

日本

# 生理学

雑誌

JOURNAL OF THE PHYSIOLOGICAL SOCIETY OF JAPAN

56巻 11号 1994

*INFORMATION* 351

*CALENDAR* 359

*RECORDS* 360

*PROFILE* 361

生理学実験技術法講座

シリーズ「パッチクランプ実験技術法講座」

丸山芳夫：膜容量測定法…………… 363

実験法

鬼丸 洋：新生ラット摘出脳幹—脊髓標本におけるパッチクランプ法の適用…………… 369

学会抄録

第74回北海道医学大会生理系分科会…………… 381

日本生理誌  
J. Physiol. Soc. Japan

日本生理学会

シングルチャネル・データ  
解析用ソフト MAC-TAC、  
遂に登場!



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

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

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

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

ヘカ社日本総代理店  
EPC-9 西日本総発売元

 ショーシンEM株式会社

〒444-02 愛知県岡崎市赤渋町蔵西1-14  
ショーシンビル2F

TEL. 0564-54-1231  
FAX. 0564-54-3207

EPC-9 東日本総発売元

*(Physio-Tech)*

株式会社 **フィジオテック**

〒101 東京都千代田区内神田3-10-3  
コイダビル4F

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

# 目 次

## **INFORMATION**

ソルト・サイエンス研究財団による1995年度研究助成	351
〔研究員公募〕 理研フォトダイナミクス研究センター(仙台市青葉区)	351
C型肝炎シンポジウム ー基礎研究と臨床の最先端ー	351
第101回日本医学会シンポジウム シナプスの可塑性と高次脳機能	352
第5回日本病態生理学会総会	353
Molecular Approaches to Laboratory Diagnosis	353
第24回日本医学会総会 1995 名古屋	356
日本学術会議だより 第34号 第16期最初の総会開催される	357

## **CALENDAR**

主な学会開催日程	359
----------	-----

## **RECORDS**

会員消息	360
------	-----

## **PROFILE**

「生理学者群像」(山田好秋)	361
----------------	-----

## **生理学実験技術法講座**

シリーズ「パッチクランプ実験技術法講座」

丸山芳夫：膜容量測定法	363
-------------	-----

## **実験法**

鬼丸 洋：新生ラット摘出脳幹ー脊髓標本におけるパッチクランプ法の適用	369
------------------------------------	-----

## **学会抄録**

第74回北海道医学大会生理系分科会	381
-------------------	-----

## INFORMATION

### ソルト・サイエンス研究財団による1995年度研究助成

助成の対象：海水濃縮技術，食塩結晶の製造および加工技術，海水資源の利用および環境問題，食塩やミネラルの生理作用，および食品における塩の用法や役割などに関連する研究を助成する。とくに若手研究者の積極的な応募を期待する。

助成件数：50件程度

助成金額：1件当たり50～300万円以下

応募の方法：当財団の応募要領による。

申請書類用紙を電話・FAX・郵便で当財団に請求して下さい。

申込期間：1994年11月1日～1995年1月15日  
(申請書類必着)

申込先：〒106 東京都港区六本木7-15-14  
塩業ビル 3階

(財)ソルト・サイエンス研究財団

TEL 03-3497-5711

FAX 03-3497-5712

### 〔研究員公募〕 理研フォトダイナミクス研究センター (仙台市青葉区)

公募人員：フロンティア研究員 若干名

所属：光・生物チーム

専門分野：細胞生物学，生体物質化学の研究に実績があり，レーザーを利用した新しい観測手法の利用に意欲をもつ研究者。細胞培養に経験があればさらに望ましい。

着任時期：1995年4月1日

任期：パーマメントではありません。

応募資格：修士終了者以上 (33才以下)

提出書類：①履歴書②業績リスト③主要論文の別刷

④今後の研究への抱負⑤推薦書(できれば)

公募締切：1995年1月15日(日)

書類送付および問い合わせ先：

〒980 仙台市青葉区長町字越路19-1399

理化学研究所

フォトダイナミクス研究センター

光生物研究チーム 田代英夫

Tel : 022-228-2046/2050

Fax : 022-228-2045

### C型肝炎シンポジウム ー基礎研究と臨床の最先端ー

日時：平成6年12月8日(木)午前10時～午後5時

平成6年12月9日(金)午前9時30分～午後5時

会場：アルカディア市ヶ谷(私学会館)

千代田区九段北4-2-25

最寄駅：JR総武線，営団地下鉄有楽町線，都営地下鉄新宿線，市ヶ谷駅下車 徒歩2分

主催者：東京都・(財)東京都神経科学総合研究所・  
(財)東京都臨床医学総合研究所

演者：8日(第1日目)

特別講演(同時通訳付)

Charles M. Rice (Washington Univ.)

Jin Hee Han (Chiron Corp.)

未定 (NIH)

下遠野邦忠(国立がんセンター)

宮村達男(国立予防衛生研究所)

吉倉廣(東京大学医学部)

岡山博人(東京大学医学部)

9日(第2日目)

保井孝太郎(東京都神経科学総合研究所)

小原道法(東京都臨床医学総合研究所)

溝上雅史(名古屋市立大学医学部)

高橋秀実(日本医科大学)

井廻道夫(自治医科大学)

清澤研道(信州大学医学部)

飯野 四郎 (聖マリアンナ医科大学)  
田中 慧 (東京都立駒込病院)

参加費：無料

参加申込方法：ハガキにて、氏名・所属名・連絡先(電話)を明記の上、下記の宛先へ11月12日までにお申込みください。

宛先：〒183 東京都府中市武蔵台2-6

(財)東京都神経科学総合研究所 管理部調査課

問合先：(財)東京都神経科学総合研究所 管理部調査課

TEL 0423-25-3881 内線 4104

(財)東京都臨床医学総合研究所 管理部調査課

TEL 03-3823-2102 内線 5127

## 第101回日本医学会シンポジウム シナプスの可塑性と高次脳機能

日時：平成6年12月15日(木) 10:00~17:15

場所：日本医師会館 大講堂

〒113 東京都文京区本駒込2-28-16

TEL 03-3946-2121

### I. 脳の発達とシナプス可塑性

(座長) 津本忠治 (阪大・バイオメディカル教育  
研究センター)

序論 津本忠治 (阪大・バイオメディカル教育  
研究センター)

#### 1. 大脳皮質層形成の分子機構

小川正晴 (高知医大・生理学)

#### 2. 視覚野の層構造の形成機序

外山敬介 (京都市立医大・生理学)

#### 3. 大脳皮質コラムと可塑性シナプス

津本忠治 (阪大・バイオメディカル教育  
研究センター・高次神経医学)

討論

### II. 記憶・学習とシナプスの可塑性

(座長) 黒田洋一郎 (都神経科学総合研)

序論 黒田洋一郎 (都神経科学総合研)

#### 4. 海馬シナプスの長期増強およびその消去のメカニズム

加藤宏司 (山形大・生理学)

#### 5. 小脳長期抑圧の生理学的意義とその分子メカニズム

渋谷克栄 (新潟大脳研・神経生理学)

#### 6. ニューロン回路網の可塑性とシナプス結合の形態変化

黒田洋一郎 (都神経科学総合研・神経生化学)

討論

### III. 高次脳機能の最近の進歩

(座長) 酒田英夫 (日大・生理学)

序論 酒田英夫 (日大・生理学)

#### 7. 大脳連合野における視覚認知の機能分化

酒田英夫 (日大・生理学)

#### 8. 視覚連合野における知覚と記憶の統合メカニズム

酒井邦嘉 (東大・生理学)

宮下保司 (東大・生理学)

#### 9. 海馬体における空間記憶のニューロン機構

小野武年 (富山医大・生理学)

討論

総合討論

(司会) 津本忠治 (阪大・バイオメディカル教育  
研究センター)

黒田洋一郎 (都神経科学総合研)

酒田英夫 (日大・生理学)

### 第101回日本医学会シンポジウム組織委員

津本忠治 黒田洋一郎 酒田英夫

○参加費不要

○出席者は討論に参加できます。

○参加ご希望の方はハガキに右記要領で日本医学会までお申し込み下さい。

なお、ハガキの下から5cm幅に記入の住所・氏名は、入場券送付時に使用しますので、正確にお書き下さい。

○日本医学会

〒113 東京都文京区本駒込2-28-16

日本医師会館内 電話 03-3946-2121

第101回日本医学会シンポジウム 参加希望	
(所属・勤務先)	
(氏名)	
〒□□□-□□	5 cm 様
(住所)	
(氏名)	

## 第5回 日本病態生理学会総会

会 期：平成7年1月21日(土)・22日(日)

会 場：愛知医科大学

愛知県愛知郡長久手町

会長講演

「発汗活動の生理的・病的変動とその解析」

小川 徳 雄(愛知医大 第2生理)

シンポジウム

1. 「中枢性肺水腫の病態生理」

司会 野口 宏(愛知医大 麻酔・救急医学)

2. 「血球の分化・増殖とその病態」

司会 梶江 勇(愛知医大 第1生理)

3. 「病態痛と交感神経」

司会 熊澤孝朗(名大環研 神経性調節)

4. 「各種疾患における生理活性ペプチドの病態生理学的意義」

司会 満間照典(愛知医大 第4内科)

5. 「Microneurographyによる病態生理学的研究」

司会 間野忠明(名大環研 自律神経・行動科学)

一般演題

多数の演題の応募をお待ちしています。

発表は、共同演者も含め本学会員に限ります。

未入会の方は、直接学会事務局へ入会手続きをお願いします。

発表申込締切日：平成6年10月31日(月)

参加費：¥2,000 懇親会費：¥4,000

入会申込先

〒761-07 香川県木田郡三木町池戸1750-1

香川医科大学 第二生理学教室内

日本病態生理学会事務局

TEL 0878-98-5111(ex.2432)

FAX 0878-98-8346

発表申込および問い合わせ先

〒480-11 愛知県愛知郡長久手町

愛知医科大学 生理学第2講座内

第5回日本病態生理学会総会事務局

TEL 0561-62-3311(ex.2212)

FAX 0561-63-9809



The International Association of Biological Standardization (IABS)

and



The UCSF Department of Laboratory Medicine

PRESENT

# MOLECULAR APPROACHES TO LABORATORY DIAGNOSIS

FEBRUARY 18-21, 1995

RITZ-CARLTON HOTEL  
SAN FRANCISCO, CALIFORNIA

Scientific Organizing Committee

University of California School of Medicine, San Francisco (UCSF)

J. Michael Bishop, M.D.

Donald E. Ganem, M.D.

Yuet W. Kan, M.D. (Co-Chair)

Grish N. Vyas, Ph.D. (Co-Chair)

Farid F. Chehab, Ph.D.

Joe W. Gray, Ph.D.

Daniel P. Stites, M.D.

Fred Brown, D.Sc. (IABS)

# SCIENTIFIC PROGRAM

---

## SATURDAY, FEBRUARY 18, 1995

1:00- Registration  
5:00 p.m.

### Session 1

*Moderators: Girish N. Vyas, Ph.D., and Florian Horaud, M.D.*

5:00 p.m. Inaugural Ceremony  
5:30 Keynote Address  
*William J. Rutter, Ph.D.*  
6:30 Presidential Reception

---

## SUNDAY, FEBRUARY 19, 1995

### Session 2

*Moderator: Clifford A. Lowell, M.D., Ph.D.*

7:30 Continental Breakfast  
and Setup of Posters  
8:00 Poster Presentations  
Personal Discussions with  
Presenters (Posters Remain  
Displayed throughout the Day)

### Session 3: Genetic Disorders

*Moderators: Yuet W. Kan, M.D., and Fred Brown, D.Sc.*

9:00 Gene Map of Man as it Relates to  
Disease  
*C. Thomas Caskey, M.D.*  
9:45 Discussion  
10:00 Molecular Diagnostics in the  
Clinical Laboratory  
*Farid F. Chehab, Ph.D.*  
10:30 Discussion  
10:40 Coffee Break  
11:00 Oral Presentation and Discussion  
of Selected Abstracts  
12:30 Lunch Break

### Session 4: Immunologic Disorders

*Moderators: Daniel P. Stites, M.D., and Arnold B. Gelb, M.D.*

2:00 Molecular Diagnosis of  
Immunodeficiencies  
*Melissa E. Elder, M.D., Ph.D.*  
2:45 Discussion  
3:00 New Approaches to Monitor  
the Natural History of HIV  
Infection and the Efficacy of  
Antiviral Therapeutics  
*Mark B. Fineberg, M.D., Ph.D.*  
3:30 Discussion  
3:40 Coffee Break  
4:00 Oral Presentation and Discussion  
of Selected Abstracts  
5:30 Free Evening

---

## MONDAY, FEBRUARY 20, 1995

### Session 5

*Moderator: Lynn D. Pulliam, Ph.D.*

7:30 a.m. Continental Breakfast  
and Setup of Posters  
8:00 Poster Presentations  
Personal Discussions with  
Presenters (Posters Remain  
Displayed throughout the Day)

### Session 6: Cancer/Oncogenes

*Moderators: Joe W. Gray, Ph.D., and Stephen L. Jeffcoate, M.D., Ph.D.*

9:00 TBA  
*Michelle M. LeBeau, Ph.D.*  
9:45 Discussion  
10:00 Molecular Cytogenetic Diagnosis  
of Solid Tumors  
*Frederic M. Waldman, M.D., Ph.D.*

- 10:30 Discussion  
 10:40 *Coffee Break*  
 11:00 **Oral Presentation and Discussion  
 of Selected Abstracts**  
 12:30 *Lunch Break*

### Session 7: Microbial Infections

*Moderators: John J. Sninsky, Ph.D., and  
 Ian D. Gust, M.D., Ph.D.*

- 2:00 **Molecular Diagnosis of  
 Microbial Infections**  
*Hubert E. Blum, M.D.*
- 2:45 Discussion
- 3:00 **Molecular Diagnosis of  
 Retroviral Infections**  
*Helen H. Lee, Ph.D.*
- 3:30 Discussion
- 3:40 *Coffee Break*
- 4:00-  
 5:30 **Oral Presentation and Discussion  
 of Selected Abstracts**
- 6:30 Symposium Banquet  
*Special Address by  
 John C. Petricciani, M.D.*  
**Standardization in Molecular  
 Diagnostics**
- 9:00 *Good Night*

---

## TUESDAY, FEBRUARY 21, 1995

### Session 8

*Moderator: Robert S. Goldsmith, M.D., M.P.H.*

- 7:30 a.m. *Continental Breakfast  
 and Setup of Posters*
- 8:00 **Poster Presentations**  
 Personal Discussions with  
 Presentors  
 (Posters Remain Displayed  
 throughout the Day)

## SIMULTANEOUS SESSIONS

### Session 9: Parasitic Infections

*Moderators: Donald E. Ganem, M.D., and  
 David A. Espeseth, D.V.M., M.S.*

- 9:00 **Molecular Approaches  
 to Parasitic Infections**  
*James H. McKerrow, M.D., Ph.D.*
- 9:45 Discussion
- 10:00 **Buffalo, Babesia, and Sick Soldiers:  
 Identification of a Newly  
 Recognized Zoonotic Protozoan**  
*David H. Persing, M.D., Ph.D.*
- 10:30 Discussion
- 10:40 *Coffee Break*
- 11:00 **Oral Presentation and Discussion  
 of Selected Abstracts**

### Session 10: Forensic Science

*Moderator: Boyd G. Stephens, M.D.*

- 9:00 **Applications of Molecular Biology  
 to Analyses of Forensic Evidence**  
*Catherine T. Comey, Ph.D.*
- 9:45 Discussion
- 10:00 **New Developments in DNA  
 Technology**  
*Victor W. Weedn, M.D., J.D.*
- 10:30 Discussion
- 10:40 *Coffee Break*
- 11:00 **Oral Presentation and Discussion  
 of Selected Abstracts**
- 12:00 *Symposium Adjourns*



第24回 日本医学総会 1995 名古屋

# 名古屋総会広報

# No.4

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

## プレシポジウム盛大に開催される

第24回日本医学総会開催の期待がかかる中『文明の進歩と病気の変遷…病気と医学の闘いに終焉はあるのか…』と題するプレシポジウムが、7月名古屋で開催された。

飯島宗一総会会頭の司会で、多田富雄東京大名誉教授、中村雄二郎明治大教授、高久史麿国立国際医療センター総長が、古代から最先端医療まで、それぞれの視点から人類と病気のかかわりを検証した。

遺伝子治療や生物学の進歩は、医療の概念を大きく変えつつあり、ここにきて改めて『人間の存在とは何か?』『何を満たすのが医学の使命か?』を、医学界だけでなく社会やその制度など、人間の根幹にも関わる

会期 1995年 4月 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

開会式 閉会式

学術講演 総合医学展示

問題を、来年の医学総会を契機にすべての人が積極的に取り組むべき考え方の本質を各シンポジストが示唆した。

最後に飯島会頭は、日本では社会的に広がった問題に個々の意見、主張があまりにも少ないと指摘、主体的意見を持つことの必要性を訴え、そのヒントが今日のシンポジウムで提出されたと総括した。

なお、プレシポジウムII「長寿社会への船出—新しい高齢者像を求めて」が来る10月1日(土)名古屋・テレビアホールで開催される予定。

## ◆総合医学展示のご案内

「見て、触れて、体験する総合医学展示」

<b>ポートメッセなごや</b>			<b>松坂屋本店</b>	
<b>先端技術展示</b> ・バーチャルリアリティーと医学 ・マイクロマシンの医療応用 ・宇宙空間における医学実験 ・人工臓器の近未来像	<b>健康環境展示</b> ・長寿をささえる健康環境 ・ホスピタルアメニティ ・救急医療 ・ゼロ距離社会と医療	<b>医学史展示</b> ・東海の医学史 ・医療記録 ・WHO	<b>市民向け展示</b> ・明日の保険と医療 ・市民公開連続講座	
<b>医療機器展示</b> ・健康と医療をささえるテクノロジー	<b>生涯教育展示</b> ・目でみる日常診療の進歩	<b>医薬品展示</b> ・高齢者の医療をささえる薬	<b>名古屋国際会議場</b> <b>医学書展示</b> ・見て、触れて、体験するニューメディア	

## 登録のご案内

登録に関するお問い合わせは **052-735-4333**

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

## 名古屋観光案内



### 名古屋水族館 (展示会場ポートメッセなごやよりタクシーで約10分～15分)

□展示テーマは“南極への旅”。生命の源である海と人間との関わりを振り返り、日本の海から深海、赤道、オーストラリア、そして南極へとめぐり、そこにそびえる生命の偉大さ、すばらしさに感動すると共すむ生物の生活ぶりを自然に近い姿で再現している。に、その環境破壊の危機も提言している。必見。

○地下鉄名城線「名古屋港」駅下車(1番出口)徒歩7分。開館時間:9時30分。4月1日～7月20日及び9月1日～11月30日は17時30分まで。7月21日～8月31日は20時まで。12月1日～3月31日は17時まで。休館日:毎週月曜日(休日の場合は翌日)及び12月29日～1月1日。入館は開館の30分前まで。入場料:大人1500円、小中高生700円。名古屋港区港町1番3号 ☎052-654-7080

お問い合わせ

第24回 日本医学総会総会事務局 TEL 052-732-6622 FAX 052-732-0036

〒466 名古屋市昭和区鶴舞町65 名古屋大学医学部附属病院共済会館内

日本学術会議だより 第34号  
第16期最初の総会開催される

平成6年8月 日本学術会議広報委員会

日本学術会議の第16期が平成6年7月22日(金)からスタートし、7月25日から7月27日までの3日間、第119回総会が開催されました。今回の日本学術会議だよりでは、総会の概要等についてお知らせします。

**日本学術会議第119回総会報告**

平成6年7月22日から、第16期が開始されましたが、この第16期会員による最初の総会である日本学術会議第119回総会が、7月25日から27日までの3日間にわたって開催されました。

初日(25日)の午前は、辞令交付式が、総理大臣官邸ホールで行われ、210名の会員のうち海外出張中等の22名を除く188名の会員が出席しました。式は、村山内閣総理大臣、五十嵐内閣官房長官、石原官房副長官、文田総理府次長等の出席を得て行われ、第1部から第7部までの全会員の名前が読み上げられた後、会員を代表して最年長である中田易直第1部会員が、村山内閣総理大臣から辞令を受け取りました。この後、村山内閣総理大臣が「会員の皆様には独創性豊かな学術研究の発展等のため、総合的観点に立って学術研究に係わる諸問題の解決に御尽力いただきたい」とあいさつし、これに応じて、中田易直第1部会員が「微力ながら全力を尽くし、重要な職責を全うし、国民の期待に応えたい」とあいさつしました。午後は、日本学術会議講堂において、総会が開催され、会長、副会長(2名)の互選が行われました。その結果、会長には、伊藤正男第7部会員が、人文科学部門の副会長には、利谷信義第2部会員が、自然科学部門の副会長には、西島安則第4部会員が、それぞれ選出され、伊藤会長及び利谷副会長(西島副会長は海外出張中)がそれぞれ就任のあいさつを行いました。続いて、各部会が開かれ、各部の部長副部長、及び幹事の選出等が行われました。(第16期の役員については、別掲を参照)

2日目(26日)は、午前10時から総会が開催され、近藤前会長が海外出張中のため代理として川田前副会長が第15期の総括的な活動報告を行い、続いて、会員推薦管理会報告として、久保亮五委員長の代理として高岡事務総長が、第16期会員の推薦を決定するまでの経過報告を行いました。引き続き、事務総長から第16期会員に対して実施した「第16期の日本学術会議が取

り組むべき課題について」のアンケートの結果について説明がありました。総会終了後は、各運営審議会附置委員会、各部会、各常置委員会等が開催されました。また、夕方には、総理大臣官邸ホールにおいて、村山内閣総理大臣主催の日本学術会議第16期会員との懇談会が初めて開催されました。懇談会は、村山内閣総理大臣のあいさつで開会し、五十嵐内閣官房長官の発声による乾杯、伊藤会長の答礼のあいさつの後、懇談に入りました。来賓として、与謝野文部大臣、田中科学技術庁長官、吉田農林水産政務次官、藤田日本学士院院長ほか大勢の方が出席され、あふれんばかりの人々で歓談が続き盛会となりました。

3日目(27日)は、午前10時から総会が開会され、会長から「第16期活動計画の作成について」の申合せ案について提案があり、原案どおり可決されました。続いて、第16期の活動計画についての自由討議が行われ、各部長から各部会での意見が披露されるなど活発な発言がありました。総会終了後は、地区会議合同会議、各運営審議会附置委員会、各常置委員会等が行われました。その後、運営審議会が開催され、第16期の活動計画の素案作成のために、運営審議会構成員の中から起草委員を選出し、審議に入りました。

**第16期日本学術会議役員**

会 長	伊 藤 正 男 (第7部・生理科学)
	理化学研究所国際フロンティア
	研究システム長
副会長	利 谷 信 義 (第2部・基礎法学)
	お茶の水女子大学 (生活科学) 教授
副会長	西 島 安 則 (第4部・化学)
	日本ユネスコ国内委員会会長
〔各部役員〕	
第1部 部 長	中 田 易 直 (歴史学)
副部長	戸 川 芳 郎 (哲学)
幹 事	堀 尾 輝 久 (教育学)
幹 事	森 岡 清 美 (社会学)

第2部	部長	中山和久 (社会法学)
	副部長	山口 定 (政治学)
	幹事	兼子 仁 (公法学)
	幹事	山中永之佑 (基礎法学)
第3部	部長	柏崎利之輔 (経済政策)
	副部長	岡本康雄 (経営学)
	幹事	河野博忠 (経済政策)
	幹事	二神恭一 (経営学)
第4部	部長	伊達宗行 (物理科学)
	副部長	竹内郁夫 (生物科学)
	幹事	井口洋夫 (化学)
	幹事	新藤静夫 (地質科学)
第5部	部長	内田盛也 (応用化学)
	副部長	大橋秀雄 (機械工学)
	幹事	増子 昇 (金属工学)
	幹事	松尾 稔 (土木工学)
第6部	部長	志村博康 (農業工学)
	副部長	北村貞太郎 (農業工学)
	幹事	島田淳子 (家政学)
	幹事	平田 熙 (農芸化学)
第7部	部長	渥美和彦 (内科系科学)
	副部長	金岡祐一 (薬科学)
	幹事	入江 實 (内科系科学)
	幹事	細田泰弘 (病理科学)

## 〔常置委員会〕

第1常置	委員長	利谷信義 (第2部)
第2常置	委員長	中塚 明 (第1部)
第3常置	委員長	村上英治 (第1部)
第4常置	委員長	増本 健 (第5部)
第5常置	委員長	山中永之佑 (第2部)
第6常置	委員長	鹿取廣人 (第1部)
第7常置	委員長	井口洋夫 (第4部)

(注) カッコ内は、所属部・専門

## 第16期日本学術会議会員の概要について

この度任命された210人の第16期日本学術会議会員の概要を以下に紹介します。(カッコ内は第15期)

1 性別 男性209人 女性 1人

2 年齢別	45～49歳	1人	50～54歳	3人
	55～59歳	26人	60～64歳	93人
	65～69歳	72人	70～74歳	12人
	75～79歳	1人		

最年長 75 歳 (74 歳)

最年少 47 歳 (54 歳)

平均年齢 63.6歳 (63.3歳)

## 3 勤務機関及び職名別

(1) 大学関係	国立大学	59人
	公立大学	2人
	私立大学	111人
	公私立短期大学	2人
	計	174人
(2) 国立私立試験研究機関・病院等		9人
(3) その他	法人・団体関係	5人
	民間会社	6人
	無職	14人
	その他	2人
	計	27人

## 4 その他の分類

(1) 前・元・新別	前会員	82人
	元会員	3人
	新会員	125人

## (2) 地域別 (居住地)

北海道	3人( 5人)
東 北	9人( 8人)
関 東	136人(133人)
中 部	14人( 19人)
近 畿	41人( 34人)
中国・四国	3人( 5人)
九州・沖縄	4人( 6人)

(注) 詳細については、日本学術会議月報7月号を参照

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

〒106 東京都港区六本木7-22-34

日本学術会議広報委員会

電話 03(3403)6291

## CALENDAR

### 主 な 学 会 開 催 日 程

開 催 日 (演題締切)	名 称	会 場	連 絡 先
94.11.29-12. 1	第 9 回生体・生理工学シンポジウム	つくば：工業技術院共用講堂	計測自動制御学会 ☎03-3814-4121
94.11.29-12. 1	第24回日本免疫学会学術集会	京都：国立京都国際会館	京大理学部 動物学 ☎075-751-2111 村松 繁
94.12. 3	第21回日本神経内分泌分科会	北九州：産業医大ラマツイーニホール	産業医大 第一生理 ☎093-691-7420 山下 博
94.12. 6- 8	第18回日本神経科学大会	池袋：サンシャインシティ	日大医学部 第一生理 ☎03-3972-8111(2231) 泰羅
94.12. 8- 9	C型肝炎シンポジウム —基礎研究と臨床の最先端—	東京：アルカディア市ヶ谷	東京都神経研 管理部調査課 ☎0423-25-3881(4104)
94.12.13-16	第17回日本分子生物学会年会	神戸：ポートアイランド国際会議場	学会事務センター 大阪事務局 ☎06-873-2301 石濱明(国立遺伝研)
94.12.16-18	第37回日本腎臓学会総会	千葉：日本コンベンションセンター(幕張メッセ)	筑波大 泌尿器科 ☎0298-53-3202 江藤胤尚
94.12.15	第101回日本医学会シンポジウム シナプスの可塑性と高次脳機能	東京：日本医師会	日本医学会 ☎03-3946-2121
95. 1.21-22 (94.10.31)	第 5 回日本病態生理学会総会	愛知県：愛知医科大学	愛知医大 第二生理 ☎0561-62-3311(2212)
95. 2. 4 (94.10.15)	第24回日本心脈管作動物質学会	京都：国立京都国際会館	京都府立医大 第二内科 ☎075-251-5511 澤田昌平
95. 3.27-28	第 2 回日英合同生理学会 岡崎シンポジウム	岡崎：生理学研究所	北大 菅野 ☎011-716-2111 生理研 山岸 ☎0564-55-7831
95. 3.30-31	第72回日本生理学会大会	名古屋：名大 東山キャンパス	名大 富田・曾我部・渡邊・熊澤 ☎052-782-8246
95. 4. 1- 2	第2回日英合同生理学会 名古屋シンポジウム	名古屋：名大	名大 富田・曾我部 ☎052-741-2111 名大渡邊・熊澤 ☎052-781-5111
95. 4. 7- 9	第24回日本医学会総会	名古屋	第24回日本医学会総会事務局 ☎052-732-6622 名大 共済会館内

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

## RECORDS

### 会 員 消 息

#### <新 入 会 員>

氏 名	勤 務 先 (電 話)	〒	自 宅 住 所	専 門 分 野
山 神 眞 一	香川大学 教育学部 0878-36-1713	760	香川県高松市昭和町1-13-25-105	細胞・分子
太 田 千 穂	中村学園大学 家政学部 食物栄養学科 092-851-2531	814-01	福岡県福岡市城南区茶山6-7-7-203	
池 田 宏 明	富山医科薬科大学 医学部 第二生理 0764-34-2281	930	富山県富山市寺町1区65 フォーラム山ビル5B	
中 田 恭 史	富山化学工業㈱ 0764-32-3136	939	富山県富山市赤田740-1 プラム・ビレッジA203	
三 鍋 恭 子	富山医科薬科大学 医学部 第二生理 0764-34-2281	939	富山県富山市西田地方町2-5-5	
石 山 正 弘	京都工芸繊維大学 応用生物学科 075-724-7783	606	京都府京都市左京区岩倉三宅町3-9	
真 継 航	京都工芸繊維大学 応用生物学科 075-724-7783	604	京都府京都市中京区壬生森前町19-22	
林 世 華	京都工芸繊維大学 応用生物学科 075-724-7783	600	京都府京都市下京区西七条名倉町21-19	

#### <転 勤 ・ 異 動>

氏 名	勤 務 先 名	勤務先 T E L
伊 藤 漸	群馬大学生体調節研究所	0272-20-8850
稲 澤 健 志	東京大学医学部附属病院分院	
大 築 立 志	東京大学大学院総合文化研究科	03-5454-6867 内6133
奥 埜 良 信	大阪教育大学Ⅱ部生物	06-775-6614
北 澤 茂	電子技術総合研究所脳機能研究室	0298-58-5176
北 畠 義 典	(財)明治生命厚生事業団体力医学研究所	0426-91-1163
清 野 茂 博	鳴門教育大学副学長	0886-87-1311
倉 沢 郁 文	松本歯科大学第二補綴	0263-52-3100
佐 川 節 子	大阪大学医学部保健学科	06-855-1281
沢 井 元	岡山県立大学保健福祉学部	08669-4-2111 内6505
白 崎 哲 哉	九州大学医学部第二生理	092-641-1151 内3336
土 屋 徹	(株)資生堂ライフサイエンス研究所	045-788-7291
長 濱 辰 文	神戸大学理学部生物学科	078-803-0528
長谷川 晴 彦	中島医院	025-222-8393
花 田 百 造	山形少年鑑別所	0236-42-3444
藤 野 一 郎	杏林大学医学部第二生理	0422-47-5511 内3444
松 永 浩	福岡白十字病院	092-891-2511
山 田 武 範	東京理科大学理学部物理学科	03-3260-4271 内2415
岩 元 純	旭川医科大学第一生理	0166-65-2111

## <物 故 者>

氏 名	勤 務 先 名	会費94年度
安 尾 義 人	慈恵曾根病院	H 6 . 4 . 19逝去
伊 藤 秀三郎		H 5 . 12.14逝去
高 橋 誠		H 6 . 7 . 16逝去
渡 部 英 史	日本大学医学部第二生理	H 6 . 4 . 7 逝去
小 林 龍 男	千葉大学 名誉教授	H 6 . 8 . 14逝去

## PROFILE

### 「生理学者群像」

## 山 田 好 秋 君

新潟大学歯学部教授

(口腔生理学講座)

平成5年8月16日就任



#### ① 現在の研究内容

運動の制御機構に興味を持ち、咀嚼運動と顎反射をヒトならびに動物を対象に研究してきた。咀嚼時の顎反射変調様式を観察する過程で、急性実験に限界を感じ慢性実験に移行した。そして、自由に行動している動物の咀嚼運動を記録する必要から、小型動物の体内に埋め込んで使用できる運動軌跡記録装置を開発した。現在、このシステムを使用して自然咀嚼時の顎反射の変調および嚥下によるリズムの修飾を観察し、随意運動に反射がどのように関わっているか研究している。

#### ② 将来の研究活動の抱負

生物の特性をモデル化するシステムを工学的に組み上げ、その組み上げられたシステムの挙動を観察することで生物を理解する。そんな手法を咀嚼運動の制御機構の解明に導入してみたいと考えている。幸い、工学部に私の研究に興味を持ってくれる友人がおり、工学的なニューラルネットワークを咀嚼運動の制御モデ

ルとして構築しようと相談している。当面は単純な閉運動の繰り返しである、飲水時のリッキング運動を対象に研究を進めるつもりである。

#### ③ 生理学教育に対する意見

赴任して最初の問題はカリキュラムの改編であった。学部の講義をしていると化学や物理学の基礎的な知識が不足していると感じる昨今、教養部の廃止が基礎知識の一層の低下を招くのではないかと心配である。最近では教科書や参考資料の入手が容易になり、従来の講義・実習形態をそのまま続けることに意味があるかどうか疑問を感じる。カリキュラムの見直しを機会に関連する教科との連携を深めて、全く新しい講義・実習形態を考えることも必要かも知れない。大学院の充実が要求されているが、大学院終了後の研究生生活に何の保証もない現在あまりにも無責任な制度と言わざるを得ない。臨床のように医員の制度を設けてみてはどうだろうか。

## 膜 容 量 測 定 法

丸 山 芳 夫

(自治医科大学生理学教室)

### は じ め に

読者の大部分は膜容量計測法を、分泌顆粒膜の形質膜への融合、つまり開口放出に伴う形質膜面積(形質膜容量)の増加をモニターする手段として用いようとしておられるにちがいない。その目的で、パッチクランプ法(Whole-cell clamp: WC)と膜容量計測法を組み合わせ、単一分泌細胞における開口放出を膜容量変化として最初に示したのは Erwin Neher(1984)であった。Neher 等あるいは他の研究者の論文をもとに、同法から導かれた結果をここ10年間にわたって辿ることは容易であると思う。むしろ難しさは、同法をある細胞に適用するにあたってどのように運用すべきなのか、という点にあると思う。よって本稿では膜容量計測法の方法原理、計測に伴う誤差あるいは注意点を述べ、同法を用いたデータ取得の実際を再現したい。読者は WC 法がいかなるものか、理解しているものと仮定する。

### I. 膜抵抗および膜容量

細胞膜電気生理学の基本である膜の電気等価回路を考える(図1A)。オームの法則( $V=IR$ )

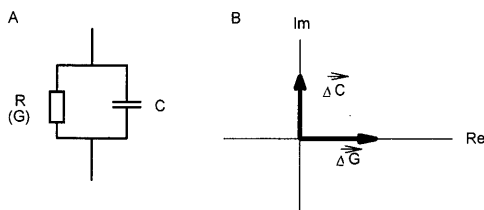


図1 膜等価回路と  $\Delta G$ ,  $\Delta C$ .  $G$ :膜コンダクタンス,  $C$ :膜容量.  $\Delta G$ ,  $\Delta C$ :膜コンダクタンスおよび容量の変化分. B, 複素アドミッタンスの2軸分解図.

を WC 法により得られた定常電流の値( $I$ )に適用すると、 $R=V/I$  から、計測抵抗( $R$ )がわかる。例えば半径  $10 \mu m$  ほどの球状細胞の場合、多少の幅はあるがおおむね、 $R=5 G\Omega$  ( $5 \times 10^9 \Omega$ ) ほどの値が得られる(細胞刺激の存在しない時)。抵抗値はいっぼう、

$$R = \rho \times L / A \quad [\Omega]$$

と表される( $\rho$ :単位長さあたりの抵抗値 [resistivity,  $\Omega cm$ ],  $L$ :膜の厚さ [ $cm$ ],  $A$ :電束が貫く領域の横断面積 [ $cm^2$ ])。この細胞での膜表面積( $A$ )はほぼ  $1257 \mu m^2$  ( $4 \pi \times 10^2$ ) であり、形質膜の厚さ( $L$ )はほぼ  $100 \text{ \AA}$  ( $100 \times 10^{-8} cm$ ) 程度であるから、 $\rho = 63 \times 10^9 [\Omega cm]$  とわかる。 $\rho$ を他の物質のそれと比較してみると、細胞膜の電流通過能の目安となるかもしれない(1 M NaCl 溶液: $\rho = 10$ , ガラス: $\rho = 10^{14}$ , 銀: $\rho = 10^{-6} [\Omega]$ )。量  $R_m = \rho \times L [\Omega cm^2]$  を膜特有の抵抗(比抵抗, specific resistance)といい、計測抵抗( $R [\Omega]$ , input resistance)と区別する。 $R_m$ は細胞により異なる。

同様のことがらを膜容量についてもみてみよう。細胞膜の容量は単一細胞につき、

$$C = D \times \epsilon \times A / L \quad [F]$$

と表される( $\epsilon$ :真空誘電率,  $8.85 \times 10^{-14} [F/cm]$ ,  $D$ :誘電定数  $> 1$ :例えば油は  $D=10$ , 水は約80, 細胞膜は約  $11.3 [F/cm]$ )。ともかくも、 $C$ は  $A$ (膜表面積)に比例する量であることはみてとれる。膜の厚さ( $L$ ),  $D$ などの量が一定であれば、従って、

$$\Delta C = K \times \Delta A \quad K: \text{定数} = D \times \epsilon / L$$

が成り立つ。つまり、膜表面積変化(顆粒膜の融合による)を膜容量の変化として校正しよう。いっぼう、膜比容量,  $C_m = D \times \epsilon / L (= K) [F/cm^2]$  は、さまざまな生体膜において、1

$\mu\text{F}/\text{cm}^2$  と報告されている。Cm は生物定数のひとつとみなしてよからうと思う。さきほどのモデル細胞(半径  $10 \mu\text{m}$ )の計測容量は、 $C = 1 [\mu\text{F}/\text{cm}^2] \times A$ , ( $A = 4\pi \times 10^2 = 1257 \times 10^{-8} \text{cm}^2$ )より、 $12.8 \text{pF}$ である。しかし、これは膜の折れ込み等を見逃した計算量であり、実際の計測細胞膜容量はこの計算量の1.5~3倍ほどになるはずである。いっぽう、膜容量は本質的に膜の折れ込み等の幾何的配置によらない量であり、膜表面積の推定について、こうした光学的(視覚的)計量よりも正確な値を提供しうる。

$D \times \epsilon$  は一定とみなしてきた。しかしこれは実験状況によって変わりうる。例えば、細胞刺激剤として、親油性(あるいは両親媒性)でありかつ荷電を持つ(分極モーメントを持つ)薬剤(親油誘電物質)を考えよう。これは膜中において  $D \times \epsilon$  を増加させうる。従ってその投与の結果Cの増加があっても、それは必ずしも膜表面積の増加を意味しない。誘電効果によるCの増加を否定できないからである。開口放出の刺激および抑制等、そうした薬剤による効果を評価する場合、個々実験上の工夫を要する。同様にLの減少によるCの増加も、現実にあるか否かは別として想像できる。

## II. 膜容量および膜コンダクタンス変化の計測原理

本稿では膜容量および膜コンダクタンスの変化分(刺激に伴う)の計測を意図しており、CあるいはGの絶対値の計測を目的としない。

図1 A (CとRあるいはGの並列回路)における回路アドミッタンスYは、

$$Y = G + C\omega j$$

とかける(j=複素数単位,  $\omega$ :角振数= $2 \times \pi \times$ 周波数)。つまり、GとCは位相に関して独立な計測である。刺激後のYの変化量  $\Delta Y$  は  $\Delta G$  と  $\Delta C$  が微小であれば形式的に、

$$\Delta Y = (\partial Y / \partial G) \Delta G + (\partial Y / \partial C) \Delta C$$

$$\Delta Y = \Delta G + \omega j \Delta C$$

である(図1 Bに複素数平面での幾何的描像を示した)。  $\Delta G$  はイオンチャネルの活性化をま

た  $\Delta C$  は分泌顆粒膜への融合を想定している。複素数単位jをかけ算の形でかけることは、位相の  $\pi/2$  回転を意味しており、よって位相の差(0と  $\pi/2$ )を識別し、それぞれの位相に対応する振幅量を受感しうる装置があれば、コンダクタンスの変化量( $\Delta G$ )と膜容量の変化量( $\Delta C$ )は相互に依存せず、全く独立な計測量として評価しうる。言い換えると、膜(単一分泌細胞)を  $V \sin \omega t$  にて定常駆動した場合、

$$\text{コンダクタンス素子を通る電流の変化分}$$

$$= \Delta G \times V \sin \omega t$$

$$\text{容量素子を通る電流の変化分}$$

$$= \Delta C \times V \sin(\omega t + \pi/2)$$

となる。その識別と計測を実現するため通常ロックインアンプ(あるいはパソコン等によりそれをシミュレートした装置)を用いる。ロックインアンプのReference端子に  $V \sin \omega t$  を加え、パッチクランプから出力をその入力とする。ロックインアンプは  $V \sin \omega t$  の位相(0位相)を基準として、その位相(0フェーズ)と  $\pi/2$  だけずれた位相( $\pi/2$  フェーズ)の信号のみ識別し、それらの振幅を(平均化して)時間に沿って出力する。

以上が膜容量計測法の理想化された状況での測定原理である。しかし図1 Aの回路は理想化されたモデルであり、実際には計測および膜電位制御のためのアクセスコンダクタンス( $G_s$ ):

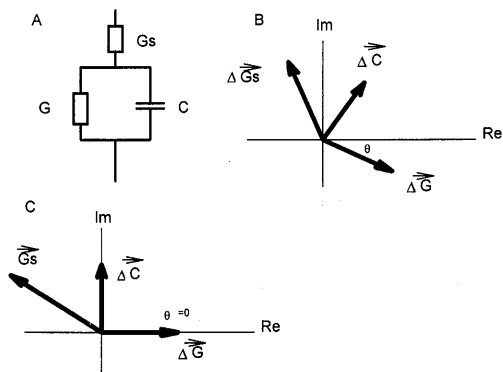


図2 Whole-cell clamp における膜等価回路と  $\Delta G$ ,  $\Delta C$ ,  $\Delta G_s$ . A, 等価回路. B, 複素アドミッタンスの2軸分解図. C, ロックインアンプによる軸合わせ( $\theta$ の消去)。

WC 計測にて、ガラス電極と細胞内をむすぶ通路コンダクタンス、図 2 A) が直列に挿入される。この挿入により、上に述べた計測量の修正を余儀なくされる。新たな要素、 $G_S$  の変化 ( $\Delta G_S$ )、に応じた対策とこの挿入による必然誤差 ( $\Delta G$  および  $\Delta C$  での) の評価も必要となる。

### Ⅲ. Whole-cell clamp 時での等価回路

前述したように目的は  $\Delta G$  あるいは  $\omega \Delta C$  の計測であって、 $C$  あるいは  $G$  の計測ではない。それゆえ、 $C$  (input  $C$ ) はパッチクランプアンプ  $C$  消去回路により、見かけ上消去されているものとして話を進める。こうした  $C$  の事前消去は、微小な  $\Delta C$  を追う場合、 $C$  によるロックインアンプ入力端の飽和を防ぐためおよび  $\Delta C$  の誤差を除くために行う。

図 2 A の回路には新たに  $G_S$  が加わった。回路アドミッタンス  $Y$  は図 1 のそれよりも複雑になる。

$$Y(G, C, G_S, \omega) = B(\omega) \times (G + C\omega j)$$

$$B(\omega) = (1 + G + /G_S + \omega j/G_S)$$

同様に変化分をとってみると ( $\Delta G$  と  $\Delta C$  は微小)、

$$\Delta Y = Y(G + \Delta G, C + \Delta C, G_S + \Delta G_S, \omega)$$

$$- Y(G, C, G_S, \omega)$$

$$= (\partial Y / \partial G) \Delta G + (\partial C) \Delta C$$

$$+ (\partial Y / \partial G_S) + O(\Delta G^2, \Delta G^2, \Delta G_S^2)$$

$$\Delta Y = B^2(\omega) \times \{\Delta G + \omega j \Delta C$$

$$+ (G/G_S + C\omega j/G_S)^2 \Delta G_S\}$$

$$= B^2(\omega) \times \{\Delta G + \omega j \Delta C$$

$$+ (D + E\omega j) \Delta G_S\}$$

$$= B^2(\omega) \times \{(\Delta G + D\Delta G_S)$$

$$+ \omega j(\Delta C + E\Delta G_S)\}$$

この式の幾何学的描像を複素数軸上 (図 2 B) に示した。ロックインアンプは各々、下記の計測量 (実数軸および虚数軸上の値) を位相差に従って出力する。

$$B^2(\omega) \times \{(\Delta G + D\Delta G_S)\} \dots$$

実数軸 (0 位相)

$$B^2(\omega) \times \{\omega j(\Delta C + E\Delta G_S)\} \dots$$

虚数軸 ( $\pi/2$  位相)

これらの量は 2 種類の誤差を含む。  $B^2(\omega)$  の積の形と  $\Delta G_S$  によるものである。実際上  $\Delta G_S$  の寄与による誤差は事前に予測できないし、機器設定によっても除けない。ただ  $\Delta G_S$  が実験に際してゼロであること、すなわち  $G_S$  は変化しないことを祈るばかりである。  $\Delta G_S$  が生じた場合、測定量になが起るか知っていれば、そうしたデータを捨てるということで、それによる誤りを回避できる。説明を続行する都合上、当面、  $\Delta G_S = 0$  とおく。すなわち、

$$\Delta Y = B^2(\omega) \times (\Delta G + \omega j \Delta C)$$

この式で、もし、  $\Delta G$  ベクトルを実数軸にまた  $\Delta C$  ベクトルを複素数軸に合わせることができれば、両変化量は直読できる。こうした軸の回転はロックインアンプつまり計測器の計測位相を調節することで達成される。ロックインアンプの位相調節は式の中では以下に示すように、  $1/\exp(j\theta)$  両辺にかけることを意味する。こうすることで、測定条件を図 1 でみたような理想的状況に近づけることができる。

$B^2(\omega)$  は複素数である。よって、  $B^2(\omega) = [B^2] \times (\cos\theta + j\sin\theta)$  とかける (簡単に、  $[B^2(\omega)] \times \exp(j\theta)$  とかく: [ ] 記号は絶対値を意味する)。

$[B^2(\omega)]$  は通常の“良い” WC ( $G_S \gg G, \omega C$ ) の場合、1 に非常に近い。つまり、

$$[B^2(\omega)] = \{(1 + G/C_S)^2 + (\omega C/G_S)^2\}^{-1} = 1$$

よって、ロックインアンプ常設の位相補正つまりにより位相調節を施された  $\Delta Y$  ( $\Delta Y'$ ) は、

$$\Delta Y' = \Delta Y / \exp(j\theta)$$

$$= (\Delta G + \omega j \Delta C) \times \exp(-j\alpha)$$

となる。  $\exp(-j\alpha)$  は位相補正にて修正しきれなかった軸回転の誤差を表す。よって、

$$\Delta Y' = (\Delta G + \omega j \Delta C) \times \exp(-j\alpha)$$

$$= (\Delta G + \omega j \Delta C) \times (\cos\alpha - j\sin\alpha)$$

$$= (\Delta G \cos\alpha + \omega \Delta C \sin\alpha)$$

$$+ j(\omega \Delta C \cos\alpha - \Delta G \sin\alpha)$$

$$= \text{Re}(\Delta Y') + \text{Im}(\Delta Y')$$

が成り立つ。  $\alpha$  がゼロであれば (完璧な位相補正、図 2 C)、  $\exp(-j\alpha) = 1$  であり、従って、

$$\Delta Y' = \Delta G + \omega j \Delta C$$

このように、 $\theta$  をロックインアンプであわせ込む時点で誤差の大きさは決まってしまう。 $\theta$  の合わせこみが不十分あるいは過剰であると、上式より、 $\Delta G$  および  $\Delta C$  計測の相対誤差 (EG および EC),

$$EG = \Delta G - (\Delta G \cos \alpha + \omega \Delta C \sin \alpha) \\ = -\omega \Delta C \alpha$$

$$EC = \Delta - \{\Delta C \cos \alpha - (\Delta G / \omega) \sin \alpha\} \\ = (\Delta G / \omega) \alpha$$

が生ずる。

$\omega$  の設定は特別な意味を持つ。 $\Delta G_S = 0$  を完璧に維持できるなら、それは大きい方がよい。なぜなら、EC を極小に抑えられるし、 $\omega j \Delta C$  量の増幅 ( $\Delta C$  分解能をあげること) にもなるからである。しかし、 $\Delta G_S$  があるていど見込まれる時には、それをむやみに大きくとると、前述の式、

$$\Delta Y = B^2(\omega) \times \{\Delta G + \omega j \Delta C \\ + (G/G_S + C\omega j/G_S)^2 \Delta G_S\}$$

より、 $\Delta G_S$  由来の誤差 ( $E(\Delta G_S)$ ),

$$E(\Delta G_S) = (G/G_S + C\omega j/G_S)^2 \Delta G_S \\ = \{ (G/G_S)^2 - (\omega/G_S)^2 \} \\ + 2 \times (G/G_S) \times (C\omega/G_S) j \Delta G_S$$

特にその虚軸成分 ( $\Delta C$  計測軸) への寄与が大きくなる。実験にみあう  $\omega$  値への考慮が必要である。

#### IV. 誤差とその防止法

以上の議論での仮定をまとめると、以下の3点となる。

a)  $[B^2(\omega)] = 1$

b)  $\theta = 0$

c)  $\Delta G_S = 0$  あるいは  $\omega$  への配慮

これらは実験上実現可能であろうか。a) については実際の値をいれてみる。 $G_S = 200 \text{ nS}$ ,  $G = 1 \text{ nS}$ ,  $\omega C = 2 \times \pi \times 300 \times 11 \times 10^{-3} \text{ nS} (= 20 \text{ nS})$ :  $C = 11 \text{ pF}$ , 周波数  $300 \text{ Hz}$  の値は、膵腺腺房細胞にて通常みとめられる。計算上、 $[B^2(\omega)] = 0.98$  となり実現されうる。b) による誤差は制御可能である。また言い方を変えると、ゼロへの合わせこみの正確さが誤差を決める。 $\theta$  値

は  $G, C, G_S$  を知ることで求められる ( $\tan \theta = -\omega C / (G_S + G)$ )。そのように  $\theta$  をロックインアンプであわせ込めばよい。これにかわる方法は、パッチクランプアンプに常設されている C 補正つまみを用いて仮想的に  $\Delta C$  を印加したとき、ロックインアンプの実軸出力 (通常  $\cos$  出力と表示) がゼロでありかつ虚軸 ( $\sin$  出力と表示) が最大変化するようにロックインアンプを調節することである。双方とも、軸合わせに関して同じ意味をもつ。印加  $\Delta C$  を + と取るか - と取るか、またその大きさはどうするか、市販のパッチクランプアンプに固有の特性があるようでありがちにいいない。著者は EPC-7 (List 社) と CEZ-2300 (日本光電) を比較したことがある。前者の方が  $\theta$  あわせこみが楽であったという印象をもっている。筆者は通常、EPC-7 を用い  $-1$  乃至  $-2 \text{ pF}$  の  $\Delta C$  を印加し、ロックインアンプの軸あわせを行っている。c):  $G_S$  の変化は予測できない。 $G_S$  の変化は応答の基線レベルを大きく変えるか、または上あるいは下への恒常的なトレンドを生じせしめるのが普通である。よって、刺激の前後においてロックインアンプの実軸および虚軸出力とも安定な基線レベルを保ちえた応答記録を受け入れ、他を棄却するという方針をとらざるをえない。安定な  $G_S$  を得るには、比較的大口径のピペットを用いて大きな  $G_S$  を得ておくことに尽きるが、 $\omega$  を小さくとる ( $\Delta C$  の分解能をあるていど犠牲にして) のも一法である。筆者がかつて、膵腺腺房細胞において、比較的稳定な  $G_S$  を得た例では  $C = 11 \text{ pF}$ , ピペット抵抗  $= 2.5 \text{ M}\Omega$  (K-グルタメート溶液) そして  $G_S = 5-7 \text{ M}\Omega$  であった。

#### V. 細胞応答

刺激に伴い、a)  $\Delta G, \Delta C$  双方とも変化する細胞 (たとえば、膵腺腺房細胞), b) 一見  $\Delta C$  のみである細胞 (腹腔内肥満細胞) など、標本および刺激方法により  $\Delta Y$  の変化には多様性がある。 $\Delta C$  応答のみを示す細胞での、実験および結果 (誤差) の評価は、両者を示す細胞に比べ

てはるかに容易である。位相計測法による膜容量測定を意図し計画している方々には、練習台として前者、例えば b) に属する腹腔内肥満細胞、を用いることを奨めたい。b) に属する細胞での誤差は、 $\Delta G = 0$  であるので極小となしう。また、虚軸を  $\Delta G_S$  方向へ合わせ込めれば  $\Delta G_S$  による影響も極小となしう。

## VI. 手技に対する注意

以下にあげる手技が必要であり、それへの注意点を述べる。

a) 必要機器: EPC-7 相当のパッチクランプ。2 位相計測のできるロックインアンプ(例えば NF 社 NF 6051B)。2 位相ロックインアンプは、Reference の位相(0 フェース)と  $\pi/2$  だけずれた位相( $\pi/2$  フェース)のシグナルを増幅し出力する。

b) ピペットの作成とシルガードコーティング: 細胞にもよるが、一般にピペット抵抗値 2 M $\Omega$  以下では良好な giga-seal は難しい。しかし WC において、 $G_S$  を安定に保つには低抵抗(大口径)のピペットが望ましい。妥協点をさがす必要がある。シルガード等疎水性レジンでのピペットコーティングは、ピペット/溶液境界面からの薄膜上下動を防ぐため必須である。この上下動はピペット容量を変化させ、それは  $\Delta C$  と区別し難い。

c) C の見かけ上の消去: パッチクランプアンプでの C の消去はロックインアンプ入力の飽和を防ぐためおよび周波数特性を維持しつつ増幅率をあげるために必要である。シルガードコーティングしたピペットを用いても完璧な消去は望めない。極小に(10%以下)抑えれば良い。

d)  $\theta$  のあわせこみ: パッチクランプアンプに常設されている C 補正つまみを用いて仮想的に  $\Delta C$  を印加し(1 pF 程度)、ロックインアンプの実軸出力(通常  $\cos$  出力と表示)がゼロでありかつ虚軸( $\sin$  出力と表示)が最大変化するようにロックインアンプを調節する。筆者は NF 5610B(2 位相)を用いて、 $0.1^\circ$  のオーダーまで合わせるようつとめている。b), c) の操作

には通常 2 分程度かかる。後、基線の安定(つまり  $G_S$  の安定)するのを待ち、細胞刺激を加える。

e) 薬物の投与: 投与方法には注意を要する。灌流槽全体の液交換は奨められない。液面の動揺は  $\Delta C$  計測への動揺として反映されるからである。液面 1 mm の上昇あるいは下降は通常のガラスピペット浮遊容量を 1 pF ていど増加あるいは減少させる。面倒でも細胞近傍に設置した薬物投与ピペットなど用いて局所灌流を行うべきである。

f)  $\Delta C$  および  $\Delta G$  の校正: パッチクランプアンプに常設されている C 補正つまみからの入力を  $\Delta C$  校正とする。チャートレコーダー等の増幅率を考慮の上、 $\Delta C$  校正を元に  $\Delta G$  のそれを計算する。

## VII. 方法論再考

刺激時  $\Delta G$ 、 $\Delta C$  双方とも変化する細胞を想定し、位相計測法による膜容量計測法を、 $G$ 、 $C$ 、 $G_S$  の等価回路がそのまま細胞膜と等価であるとして議論してきた。しかし細胞膜の折れ込み(infolding)等、形態(細胞幾何)が複雑な細胞にそれが通用するものが疑問が残る。 $\Delta C$  計測の誤差の由来は  $\Delta G$  から  $\Delta C$  への混入誤差であり、また  $\Delta G$  はイオンチャネルの活性化によるものである。細胞内外をチャネル非通過のイオンにて置き換えた時、 $\Delta G = 0$  が実現されかつ  $\Delta C$  が得られれば、細胞形態に由来する誤差は少ないといえる(腹腔内肥満細胞ではそのまま  $\Delta G = 0$  が実現されている)。また、 $\Delta C$  と  $\Delta G$  の時間経過およびパターンに明らかな差異がありかつ  $\Delta G$  が生の電流変化と全く一致すれば、 $\Delta C$  反応は  $\Delta G$  による反映ではないといえる。幸い筆者のよく使う睥腺腺房細胞においてはそのようになる。

$\Delta G = 0$  が実現されうる時、虚軸を  $\Delta G_S$  の方向にあわせ、 $\Delta C$  をその虚軸への射影とすることで、 $\Delta G_S$  の影響を極小化した状態で  $\Delta C$  をモニターしう。当然この場合、実軸計測量は捨てる(それに代わる  $\Delta G$  モニターには電流変化を用いる)。原法のバリエー

ションとして利用価値が高い。

求めたい未知数は  $G$ ,  $C$ ,  $G_S$  の3種であり, それらを含んだ3個の独立な計測および理論式があればそれからの絶対値を計算できる (CGG<sub>S</sub> 算出法). ロックインアンプの実および虚軸出力, および生の電流変化より求まる  $G$  によりこれらの算出は可能である. 細胞内への物質投与後の反応を, WC 確立直後から追えるなど, それなりに有効な方法である.  $G_S$  をモニターできるという利点もある. しかし, 絶対値を追うという制約上, 変化分に対する計測分解能は落ちる.

### おわりに

方法論に関連する文献を一括してあげ, それらを簡単に評価して終わる.

#### 文献とそれらへのコメント

##### I. 開口放出と膜容量について(総説)

- 1) Penner, R. and Neher, E. (1989) The patch-clamp technique in the study of secretion. *TINS*, **12**, 159-163
- 2) Almers, W. (1990) Exocytosis. *Annu. Rev. Physiol.* **52**, 607-624
- 3) Lindau, M. and Gomperts, B. D. (1991) Techniques and concepts in exocytosis: focus on mast cells. *BBA*, **1071**, 429-471
- 4) Monk, J. R. and Fernandez, J. M. (1992) The exocytotic fusion pore. *J. Cell Biol.*, **119**, 1395-1404
- 5) 丸山芳夫 (1992) 脱顆粒のシグナル伝達. *細胞工学分*, **11**, 525-532

##### II. 方法論

- 6) Neher, E. and Marty, A. (1984) Discrete changes of membrane capacitance observed under condition of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 6712-6716
- 7) Lindau, M. and Neher, E. (1988) Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measure-

ments in single cells. *Pflugers Archiv* **411**, 137-146

- 8) Maruyama, Y. (1988) Agonist-induced changes in cell membrane capacitance and conductance in dialysed pancreatic acinar cells of rats. *J. Physiol.*, **406**, 299-313
- 9) Maruyama, Y., Inooka, G., Li, Y. X., Miyashita, Y. and Kasai, H. (1993) Agonist-induced localized  $Ca^{2+}$  spikes directly triggering exocytotic secretion in exocrine pancreas. *EMBO Journal* **12**, 3017-3022
- 10) Maruyama, Y. (1989) Control of exocytosis in single cells. *News in Physiol. Sci.*, **4**, 53-56
- 11) Joshi, C. and Fernandez, J. M. (1988) Capacitance measurements. *Biophys. J.*, **53**, 885-892
- 12) Fidler, N. and Fernandez, J. M. (1989) Phase tracking: an improved phase detection technique for cell membrane capacitance measurements. *Biophys. J.*, **56**, 1153-1162
- 13) Zierler, K. (1992) Simplified method for setting the phase angle for use in capacitance measurements in studies of exocytosis. *Biophys. J.*, **63**, 854-856
- 14) Okada, Y., Hazama, A., Hashimoto, A., Maruyama, Y. and Kubo, M. (1992) Exocytosis upon osmotic swelling in human epithelial cells. *BBA* **1107**, 201-205

6) は位相計測法の原法を最初に示した論文で, これよりすべてが始まった. 7) では様々な計測法を取り上げ, CGG<sub>S</sub> 算出法の原理と分解能を位相計測法のそれと比較している. 6), 7) は必読のこと. 8), 9) では,  $\Delta G$ ,  $\Delta C$  双方とも変化する場合の取り扱いを述べている. また 7) では  $\Delta G$  由来の  $\Delta C$  誤差を評価している. 10) ではそうした細胞において, 膜非透過性のイオンを用いて  $\Delta G$  消去した場合の例をあげている. 11), 12), 13) では, 肥満細胞 ( $\Delta G = 0$  の細胞) での  $\Delta G_S$  極小化の原理を述べている. 14) では CGG<sub>S</sub> 算出法を改良して,  $\Delta G$ ,  $\Delta C$  双方とも変化する細胞に適用した例を述べている.

追加文献: Maruyama, Y. and Petersen, O. H. (1994) Delay granular fusion evoked by repetitive cytosolic  $Ca^{2+}$  spikes in mouse pancreatic acinar cells. *Cell Calcium* **16**, 419-430.

この論文には  $\Delta C$  および  $\Delta G$  がともに大きく変化したときの誤差評価と誤差極小化が述べられている.

## 新生ラット摘出脳幹-脊髄標本におけるパッチクランプ法の適用

鬼丸 洋

(昭和大学医学部第二生理学教室)

### はじめに

新生ラット摘出脳幹-脊髄標本は、脳幹内の神経機構解析の *in vitro* モデルとして、Suzue 等(1983, 1984)<sup>1,2)</sup> によりはじめて導入された。この標本は、血管系を介した灌流を特別に行わない状態でも、呼吸中枢活動を維持し、その出力が第4 (または第5) 頸髄前根から記録できることから、とくに呼吸中枢の解析に適していると考えられた。これまでに、呼吸中枢に関連して、反射<sup>3)</sup>、薬理作用<sup>4-6)</sup>、リズム形成<sup>7-14)</sup>、ネットワーク解析<sup>15,16)</sup>、中枢化学受容<sup>17-21)</sup>、組織の内部環境、代謝<sup>22,23)</sup>、横隔神経核内の伝達機構<sup>24-26)</sup>などの研究が行われている。さらに歩行運動<sup>27-29)</sup>その他の脳幹と脊髄を含む機能的、統合的な神経機構の解析にも応用可能である。つまりこの *in vitro* 標本は、*in vivo* 実験系ではその複雑さのために解析が困難であるが、スライス標本では機能が失われてしまい十分な解析が行えないようなネットワークシステムの研究に適している。

神経機構の詳細な解析には、ニューロンの膜電位の記録が不可欠である。しかしこの標本において、従来の微小ガラス電極を用いて、延髄網様体などに分布するニューロンから、細胞内記録を行い、それを長時間維持することは、非常に困難であった。この理由のひとつとして、この標本においてはニューロンが回りの組織によって強固には支えられていないことが想像される。逆にこのような状態であるから、組織内が比較的良く灌流され標本の生存に有利であるのかもしれない。そこで膜電位記録を行うには、細胞に電極を刺すのではなく、細胞を電極に吸着する方法であるパッチクランプ法<sup>30)</sup>が有効であると考えられる。本稿ではこの標本におけるパッチクランプ法の適用<sup>31,32)</sup>について、具

体的に解説する。また Pickering 等<sup>33)</sup>による脊髄スライスニューロンからのホールセルパッチクランプ法についての詳しい解説があり大変参考になる。

### I. 標本の作成

標本の作成は基本的に Suzue<sup>2)</sup>の方法に従っている。ここでは延髄 (または橋) から頸髄までを含む標本の作成について述べる。

1. 新生ラット (0~4日齢) を深エーテル麻酔し、ハサミを用いて、頭部、脊髄部の皮膚を背側から剝し、胸髄のレベルで切断、続いてすばやく前頭骨と頭頂骨の間に、前頭部を除去する。標本を、室温あるいはやや冷却した (15~20℃) modified Krebs 液<sup>(1)</sup>を満したピーカーに入れる。この行程は30秒以内に行う。

2. 血液を洗った後、標本を解剖用のシャーレー (底にゴムを敷いたもの) に移し、実体顕微鏡下で脳幹、脊髄を取り出す。このとき Krebs 液を適当な流速 (1~2 ml/min) で流しながら解剖を行うと良い。まず腹側面を上に向けピンで胸部を固定し、咽頭部、気管、食道、肺、心臓などを取り除く。迷走神経を使用する場合には、この時点で切断しないように注意し、頸部迷走神経を回りの組織、血管などから剝離しておく。

3. 次に背側面を上にして同様にピンで固定し、後頭部、頸部、胸部の背側を覆う筋肉を取り除く。脳と頭骨の間にハサミを入れ、頭蓋骨および椎骨 (胸髄レベルまで) の背側部を取り

(1) Modified Krebs 液 (以下 Krebs 液) の組成 (mM) : 124 NaCl, 5.0 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.4 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgSO<sub>4</sub> (or MgCl<sub>2</sub>), 26 NaHCO<sub>3</sub>, 30 glucose, pH 7.4, 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> で飽和。灌流液の組成は、研究者によって多少異なっているが、glucose 濃度は 30 mM と通常よりも高くする<sup>2)</sup>。

除く。脳の背側部が露出されたところで、四丘体レベルで切断し通常小脳も取り去る。硬膜など残っている場合には取り除く。

4. 再び腹側面を上にして固定し、残っている腹側の頭蓋骨をまず橋が見える所まで取り除く。橋に出入りする脳神経 (V, VII など) を切断後、さらに頭骨を腹側延髄が見える所まで取り除く。クレブス液が、血液で濁ってきて視界が悪くなったら、液を捨てて新しくする。

5. 延髄脳底部を覆う骨を少し持ち上げると、延髄に出入りする脳神経 (IX, X, XI, XII) が確認できる。このときクモ膜が浮き上がって見えるので、これらを取り除いた後、各脳神経を切断する。延髄部分を覆う骨をすべて取り除く。迷走神経を使用する場合には、頭蓋骨に入り込む所を確認しつつ、周囲の骨を注意深く取り除く。

6. 脊髄と椎骨の間にハサミを入れ、第8頸髄 (C 8) レベルまで脊髄及び各神経根を傷つけないように、腹側椎骨を取り除く。神経根をできるだけ長く残すように切断する。

7. 脊髄及び脳幹のクモ膜を精密ピンセットで取り除く。特に延髄部分は、腹側表面を傷つけないように注意深く作業を行う。延髄部分の向きを少し変えて、側面及び背面に残っている膜も取り除く。このとき軟膜は取り除かない。

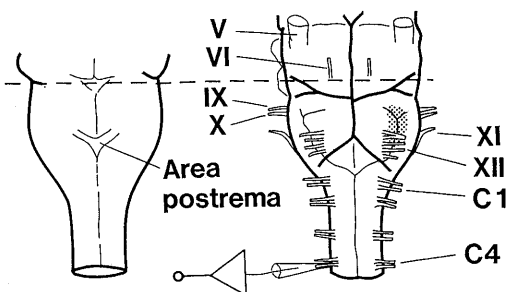


図1. 新生ラット摘出脳幹-脊髄標本の背側(左)及び腹側(右)面の外観。破線は橋を含まない標本を作る場合の切断レベルを示す。V-XII, 各脳神経。C1-C4, 頸髄神経。呼吸性の運動神経活動は、C4またはC5前根から吸引電極を用いて記録。延髄腹外側部(影を付けた部分)から呼吸性ニューロンが記録できる。

8. 橋と延髄の間で脳幹を切断する。第VI脳神経根よりやや尾側で、前下小脳動脈よりやや吻側のレベルを目安とする(図1)。最後に脊髄をC7またはC8レベルで切断する。

9. こうして摘出した標本を、前もってクレブス液を灌流しておいた実験槽に移す。ここまでの行程が馴れると約10分で終了する。実験槽内のクレブス液の灌流速度は2.5~3.0 ml/min, 温度は25~26℃とする。

図2に我々が使用している実験槽の概略を示す。温度コントロール可能で、容量が2 ml, ナイロンメッシュを底に敷いてある。標本は、

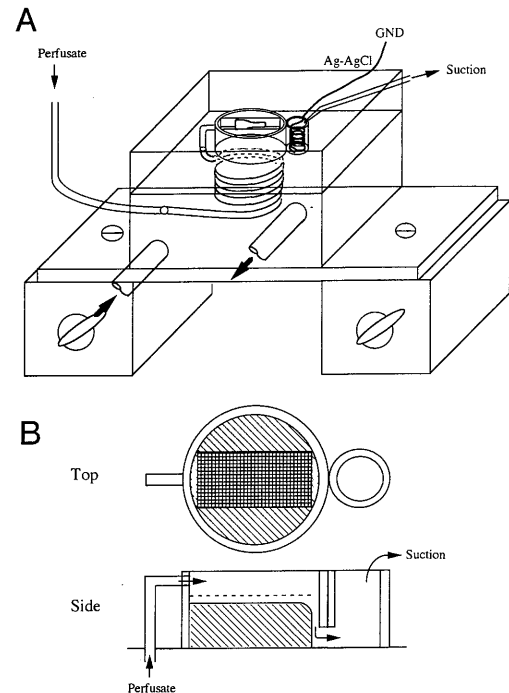


図2. 実験槽の概略図。A: 全体図。灌流液は、まず一定温度に保つための恒温槽部分(下部)を通り、標本を置くチェンバー(上部, 容量2 ml)に流れ込む。このチェンバーに接する小さい円筒部で、底を通過してきた液を吸引する(B下図)。またこの部分にらせん状に巻いた銀-塩化銀電極を置き、アースをとる。装置全体は、マグネットにより実験台に固定する。B: 実験槽の拡大図(Top, 上面; Side, 側面)。標本はナイロンメッシュ(10/13 mm 格子)の上に置く。側面図の矢印は灌流液の流れる道筋を示す。チェンバー内の灌流液の温度は、標本のすぐ近くに置いた熱電対により常にモニターする(図3)。

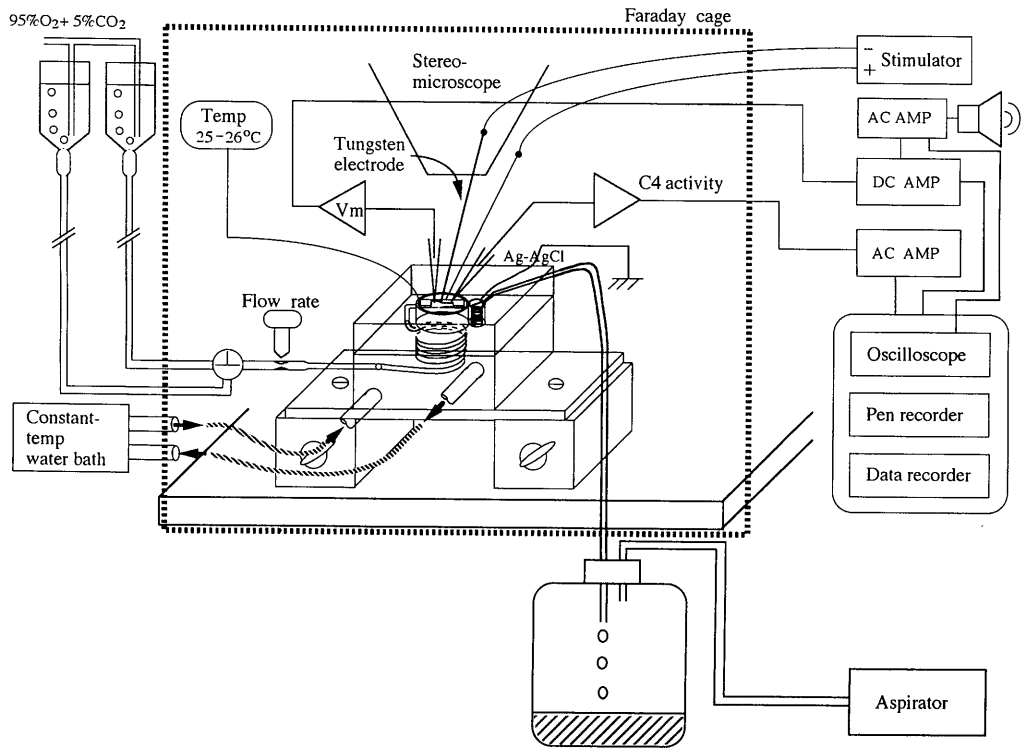


図3. 実験装置全体の概略図.

腹側表面を上に向け、微小ステンレス針で固定するか、先端を溶融してまるめたガラス棒（マニピュレータに取り付けてある）を用いて、延髄中央部分を軽く押さえることで固定する。図3に実験装置全体の概略を示す。

## II. 記 録

摘出脳幹-脊椎標本におけるホールセル記録は、Blanton 等<sup>34)</sup>による、いわゆる blind patch method が基本となっている。目的とするニューロンが、呼吸性ニューロンの場合には、自発活動を示すこと、ニューロンの位置が比較的深い場合があることなどの理由から、スライス標本または培養細胞における方法と比べて多少異なる点がある<sup>31)</sup>。

1. 呼吸性活動の出力モニターとして、C4 または C5 前根から吸息性活動を記録する。先端内径 100~150  $\mu\text{m}$  のガラス管(図4)を用いて、前根を吸引し、信号を短い導線を介して高

入力抵抗のプレアンプにつなぎ、その出力を AC フィルターアンプで増幅する。Low cut フィルターの時定数は 0.3~2 sec に設定する。

2. 呼吸性ニューロンは主に延髄腹側外側に分布する<sup>35,36)</sup>(図1)。延髄のパッチ電極を刺入する場所から、表面の軟膜を取り除く。これ

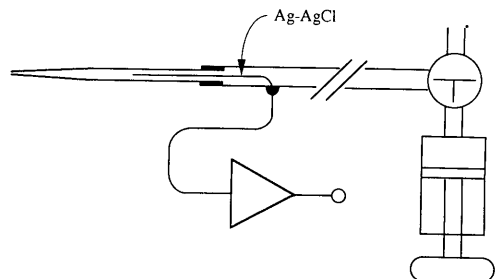


図4. 吸引電極。神経根吸引用のガラス管は、先端の内径が 100~150  $\mu\text{m}$  のものを使用(外径 1.3~1.5mm のガラス管から引く)。先端をかるく熱処理する。ビニールチューブを介して注射器につなぎ吸引する。

にはパッチ電極用に作成したガラスピペットを用いる。マニピュレータを操作することで、ガラスピペットを動かして、表面の血管をはぎ取るようにする。軟膜を取り除く面積は必要最小限にとどめる。このとき、C4前根吸息活動の変化に注意する。

3. パッチピペットは、より深部 (~600  $\mu\text{m}$ ) のニューロンからの記録の際にも、組織をできるだけ傷つけないように、比較的先端部の細長いものを使用する。これには、外径 1 mm の thin-wall borosilicate ガラス管 (Clark Electromed., GC 100 TF-10, しん入り) を用い、縦引きプーラー (成茂 PE-2) で一段引きする。電流値を 11.5~12 A くらいに設定すると、引き終るまでの時間が 36 秒前後となり、比較的細長い電極ができる (図 5)。先端内径は 1.5~2.0  $\mu\text{m}$  であり、電極抵抗は 3~6 M $\Omega$  となる。電極先端の内径は、必ず顕微鏡で確認する。電極は使用する直前に作成し、シルガード処理及び先端の熱処理 (heat polish) は行わない。

4. 標準的な電極液としては、130 (mM) K-gluconate, 10 EGTA, 10 HEPES, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub> (KOH で pH を約 7.4 に調整) を使用している。さらに Ca チャネルの rundown を避けるなど、細胞内環境をできるだけ正常に保つ目的で、2 mM ATP を追加することが多い。浸透圧は、280 mOsm 前後である。ニューロンの

形態を調べるためには、0.2~1% のルシファゼイエロー (LY) を含む電極液を使用する。LY の濃度は高いほど神経突起の細部まで良く標識できるが、溶液の浸透圧が増すので、K-gluconate 濃度を減少させるなどして 300 mOsm 前後に調節する必要があると思われる。電極液はミリポアフィルター (0.45  $\mu\text{m}$ ) を通して、細長いチューブから電極に充填する。

5. 電極を電極ホルダー (日本光電, PC-3) に取り付ける。我々は、電極ホルダーを直接ヘッドステージアンプに付けずに、離して使用している。電極ホルダーをマニピュレータに取り付け、アンプとの間を短い導線で結ぶ。これによって、電極の交換が容易になるとともに、作業空間を広く取ることができる。マニピュレータは成茂 MO-11 (or WR-40) と M-2N の組合せが使いやすい。アンプは日本光電の単電極膜電位固定用増幅器 (CEZ-3100, プローブは JZ-302 J) を使用している。目的とするニューロンは、呼吸性ニューロンのように自発活動を示すものが主なので、ブリッジモードまたはカレントクランプモードで、容量補正、電極抵抗補正ができるアンプが便利である。

6. ニューロンの探索はブリッジモードで行う。電極先端の汚れを避けるために 5~15 cm H<sub>2</sub>O くらいの陽圧を加えて<sup>(2)</sup>、電極を延髄腹側から刺入していく。電極を灌流液につけたとき

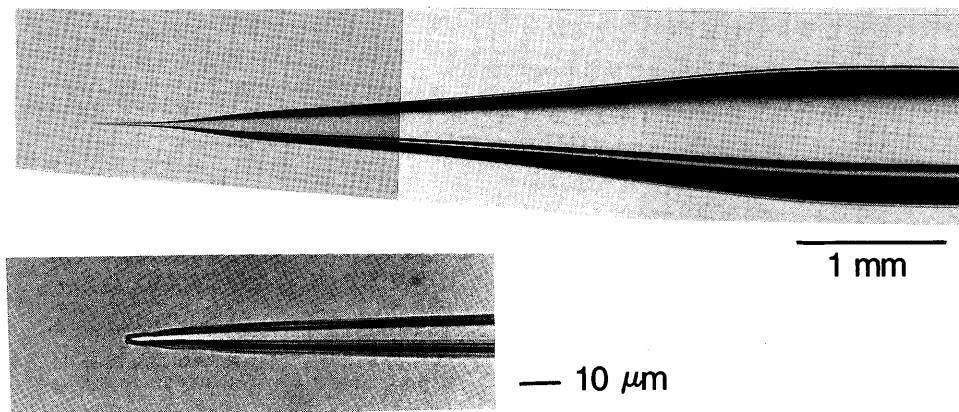


図 5. パッチピペットの形状。

に、アンプの電圧の読みが0になるようにオフセット調整を行う。また容量補正を行う。電極抵抗をチェックする。DCアンプの出力をACアンプで増幅し、スピーカーを介して、音をモニターする。このサウンドモニターは特に重要で、電極が細胞その他の障害物に接触したこと、ニューロンの発火パターン、電極先端の汚れ具合などを知ることができる。電極を進めていくと、急にノイズが増加するポイントがある。これは電極が何か障害物に接触したことを意味する。これが目的とするニューロン（たとえば呼吸性ニューロン）でない場合には、少し電極を戻してノイズが減少することを確認して、再び進める。電極先端に陽圧がかかっているため、この操作で障害物を避けることが可能となり、電極先端の汚れを最小限にとどめることができる。つまり前進、後退を繰り返しつつ、小刻みに電極を進めていく。

7. 目的とするニューロンが見つかる、まず再度オフセットを0に調整し、シール抵抗モニター用のコマンドパルス(-0.1 nA, 30 ms, 1~2 Hz)を加える。電位応答をペンレコーダーまたはオシロスコープ上でモニターし、振幅を確認しながら吸引する。電極先端部が汚れていない場合(すなわち目的とするニューロンがすぐに見つかったとき)には比較的小さい陰圧(20~40 cmH<sub>2</sub>O)でギガオームシールが達成される<sup>(3)</sup>(図7A)。ギガオームシールが達成さ

(2) 圧力の調整には、密閉式と開放式の2つの方法がある。図6に我々が使用している方法の概略を示した。密閉式のほうが、微妙な圧の調整に、より適しているが、圧トランスデューサー、マイクロインジェクターなどが必要となる。これに対し開放式のほうは、簡易型の場合、安価に準備できる。

(3) ニューロンの探索時間が長くなるほど、シール形成に時間がかかるとともに、大きい陰圧(-100 cm H<sub>2</sub>O 以下)を必要とする(図7B)。一度引圧を加えて、シール形成がうまく行かなかった場合には、電極を新しいものと取り替える。最初のトラックでニューロンを見つけるのがベストであるが、2~3トラック目でもうまく行くこともある。成功する確率は、ニューロンを探索している時間が短いほど高くなる。

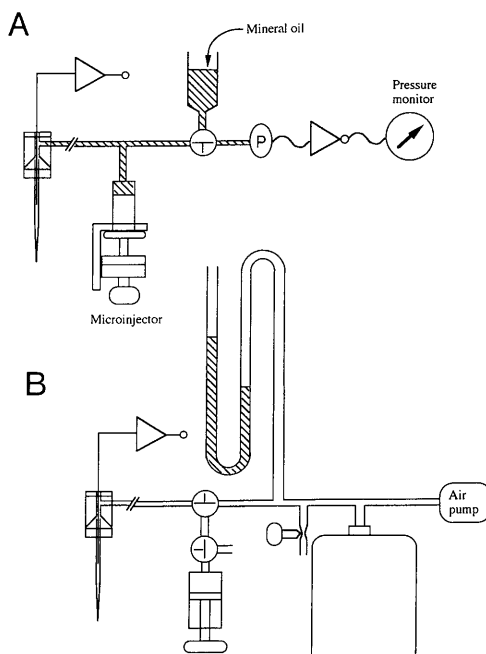


図6. 圧調節の方法。A: 密閉式。電極ホルダーは、圧コントロールのためにポリエチレンチューブを介して、ガラス製注射器(1 ml)及び圧トランスデューサー(P)に接続される。内部に粘性の低い mineral oil (nacalai tesque Co., No. 233-34)を満たす。気泡はできるだけ残らないようにする。注射器はマイクロインジェクター(成茂 IM-4B または IM-1)に取り付ける。B: 開放式簡易型。エアーポンプ(小型のもので良い)で空気を送り圧をかける。圧はガラスU字管に入れた水の高さによりモニターする。途中、空気の振動吸収用に10 l くらいのタンクを置く。圧の調節は分岐点から空気を逃がすことで行う。ギガオームシールをつくる時には、10 ml のプラスチック注射器を用いて引圧をかける。引圧の大きさはモニターできないが、シール抵抗をモニターすることで特に困難はない。

れる場合には、急激にシール抵抗(すなわち電位応答の振幅、たとえば1 GΩで100 mV)が大きくなるので、その兆候が見え始めたら、引圧を0に戻す。やや陽圧(10 cm H<sub>2</sub>O 以下)にするとギガオームシール達成が速まることもある。さらに電極をわずかに戻したほうがシールが安定することが多い。次に、パッチ膜を破るために、やや陰圧(40 cm H<sub>2</sub>O 前後)にして、パルス(30 ms, -0.6~-1.0 nA)をワンショットで加える。

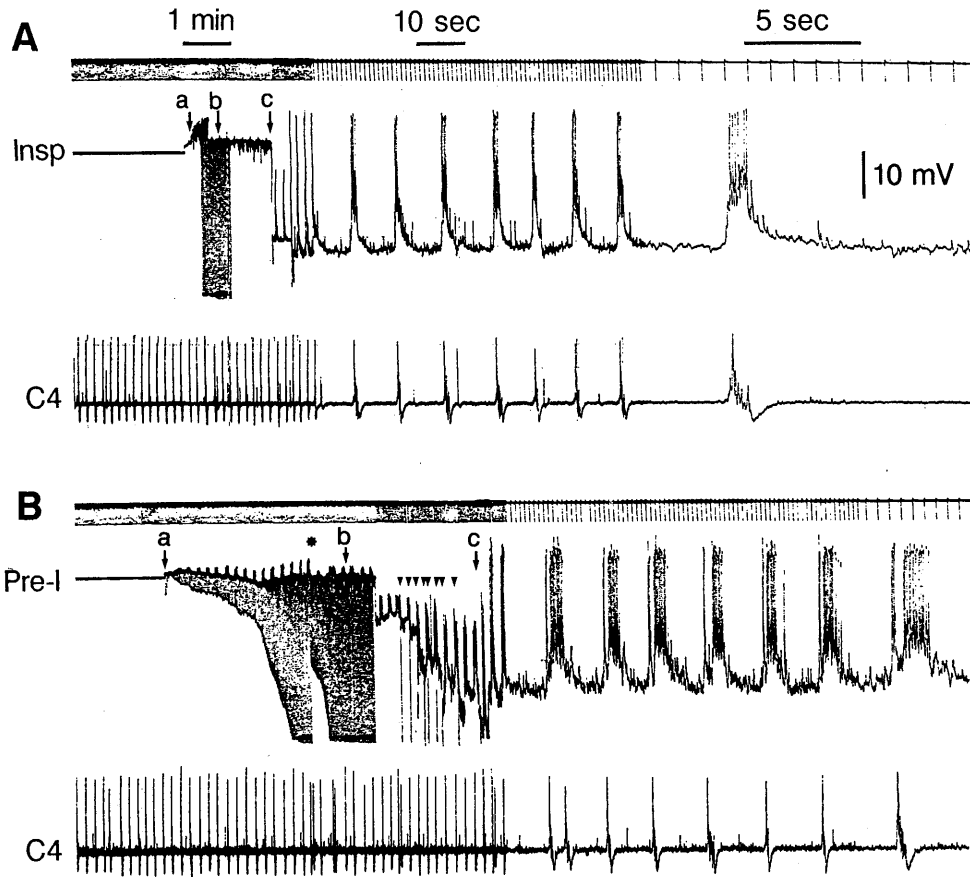


図7. ギガオームシール形成とホールセル記録;実際に実験を行っているときのペンレコーダーによるモニター。A: Insp, 吸息性ニューロンからの電位記録の例。C4, 第4頸髄前根からの吸息性運動神経活動。サウンドモニターで吸息性ニューロンに電極が接しているのを確認したのち, aの時点でシール抵抗モニターのため0.1 nA, 1 Hzのコマンドパルスを加え, パッチ電極に引圧をかけた。ただちにシール抵抗が増加しギガオームシールが形成された(b)。cの時点でパッチ膜を破りホールセル記録状態になった。ペンレコーダーによる記録のため, 活動電位のピーク値は減衰している。B: Pre-I, 吸息先行型(Pre-I)ニューロンからの電位記録の例。a, b, cはAの場合と同様。この場合, 電極に引圧をかけてからギガオームシールが形成されるまでに, 約4分を要している(途中, \*印の時点でペンレコーダーのゲインを下げた)。ニューロンをさがす間に電極先端部がやや汚れてしまったためと考えられる。パッチ膜を破るために, 弱い引圧を加えた状態で, 各矢じりの時点で, 電流パルスを与えた(テキスト参照)。この例では, パッチ膜も破れにくいことを示している。ホールセル記録はAで45分間, Bで70分間維持された。

8. パッチ膜を破り, ホールセル記録状態になったところでコマンドパルスを加えて, シリーズレジスタンス( $R_s$ )を補正する。電極抵抗そのものは3~6 M $\Omega$ であるが, ホールセル記録状態での $R_s$ は10~60 M $\Omega$ と大きくなることが多い。図8に吸息性ニューロンから得

られた, 膜電位トレースと膜の電氣的応答を示す。ホールセル記録法で測定された膜抵抗は, ガラス微小電極によって測定されたものに比較し, 10倍以上高い(200~600 M $\Omega$ )。Nystatinを用いた perforated whole-cell recording(後述)においても, 同様の結果が得られているので,

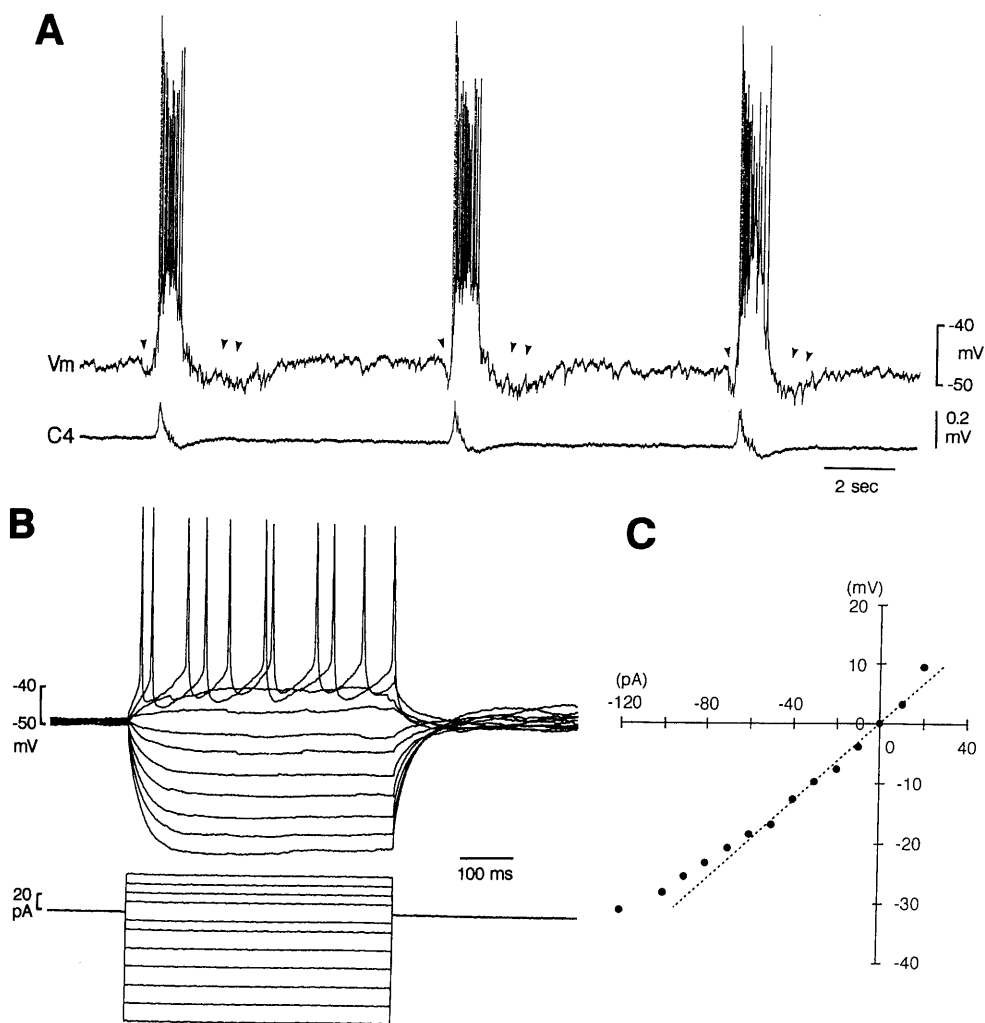


図8. 吸息性ニューロンから得られたホールセル記録と電流-電圧関係. A: 膜電位トレース (Vm) と C4 吸息性活動 (C4). このニューロンは吸息相の前後(矢じり)で過分極を示すタイプ III 吸息性ニューロン<sup>31)</sup>である. B: 500 ms 電流パルスに対する膜電位応答. C: 500 ms パルスの終点で測定された膜電位変化の大きさと刺激電流値のプロット. 破線は抵抗 330 M $\Omega$  を表す. このニューロンの形態は図9に示す.

これはパッチ電極内液による細胞内透析に起因するものではないと思われる.

#### 液間電位 (LJP) と washout

ホールセル記録法によって測定された膜電位は, K-gluconate 電極の場合  $-50$  mV 前後と, ガラス微小電極を用いて測定されたものと比べ, 浅い傾向がある. これは, 電極先端に生じる液間電位 (LJP) により説明されている. LJP

の補正は細胞内が, 完全に電極液で置き変わったと仮定して行う. Neher (1992)<sup>37)</sup> の解説に従って実際測定してみると, K-gluconate 電極を用いた場合には,  $-10 \sim -14$  mV となった. これは細胞外でオフセットを 0 に調整し, 細胞内電位が  $-50$  mV であった場合, 実際の膜電位は  $-60 \sim -64$  mV であることを意味する. しかしながら, 細胞内灌流の効果は, 電極の形状及び  $R_s$  によって影響されると考えられる.

ここで使用するような、先端部が比較的細長く、 $R_s$  が大きい電極では、その効果が少ない可能性がある。K-gluconate のかわりに KCl (LJP = -4 mV) を電極液として用いた場合、または perforated whole-cell recordings を用いたときにも、K-gluconate の場合とほぼ同様の静止電位を得ているので、LJP の寄与はそれほど大きくないと考えられる。通常のホールセル記録では特に Ca チャネルの washout が問題となる。我々の実験では Na 及び K チャネルブロッカーで1時間以上にわたって Ca 活動電位が観察されたことから、この方法においても、ある程度 Ca チャネルの解析が可能であった。

#### 電位固定について

早い時間経過の Ca 電流 (HVA など) を電位固定下で測定することは、固定電位の変動を生じ安く、多くの場合困難をとまなう。呼吸性ニューロンの形態的観察から樹状突起が 500  $\mu\text{m}$  以上にわたって伸びていることもあり、十分なスペースクランプ特性を得ることが、難しいためと考えられる。より遅い時間経過の電流およびシナプス電流に対しては有効であると思われる。

#### シングルチャネル記録

Cell attached mode におけるシングルチャネル解析の可能性が報告されている<sup>32)</sup>。また outside-out 記録の報告もある。これらの方法を用いれば、同定された呼吸性ニューロンのシングルチャネル解析も可能であると思われる。

#### Perforated whole-cell recordings

Horn & Marty (1988)<sup>38)</sup> によって導入された、この方法の最大の特徴は、nystatin を用い、1価イオンのみが通過できるような孔をパッチ膜に開けることで、細胞内成分の記録電極への流出を防ぐことにある<sup>39,40)</sup>。我々の経験では、この記録は、通常のホールセル記録より、さらに長時間にわたって安定であった。Nystatin は保存液として、25 mg/ml (in DMSO) を作り、使

用直前に 100  $\mu\text{g/ml}$  になるように電極液に希釈し、超音波処理を施した後、ミリポアフィルターを通して電極に充填する。一般に電極先端部には nystatin を含まない液を、その後ろに nystatin 液を充填する方法がとられている。しかしながら、陽圧をかけて、ニューロンを探す場合には、電極液は常に流出しているため、先端部の液量をコントロールすることは、実際上不可能である。そこで我々は電極の先端部に直接 nystatin を含む液を充填して使用している。電極液としては、140 (mM) K-gluconate, 4 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES (pH 7.4) または 140 K-gluconate, 0.5 EGTA, 10 HEPES (pH 7.4) を用いている。陽圧のために先端から流出する nystatin 液によりニューロンがダメージを受ける可能性があるため、できるだけ短時間に目的のニューロンを探すことがキーポイントである。ギガオームシール形成は通常のホールセル記録に比べ、やや成功率が低い傾向があった。シール形成後、しだいに電位が深くなり、 $R_s$  が下がり、活動電位が大きくなってくる。5～15分ではほぼ完全に穴があき、細胞内記録と同じ状態になる。この方法においても、ルシファアーイエローを電極液に入れておくと、細胞を標識することができる。とくに膜を破る操作をしなくても長時間 (1時間以上) 記録を続けると、自然に標識されるようである。ただし通常のホールセル記録と比べると、標識は薄い傾向が見られた。

### Ⅲ. 組 織

延髄腹外側部のように、ニューロンが機能的にも形態的にも一様ではない系では、記録をとったニューロンの形態を調べることは、特に重要である。ここでは、最も手軽である、ルシファアーイエローで標識されたニューロンの形態観察について述べる。

1. 実験終了後、標本はまず10%ホルマリン-リン酸緩衝液 (pH 7.0, Lillie 液<sup>41)</sup>) で 4℃, 48時間以上固定する。

2. 標本を5~15%蔗糖-0.1M 磷酸緩衝液<sup>(5)</sup>(PB, pH7.2)で洗う。蔗糖の濃度を5, 10%と段階的に上げて行き(各20分くらい), 15%でオーバーナイトさせる。

3. クリオスタット用の試料ブロック上に, 脊髄を切り落とした標本を, 吻側を下にして包埋剤(Tissue-Tek O. C. T. Compound, MilesInc.)で固定する。クリオスタットで延髄部分の連続切片(70~100 $\mu$ m)を作り, スライドグラス上に並べていく(1スライドグラスあたり8~10切片)。包埋剤を除去するために磷酸緩衝塩溶液<sup>(6)</sup>(PBS)を静かに滴下する。切片に小さい気泡が付着している場合には, コック付きデシケーターを用いて, 軽く脱気するとよい。

4. 別のゼラチン-ミョウバンでコートしたスライドグラス<sup>(7)</sup>に, 切片の数だけ PBS 水滴をたらしておき, そこに切片を移す。PBS を濾紙またはスポイドなどで取り除き, 切片がスライドグラスに接着したところで(しかし完全に乾ききる前に)1:1のグリセリン-PBSで包埋する。これらの作業は, 実体顕微鏡下で行い, できるだけ切片の左右が逆にならないように注意する。最後に透明のエナメル(マニキュア用)でカバーグラスを縁どりし, 密封する。蛍光保存のために, propyl gallate(0.05~0.1%)をグリセリン-PBSに加えると良いと言われている。

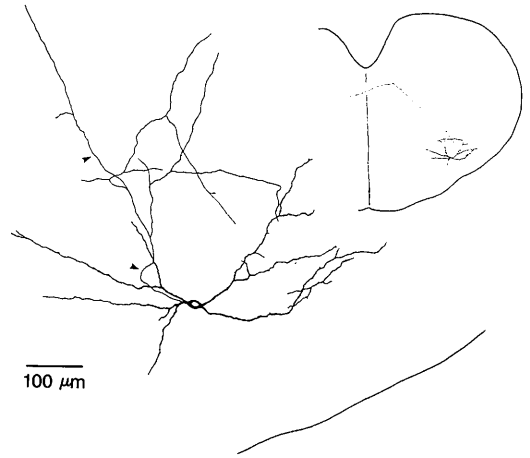


図9. ルシファーイエローにより標識された吸気性ニューロン(図8のもの)の形態. 70 $\mu$ mの厚さの連続切片11枚から描画装置を用いてスケッチし再構成した。延髄腹外側部において, 軸索(矢じり)が複雑に分岐し, そのうちの1つが背側方向へ伸び, さらに反対側に入っている(右挿入図)。

5. 蛍光顕微鏡下での観察はルシファーイエローの場合, B励起フィルターを使用するが, 光を照射すると比較的短時間(数分のオーダー)で蛍光が失われて行くので注意を要する。細胞体のある切片を, はじめに写真撮影(Ektachrome 400, Kodak)し, より詳しいデンドライト, 軸索などの走行を把握するためには, 描画装置(オリンパス BH2-DA)を用いてスケッチする。蛍光の弱い軸索, 細いデンドライトからまずスケッチして行く。切片ごとに別々の紙を使用し, あとでトレーシングペーパー上に全体を再構成する(図9)。

#### IV. 考 察

摘出脳幹-脊髄標本を用いて, 我々は, 呼吸リズム発生の神経機構を調べてきた。これまでの結果は, 呼吸運動の中枢パターンジェネレーターが, リズムジェネレーターと吸気パターンジェネレーターとからなることを示唆している<sup>8)</sup>。リズムジェネレーターは吸気に先行して発火するニューロン群(Pre-Iニューロン群)からなり, その活動は, 吸気時には通常抑制され, 吸気後に再び発火する。一方吸気パターンジェ

(4) Lillie 液: 100ml ホルマリン, 900ml D. W., 5.2g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 16.36g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  の混合液。10%ホルマリン-0.1M PB または, 4%パラホルムアルデヒド-0.1M PB でも可。

(5) 0.1M PB(Sorensen-Gomori 磷酸ナトリウム緩衝液, pH7.2): 0.2M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (A液)と 0.2M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (B液)を 1:2の割合で混合した溶液を D. W. で2倍に希釈する。

(6) PBS: 0.45g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 3.23g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 8g NaCl を D. W. に溶かして 1000ml にする。

(7) ゼラチン-ミョウバンコートスライドグラス: 100ml D. W. に 1g ゼラチン, 0.1g クロムミョウバンを温浴で溶かし, ろ過した液に, スライドグラスを2~3分ひたす。37 $^{\circ}$ C(または室温)でオーバーナイト乾燥させる。

ネレターは、吸息時に発火する吸息性ニューロンから構成される。ホールセル記録による膜電位解析から、吸息性ニューロンは、そのシナプス結合様式に基づいて、少なくとも3つのサブタイプに区別された。つまり、1) Pre-Iニューロンから興奮性入力を受けるもの、2) Pre-Iニューロンとは明確なシナプス結合を示さないもの、3) Pre-Iニューロンから抑制性のシナプス入力を受けるもの(図8)である<sup>31)</sup>。さらに最近、呼吸性ニューロンにおけるCaチャンネルを解析し、ニューロンのサブタイプによって、それらの持つCaチャンネルの特性に差異があることを示唆した<sup>41)</sup>。一方Pre-Iニューロンのあるものは、内因性バースト形成能を有することが示唆されているが<sup>9)</sup>、そのイオン機構に関しては、今後解決すべき問題として残されている。

このin vitro標本は呼吸中枢などの複雑なネットワークを解析するのに極めて有用な実験系であり、パッチクランプ法はその有用性を十分に発揮させるものである。ただ標本を用いるにあたって、組織の内部に行くほど環境が悪化するらしいということに、注意しなければならない。たとえばpHは腹側表面からの深さが300 $\mu$ mで6.8~6.9、500 $\mu$ mで6.6~6.7と報告されている。PO<sub>2</sub>に関しても研究者によって多少差があるものの、灌流液のPO<sub>2</sub>が630~650 Torrのとき、深さ300 $\mu$ mで20または120 Torr、500 $\mu$ mで0または20 Torrという測定結果がある<sup>22,23)</sup>。Brockhaus等<sup>23)</sup>は腹側呼吸性ニューロン群への酸素供給は、ニューロンの好気性代謝及びネットワーク機能の維持に十分であると結論した。我々の経験では、500 $\mu$ mくらいの深さからでも、呼吸性ニューロンの活動を記録することは可能であった。

標本は0~4日齢のラットから取り出したものに限られるという点で、その後起こる神経系の発達の問題が残される。これを解決するために、adult rat(or ginea pig)を用いて、心臓付近の動脈または脳底動脈から生理的塩類溶液(酸素キャリアーを入れる場合もある)を灌流し

た標本が開発されている<sup>42~44)</sup>。最近では、adult rat(or mouse)から呼吸関連のリズミクな活動(XII脳神経根からモニター)を発生するスライス標本が作られている<sup>45)</sup>。また胎児期については、新生ラットと同様の摘出標本を作ることができる<sup>46,47)</sup>。さらに新生ラット延髄からXII脳神経を含むスライス標本を作りリズミクな運動神経活動をXII脳神経根からモニターする方法もある<sup>12)</sup>。これら異なる標本間で得られる結果の比較には、標本に残されているニューロンネットワークの大きさが異なるので、対応する神経活動について注意を要する。しかしながら、機能を残したin vitro標本を用いた研究は、今後ますます増えることが予想され、in vivo実験系では、得られなかった重要な知見がもたらされると期待される。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、御校閲頂きました工藤典雄教授(筑波大学基礎医学系生理学)、御助言を頂きました桑名俊一(帝京大学医学部第一生理)、荒田晶子(昭和大学医学部第二生理)両氏に深謝致します。また終始御支援頂きました本間生夫教授ならびに第二生理学教室の皆様へ深く感謝致します。

#### 文 献

- 1) Suzue, T., Murakoshi, T. & Tamai, S. (1983) Electrophysiology of reflexes in an isolated brainstem-spinal cord preparation of the newborn rat. *Biomed. Res.* **4**, 611-614
- 2) Suzue, T. (1984) Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *J. Physiol.* **354**, 173-183
- 3) Murakoshi, T. & Otsuka, M. (1985) Respiratory reflexes in an isolated brainstem-lung preparation of the newborn rat: possible involvement of  $\gamma$ -aminobutyric acid and glycine. *Neurosci. Lett.* **62**, 63-68
- 4) Murakoshi, T., Suzue, T. & Tamai, S. (1985) A pharmacological study on respiratory rhythm in the isolated brainstem-spinal cord preparation of the newborn rat. *Br. J. Pharmacol.* **86**, 95-104
- 5) Errchidi, S., Monteau, R. & Hilaire, G. (1991) Noradrenergic modulation of the medullary respiratory rhythm generator in the newborn rat: an in vitro study. *J. Physiol.* **443**, 477-498
- 6) Morin, D., Monteau, R. & Hilaire, R. (1991) 5-Hydroxy-tryptamine modulates central respira-

- tory activity in the newborn rat: an *in vitro* study. *Eur. J. Pharmacol.* **192**, 89-95
- 7) Onimaru, H. & Homma, I. (1987) Respiratory rhythm generator neurons in medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Res.* **403**, 380-384
  - 8) Onimaru, H., Arata, A. & Homma, I. (1988) Primary respiratory rhythm generator in the medulla of brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Res.* **445**, 314-324
  - 9) Onimaru, H., Arata, A. & Homma, I. (1989) Firing properties of respiratory rhythm generating neurons in the absence of synaptic transmission in rat medulla *in vitro*. *Exp. Brain Res.* **76**, 530-536
  - 10) Onimaru, H., Arata, A. & Homma, I. (1990) Inhibitory synaptic inputs to the respiratory rhythm generator in the medulla isolated from newborn rats. *Pflugers Arch* **417**, 425-432
  - 11) Smith, J. C., Greer, J. J., Liu, G. & Feldman, J. L. (1990) Neural mechanisms generating respiratory pattern in mammalian brain stem-spinal cord *in vitro*. I. Spatiotemporal patterns of motor and medullary neuron activity. *J. Neurophysiol.* **64**, 1149-1169
  - 12) Smith, J. C., Ellenberger, H. H., Ballanyi, K., Richter, D.W. & Feldman, J.L. (1991) Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* **254**, 726-729
  - 13) Arata, A., Onimaru, H. & Homma, I. (1993) Effects of cAMP on respiratory rhythm generation in brainstem-spinal cord preparation from newborn rat. *Brain Res.* **605**, 193-199
  - 14) Greer, J. J., Smith, J. C. & Feldman, J. L. (1991) Role of excitatory amino acids in the generation and transmission of respiratory drive in neonatal rat. *J. Physiol.* **437**, 727-749
  - 15) Onimaru, H., Homma, I. & Iwatsuki, K. (1992) Excitation of inspiratory neurons by preinspiratory neurons in rat medulla *in vitro*. *Brain Res. Bull.* **29**, 879-882
  - 16) Kashiwagi, M., Onimaru, H. & Homma, I. (1993) Correlation analysis of respiratory neuron activity in ventrolateral medulla of brainstem-spinal cord preparation isolated from newborn rat. *Exp. Brain Res.* **95**, 277-290
  - 17) Harada, Y., Wang, Y. Z. & Kuno, M. (1985) Central chemosensitivity to  $H^+$  and  $CO_2$  in the rat respiratory center *in vitro*. *Brain Res.* **333**, 336-339
  - 18) Harada, Y., Kuno, M. & Wang, Y. Z. (1985) Differential effects of carbon dioxide and pH on central chemoreceptors in the rat *in vitro*. *J. Physiol.* **368**, 679-693
  - 19) Monteau, R., Morin, D. & Hilaire, G. (1990) Acetylcholine and central chemosensitivity: *in vitro* study in the newborn rat. *Respir. Physiol.* **81**, 241-254
  - 20) Issa, F. G. & Remmers, J. E. (1992) Identification of a subsurface area in the ventral medulla sensitive to local changes in  $PCO_2$ . *J. Appl. Physiol.* **72** (2), 439-446
  - 21) Okada, Y., Mückenhoff, K. & Scheid, P. (1993) Hypercapnia and medullary neurons in the isolated brain stem-spinal cord of the rat. *Respir. Physiol.* **93**, 327-336
  - 22) Okada, Y., Mückenhoff, K., Holtermann, G., Acker, H. & Scheid, P. (1993) Depth profiles of pH and  $PO_2$  in the isolated brain stem-spinal cord of the neonatal rat. *Respir. Physiol.* **93**, 315-326
  - 23) Brockhaus, J., Ballanyi, K., Smith, J. C. & Richter, D.W. (1993) Microenvironment of respiratory neurons in the *in vitro* brainstem-spinal cord of neonatal rats. *J. Physiol.* **462**, 421-445
  - 24) McCrimmon, D. R., Smith, J. C. & Feldman, J. L. (1989) Involvement of excitatory amino acids in neurotransmission of inspiratory drive to spinal respiratory motoneurons. *J. Neurosci.* **9**, 1910-1921
  - 25) Liu, G., Feldman, J. L. & Smith, J. C. (1990) Excitatory amino acid-mediated transmission of inspiratory drive to phrenic motoneurons. *J. Neurophysiol.* **64**, 423-436
  - 26) Liu, G. & Feldman, J. L. (1992) Quantal synaptic transmission in phrenic motor nucleus. *J. Neurophysiol.* **68**, 1468-1471
  - 27) Kudo, N. & Yamada, T. (1987) N-Methyl-D, L-aspartate-induced locomotor activity in a spinal cord-hindlimb muscles preparation of the newborn rat studied *in vitro*. *Neurosci. Lett.* **75**, 43-48
  - 28) Smith, J. C. & Feldman, J. L. (1987) *In vitro* brainstem-spinal cord preparations for study of motor systems for mammalian respiration and locomotion. *J. Neurosci. Meth.* **21**, 321-333
  - 29) Atsuta, Y., Garcia-Rill, E. & Skinner, R.D. (1990) Characteristics of electrically induced locomotion in rat *in vitro* brain stem-spinal cord preparation. *J. Neurophysiol.* **64**, 727-735
  - 30) Edwards, F. A., Konnerth, A., Sakmann, B. & Takahashi, T. (1989) A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflugers Arch.* **414**, 600-612
  - 31) Onimaru, H. & Homma, I. (1992) Whole cell recordings from respiratory neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations isolated from newborn rats. *Pflugers Arch.* **420**, 399-406
  - 32) Smith, J. C., Ballanyi, K. & Richter, D. W. (1992) Whole-cell patch-clamp recordings from respiratory neurons in neonatal rat brainstem *in vitro*. *Neurosci. Lett.* **134**, 153-156
  - 33) Pickering, T. E., Spanswick, D. & Logan, S. D.

- (1993) 'Whole-cell patch-clamp recording from neurones in spinal cord slices' in PART III Central Nervous System. pp.169-188. Electrophysiology, a practical approach (edited by Wallis D. I.). Oxford Univ. Press Inc., New York.
- 34) Blanton, M. G., Lo Turco, J. J. & Kriegstein, A. R. (1989) Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *J. Neurosci. Meth.* **30**, 203-210
- 35) Onimaru, H., Arata, A., & Homma, I. (1987) Localization of respiratory rhythm-generating neurons in the medulla of brainstem-spinal cord preparations from newborn rats. *Neurosci. Lett.* **78**, 151-155
- 36) Arata, A., Onimaru, H. & Homma, I. (1990) Respiration-related neurons in the ventral medulla of newborn rats in vitro. *Brain Res. Bull.* **24**, 599-604
- 37) Neher, E. (1992) 'Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments' in *Methods in Enzymology* (edited by Rudy B. & Iverson, L. E.). Vol 207, pp.123-131. Academic Press, Inc.
- 38) Horn, R. & Marty, A. (1988) Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole cell recording method. *J. Gen. Physiol.* **92**, 145-159
- 39) Korn, S. J. & Horn, R. (1989) Influence of sodium-calcium exchange on calcium current rundown and the duration of calcium-dependent chloride currents in pituitary cells, studied with whole cell and perforated patch recording. *J. Gen. Physiol.* **94**, 789-812
- 40) Armstrong, D. & White, R. E. (1992) An enzymatic mechanism for potassium channel stimulation through pertussis-toxin-sensitive G proteins. *TINS* **15**, 403-408
- 41) Onimaru, H., Ballanyi, K. & Richter, D. W. (1994) Analysis of calcium channels of respiratory neurons in the newborn rat medulla in vitro by whole-cell recordings. *Jpn. J. Physiol. Supp.* in press
- 42) Morin-Surun, M. P. & Denavit-Saubié, M. (1989) Rhythmic discharges in the perfused isolated brainstem preparation of adult guinea pig. *Neurosci., Lett.* **101**, 57-61
- 43) Hayashi, F., Jiang, C. & Lipski, J. (1991) Intracellular recording from respiratory neurones in the perfused in situ rat brain. *J. Neurosci. Meth.* **36**, 63-70
- 44) Kuwana, S., Morawietz, G. & Richter, D. W. (1992) The respiratory network in isolated perfused brainstem of rat. *Pflugers Arch.*, **420**, R 125
- 45) Paton, J. F.R., Ramirez, J. M. & Richter, D. W. (1994) Mechanisms of respiratory rhythm generation change profoundly during early life in mice and rats. *Neurosci. Lett.* **170**, 167-170
- 46) Di Pasquale, E., Monteau, R. & Hilaire G. (1992) In vitro study of central respiratory-like activity of the fetal rat. *Exp. Brain Res.* **89**, 459-464
- 47) Greer, J. J., Smith, J. C. & Feldman, J. L. (1992) Respiratory and locomotor patterns generated in the fetal rat brain stem-spinal cord in vitro. *J. Neurophysiol.* **67**, 996-999

## 第74回 北海道医学大会生理系分科会

日 時：平成6年9月17日(土)

会 場：ムトウビル講堂(6F)

当番幹事：北海道大学電子科学研究所 下澤樞夫

×は非会員を示す

### 1. 歩行運動中のゴキブリのキノコ体ニューロンの活動

水波 誠・×池田潤治・×ニコラス ストラスフェルド\* (北大, 電子研・アリゾナ大, 神経生物\*)

我々は極細ワイヤ電極(直径  $20\mu\text{m}$  の被覆銅線)を用いて自由歩行中のゴキブリの中樞のニューロンの活動を慢性記録し、記録終了後には銅イオンを組織中に注入し銀増感によって電極近傍のニューロンを染め出す技術を開発していたが、今回この方法を用いて脳の高次中枢の1つであるキノコ体の入力部(傘)や出力部(柄,  $\beta$ 葉, 柄葉接合部)のニューロンの感覚刺激時および歩行運動中の活動について調べた。

傘のニューロンの多くは感覚性で、嗅覚、視覚、気流、接触刺激などに反応した。柄や $\beta$ 葉のニューロンの多くは歩行運動中に顕著な活動を示した。柄葉接合部には歩行の開始に先行して活動するニューロン群があった。例えば柄葉接合部のあるニューロンは低い頻度の自発放電を示し、その頻度は右へのターンの際に顕著に増加したが、スパイク頻度の上昇はターンの開始に0.3~1秒先行して始まった。このニューロンのスパイク放電は前進時には多少増加し、左へのターンの際は強く抑制された。これらのニューロンはキノコ体の柄葉接合部から前大脳側方に投射するキノコ体出力ニューロンの1種であることが記録後の染色像の観察から示唆された。これらの結果はキノコ体が歩行運動の組み立てに深く関与することを示唆するものである。

### 2. コオロギ気流感覚神経細胞のヒステリシス特性

×赤沢年一・×清水利伸・×馬場欣哉・下澤樞夫(北大, 電子科学研究所, 神経情報)

コオロギ尾葉にある気流感覚毛は、逃避行動を引き起こす入力感覚器の1つである。気流感覚毛の根元にはそれぞれ1個の感覚神経細胞があり、感覚毛が傾くと活動電位を発生する。我々は、Gauss 白色雑音を気流刺激とし活動電位の列までを信号変換器とみなし、Wiener の白色雑音法を用いてこの系の活動電位発射

特性を調べた。その結果、この系は線形フィルタの後に非線形なパルス密度変調器が連なったモデルで表現できることがわかった。しかし、モデルから推定した出力と、同じ刺激を繰り返し与えて得た加算平均ヒストグラムとは細部で異なっていた。両者の平均自乗誤差は28.8%であった。その差異を検討した結果、感覚神経細胞の活動電位発生はパルス密度変調器への入力の時値だけでなく、入力時値の変化率にも依存することが明らかとなった。すなわち、パルス密度変調器はヒステリシス特性を持つことがわかった。このとき、モデルから推定した出力の加算平均ヒストグラムに対する平均自乗誤差は16.0%であった。また、Wiener の白色雑音法はヒステリシス特性を有する系にも適用できると言える。

### 3. 日常の明暗環境下で観察された生体リズムの内的脱同調

橋本聡子・中村宏治・本間研一・本間さと(北大, 第一生理)

21才の男子学生の睡眠覚醒リズムを、日常の明暗サイクル下で約一ヶ月毎に一週間記録し、その後続けて血中メラトニンリズムを3日間にわたり4度測定した。睡眠時刻は被験者の自由に任せしたが、およそ20:00時から12:00時の間にあった。一方、血中メラトニンリズムは24.18時間でフリーランを示し、生体リズムの内的脱同調が見られた。次に約一ヶ月間、睡眠時間を24時~8時に指定し、毎週末血中メラトニンリズムを測定した。メラトニンリズムは24.12時間でフリーランを続けた。

一方200, 500, 1000, 5000, 10000 lx の光を体温の最低時刻より3時間被験者に照射し、これらの光に対する夜間血中メラトニン濃度の抑制反応を観察したところ1000 lx 以上の照度で抑制が見られた。以上のことから、この被験者に関して強制的な睡眠時刻の指定は体内時計を同調させる因子として十分とはいえず、また光による同調の閾値は夜間血中メラトニン濃度の抑制の閾値よりもはるかに高いことが示唆された。

#### 4. 血中メラトニン濃度の夜間上昇を認めない非24時間睡眠覚醒リズム症候群患者に対するメラトニン補充療法の試み

中村宏治・橋本聡子・本間さと・本間研一(北大, 第一生理)

【目的】 高校生の時より睡眠覚醒リズム障害に悩む被験者の血中メラトニン濃度を測定したところ, 基礎分泌のみで夜間の上昇を認めなかった. また近年, メラトニン経口摂取によってヒトの体内時計の位相を変位させ, さらに視覚障害者の血中メラトニンのフリーラン周期を変化させたとの報告がある. そこで, メラトニンを経口投与し, その前後の体内時計への影響を調べた.

【方法】 informed consent を得た後, 10週間にわたりメラトニンを 3 mg, 及び, 6 mg ずつ経口投与した. その間の睡眠覚醒リズム, 血中メラトニン, 血中コチゾール, 体温などを測定した.

【結果】 睡眠覚醒リズムは, フリーランせずほぼ固定化された. 被験者自身の睡眠感と日中の QOL は大きく改善した. よって, 非24時間睡眠覚醒リズム症候群はメラトニン経口投与により軽快した.

【考察】 メラトニン経口投与は, 睡眠覚醒リズム障害の新しい治療法となる可能性がある. また, メラトニンはヒトの体内時計の同調に役割を担っている可能性がある.

#### 5. 昼行性シマリス行動リズムの特徴

本間さと, 安倍 博, 本間研一(北大, 第一生理)

哺乳動物の体内時計機能の多くは, 夜行性齧歯類を用いて研究されている. しかし, ヒトの概日リズムにみられる, 内的脱同調, サーカディアンリズムなどは, 夜行性齧歯類には出現せず, ヒト概日リズムのモデルとしては問題があった. そこで, 昼行性齧歯類のシマリスを用い, 光同調機構について調べた.

実験には33匹の雌雄の朝鮮シマリス (*Eutamias Asiaticus*) を用い, 自発行動リズムと輪回し運動リズムを解析した. シマリスは明暗サイクル下で高振幅の昼行性行動リズムを示した. 24時間周期で明暗比を変える実験では, 一日12時間から30分までの明期に同調し, その際, 行動開始位相は, 明期4時間までは明期の midpoint に, 3時間から30分までは, 暗期開始に一致した. 6時間明で暗期の長さを変える T 実験では, 22~30時間周期まで安定した同調が確認された. また, 12時間周期まで, 明期に一致した行動リズムを, 28~

30時間周期では相対的協調を示した. T 実験結果から求めた光に対する位相反応曲線は, ヒトと同様, 主観的明期後半に後退相, 暗期後半に前進相があった.

#### 6. SCN 近傍細胞外液中興奮性アミノ酸量のサーカディアンリズム

勝野由美子, 本間さと, 篠原一之, 安倍 博, 本間研一(北大, 第一生理)

視交叉上核(SCN)に存在する生物時計は, 網膜視床下部路を介して光同調を受けており, その神経伝達物質は興奮性アミノ酸であると考えられている. しかし, その生理的変動や光に対する反応性は未だ不明である. そこで, 明暗条件下(明期6~18時)で飼育した Wistar 系成熟雄ラットを用い, 無麻酔無拘束で, *in vivo* マイクロダイアリシスを用い, SCN 近傍細胞外液中のグルタミン酸およびアスパラギン酸量の変動を調べた. 48時間のダイアリシスを, 第一日目は明暗条件下で, 2日目は連続暗あるいは連続明の条件下で行った. 一時間毎に採取した透析液中のアミノ酸量は, HPLC を用い電気化学的に検出した.

透析液中の両アミノ酸量は, 24時間に渡りスパイク状に変動し, 両者間には有意の正の相関が認められた. また, 明暗条件下では暗期に上昇する明瞭なリズムを示したが, 連続暗第一日目ではその振幅が減少した. 以上の結果, SCN 近傍細胞外液中の興奮性アミノ酸は, 生物時計への光入力よりもむしろ時計のリズム表現を反映するが, その振幅は明暗周期により修飾されることが明らかとなった.

#### 7. 単一蛍光測定法を用いた DNA ハイブリダイゼーションの検出

金城政孝, 小山富康(北大, 電子研, 細胞機能研究分野)

我々は, 単一細胞の生理活性を測定するために, 自己相関蛍光分光器(FCS)を用いた単一分子解析システムを開発中である. 今回, この開発中の装置の紹介と DNA の会合を例にその解析方法を報告した. FCS は, 蛍光顕微鏡, 連続発振アルゴンレーザー(500  $\mu$ W)とデジタルオートコリレーター(ALV 5000)を中心に組み合わせた構成である.

ユニバーサルシークエンシングプライマーと M13 mp18 ss DNA の会合過程の解析は 0.18M NaCl (20  $\mu$ l) 中で種々の温度で反応させ, 一定時間毎に FCS により, 反応液中の未結合と結合したプライマー比を

なんら分離操作を行う事なしに決定した。得られた結果から、反応速度定数と活性化エネルギーを見積もり、その値が妥当なものである事を確認した。また、会合過程のフィッティング(Cot 曲線)からこの過程が一状態モデルではうまくいかない事が示唆されたので、次に滴定実験により、結合サイトの数を、同じく FCS を用いて求めた。その結果、ターゲットの DNA 1 分子に対してプライマー DNA が 2 分子結合している事が示された。両 DNA 間での塩基配列のホモロジー検索の結果は、二つ以上のサイトが存在する可能性を示し測定結果を支持した。

## 8. 自然発症高血圧ラット (SHR) の心筋毛細血管網

×高明, 小山富康(北大, 電子研細胞機能素子)

本態性高血圧症のモデルとも言われる SHR の左室心筋では、高齢に於いてのみ毛細血管密度が低下すると言われる。本研究では 11 週令の SHR とその同系の正常血圧ラット (WKY) について、動脈性・静脈性毛細血管それぞれの標識酵素を弁別染色することにより血圧上昇にともなう毛細血管網の挙動を詳細に検討した。毛細血管密度は従来の報告の通り、SHR と WKY との間に大差なく、心筋細胞の断面積は増大していた (762 vs 460  $\mu\text{m}^2$ )。従って心筋細胞一個当たりの毛細血管数は、SHR で著しく増加していた (1.40 vs 1.04)。これは心筋細胞の肥大にともなう酸素の拡散距離の延長という不利な変化を抑える方向に作用する。しかしながら本研究では、静脈性毛細血管の比率が SHR で有意に上昇する (75 vs 60%, 密度としては 1471 vs 1126/ $\text{mm}^2$ ) という新しい成績が得られた。静脈性毛細血管を流れる血液は酸素分圧が低いので心筋への酸素の供給能率は高くない。さらに動脈性・静脈性毛細血管ともに心筋組織の担当面積は増加していた (それぞれ 660 vs 556  $\mu\text{m}^2$ , 569 vs 500  $\mu\text{m}^2$ )。従って心筋細胞の肥大を補うための毛細血管網の適応は進行しているが、必ずしも充分ではないと結論される。

## 9. $\text{Ca}^{2+}$ による PS 膜融合における脂質分子運動

×河田伸一朗, 小山富康, 荒磯恒久, ×長谷部清\*(北大, 電子研細胞機能素子・地球環境科学研究科\*)

PS (phosphatidylserine) 二重層ベシクルは、 $10^{-3}$  M オーダーの  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で接着し融合する。 $\text{Mg}^{2+}$  は単独では PS ベシクルの接着のみを誘導し融合を引き起こさないが、 $\text{Ca}^{2+}$  による融合を促進する。

bovine brain PS ベシクル接着に要する濃度は  $\text{Ca}^{2+}$  2 mM,  $\text{Mg}^{2+}$  5 mM であり同じオーダーであるが、融合に対する効果は両イオンで大きく異なる点に興味もたれる。本研究では N-NBD-PE を蛍光プローブとする時間分解蛍光偏光解消法により  $\text{Ca}^{2+}$  及び  $\text{Mg}^{2+}$  存在下での bovine brain PS ベシクルの分子運動を測定し、両イオンの膜分子運動に対する効果の違いを検討した。

その結果、PS ベシクル接着が誘起されるイオン濃度において、 $\text{Ca}^{2+}$  は運動速度を遅くし、運動範囲を狭めることが見出された。一方  $\text{Mg}^{2+}$  存在下では、イオン添加前とほぼ同様の値を示し、 $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Mg}^{2+}$  では PS 分子運動に与える効果が大きく異なっていることが明らかとなった。このことから  $\text{Ca}^{2+}$  は  $\text{Mg}^{2+}$  に比べ隣接する PS 分子を引き付ける力が強く、膜融合過程において極性頭部を内側にした逆ヘキサゴナル形の間体構造形成を促進するものと考えられる。

## 10. 脂質二重層膜相転移過程でのコレステロールの役割

×早川枝利, ×長沼陸雄\*, ×石輝橋雄\*\*, 小山富康・下澤樞夫・荒磯恒久(北大, 電子研・神経内科\*・第二生化\*\*)

生体膜の融合現象は、生体機能のさまざまな面で、重要な役割をもっている。この生体膜間での膜融合機構の初期過程において逆ヘキサゴナル II ( $\text{H}_{II}$  相) 構造に類似した中間体ができることが想定されている。

細胞膜は通常脂質二重層構造 (ラメラ相:  $\text{L}\alpha$ ) をとるが、リン脂質のバランスにより二分子膜が単独では形成できなくなり、 $\text{H}_{II}$  相構造をとる場合がある。生体膜の主要脂質のうち、ホスファチジルコリン (PC) は  $\text{L}\alpha$  相を安定化するのに対し、ホスファチジルエタノールアミン (PE) やコレステロール (Chol) は  $\text{H}_{II}$  相の形成を促進する。

本研究では PC, PE, Chol から成る脂質膜の, DOG により誘導される  $\text{L}\alpha$  相  $\rightarrow$   $\text{H}_{II}$  相への移行過程での Chol の役割を調べるため、牛脳 PC 牛脳 PE/Chol (1 : 1 : 1, mol/mol) で構成されたりポソームと Chol の蛍光アナログとしてデハイドロエルゴステロール (DHE) を用いて、ピコ秒パルスレーザーを用いた時間分解蛍光偏光解消法により Chol の分子運動を測定した。 $\text{L}\alpha \rightarrow \text{H}_{II}$  相転移過程において、 $\text{L}\alpha \cdot \text{H}_{II}$  相が混在する時に Chol 分子の運動性が活発になることが見い出され、Chol 独自の分子運動が相転移を促進

することが示唆された。

### 11. 咳反射終了後に持続する喉頭反射の促進

×片田彰博, 小林吉史, 坂本尚志(旭川医大, 第二生理)

咳反射時には, 声門閉鎖筋の筋活動が一過性に増大し, 気管内圧が上昇して強大な呼吸が形成される。本研究では, 声門閉鎖筋に誘発される喉頭反射を指標として, 咳反射に伴う声門閉鎖筋の興奮性の変化を解析した。

実験には無麻酔中脳ネコ( $n=5$ )を用いた。一側の上喉頭神経内枝(ISLN)に, 持続 $20\sim 50\mu\text{sec.}$ , 喉頭反射閾値の1.1倍(1.1T)の矩形波電気刺激を,  $0.33\sim 0.5\text{Hz}$ の頻度で加え, 甲状披裂筋(TA)の誘発筋電図を記録した。同じ電極から $1.1\sim 5.0\text{T}$ の刺激を $33\text{Hz}$ ,  $3\text{sec}$ 間加え, 咳反射を誘発した。誘発筋電図を全波整流し, 潜時 $6.5\sim 22.5\text{msec.}$ の範囲を積分した値を喉頭反射の指標とし, 咳反射の前後で比較検討した。

咳反射直後, 喉頭反射は安静呼吸時に比べて $1.97\pm 0.6$ 倍に増大し, 徐々に減少して $100\sim 175\text{sec.}$ 後には安静呼吸時のレベルに戻った。安静呼吸時, 喉頭反射は, 呼吸相では吸気相の $1.28\pm 0.12$ 倍であり, 有意に大きかった。しかし, 咳反射後の喉頭反射の増加率とその経時変化には, 呼吸位相による差が認められなかった。

咳反射が繰り返されると, 先行する咳反射に引き続いて, 声門閉鎖が生じやすい状態が持続していることが示唆された。

### 12. 橋呼吸調節中枢と延髄後台形体核(retrotrapezoid nucleus)から Böttinger 複合体への軸索投射

×宋 剛, 里 康光, 青木 藩(札幌医大, 医, 第二生理)

Böttinger複合体(Böt)は延髄後顔面神経核の周囲にある呼吸性ニューロン群である。出力性線維は背側と腹側呼吸性ニューロン群へ投射する。しかし, Bötへの入力性投射はよくわかっていない。そこで本実験は成ネコを用い, 組織学的にWGA-HRP法による逆行性標識法と微小電気刺激による逆向性応答法の両者を用いてその入力投射を調べた。まず麻酔したネコを用い, 露出した延髄に2連ガラス電極を刺入し, Bötから呼吸性ニューロン発射を細胞外記録し, その部位ヘナノリッターポンプを用いてWGA-HRP(5%,  $15\sim$

$60\text{nl}$ )を注入した。ネコを48時間後に灌流固定し, 作製した脳幹の薄片をTMB法で反応させた。一側のBötにWGA-HRPを注入した例では逆行性標識細胞が同側の橋吻側部の外側腕核(NPBL), KF(Kölliker-Fuse)核と延髄腹外側の後台形体核(RTN)に多く観察された。その他同側の背側孤束核(NTS), 内側結合腕傍核(NPBM), 大縫線核(NRM)にも少数観察された。Bötを微小電気刺激( $50\mu\text{A}$ 以下)すると逆向性応答するニューロンも橋のPBLとKFに多数記録された。以上の成績は橋呼吸調節中枢と延髄RTNからBötへの特異的軸索投射の経路の存在を示唆する。

### 13. 海馬スライスにおけるCA1野錐体細胞と歯状回顆粒細胞の虚血様負荷に対する反応の差

清水 斎, 水口 章, 青木 藩(札幌医大, 医, 第二生理)

虚血に対するニューロンの障害の部位差を神経生理的機能の面から, 明らかにすることを目的として, ラット海馬スライス標本を用い, 低酸素・無グルコース負荷(虚血様負荷)時の, CA1野錐体細胞(PC)と歯状回顆粒細胞(GC)膜電位と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化を比較した。さらに, これらの反応に, CA3野を介したPCとGCの線維連絡が関与しているかどうかを調べる目的で, CA3野を除去したスライスを用い, 同様の比較を行った。

細胞内記録法により, 細胞内電位を導出記録した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は, Fura-2/AMを負荷したスライスで, 細胞内記録と同時に測定した。虚血様負荷により, PCでは, 膜電位が平均 $10.5\text{mV}$ ( $n=10$ )の過分極を示した後,  $7\sim 10$ 分で急速に脱分極した。GCでは, 過分極は平均 $3.1\text{mV}$ ( $n=10$ )で小さく,  $8\sim 11$ 分で脱分極は緩やかに進行した。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は脱分極に一致して急速に上昇し, その最高値はCA1野が歯状回より有意に高かった。CA3野を除去したスライスにおいて, 同様の傾向が維持された。

これらの成績から, PCとGCでは, 虚血様負荷に対する反応に差があり, それは, 主としてニューロン自体の持つ電気的性質の差によることが示唆された。

### 14. ラット海馬スライス標本のCA1野フィールド電位に及ぼす静脈麻酔薬ミダゾラムの影響

里 康光, 清水 斎, 青木 藩(札幌医大, 医, 第二生理)

今回我々は, ベンゾジアゼピン系静脈麻酔薬である

ミダゾラムの海馬シナプス伝達に及ぼす影響を調べる目的で、ラット海馬スライス標本を用いて、CA1野錐体細胞層(CA1)のフィールド電位に及ぼすミダゾラム投与の影響を検討した。

同一スライスで順向性刺激を Schaffer の側枝に、逆向性刺激を alveus に加え、CA1野からフィールド電位の細胞外記録を行った。ミダゾラム投与により、順向性刺激による population spike(N2)の振幅は用量依存性に(25, 50, 75 $\mu$ M)著明に減少したが、fiber volley(N1)の振幅はわずかにしか減少しなかった。逆向性刺激による population spike(anti-PS)の振幅もほとんど減少しなかった。Peak latency, duration は N2 で延長する傾向を示したが、N1, anti-PS では有意な変化はなかった。これらの成績から、ミダゾラム投与は用いた投与量では、軸索での伝導と細胞体膜自体にはあまり影響を及ぼさず、シナプス前末端の伝達物質の放出とシナプス後膜の EPSP 発生に抑制作用を及ぼすことが示唆された。

#### 15. ネコ前肢運動ニューロンと横隔膜運動ニューロンにおける赤核性と大脳性 EPSP の促進

藤戸 裕, 青木 藩(札幌医大, 医, 第二生理)

赤核と前肢遠位筋支配運動ニューロン(Mn)間、及び皮質脊髄路と横隔膜 Mn 間のそれぞれの単シナプス接続が示唆されてきた。今回は対側赤核及び大脳脚の単発刺激により頸髄 Mn に誘発された EPSP の髄節潜時と2発刺激(interval 3ms)による EPSP の促進を比較した。ネコをネブタールで麻酔しガラミンで不動化した。赤核の単発刺激により72%(88/122)の前肢 Mn において EPSP が記録された。C8-T1 前肢 Mn では50%(23/46)の赤核性 EPSP で髄節潜時が1.0ms 以下であった。それに対し C6-C7 前肢 Mn では7%(3/42)のみ髄節潜時が1.0ms 以下であった。赤核と前肢遠位筋 Mn 間の接続の相当部分は単シナプス性であることが示唆された。髄節内潜時1ms 以下の赤核性 EPSP の促進(V2-V1)/V1 は1つの例外を除いて50%以下(n=17)であり、単シナプス性赤核 EPSP の弱い促進を認めた。髄節潜時1.8ms 以上の多シナプス性赤核 EPSP では促進は160~900%(n=9)であった。大脳脚単発刺激により33%(18/54)の横隔膜 Mn において EPSP が記録され、2個の EPSP の髄節潜時が1ms 以下であった。大脳性 EPSP の促進は4/10の横隔膜 Mn で50%以下であった。

#### 16. アメリカザリガニ尾扇運動を修飾する下行性介在神経の投射形態

×難波寿明, 長山俊樹, 高畑雅一(北大, 理, 生物学)

アメリカザリガニの尾扇肢に接触刺激を与えると回避行動を示し、その際に尾扇肢が閉じる運動パターンが腹部最終神経節内の局所回路により形成される。一方、腹部伸展誘起神経束刺激による伸展中には尾扇肢が開くパターンが形成され、感覚刺激に対する応答を示さない。この尾扇肢運動パターンに変化をもたらす下行性入力源を知るため、神経束刺激に対し直接又は間接的に興奮する下行性介在神経を細胞内記録・染色により解析した。

その結果7種類の下行性介在神経が、尾扇肢運動神経への出力効果と最終神経節への投射形態から同定された。これらには、尾扇肢閉筋支配の運動神経を抑制し開筋支配の運動神経を興奮させる効果を持つものと、両方を興奮させるものが含まれていた。これらが腹部姿勢系に及ぼす効果は比較的弱く、顕著な出力パターンは得られなかった。またすべての下行性介在神経は軸索を、刺激部位と同様、縦連合の側方領域にもち、最終神経節ニューロパイルの背側領域に投射していた。このことは、局所回路神経要素のうち前運動性ノンスパイク介在神経あるいは尾扇肢運動神経との接続を示唆している。

#### 17. ザリガニ同定ノンスパイク介在神経の樹状突起膜性質の領域差

高橋幹雄, ×高島 聡, 高畑雅一(北大, 理, 生物学)

アメリカザリガニ尾扇感覚系の同定ノンスパイク介在神経(LDS細胞)樹状突起にステップ定電流注入を行い、これに対する膜応答を調べ、入力抵抗と膜時定数が樹状突起の部域によりどのように異なるかを検討した。電極刺入部位は、ガラス管微小電極から蛍光色素 Lucifer yellow を注入し、in situ での励起用紫色光の落射照明により実体顕微鏡下で確認した。

LDS細胞は、腹部最終神経節内で、ほぼ左右対称に水平に樹状突起を広げ、中心線付近で、太いアーチ状の突起で結ばれている。アーチ状突起(直径約20 $\mu$ m;長さ約300 $\mu$ m)における入力抵抗と時定数は7.6 $\pm$ 0.7M $\Omega$  および 16.0 $\pm$ 1.7msec であった(n=22)。辺縁部域の細い突起(直径5から10 $\mu$ m)では、それぞれ 13.9 $\pm$ 1.3M $\Omega$ , 26.2 $\pm$ 2.9msec であった(n=15)。

入力抵抗, 時定数ともに, 辺縁部域と較べてアーチ状突起での値は有意に低かった ( $P < 0.01$ ; 両側 t-検定).

一方, 脱分極時に見られる外向き整流性質および大きな過分極(静止電位から約  $-30$  mV)に対して見られる内向き整流性質は, とともに樹状突起の部位にかかわらず観察された.

#### 18. 絶食による褐色脂肪組織の変化—特に in vitro 熱産生能と脂肪分解能—

長嶋雄一, 菊地計, 黒島晨汎(旭川医大, 第一生理)  
褐色脂肪組織 (BAT) は非ふるえ熱産生の主要部位であり, その機能の重要な調節因子は BAT に豊富に分布している交感神経のノルアドレナリン (NA) であることが知られている. BAT の機能は寒冷馴化や過食により促進される一方, 絶食により抑制されることが報告されている. 本研究では温暖馴化ラットを用いて, 絶食 (24~120時間) が BAT に及ぼす影響について in vitro 熱産生能を測定すると共に, 酸素消費量測定メヂウム中に放出された遊離脂肪酸 (FFA), グリセロールを測定することにより脂肪分解能としその関連性を検討した. また絶食が BAT の DNA に及ぼす影響も検討した.

絶食により体重, BAT 重量は有意に減少した. 総 DNA は漸減し絶食 5 日群で対照群と比較して有意差が認められた. 基礎酸素消費量, 基礎 FFA 及びグリセロール放出量も絶食により抑制されたが, 基礎グリセロール放出量の抑制が先行した. NA, グルカゴンに対する最大酸素消費量, 最大 FFA 及びグリセロール放出量も同様の結果であり, Lipolysis の低下が respiration の低下に先行することが示された. 本研究の結果は, 絶食時には cellularity, 細胞活性ら幾つかの側面からの BAT 機能の抑制がエネルギー基質を保持する様に働いていることを示している.

#### 19. 褐色脂肪組織内 NO 合成酵素の組織化学的同定

Shyamal Kumar Saha, 大日向浩, 岩元純, 黒島晨汎(旭川医大, 第一生理)

一酸化窒素合成酵素 (NOS) は NADPH-diaphorase と同一であるために, 従来から知られた nitro blue tetrazolium (NBT) を用いた酵素組織化学的方法による検出が可能である. 近年, 種々の主要臓器における NOS の存在が多数報告されているが, 本研究では Wistar rat の肩甲間褐色脂肪組織を用いて NOS の検出を試みた. 2% paraformaldehyde リン酸緩衝液に

より, 灌流固定された動物より摘出された褐色脂肪組織及び対照組織である脳, 消化管は, 後固定の後, 15% sucrose 液に一昼夜浸された. その後, 組織は凍結薄切 ( $20 \mu\text{m}$ ) され, 一時間にわたって NBT,  $\beta$ -NADPH を含む混合反応液内で培養された. 褐色脂肪組織全体で NBT よりの formazan 染色がびまん性に認められ, 中枢性や末梢性神経細胞に認められる NOS などと同様の染色性を示すことが観察された.

以上により, 褐色脂肪組織においても constitutive な NOS の存在することが示唆され, 本組織における NO の役割が新たな生理学的興味の対象となった.

#### 20. 急性寒冷曝露時における褐色脂肪組織血流量増加と一酸化窒素

長嶋知明, 黒島晨汎(旭川医大, 第一生理)

【目的】 昨年, 本学会にて外来性にノルアドレナリン (NA) を投与した時の褐色脂肪組織 (BAT) 血流量の増加, および BAT 温度の上昇に一酸化窒素 (NO) が関与していることを報告した. 本研究では内因性の BAT 血流量の増加に NO が関与しているか, また BAT 温度の上昇が血流を介した効果だけでなく NO の直接効果も関与していないかを検討した.

【実験方法】 12週齢の Wistar 系雄ラットを用いた. 1)  $25^{\circ}\text{C}$  の環境下でウレタン麻酔後 BAT を露出し, 直上に血流測定用プローブを留置した. 周囲環境温を  $25^{\circ}\text{C}$  から  $10^{\circ}\text{C}$  まで下げ, L-NAME を静注した. 10分間経過観察した後  $25^{\circ}\text{C}$  まで環境温を戻した. この間の血流量をレーザードップラー血流量計を用いて測定した. 2) BAT を取り出し, 細切し, クラーク型酸素電極を用いて NA 刺激時の組織酸素消費量に対する L-NAME の効果を検討した.

【結果と考察】 環境温を下降させると  $10^{\circ}\text{C}$  では  $25^{\circ}\text{C}$  の時の約 3 倍に BAT 血流量は増加した. この時 L-NAME 80 mg を静注すると投与後 1 分で増加した血流量は完全に抑制された. このことは NO が内因性の BAT 血流量の増加に関与する直接因子であることを示唆している. また, NA 刺激 BAT 酸素消費量に対しても L-NAME は用量依存性に抑制効果を示し, NO が直接 BAT の熱産生に関与している可能性が示唆された.

#### 21. 導出電極の差異が分泌電極の記録波形に及ぼす影響

猪股孝四郎, 鈴木光代, 星 和明, 太田 薫, 倉橋

昌司\* (北医療大, 歯, 口腔生理・看護福祉, 生命基礎科学\*)

今まで, 唾液分泌時に見られる電位の変動を導出するとき, 電極の種類によって記録される波形が影響を受けるかどうかについてはほとんど考慮されなかった. 今回は唾液の流出部(耳下腺開口部)に, 細いビニール管(直径約 1 mm)に綿糸を留置しそれに生食水を充たしたものを電極として用い, さらに銀-塩化銀電極と白金電極のこれら三者の電極 1 つの採唾管に設置した. この唾管によって三者の電極から導出された記録波形の比較を行った. それによると特に銀-塩化銀電極から導出された記録波形の頂点時の延長は他の電極に比して著しかった. 次に NaCl の 100 mM および 5 mM の溶液を作り, これを 1 分間に約 8 ml の流水のモデルを作り, この水路に上述の三者の電極を設置して, 不正電位の有無を検討した. その結果ビニール細管の断端から留置する糸の先端を少し引き込んだ状態にした電極が 1 番不正電位が小さい(約 0.5 mV)ことが判明した. この不正電位の少ない電極を用いても, 唾液分泌時には耳下腺開口部から明らかな電位変化が記録された.

## 22. ATP の耳下腺アミラーゼ分泌効果: 種々のアゴニストとの相互作用

吉村啓一(北大, 歯, 生理)

還流系でしらべた ATP の耳下腺アミラーゼ分泌効果は ATP 濃度により異った分泌パターンを示す. すなわち 1 mM の ATP (最少有効濃度)の効果は ATP 添加 2 分で最大(刺激前の 2~3 倍)となり, その効果は ATP が存在するかぎりほぼ保たれた. 3~10 mM の ATP では約 1 分で最大効果(刺激前の 3~4 倍)となりその後ゆっくり減少(脱感作)する. この脱感作も ATP 濃度に依存した. ATP を Isoproterevol (Isop)での持続刺激時に加えた時その効果は 0.1 mM で有意になり 3 mM で最大となった. この ATP の最大効果の大きさは ATP 単独効果の約 3 倍,  $EC_{50}$  は約 0.5 mM であった. すなわち Isop 存在下では ATP の効果は最大効果および親和性共に増強した. ほぼ同様な結果は Isop の代りに IBMX を用いた場合にもみられた. 従ってこの ATP の効果増強には cyclic AMP が関与すると示唆された. この ATP 効果は外液の  $Ca^{2+}$  の除去, C kinase 阻害剤では消失しなかった. Carbamylcholine (CCH) は 2 相性のアミラーゼ分泌をおこすがこの plateau 時 ATP を添加すると再び 2 相性の

アミラーゼ分泌促進がみられた. ATP は耳下腺細胞の  $[Ca^{2+}]_i$  を増加することが知られている. しかし Thapsigargin や ionomycin の添加はこの ATP 効果を再現できない. 従ってこの効果は ATP の  $[Ca^{2+}]_i$  増加作用では説明できない.

## 23. 腸管分節標本の収縮反応における筋層の相互作用について

石澤光郎(札幌医大, 保健医療学部, 生理)

腸管壁の筋層は縦走筋層と輪走筋層が互いに直角に交わっているため, 両筋層の収縮は互いに抑制するように働くと考えられる. 実験は, 両筋層の収縮反応における相互作用について, モルモット摘出遠位結腸の分節標本(管状標本, 直径約 5 mm, 長さ 15 mm)と条片標本(幅約 10 mm, 長さ 15 mm)の縦走筋方向に対するカルバコールの収縮反応から検討した.

カルバコール ( $0.01 \sim 1 \mu M$ ) は輪走筋と縦走筋を共に収縮する. 一方, PGE-1 ( $0.1 \sim 1 \mu M$ ) は縦走筋を収縮するが輪走筋を弛緩する. 分節標本を予め PGE-1 ( $1 \mu M$ ) でカルバコールの輪走筋収縮を抑制しておくるとカルバコール ( $1 \mu M$ ) の縦走筋収縮は増大する ( $138 \pm 19.3\%$ ,  $n=10$ ), しかし, 条片標本ではこのような増大効果は殆どみられなかった ( $102 \pm 4.5\%$ ,  $n=5$ ).

さらに, 内因性 PG の合成を阻害するインドメサシン ( $1 \mu M$ ) で標本を処理すると縦走筋の張力は低下するが, 輪走筋の張力と自発性収縮が増大する. インドメサシン処理した分節標本のカルバコール収縮は条片標本より強い抑制をうけた ( $77.1 \pm 11.5\%$ ,  $n=5$ ).

以上, 腸管における両筋層の力学的相互作用は条片標本では殆どみられず, 分節標本で強くみられた.

## 24. 副交感神経伝達物質による内臓平滑筋膜興奮性の制御(モルモット膀胱平滑筋細胞の場合)

吉野正巳, 蔦井克典, 藪 英世(札幌医大, 医, 第一生理)

モルモット膀胱平滑筋細胞において, カルバコール (CCh) 刺激はムスカリニック受容体, GTP 結合蛋白, イノシトール 3 磷酸を介した細胞内ストアカルシウム放出により L-type Ca チャネルを Ca 依存性不活性化により抑制することを報告した. この Ca 電流抑制時に保持電位がマイナス側にシフトすることが観察される. そこで CCh 自信の誘発する膜電流を Whole-cell パッチクランプ法, ナイスタチン穿孔パッチ法に

より調査した。保持電位  $-50\text{ mV}$  で CCh を投与すると持続性の内向き電流が発生した。この内向き電流はアトロピン添加で抑制され、ムスカリニック受容体を介するものである事が判明した。カフェインは保持電位  $-50\text{ mV}$  で CCh 類似の持続性内向き電流を発生させた。ランプパルス実験から CCh 誘発電流の平衡電位は  $0\text{ mV}$  近辺にあった。CCh 投与により内向き電流の発生が見られない細胞ではあらかじめステップパルスを数回与えて L-type Ca チャネル電流を発生させると CCh 投与時に内向き電流が観察された。さらに L-type Ca channel 電流を CCh 存在下で繰り返し発生させることによって内向き電流は発生した。Ba 電流は発生を見なかった。Thapsigargin, Cyclopiazonic acid (Ca-ATPase 抑制剤) 存在下では Ca 電流を発生させても内向き電流の発生は見られなかった。電流固定下では CCh, カフェインはいずれもコンダクタンス上昇を伴う持続的膜脱分極をおこした。これらの結果は、L-type Ca チャネルを介した流入 Ca は一旦細胞内ストアに貯蔵され、アゴニスト存在下で細胞内ストアから Ca が放出されることにより、内向き電流が活性化される事を示唆する。

#### 25. 副交感神経伝達物質による内臓平滑筋興奮性の制御 (モルモット結腸紐平滑筋細胞の場合)

薦井克典, 吉野正巳, 蒔 英世 (札幌医大, 医, 第一生理)

モルモット結腸紐より単離した平滑筋細胞に Whole-cell パッチクランプ法, ナイスタチン穿孔パッチクランプ法を適用し, カルバコール (CCh) の膜電位, 膜電流に対する作用を調べた。電流固定下では, 長期にわたり overshoot する自発性活動電位が観察された。外液へ CCh ( $1\sim 10\ \mu\text{M}$ ) を投与すると膜コンダクタンス上昇を伴う持続的膜脱分極が起こり脱分極相で活動電位発火頻度の増加が観察された。次に, 膜電位固定下に CCh を投与すると持続的内向き電流が発生した。この電流は外液へのアトロピン添加により消失することからムスカリニック刺激を介することが判明した。外液ナトリウムを一部コリンに置換すると, こ

の電流は減少した。ランプパルスを用いた実験から電流の平衡電位を求めたところ  $0\text{ mV}$  付近にあることがわかった。また, 電流固定下で外液のカルシウムを除去すると CCh を投与しても膜脱分極は発生しなかった。CCh 投与前にあらかじめ脱分極ステップパルス (持続  $150\text{ ms}$ ) を数発与え, L型 Ca 電流を誘発させておくと内向き電流は著明に増強された。これらの結果は L型 Ca チャネルを介したカルシウム流入がこの内向き電流に対して重要な役割を果たしていることを示唆している。

#### 26. 覚醒ネコにおける垂直前庭頸反射の時間的信号変換にカハール間質核が関与する

福島菊郎, <sup>×</sup>田中真樹, 福島順子\* (北大, 第二生理・医療短大\*)

カハール間質核が垂直前庭頸反射における時間的信号変換に関わるかどうかを調べるために, 頭部を固定した覚醒ネコ 3 匹で正弦波状 pitch 回転 ( $0.05\sim 1.0\text{ Hz}$ ,  $\pm 20^\circ$ ) を加え, 抑制性化学伝達物質 GABA の作動薬 muscimol の両側性微量 ( $0.3\ \mu\text{g}$  ずつ) 注入前後で頸筋 (biventer cervicis) 筋電図応答を解析した。また垂直方向の直線加速度刺激 ( $0.2\sim 0.85\text{ Hz}$ ,  $\pm 10\text{ cm}$ ,  $0.02\sim 0.31\text{ g}$ ) と水平回転刺激 ( $0.2\sim 0.5\text{ Hz}$ ,  $\pm 20^\circ$ ) による筋電図応答を比較解析した。いずれのネコも pitch 回転, 水平回転, 直線加速度刺激により正弦波状に変化する筋電図応答が誘発された。その位相利得特性は pitch 回転と水平回転では差がなかったが, 直接加速度刺激では異なり, 特に入力加速度からの位相遅れが直線加速度刺激で少なかった。両側カハール間質核への muscimol 注入により pitch 回転による前庭頸反射は障害され, 入力加速度に対する位相遅れが平均で  $40^\circ$  減少し, 利得も低下した。しかし水平回転と直線加速度刺激による前庭頸反射には muscimol 注入前後で有意差はなかった。これらの結果は垂直半規管刺激による前庭頸反射がカハール間質核の神経細胞体の不活性化により選択的に障害されたことを示唆する。

### 〔編集後記〕

本年も残すところあと一カ月になってしまいました。本号に原稿をお寄せ下さった会員諸氏、とりわけ、パッチクランプ法実験法講座を執筆された丸山先生と、摘出脳幹-脊髄標本からのパッチクランプ記録法を執筆された鬼丸先生には深く感謝いたします。自画自賛になりますが、実験法講座はご好評をいただいております。パッチクランプ法実験法講座の企画をされた生理学会教育委員会には厚く御礼申し上げます。

ご存じのように、PROFILEの欄では新たに教授に昇進された会員の方々にその抱負を語っていただいております。これまでは、毎月の編集会議で編集委員の知り得た情報や学会事務局へ寄せられた所属変更の資料などから候補者をリストアップし、執筆をお願いして参りました。しかし、編集委員会で全ての情報を把握することは出来ませんので執筆の機会を逸してしまわれた方もおられるのではないかと案ずるとともに、そのような方にはお詫びいたします。今後、該当する方々は事務局から依頼が行かなくても、ご自分から積極的に投稿して下さいようお願いいたします。また、TRENDSの欄に掲載するその他のニュースなども、

委員会からの依頼が無くても寄稿下さいますようお願いいたします。とりわけ、地方会の世話人の方は地方会での話題など、会の模様をお知らせいただければ幸いです。

来年の1月号からは巻頭言の欄を設け、今後の生理学の方向付け、学会のあり方、医学教育の中における生理学教育のあり方など、生理学の将来像に関してさまざまな方々のご意見を披露していただくべく準備を進めております。本誌が学会員のコミュニケーションの場として一層役立てていただきたいと考えこのような企画を致しました。さまざまな点について会員の皆様からご意見をお寄せ下さることを編集委員会として期待しております。

本誌の製作を担当している鶴岡印刷では印刷機の電算機化が進んでいます。前にもお願い致しましたが、原稿はワープロで打ったものをフロッピーディスクで送って下さることをぜひお願いしたいと思います。打ち込みの手間と費用が省け、ミスタイプを防げるなど一石三鳥です。ワープロや機種は、一般に普及しているものであれば事務局、印刷所、あるいは編集委員のもとで対応出来ます。

(金子章道)

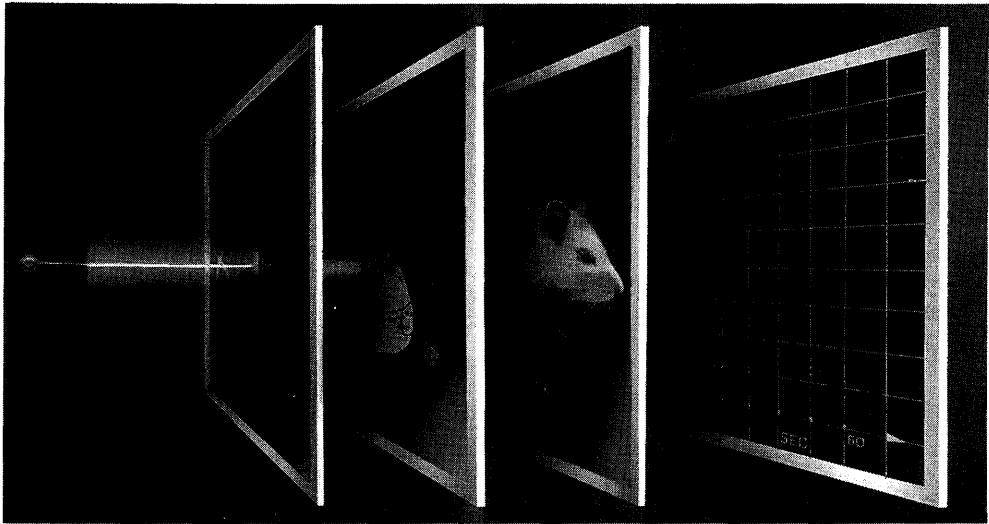
### 編 集 委 員

金子章道(幹事)	野口鉄也	野村正彦
神田健郎	野崎修一	中島祥夫
青木 藩(北海道)	土居勝彦(東北)	工藤典雄(関東)
松波謙一(中部)	福田 淳(近畿)	片岡喜由(中・四国)
山下 博(九州)		



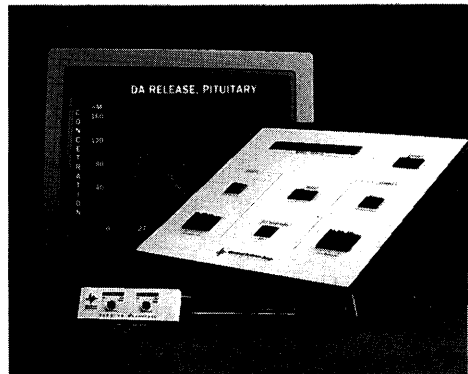
## ニューロトランスミッタ濃度測定装置

# 新登場 IVEC-10



IVEC-10は、神経科学において非常に重要なドーパミン、セロトニン等の各種モノアミン類ニューロトランスミッタの濃度変化を、酸化/還元電流の測定によりin vivo、in vitroを問わずハイ・スピード、リアルタイムでモニタする画期的なシステムです。

- 毎秒1-25回の測定により、急速な現象変化にも追従
- コンピュータによるリアルタイム・データディスプレイおよびデータストレージ
- 低濃度まで測定可能な高感度ハードウェア
- 各種の刺激波形による確実なアミン類の確定
- 個々のカーボン電極のバラツキを完全に克服する、独創的な電極キャリブレーション法
- データの取得から解析、編集、プリントアウトまで、一貫したコンピュータ・コントロール
- 培養細胞、in vivo、in vitroと広い応用範囲



メディカル・システムズ社 日本総代理店

### ショーシンEM株式会社

〒444-02 愛知県岡崎市赤浜町蔵西1番地14(ショーシンビル)

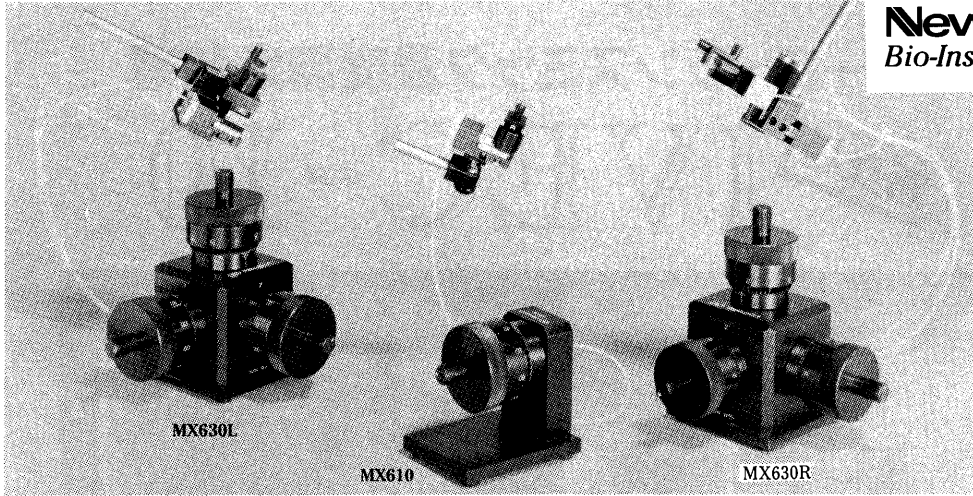
TEL. (0564) 54-1231番(代表)

FAX. (0564) 54-3207番

# 水圧式マイクロマニピュレータ



Newport  
Bio-Instruments

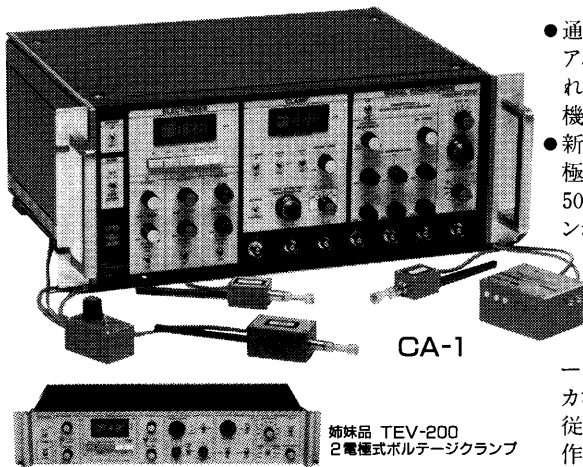


- コンパクトで遠隔操作型
- 低ドリフトで驚くべき安定性
- 高い分解能
- スムーズで応答性に優れた駆動
- 顕微鏡や粗動マニピュレータへのセッティングが簡単

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

## High Performance Oocyte Clamp 高性能Oocyteクランプ装置 CA-1 クランプエータワン **Dagan社製**

- \* CA-1は最も低ノイズで高速度のOocyteクランプシステムです。
- \* 従来の2電極モードと最新のCut-Open Vaseline Gap法によるクランプができます。



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

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

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

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

日本総代理店

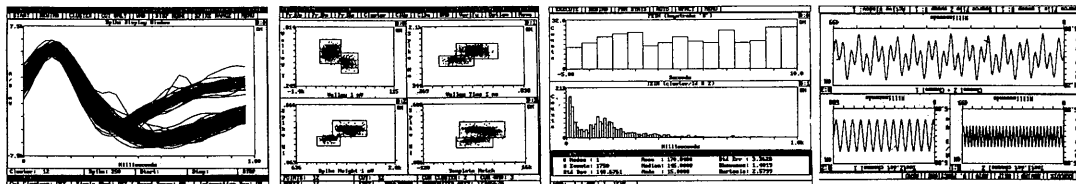


バイオリサーチセンター株式会社

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

# WorkBench & Discovery

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

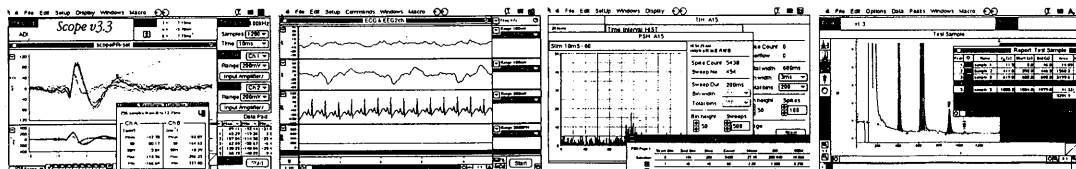


- ユニット分離 1つのユニットより12項目の値を抽出し、最大12のグループに区別します。
- ヒストグラム PETH、IEIH、XCRR、Rate Meter、JPST、Replay、Periodic PETH...
- 波形演算処理 アベレージング、スムージング、FFT、微積分、刺激誘発反応、可変面積、他多数。
- 波形数値抽出 Peak to Peak、dv/dtをはじめ、70種類にも及ぶデータ抽出が可能です。
- ディスプレイ オシロスコープ、ヒストグラム、XYプロット、デジタル表示、他多数。

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

## マックラブシステム

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



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

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

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

A. D. I. 社  
日本総代理店



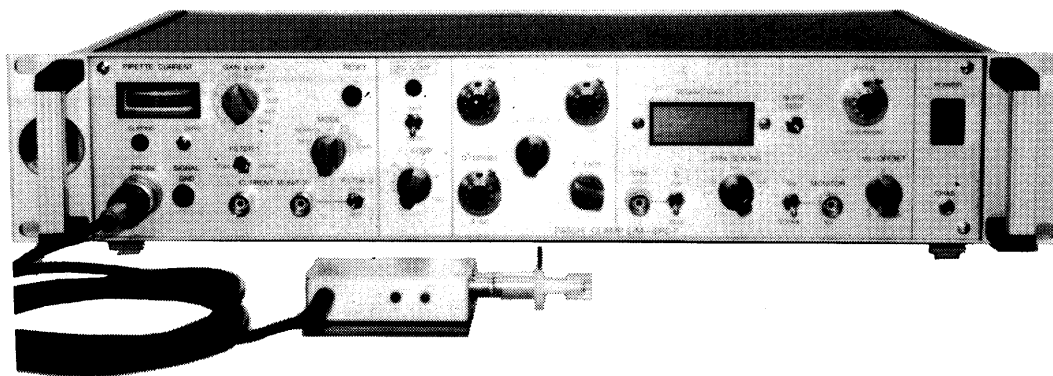
バイオリサーチセンター株式会社

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

# 実績 No.1!! F. J. Sigworth, E. Neher のオリジナル

西独リスト社

## パッチクランプシステム *EPC-7*



### ■ 主な性能

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

日本総代理店 / 西日本地区発売元



ショーシンEM株式会社

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

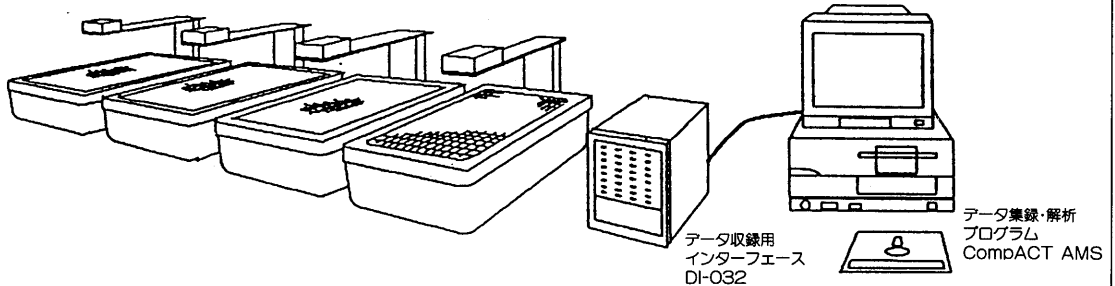
東日本地区発売元

(Physio-Tech)

株式会社 フィジオテック

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

# ローコスト型 スーパーメックス PAT. P. 自発運動量測定システム SUPERMEX



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

**Muromachi**

総発売元 **室町機械株式会社**

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

## ラット・マウス用 非観血式血圧測定装置

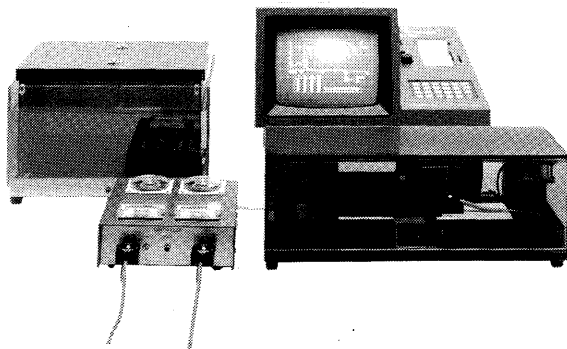
### MODEL MK-1100

\* 収縮期血圧 /

\* 平均血圧 /

\* 拡張期血圧(計算値) /

\* 脈拍数 / の安定した測定に



#### ■特長

- 脈拍信号を音で聞くことができます。(音量の調節可)
- 連続測定機能及び高速測定機能の追加により測定時間が大幅に短縮。
- 400mmHg 迄加圧可能ですので SHRSP も測定できます。
- 高速印字機能 / 全ての測定データは、音の静かな高速一マルプリンタにより約1秒間で打ち出されます。また、平均値の他にSD値も打ち出されます。
- タイムスタンプ機能 / テータ印字の際に計測時の時間も印字されます。
- 画面コピー機能 / 付属のプリンタで画面のハードコピーを行なえます。
- マーモセットやスunksの測定を行なうこともできます。
- R232C出力が標準装備されています。
- センサーの感度はMK-1000型と比較して約5倍アップしています。

**Muromachi**

総発売元

**室町機械株式会社**

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

# Whole-Cell Clamp System

MODEL

TM-1000

- 人間工学的なデザイン、簡便で確実な動作。
- 安全性の高い直列抵抗の補償。(Rs:0~20M $\Omega$ )
- ダイナミックレンジの大きなオフセット及びホールド電圧設定。



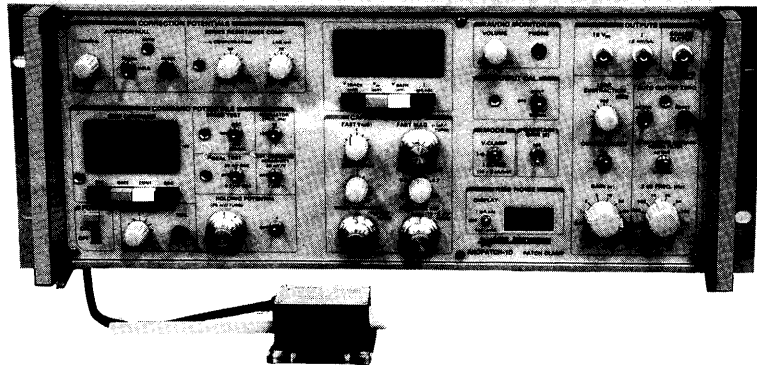
※2点支持タイプ(メカニカルドリフトフリー)の電極ホルダー標準装備。



株式会社 アクトME研究所

〒173 東京都板橋区大谷口北町89-8-202 TEL:03-3554-5946

# 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
- シールドテスト
- オーディオモニター
- 漏れ電流除去

## AXOPATCH-1Dのヘッドステージ

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

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

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

西日本地区発売元



INTER MEDICAL CO., LTD.

株式会社 インターメディカル

本社/〒461 名古屋市中区栄一丁目25番1号  
TEL (052) 937-7060 FAX (052) 937-5423  
TLX 444-3603 WDMC J  
東京支社/〒157 東京都世田谷区柏谷三丁目32番16号  
製造営業部      アビタシオン千歳島山1102号  
TEL (03) 5384-6387      FAX (03) 5384-6487

東日本地区発売元

(Physio-Tech)

株式会社 フィジオテック

〒101 東京都千代田区内神田3丁目10番3号  
コイダビル4F

TEL (03) 3258-1641(代)

# The Journal of Physiology

The Physiology Societyの機関誌

Chairman of the  
Editorial Board:

R.E.J. Dyball  
*University of Cambridge*



CAMBRIDGE  
UNIVERSITY PRESS

• *New Frequency!*

• *New Format!*

• *New Design!*

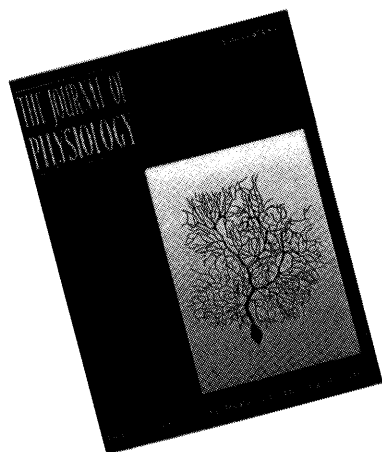
• *Color Illustrations!*

• *High Impact Factor!*

Impact Factor : 4.843  
(from ISI® SCI® Journal Citation Reports® '92)

本誌は、生理学全般におけるオリジナルの研究報告を掲載します。この分野では国際的に高い評価を受けており、論文の引用度も際立って高くランクされています。特に脊椎動物の神経生理学に重点をおきながら、呼吸、循環、排出、生殖、消化、ホメオスタシス、神経生理、筋収縮などについての原著論文を掲載する他、英国生理学会の議事録の収録します。

本誌は、1994年よりA4判になり、装いも新たになりました。



- ◆'95年巻号 : Vol. 482 - 489
- ◆刊行回数 : 年 24回 +6 Proceeding + 1 Index
- ◆商品コード : J43900T
- ◆年間購読概価 : ¥ 191,700.-

□販売価格は、実勢レートをもとに算出し、概算価格にて表示しております。最新価格につきましては改めてご照会ください。(消費税別)

□ご購入、見本誌のお申し込み、その他のお問い合わせは、最寄りの紀伊國屋書店営業所にお申し付け下さるか、雑誌部マーケティング課宛にハガキまたはFAXにてご連絡下さい。

日本販売総代理店



株式会社 紀伊國屋書店 雑誌部

〒156 東京都世田谷区桜丘 5-38-1  
Tel. 03-3439-0124 Fax. 03-3439-1094

# The Company of Biologists Ltd.

## 生理学関連雑誌ご案内

### The Journal of

# Experimental Biology

Editor : R. G. Boutilier & W. R. Harvey with W. A. Foster, E. A. Howes & T. Matheson

本誌は、比較生理学分野における実験的研究を發表します。カバーするトピックスは、細胞神経生理学・行動の神経的基礎から能動輸送、排泄、感覚受容、ダイアーナリズム、循環、呼吸、運動などです。

年間購読概価：¥115,500 1995年巻号：Vol. 198 (12 issues) 商品コード：J22450G

### Contents

Transduction diversity in olfaction / Dionne, V. E. and Dubin, A. E.

Detection of magnetic inclination angle by sea turtles : a possible mechanism for determining latitude / Lohmann, K. J. and Lohmann, C. M. F.

The Metabolic characteristics of the locomotory muscles of grey seals (*Halichoerus grypus*), harbour seals (*Phoca vitulina*) and Antarctic fur seals (*Arctocephalus gezeila*) / Reed, J. Z., Butler, P. J. and Fedak, M. A.

Short-term cell volume regulation in *Mytilus californianus* gill / Silva, A. L. and Wright, S. H.

Hydrodynamic aspects of design and attachment of a back-mounted device in penguins / Bannasch, R., Wilson, R. P. and Culik, B.

Extreme drag forces and the survival of wind- and water-swept organisms / Denny, M. W.

Intracellular ion concentrations in branchial epithelial cells of brown trout (*Salmo trutta* L.) determined by X-ray microanalysis / Morgan, I. J., Potts, W. T. W. and Oates, K.

～ 分子・細胞・発生生物学のニュースとレビュー ～

## BioEssays

Editor : A. S. Wilkins (University of Cambridge)

権威ある ICSU (International Council of Scientific Union) の機関誌として創刊された本誌は、現代生物学の中心的領域である分子細胞生物学を対象分野とし、遺伝子発現や細胞構造から、分子医学や発生調節までのトピックスを扱います。基礎研究の進展状況に主眼をおきますが、医学、産業、農業へ応用研究にも十分な配慮を加えています。特にこれらの分野で既に研究を進行・計画中の機関にとって本誌は興味深い文献となるでしょう。生物学研究において不確かで、争点となっている問題を取りあげ、著名専門家の見解を提供すると共に、活発な意見交換の場となることが本誌の目的です。

年間購読概価：¥39,100 1995年巻号：Vol. 17 (12 issues) 商品コード：B14170A

published by :



The Company of Biologists Ltd. (UK)

※販売価格は実勢レートの変動にともない変わりますので、概算にて表示しております。(税別)

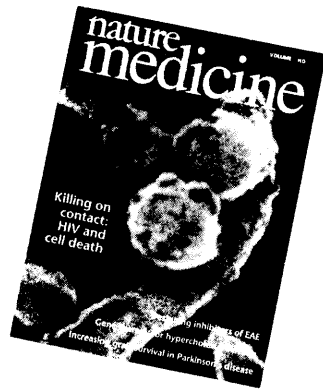


日本販売総代理店  
藝文紀伊國屋書店

# nature medicine

月刊

# 創刊1995年1月



過去20年間における生物医学研究のめざましい進歩(組み換えDNA技術によるところが大きい)によって、疾患の原因究明や治療法は根本から変化しています。これまでの生化学や病理学は、DNAやタンパク質、そして健康と疾患に関与する他の分子などの構造と機能を解明するための基礎となる、新しい科学に取って代わられつつあるのです。医学の技法と科学の精密さが手を取り合って、病気の治療に明るい未来を約束してくれる新しい「分子医学」という分野をつくりあげたのです。

分子医学は、特定の疾患を対象にした実現可能性のある遺伝子治療や、免疫系や心臓血管系を制御している分子レベルのメカニズムの解析など、現在の生物医学研究の領域全体を含んでいます。また、腫瘍は、発癌現象のメカニズムを解明している分子生物学者たちが、最大の標的としているものです。磁気共鳴映像法(MRI)のような画像技術や、薬剤の合理的な設計を確実にする構造生物学もまた、この新しい医学の一部に含まれます。

現在のところ、分子医学の粋、つまり生物医学界に広く興味をもたれるような、ハイレベルな優れた研究を1冊に収めた科学雑誌はありません。「Nature Medicine」は、生物分野の最先端部分(これは「Nature」の守備範囲でもありますが)と、多くの臨床医学雑誌が扱うような実際の医療との間にあるギャップを、橋渡ししようというものです。例として時間を引き合いに出すと、わかりやすいでしょう。臨床関係の雑誌は、医療現場ですぐに使える情報に目を向けていますが、「Nature」本誌の掲載対象となる創造的な科学的洞察は、医療に応用されるまでに大体10年かかります。

その中間点にある研究を対象にしていくのが「Nature Medicine」です。中間とつまり、一般への応用にはおそらく3年から5年かかるもので、人間を対象とした研究の第1段階である臨床試験研究も多く含まれることとなります。大学の医学部や独立の研究所、そしてバイオテクノロジー・製薬業界において、臨床面の可能性を秘めたエキサイティングな研究が実際に行われているのは、まさしくこの分野なのです。

「Nature Medicine」は、自分の関わっている分野以外でも何が起きているかを知る必要のある意欲的な科学者や、最新の医学の時流に乗り遅れずにいたい現場の医療関係者を対象に、最高の質の研究論文だけでなく、最も関連の深い研究論文も掲載していきます。「Nature Medicine」は、MDやPhDのために書かれ、編集されていくことになるはずです。そして、基礎科学における成果をしっかりと医学状況につなげるような、プレゼンテーションや論文の明快さに重きをおいていきます。

「Nature Medicine」はまた、科学政策が、研究者や医療関係者の方々にとって重要な要素であると認識しています。したがって、生物医学研究をサポートするすべての国々での、研究の財源や規制についての記事をタイムリーに掲載していく予定です。ですから、胎児研究や体外受精、バイオテクノロジーの規制、また、独創的研究への出資などのトピックスも扱っていきます。

「Nature Medicine」は、完成度が高く、しかも読みやすい最高レベルの分子生物学の論文を掲載することで、基礎科学と臨床医学の間にあるギャップに橋渡しをし、それによって国際的な研究社会に貢献していくと考えています。また、それゆえに、この雑誌が計り知れない価値をもつ学際的な雑誌になるものと信じています。

## 購読について

### ■個人購読料金(1年12冊)

- 創刊記念特別料金(締切1995年1月31日).....¥16,480
- 1995年通常料金.....¥20,800

### ■学生/研修医購読料金(1年12冊)

- 創刊記念特別料金(締切1995年1月31日).....¥12,360
- 1995年通常料金.....¥15,450

個人購読料金・学生/研修医購読料金は、購読者ご本人がネイチャー・ジャパンと直接契約を結んだ場合にのみ適用いたします。

### ■学生購読制の加入資格等について

- 1) 下記のいずれかに在籍している(A)学生(B)大学院生であることが必要です。  
大学・短大・大学校・工業高等専門学校・各種専門学校
- 2) 資格証明の必要上、申込書の所定事項にはもれなく記入して頂きます。
- 3) Renewal(更新)の都度所定事項の記載をしていただきます。
- 4) 購読期間中に資格を喪失した場合でも、現購読期間終了までは送本は続けられます。(この場合、当然のことながら次期更新の際は一般個人購読者として扱われます。)
- 5) その他、ご不明の点がございましたら、遠慮なく個人購読係までお問い合わせ下さい。

■研修医の場合は、資格証明の為、注文書の所定欄に研修中の病院の責任者のご署名をいただきます。  
その他の条件は学生購読制に準じます。

### ■法人購読料金(1年12冊)

- 創刊記念特別料金(締切1995年1月31日).....¥61,800
- 1995年通常料金.....¥77,250

創刊記念特別料金の締切は  
1995年1月31日(当日消印有効)

# 基礎科学と臨床医学の橋わたし

新製品

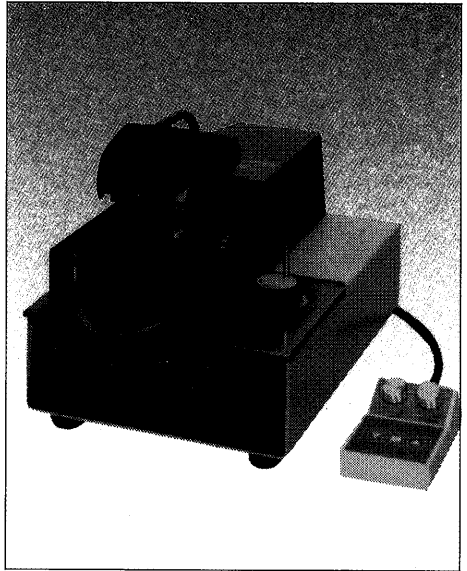
お求めやすい価格で新登場!

新鮮脳切片作製のための

## D.S.K. マイクロスライサー®

DTK-1500型・セパレートタイプ

- 新鮮脳の切断面のダメージが、著しく少なくなりました。
- 横振(FREQUENCY)の幅を小さくして、前進スピードを出るだけおそくする操作を可能にしました。
- セパレート型、コントロール部を独立させる事により生理食塩水、バッファ、水等の浸透を防ぎ、操作性、耐久性がアップしました。
- 刃の作動方式には電磁振動方式を用いず、上下振動のない滑走式(PAT)を採用しています。
- 刃の往復数が自由に換えられるため、柔らかい組織や不均一な組織も切りやすくなりました。

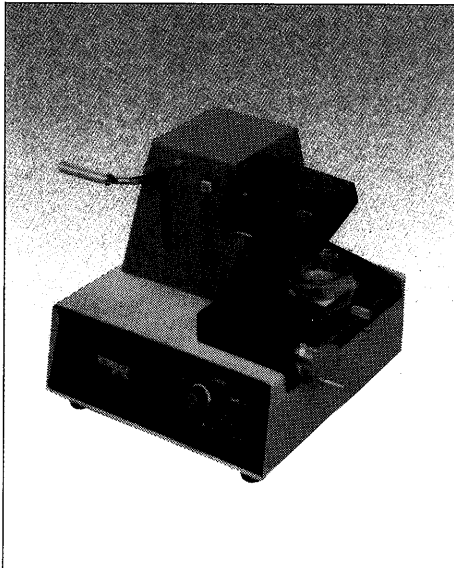


新製品

“生きのいい”脳薄切標本作製装置

## D.S.K. ロータースライサー®

DTY-7700型・手動式



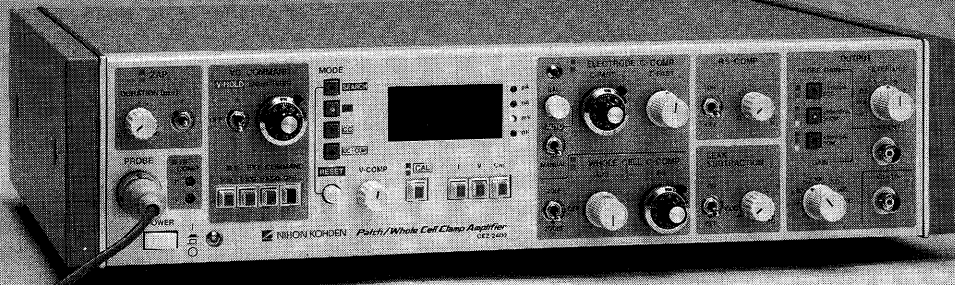
- 脳組織など、素早く取り出した生きた軟かい生体組織の薄切標本(70ミクロン以上)が容易に得られます。
- 組織の送り幅(薄切の厚さ)、刃の回転速度をセット。あとは組織をコンテンツ台に固定して、手でレバーを操作し回転刃を下降すればOK。
- 組織の固定も簡単で熟練を要しません。
- 液中で薄切するので、標本が空気中にさらされる時間も短縮され“生きのいい”切片が順序よく回収できます。
- 特製試料トレイ(多孔質セラミックス製バブラー付 [PAT.P])を標準装備。

★詳しい資料・文献・デモンストレーションは下記までご請求ください。

D.S.K. 堂阪イーエム(株)

本社・工場/〒601-11 京都市左京区静海市原町1032の3 TEL (075)741-3069 FAX (075)741-3026

# パッチクランプ / ホールセルクランプの 測定に威力を発揮!



細胞膜の研究に

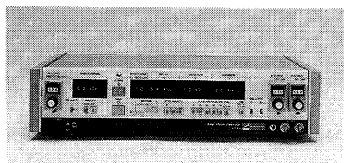
## パッチ / ホールセルクランプ用増幅器 CEZ-2400

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

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

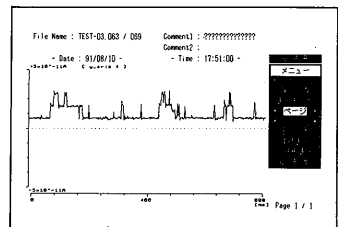
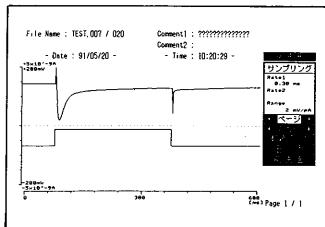
### ステップパルスジェネレータ SET-120J

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



### パッチ / ホールセルクランプ用処理プログラム QP-120J

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



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

カタログをご希望の方は宣伝課宛ご請求下さい。

J. Physiol. Soc. Japan Vol. 56, No. 11 (1994)

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  
 在野ビル(旧)生理学会

印刷者  
 印刷所

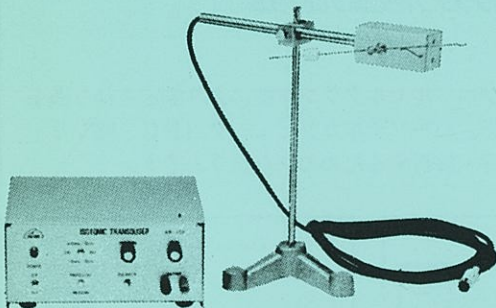
山形県鶴岡市山王町一四一四  
 平岡印刷株式会社

発行所

〒一三三  
 東京都文京区本郷三丁目三〇一〇  
 日本生理学会

振替口座  
 東京〇〇三  
 定三五六八  
 価一八一八  
 四四一  
 千四二一  
 三五三二  
 〇三三  
 円番九四

# KN-259 生体用変位計 PAT.P



トランスジューサーと増幅器からなる、微小変位測定装置です。これまでキモグラフィオン・ヘーベルを用いて行なっていた測定を電氣的測定におきかえることにより、取扱いの簡便さ、再現性および信頼性を高めました。

測定範囲	0～50mm (±25mm)
	(中心軸より100mmの時)
分解能	無限大
最大摩擦トルク	50mg・cm以下
直線性	±3%
出力インピーダンス	5KΩ以下
校正器	10mm
	極性切換スイッチ付

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 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 大阪府豊中市新千里東町1-4-2  
 電話 06(873)3251 FAX 06(873)2045