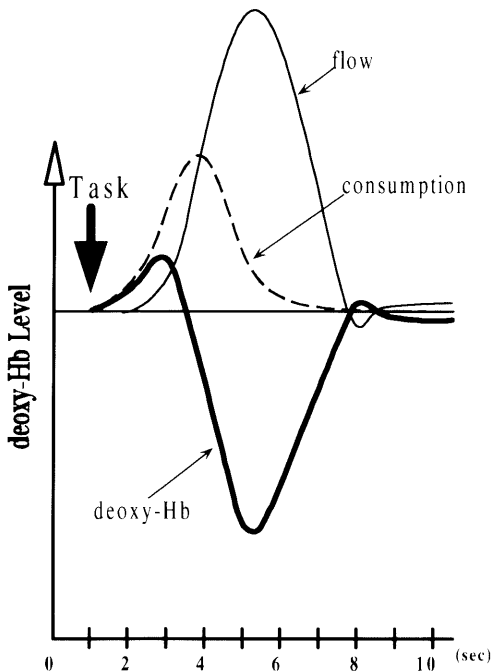


図 6：脳賦活にともなう deoxy-Hb の局所変化。

題の施行による神経細胞の活動はまず酸素消費の増加を示す (点線)。auto-regulation による局所血流の増加は数秒遅れて始まり (実線)、結果として、deoxy-Hb 濃度は二相性に変化する (太線)。

てない。

BOLD-fMRI 施行の上ではっきりと理解しておかなければいけない点は BOLD 効果とはあくまでも MRI で観察できるひとつの現象を捉えたものに過ぎず、その原因となる生理変化も、神経活動との関係も決定されていないことである。経験的に認められていることは、特定課題における賦活部位が autoregulation を介して実際の神経活動と大まかに合意すると言う点だけである。ピクセルの輝度変化が実際の神経活動と定量的に相関するか否かも、その時系列変化が神経活動の時系列変化と相関するか否かも、知られていない。

#### 画像 artifact の対策

MRI の artifact は k-space での artifact に由来する。従って、artifact の影響は画像に現れた部位のみならず広範囲に広がっている。これは他の画像法とは根本的に異なった MRI の特性である。従って、元画像に顕著な artifact が存在する限り、画像統計処理は正当性を持たず、fMRI は施行できない。賦活による信号強度変化が僅かであった場合は、例え、明らかな元画像の artifact が見られなかった場合でも、元画像の「揺れ」が fMRI での artifact (偽賦活 artificial activation) となって現れる。従って、元画像の artifact 対策は fMRI 施行のための大前提となる<sup>16</sup>。以下に、二つの基本的 artifact を概説する。

#### Susceptibility artifact

磁化率効果は臨床画像において artifact の代名詞として使われていたことから分かるように、磁化率の違いは磁場の乱れを誘発し、顕著な画像の歪みを生ずる (図 2, 3)。BOLD コントラストは deoxy-Hb のもたらす、極僅かな磁化率効果であるから、もともと磁化率効果の強い部位<sup>17</sup>で BOLD コントラストを捉えることは極めて難しい。

## EPI artifact

EPI は一度の励起で k-space をすべて網羅する方法論であり、大別して、 $90^\circ$  pulse 後すぐに free induction decay (FID) を用いる gradient echo 型の EPI (GRE-EPI) と、 $180^\circ$  pulse で正相化された echo を用いる spin echo 型の EPI (SE-EPI) とが存在する。GRE-EPI では  $T_2^*$ 、SE-EPI では  $T_2$  が主要なコントラスト因子であるが、基本的に EPI は傾斜磁場の高速 switching による k-space の信号読み出し sequence であり、FID もしくは echo の形成に至るまでの sequence に依存性がない。従って、理論的にはどのようなコントラストの画像を取得することも可能である。fMRI では磁化率効果に敏感な GRE-EPI を用いるのが一般的である。

EPI の最大の欠点は hardware への要求の厳しさと artifact の多さである。EPI は静磁場の不均一性に極めて敏感であり、通常の撮像における shimming 程度では容認できない幾何学的歪みと輝度の散らばりとを生ずる(図7)。奇数番号の echo 信号と偶数番号の echo 信号とを反対方向に読み出す操作から EPI 独特の

Nyquist artifact が生ずることも良く知られている。これらの EPI ghost は susceptibility artifact と並び、fMRI にとって厄介な敵である。

メーカー側から与えられた装置の企画のままでは、fMRI の施行に適した画像が得られる保証は全くない。また、メーカー側にそれぞれの施設での「微調節」を要求することには無理がある。EPI の適正化は、装置の置かれた環境、画像作成の parameter、それぞれの装置の「癖」などを判断しながら進められる「微調節」であり、EPI 画像の成否は、MRI 装置の使用者がどこまで hardware と software に対して厳しい態度で接し最適化を行えるかにかかっている。

## 統計学的 artifact の対策

元画像の artifact は fMRI の artifact に直結するが、元画像に artifact が全く無い場合にも、画像統計処理を必要とする fMRI には偽賦活が現れる。その原因となる基本的な三つの要素を概説する。

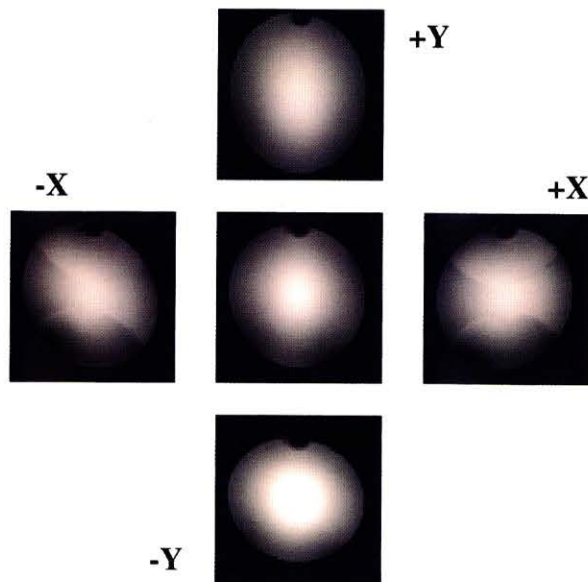


図7：僅かな磁場の不均一性から生ずる EPI artifact. 位相側の不均一性から Nyquist artifact が強調されている。

Pixel Misalignment

元画像の ghost に続く fMRI の最強の敵は pixel misalignment である。元々、隣接した組織に輝度差が存在する場合、統計的に認められた輝度変化が賦活によるものであると評価できるためには、pixel misalignment に関してある程度の条件を満たしていなければならない(図8)。

pixel misalignment 対策として広く用いられているものに様々な motion correction algorithm がある。残念ながら、現在の所、正当性を明らかに認められた motion correction algorithm は存在しない。問題点を SPM96 の motion correction algorithm を例に取って、図9に概説する。

流入効果 In-flow Effect

流入効果が BOLD fMRI に影響を与えるのは血管とその近傍である。超高磁場装置などを用いた BOLD 機能画像ではあまり大きな問題とはならないが、臨床機を用いた fMRI、特に高速での連続撮像を行った場合に、重要な要素となり得る。従って、基本的知識は不可欠である。

gradient echo sequence により撮像された静止組織の信号強度は

$$S = S_0 \frac{1 - \exp[-TR/T_1]}{1 - \cos \alpha \exp[-TR/T_1]} \sin \alpha \exp[-TE/T_2^*]$$

で表すことができる。α は flip angle である。

n 回の照射を受けた磁化の Z 軸成分を  $M_n$  とすれば、 $M_n$  は n-1 回の照射を受けた磁化の Z 軸成分  $M_{n-1}$  と撮像領域に新しく流入して来た血液の磁化の Z 軸成分  $M_{(t)}$  によって

$$M_n = AM_{n-1} + BM_{(t)}$$

|                         |   |                                              |
|-------------------------|---|----------------------------------------------|
| <b>Gray Matter ~ 30</b> | → | <b>39 (3%)</b>                               |
| <b>CSF ~ 100</b>        | → | <b>30 x 0.9 + 100 x 0.1 = 37 (0.1 pixel)</b> |
|                         |   | <b>30 x 0.8 + 100 x 0.2 = 44 (0.2 pixel)</b> |

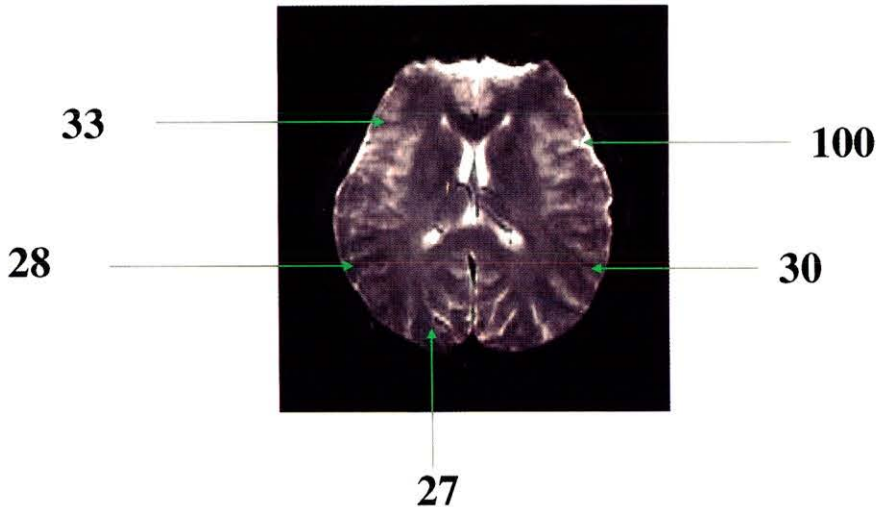


図8：GRE-EPI 画像における輝度の一例。

GRE-EPI は最適化されているためこの元画像では画像 artifact がほとんど認められない。脳脊髄液 cerebrospinal fluid (CSF) の輝度を100とした場合、皮質は平均して30の輝度をしている。賦活による BOLD 効果で信号が3%上昇した場合<sup>24</sup>その輝度は39となるが、0.2ピクセル分だけ CSF が入り込むとそれ以上の輝度変化が元画像にでる。従って、1.5T 装置での pixel misalignment の許容量は最大で0.1 pixel とされる<sup>25</sup>。

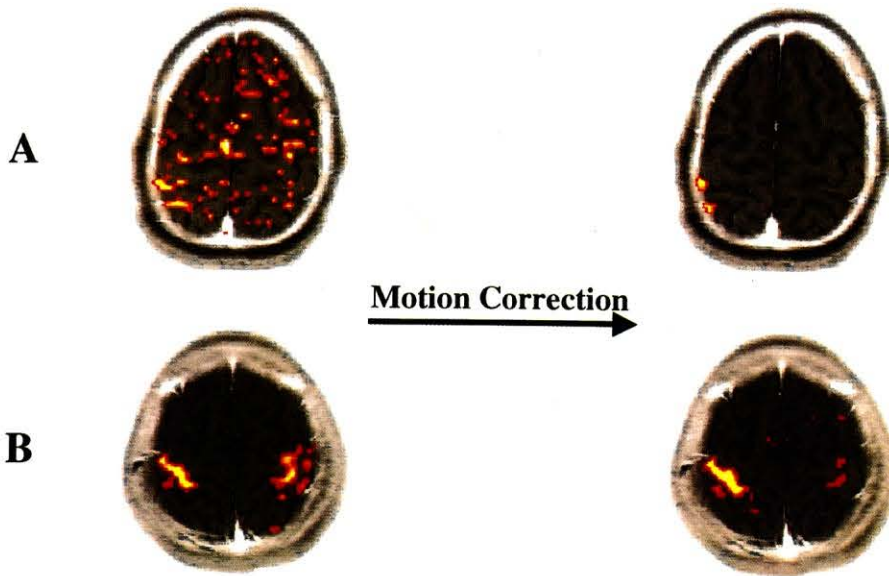


図9：SPM96による motion correction.

両手を動かしたときの fMRI. A: pixel misalignment が許容範囲を超えた場合. B: pixel misalignment が許容範囲以内の場合. motion correction algorithm で明らかな artifact は消去できるが(A), 同時に正確に行われた時の賦活部位も変化してしまう(B).

$$A = e^{-TR/T_1} \cos \alpha$$

$$B = 1 - e^{-TR/T_1}$$

と表わすことができる. 簡潔にするために  $M_{(t)}$  が定数  $M_0$  であるとすれば,

$$\begin{aligned} M_n &= AM_{n-1} + BM_0 \\ &= A(AM_{n-2} + BM_0) + BM_0 \\ &= A^2 M_{n-2} + (A+1)BM_0 \\ &= A^3 M_{n-3} + (A^2 + A + 1)BM_0 \\ &\quad \cdot \\ &= A^n M_0 + (A^{n-1} + A^{n-2} + \dots + A + 1)BM_0 \\ &= A^n M_0 + \frac{(1-A^n)}{1-A} BM_0 \end{aligned}$$

となることがわかる. これが time of flight を使った MR angiography の原理説明に頻発する progressive saturation の関係式であり,

$$\begin{aligned} M_s &= \frac{B}{1-A} M_0 \\ &= \frac{1 - \exp[-TR/T_1]}{1 - \cos \alpha \exp[-TR/T_1]} \end{aligned}$$

は, saturation magnetization とよばれる.

ここから, 血液の流入による信号強度変化,  $\Delta S$ , は

$$\Delta S = A^n (M_0 - M_s) \sin \alpha \exp[-TE/T_2^*]$$

で表されることが分かる. これが流入効果であり,  $M_0$  や  $M_s$  の状況により元画像の輝度が予測不可能な影響を受ける. 複数の slice を連続して同時に撮像した場合などは更に顕著である. 従って,

$$M_0 - M_s$$

をできるだけ小さくすることで,  $\Delta S$  の影響を最小限度に抑える必要が生まれる.

実践的にはできるだけ長い TR を選択することで簡単に解決される. しかし, 時系列解析を目的に TR を短縮した場合などには十分な配慮を要する.

生理学的雑音 physiological noise

問題になる生理学的変化の中で, 系統的に処

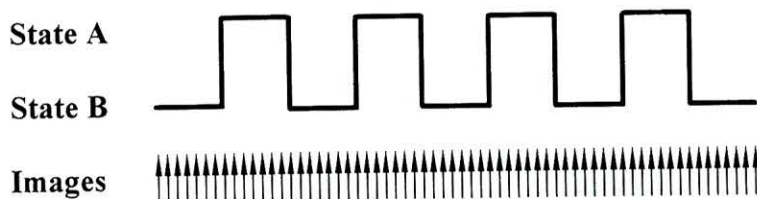


図10：標準的な課題負荷の pattern.

比較するべき stage A と stage B とを課題 task として与える。その間に超高速撮像法を用いて  $T_2^*$  に敏感な画像を撮る。これらの元画像を統計処理することにより、必要な情報を取得する。

理可能な要素は周期性をもった雑音 periodic noise であり、基本的には拍動による血流変化と呼吸による  $PO_2$  変化である。周期性の雑音はその時系列解析において filter で落とすことも可能であり、Fourier 解析や Wavelet 解析による filtering が検討されている。

正当性評価の可能な fMRI のほとんどが状態解析 state-related analysis であることを考慮すれば<sup>18</sup>，課題の cycling による filtering も容易に行える(図10)。fMRI ではある程度長めの TR が適切であり<sup>19</sup>，これは in-flow effect を抑えるとの点からも，saturation を防いで S/N を稼ぐと言う点からも妥当と考えられている。そこで、この「適度に長い TR」を利用するのである。約 1 Hz の拍動と約 0.25 Hz の呼吸による周期性雑音は、4 sec ごとの sampling では aliasing がかかる<sup>20</sup>。例えば、課題の cycling を 0.02 Hz<sup>21</sup> として post-processing で 0.01 Hz の high pass filter をかければ aliasing により低周波数領域に落ちた周期性雑音は、低周波領域に存在するその他の生理的雑音とともに filtering することができる。

### 実践例

言語理解(いわゆる Wernicke area)の機能画像(図11)。以下に、主要な parameter を示す。これらはすべて、この画像が持つ意味を決定付ける条件であり、それぞれの正確な意味付けを理解してもらうことがこの小論の目標である。



図11：言語理解の機能画像。  
いわゆる Wernicke area の賦活が見られる。

#### 使用装置

磁石 : Magnex 3.0 T superconductive magnet  
with a 80 cm clear bore  
platform : GE Signa  
Gradient/RF coils : Advanced NMR  
EPI module : Advanced NMR, resonance mode

#### 撮像 parameter

FOV : 40 cm × 20 cm  
Matrix : 128 × 64  
Slice thickness : 5 mm  
Interslice gap : 2.5 mm  
Shimming Slab : 30 mm  
Sequence : GRE-EPI  
Sinusoidal gradient with linear k-space trajectory  
Flip angle : 60 degree  
TR : 1 sec  
Dummy scan : ten

## 課題

Box-car alternative sequence

Each Epoch : 30 sec

Total Number of Epoch : 9

State A : reversal of State B stimulation

State B : HL Japanese sentence read at 50 dB above

Post-processing

Threshold : no ghost, 0.6 mm motion

Pictorial Statistics

Software : SPM96 (the Wellcome Department of Cognitive Neurology)<sup>4)</sup>

Cross Correlation Model Function : delayed (6 sec) box car

High pass filter : 120 Hz

Smoothing kernel : 5 mm

## おわりに

脳は「こころ」を司る器官である。緻密な神経回路網が生み出す高次統合機能の存在はヒトがヒトたる所以でもあり、その詳細解明は人類に課せられた使命でもある。脳を知りたいと願い、大脳生理学を志すものが最後に辿り着くゴールがヒトの「こころ」であるとするれば、MRIによる機能画像は脳の世紀を迎える人類に与えられた最大の贈り物と言っても過言では

ない。

その反面、極端に学際的で守備範囲の広いMRの世界は、その「器用さ」ゆえに誤解を受けやすく、「救世主」であるべきfMRIも「悪魔の手先」となりかねない。事実、世界中に巻き起こっている「正当性評価のされていない artifact 満載の fMRI 論文」の発表合戦は、人類の夢を打ち砕きかねない有様を呈している。このままでは、fMRIの世界が烏合の衆に占拠されてしまいかねない。

「科学」と呼ばれた分野の中に「自分の評価している信号が何を意味するのか」を理解せず、結果のみを対象として続けられた研究は存在しない。人類に与えられた偉大なる方法論をしっかりと受け止め、人類の夢を壊さないためにも、fMRIを目指すすべての研究者がしっかりとしたMRの知識を獲得することを願わずにいられない。

心有る人々の努力を期待したい。

## Appendix

## 磁化率

すべての物質は磁性体<sup>22)</sup>であり、磁界の中では分極して磁化 magnetization がおこる(図12)。磁化,  $M$ , が磁界,  $H$ , と比例する時,

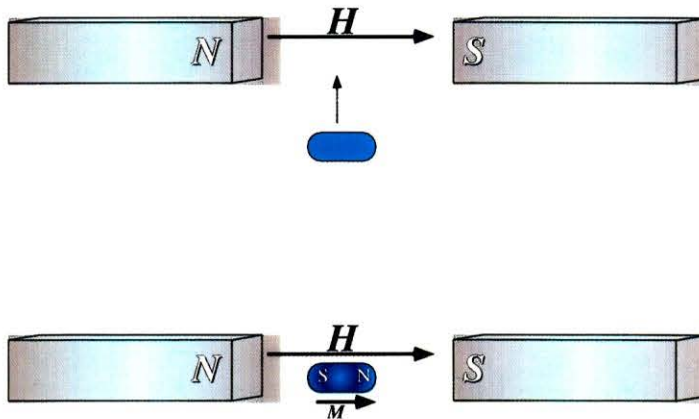


図12：磁化率。

物質は磁界の中では分極して磁化 magnetization がおこる。磁化,  $M$ , が磁界,  $H$ , と比例する時, その比例定数を磁化率 magnetic susceptibility,  $\chi_m$ , と呼ぶ。

その比例定数を磁化率 magnetic susceptibility,  $\chi_m$ , と呼び

$$M = \mu_0 \chi_m H$$

と表す<sup>23</sup>。ここで、 $\mu_0$  は真空における誘磁率である。

磁化率が正の値を取るときその物質を常磁性体性 paramagnetic, 負の値を取るとき反磁性体性 diamagnetic と呼ぶ。反磁性体性は原子核の周りをまわる電子に由来し、従って、すべての物質が持つ物理特性である。しかし、原則としてその効果は小さく、MRIにおいて問題にされる磁化率効果は基本的にすべて常磁性体性物質によるものである。

## 文 献

- 1) Ogawa S, Lee TM. Magn Reson Imaging **8**: 557, 1990
- 2) Kwong K, Belliveau J, Chesler D, et al. Proc Natl Acad Sci USA **89**: 5675, 1992
- 3) Malonek D, Grinvald A. Interactions between electrical activity and cortical microcirculation revealed by imaging spectroscopy: Implication for functional brain mapping. Science **272**: 551-554, 1996
- 4) Friston KJ, Jezzard P, Turner R. The analysis of functional MRI time series. Hum Brain Mapping **1**: 153-171, 1994

- 1 慣例に従い、核磁気共鳴 nuclear magnetic resonance の生体応用を単に磁気共鳴 magnetic resonance (MR)と呼ぶ。
- 2 脂肪酸側鎖の proton からの信号も対象となるが、脳実質を扱っている限り無視できる。しかし、fMRI では皮下脂肪の信号による chemical shift artifact が問題で、fat suppression が必須となる。
- 3 みかけの拡散をスカラーで表すためにはみかけの拡散が等方性であるとの前提が必要になる。不等方性を考慮するとテンソル解析が必要となるが、ここでは詳細に触れない。
- 4 FLAIR, CISS, 3DAC, magnetization transfer などが有名である。
- 5 下述するように、最も一般的な手法は BOLD コントラストを用いたものであり、その場合、「付加する」操作は必要でなく、賦活に伴って自然に現れる BOLD コントラストを「取り出す」作業だけが必要となる。
- 6 blood oxygenation level dependent
- 7 便利用語ではあるが、その曖昧さは否定できない。物理学的には核磁気共鳴における水素原子核 proton の磁化 magnetization も常磁性体性であり、用語の曖昧さが時に初学者の混乱を招く要因にもなる例である。
- 8 BOLD 機能画像が登場するまで、磁化率効果はアーチファクトの代名詞でもあった。
- 9 gradient echo 法など。
- 10 通常の臨床装置ではこの条件を獲得することは極めて難しい。従って、fMRI の施行を目指す研究者は、第一に、装置の最適化を図る必要がある。
- 11 CT が臨床画像に登場した初期には partial volume effect による脳実質の信号強度低下が病変と誤診されることが多く見られた。
- 12 computed tomography
- 13 positron emission tomography
- 14 詳細は MRI の教科書を参照のこと。
- 15 ここで示した賦活効果の概説は一般的に受け入れられているものではあるが、異論を唱える研究者も多い。optical imaging の最新の検索によれば、hemoglobin によるとされていた賦活前後の信号変化は、細胞の拡張などをも含めた複合効果であるとの見方が有力となっている。

- 16 残念ながら、MRI の特殊性の理解は fMRI を施行しようとする研究者に行き渡っておらず、著名な科学雑誌に発表された著名な施設からの論文にも正当性の評価がはっきりとなされていない論文が目立つ。
- 17 例えば、petrous air cell に隣接した hippocampus などは極めて BOLD-fMRI の対象になり難い部位である。また、生理的に鉄濃度が高く、磁化率効果による信号低下の見られる globus pallidum や小脳の dentate nucleus など、構造画像自体に歪みはなくても、統計学的 artifact が頻発する部位となる。
- 18 誘発電位 evoked potential 同様な fMRI の事象解析 event-related analysis が多くの施設から発表されているが、その正当性評価は不十分のままである。神経活動は m sec 単位の現象であり、fMRI で捉えている「何か」は 6~8 sec の delay を含む sec 単位の現象である。この、全くかけ離れた二つの現象に有為な相関があるとの仮説は正当性評価なくして容認されるべきではない。
- 19 3.0~4.0 T の装置では 1 sec 程度、1.5 T の装置では 3~4 sec 程度
- 20 sampling theory によれば対応可能な最大周波数は sampling rate の 1/2 であり、例えば TR=4 sec の場合、sampling rate は 0.25 Hz となり、0.125 Hz が最大周波数となる。従って、それより速い信号には aliasing がかかる。
- 21 25 sec 毎に A state と B state を cycling する。
- 22 多くの物質は磁化率が低く、鉄が磁石にくっつくような日常生活での現象はみることができない。
- 23 鉄のような強磁性体性 ferromagnetic の物質では磁界と磁化とは比例しない。
- 24 1.5 T 装置における BOLD 効果の最大値と言われる。
- 25 定位脳手術での観測から、完全に頭蓋骨を固定して場合でも 0.3 mm 程度の脳の運動が見られる。従って、1.5 T では頭の固定を完全に行ったと仮定しても、3 mm×3 mm 以上の分解能を持った fMRI に正当性を望むことは極めて難しい。



## 第31回 東北生理談話会

会 期：平成10年10月24日(土)～25日(日)

会 場：山形厚生年金休暇センター

当番幹事：山形大学医学部生理学第一講座 土居 勝彦

山形大学医学部生理学第二講座 加藤 宏司

参 加 者：74名

東北生理談話会は、生理学会大会の縮小版にしないようにという理解があり、本年は参加者一同が宿泊でき、懇親会も楽しめる厚生年金休暇センターで行なった。各研究室の紹介をその教室の一番先の発表の前にもしてもらい、発表と討論の時間も(主催者は別にしても)多少の伸び縮みは気にしないで行なった。座長は中堅の若手の先生に担当していただき、全ての発表をOHPで行なった。宿泊しながらの談話会は、浴衣姿で懇親会が出来、お互いの親睦を深めるのにも役立ったと思う。研究室の教授の世代交代が進み、全体的に研究者も若返っているの、お互いの親睦や研究の道筋が分かり、情報を忌憚なく交換できるこのような談話会は大切であると思う。発表演題数は26題で、活発な討論が行われた。(加藤宏司 記)

### 1. マウス卵における小胞体カルシウム放出機構の加齢による変化

高橋俊文<sup>1</sup>、高橋英嗣<sup>2</sup>、土居勝彦<sup>2</sup>(山形大、医、<sup>1</sup>産婦人科、<sup>2</sup>第一生理)

卵細胞の受精時にみられる細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) の周期的変動 ( $Ca^{2+}$  oscillation) は、卵の活性化、細胞周期の進行、その後の胚発育と深く関与していることが知られている。これまで我々は、マウス卵において受精時の  $Ca^{2+}$  oscillation が卵の加齢と共に変化し、これは、小胞体の  $Ca^{2+}$  再取り込み能の低下が一要因であることを報告した (Mol. Reprod. Dev. 1997, 48: 383-390)。  $Ca^{2+}$  oscillation 成立には、小胞体膜上にあるイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 ( $IP_3$ ) 受容体を介した、  $IP_3$  誘導性  $Ca^{2+}$  放出系が重要である。今回、マウス卵における、小胞体  $Ca^{2+}$  放出系の加齢に伴う変化について検討した。過排卵処理した B6C3F1 雌マウスより、hCG 投与14 (n=12)、18~20 (n=28)、22~24 (n=32) 時間後の MII 期卵を採取し実験に供した。採取卵に、Caged  $IP_3$  及び  $Ca^{2+}$  蛍光指示薬 Fluo-3 を微量注入し、140 msec の紫外光照射にて光解除を行い、以下の検討を行った。1) 光解除後の  $[Ca^{2+}]_i$  変化を解析し、  $Ca^{2+}$  放出能を比較検討した。2) Dose response curve を作成し、  $IP_3$  受容体の感受性を解析した。hCG 投与後14時間後の卵を新鮮卵、他は加齢卵とした。卵の加齢に伴い、  $[Ca^{2+}]_i$  のピーク値及び最大立ち上がり速度は有意に低下した。EC50 は卵の加齢により変化せず、  $Ca^{2+}$

放出に関わる  $IP_3$  レセプターの感受性は変化しないと考えられた。以上より、マウス卵において、加齢による小胞体  $Ca^{2+}$  ストアの減少が示唆された。

### 2. 膵腺房細胞のリアノジン感受性 $Ca^{2+}$ 放出機構の修飾効果

小澤輝高(東北大・医・生体機能制御・細胞生理)

膵腺房細胞の小胞体には、カフェイン、リアノジン、サイクリック ADP リボース (cADPR) で活性化される、リアノジン感受性  $Ca^{2+}$  放出機構が存在するが、その特性については小胞体レベルでの研究は行われていなかった。今回、ラット膵腺房細胞の単離小胞体標本を用いて、リアノジン感受性  $Ca^{2+}$  放出機構がどのような物質で修飾されるのかを調べた。最初に、骨格筋のリアノジン受容体にその結合部位を持つことが知られている、カルモジュリン (CaM) の役割を調べてみた。CaM 阻害剤の W-7 (60  $\mu$  M) で小胞体標本を前処理しておく、カフェイン (5~30 mM) による  $Ca^{2+}$  放出が著明に抑制された。外因性に与えられた、CaM (10  $\mu$  g/ml) は低濃度 (5~10 mM) でのカフェインの効果を促進し、用量効果曲線を左に移動させた。リアノジン (500  $\mu$  M) や cADPR (2  $\mu$  M) による  $Ca^{2+}$  放出も W-7 (60  $\mu$  M) により抑制され、CaM (10  $\mu$  g/ml) では促進された。更に、カフェイン (10 mM) による  $Ca^{2+}$  放出が、リアノジン (10  $\mu$  M) や cADPR (0.5~1.0  $\mu$  M) により促進された。以上の結果より、ラット膵腺房細胞の小胞体に存在する、リアノジン感

受性  $\text{Ca}^{2+}$  放出チャネルはリアノジンだけでなく、 $\text{CaM}$  と  $\text{cADPR}$  により、その機能が修飾されることが示された。

### 3. ラット耳下腺腺房細胞における ACh による $\text{Ca}^{2+}$ 放出に及ぼす細胞外 ATP の効果

福士靖江(東北大・医・生体機能制御・細胞生理)

自律神経伝達物質の作用は、生体内では ATP によって調節をうけている可能性がある。ACh の  $\text{Ca}^{2+}$  反応に対して細胞外 ATP が如何に作用するかを検討した。ラット耳下腺腺房細胞を酵素処理にて単離し、顕微蛍光測定法により細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を測定した。ATP は ACh の細胞内ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出を急速に短縮化し、その大きさを抑制した。BzATP は無  $\text{Na}^+$ 、無  $\text{Ca}^{2+}$  の外液下ではそれ自身は  $\text{Ca}^{2+}$  反応を起さないが、無  $\text{Na}^+$ 、無  $\text{Ca}^{2+}$  の外液下で、ACh の反応を短縮かつ抑制した。PKC 阻害剤は ATP の ACh に対する作用を無効にし、逆に PKC 促進剤は促進した。低濃度のアトロピンは ATP と同じ効果を示した。以上の結果から、ATP は  $\text{P}_{2Z}$  受容体と結合することにより、 $\text{Ca}^{2+}$  非依存性の PKC を活性化し、ムスカリン受容体を急速に脱感作することが示唆された。

### 4. ウサギ陰莖海綿体平滑筋細胞における細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度へのノルアドレナリンや ATP の効果

佐藤 実, 河谷正仁(秋田大学・医・第二生理)

ウサギの培養陰莖海綿体組織の平滑筋細胞における細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) へのノルアドレナリン (NA) や ATP の効果を fura-2 蛍光測定法で検討した。培養組織には  $\alpha$ -平滑筋アクチン抗体陽性の細胞が多く存在した。平滑筋細胞の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  は NA や ATP によって濃度 (0.5~100  $\mu\text{M}$ ) 依存的に増加した。1  $\mu\text{M}$  で NA による増加は  $274 \pm 28\%$ 、ATP による増加は  $288 \pm 27\%$  であった。NA の効果は  $\alpha$  および  $\beta$  レセプター阻害剤 (各々フェノキシベンザミン (100  $\mu\text{M}$ ) およびプロプラノロール (100  $\mu\text{M}$ )) によって阻害され、ATP の効果は  $\text{P}_2$  阻害剤 PPADS (100  $\mu\text{M}$ ) に阻害された。Ni<sup>2+</sup> (1 mM) によって、NA の効果は  $12 \pm 8\%$ 、ATP の効果は  $93 \pm 6\%$  抑制された。NA や ATP の効果は  $\text{Ca}^{2+}$  除去下ではその前処置が長くなると減少したが、ニフェジピン (10  $\mu\text{M}$ ) に影響を受けなかった。又、これらの効果はリアノジン (10  $\mu\text{M}$ ) に抑制されなかったが、 $\text{Ca}^{2+}$  放出阻害剤 TMB-8 (100

$\mu\text{M}$ ) によって消失した。以上より、NA による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  増加は  $\alpha$  ないし  $\beta$  レセプターを介し、ATP による増加は  $\text{P}_2$  レセプターを介して細胞内からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出と細胞外からの  $\text{Ca}^{2+}$  流入がおき、平滑筋の収縮を起こす可能性があることを示した。

### 5. 新生ラット腰仙髄副交感神経節前ニューロンの電気生理学的性質

三浦 章, 河谷正仁(秋田大学・医・第二生理)

副交感神経節前ニューロン (PGN) の電気生理学的特徴を腰仙髄薄切スライス標本によりパッチクランプ法を用いて研究した。300 ms の脱分極パルスを与えたとき、PGN の 39% は刺激開始時に発火し刺激中にスパイクが消失する発火様式 (phasic PGN) を示した。残りの 61% は刺激中スパイクが持続する発火様式 (tonic PGN) を示した。いずれのタイプの PGN は静止膜電位 (-51.0 mV)、活動電位閾値 (-35.0 mV)、スパイク幅 (2.4~2.7 ms) について共通の性質をもっていた。しかし、tonic PGN の細胞径 (20.7  $\mu\text{m}$ ) と膜入力抵抗 (803.1 M $\Omega$ ) は phasic PGN (16.7  $\mu\text{m}$ , 610.2 M $\Omega$ ) よりも有意 ( $p < 0.05$ ) に大きかった。また、tonic PGN (200.5 ms) の活動電位後過分極電位は phasic PGN (137.6 ms) よりも有意に ( $p < 0.05$ ) 長かった。4-aminopyridine (4-AP) は tonic PGN (-33.9 mV から -39.2 mV) および phasic PGN (-30.7 mV から -36.1 mV) における活動電位発火閾値を有意に下げた。また 4-AP は phasic PGN を持続性の放電に変え、tonic PGN の発火頻度を 119% ( $p < 0.05$ ) 増加させた。Tonic PGN と phasic PGN の放電様式を制御する上で、4-AP 感受性  $\text{K}^+$  電流が重要であると推測された。

### 6. 経口薬物 (LP805) の尿中代謝産物による排尿促進機構の検討

今泉 満, 三浦 章, 石田文孝, 河谷正仁(秋田大学・医・第二生理)

船山宣夫(ポーラ化成工業・医薬品事業部)

LP805 (ATP-sensitive  $\text{K}^+$  channel opener) を経口摂取すると、膀胱痛がおこることから、ラットにこの薬物を連続一週間経口摂取 (100 mg/kg) させ、慢性的に膀胱を刺激する状態の動物モデルを作成し、排尿反射及び、L6~S1 の後根神経節の知覚神経細胞の興奮性について検討した。正常ラットの膀胱内を慢性モデルラットから採集した尿を用いて灌流すると、排尿間隔と排尿量が有意に低下した ( $p < 0.02$ )。慢性モデル

ラット自身に生食での排尿反射を検討すると、排尿間隔と排尿量は、正常とほぼ等しかった。膀胱内灌流液を酢酸(0.1%)に変更したが、排尿反射の亢進は認められなかった。モデル動物の知覚神経細胞のパッチクランプ法による検討では、興奮の閾値が正常より低下していた( $p < 0.05$ )。したがって、この薬物の投与により、知覚神経細胞が活性化し排尿反射を一時的に亢進させたが、一週間の連続投与後には、排尿反射は正常と有意差がない状態となった。さらに、通常では膀胱内を酢酸刺激すると排尿反射は亢進するが、モデル動物ではその変化が認められなかったことから、この状態では末梢からの知覚系は活性化されているのに中枢神経系の可塑性がおこり、排尿反射は見かけ上ほぼ正常と同じ状態になるように適応したと推測された。

#### 7. シナプス小胞開口放出の C-キナーゼ依存性修飾メカニズム

八尾 寛(東北大, 医, 生体情報)

中枢および末梢のさまざまなシナプスにおいて、シナプス前終末からの伝達物質放出が C-キナーゼ(PKC)により増強される。しかし、PKC が伝達物質放出のどの素過程を修飾しているかは殆ど知られていない。昨年の本談話会において、ニフトリ胚毛様体神経節の巨大シナプス前終末からのアセチルコリンの素量放出がフォルボルエステルにより増強されること、この増強が終末への  $Ca^{2+}$  流入の増大をともなわないことを報告した。すなわち、 $Ca^{2+}$  流入以外の開口放出機序に PKC の作用部位があることが示唆される。本報告においては、PKC の活性化がシナプス小胞の readily releasable pool を増大させるか、あるいは、シナプス小胞の融合確率を増大させるか、のいずれかを判定する目的で、readily releasable pool のダイナミクスを解析した。シナプス前線維を高頻度でトレイン刺激をすると5発目あたりから興奮性シナプス電位 EPSC の大きさが定常値をとる。この steady-state EPSC は、readily releasable pool の補充と開口放出が釣り合ったことにより説明され、その大きさは補充速度に比例する。フォルボルエステルは、トレイン刺激の最初のパルスによる EPSC を増強したが、steady-state EPSC の大きさに影響を与えなかった。また、readily releasable pool の枯渇からの回復速度にも影響を与えなかった。すなわち、PKC の活性化は、readily releasable pool の増大をともなわず、小胞の融合確率を増大させることが示唆される。

#### 8. 海馬苔状線維シナプス前終末 $Ca^{2+}$ 濃度の新しい測定法

本田 泉, 海老原尚弥\*, 八尾 寛\*(東北大, 医, 麻酔学・\*生体情報学)

海馬苔状線維終末からの伝達物質放出に可塑性があることはよく知られている。その細胞内メカニズムを解析する目的で、マウスの海馬苔状線維シナプス前終末の  $Ca^{2+}$  動態を測定する新しい手法「カットアンドシール法」を開発した。先端径 100  $\mu\text{m}$  のガラスピペットに  $Ca^{2+}$  感受性蛍光指示薬 fura-dextran を充填し、細胞外  $Ca^{2+}$  濃度 0 mM, 4°C で CA4 領域透明層に刺入することにより軸索を切断し色素を取り込ませた。細胞外  $Ca^{2+}$  濃度 2 mM, 33°C にインキュベートすることにより、軸索断端は修復され、シナプス前終末が fura-dextran により順行性に標識された。CA3 領域透明層の数個のシナプス前終末に焦点を当て、340/380 nm の 2 波長励起法により細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を測定した。Baclofen, DCG IV により  $Ca^{2+}$  流入は抑制された。ホルボルエステル phorbol 12, 13-diacetate (PDAc) 10  $\mu\text{M}$  により細胞内  $Ca^{2+}$  流入が促進された。CA3 におけるフィールド電位の測定においても同様に fEPSP が増強されたことから、PDAc の EPSP 増強に  $Ca^{2+}$  流入の増大が関与する可能性が示唆された。

#### 9. ラット膵 $\beta$ 細胞の L 型 $Ca^{2+}$ 電流に対する PKC の抑制作用

神村典孝, 菅世智子, 菅野隆浩, 泉井 亮(弘前大, 医, 第一生理)

膵  $\beta$  細胞のインスリン分泌に対し電位依存性の L 型  $Ca^{2+}$  チャネルは重要な役割を果たす。すなわちインスリン分泌に必要な細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇の多くはこのチャネルを通る細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入に依っている。L 型  $Ca^{2+}$  チャネルの修飾因子の一つに細胞内プロテインキナーゼの活性化があげられるが今回我々は特にプロテインキナーゼ C (PKC) に着目し、 $Ca^{2+}$  電流に対する効果をホールセルパッチクランプ法を用いて検討した。脱分極パルスによって生じる内向き  $Ca^{2+}$  電流は PKC を直接活性化する PMA を投与すると抑制された。この効果は PKC を阻害するスタウロスポリンであらかじめ細胞を処理すると消失し、cAMP 依存性プロテインキナーゼ(PKA)を阻害する Rp-cAMPs による処理では変化しなかった。また、 $Ca^{2+}$  チャネルのどの部位が PKC によるリン酸化を

うけるかを明らかにするため、チャンネルを構成するサブユニットの一つである $\beta$ サブユニットに注目し、アンチセンスを用いてその発現を抑制した。この細胞にPMAを投与しても電流の抑制は得られず、コントロールとして用いたノンセンスで処理した細胞では抑制効果が得られた。以上よりPKCはラット膵 $\beta$ 細胞のL型 $\text{Ca}^{2+}$ 電流に対し抑制的に作用することが確認され、この機構はL型 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルの $\beta$ サブユニットのリン酸化によることが示唆された。

#### 10. CRFによる膵 $\beta$ 細胞のカルシウム動員機構

泉井 亮, 菅野隆浩, 菅世智子, 中野京子, 武尾照子, 神村典孝(弘前大, 医, 第一生理)

CRF (corticotropin releasing factor)は広く末梢組織でも生成されており、その生理的役割が注目されている。本研究ではCRFが膵ラ島 $\beta$ 細胞のインスリン分泌にどのように作用するかを明らかにする目的で、単離した $\beta$ 細胞の細胞内カルシウム濃度( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ )と細胞膜の電気的特性に対するCRFの効果を調べた。免疫組織化学染色から、 $\beta$ 細胞に2種類のCRF受容体(type-1, type-2)の存在が確認された。CRF (2 nM)は外液 $\text{Ca}^{2+}$ 存在下に、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させた。CRFは0.02~2 nMで濃度依存性に膜を脱分極させた。しかし、20 nMでは電位変化を生じなかった。L-type  $\text{Ca}^{2+}$  channelを通る $\text{Ca}^{2+}$ 電流に対してCRFは0.02~2 nMでは促進させたが、2 nMでは抑制した。細胞をcAMP-依存性キナーゼの阻害薬で処理するとCRFによる促進効果は消失した。脱分極の発生とcAMP情報系を介したL-type  $\text{Ca}^{2+}$  channelの活性化がCRFによる膵 $\beta$ 細胞の $\text{Ca}^{2+}$ 動員を引き起こしていることが示唆される。

#### 11. オボッサム腎近位尿細管細胞膜に存在する内向き整流性 $\text{K}^+$ チャンネルのcGMP依存性蛋白リン酸化による活性化

久保川 学, 中屋重行, 吉岡芳親, 中村一芳, 佐藤文夫(岩手医大, 医, 第二生理)

オボッサム腎近位尿細管細胞膜には約90 pSの内向き整流性 $\text{K}^+$ チャンネルが存在し、そのチャンネル活性はAキナーゼ(PKA)で上昇し、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性Cキナーゼで抑制される。今回さらに、cGMPのチャンネル活性に対する影響を調べた。

【方法】 培養オボッサム腎近位尿細管細胞を用い、その細胞膜に存在する内向き整流性 $\text{K}^+$ チャンネルを

パッチクランプ法を用いて観察した。

【結果および結論】 Cell-attached patchにてこのチャンネル活性は浴液への dibutyryl-cGMP (100  $\mu$  M)投与で上昇し、また心房性 $\text{Na}^+$ 利尿ペプチド(ANP, 10 nM)の投与でも上昇した。これらの活性上昇はcGMP依存性キナーゼ(PKG)の阻害剤であるKT5823 (10  $\mu$  M)存在下で抑制されたが、PKAの阻害剤であるKT5720 (200 nM)では抑制されなかった。Inside-out patchにては、cGMP (100  $\mu$  M)の単独投与ではチャンネル活性の変化はなかったが、cGMP (100  $\mu$  M)存在下でPKG (500 U/ml)を投与すると著明に上昇した。以上より、この $\text{K}^+$ チャンネルはPKGによる蛋白リン酸化で活性化され、それはPKA非依存性である。また、ANPは細胞内のPKG活性化を導くアゴニストの一つであると考えられた。

#### 12. Dexamethasone投与ラットの尿成分のMRSによる解析

中屋重行, 吉岡芳親, 久保川学(岩手医大・医・第2生理)

副腎皮質Glucocorticoid過剰分泌時には高血圧・脂肪過多・浮腫傾向になり、特に合成ステロイド剤Dexamethasone治療時には副作用として骨格筋力低下・筋萎縮を伴ういわゆるステロイドミオパチーを生ずるが、その他の生理代謝機構に関しては不明な点が多い。今回は、生体内代謝に関する多くの情報を得ることのできる尿試料を中心にMRS分析法を用いて調べた。

【方法】 Wistar雄ラット(300~500 g)を恒温ケージ(25 $^{\circ}$ C・12h明暗周期)内で飼育し、Dexamethasone (Decadron 4~8 mg/L)を飲水と共に投与し、体重、水・エサ摂取量、尿量・便排泄量を毎日測定し、運動量を経時記録しながらMRSを用いて尿性状を分析した。

【結果】 Dexamethasone投与直後より体重は徐々に減少し、0.2 mg/kg/day投与群では20日後に投与前の70%、0.4 mg/kg/day投与群では60%にまで減少し、運動量低下と摂食量・排便量の減少が進行した。剖検では心・肝・腎・精巣・骨格筋重量の減少と共に肉眼的に内臓平滑筋の萎縮、皮下脂肪量の減少傾向を確認した。

尿MRSでは、多尿、糖尿、クレアチニン量増加とクレアチン及びアミノ酸代謝物質その他の排泄異常を認めた。以上のことから尿成分のMRS分析はステロイド代謝に関する病態解明に有用な手段になりうると

考えた。

### 13. endothelin 1 で引き起こした脳血管の持続性収縮における MAP kinase cascade の関与

渡辺美喜雄<sup>1,2</sup>, 土肥 守<sup>2</sup>, 佐々木和彦<sup>1</sup>, 小川彰<sup>2</sup>(岩手医大, 医, <sup>1</sup>第1生理, <sup>2</sup>脳神経外科)

摘出した牛中大脳動脈からリング状標本を作り、内皮細胞を除去後灌流槽に懸垂して tyrode 液で灌流した。endothelin 1 (ET-1), phorbol dibutyrate (PDBu), または highK<sup>+</sup> 溶液の投与で発生する等尺性収縮を張力トランスジューサにて検出記録した。ET-1, PDBu は共にゆっくり立ち上がる持続性の収縮を発生するが、highK<sup>+</sup> 収縮は速やかに最大値に達して洗い流すとすぐ元に戻る。protein kinase C 拮抗剤の calphostin C を前投与すると ET-1, PDBu 収縮の両者共著しく抑制されたが highK<sup>+</sup> 収縮には無効であった。protein tyrosine kinase 拮抗剤の genistein, 又は Map kinase kinase (Mek) 拮抗剤の PD-98059 を前投与すると ET-1, 及び PDBu による収縮は著しく抑制されたが、highK<sup>+</sup> 収縮には無効であった。以上の結果から ET-1 で引き起こされる収縮には PKC, PTK の活性化に加えて MAP kinase cascade の活性化が関与している事が示唆された。

### 14. アフリカツメガエル卵胞細胞の FSH 受容体応答に対する ATP 受容体刺激による抑制作用

藤田玲子<sup>1</sup>, 木村眞吾<sup>2</sup>, 川崎 敏<sup>2</sup>, 高島浩一郎<sup>2</sup>, 松本光比古<sup>3</sup>, 佐々木和彦<sup>2</sup>(岩手医大・教養・<sup>1</sup>化学, 岩手医大・医・<sup>2</sup>第一生理, 弘前大・医療短期大学部・<sup>3</sup>物理)

アフリカツメガエルの卵胞細胞は gap junction を介して卵母細胞と電気的に連絡し、これを取り囲んでいる。卵胞細胞の形質膜は種々の hormone に対する受容体を持つが卵母細胞の形質膜は受容体をほとんど持たない。この性質を利用して卵母細胞に二本のガラス微小電極を刺入し、膜電位固定して卵胞細胞膜にある FSH 受容体と ATP 受容体間の相互作用を調べた。

膜電位を -60 mV に固定して 5.7 μM の follicle stimulating hormone (FSH) を投与するとゆっくりとした外向き電流応答を発生した。この電流応答は K<sup>+</sup> チャネルが開いて発生していることを確かめた。一方、1 μM の ATP を投与すると内向きの早い Cl<sup>-</sup> 電流とそれに続くゆっくりとした外向き電流応答が得られた。1 μM ATP を 30 秒間前もって投与すると上記

FSH 受容体刺激で発生する K<sup>+</sup> 電流応答は著しく抑制され、30 分間 wash out すると元の大きさに回復した。ATP 受容体刺激による FSH 受容体応答の抑制様式を dose-inhibition curve 上で解析した結果、その抑制作用は非競合的であることが解った。さらに、PKC activator の PDBu (1 nM) を 3 分間前投与した場合にも、FSH 投与で発生する K<sup>+</sup> 電流応答は著しく抑制された。これらの結果から、ATP 受容体を刺激した後でみられる FSH 投与で発生する K<sup>+</sup> 電流応答に対する抑制作用発現には、PKC の活性化が介在していると推察された。

### 15. カエル舌咽神経の塩応答に対するアミロライドの効果

北田泰之, 奥田(赤羽)和久, 川原田啓, 美藤純弘\* (岩手医科大, 歯, 口腔生理, 岡山大, 歯, \*口腔生理)

ラット鼓索神経の Na 味覚応答は利尿剤のアミロライドによって抑制されるアミロライド感受性 Na 応答と抑制されない非感受性 Na 応答に分けられる。しかし、我々はこれまでカエル舌咽神経の Na 応答はアミロライドに影響されないことを報告してきた。今回、各種塩の応答に対するアミロライドの効果を調べた。実験にはウレタン麻酔したウシガエルを用いた。吸引電極法により単一神経線維の味応答を記録した。0.01 ~ 0.5 mM アミロライドは 10 ~ 200 mM MgCl<sub>2</sub> 応答および 100 ~ 500 mM NaCl, KCl および NH<sub>4</sub>Cl 応答に影響を与えなかった。一方、低濃度の 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> 刺激で現れる大きな応答は 0.2 mM アミロライドではほぼ完全に抑制された。さらに、CaSO<sub>4</sub> の用量-応答曲線を求めアミロライドの抑制効果を定量的に調べた。その結果、アミロライドによる Ca 応答抑制は競合拮抗であることが分かった。Ca 応答は他の陽イオンによって競合的に抑制されるし、アミロライドは正荷電を持つことから Ca 応答の抑制はアミロライドの陽イオンとしての働きであり特別な作用ではないことが推察される。アミロライドは味細胞間のタイトジャンクションを通らないので Ca 応答の受容体は先端受容膜に存在するものと思われる。本実験結果からアミロライドはラット鼓索神経と異なってカエル舌咽神経の電解質の応答に特別な作用は持たないと結論される。

### 16. 血管運動神経の地域性とその役割

刈田啓史郎, 和泉博之(東北大, 歯, 口腔生理)

自律神経の血管運動神経として交感神経と副交感神

経の2種類の神経があげられている。しかしながら、これら2種類の神経分布様式や役割は、体の部位によりかなりの違いが見られる。ことに、皮膚血管ではそこに副交感神経支配があるかないかということによって、特徴がでてくる。すなわち、四肢、体幹部での皮膚血管では、交感神経のみによる単独支配であるための巧妙な調節方法をとっている。すなわち平常では一定の緊張状態を保つことによって2方向への調節(拡張と収縮)がとられている。一方、口腔・顔面領域の皮膚・粘膜血管では交感神経と副交感神経の両方の支配があるために、副交感神経による血管拡張、交感神経による血管収縮というかたちでの分業がなされていて、交感神経による血管拡張方向への作用は、弱くなってしまふということが起きているようである。そこで今回、皮膚における血管運動神経の地域性の問題を、ネコを使った血管運動作用のデータから検討した。その結果、副交感神経の血管拡張神経支配領域では、交感神経の血管運動作用は、血管収縮作用というよりは、副交感神経の作用を強める作用をすると考えた方が適切であると推論した。

#### 17. 「動物の保護及び管理に関する法律」の改正問題について

片平清昭(福島医大, 医, 実験動物)

最近、一部の政党に「動物の保護及び管理に関する法律」(動管法)の改正を進めようとする動きがある。これを契機に、「動物の法律を考える連絡会議」が動管法の改正案を作り、その趣旨を広く全国に呼びかけて賛同をつる活動を展開している。改正案の骨子はつぎのとおりである。(1)動物及び動物虐待・遺棄の定義を明確にする(2)罰則を強化する(3)動物虐待の調査、監視及び適切な指導のための査察制度を設ける(4)動物取扱業を許可制にする(5)動物実験を許可制にし、民間人を含めた動物実験倫理委員会及び査察制度を設けるこの改正案では、自治体からのイヌやネコの実験用譲渡は禁止される。これまで、研究機関ごとに動物実験指針で規定されていた動物実験委員会の設置と動物実験計画書の審議については、法律によって義務づけられることとなる。さらに、これらに関する情報公開請求に対しては公開しなければならない。罰則として、30万円以下の罰金または3年以下の懲役刑が盛り込まれている。このような動管法の改正案が成立されれば、医学や生命科学研究における動物実験は従来にも増して規制が強化され、生理学分野においても研究や教育

の面で大きな制約を受けることになる。動物実験を行う関係者にとって今後新たな対応が求められる。さしあたって、医学関係学会は学会としての動物実験に対する考えを一般社会に表明し、より多くの国民からの支持を得る努力をすべきであろう。

#### 18. 微小重力環境における大動脈神経性圧受容器反射機構の生後発達—「ニューロラプ」宇宙実験速報—

永山忠徳, 清水 強, 山崎将生, 和気秀文, 勝田新一郎, 大石浩隆(福島県立医科大学・生理学第一講座), 片平清昭(福島県立医科大学・実験動物研究施設), 宮本裕加子(福島県立医科大学・大学院医学研究科), 三宅将生, (東京大学・大学院理学系研究科)長谷川正光(国立循環器病センター研究所), 松本茂二(日本歯科大学・生理学教室), 金子みち代(東京家政学院短期大学・人間科学), 向井千秋, 長岡俊治(宇宙開発事業団)

大動脈神経(AN)は生後のある時期まで有髄化が進み、機能的にも変化する。一方、微小重力( $\mu G$ )下では頭側への体液移動がみられ、心拍出量や総頸動脈流量(CCAF)は増加するため、宇宙で育った動物のANの発達の様相は地上で発育したものと異なると考えられる。今回はこの仮説を証明すべく行った実験の方法と経過について報告する。生後9日齢のSprague-Dowley ラットを、スペースシャトル内特殊ケージで母親と共に16日間  $\mu G$  に曝露した群(FLT 群)、地上でそれと同じケージ内で育てた群(AGC 群)および一般飼育ケージで育てた群(VIV 群)の3群に分け、次のような実験を行った。麻酔はウレタン(1.2~1.8g/kg, ip.)で行い、昇圧に対する心拍数応答の計測、AP変動に伴うAN活動様式の観察、そしてCCAFのAP変動時の変化を調べた。以上の機能実験終了後、灌流固定を行い組織学的検索を行った。また、未固定の大動脈弓部と胸部大動脈を摘出し、前者は $-70^{\circ}\text{C}$ に凍結し空輸した後引っ張り試験を行って、圧受容部位の血管特性を調べ、後者はリング標本を作成し等尺性張力を測定して、圧反射弓効果器としての血管の運動機能を観察した。本研究はNASDAとの共同研究としてNASA, JSAP並びにJSFの支援を受け、和合治幸、大河内利康の技術協力のもとで行われた。また、研究の一部は文部省科学研究費基盤研究A(2:084007004)の支援を受けた。

## 19. 断眠状態におけるヒトの姿勢制御に関する研究

小野芳秀, 八巻 敦, 板橋幸一, 高橋彌穂(東北学院大, 人間情報学)

先に我々は、断眠状態にしたヒトの姿勢制御機能が、断眠時間の経過に伴って低下し、比較的短時間の仮眠直後には機能回復すること、それらが体温、脳波などの生理指標や、眠気や疲労に対する主観評価との相関を示すことを明かにした。

今回、生理指標に皮膚表面誘導法による下肢筋群の筋電図を加えることで、断眠が姿勢制御に及ぼす影響を、筋疲労と脳波による覚醒レベルの両面から捉えることを試みた。被験者が視覚、体勢知覚、前庭の各入力情報を用いる能力の経時変化について検討した結果、前庭による姿勢制御に脳の覚醒レベルが深く関わることが示唆された。

## 20. 安静時と光刺激時の脳波-脳血流の関係に関する研究

宮崎 浩, 鄭 明基, 小西和彦, 高橋彌穂(東北学院大, 人間情報学), 伊藤正敏(東北大, サイクロ)

安静閉眼時と光刺激のある場合において、4人の正常ボランティアについて脳細胞活動の電気的事象である脳波と、エネルギー代謝を示す局所脳血流量とを同時に計測し、その関係を調べた。その結果、脳波では光刺激時に $\alpha$ 波の出現頻度が低下し(14%)、それは前頭葉よりも後頭葉で大きい値を示した(18%)。これに対して $\beta$ 波の周波数の高い領域(20~30 Hz 帯)の出現頻度は増加した。それに対応して後頭葉、視覚野領域、側頭葉において局所脳血流量の増加が見られた。

## 21. ラット体性感覚野賦活時の局所脳血流動態の計測

松浦哲也, 菅野 巖\*(JST 秋田・\*秋田脳研, 放)

脳血流量(CBF)が皮質活動を反映していることは明白な事実であるが、その調節機構については不明な点が多い。本研究では脳血流量増加の初期調節機構を明らかにする目的で、ラット体性感覚野を後肢電気刺激または皮質直接電気刺激により様々な刺激頻度(0.2, 0.5, 5, 10, 50 Hz, 5秒)で興奮させ、それにより誘発される局所脳血流動態(CBF, 赤血球容積, 赤血球速度の経時変化)をレーザードップラ血流計を用いて計測した。その結果、CBFの立ち上がりのタイミングは刺激頻度に関係なく刺激開始後約0.5秒であり、速度及び容積の立ち上がりには有意な時間差は認められ

なかった。また、後肢刺激の場合、CBF反応量は刺激頻度が5 Hzで最大となり、これは誘発電位の発現頻度の最大値と一致した。直接刺激におけるCBF反応量は刺激頻度の増大とともに大きくなった。また、刺激時間を長くするとCBFに2相性の変化が確認された。以上のことから、局所CBF増加の割合は脳における神経活動の大きさと比例関係にあり、局所CBF増加の初期調節は抵抗血管の弛緩並びに毛細血管の能動的な変化の両者に起因している可能性が示唆された。

## 22. 実形状 dipole 追跡法による反応抑制(No-go)電位発生源の推定

松木智彦, 浄土英一, 香山雪彦(福島県立医大, 医, 神経精神科・第2生理)

Go/No-go 課題において、運動抑制(No-go)指示刺激呈示の200~300 msec後に前頭部優位の陰性電位が著明に増大することが知られている。この事象関連電位(ERP)成分は、サルにおいて前頭前皮質に発生源が確認されているNo-go電位に相当するものと考えられているが、頭皮上脳波測定による電源推定は、この電位が通常、他のERP成分(P300等)上に重畳して記録されるため、一貫した結果が得られていない。そこで、我々はERP波形からデジタルフィルタ処理によりNo-go電位成分を単離し、被験者の頭部形状が反映される実形状一様導体モデルによるdipole推定を試みた。この結果、高いdipolarityで左右半球にdipoleが推定された。

## 23. 聴覚運動統合におけるヒト非一次運動野の局所血流量の変化

蔵田 潔(弘前大・医・第二生理)

ヒト大脳皮質のどの運動関連領域が条件付運動課題に関連するのかわかるため、エコプラナー法による機能的MRIを用いて課題遂行中の局所血流量を計測した。1秒毎に呈示された2種類の音(333 Hz, 666 Hz)のいずれかに応答して、右手の母指と示指または母指と小指の対立運動をすることを被験者は要求された。対照課題として、音に応答してこれら対立運動を交替に行わせた。その結果、左半球の一次運動野ではいずれの課題でも同様の局所血流量の増加がみられたが、左半球の運動前野および補足運動野、前補足運動野にはこの課題に選択的な局所血流量の増加がみられた。このことは聴覚運動統合にこれら非一次運動野が重要

な役割を果たしていることを示唆している。

#### 24. 連続的固視課題中のサルの子測的眼位変化

菅原 卓<sup>1</sup>, 虫明 元<sup>1,2</sup>, 斎藤尚宏<sup>1</sup>, 坂本 一寛<sup>3</sup>, 丹治 順<sup>1</sup>(<sup>1</sup>東北大, 医, 生体システム生理, <sup>2</sup>科学技術振興事業団, <sup>3</sup>東北大, 電気通信研究所) 眼位の制御に関わる脳内機構を調べる目的で, 連続的固視課題をサルに行なわせた。この課題では, 固視点を前方のスクリーンに呈示し, 固視を保持すると消えて, ある時間間隔で次の固視点を提示する。この際, 連続的に呈示する固視点の位置を, 繰り返しを持ったシーケンスにして提示すると, 予測的に眼位を次の固視点の位置へ変位させる行動がみられた。この行動に関して分析を行ったので報告する。

#### 25. 蛍光指示2-デオキシグルコースを用いた単一細胞におけるグルコース取り込みの観察

堀本直幹, 山田勝也, 中田正範, 稲垣暢也(秋田大・医・第一生理)

【目的】 細胞のグルコース取り込みを単一細胞レベルで観察する。

【方法】 グルコースのトレーサーとして 2-デオキシグルコースに蛍光指示置換基を付加した 2-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl) amino)-2-deoxyglucose (2-NBDG) (東京農工大, 松岡英明教授提供) を用いた。対象には, ヒト GLUT2 の発現ベクターを導入した COS-1 細胞ならびに対照としてベクター単独を導入した COS-1 細胞を用いた。さらに, 膵  $\beta$  細胞を用いて 2-NBDG の取り込みを観察すると同時に, fura-2 を用いた細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の測定を行った。

【成績】 GLUT2 を発現させた COS-1 細胞では明ら

かな 2-NBDG 取り込みの増大が認められ, その取り込みは GLUT の阻害剤であるサイトカラシン B により阻害された。サイトカラシン B の効果は  $\beta$  細胞においても認められた。 $\beta$  細胞を用いた系では, グルコース刺激時における 2-NBDG の細胞内取り込みと, 細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇を同一細胞において観察することが可能であった。

【結論】 2-NBDG は哺乳動物のグルコーストランスポーターを介して細胞内に取り込まれることが明らかになった。2-NBDG をトレーサーとして用いることにより, グルコースの取り込みと細胞機能の同時評価が, 単一細胞レベルで可能になった。

#### 26. イノシトール-1, 4, 5-三リン酸タイプ1受容体ノックアウトマウスの海馬苔状線維-CA3 におけるシナプスの可塑性

伊藤智史<sup>1</sup>, 藤井 聡<sup>1</sup>, 金子健也<sup>1</sup>, 加藤邦夫<sup>2</sup>, 御子柴克彦<sup>2,3</sup>, 加藤宏司<sup>1</sup>(<sup>1</sup>山形大・医・第二生理, <sup>2</sup>科技術団・創造科学・御子柴細胞プロジェクト, <sup>3</sup>東京大・医科研・分子神経生物)

イノシトール-1, 4, 5-三リン酸のタイプ1受容体 (IP<sub>3</sub>R1) 欠損マウスを用いて, 海馬苔状線維-CA3 領域における長期増強 (LTP), 脱長期増強 (DP), 長期抑圧 (LTD) を検討した。LTP は欠損マウス群とコントロール群の双方で誘導されたが, その大きさは欠損マウスの方が有意に大きかった。DP も双方で誘導されたが, その程度には差は認められなかった。LTD はコントロール群で誘導されたのに対し, 欠損マウス群では誘導されなかった。以上の結果より, 海馬苔状線維-CA3 領域におけるシナプス可塑性のうち LTD については IP<sub>3</sub>R1 が強く関わっていると考えられた。

## 第234回 生理学東京談話会

日 時：平成10年10月24日(土) 午後1時より  
場 所：埼玉医科大学 専門校舎第一講義室  
当番幹事：埼玉医科大学生理学 野村正彦 林 秀生

第234回生理学東京談話会は1998年10月24日(土)、埼玉医科大学専門校舎第一講義室で開催されました。前回の日本医科大学の担当時に、シンポジウムの形態で開催をされて、地方会として充した内容であったと言う、引継を頂きました。この成功されたとの言葉を硬く信じて、今回の発表すべてを“シンポジウム”とした談話会の会合としました。その1として、“学習・記憶研究の現在”と言う主題で5人の演者に、その2として、“イオンチャネル・キャリア・ポンプの生理学”で4人の演者をお願いを致しました。パプロフヤスキナーの話から、ノックアウトマウス話題に至る、個体丸ごとから遺伝子発現に至るまでの全ての研究課題を学習する事ができました。当日の参加者は生理学教室に限らず、薬理学、物理学、生物学、解剖学、生化学、それに臨床の若手の聴衆を多く集め、有意義なシンポジウムを持つことができました。次回は、東京医科大学に当番で開催される予定です。

### 1. 学習・記憶研究の現在

堀 耕治(埼玉医大・第一生理)

近年、学習・記憶は生物科学諸領域で大きな研究テーマとなっており、興味深い知見が急速に蓄積されつつある。しかし学習・記憶研究の現状でのあり方を見渡すと、方法論的に若干懸念される部分があるように思われる。それは、学習・記憶というものを、生物の行動の全体像の中から、それだけ単独で取り出して測定できるかのような「幻想」、あるいはそのような測定系が確立されているかのような「幻想」が、研究者の間にすら存在するのではないかと懸念である。どのような行動試験を採用するにせよ、そこで得られた学習(記憶)成績なるものには、運動感覚機能・動機づけ・情動性等々の種々の変数が絡んでいる。内部過程を測定する技法に目覚ましい進歩が見られる今、原点に戻って、行動の全体的文脈に学習・記憶をどのように位置づけていくかを再吟味する努力が必要であるように思われる。このような問題意識に沿ったひとつの研究方略は、適切なテストバッテリーを構成し、行動の多面性を多面的なまま把握するという方略である。マウスを対象動物として開発の途上にあるわれわれのテストバッテリーの一部を紹介する。

### 2. ハトの小空間における認知・左と右の使用

古屋 泉(慶大・文・心理)

ハトはオペラント実験箱内において、3つの水平に並んだキイのうちの1つのキイを赤色・他の2つのキ

イを白色に点灯した条件で、赤色キイの左または右につき反応をする訓練を受けた。訓練完成後、赤キイの位置を移動させるテストをおこなったところ、ハトは赤キイをの両側のキイに反応をふりわけた。これは、ハトが赤キイの隣という手がかりを用いたことを示しており、ハトが赤キイをランドマークとして使用することが示唆された。しかしこの結果は、ハトがこのランドマークを基準系とした左右手がかりは使用していないことも示していた。

つぎに、正面パネルで3つすべてのキイを同じ色に点灯した条件で、左キイに反応する訓練をおこなった後に、背面のパネルのキイを同様に点灯するテストをおこなった。このテストでハトは自分の左側にあたるキイに反応し、ハトは自己を基準とした左右を使用ができることが示された。しかし、正面パネルで中心キイを赤点灯として訓練した後に、背面のパネルで同様の中心キイ赤点灯のテストをおこなうと、ハトは左右キイに反応をふりわけるといふ赤キイをランドマークとした反応(赤キイ基準の左右関係の無視)を示した。これらの結果は、オペラント箱内という小空間における空間認知において、ハトがランドマークを自己中心の左右に優先して使用することを示唆している。

### 3. 動物を用いた記憶実験法 —薬物開発への応用とその問題点—

筒井雄二(福島大・生涯学習教育研究センター)

抗痴呆薬を開発する過程で、ラットやマウスを用い

た記憶実験が薬効評価のために用いられる。神経系に障害を与えた動物に新規化合物を投与し、その効果を記憶実験により評価するのである。

最近、動物実験では記憶障害改善効果の認められた多くの化合物について、それらが臨床試験で痴呆患者に投与された場合に、期待された効果が認められていないことが問題となっている。その原因の一つとして、動物を被験体とした記憶実験法の妥当性の問題があげられる。

例えば、放射状迷路課題は薬理実験で用いられる記憶実験法の1つである。この方法を用いると、比較的容易にラットの記憶を評価することができるが、その反面、この課題に反映される記憶が、人間の短期記憶とは異なる、ラットに特有な記憶機能である可能性が指摘されている (Beatty & Shavalia, 1980; 筒井, 1993)。

そこで、我々は人間の記憶実験の手続きとできるだけ類似した方法(遅延見本合わせ)を用いてラットの記憶の測定を試みた(筒井, 1998)。その結果、ラットの記憶に人間の記憶実験の結果と共通するいくつかの特徴があることがわかった。

抗痴呆薬の開発のように、ラットの記憶実験から人間の記憶について推測を行う場合には、ラットの記憶のどのような側面が人間の記憶と関係があるのかを十分に吟味したうえで、記憶実験法の選択を行う必要がある。

#### 4. スケジュール制御オペラント行動で短期記憶を測る一交替型混合スケジュール

宮川宗之(労働省産業医学総合研究所・健康障害予防)

一定の強化スケジュールで維持されているオペラント反応(スケジュール制御オペラント行動—SCOB)を指標に用いて、動物(ラット)の短期記憶を測定する方法を紹介した。我々が開発したタイムアウト付交替型混合スケジュール(alternating mix FR DRO with TO)では、『迅速な反応(FR)』と『無反応で待機(DRO)』という2種類の行動が要求される事象が、タイムアウト(TO)を挟み強化(報酬の呈示)毎に交替する。外部の手掛り(弁別刺激)は呈示されないので、効率良く報酬を得るには、TO前の『記憶』をたよりにTO後の行動選択・切替を行うことが要求される。記憶保持時間となるTO長を変化させながら、FRやDROでの反応数や反応潜時から計算した『行動選択の正確さの

指標』を求め、これを保持時間に対してプロットすると、記憶の保持—忘却曲線となる。薬物がこの保持曲線に及ぼす影響を測定した結果を示し、化学物質が記憶等脳の高次機能におよぼす影響を解析するための行動試験方法としての利点を紹介した。

[本研究の経費の一部には、科学技術振興調整費(生活・社会基盤研究—生活者ニーズ対応研究—内分泌攪乱物質による生殖への影響とその作用機構に関する研究)による予算を使用した。]

#### 5. 作業記憶課題遂行中のアセチルコリン系神経活動について

廣中直行(理研・脳科学総合研究センター・情動)

アセチルコリン(ACh)系神経活動と記憶との間には密接な関連があるとされているが、両者の関係を直接検討した研究は少ない。そこで本研究では脳内マイクロダイアリシス法を用い、ラットの海馬及び前頭前野におけるAChと記憶の関連を検討した。F344系雄性ラットを用い、レバーとランプを左右に2個ずつ備えたオペラント実験箱で、餌を報酬とし、一群には試行間間隔を10秒とした遅延交替反応を、他群には反応の手がかりとして一方のランプが点灯する手がかり付交替反応を形成した。両群の行動は見かけ上同一であるが、後者は前者に比べて作業記憶負荷が少ないと考えられる。訓練完成後、エゼリン10~4Mを含むリンゲル液を流速2 $\mu$ L/minで灌流し、行動実験開始前、実験中、及び終了後(各60分)に得た試料中のACh濃度をHPLC-ECDで分析した。前頭前野透析液中のACh濃度は、遅延交替群の実験中に増加した。実験終了後には減少したが、実験前に比べてやや高値を示した。手がかり付交替群にはこのような変動は見られなかった。海馬透析液では、手がかり付交替群のACh濃度が実験中に上昇し、実験終了後には実験前のレベルに戻った。遅延交替群ではこのような変動は見られなかった。以上より、前頭前野のACh神経活動は作業記憶と関連して活性化するのに対し、海馬のそれは注意あるいは手がかりの利用等他の要因と関連して活性化する可能性が考えられた。

#### 6. 筋小胞体のCa放出チャネル

遠藤 實(埼玉医科大学・薬理学教室)

筋小胞体は筋細胞の細胞内カルシウム(Ca)ストアであり、そのCaチャネルの開口による小胞体からのCa放出が横紋筋興奮収縮連関時の主要Ca供給源で

ある。横紋筋小胞体の Ca 放出チャネルは、リアノジンが特異的に結合するリアノジン受容体 (RyR) 蛋白として単離精製された。RyR には、骨格筋型 (1 型)、心筋型 (2 型)、脳型 (3 型) の 3 種がある。竹島らは、1 型 RyR の発現を欠いたマウスを作成し、その骨格筋では興奮が収縮を惹起し得ないことを証明した。このマウスの骨格筋細胞に培養条件下で 1 型 RyR を発現させると興奮収縮連関は回復するが、2 型 RyR を発現させたのでは回復は起こらない。3 型 RyR はこの 1 型 RyR 欠損マウス骨格筋に発現しているの、T 管脱分極の情報を受け取って機能することができるのは 1 型だけであることが分かる。骨格筋小胞体からは、生理的刺激の他に Ca 自身 [Ca-induced Ca release (CICR)] や小胞体膜の「脱分極」によって Ca 放出を起こすことができる。RyR は、すべて CICR チャネルの性質を持っているが、「脱分極」による Ca 放出は 1 型 RyR の性質である。我々は比較的最近 1 型、3 型両方の発現を欠いたマウスを作成した。その骨格筋小胞体は、ATP 存在下に Ca を取り込むことができるが、CICR を欠くことが証明できた。

#### 7. 神経終末カルシウムチャネルの伝達物質放出における機能

持田澄子 (東京医科大学・第一生理)

神経終末への活動電位の到達に伴って膜電位依存性  $Ca^{2+}$  チャネルから  $Ca^{2+}$  が流入するとシナプス小胞の開口が起り伝達物質が速やかに放出される。 $Ca^{2+}$  チャネルは  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2-\delta$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  サブユニットからなるが、チャネルを形成する  $\alpha 1$  サブユニットの細胞質ループは磷酸化や GTP 結合蛋白の結合によりチャネル活性が制御される。特に、神経伝達物質の放出を担う N 型および P/Q 型チャネル  $\alpha 1$  サブユニットの膜貫通ドメイン II と III をつなぐ細胞質ループには、シナプス小胞のアクティブゾーンへのドッキングおよび神経終末膜との融合に関与すると考えられている蛋白質複合体と結合する部位が存在し、活動電位に伴って流入した高濃度の  $Ca^{2+}$  によってシナプス小胞が同期して開口することに重要な働きをしていることがこの部位のリコンビナント蛋白のシナプス前細胞への注入により明らかとなった。さらに、神経終末膜の脱分極により増強される  $Ca^{2+}$  非依存性伝達物質放出がこのリコンビナント蛋白により抑制されたことより、この部位の終末内蛋白複合体との結合が膜の脱分極に依存したシナプス小胞開口確率の増加に一役を果たしている可能

性が示唆された。

#### 8. 両生類の皮膚：Na 能動輸送の機能分化のモデル上皮

高田真理 (埼玉医大・第 2 生理)

Amiloride-blockable  $Na^{+}$  channel は腎集合管、大腸、肺上皮、感覚細胞に広く分布する。ウシガエルのオタマジャクシの皮膚はこの channel のかかわる上皮の機能分化の過程を知る上で恰好の材料であろう。というのは、それらは変態の過程で分化してくるのだから。この皮膚を用いた研究の系を単純化するには、組織の培養法を確立する必要があった。また、変態からむ現象なので甲状腺ホルモンの関与が考えられた。つまり、培養系を確立する過程は取りも直さず“甲状腺ホルモンによる、上皮 Na 能動輸送系の機能分化の遺伝子発現の解析”に他ならないはずであった。ところがおどろいたことに、培養皮膚では輸送系は甲状腺ホルモンでは発現せず、アルドステロンで発現した。アルドステロンの効果を甲状腺ホルモンは、促進することも抑制することもなかった。一方、プロラクチンはアルドステロンの効果を抑制した。また、アルドステロン効果は  $Ca^{2+}$  濃度に依存した。上皮輸送系の分化の機構解析は細胞極性の形成過程を知ることもである。また、個体発生は系統発生の繰り返しである、というヘッケルの言葉を信ずるならば、両棲類の変態からむ現象は哺乳類における初期発生時の機能分化の研究に通ずるものとなるかもしれない。両棲類の皮膚がこれらに携わるホルモン、遺伝子の研究のためのモデル上皮として広く利用されればと思う。

#### 9. ウシガエルの皮膚：アミロライド感受性 $Na^{+}$ チャネルのノイズ解析

椎橋実智男 (埼玉医大・第二生理)

ウシガエル皮膚には、親への変態の極く短い時期に  $Na^{+}$  能動輸送系が発現する。この輸送に関与する  $Na^{+}$  チャネルは、利尿剤のアミロライドによってブロックされるアミロライド感受性  $Na^{+}$  チャネルとして知られている。ノイズ解析法は、短絡電流に含まれるイオンチャネル由来の微小な電流ノイズ (ゆらぎ) を高精度に測定することにより、イオンチャネルの単一チャネル電流やチャネル密度を解析する手法であり、パッチクランプ法の適用が困難な材料に存在するイオンチャネルを、単一チャネルレベルで解析する際に有効である。このノイズ解析法を、アルドステロン存在

下で培養した皮膚と自然変態の皮膚に適用し、両者に発現したアミロイド感受性  $\text{Na}^+$  チャンネルの特性を比較した。

短絡電流法による比較では、両者のアミロイド感受性に差はなく、培養した皮膚の短絡電流は自然変態の皮膚の約2倍であった。ノイズ解析の結果、培養した皮膚の単一チャンネル電流は  $0.56 \pm 0.05 \text{ pA}$ 、自然変

態の皮膚は  $0.54 \pm 0.05 \text{ pA}$  であった。また、培養した皮膚のチャンネル密度は  $0.71 \pm 0.19 \text{ 個}/\mu\text{m}^2$ 、自然変態の皮膚は  $0.32 \pm 0.08 \text{ 個}/\mu\text{m}^2$  であった。すなわち、両者の単一チャンネル電流は同じで、短絡電流で見られた約2倍の違いはチャンネル密度の違いであると考えられた。

## 第 50 回 日 本 生 理 学 会 中 国 四 国 地 方 会

日 時：平成10年11月6日(金)  
 場 所：エスポアール愛媛文教会館  
 当番幹事：愛媛大学医学部生理学第一講座 片岡喜由  
 愛媛大学医学部生理学第二講座 前田信治

日本生理学会中国四国地方会は今年度で半世紀を迎えた。会場は、全国的にその名を知られる道後温泉の一角に設定した。JR松山駅からは市電あるいはバスを利用しなければならないので多少不便であったが、生理学会会員の多くの参加を頂いた。

現在、中国四国地方会は若手会員の活躍の場として定着している。座長は助教授から助手にいたる会員が務めているし、学生会員の発表も散見された。将来の日本生理学会を担う会員の適当な訓練の場となっている。発表演題数は28題(口演10分、討論2分)であり、1日のうちに終了するに丁度手ごろな規模であった。

昼食の時間を利用して評議員会が行われた。先ず、新任の柁秀人教授(高知医科大学生理学第一講座)、二宮石雄教授(広島国際大学保健医療学部)、福田博之教授(川崎医療福祉大学医療技術学部)が紹介された。続いて、常任幹事会、教育委員会、日本生理学雑誌編集委員会、JJ P編集委員会の各委員からの報告が行われたが、各々の報告事項について活発な討論がなされ、要望事項が各担当委員に伝えられた。協議事項としては、第51回地方会の当番幹事校が山口大学医学部である旨が確認され、第52回地方会の当番幹事校として島根医科大学が決定した。また、2年前から議論されてきた中国四国地方会における研究生、大学院生あるいは学部学生の参加にあたって参加費の納入に関する申合せが文書として提出され、了承された。日本生理学会中国四国地方会は10校の医学部・医科大学を拠点として10年毎に順番制で回ってくる。各発表演題に対する活発な討論と評議員会における熱のこもった議論に感謝する次第です。

(前田信治記)

### 1. アストロサイトの神経細胞死抑制効果

徳 和子, 田中潤也, 阪中雅広\*, 前田信治(愛媛大・医・二生理, \*二解剖)

活性酸素を神経細胞に負荷したときのラット培養アストロサイトの挙動を観察した。ニトロブルシッドナトリウム, SIN-1, 硫酸第一鉄を一過性に負荷すると、神経細胞の単独培養では、20時間以内にアポトーシス様の細胞死をきたしたが、アストロサイトと共培養しておくくと神経細胞死はほぼ完全に阻止された。マイクログリアにも強い神経細胞死抑制効果があるが、両者の作用機構には明らかに異なる点があった。アストロサイト由来の細胞外マトリックスには、培養上清より強力な神経細胞保護効果があり、ラミニンとフィブロネクチンが含まれていた。精製した両蛋白質にも強い神経細胞保護効果が認められた。以上の結果は、アストロサイトが、主に細胞外マトリックス蛋白質分泌により神経細胞保護に関与していることを示している。

### 2. インターロイキン4のマイクログリアに対する作用

土居潤子, 徳 和子, 浜田英里, 田中潤也, 阪中雅広\*, 前田信治(愛媛大・医・二生理, \*二解剖)

脳内の主たる免疫担当細胞であるマイクログリアの機能、形態、生存期間に対するインターロイキン4(IL-4)の影響を培養系で検討した。血清存在下では培養マイクログリアはマクローフェージ様の丸い形態を呈するが、IL-4存在下ではその濃度依存性に突起を伸展し、一酸化窒素やスーパーオキシドアニオン産生能も抑制された。しかし、IL-4は血清存在下で促進される細胞増殖を抑制しなかった。一方、無血清培地中では、培養時間とIL-4濃度に依存してマイクログリアの細胞死が促進された。この細胞死は、TUNEL陽性であり、形態上からもアポトーシスと考えられた。以上の結果は、IL-4がマイクログリアの活性抑制の他、種々の神経疾患時に増殖したマイクログリアの細胞数減少に関与していることを示唆している。

### 3. マウス脳に対するイブシロン毒素の作用

住谷和則<sup>1</sup>, 宮本 修<sup>2</sup>, 中村文洋<sup>3</sup>, 山神真一<sup>4</sup>, 岡田泰士<sup>4</sup>, 村上哲英<sup>5</sup>, 板野俊文<sup>2</sup>, 根木哲朗<sup>1</sup>(香川医大・<sup>1</sup>基礎スポーツ医, <sup>2</sup>生物, <sup>3</sup>脳神経外科, 香川大・<sup>4</sup>保健体育, 倉敷芸術科学大・<sup>5</sup>生理)

*Clostridium perfringens* type BまたはDが産生するイブシロン毒素は、家畜の腸管より吸収されプロテアーゼで活性化されて、毒素症状を引き起こす。本毒素は脳に特異的に取り込まれ、脳細胞障害を起こすことが知られているが、その作用機序については十分に解明されていない。我々は、本毒素が海馬に特に障害を与えること、またこの作用はグルタミン酸が関与することを示唆してきた。本研究では、酵素電極法を用いた微小還流透析法により、毒素投与による脳内グルタミン量について検討した。マウス(雄, 30~35g)の海馬にプローブを埋め込み、イブシロン毒素投与前後(2LD<sub>50</sub>-4LD<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub>=70 ng/kg)でのグルタミン酸濃度を測定した。毒素投与約1時間後より、海馬のグルタミン酸濃度が上昇し、これは用量依存性であった。けいれん誘発についても、同様の傾向がみられ、これは前シナプスからのグルタミン酸放出抑制剤である riluzole によって抑えられた。以上より、イブシロン毒素は脳内グルタミン酸の放出量を増加させ、これによりけいれん誘発及び脳細胞障害を起こす可能性が高い。

### 4. 孤束核への催吐性迷走神経入力伝達に關与する受容体の検討: 催吐刺激時の唾液分泌に対するグルタミン酸受容体遮断薬の効果

古川直裕, 畑野瑞恵, 福田博之, 古我知成(川崎医科大学生理学教室)

【目的】 迷走神経や最後野からの催吐性信号は内側孤束核に投射することが知られている。今回、迷走神経から孤束核への催吐性信号伝達における受容体について検討した。

【方法】 除脳イヌを用い、ガラミン投与、人工呼吸下の実験を行った。迷走神経背側枝を求心性に刺激して嘔吐誘発刺激とした。左顎下腺からの唾液分泌量を測定し、迷走神経および舌神経の求心性刺激に対する反応を観察した。glutamateのNMDA受容体の遮断薬

MK-801, non-NMDA受容体の遮断薬NBQX, およびそのvehicleを第四脳室内に投与してその効果を検討した。

【結果】 迷走神経背側枝の求心性刺激により retching

と唾液分泌の高進反応が発現した。両反応は vehicle および MK-801 投与の影響を受けなかったが、NBQX により完全に消失した。どの薬物においても、舌神経刺激による唾液分泌反応は変化しなかった。

【結論】 迷走神経の求心性刺激による retching の発現と唾液分泌の高進反応には、孤束核の non-NMDA 受容体が関与していることが示された。

### 5. Prosaposin 18-mer peptide の神経栄養活性

伊賀瀬圭二, 阪中雅広, 田中潤也\*, 前田信治\*(愛媛大・医・二解剖, \*二生理)

Prosaposin は神経栄養因子作用を持つが、その活性が saposin C domain の親水領域にある18個のアミノ酸残基に存在することを我々は既に確認している。この18個のアミノ酸からなるペプチド(18-mer peptide)を合成し、ラット中大脳動脈永久閉塞モデルを用いて脳室内に持続注入したところ、濃度依存性に大脳皮質梗塞巣の縮小が認められ、同時に視床の二次変性も抑制された。またこのペプチドを培養ラット皮質ニューロンに添加すると、低酸素負荷による細胞傷害率は無添加群に比べ、有意に減少した。以上より、18-mer peptide は低酸素環境下で神経細胞を保護することにより梗塞巣を縮小することが推測される。

### 6. マイクロダイアリス法による海馬歯状回の虚血性グルタミン酸流出の検討

崔翼龍, 章龍, 宇都宮一泰, 柳瀬尚人, 三谷 章, 片岡喜由(愛媛大・医・一生理)

脳虚血によるグルタミン酸サージは虚血性神経細胞死の初期メカニズムとしてよく知られている。本研究では虚血に対して耐性を示す歯状回顆粒細胞でのグルタミン酸サージを検索するため、あらかじめ5分間の一過性脳虚血負荷により虚血に対して脆弱なCA4神経細胞を除去したスナネズミ歯状回において、10分間の一過性脳虚血負荷により誘発されるグルタミン酸濃度の変化をマイクロダイアリス法を用いて測定した。その結果、虚血に対して脆弱な海馬CA1などでは虚血開始直後から顕著なグルタミン酸流出が観察されるのに対し、CA4神経細胞を除去した歯状回では虚血開始5分後からグルタミン酸流出が観察された。なお、一過性5分間虚血負荷による反応性アストロサイトの増殖を抑えると虚血性グルタミン酸サージは有意に低下していた。以上の結果は、脳虚血に対して耐性を示すスナネズミ歯状回顆粒神経細胞は10分間虚血

の期間中殆どグルタミン酸を流出しないことを示している。

### 7. 前脳虚血モデルにおける低脳温処置による蛋白合成能の回復と海馬神経細胞保護

増田晴造, 柳瀬尚人\*, 片岡喜由\* (愛媛大学医学部 附属実験実習機器センター, \*第一生理学)

低脳温による虚血後の海馬神経細胞の蛋白合成能の回復と神経細胞保護との関係を解明する手がかりを得るため, 本実験を行った。実験では, スナネズミを用いて脳温37℃下で5分間虚血後, 侵襲が進行した数時間後より24時間32℃の低脳温処置を行った後, 海馬神経細胞の形態学的観察とオートラジオグラフィによる蛋白合成の定量を行った。その結果, 虚血後低脳温処置をしない実験群では, 大脳皮質, 海馬 CA3, 歯状回の神経細胞の蛋白合成は, 虚血後1日目には虚血を施さない対照群と同程度の値まで回復し, 7日目まで持続した。一方, 海馬 CA1 では蛋白合成の顕著な回復が見られず, 神経細胞は死滅した。一方, 虚血1時間後および3時間後より低脳温処置した実験群では, 大脳皮質, 海馬 CA3, 歯状回では, 1日目より7日目まで対照群との間に有意差は認められなかったが, 海馬 CA1 では虚血1日目は対照群より低値を示し, 2日目以降は対照群とほぼ同程度に回復し, 神経細胞は生存した。このことから, 蛋白合成の回復が神経細胞保護の重要な一因であると推察され, また低脳温処置による海馬 CA1 神経細胞保護の作用機序の一つとして, 蛋白合成能の回復が示唆された。

### 8. 橋核 NMDA 受容体の発達の機能変化とニューロン脆弱性

三谷 章, 片岡喜由(愛媛大・医・一生理)

成熟脳では観察されず未熟脳においてのみ観察される脳障害 Pontosubicular Necrosis の発生機序は橋核および海馬支脚ニューロンの未熟性に起因すると説明されているが, その実体は不明である。本研究では, スライス・パッチクランプ法を用いてラット橋核ニューロンの NMDA 受容体のチャネル活性を発達経過を追って解析し, 未熟脳において発生する脳障害の神経基盤となっている NMDA 受容体の発達の機能変化を検索した。Mg<sup>2+</sup> 低感受性 NMDA 受容体チャネルがラット生後2週頃の橋核ニューロンに特異的に多く発現していることを示す電流応答が観察された。この Mg<sup>2+</sup> による抑制を受けずに Ca<sup>2+</sup> の細胞内流入

を導く Mg<sup>2+</sup> 低感受性 NMDA 受容体チャネルは, 胎児脳循環不全などが起こった場合, 直ちに細胞内 Ca<sup>2+</sup> 高濃度上昇を導き, 選択的細胞死を発生させるものと推察される。

### 9. Effect of Theanine Extracted from Green Tea on Electroencephalogram in the Rat Brain

N. Okamura, T. Kakuda\*, I. Sakane\*, T. Takihara\*, K. Nojima, K. Kon Department of Physiology, Ehime College of Health Science, Ehime, Japan, \* Central Research Institute, Itoen Ltd., Sizuoka, Japan

Theanine (N-ethylglutamine) isolated from Japanese green tea (*Camellia sinensis*) was known to inhibit the convulsive action led by administrating a great deal of caffeine. Then, antagonistic effects of theanine on the stimulatory action of central nervous system with caffeine was studied using electroencephalography (EEG). EEGs in cerebral cortex, hippocampus and amygdaloid body were measured with wister rats, implanted with stainless-steel parallel dipolar electrodes. Theanine and caffeine were given to tail vein of the rats simultaneously. Power spectra of the EEGs were determined later by fast Fourier transformation using personal computer and relative powers of  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\alpha$ , and  $\beta$ -band were calculated.

By administrating caffeine higher than 5  $\mu$ M/kg. b. w., the relative power of  $\beta$ -band increased and  $\delta$ -band decreased in cerebral cortex and amygdaloid body, and the relative power of  $\theta$ -band increased in hippocampus. On the other hand, at 10  $\mu$ M/kg. b. w. of theanine administration after administration of 5  $\mu$ M/kg. b. w. of caffeine, the relative power of  $\beta$ -band decreased and  $\delta$ -band increased in cerebral cortex and amygdaloid body, and the relative power of  $\theta$ -band decreased in hippocampus. These results suggest that theanine has antagonistic effects of the stimulatory action of the central nervous system with caffeine.

### 10. Pontamine skyblue の興奮性神経毒性とその microinjection による嘔吐運動の central pattern generator (CPG) の所在領域の限定

中村恵美, 福田博之, 古我知成, 古川直裕(川崎医大・生理)

近年, NK1 受容体遮断薬が中枢性に広範な制吐作用を示すことが明らかになり, 制吐剤として期待されている. 我々は, 同遮断薬を延髄内に微量注入することにより, その制吐作用部位を同定する実験で, 遮断薬の拡散範囲の目安を得るために pontamine skyblue (PSB) との混合溶液を注入に用いた. その過程で, PSB の神経毒性に気付き, 今回, その毒性を単離したラットの petrosal ganglion cell で確かめた. PSB は 0.1% 以上で入力抵抗の減少と脱分極を起し, 活動電位を発生させた. より高濃度では脱分極の進行に伴い活動電位発生が不可逆的に阻害された. 即ち, 同色素が不可逆性の興奮性神経毒性であることが明らかになった. そこで, 同色素の染色性と神経毒性を用いて, かねて我々が, kainic acid の微量注入により後顔面神経核背側網様体に存在することを明らかにした嘔吐運動の central pattern generator の所在領域の限定を行った. 除脳イヌの顔面神経核領域への PSB (0.5 ~ 1.0  $\mu$ l) の注入により, 腹部迷走神経刺激による retching が消失することを 8 例で確かめた. それらの注入により染色された延髄領域には後顔面神経核の直背側の背腹, 吻尾各 0.5 mm, 左右 0.8 mm の網様体領域が共通して含まれていた. 従って, 嘔吐運動 central pattern generator の核心部分は同網様体領域に存在するものと想定される.

#### 11. 幼若ラットのにおいの学習におけるセロトニンの関与

張敬姫<sup>1</sup>, 奥谷文乃<sup>1</sup>, 梶 秀人<sup>1</sup>, 八木文雄<sup>2</sup>(高知医大・医・<sup>1</sup>第一生理, <sup>2</sup>心理)

主嗅球には縫線核から豊富な遠心性セロトニン作動性神経が投射している. しかしその機能については未だ不明な点が多い. そこで幼若ラットのにおいの学習へのセロトニンの関与について行動薬理学的に検索した.

幼若ラットは生後 11 日令 (PND11) における電撃とにおい刺激の対提示訓練により, PND12 にはにおい刺激に対する嫌悪行動を示す. 訓練時にセロトニン (5-HT<sub>2</sub>) の拮抗薬であるリタンセリンを PND10 に埋設した薬物注入用カニューレを用いて嗅球に直接注入すると, 1 nM の濃度でのみ嫌悪学習が阻害された. リタンセリンはドーパミンレセプターに弱い親和性があることから, 単独注入では学習阻害効果をもたない 10 nM のリタンセリンとドーパミン拮抗薬であるチオチキシン混合液を訓練時に注入するとチオチキシンの

濃度依存性に嫌悪学習は阻害された. 一方, セロトニン (5-HT<sub>2</sub>) 作動薬であるメチルセロトニンを注入しながら, におい刺激のみの訓練を行うと, 中性の濃度のおいに対する嫌悪学習が, 濃度依存性に成立した.

以上の結果から訓練時の体性感覚刺激によって嗅球の僧帽細胞がセロトニン (5-HT<sub>2</sub>) レセプターを介して興奮することにより, 中性濃度のおいに対する感受性が上がり, においの学習が成立したと考えた.

#### 12. 失語症者の漢字, 仮名処理過程の事象関連電位

北出修子, 森田雄介, 勢井宏義(徳島大学医学部第二生理学教室)

事象関連電位 (ERP) N400 は現在, 意味処理を反映する電位として注目されている. 我々は言語機能に障害を持つ失語症者を対象に, 漢字課題, 仮名課題中の ERP 測定を行い, 健常者との比較において N400 の変化を検討した. その結果, 脳波測定時の言語課題の正答率は, 机上でのそれに比べ有意に低値を示した. これは, 脳波測定時の課題施行においては, 言語能力以外の高次能力の必要性が示唆された. また, コントロール群における ERP では, 漢字課題において, 刺激後約 400 msec から約 800 msec まで陰性方向へのシフトが持続したが, 仮名課題では, 区間内の約 600 msec で陽性方向のシフトを認めた. これは, late positive component と考えられるが, 両課題間の 400 msec 以降の電位差は, 漢字, 仮名における言語処理過程の違いによるものと示唆された. また失語群の ERP では, 漢字課題で刺激後約 400 msec から少し陰性方向へのシフトが認められるが, 仮名課題では認められなかった. また, 452~648 msec 間は, 失語群はコントロール群に比し, 有意な平均電位の低下を認めた. つまり, 失語群では, 言語処理における semantic memory search が不活発であることが示唆された.

#### 13. 高コレステロール/加齢ラット脳におよぼす DHA の抗酸化的影響

Md. Shahdat Hossain, 橋本道男, 山崎 宏, 原俊子, 榊村純生(島根医大・一生理)

我々は加齢ラットに, 過コレステロール血漿を誘起させ, 脳の抗酸化作用におよぼす DHA の影響の有無を検索した.

【方法】 加齢ラット (雌 100 週齢) を高コレステロール食で飼育した HC 群と, HC 食で飼育しながら DHA を経口投与した (HC+DHA) 群に分けた. 各群につき,

脳を摘出，大脳／小脳／脳幹部に分け，それらの脂肪酸，過酸化脂質(LPO)，還元型グルタチオン(GSH)，グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)，カタラーゼ(CAT)を測定し，比較検討した。

【結果】 HC 群では，大脳 LPO 値は小脳／脳幹部に比し高く，抗酸化作用を有する GSH, GPx, CAT は，大脳で最も低い値であった。(HC+DHA)群では，大脳の LPO のみが減少( $p < 0.05$ )，大脳の GSH, GPx, CAT が増加した( $p < 0.05$ )。脳における GPx および CAT 値は，大脳／小脳／脳幹部の DHA 値に対し，正の相関を示した( $p < 0.05$ )。以上の結果から，DHA は，脳の抗酸化酵素として GPx, CAT の活性化を促し，LPO の生成を抑制するものと考えられた。

#### 14. 多糖類の一つマンナンによるマクロファージ外向き電流の活性化

一ノ瀬充行，廣田秋彦(島根医大・二生理一)

パーホレイティドパッチクランプ法を用いて，酵母細胞膜の構成成分である多糖マンナンのマクロファージの対する作用を検討した。チオグリコレートをマウス腹腔に注射して4日後に回収して得た腹腔マクロファージを材料にして，マンナンをバフビツベトより微量に投与すると外向き電流が発生することが明らかとなった。single outward current または oscillatory outward current を生じた。

#### 15. 培養クロマフィン細胞のブラディキニン作用機構への強磁界の影響

細川敬子，池原敏孝，朴 基豪<sup>1</sup>，山口久雄，芳地一<sup>2</sup>，木内陽介<sup>1</sup>，吉崎和男，宮本博司(徳島大・医・一生理，工・<sup>1</sup>電気電子，附属病院・<sup>2</sup>薬剤，徳島文理大・<sup>3</sup>家政)

副腎髄質クロマフィン細胞を用いて Bradykinin (BK) 添加後の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) に対する変動磁界の影響を考察した。電源出力をオン・オフすることにより，最大 1.7 T の磁束密度をもつ間欠磁界を発生させた。このときの平均誘導電流密度は最大  $32 \text{ mA/m}^2$  と最小  $-13 \text{ mA/m}^2$  となる。 $Ca^{2+}$  を除去した培養液(BSS (-))では，BK 添加前の  $[Ca^{2+}]_i$  は  $a^{2+}$  存在下よりも減少するが，BK 添加すると  $Ca^{2+}$  存在下より低い急速な  $Ca^{2+}$  増加が見られた。この BK 作用には細胞膜を介する  $Ca^{2+}$  流入とストアからの放出の2つの経路が関与している。外液  $Ca^{2+}$  存在下，3時間の曝磁は BK 添加後の  $[Ca^{2+}]_i$  の最大値を

有意に減少させ，最大値に達する時間を遅らせた。一方， $Ca^{2+}$  除去液中，BK による  $[Ca^{2+}]_i$  の最大値は 1.4 T 以上で有意な減少がみられた。1.7 T の曝磁では，15分で  $[Ca^{2+}]_i$  の最大値は有意に減少し，2時間曝磁では，BK による  $[Ca^{2+}]_i$  の増加が完全に阻害された。以上の結果から，この磁界作用により細胞内  $Ca^{2+}$  ストアからの  $Ca^{2+}$  放出が完全に抑制されることが認められ，細胞膜を介する  $Ca^{2+}$  流入はほとんど影響されないことが推察された。

#### 16. ラパマイシン (Rapa) はラット骨芽細胞様 (ROS17/2.8) 細胞の分化を促進する

—FK506 及びシクロスポリン A (CsA) の効果との違い—

小川尊明<sup>1,2</sup>，山口文徳<sup>1</sup>，長島駿一郎<sup>2</sup>，徳田雅明<sup>1</sup>(香川医大・<sup>1</sup>一生理，<sup>2</sup>歯口外)

免疫抑制剤の Rapa, FK506 及び CsA の副作用はほとんど解明されていない。そこで我々は，ラットの骨芽細胞様培養細胞株 ROS17/2.8 細胞 (ROS 細胞) に対する三種の免疫抑制剤の効果を比較検討した。Rapa は用量依存性に ROS 細胞の増殖を強く抑制した。FK506 と CsA の増殖抑制効果は弱かった。Rapa は分化マーカーとなるアルカリホスファターゼ活性や骨に特異的な蛋白質の mRNA の発現を強く促進した。どの分化マーカーにおいても CsA と FK506 の効果は弱かった。この結果はこれら免疫抑制剤 (特に Rapa) が直接，骨芽細胞に働き，分化を促進する作用を有し，これら三剤の効果に差があることを意味しているとも考えられる。

#### 17. 各種ナトリウムチャンネル $\alpha$ サブユニットのグラヤノトキシン感受性比較

木村隆広，石井秀将，木下英司，焼広益秀\*，瀬山一正(広島大学医学部生理学第一，\*広島国際大学)

植物毒であるグラヤノトキシン (GTX) は電位依存性 Na-チャンネルに特異的に結合し，その活性化の電位依存性を過分極方向へシフトさせ，かつ不活性化過程を取り除く作用を持つ。このため，GTX と Na-チャンネルとの関係を調べる事で Na-チャンネルのゲート機構についての情報を得る事ができる。実験には，HEK293 細胞にラット骨格筋・ラット心室筋・ラット脳の Na-チャンネルの  $\alpha$  サブユニットを発現させ，GTX-I に対する感受性について検討した。その結果，EC50・relative chord conductance はそれぞれ  $4.4 \times$

$10^{-6} \cdot 0.23$ ,  $1.0 \times 10^{-5} \cdot 0.14$ ,  $9.0 \times 10^{-5} \cdot 0.18$ でありラット骨格筋に対する感受性が最も高い事がわかった。このことより今後、感受性の違うもの同士でキメラを作成し、GTXが $\alpha$ サブユニット内のどのドメインと親和性が高いか推測できると思われる。

### 18. カルシウムシグナルを介するBリンパ球アポトーシス経路の解析

近藤英作, 原島 哲, 松下正之, 松尾良信, 森脇晃義, 折田薫三, 松井秀樹(岡山大・医・<sup>1</sup>生理, 林原生化研)

Bリンパ球は末梢リンパ組織の胚中心を唯一のクローナルセレクションの場とする。この際の実際にはアポトーシス機構が働くことが知られている。一方, group I type Burkitt lymphoma の細胞株はこの胚中心細胞とフェノタイプを共有しており, これらの細胞株を用いた解析はBリンパ球クローン選択機構の解明の一端になり得る。我々はBALM-14, BALM-18などのgroup I type Burkitt lymphoma 細胞株が細胞表面IgMの架橋により劇的なアポトーシスに陥ることを見いだした。さらに, このアポトーシス誘導機構がカルシウムシグナルを特異的に介している可能性を見いだしたので報告する。

### 19. ラット大腸運動に対する咽頭内注水刺激の効果

吉田繭子, 畦崎亜衣, 岡田博匡(川崎医療福祉大・臨床栄養)

昨年の本学会でクロラロース麻酔下に除脳したラットの喉頭神経の求心性刺激によって遠側結腸の運動促進が引き起こされ, 骨盤神経切断後には消失することを報告した。今回は咽頭内に水道水2~3mlを注ぎ, 大腸運動に対する効果を検討した。注水刺激により遠側結腸の運動促進が引き起こされた。この促進効果は喉頭神経切断後にも認められるが, さらに舌咽神経を切断した後には消失した。また喉頭神経刺激による遠側結腸の促進効果は橋下部のレベルでの脳幹横断後には消失した。これらの結果より, 注水刺激により引き起こされた求心性衝撃は喉頭神経と舌咽神経を介して延髄に入り, さらに以前提唱した橋排便中枢を経由して脊髄排便中枢の興奮を引き起こすと推定される。

### 20. Ranatachykinin A の静脈内投与によるリンパ心臓抑制

畦崎亜衣, 吉田繭子, 岡田博匡(川崎医療福祉大・臨床栄養)

Ranatachykinin A は最近カエルの脳と腸管から見出された11個のアミノ酸からなるペプチドで腸収縮反応を引き起こす。この物質をカエルの静脈内に投与すると, リンパ心臓支配 XI 脊髄神経の遠心性活動が抑制される。さらにこの抑制反応は頭蓋内迷走神経の切断によって消失した。また, 肺・心臓枝の切断後にも消失した。他方, 肺枝と心臓枝の求心性活動がこの物質の静脈内投与によって増加した。これらの結果より, Ranatachykinin A の投与によって心臓と肺の受容器が刺激され, その求心性活動は迷走神経を経由して延髄に入り, ついで脊髄に至り脊髄リンパ心臓中枢の活動を抑制すると結論される。

### 21. 手掌部および前額部発汗に及ぼす体位の影響

白石義光, 河合康明(鳥取大学医学部第二生理)

ヒトの手掌部における精神性発汗ならびに前額部における温熱性発汗に及ぼす体位の影響を, 局所発汗量連続測定装置を用いて調べた。坐位(コントロール)ならびにHDT(head down tilt)位で発汗量の測定を行い, 結果を比較した。手掌部発汗については, 精神性負荷(暗算)と運動性負荷(ハンドグリップ)を与え, 反応性発汗波のpeak値, volume値について検討した。暗算中の発汗量は, 坐位のコントロール値と比較してHDT位の値に有意差は認められなかった。ハンドグリップを行った場合, peak値, volume値とも徐々に減少し漸減現象を示し, HDT負荷の15分後よりpeak値は有意に減少していた。4時間HDT負荷の時は, 2時間後のvolume値が有意に減少した。電気毛布による温熱刺激を1時間加えた時の前額部の発汗量を, 坐位とHDT位で比較検討した。温熱刺激を行うと, 体温の上昇とともに発汗量も増加し, 1時間後に最高値を示した。温熱刺激を終了すると, 発汗量は急激に減少し, 10分以内にほぼ基準値に回復した。坐位とHDT位で温熱刺激中の発汗量および体温の増加パターンに有意な差が認められなかった。今回用いた温熱刺激は, 発汗に及ぼす体位の影響を打ち消す程強かったと推察される。

## 22. 腎動脈枝閉塞と腎神経活動の反射性調節

清水希功<sup>1,2</sup>, 松川寛二<sup>1</sup>, 村田 潤<sup>1</sup>, 和田哲也<sup>1</sup>, 二宮石雄<sup>2</sup>(<sup>1</sup>広島大学医学部保健学科, <sup>2</sup>広島国際大学保健医療学部臨床工学科)

腎循環の神経性調節については、腎臓全体をブラックボックスとした研究が多くなされて来たが、腎の局所域に対する調節系の報告はない。そこで我々は、ペントバルビタール麻酔ネコ(n=8)を用いて、腎動脈分枝の閉塞を行い、腎神経束の支配域または非支配域を虚血にした際の腎交感神経活動(RSNA)について記録し、腎の虚血に対する局所的な反射性調節機構について検討した。腎神経束を分離し、電気刺激により腎神経束の腎支配域を同定した後、その支配域が虚血域または非支配域が虚血域となるように閉塞する腎動脈分枝を選らんだ。腎動脈分枝の閉塞を3分間行い、その前後のRSNA 応答と共に平均動脈圧、心拍数の変化を記録した。RSNA として、腎神経束の1秒間放電頻度をスパイクカウンタにより数量化し、さらに10秒間平均値を計算した。その結果、RSNA は、腎神経束の支配域の虚血により約5%増加、非支配域の虚血により約20%減少した。血流再開後にRSNA は対照値に戻った。また全腎神経束の末梢側クラッシュによりRSNA 応答は消失した。以上の結果から、腎局所の虚血時には、局所的な反射性調節機構が存在し、それは腎神経束の虚血域または非虚血域投射で異なることがわかった。

## 23. スフィンゴ脂質による気道平滑筋の収縮装置Ca<sup>2+</sup>感受性の増加

佐藤正史, 轟-池田奈津子, 最上紀美子, 大村昌人, 森景則保, 水上洋一, 小林 誠(山口大・医・第一生理)

気管支喘息の原因としてCytokine, Growth factorによって引き起こされる気道平滑筋の異常収縮(Ca<sup>2+</sup>非依存性収縮)が注目されているが、その細胞内情報伝達因子は未だ同定されていない。本研究では、Cytokine, Growth factorによって代謝が亢進することが知られているスフィンゴ脂質が、気道平滑筋収縮の制御因子である可能性について検討した。fura-2を負荷したインタクト気道平滑筋において、スフィンゴ脂質の一種であるSphingosylphosphorylcholine (SPC)は、細胞質Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)を増加させたが、その[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>増加の程度から予想される以上の大きな収縮(収縮装置のCa<sup>2+</sup>感受性の亢進)を引き起こした。β-escinによるスキンド気道平滑筋において、SPC

はCa<sup>2+</sup>非依存性収縮を引き起こした。以上の結果から、SPCは、気道平滑筋のCa<sup>2+</sup>非依存性収縮を引き起こす新規の細胞内情報伝達因子である可能性が示唆された。

## 24. 血清コレステロール値からみたスフィンゴ脂質によるヒト動脈平滑筋収縮の差異

森景則保<sup>1,2</sup>, 大村昌人<sup>1</sup>, 轟-池田奈津子<sup>1</sup>, 最上紀美子<sup>1</sup>, 善甫宣哉<sup>2</sup>, 江里健輔<sup>2</sup>, 水上洋一<sup>1</sup>, 小林誠<sup>1</sup>(山口大・医・第一生理, <sup>2</sup>第一外科)

【背景】高脂血症患者における狭心症の発症がコレステロール降下療法によって抑制されることが報告されている。一方、狭心症の原因として、血管平滑筋のCa<sup>2+</sup>非依存性収縮による血管緊張異常が注目されている。しかし、血中コレステロール濃度とCa<sup>2+</sup>非依存性収縮の関係は不明である。

【目的】ヒト血管平滑筋のCa<sup>2+</sup>非依存性収縮を引き起こす原因分子を同定し、血中コレステロール濃度との関係について検討する。

【方法】標本はヒト内胸動脈、胃大網動脈あるいは結腸動脈を使用した。sphingosylphosphorylcholine (SPC)を用い動脈中膜条片の張力測定、およびfura-2法による細胞質Ca<sup>2+</sup>濃度の同時測定を行った。

【結果】SPCはヒト血管平滑筋の細胞質Ca<sup>2+</sup>濃度の増加の程度から予想される以上に大きな収縮を引き起こした。その収縮は、血中コレステロール濃度が正常の標本ではほとんど認めなかったが、血中コレステロール220mg/dl以上の標本で急激に増加した。

【結語】高脂血症ヒト血管平滑筋においてSPCはCa<sup>2+</sup>非依存性収縮を引き起こす新しい細胞内情報伝達因子である。SPCは、高コレステロール血症に合併する血管緊張異常の発症に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

## 25. ウサギ脳底動脈の収縮ならびにカルシウム動態に及ぼすpH作用

青山泰明<sup>1,2</sup>, 河合康明<sup>1</sup>(鳥取大学医学部生理学第二, 脳神経内科)

細胞内外のpH変化が脳動脈平滑筋の収縮機構に及ぼす影響について検討した。ウサギ脳底動脈を摘出し、等尺性収縮を記録すると同時に、細胞内カルシウム濃度ならびに細胞内pHを蛍光指示薬を用いて測定した。セロトニンは用量依存性に脳底動脈の収縮と細胞内カルシウム濃度の上昇を惹起した。保生液のpHを

6.9に酸性化するとこれらの反応は減弱し, 7.9にアルカリ化すると増強した. そのメカニズムとして, pHが高くなると細胞内カルシウム濃度の上昇が強化されるが, カルシウム感受性は変化しないことが判明した. ブチル酸あるいはトリメチルアミンを用いて, 細胞内pHを選択的に変化させた時にも同様の現象が認められた. 以上の結果より, セロトニンに対するウサギ脳底動脈の収縮反応はpHの変化により修飾され, その現象の一部に細胞内pHが関与することが示唆された.

## 26. 血管作動生物質による脳軟膜血管の動態変化

新名健治, 太田智恵, 吉野綾, \*山根正信, 麻原仁子, 辻岡克彦(川崎医科大学生理学, \*川崎医療短期大学)

ニードルプローブ型 CCD 生体顕微鏡は先端部直径が1mmで空間分解能は2.5 $\mu$ mである. これを使用することにより, 脳微小血管の生体内における広い範囲での動態観察が可能である. 我々は雑種成犬に頭蓋骨除去, 硬膜切開を行い, 脳表を露出した後, 血管拡張または収縮の機序の異なる薬剤を使用し, 脳軟膜細動脈の反応を観察した. 吸気中への10%CO<sub>2</sub>の負荷, ニトログリセリン, アデノシンの内頸動脈内投与では頸動脈血流の増大と, それに対応する全般的な脳表細動脈の直径の増加を認めた. これに対しアンギオテンシンIIとフェニレフリンの内頸動脈内投与, エンドセリン-1の脳表灌流では脳表面の細動脈は一様な収縮ではなく, 部分的な収縮と拡張部位の混在を認めた.

## 27. Endothelium-derived contracting factor in carotid artery of hypertensive Dahl rat

The 2nd Department of Physiology, Kagawa Medical University, Kagawa 761-0793, Japan

Zhou MS, Nishida Y, Chen QH, Yoneyama H, Murakami H, Kosaka H

Dahl salt-sensitive (DS) and salt-resistant rats were fed a 0.4% NaCl or an 8% NaCl diet for 4 weeks. Blood pressure in DS rats fed a high-salt diet (DS-HT) was higher than that in the remaining animals. Carotid rings were suspended for isometric tension recording. Acetylcholin (ACh) caused an endothelium-dependent contraction in quiescent carotid rings from DS-HT alone. ACh-induced contraction was abolished by atropine, indomethacin, ONO-3708 (prostaglandin H<sub>2</sub>(PGH<sub>2</sub>)/thromboxane A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>) receptor antagonist), partially attenuated by OKY-046 (inhibitor of TXA<sub>2</sub> synthase). Those results suggest that ACh caused release of EDCF in carotid rings from DS-HT, which is likely to be PGH<sub>2</sub> and TXA<sub>2</sub>. ONO-3708 partially improved the ACh-induced relaxation which was significantly depressed in carotid rings from DS-HT, suggesting that the blunted ACh-induced relaxation in carotid rings from DS-HT is due to both reduced endothelium-derived relaxant factor and simultaneous release of endothelium-derived contracting factor.

## 28. X-線照射 MAP 血の保存中における赤血球の形態学的・レオロジー的变化

鈴木洋司, 立石憲彦, Cicha, Iwona, 前田信治(愛媛大学・医・二生理)

移植片対宿主反応予防のためにMAP(マンニトール, アデニン, リン酸)血に対して15GyのX-線照射を行った. 保存による赤血球容積の減少はX-線照射血においてより顕著であった. 保存中の赤血球の形態変化(有棘化)の程度には差がなかった. X-線照射血では物理的外力による赤血球変形能が低下した. 以上の変化に関わらず血液粘度に差が認められなかったことから, X-線照射は輸血上は特に支障がないものと考えられた.

## 第 49 回 西日本生理学会

日 時：平成10年10月15日, 16日

会 場：佐賀医科大学

当番幹事：佐賀医科大学生理学講座 顛原嗣尚 吉村 恵

### 1. ラット破骨細胞における非選択性カチオンチャンネル

吉田憲弘<sup>1,2</sup>, 岡田幸雄<sup>2</sup>, 小林和英<sup>1</sup>, 佐藤俊英<sup>2</sup>(長崎大・歯<sup>1</sup>歯科矯正, <sup>2</sup>口腔生理)

破骨細胞が骨吸収を行う際に, 吸収窩の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は 40 mM にも達すると報告されている. このような高  $\text{Ca}^{2+}$  の環境で, 破骨細胞はどのように膜特性を変化させているのかを検討した.

Wistar 系新生仔ラットの大腿骨及び頸骨から破骨細胞を採取した. カバーガラス上に単離した破骨細胞に, 穿孔全細胞固定記録を行った. 正常外液(1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  を含む)中で, 破骨細胞は内向き整流性  $\text{K}^+$  電流を示した. 細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  濃度を増加させたり,  $\text{Ca}^{2+}$  イオノフォアであるイオノマイシン(3  $\mu\text{M}$ )を作用させると,  $\text{K}^+$  チャンネル以外のコンダクタンス上昇が認められた. 又  $\text{Ca}^{2+}$  受容体作動薬であるネオマイシン(100  $\mu\text{M}$ )及びガドリニウム(100  $\mu\text{M}$ )を作用させても同様なコンダクタンス上昇が認められた. これらの薬剤で誘発された電流は,  $\text{Cl}^-$  の濃度変化に依存せず,  $\text{Cl}^-$  チャンネルブロッカーである NPPB(100  $\mu\text{M}$ )でも抑制されず, カチオン電流であると考えられた.

以上の電気生理学的結果から, 破骨細胞は細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  を  $\text{Ca}^{2+}$  受容体で検出し, カチオン電流を活性化させながら骨吸収の調節を行っているものと思われる. カチオンチャンネルのイオン選択性及びその機能に関しては, 今後の検討が必要である.

### 2. ラット迷走神経運動ニューロンにおける軸索損傷後の NMDA 受容体 $\text{Mg}^{2+}$ ブロックの減弱

古川義彦 鍋倉淳一(九州大学医学部第2生理)

生体内において軸索損傷を与えたラット迷走神経背側運動核(dorsal motor nucleus of the vagus nerve; DMV)細胞に対し, ニスタチン穿孔パッチクランプ法を適用して NMDA 受容体応答の電位依存性  $\text{Mg}^{2+}$  ブロックについて検討した.

軸索損傷後12時間~5日目のラットから急性単離した神経細胞では電位依存性  $\text{Mg}^{2+}$  ブロックが非傷害

群と比して減弱し, 10日目には回復した. 軸索損傷のかわりに fast axonal flow を停止させる薬剤であるコルヒチンを頸部迷走神経軸索に局所投与しても NMDA の  $\text{Mg}^{2+}$  block は変化しなかった. また, 軸索損傷後3日目の細胞において減弱した  $\text{Mg}^{2+}$  block は選択的 PKC 阻害剤であるセレリスリン( $10^{-6}\text{M}$ )やカルフォスチン C ( $10^{-7}\text{M}$ )を投与しても変化はみられなかった. DMV における NR2C, NR2D の mRNA を定量したところ, 軸索損傷後1日目と3日目には NR2C が増加し10日目にはコントロールレベルとなった.

以上の結果より, 軸索損傷後に生じる NMDA の電位依存性  $\text{Mg}^{2+}$  ブロックの減弱は, PKC を介する細胞内でのリン酸化や fast axonal flow に伴う神経栄養因子の逆行性輸送の停止とは無関係で, NMDA 受容体サブユニット構成の変化が深く関わっているものと考えられる.

### 3. ラットマイネルト核ニューロンにおける自発性外向き $\text{K}^+$ 電流(SMOC)

有馬潤一(九州大学医学部第2生理)

機械的に急性単離したラットのマイネルト核ニューロンにおいて, ニスタチン穿孔パッチクランプ法を用い, 電圧固定下に自発性の外向き  $\text{K}^+$  電流(spontaneous miniature outward current: SMOC)を観察した.

この SMOC は, ① apamin によって用量依存的に抑制されることから, small conductance type  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel ( $\text{SK}_{\text{Ca}}$ )を介することが分かった. ②  $\text{Ca}^{2+}$  ストアへの  $\text{Ca}^{2+}$  供給をブロックする thapsigargin によって抑制され, また caffeine の連続投与によってストアを枯渇させると消失することから, その発生には細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  ストアからの  $\text{Ca}^{2+}$  放出が関与していることが明らかとなった. しかし, ryanodine の投与による変化はみられなかったため, ryanodine receptor は直接は関係していないと考えられた. ③  $\text{Cd}^{2+}$ , あるいは  $\text{Ca}^{2+}$ -free 外液の投与によって発生頻度が減少することから, 電位依存性  $\text{Ca}^{2+}$

チャンネルなどからの  $\text{Ca}^{2+}$  流入によって活性化されると考えられた。また、 $\text{Cd}^{2+}$  投与下に  $\text{Na}^+$ -ionophore である monensin を加えると発生頻度が若干増加することから、一部 reverse-mode  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger の関与も否定できなかった。

これまで血管平滑筋細胞や培養末梢神経節細胞などで同様の現象が報告されているが、中枢ニューロンでは、関与するチャンネルの種類や SMOC を制御する  $\text{Ca}^{2+}$  流入のメカニズムなどに相違があることが明らかになった。

#### 4. ラット迷走神経背側運動核 (DMV) 細胞における ATP 応答に対する $\text{Zn}^{2+}$ の修飾作用

上野 剛(九州大学医学部生理学第2講座)

DMV は内臓に対する迷走神経節前線維を送る。また興奮性神経伝達物質として注目される。ATP の応答が DMV 細胞の90%以上で見られる。一方、 $\text{Zn}^{2+}$  は中枢神経において様々な作用があり、神経終末からも放出される事が知られている。近年、神経節などの末梢神経細胞における ATP 応答を  $\text{Zn}^{2+}$  が修飾すると報告されている。今回、急性単離したラット DMV 細胞にニスタチン穿孔パッチクランプ法を適用し、中枢神経細胞における ATP 応答に対する  $\text{Zn}^{2+}$  の修飾作用を検討した。

まず ATP 応答が立ち上がりの急峻な内向き電流であり、P2X の非選択的 antagonist (Suramin, Reactive blue 2) で抑制されることから、この ATP 応答は P2X 受容体を介していると考えられる。 $\text{Zn}^{2+}$  は低濃度 ( $\leq 30 \mu\text{M}$ ) では ATP 応答を増強したが、高濃度 ( $> 30 \mu\text{M}$ ) では ATP 応答の立ち上がりの緩徐化を伴う抑制を示した。またこの  $\text{Zn}^{2+}$  による 2 相性の修飾作用に電位依存性はなかった。P2X agonist (ATP  $\gamma\text{S}$ , 2MeSATP) 応答に対しても、低濃度、高濃度  $\text{Zn}^{2+}$  がそれぞれ ATP 応答に対する作用と同様の修飾をすることから、特定の subtype に対する作用ではないと考えられる。

今回の結果から末梢神経における報告とは異なり、 $\text{Zn}^{2+}$  は中枢神経における ATP 応答に対し、用量依存的に 2 相性の作用を示すことが示唆された。

#### 5. 無酸素によるモルモット心室筋細胞活動電位の短縮に及ぼす Protein Kinase C (PKC) の増強効果

伊藤健一郎(大分医科大学第二生理)

【目的】モルモットの単離心室筋細胞において、無酸

素、再酸素化時の活動電位持続時間 (APD) の変化に PKC がどのように関与するかを検討した。

【方法】semi-closed airtight chamber 内で細胞を無酸素、再酸素化し、whole cell mode において APD (1 Hz) の経時的变化を記録した。PKC の活性化には膜透過性の diacylglycerol analogue である 1,2-dioctanoyl-sn-glycerol ( $20 \mu\text{M}$ ) を用いた。

【結果】無酸素化により APD が元の値の80%から20%まで短縮するのに要する時間は、PKC 非活性化群で5.1分、PKC 活性化群で1.2分と PKC 活性化群で有意に短く、PKC の活性化により APD の短縮が促進された。再酸素化により APD が元の値に回復するのに要する時間は PKC 非活性化群では約20秒、PKC 活性化群では約6分と PKC 活性化群で有意に延長し、PKC の活性化により APD の回復が遅延した。尚、PKC 非活性化群において細胞内 Ca の有無により APD の変化を比較したところ、有意な差は認めなかった。

【総括】PKC の活性化により  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャンネルの開口は促進し、かつ再酸素化によるチャンネルの開鎖は遅延することが示唆された。

#### 6. Isaacs 症候群及びその近縁疾患における $\text{K}^+$ channel 抑制の機序について

長堂竜雄, 園田至人, 有村仁志, 有村公良, 納 光弘(鹿児島大第3内科), 亀山正樹(同第2生理)

Isaacs 症候群は、myokymia, fasciculation 等の筋自発運動を呈し、発汗過多や知覚異常を伴う疾患として知られており、近年、その病態機序として voltage-gated  $\text{K}^+$  channel (VGKC) の抑制が注目されている。今回我々は何の type の VGKC がどのような機序で抑制されているかを調べるため、培養ヒト神経芽細胞 (NB-1) と hKv1.1 及び1.6を発現させた CHO cell を用い、患者血清の VGKC に対する影響を patch clamp 法で検討した。

【方法】患者免疫グロブリン (Ig) と共に 3 日間培養した NB-1 cell の  $\text{K}^+$  current density を whole cell patch clamp 法で測定、また single channel conductance も測定し、コントロールと比較検討した。hKv1.1 及び1.6を発現させた CHO cell では、患者血清と共に 3 日間培養し  $\text{K}^+$  current density をコントロールと比較検討した。

【結論】NB-1 の native な  $\text{K}^+$  電流及び CHO に発現させた hKv1.1 及び1.6は患者血清で抑制された。ま

た、 $K^+$  channel の single channel conductance に変化はみられなかった。Isaacs 症候群では、 $K^+$  channel 個々の性質には変化はなく、その病態機序として channel の数の減少が想定された。

### 7. カエル神経筋接合部での $Sr^{2+}$ による MEPP 頻度の増大

田辺憲子(第一保育短期大学)

$Ca^{2+}$  は神経終末での伝達物質放出の過程に重要な役割を担っている。しかし Ca チャネルより  $Ca^{2+}$  の流入後、開口放出が起こるまで過程はまだ不明の点が多い。

カエルでは神経の連続刺激による伝達物質放出の増大は時定数の違う4つの因子(fast facilitation, slow facilitation, augmentation, potentiation)に依っているが、 $Ca^{2+}$  が関与しているのは fast facilitation のみであって、他の因子は  $Ca^{2+}$  が直接関与していない事を以前に示している。

$Sr^{2+}$  も  $Ca^{2+}$  と同様、神経刺激により伝達物質放出をトリガーするが、 $Ca^{2+}$  とはいくぶん異なっているようであり、現在  $Sr^{2+}$  の作用を調べている。還流液中の  $Ca^{2+}$  を  $Sr^{2+}$  に置き換えて、時間間隔を変えた paired pulse facilitation により、 $Sr^{2+}$  中では 10 ms 後の刺激より 20~50 ms 後の方が2発目の大きさが大きくなった。また神経を連続刺激した時の MEPP の増加の仕方も Ca 溶液中と Sr 溶液中では異なっていて、Sr 溶液中の方が増加の仕方が顕著であった。

### 8. 蛍光顕微鏡による脳スライス細胞内 $Ca^{2+}$ 変動の測定

石松 秀, 赤須 崇(久留米大学医学部第二生理)

幼若ラット(<21日齢)での青斑核(LC)では gap junction を介した Intercellular communication の存在が知られているが、成長ラット(>6週齢)の LC ではその存在はまだ明らかになっていない。今回我々は、LC 全体の同期した細胞内  $Ca^{2+}$  変動(ICF)を光学的に測定したので報告する。成長ラットより取り出した LC を含む新鮮脳スライス標本(250~300  $\mu$ m)に対し、細胞膜透過性  $Ca^{2+}$  感受性色素(Oregon Green BAPTA-1AM 0.125%)を局所的に処理し、倒立型蛍光顕微鏡と ICCD camera (Argus 50)を用いて光学的(Ex/Em: 488/520 nm)に細胞内  $Ca^{2+}$  レベルを測定した。灌流液中に tetraethylammonium chloride 10 mM,  $BaCl_2$  1 mM, tetrodotoxin 1  $\mu$ M を加えると LC 全体の

細胞が同期した ICF を示した。この ICF の同期性は gap junction の阻害剤である carbenoxolone 100  $\mu$ M の灌流や細胞内環境を酸性化により spontaneous activity を保ったまま非同期に転じることより、成長ラットの青斑核においても gap junction の存在が示唆された。

### 9. スフィンゴシルフォスフォリルコリンのリアノジン受容体への作用

上原 明, 安河内 緑\*, 今永一成(福岡大学 医学部 生理学第一, \*人間生物系総合研究室)

Ca 誘発性 Ca 放出(CICR)を担う心筋小胞体リアノジン受容体のチャネル活性は、形質膜の L 形 Ca チャネルから流入する Ca イオンや、ATP, Mg イオンなど、細胞質内に存在する多くの内在性物質により調節されている。今回は、他の内在性物質であり、形質膜成分となる脂質の代謝産物、スフィンゴシルフォスフォリルコリン(SPC)が、リアノジン受容体の調節物質となりうるか否かを検討した。

リアノジン受容体チャネル標本は家兎の心室筋より単離精製した。同チャネル標本を再構成膜に埋め込み、単一チャネル電流を記録した。cis 側及び trans 側の実験槽の液組成は、250 mM CsOH, pCa5, pH7.4 とした。

細胞質側に 5  $\mu$ M の SPC を投与し、投与前後の開確率と開口頻度を比較した。開確率は、 $0.61 \pm 0.07$  から  $0.16 \pm 0.05$  と減少し、開口頻度は  $283 \pm 39$  Hz から  $85 \pm 18$  Hz と減少した。このように、SPC のブロック作用が心筋リアノジン受容体に対して認められた。

以上の結果は、SPC が脂質セカンドメッセンジャーとしてリアノジン受容体チャネルを調節する可能性を示している。

### 10. 頸動脈小体の化学受容機構モデル

林田嘉朗, 吉崎克明\*(産業医科大学応用生理学, \*秋田大学医療技術短大)

頸動脈小体の化学受容はグロムス細胞を受容細胞とするのが一般的である。しかし形態学的に一本の洞求心神経は分枝して、最大20個のグロムス細胞と接しているため、グロムス細胞の興奮から神経終末への情報伝達がどのように調節されているかは明らかでない。ここでは細胞内記録の結果から頸動脈小体の受容機構のモデルを提示する。

【方法】 バルビタール麻酔下でネコの頸動脈小体を洞

神経とともに摘出し、ロック液環流下に細胞内記録を行った。洞神経からは求心性活動をモニターした。頸動脈小体の刺激には酸素欠乏溶液、酸性溶液、acetylcholine または sodium cyanide 溶液を用いた。

【結果】 洞求心神経の終末部からの細胞内記録は 10 mV から 55 mV の spike potential と最大 25 mV に達する slow depolarizing potential (SDP) が記録できる。グロムス細胞は 17 mV から 90 mV の静止膜電位を持ち、時に持続時間の長い(約 2 秒) spike 様電位の振動を自発的に繰り返す細胞もある。化学刺激により静止膜電位が脱分極する細胞、過分極する細胞、および膜電位が変化しない細胞がある。

【結論】 化学刺激は洞求心神経支配領域の 20% のグロムス細胞を脱分極し、それと接する求心神経終末に SDP を発生させる。残り 80% のグロムス細胞は過分極することにより情報伝達を調節していると考えられる。

#### 11. ラット脳スライスにおける神経細胞のエネルギー代謝

吉岡敬太郎, 柳井莊緑, 西丸直子, 山田和廣(大分医科大学 生理学第一)

脳組織におけるエネルギー基質は主にブドウ糖であることが知られているが、一方乳酸もエネルギー基質として用いられることが報告されている。特に乳酸は低血糖状態や低酸素後の回復にとって重要であると考えられる。我々はラット脳スライスの  $^{31}\text{P}$ -NMR 測定によって、高カリウム刺激による高エネルギーリン化合物(クレアチンリン酸)の変化を経時的に観察することにより、脳組織における乳酸のエネルギー基質としての能力をブドウ糖と比較検討した。

解糖系の阻害剤であるヨード酢酸 (IAA) で処理した脳スライスのクレアチンリン酸レベルは、高カリウム刺激後、ブドウ糖中では回復しなかったにもかかわらず、乳酸中では回復した。このことは脳組織において乳酸がエネルギー基質として利用されることを示している。

ブドウ糖を供給したとき、灌流液中の  $\text{Ca}^{2+}$  の有無により高カリウム刺激後の脳スライスのクレアチンリン酸レベルの回復に差がなかった。一方、乳酸を供給した場合には、 $\text{Ca}^{2+}$  の有無によって有意な差がみられ、 $\text{Ca}^{2+}$  が存在すると回復が悪かった。この結果は、乳酸の脳組織におけるエネルギー代謝の支持能力がブドウ糖より劣ることを示唆する。

#### 12. メカニカルストレスによる破骨細胞の骨吸収機能調節

都築 尊, 岡部幸司, 鍛冶屋 浩, 岡本富士雄, 副田博之(福岡歯科大学・口腔生理)

【目的】 無重力や運動機能低下の環境では骨量が減少することが知られており、骨量維持にはメカニカルストレス (MS) が重要であることが知られているが、その細胞レベルでの機序は不明な点が多い。そこで、骨での MS の受容細胞として、破骨細胞の機能がどの様に調節されるかを検討した。

【方法】 新生児ラット長管骨の骨髓より採集した破骨細胞を用い、低浸透圧刺激 (HOS) による細胞膨張を細胞膜に対する MS 刺激としに行った。細胞に fura-2/AM を負荷し、HOS による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の変化を測定した。また、破骨細胞活性化の骨吸収機能形態の指標である actin ring を蛍光染色で染色し、HOS による影響を併せて検討した。

【結果と考察】 HOS により、数分以内に細胞面積の増加が可逆的に起こり、それに伴い、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇が認められた。この  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇は、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  貯蔵部位の機能を抑制する薬物では抑制されず、外液  $\text{Ca}^{2+}$  除去により完全に消失し、また、 $\text{Gd}^{3+}$  によりほぼ抑制された。従って、HOS により  $\text{Gd}^{3+}$  感受性のある  $\text{Ca}^{2+}$  流入系が活性化されるものと考えられた。また、破骨細胞の有する actin ring に対しても HOS 環境化では ring 形態の崩壊が認められ、この HOS による抑制は外液の  $\text{Ca}^{2+}$  に依存した。以上より、HOS は破骨細胞の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を介して骨吸収能を抑制させると考えられ、MS が破骨細胞を介して骨吸収を抑制的に調節する可能性が示唆された。

#### 13. ノシセプチン脳室内投与による腎交感神経活動変化における圧受容器反射活動の関与

白阪哲朗, 加藤和男, 金 清華, 國武孝人, 花森隆充, 河南 洋(宮崎医科大学第一生理)

ノシセプチンは、麻薬レセプター類似の opioid receptor like<sub>1</sub> (ORL<sub>1</sub>) レセプターの内因性リガンドとして発見されたペプチドである。

意識下で intact および sino-aortic denervated (SAD) rat を用いてノシセプチン (2~10 nmol) を脳室内に投与し血圧 (BP)、心拍数 (HR) および腎交感神経活動 (RSNA) に及ぼす影響について調べた。さらに nociceptin (10 nmol) の心拍数に及ぼす影響の副交感神

経活動の関与を調べるために硫酸アトロピン (4.0 mg/kg) を前投与した。また opioid receptor antagonist である naloxone (100 nmol) あるいは痛覚伝達において nociceptin に拮抗作用のある nocistatin (20 nmol) を前投与して nociceptin (10 nmol) の作用に影響するかどうかを調べた。Intact rat では、BP および HR は dose-dependent に低下したが、RSNA は 2 および 5 nmol 投与した場合に有意に低下した。SAD rat では BP, HR および RSNA の全てのパラメーターにおいて dose-dependent に低下した。硫酸アトロピンを前投与しても nociceptin による徐脈反応に変化はなかった。Naloxone あるいは nocistatin を前投与しても、nociceptin による降圧および徐脈反応に影響はなかったが、naloxone 前投与群で RSNA が有意に低下した。Nociceptin は中枢性に腎交感神経活動および圧受容器反射活動を調節すると思われた。

#### 14. 脳幹の顎運動関連領域への黒質からの下行経路の検索

藏岡直史\*, 笹本一茂, 西牟田国博, 太田雅博(九州大・歯・\*第二補綴, 口腔生理)

顎運動に関連する脳幹の諸構造への黒質からの下行経路を検索した。pentobarbital 麻酔下の Wistar rat の上丘, 赤核あるいは橋網様体には 5% WGA-HRP を電気泳動法で注入し TMB 反応を行った。

上丘注入例では、同側優位で両側の黒質網様部 (SNR) と、同側の黒質外側部 (SNL) に標識細胞が観察された。神経終末を含む標識線維成分が、対側の橋網様体小細胞部 (PRF<sub>pc</sub>), inter trigeminal nucleus (I5) に見られた。赤核からは対側の橋へ投射していた。赤核吻側部注入例では、主として I5 および三叉神経主知覚核に線維成分が見られたのに対し、尾側半注入例では、主として PRF<sub>pc</sub> と三叉神経運動核に線維成分が見られた。また、標識細胞体が同側 SNR に見られた。橋網様体外側部やや内側に注入した例では、対側赤核尾側半, 上丘および同側 SNL に標識細胞が見られ、外側よりに注入した例では、赤核吻側半, 上丘および SNL にそれらが見られた。

I5 は三叉神経運動ニューロン (VMN) へ線維を送る介在ニューロンプールである。また、PRF<sub>pc</sub> にも、VMN へ線維を送るニューロンがある。今回の実験結果から、黒質からの下行性経路には、SNR および SNL から同側上丘経路で対側 PRF<sub>pc</sub> および I5 に達する系、SNR から同側赤核尾側半経路で対側 PRF<sub>pc</sub>

(一部は赤核から直接 VMN) に達する系、および SNL から同側 PRF<sub>pc</sub> に達する系の三系統があることが推定できた。

#### 15. AF64A 投与痴呆モデルラットの行動および体温のサーカディアンリズム

遠藤 豊, 白木啓三(産業医大・医学部・第2生理)

サーカディアンリズム発現機構におけるコリン作動性神経系の役割を検討することを目的として、コリン作動性神経の選択的神経毒である AF64A (ethylcholine mustard aziridinium) を投与した痴呆モデルラットの自発行動量, 深部体温, 摂食量, 飲水量および血漿コルチコステロン濃度を測定し, cosinor 法を用いてリズム分析を行った。自発行動量, 深部体温, 摂食量, 飲水量は、テレメトリーシステムを組み合わせた摂食・飲水ケージで飼育して自動測定し、血漿コルチコステロン濃度は RIA kit を用いて測定した。その結果、自発行動量, 深部体温いずれも、amplitude が減少し、acrophase が有意に先行していた。また血漿コルチコステロン濃度はレベルが上昇し、やはり acrophase は有意に先行していた。摂食量および飲水量については、明暗周期で比較するといずれも有意な変化は認められなかった。以上より、脳内のコリン作動性神経系の障害により、amplitude の低下および acrophase の先行を特徴とするリズム障害が惹起され、脳内のコリン作動性神経系が自発行動量, 深部体温および血漿コルチコステロン濃度についてのサーカディアンリズム発現機構に関与することが明らかにされた。

#### 16. 糖尿病ラットにおける行動およびストレスと脳内セロトニンレベルとの関係

山崎里美, 大和孝子, 三隅幸子, 青峰正裕(中村学園大学・栄養生理)

本研究では自然発症型糖尿病ラット (10 週齢 WBN/Kob; 以下 DM 群) を用いて、海馬における細胞外セロトニン (5-HT) レベルと行動との関係を調べ、Tail Pinch やエタノール投与, インスリン投与, トリプトファン (Trp) 投与に対する反応をマイクロダイアリシス法にて検討し、正常ラット (8 週齢 Wistar 系; 以下 C 群) と比較した。

DM 群は C 群に比して 5-HT の Basal Level が約 3 倍高く、行動量も約 2 倍多かった。両群に Tail Pinch を与えると、C 群の 5-HT レベルは DM 群より有意

に上昇した。その後、エタノールを経口投与すると DM 群では有意に 5-HT レベルが上昇したが、C 群には変化がなかった。両群にインスリンを投与した場合、C 群の 5-HT レベルは有意に上昇したが、DM 群には変化がみられなかった。また Trp の投与により、C 群においては DM 群よりも 5-HT レベルが有意に増加した。

以上のことより糖尿病ラットはストレスを感じにくく、知覚神経異常を伴っている可能性が示唆された。また今回用いた糖尿病ラットで観察された高い 5-HT レベルは、5-HT の代謝過程における何らかの異常により 5-HT が蓄積した可能性を示唆している。

#### 17. histamine 刺激により IgE の血管内皮細胞透過性は亢進する

花城和彦<sup>1)</sup>、洲鎌いち子<sup>1)</sup>、渡慶次賀博<sup>1)</sup>、仲宗根敏幸<sup>1,2)</sup>、小杉忠誠<sup>1)</sup> (1)琉球大学医学部生理学第一講座、2)同歯科口腔外科学講座

【目的】 血管内皮細胞の持つ物質透過能力に及ぼす histamine の影響を調べた。さらに、血管内皮細胞の物質透過性に選択性が存在するか否か、その選択性が histamine 刺激により変化するかどうかを検討した。

【方法】 内皮細胞はラット胸部大動脈より explant 法を用いて採取し、DiI-Ac-LDL の取り込みを蛍光顕微鏡を用いて確認した。chamber の膜上に播種した内皮細胞が confluent に達した後、histamine 添加または無添加の無血清培地で 24 時間培養した。次いで、monoclonal DNP-specific rat IgE あるいは精製 rat albumin を上槽内の培地に添加後、上槽および下槽から培養液を経時的に採取し、IgE および albumin 濃度を定量した。その結果より、clearance volume および透過係数を算出した。

【結果】 非刺激内皮細胞では、IgE の透過係数は albumin に比較して低値を示した。しかしながら、histamine 刺激内皮細胞では、IgE の透過係数は albumin に比較して高値を示した。さらに、histamine 刺激内皮細胞では非刺激内皮細胞に比較して、IgE の透過係数は有意な上昇を示したが、albumin では有意な変化は認められなかった。

【結論】 培養血管内皮細胞の持つ物質透過能力には選択性が存在し、histamine 刺激によりその選択性が変化する可能性が示唆された。

#### 18. モルモットとマウス遊離副腎細胞における ACTH による副腎皮質ホルモン分泌への PAF の関与

広瀬妙子、相川忠臣、嶋田敏生、松本逸郎(長崎大・医学部・第一生理)

PAF (platelet activating factor) が ACTH による副腎皮質ホルモン分泌に関与していることをイヌの灌流副腎と遊離副腎細胞を用いて明らかにしてきた。今回モルモットとマウス遊離副腎細胞で同様の結果が得られるかどうかを調べた。モルモット遊離副腎細胞で ACTH と Forskolin による副腎皮質ホルモン分泌が PAF 拮抗剤 SM12502 で著明に抑制された。その立体異性体 SM12501 は Forskolin による分泌をほとんど抑制しないので toxic な抑制ではないと考えられる。マウス灌流副腎で ACTH による副腎皮質ホルモン分泌を CV6209 と SM12502 の 2 種類の PAF 拮抗剤が抑制し、Forskolin と dibutyryl cyclicAMP による副腎皮質ホルモン分泌も SM12502 で抑制された。これらの抑制効果は正常マウスに比べヌードマウスで有意に小さいものであった。マウスの遊離副腎細胞で ACTH による副腎皮質ホルモン分泌は高濃度の CV6209 で抑制されたが、正常マウスとヌードマウスで差が見られなかった。以上の結果より ACTH による副腎皮質ホルモン分泌の細胞内情報伝達のメカニズムに PAF とその受容体が関与し、そのレベルは cyclicAMP 以降にあることがイヌ、モルモット、マウスで明らかとなった。

#### 19. 腸管由来の LPS が非炎症ストレス時の末梢 IL-6 産生に関与する

八木誠司、高木厚司、堀哲郎(九州大学医学部第一生理学教室)

我々は、これまでに(1)マウス IL-6 組織含有量が肝臓、腸管膜、腸管膜リンパ節等で高く、(2)1 時間拘束で、腸管膜、腸管膜リンパ節の組織含有量が低下し、(3)IL-6 mRNA は、同拘束時に肝臓、腸管膜、腸管膜リンパ節で上昇する事を報告した。そこで、今回、肝門脈周辺臓器が非炎症ストレス時の血漿 IL-6 の産生源であることを in vivo 実験で検証した。

雄ラットに(i)門脈(P)、(ii)肝静脈-下大静脈合流部(VCH)、(iii)腎静脈-下大静脈合流部上部(VCM)、(iv)下大静脈-大腿静脈合流部付近(VCL)にカテーテルを各々挿入し、全ての動物で一般静脈血採血用に経頸静脈的に右房近傍にもカテーテルを埋め込んだ(j)。Foot shock stress (FSS) 負荷後の P の IL-6 濃度は、

VCH よりも早期に上昇し、そのピーク値は、VCHの方が高かった。一方、VCMではJと比較して有意差を認めず、VCLでは、Jの方が高い傾向を認めた。

次に、腸管周辺臓器でIL-6産生を引き起こす因子として腸管由来のエンドトキシン(LPS)に注目し、循環血中のLPSをPolymyxin B(PMB)で中和した。その結果、FSS時の肝門脈血中のIL-6濃度上昇が抑制され、腸管由来のLPSが非炎症ストレス時の末梢IL-6産生のkey mediatorである可能性が示唆された。

## 20. アディポサイトカインとしての GBP28

高木厚司, 堀 哲郎(九州大学医学部第一生理学教室)

Gelatin-Binding-Protein (GBP)28は、1996年に中野・富田らによってヒトの血漿から抽出・同定された244個のアミノ酸からなる28kDaのポリペプチドで、脂肪細胞に特異的に発現するapM1 geneによってコードされるアディポサイトカインの一種である。この物質は、コラーゲン様ドメインを持ち、通常3量体を形成し、血清中ではさらにこれが4組または6組結合した状態で存在している。そしてその構造上の特徴から、皮下や腸管膜に大量に存在する脂肪細胞から分泌されるGBP28が、外環境から侵入してくる陰性に荷電した巨大分子(LPSなど)を捕捉し、マクロファージ系の細胞に受け渡している可能性が推測された。そこで今回、このGBP28とLPSとの相互作用を検討した。その結果、(1)GBP28にLPS様リムルス活性が存在し、その力価はLPS(E. coli., 0111:B4)と比較し1/1,000程度であること、(2)GBP28のLPS様活性は、56℃30分で減弱し、高次構造がその活性と関係する事、(3)GBP28は、マクロファージからのIL-6産生を誘導し、その作用も加熱により減弱する事、等がわかった。今後、GBP28とLPSとの結合性、GBP28が生体内に侵入してくるLPSの除去に寄与している可能性、等を念頭にさらに検討を加えていく予定である。

## 21. 内因性有機酸 2-buten-4-olide によるマウス水迷路学習の促進

李 学良<sup>1</sup>, 粟生修司<sup>1</sup>, 大村 裕<sup>2</sup>, 堀 哲郎<sup>1</sup>(九州大学・医・1生理, <sup>2</sup>日本臓器生物活性科学研究所)

内因性有機酸の2-buten-4-olide (2-B4O)は摂食抑制、血糖上昇、視床下部一下垂体一副腎皮質系の賦活

化など、種々の生理作用を示す。本研究では2-B4Oの学習機能に及ぼす作用を調べ、さらに2-B4Oの学習調節作用における酸性線維芽細胞成長因子aFGFの関与を調べた。実験には9週齢の雄DDYマウスを用い、モリス水迷路試験(4試行/日, 4日間)で空間学習機能を調べた。2-B4O(5mg/kg)または生理食塩水を腹腔内投与し、2時間後にモリス水迷路試験を施行した。2-B4O投与群のゴール到達に要する時間は、対照の生理食塩水投与群に比べ、有意に短縮した。訓練終了後のProbe testでも、2-B4O投与群はゴールのあった領域に滞在する時間が長く、またゴール地点を横切る回数も多かった。この2-B4Oの学習促進効果は抗FGF抗体(600ng/mouse)を2-B4O投与30分前に両側側脳室に投与しておくで消失した。Probe testでも抗FGF抗体(300, 600ng/mouse)は用量依存性に2-B4Oの学習促進効果を抑制した。以上の結果は、2-B4Oは水迷路学習を促進し、その促進の少なくとも一部はaFGFを介することを示唆する。

## 22. 酸性線維芽細胞成長因子(aFGF)活性フラグメントは糖尿病モデルOLETFラットの学習障害を改善する

粟生修司<sup>1</sup>, 李 学良<sup>1</sup>, 大村 裕<sup>2</sup>, 堀 哲郎<sup>1</sup>(九州大学・医・1生理, <sup>2</sup>日本臓器生物活性科学研究所)

aFGFは学習促進作用をもち、虚血による脳障害や老化促進マウスの記憶障害を改善することが知られている。最近、我々はCCK-A受容体遺伝子欠損動物であるOLETF(Otsuka Long Evans Tokushima)ラットが空間学習障害を示すことを見出した。本研究では、新しいaFGF活性フラグメントである[Ala16]aFGF(1-29)のOLETFラットの学習機能に及ぼす影響を調べた。実験には5ヶ月齢のOLETFラットと対照としてLETO(Long Evans Tokushima)ラットを用いた。空間学習機能をモリス水迷路試験(4試行/日, 4日間)で評価した。水迷路試験においてOLETFラットは、LETOラットに比べゴール到達に要する距離が長く、probe testでもゴール地点を横切る回数が少なく、ゴール領域にいる時間も短かった。[Ala16]aFGF(1-29)300mg/kgを週1回、4ヶ月皮下投与すると、OLETFラットのゴール到達までの水泳距離が生理食塩水投与群と比較して有意に短縮した。LETOラットでは効果がなかった。probe testでは、300mg/kgだけでなく100mg/kgの用量でもOLETFラットのゴール地点を横切る回数が増加した。以上の

結果, OLETF ラットはモリス水迷路学習が障害されており, 新しい aFGF 活性フラグメントである [Ala16] aFGF (1-29) はその学習障害を改善することが明らかになった。

### 23. c-kit ミュータントラットの海馬における Paired-pulse facilitation (PPF) の異常

片岡俊彦, 近藤哲哉, 堀哲郎 (九州大学医学部第一生理)

c-kit 受容体のチロシンキナーゼドメインに4個のアミノ酸欠損が認められる Ws/Ws ミュータントラットでは, 空間認知学習, および海馬苔状線維-CA3回路における長期増強現象 (LTP) が低下している。そこで, ミュータントラットの海馬スライス標本の CA1 および CA3 領域における誘発電位を記録し, PPF と, テタヌス刺激 (100 Hz, 1 秒) 直後のシナプス増強 (PTP) や LTP との相関, および LTP の前後での PPF の変化などについて, コントロール群 (+/+ ) と比較検討した。

テタヌス刺激前と, 刺激60分後に PPF テストを行うと, テタヌス刺激前の PPF が大きいほど, LTP 後には PPF の値が小さくなるという負の相関が, CA1 では Ws/Ws および +/+ で観察された。ところが, CA3 では +/+ で見られた負の相関が Ws/Ws では消失していた。さらに, CA1 では, +/+ は PPF と PTP に正の相関があり, PPF と LTP, および PTP と LTP には相関はなかったが, Ws/Ws では, PPF と PTP の相関が消失していた。一方, +/+ の CA3 では, PPF, PTP, LTP のどの二つの間にも正の相関があったが, Ws/Ws の CA3 では, PPF と PTP のみ正の相関があり, PPF および PTP と, LTP には相関が消失していた。また, +/+ マウスで観察されたテタヌス刺激前の PPF と, LTP 後に行った PPF の変化度との負の相関は, Ws/Ws では消失していた。

### 24. マウス海馬苔状線維-CA3 回路の Paired-pulse facilitation に対する Stem Cell Factor の作用

近藤哲哉, 片岡俊彦, 堀哲郎 (九州大学医学部第一生理)

マウス海馬の苔状線維-CA3 回路では, あらかじめ c-kit 中和抗体でスライス切片をインキュベートしておくと, テタヌス刺激による LTP が著名に抑制されたことから, c-kit のリガンドである Stem Cell

Factor (SCF) がシナプス増強に関与していることが示唆された。そこで, 苔状線維-CA3 回路における paired-pulse facilitation (PPF) に対する SCF の灌流投与の効果を検討した。

SCF ( $8 \times 10^{-9}$  M) 投与前と, 30 分の灌流投与後に PPF を測定すると, 前値が大きいほど, SCF 投与後に大きく減少し, 前値が小さいと逆に増加するという負の相関が見られた。このような負の相関は, LTP の前後で PPF を測定した場合も観察された。SCF の受容体は, 苔状線維-CA3 回路において, シナプス後膜にしか存在しないことから, SCF の作用として逆行性シナプス伝達が示唆された。また, SCF による PPF の変化は, 受容体チロシンキナーゼの阻害剤である K252a, および受容体チロシンキナーゼの活性化によって賦活化される PI3 Kinase を阻害剤する Wortmannin の同時投与によって完全に消失した。さらに, PLA2 阻害剤であるメパクリンによって, SCF による負の相関が消失したことから, 逆行性シナプス伝達物質の一つとして, アラキドン酸が示唆された。

### 25. 運動負荷及び精神負荷中の手掌と耳朶の皮膚温, 皮膚血流の変化

山内正毅<sup>1</sup>, 松本孝朗<sup>2</sup>, 李 丁範<sup>1</sup>, 小坂光男<sup>1</sup> (長崎大熱研・<sup>1</sup>環境生理, <sup>2</sup>愛知医大第2生理)

顔の血管運動反応は興奮や緊張時の赤面とか顔面蒼白と関係すると考えられている。本研究では精神負荷時と掌握運動負荷時の手掌および耳朶の皮膚血流, 皮膚温, 発汗を観察し, 両部位における反応を比較検討した。男子学生20名に対し, 精神負荷として1分30秒間の暗算と運動負荷として2分間の掌握運動 (5 kg, 50 回/分) を実施した (室温20~22℃, 椅座位, 普段着)。

精神負荷時の手掌血流は暗算開始直前から急激な低下を示し, 指尖皮膚温も急峻に低下した。暗算終了後はほぼ前値レベルに回復した。耳朶血流は暗算開始直前より上昇しはじめ, 開始直後に最高値に達し, 終了後前値レベルに回復した。しかし, 耳朶皮膚温はわずかに上昇傾向を示したのみであった。運動負荷時の手掌血流は運動開始直前に一過性に低下したが直ちに上昇に転じ, 運動中上昇しつづけ終了とともに徐々に回復した。一方, 指尖皮膚温は運動開始後急峻に低下し, 運動終了直前から上昇に転じた。耳朶血流は運動開始直後から急峻に上昇し, 運動中は上昇したレベルを保ち, 終了後直ちに前値レベルに回復した。耳朶皮膚温

は顕著な変化はみられなかった。以上の結果から、緊張時での手掌や指尖の冷感や顔面の火照り感や潮紅が皮膚血流反応を反映していると考えられるが、反応の顕著な部位差が観察された。機序等についてさらに検討を必要とする。

## 26. 温熱負荷後の経時的効果の発汗への影響

李 丁範<sup>1,2</sup>, 松本孝朗<sup>3</sup>, 山内正毅<sup>1</sup>, 田井村明博<sup>1</sup>, 大渡 伸<sup>1</sup>, 小坂光男<sup>1</sup>(長崎大熱研・<sup>1</sup>環境生理, 長崎大・医学部・<sup>2</sup>原研細胞, 愛知医大・<sup>3</sup>第2生理)

温熱負荷後の経時的効果の発汗への影響を検討する目的で、人工環境実験室(温度 $24 \pm 3^{\circ}\text{C}$ , 湿度40%)で成人男子8名(20~32歳)を対象とし、 $43^{\circ}\text{C}/30$ 分間の温熱負荷した。温熱負荷前および温熱負荷停止後1時間の発汗能を検討した。被験者の前腕屈側中央にQuantitative Sudomotor Axon Reflex Test (QSART)に用いるカプセルを装着し、10%のアセチルコリンを充満させた後、Iontophoresis (2 mA, 5 min 間)実施した。温熱負荷停止1時間後にはすでに温熱性発汗は観察されず、温熱負荷前後で口腔温と皮膚温には有意差はないものの、温熱負荷後においてやや上昇の傾向があった。この結果は、体温調節中枢から発汗誘発閾値以下のインパルスが汗腺に向かって発生している事が考えられる。温熱負荷前に比して温熱負荷後の発汗潜時の短縮と発汗量の増加は、温熱負荷によって汗腺の分泌管や導管内に汗が残存している事が考えられる。

以上の結果は、温熱負荷によって神経末端からのアセチルコリンの分泌や汗腺のアセチルコリン感受性が高まった事を示唆している。

## 27. LPS 投与による熱産生・摂食抑制と神経ヒスタミン

岡 暁子, 吉松博信, 黒川 衛, 正木孝幸, 千葉政一, 藤瀬多佳子, 中田 稔, 坂田利家(九州大学歯学部小児歯科, 大分医科大学医学部第一内科)

【目的】 炎症時には、各種サイトカインが循環血中に動員される。その標的となる中枢神経系は摂食抑制ならびに発熱反応を引き起こす。これらの反応系への神経ヒスタミンの関与を検討した。

【方法】 1. 体温センサーを慢性留置した WKA 雄性成熟ラットを自動測定用箱で個別飼育した。前投与薬として、神経ヒスタミン枯渇薬 FMH (50 mg/kg) と生食を用い、投与方法は腹腔内、第三脳室内の2種類の方法を用いた。それぞれに LPS (30 mg/kg) を腹腔

内投与し、これら2群での投与前後の体温、摂食量、飲水量、行動量の経時変化を比較した。2. 上記と同様にラットを2群に分け、LPS 腹腔内投与、16時間後に、血液、白色脂肪、褐色脂肪、大腿四頭筋、を採取し、各臓器 UCPs mRNA 発現量を、northern blot 法により測定した。

【結果】 1. LPS 投与後約4時間、体温上昇が観察された。FMH 前投与群では、この体温上昇効果は有意に亢進した。LPS 投与後の摂食、飲水、行動量は有意に減少したが、FMH 前投与による変化は、認めなかった。2. 各臓器 UCPs mRNA の発現量は、有意に上昇したが、FMH 前投与による変化は、認めなかった。

【結語】 LPS を用いた炎症モデルにおいて、既に末梢ヒスタミン、視床下部ヒスタミンの上昇が報告されている。今回の実験結果から、この神経ヒスタミンの上昇が、サイトカインによる産熱反応に対して抑制的に作用していることが示唆された。また、神経ヒスタミンによる産熱反応の制御に末梢 UCPs 発現への中枢性調節の関与は少ないことが示唆された。

## 28. ヒトの循環系と脳波におよぼす音楽のテンポと音程の影響

安倍紀一郎(熊本大, 医療短大部)

月光第一楽章(ベートーヴェン)・アヴェマリア(グノー)および雨だれ(ショパン)をコンピューターで作成した。曲のテンポを四分音符で1分間に70・140および35拍に変え、各テンポで、また原音程および1オクターブ上下した音程で、曲を2分間被験者に聴かせた。その後、心音図・指先容積脈波・脳波および呼吸曲線を記録して、心拍数・脈波伝導時間および脳波の周波数を調べた。心拍数はいずれの曲でも、曲を聴く前よりもテンポ70では増加し、テンポ35では減少した。アヴェマリアと月光では、脈波伝導時間はテンポ70で短縮した。月光をテンポ140で1オクターブ上げたり、テンポ35で1オクターブ下げると、心拍数が減少した。これは雨だれでも同様であった。アヴェマリアをテンポ35で1オクターブ下げると、心拍数が増加したが、1オクターブ上げると減少した。いずれの曲でもテンポ140で1オクターブ上げると、脈波伝達時間が短縮した。テンポ35で1オクターブ下げると、脈波伝達時間が月光では短縮したが、雨だれでは延長した。月光をテンポ70で1オクターブ下げると、脳波の周波数が増加したが、上げると減少した。雨だれでは、テンポ

70で1オクターブ上げると周波数が増加した。このように、曲のテンポと音程を変えることによって、血管の緊張あるいは心拍数を選択的に制御できた。また、脳波の周波数を効率的に変えることができた。

### 29. 無麻酔・意識下でのコイの体温・心拍数の連続記録に関する新たな試み

秋根 麻<sup>2)</sup>, 土屋勝彦<sup>1)</sup> (長崎大・環境科学部・自然環境保全<sup>1)</sup>, 歯学部・歯科麻酔科<sup>2)</sup>)

環境の変化が魚類の心・循環系等の自律機能に与える影響を検討した。体長20~30cmの野生型コイをFA100(田辺製薬)により麻酔後、開胸・開腹しテレメーターの送信器(DSI, USA)を腹腔に、心電図用の電極を開心腔にセットした。コイはプラスチックの水槽に収容されその直下の受信盤にて心電図及び体温を6週間以上連続記録を行った。水温は24.2℃±0.3℃に調節され室内の照明は7時点灯, 19時消灯による12/12時間の明暗サイクルとした。

【結果】 1. PQRSの識別できる安定した心電図が記録できた。ある例における3日間の心拍数の平均値(M±SE)は43.6±0.7 beats/minであった。しかし心拍は哺乳類のそれに比較して不規則であった。2. 硫酸アトロピン1 mg/kgは心拍数を持続的に増加させ、塩酸プロプラノロール1 mg/kgは心拍数を減少させる傾向を示した。3. 心拍数は夜間暗相で増加, 昼間明相で低下し, 概日リズム様の活動変化を認めた。4. メチレンブルーによる視界の遮断は心拍数の持続的な増加を誘起した。

【論議】 従来は硬骨魚類にはコリナージックな迷走神経性心臓抑制性支配しかないと考えられてきたが, 最近の総説では(Burstock, 1969; Nilsson, 1997)でアドレナージックな交感神経性心臓促進神経がわずかに存在することが紹介されている。本実験でも, アトロピン及びプロプラノロール投与での心拍数の反応の方向は哺乳類と同様であった。心拍の不規則性, 迷走神経等の外来神経の支配との関連, 心拍数の概日リズム様の変動は今後検討する必要がある。

### 30. 延髄孤束核内でnNOSの発現を分子生物学的に制御した時の循環変化

前田正信<sup>1)</sup>, 平野英保<sup>2)</sup>, 工藤秀明<sup>3)</sup>, 土肥良秋<sup>3)</sup> (所属産業医科大学・産業生態科学研究所・<sup>1)</sup>応用生理, 同・医学部・<sup>2)</sup>生化学, 同・医学部・<sup>3)</sup>第2解剖

循環の中樞性調節の研究において, 近年化学刺激の

方法が用いられ大きな進歩がみられたが, 薬剤を外来性に注入すること自体本来的に生理的でなく, 薬剤のside effectsやhigh specific effectsであるかどうかの問題も指摘されている。本研究では, antisense DNAを用い孤束核(NTS)内で神経型NO合成酵素(nNOS)の発現を遺伝子レベルで抑制し, 生体内で自然に産生されるNOを分子生物学的に制御し, その時の循環変化を観察した。antisenseはnNOSのmRNAのinitiation codonを含むように作成した。それに相当するsenseとscrambled sequenceの作成も行った。これらのoligodeoxynucleotides(ODNs)は, 人工髄液に溶かしトランスフェクション試薬と混合した。それを, urethaneで麻酔し非動化したWistar-KyotoラットのNTSへ両側性に微量注入し, 血圧・心拍数等の変化を観察した。別のラットを用い, 免疫組織化学的にNTS内でnNOSの発現が抑制されているかどうか確認した。antisenseの両側NTSへの微量注入後の平均血圧は, senseおよびscrambled ODNsと比べ, 30分後, 45分後, 60分後で有意に上昇した。antisenseの微量注入後の心拍数は, 30分後にsenseの注入時と比べ有意に上昇した。免疫組織化学的に調べると, antisense注入後のnNOSの発現はNTSで明らかに抑制されていた。NTSでのnNOSの遺伝子の発現は, 血圧・心拍数を調節している。

### 31. マグネシウム欠乏が神経性循環調節に及ぼす影響

村里嘉信, 原田裕治, 林田嘉朗(産業医科大学 応用生理学)

【目的】 Mg欠乏が, 神経性循環調節に及ぼす影響を明らかにする。

【方法】 雄性Wistar ratを飼料により, N群(n=8); 正常Mg食, L群(n=9); 低Mg食の2群に分けて飼育し, 毎週, 体重, 尿中電解質, カテコラミン, 17-Ks, 17-OHCS, 窒素酸化物(NOx)を測定した。3週後, instrumentationを行い, 意識下で, フェニレフリン, ニトロプルシッドを静注し, 平均血圧(MBP)と腎交感神経活動(RSNA), MBPと心拍(HR)の関係を解析した。さらに, 血清, 脳と心臓の組織中のMg, Caを調べた。

【結果】 L群では成長遅延, 皮膚びらんを認めた。尿中カテコラミンはN群の2~4倍, NOxは1.4~2倍に増加した。Mg, Ca排泄は著明に低下したが, Na, K, Clの排泄の低下は, 2週以降認めなかった。血

清 Mg, Ca は減少したが, 心, 脳組織中の Mg, Ca に変化はなかった. MBP-RSNA curve は右方移動し, RSNA 変動範囲は減少した. MBP-HR curve は slope が増大して, maximal gain が増大した.

【結論】 ① Mg 低下ラットでは, 交感神経の basal tone が増大しており, ナトリウム利尿や NO 分泌を阻害することなく, 高血圧を生じた. ② Mg 低下ラットでは, 血圧低下に対する交感神経増加反応は減弱しているが, 洞結節の交感神経緊張に対する感度は増加している.

### 32. 高齢者の下半身陰圧負荷時における心血管反応

佐川寿栄子, 遠藤 豊, 筒井由香, 山内克哉, 山崎文夫\*, 白木啓三(産業医科大学・第二生理, \*臨床病態)

加齢に伴って心臓及び血管系の構造や機能に変化が起きるので高齢者では自律神経を介した循環調節反応が若年者と異なる可能性がある. 本研究は加齢によっ

て循環調節反応が影響を受けるか否かを知る目的で9名の高齢者(男性8名, 女性1名, 65~69歳)と12名の男子若年者(19~24歳)に下半身陰圧(lower body negative pressure, LBNP)漸増負荷(0から-60 mmHg)を与え, 心臓血管応答について比較検討した. LBNP負荷中, 若年者では6名, 高齢者では1名が失神前兆候を示した. 高齢者では若年者に比べてLBNP中の一回拍出量(SV)および前腕血流量の低下が小さく( $P < 0.05$ ), 心拍数の増加が少なかった( $P < 0.05$ ). 高齢者では若年者と比べて安静時の下肢脈管コンプライアンスが低く( $P < 0.05$ ), LBNP中の下肢容積の増加が小さかった( $P < 0.05$ ). 従って若年者に比べて高齢者の方がLBNP耐性が高い原因として, LBNP中の下半身への血液貯留量が少ないことが関与していると推察された. SVの低下に対する前腕血管抵抗の増加応答(ゲイン)は両群で差がなく, 高齢者の血圧調節機能は傷害されていないことが示唆された.

## 編集後記

例年、生理学会大会が終わると新学期が始まり、慌ただしく過ごしているうちにゴールデンウィークとなります。今は5月、新緑もまぶしく、生命の息吹を感じる一番よい季節です。が、4号の編集がやっと終わりました。さぼっているのではありませんが……2ヶ月も遅れてしまいました。

さて、巻頭言は丹治先生からいただきました。生理学を支えてきた(いる?)高名な先生の群像を例にあげ、考える・知恵の学問である生理学を最近の動向を

考察しておられます。捕らわれすぎて自分自身の世界に陥り排他的になっていなかったか?生体を構成する物質とそれによって作られる形の研究が急速に進展し一段落しそうな今こそ、考える生理学が新たな主役を務める時で、考えることを楽しむときであろう。

プロフィールでは、これからの担うお二人の若き先生の展望と抱負が述べられていますが、まさに合致していると思われます。また、本号から新たに神経系の分子モニタリング技術講座の連載が始まりました。考えることを楽しみ、楽しく考えたいと思います。

(高松 研)

### \*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(HP担当)          |                     |

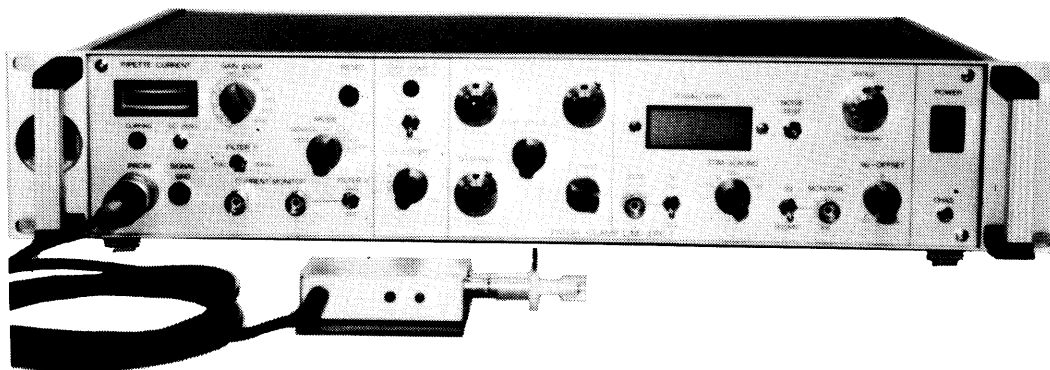
日本生理学会事務局：〒113-0033 東京都文京区本郷3-30-10 布施ビル  
 TEL：03-3815-1624 FAX：03-3815-1603(勤務時間 10:30~18:30)  
 E-mail：psj@qa2.so-net.ne.jp  
 URL：http://wwsoc.nacsis.ac.jp/psj/

# 実績 No.1!!

F. J. Sigworth, E. Neher のオリジナル

西独リスト社

## パッチクランプシステム *EPC-7*



### ■ 主な性能

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

日本総代理店 / 西日本地区発売元



ショーシンEM株式会社

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

東日本地区発売元

*(Physio-Tech)*

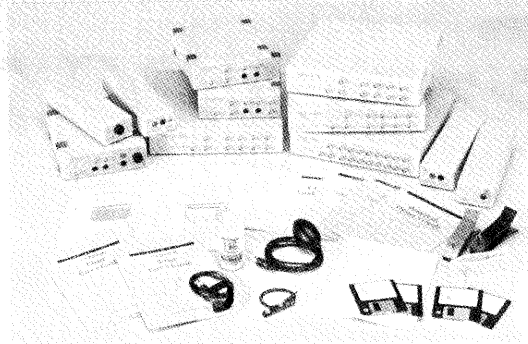
株式会社 フィジオテック

〒101-0047 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    |
| 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     |                  |

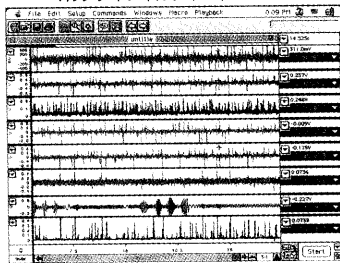
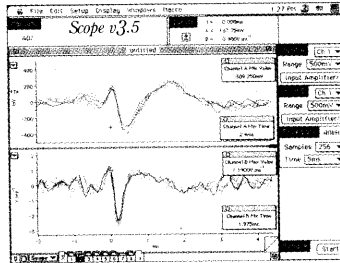
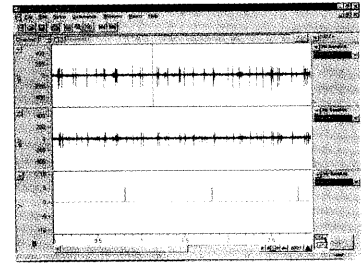
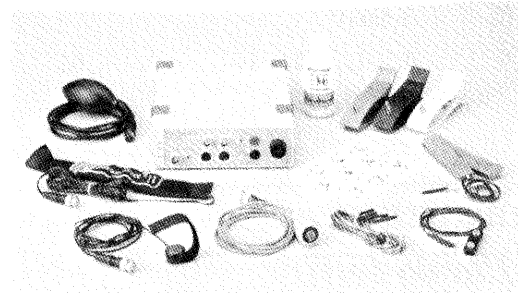
Chart  
マルチチャンネルチャートレコーダScope  
デジタルオシロスコープChart for Windows  
マルチチャンネルチャートレコーダ

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の刺激インレタが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●刺激インレタ出力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 名古屋市東区泉二丁目28番24号ヨコタビル  
TEL (052)-932-6421 FAX (052)-932-6755  
東京支店 〒101-0032 東京都千代田区若本町二丁目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.iijnet.or.jp http://www.adi-japan.com/brc

コストパフォーマンスを追求したパーソナルタイプです。

# InCyt Im™ “蛍光画像処理システム”

## 画像とデータの表示

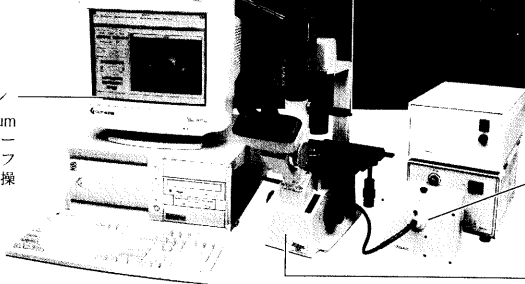
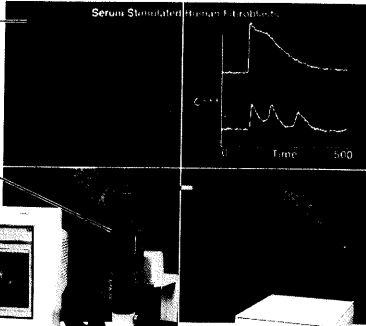
I<sup>2</sup>のモニターグラフィックソフトウェアを使用して簡単にデータを表示します。

## カメラ

低光量、低ノイズイメージング用のCCDビデオカメラを採用。

## 画像収集と解析用ワークステーション

32ビット画像処理用のPentium Pro PCとWindows NT。ユーザフレンドリーなインターフェイスによりスムーズな操作で実験可能。



- 個別の解析用に視野内を最高50エリアまで設定できます。
- 実験中のデータ解析、あるいは解析後に画像を保存します。
- ノイズを減少させるための画像アベレージング処理します。
- グレースケールからカラーへ変換するためのパレットをカスタムデザインできます。
- InCytモニターとアノテーションソフトウェア機能で、簡単に結果を表示します。又、スプレッドシートや別のプレゼンテーションパッケージへTIFFやASCIIファイルでエクスポートします。
- 画像は動画で再生できます。
- シングル又はデュアル波長測定ができます。
- 驚くほど低価格設定です。

イルミネーションシステム  
信頼性の高いXenon光源をコンピュータ制御のフィルターチェンジャーで二波長の切り換えを高速で実行します。

## 顕微鏡

I<sup>2</sup>開発のGroony™蛍光モジュールを搭載したNikonTMS-F倒立顕微鏡。

定価 ¥6,980,000  
(顕微鏡・コンピュータを含む)

日本総発売元



バイオリサーチセンター株式会社

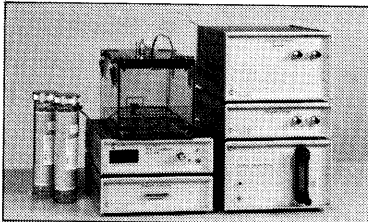
本社 名古屋市東区泉2-28-24(ヨコタビル4F) ☎052(932)6421 FAX052(932)6755  
東京 東京都千代田区岩本町2-10-1(オカジマビル) ☎03(3861)7021 FAX03(3861)7022

## 実験動物用薬理関連機器

### VO<sub>2</sub>/VCO<sub>2</sub>呼吸代謝モニター

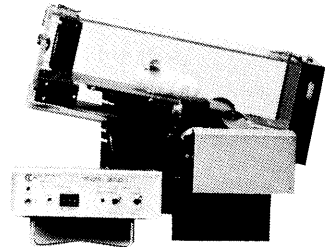
小～大動物の長期間のモニターが可能です。

- 酸素消費量
- CO<sub>2</sub>発生量
- 呼吸置換比
- コンピュータ制御
- トレッドミルとの併用可



### ラット・マウス用トレッドミル

- 1～4レーン
- ベルト速度可変
- 走行傾斜角度可変
- エアーバフ刺激可
- 電流刺激可
- 逃避センサー付き
- 代謝用チャナパー可
- コンピュータ制御も可



### 動物用呼気CO<sub>2</sub>モニター CAPSTAR-100

(小～中・大動物まで)

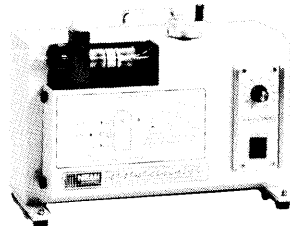
呼気CO<sub>2</sub>モニター CAPSTAR-100は、赤外線シングルビームにより正確且つ連続的にラットから各種動物の呼気ガスを応答性良く、最小限のサンプル量で、長期間安定してモニターします。



- 分析原理 赤外線シングルビーム
- 測定レンジ 0～100%
- 応答時間 (T<sub>10</sub> - T<sub>90</sub>) 130ms (50ml/min. Sample)  
(T<sub>10</sub> - T<sub>90</sub>) 150ms (10ml/min. Sample)
- 測定呼気流量 10～100ml/min.

### 動物用人工呼吸器

軽量設計された、苛酷な長期間の使用にも安心して使用出来るように設計されており、小動物から大動物まで全ての動物用に各種モデルを揃えています。



- Model: 131 シリンダー容量5ml 10ml (モルモット・ラット用)
- Model: 141 シリンダー容量10ml 30ml (ラット用)
- Model: 121 シリンダー容量30ml 70ml (ネコ・ウサギ用)
- Model: 101 シリンダー容量750ml (イヌ用)

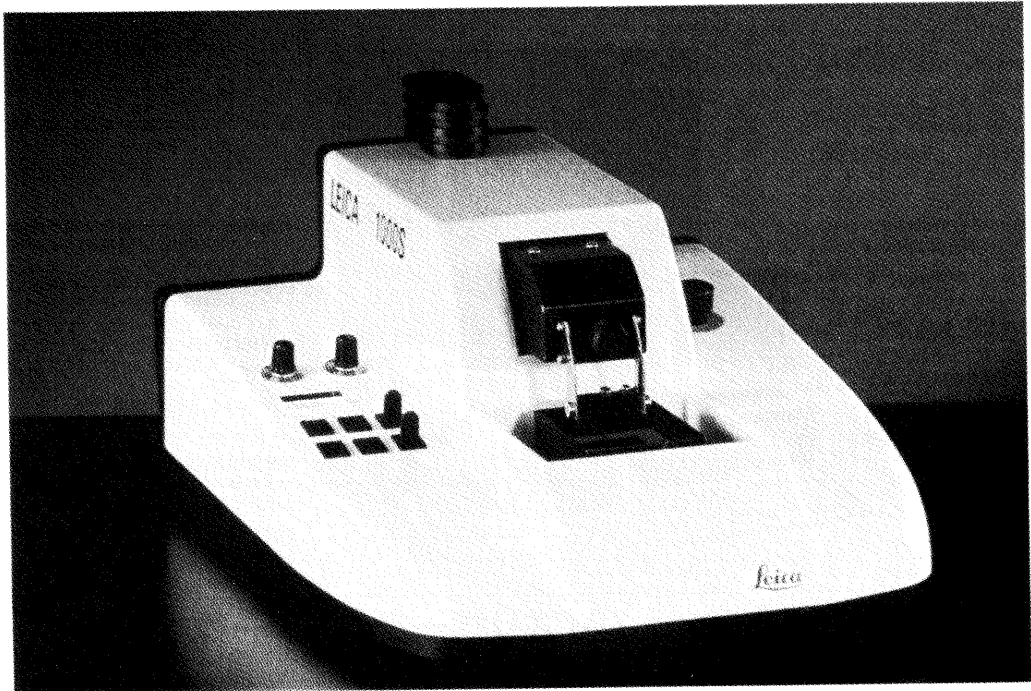
日本総代理店



バイオリサーチセンター株式会社

本社 名古屋市東区泉2-28-24(ヨコタビル4F) ☎052(932)6421 FAX052(932)6755  
東京 東京都千代田区岩本町2-10-1(オカジマビル) ☎03(3861)7021 FAX03(3861)7022

Leica



## 脳機能の解明に 最適な マイクローム

未固定、未凍結の組織から  
高品質な切片を作製

ライカVT1000S(EM)は、神経生理学、神経病理学、実験病理学等の分野で必要とされる極めてデリケートな切片作製のために開発された、新しい振動刃マイクロームです。

包埋や凍結などの試料の前処理を必要とせず、新鮮な組織から切片を作製できるため、パッチクランプやレシオ・イメージング法に最適です。また、神経病理の固定組織切片も高いクオリティーで作れます。

- ブレードの前進速度を直線的に連続調節
- 切片厚の合計表示
- 振幅は5段階調節
- 切削面積を自由に調節できる  
    カッティングウインドー
- プログラム式試料リトラクション
- 緊急停止ボタン
- 2重壁のバッファトレーで試料の  
    温度を一定に保持

ライカ振動刃マイクローム  
**VT1000S(EM)**

発売元

ライカ株式会社

本社 Tel.03-3292-9833 大阪支店 Tel.06-374-9771

名古屋営業所 Tel.052-222-3939 福岡営業所 Tel.092-731-9771

つくば出張所 Tel.0298-36-7875

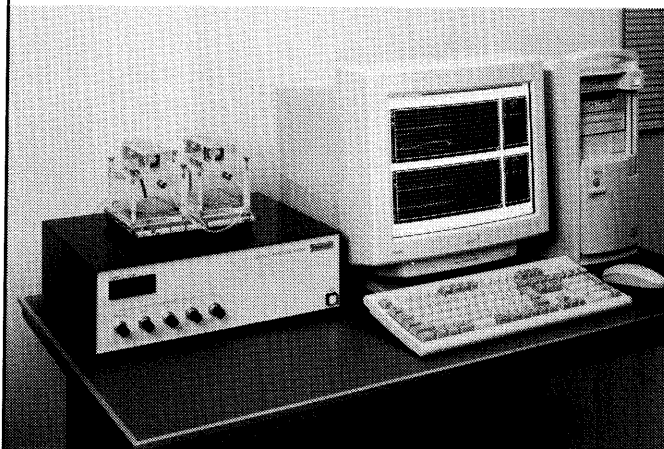
神経科学分野 総代理店

**ショーシンEM株式会社**

〒444-0241 愛知県岡崎市赤浜町蔵西1番地14(ショーシンビル)

TEL.0564-54-1231(代表) FAX.0564-54-3207

# 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**

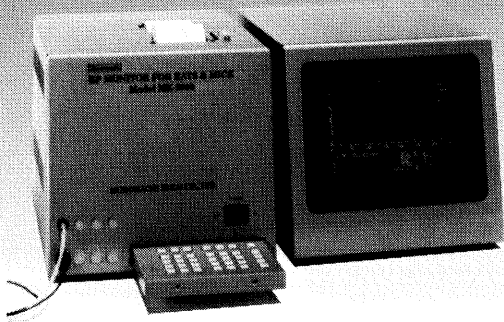
総発売元

**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>



## ラット・マウス用 無加温型非観血式血圧計 BP MONITOR FOR RATS & MICE Model MK-2000



ラットやマウス等の小動物の血圧を測定する場合、従来の非観血式血圧計では何らかの方法により動物を暖めておく必要があります。これに対しMK-2000は室温が23℃以上であれば自然の(無加温の)状態のまま測定を行うことができます。

薬物の影響を調べるのに最適な装置であり、尾動脈圧の経時変化をモニタすることもできるなど従来の非観血式血圧計の概念を覆す画期的な装置です。格納式のオペレーションキーボードは本体下部に配置されていてコンパクトに設計されています。

操作は至って簡単で、動物を測定台にセットした後はボタンを押すだけの全自動測定が行えます。

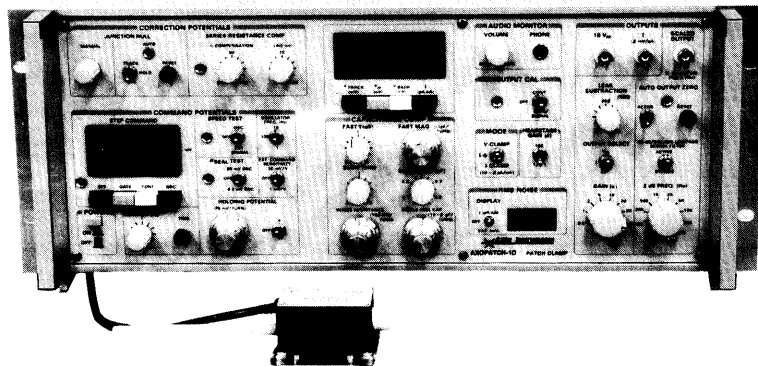
**Muromachi**

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>

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

**CV4 0.1/100** 大きなセル (200nA;>>100pF) のwhole-cellクランプとsingle-channel電流を記録するためのものです。50GΩと50MΩ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50GΩと50MΩ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 名古屋市中区葵一丁目25番1号  
TEL (052)937-7060(代) FAX (052)937-5423  
TLX 444-3603 WDMECJ  
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      アビタシオン千歳烏山102号  
TEL (03)5384-6387      FAX (03)5384-6487

東日本地区発売元

(Physio-Tech)

株式会社 フィジオテック

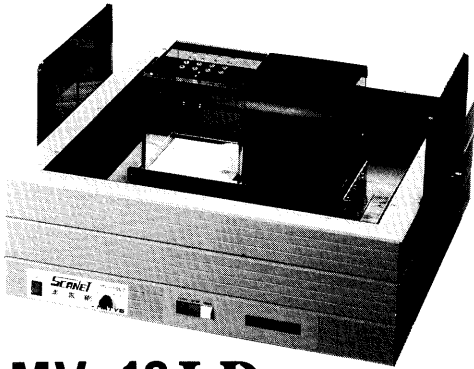
〒101-0047 東京都千代田区内神田2丁目6番11号  
若松ビル2F  
TEL (03)3258-1641

# 小動物行動測定の世界

# SCANETのTOYO

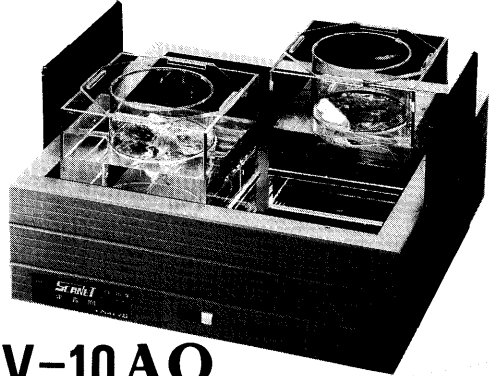
## 《スキャネットシリーズ》

●薬物依存測定



### MV-10LD

●抗うつスクリーニング測定



### MV-10AQ

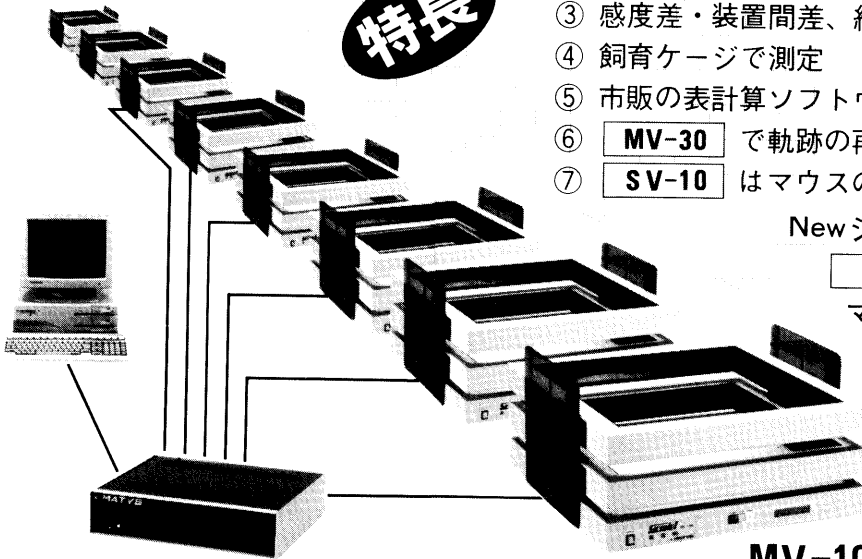
**特長**

- 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

OMEGA FLOW

# 非接触型レーザー血流計

## FLO-N1

組織血流量が測定部位に  
触れることなく測定できます。



承認番号：07日第0805号

接触型FLO-O1も用意しています。

製造元

オメガウェーブ

総発売元

株式会社  
**ニューロサイエンス**

### 【特徴】

- ★非接触 ●3cm程度離して測定可能
- ★広範囲 ●最大直径15mm程度円内のサンプルボリューム
- ★再現性 ●接触の影響が無く、広範囲に平均化された再現性を実現
- ★アーチファクト軽減回路 ●被測定部の微妙な動きによる影響を軽減
- ★豊富な出力 ●FLOW, MASS, VELOCITY, REFLEX
- ★接触用 ●接触用プローブも接続可能
- ★コンピュータ ●NEC製98NOTE又はデスクトップに接続(オプション)
- ★使い易さ ●標準プローブが小型、カイト光付き、専用固定器有り

### 【用途】

- ★脳 ●骨の上から測定ができます。  
●ロースヘンカル血栓作成時に光の干渉を受けずに測定できます。  
●深部の特定部位に小型センサーを埋め込んで、無麻酔下で測定が可能です。(接触型)
- ★神経、脊髄 ●接触すること自体問題が有る部位でも簡単に測定できます。
- ★目(兎、ラット) ●眼球の外から網膜の血流測定が可能です。
- ★皮膚 ●軟膏を塗る、薬液をたらす等の今まで困難であった処置ができます。  
●経日的変化の測定も可能です。
- ★消化器系臓器 ●粘膜に触ること無く測定ができます。  
●水面の上からでも測定が可能です。
- ★口腔内 ●圧迫の影響無く測定ができます。
- ★その他 ●筋肉、内耳、鼻腔内、骨(骨髄)等の測定が可能です。

本社 ■〒110-0016 東京都台東区台東2-29-12 サンクイホワイトビル4F  
TEL.(03)5688-1061 FAX.(03)5688-1065  
大阪支店 ■〒532-0011 大阪市淀川区西中島6-1-19  
TEL.(06)307-7311 FAX.(06)307-7727  
福岡支店 ■〒812-0016 福岡市博多区博多駅南4-3-9 アパルタメント86  
TEL.(092)414-0251 FAX.(092)414-0125

# 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

各種カプラ・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・カプラ群

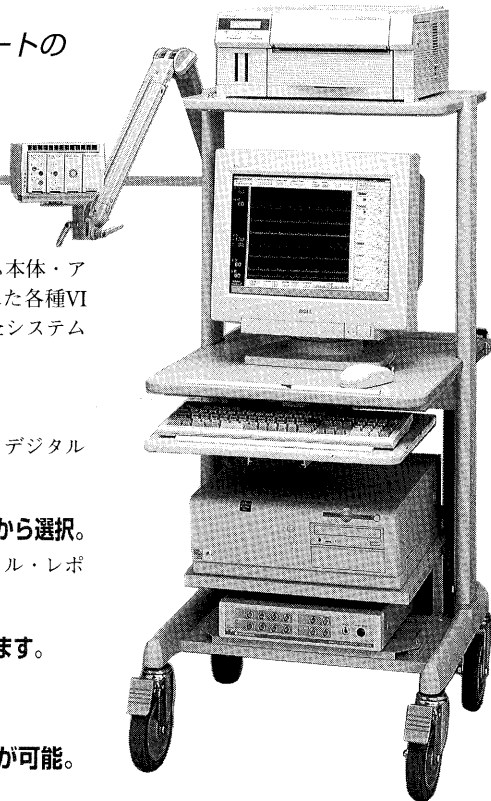
アイソレーション方式を採用し、電気的安全性が大幅に向上、デジタル化により外部雑音除去能力も向上。

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。

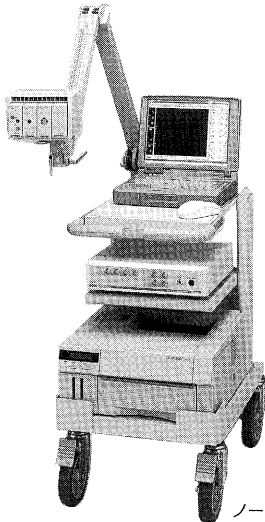
アンプはソフトウェアで管理、長期間安心してご使用いただけます。

16チャンネルまでの信号の同時計測・処理が可能。

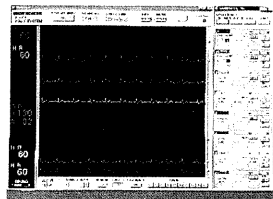
ポリグラフ等、既存装置からのアナログ信号の取り込みが可能。



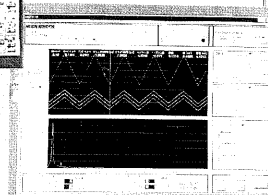
デスクトップ型パソコン構成



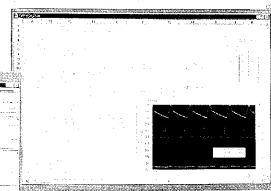
ノート型パソコン構成



POLY計測画面



VC計測画面



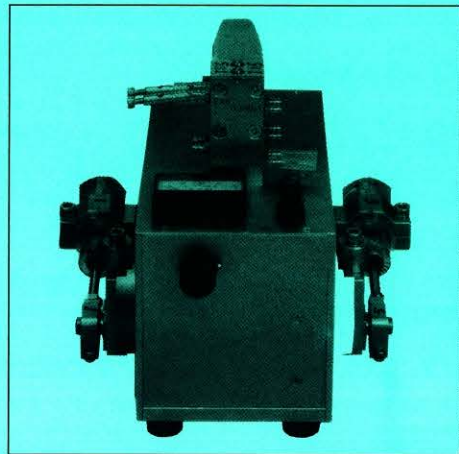
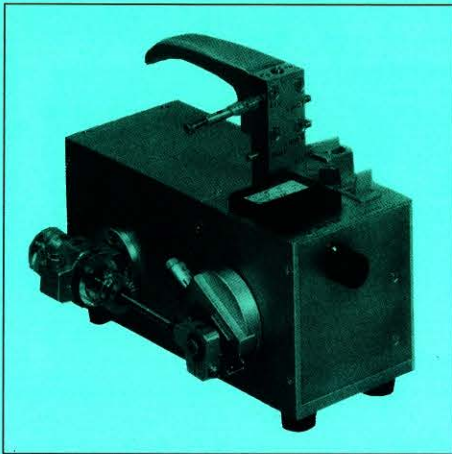
エクセル画面

**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三〇一〇  
布施ビル(四階)  
日本生理学会

印刷所

印刷者  
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  
東京都文京区本郷三丁目三〇一〇  
布施ビル(四階)

定価  
振替  
A X 電話  
〇〇三三  
〇〇三三  
〇〇三三  
三三八一  
〇〇五五  
一六一六  
二〇三三  
円