特集 教授定年退職
記念講演

順天堂医学 38 (2)
P. 154~162 (1992)

生理学教室発足当時よりの電気生理学回顧**

Reminiscences of electrophysiology in the department of
physiology in Juntendo University

竹 内 宣 子*
NORIKO TAKEUCHI, M.D.

順天堂大学医学部生理学教室は、昭和27年、坂本嶋嶺教授、真島英信助教授という先生方で、当時の三号館一階に発足しました。お二方の先生共今は亡く、発足当時より教室員としてお世話になりました者として、古い記憶をたよりに、生理学教室での主として当時の電気生理学と研究用電気機器について簡単にまとめました。その後シナプスの伝達機構を専門に研究してきましたので、その仕事の一端を報告させていただきます。

索引用語：順天堂大学生理学教室，電気生理学，神経筋接合部，膜電位固定，アセチルコリンチャネルのイオン透過性，伝達物質

Key words: Department of Physiology in Juntendo Univ., electrophysiology, neuromuscular junction, voltage clamp, ionic permeability of acetylcholine channel, transmitter

順天堂大学生理学教室の発足

まず、本日このような記念講演の機会をお与えいただきましたことを、山下会長はじめ順天堂医学会会員の諸先生方に厚く御礼申し上げます。退職にあたり振り返ってみますと、本学に生理学教室が発足いたしてよりまさに四十年という日を迎えたのであります。

私、国試のあと、神経生理学の勉強をしてみたいと思い、東大生理の坂本研究室へ研究生として入らせていただきました。間もなく坂本先生はご定年で、次いで順天堂大学の教授として生理学講座を創設されるとのことでした。私はぜひぜひお供をさせていただき、先生のもとで引き続き勉強

させていただきたいと願い、願いが叶えられました。坂本嶋嶺教授・真島英信助教授という最高レベルのすばらしい構成で、昭和二十七年、まだ木造の三号館一階に生理学教室は誕生しました。当時はまだ敗戦の混乱期の色濃く残る時代でしたが、＜順天堂医学＞誌に最近医史学の酒井先生がお書きになっておられる『本郷キャンパス建物の移り変わり』によると、三号館・四号館は昭和二十六年にできた建物とのこと、まだ新しくきれいでした。仕事はまず実験機・椅子・学生実習用機械を購入することから始まりました。筋収縮実験用ロタトリウムのみは、数台備えられていましたので、実験可能なことから、真島先生の筋収縮の力学的解析のご研究がここから出発されたのです。

* 順天堂大学医学部生理学第一講座
Department of Physiology (I), Juntendo
University School of Medicine, Tokyo, Japan
** 第260回順天堂医学会学術集会〔Mar. 25, 1992開催〕
〔May 21, 1992原稿受領〕

当時の電気生理学
—電気的装置を中心に—

神経生理学は、当時は殆どが電気生理学といっ

てよいのですが、研究に必須な増幅器・記録器の市販のものは非常に乏しく、記録器としては、横河製の電磁オシロと称する電磁ガルバノメーターがよく用いられていました。ガルバに付けられた微小な鏡に当てた光による反射光の振れを感光紙に記録するものでした。真島先生はこれを用いて筋収縮による張力を、考案された張力-電流変換器を介して記録、解析する研究に着手されました。坂本先生のご研究は、興奮性膜における電気刺激の理論で、大変緻密なものでしたので、それに適する記録器がなく、細胞の膜の局所の電位の変化を μsec 、あるいは msec で切って特別のコンデンサーにチャージとして貯めてから、各瞬間のチャージを測定するという方法を採用しておられました。当時オシロスコープは工学系の高周波をみるためのものはあったと思われますが、われわれが必要とする条件のものはまだなく、増幅器その他の電気器具は殆ど各自の手製でした。いかに上手に目的にあった増幅器や電子機器を作るかが、研究成功の鍵であったといつてよいでしょう。当時は神経あるいは筋組織の細胞外導出によりそれらの電位変化を記録する仕事が大部分でしたが、1950年代の半ばには外国でぼつぼつ細胞内電極により細胞の膜の電位変化を直接導出する方法が行われはじめてきました。導出条件が単純で解析が容易ですから、是非細胞内導出をと希い、準備をはじめました。電極が細胞内に入ったとき、静止膜電位を測定記録するための直流増幅器と、数十 $\text{M}\Omega$ の電極を用いるための高入力抵抗・低グリッド電流の入力部を組まなければなりません。

当時、一種だけその条件を満たす米国製小型真空管があり、数個やっと入手してそれぞれ特性を調べ、特性のほぼ近い二個を選んで平衡型入力部を作製しました。同時に、それらのアンプのための定電圧 B 電源（真空管の陽極へかける $+200\sim 300\text{V}$ の直流電源）・マイナス電源・真空管のヒーター電源等も秋葉原に通いながら部品を集め、シャーシに穴を開けることから始めてハンダこてを振り回しながら手製で組み上げ、どうやら 60db 程度の直流増幅器が完成しました。刺激装置も同様

に電源部・発振部・制御部と手製で組み上げました。そのうちに電気生理用のオシロスコープが発売されることになってきました。しかし、その頃の学内研究費の何年か分という高価な価格で、到底購入は不可能でした。

筋電図研究室の時代

先に東大の研究生の時期に、当時筋電図を研究され臨床にも広く利用できるよう、精力的に努力されていた時実利彦先生の部屋で筋電図を少し勉強させていただきました。本学病院には当時まだ筋電図の検査装置はないようでしたので、要請があれば筋電図の検査を引受けますから特別の予算はいただけないものでしょうかと、坂本先生・真島先生にお願いしてみました。先生方のご尽力によりそれが実現し、オシロスコープ・小型電磁オシロレコーダーなどが備えられ、手製の針電極・アンプ等、当時、群大生理より移ってこられた石田絢子先生、生理へ研究生として最初にはいられた佐藤紋郎先生等にお手伝いいただいて、筋電図検査が可能となりました。かくて順天堂大学筋電図研究室が真島助教授を室長として昭和二十九年より生理学教室内に発足し、数年間本学病院の筋電図検査を担当しました。真島先生は脊髄反射にも興味をお持ちで、石田先生らと共にカエルの筋電図による脊髄機能の研究を平行してされていました。一方、備えられたオシロスコープを利用させていただき、末梢シナプスである神経筋接合部のシナプス電位の細胞内波形記録、および解析が可能となりました。

シナプスの生理学

—終板電位の膜電位固定—

種々のシナプスのなかで神経筋接合部は、実験に有利な条件を数多く持ち、伝達機構の解析が進んでいたことは他に類なく、また伝達物質がアセチルコリンであることが確定していた唯一のシナプスでした。支配神経を刺激し、シナプス後電位

図-1 細胞内電極を用いた膜電位固定法の回路図

H : 高入力抵抗, 低グリッド電流の真空管, V : feedback 用約5000倍の直流アンプ, C : feedback 電流記録用約1000倍の直流アンプ

図-2 細胞内記録による終板電位 (A) と電位固定により得られた終板電流 (B) の波形のオシロスコープ像

である終板電位を終板部から導出, そのオシロスコープ波形を写真記録するという方法でシナプス伝達時の, 筋伸張による促進効果, 温度変化による伝達物質放出量の変化等を追求しました. シナプス後電位は, シナプス前神経終末から放出された伝達物質が後シナプス膜のレセプターに結合, 活性化してチャネルを開くことにより後シナプス膜のコンダクタンスが増加, そこを流れる電流が隣接部を流れるため, 後シナプス細胞の脱分極が

起こりシナプス電位として記録されるものです. 従ってその電位は, シナプス隣接部膜の電気的性質に依存した影響を受けますから, 実際の伝達物質の放出量や, 作用している時間経過を正確に表すものではないのです.

1952年頃よりイギリスでは, Hodgkin らにより, イカの巨大神経に縦に細い銀線電極を通し, 神経の膜を電位固定することによって, 興奮すなわち活動電位とは, 膜の脱分極によりナトリウムコンダクタンスの一過性上昇 (Na-channel が open), 次いでカリウムコンダクタンス上昇 (K-channel が open) が起こることであるという,

いわゆるナトリウム説を基礎付ける仕事が次々と発表されました. この膜電位固定法を終板部に適用できるなら, 実際にアセチルコリンが作用している時間経過などが分かるはずでした. しかし終板には, 細胞内電極という高抵抗の電極を使わなければなりませんから, 原理は negative feedback という簡単なものであっても, 実際に可能かどうか心配であったのですが, 試みることにしました. 図-1は当時用いた電気回路図を示したものです. V は5~6000倍の feedback 用直流アンプで, 真空管でこれを組むのはかなり大変でした. 全ての電源を定電圧とし, 別に定電流ヒーター電源を組んで全ての真空管のヒーターを直列に流すというようなことを試みましたが, 平衡型アンプのバランスの崩れやドリフトに常に悩まされました. また feedback 電流の記録法も何回か改良し, 発振と闘いながらやっと電位固定に成功して, 神経筋伝達時の終板電流の記録が可能になりました. 図-2のAがその波形の一例です. 同一終板で feedback をはずして記録した通常の終板電位が図-2Aの波形であり, 時間経過がかなり異なります. CはBの時間経過の電流が終板を流れたとして, 周囲の筋線維膜の時定数・実効膜抵抗等を測定後それらの数値を用い, 計算でもとめた各瞬間の電位変化 (○) と実測された終板電位の経過がよく

図-3 終板電位の大きさとそれに対応する終板電流の大きさとの関係

左図：ある単一終板でクラールの濃度を変えて得られた種々の大きさの終板電位と終板電流。
右図：終板電位と終板電流の振幅の関係。同一印は同一終板からのデータ。

一致することを示したものです。B に示される feedback 電流の経過は、神経終末から放出された伝達物質アセチルコリン分子が終板に働き、多くのアセチルコリンチャンネルを開いてイオン透過性が増大した経過に他なりません。種々の大きさの終板電位と、それを電位固定して得られた終板電流の大きさとの関係は図-3 から明らかなように、数 mV 以下を除くと直線関係にはなく、シナプス電位の大きさのみを伝達の指標とする時はこの点への留意が必要です。電位固定する膜電位を種々に変えて調べると、一般興奮性膜のナトリウムチャンネルと異なり、アセチルコリンによる電流は膜電位とともにほぼ直線的に振幅が変わること、膜電位座標上で電流零となる点（平衡電位または逆転電位）は、正常リンゲル中では約 -15mV 、それは外液の Na^+ K^+ などの陽イオン濃度に依存して変化すること、 Cl^- を膜は不透過と考えられる陰イオンで置換すると、筋線維の膜電位は大きく変わるが終板電流の逆転電位は全く変わらないこと等が明らかになりました。これらは、終板のアセチルコリンチャンネルは陽イオン選択透過性であることを意味します。 Ca^{2+} イオンは僅かに透過しますが、外液に Na^+ イオンが十分あるときはチャンネルを通過する Na^+ イオンと何れかのサイトで、interac-

tion のあることが実験結果から示唆され、アセチルコリンにより開くチャンネルは、単に通過イオンの大きさを規定する、表面が陰性荷電の孔というのみではないことが考えられます。

細胞内電極を用いてシナプス部の電位固定を、当時の真空管の増幅器を用いて行うのは、電気機器の素人としてはなかなか大変でしたが、それを成功しえたのは、秋葉原に近くて電気部品の入手が容易であったという本学の地の利によるものが大きかったと思っております。昭和三十四年渡米後は第一生理所属となり、帰国後、当時の竹内昭助教授と再び同様の装置を電源から組み上げました。

—伝達物質候補としてのグルタミン酸の発見—

上記の実験はカエルの骨格筋で行ったものですが、陰イオンについての実験では不透過の陰イオンとして主にグルタミン酸イオンを用いました。サイズの大きい陰イオンのなかで純度のよいものの入手が容易で、比較的キレート作用が弱かったからです。幸いなことにカエル筋では特殊な作用はみられませんでした。何かグルタミン酸を用いたというレポートがあるかもしれないと文献を探したところ、ザリガニの筋では非常に低濃度で

図-4 ザリガニ骨格筋, 単一神経筋接合部に対する L-グルタミン酸の効果

A: 興奮性神経頻回刺激による接合部局所電流 (上のビーム) と細胞内導出の興奮性シナプス電位 (下のビーム), B: 微小ピペットから電気泳動パルス (最上ビーム) によりその局所に与えられた L-グルタミン酸による同一点からの記録。

強い収縮が起こるという報告がありました。そこでまず、ザリガニの神経筋接合部に対するグルタミン酸の作用を調べてみることにしました。ザリガニの神経筋接合部は脊椎動物の中枢神経に似て、興奮性と抑制性の神経支配で構成され、筋線維は多接合部性です。図-4に示されるように、興奮性神経を刺激しながら細胞内電極と同様の微小電極を筋線維表面にあて、シナプス電流の記録される数ミクロンの部位では、L-グルタミン酸をつめた微小電極から電気泳動的に与えられた微量のグルタミン酸に鋭敏に応じ、シナプスを流れる電流が記録されたのです。その他の部位では全くなんの応答もないこと、グルタミン酸を与え過ぎて脱感作 (desensitization) が起こると、同時に神経

刺激によるシナプス電位も小さくなること、すなわち、神経からの伝達物質とグルタミン酸のレセプターは同一であること等も確認され、L-グルタミン酸はザリガニの神経筋接合部では、興奮性伝達物質の候補であることを提案しました。1960年代の始めです。

1960年代の後半、真空管がトランジスターとなり、トランジスターの回路を使った小さいモジュールの OP アンプができ、素人でも容易に種々の性能のアンプあるいは回路を組むことができるようになり、細胞内電極を用いたシナプスの電位固定も世界のあちこちで行われるようになりました。光学機器・刺激装置・各種増幅器・オシロスコープ、その他の記録器も既製のものが豊かに市販され、研究費さえ十分であるならば楽に実験できる時代にはいりました。

図-5 自発性微小終板電位と低 Ca 液中での神経刺激による終板電位の記録例

A: カエル胸皮筋静止時の自発性微小終板電位。B: カエル縫工筋, 低 Ca 液中での自発性微小終板電位と神経刺激による終板電位。

—伝達物質放出機構についての研究—

脊椎動物の神経筋接合部はシナプス前要素・シナプス後細胞 1 : 1 の単純な構造を持ち、伝達物質放出単位(伝達物質素子)としての微小終板電位の記録が容易で、伝達物質放出機構の研究にも適したシナプスであります。終板部の細胞内記録により静止時、図-5.A のような振幅のほぼ揃った自発性の微小終板電位が時々観察されます。B は外液の Ca 濃度を 0.2mM 程度に減らして支配神経を刺激し、終板電位を微小終板電位と共に記録したオシロスコープ写真です。振幅はばらつきが大きいですが、各々は微小終板電位のほぼ整数倍であることが分かります。神経終末に興奮が達すると伝達物質はこの素子を単位として、 Ca ion の流入量に応じて同期して放出されると考えると、伝達物質の放出量は素子の数で量的に表現できます。図-6.A は単一接合部で、 Ca 濃度を 0.1mM から少しずつ上げたとき得られた各濃度での、神経刺激時の平均素子数と Ca 濃度との関係です。外液 Ca 濃度の僅かな増加により伝達物質放出量は著明に上昇し、その勾配の急峻なことは、膜外から流入する Ca が伝達物質の放出を起こす過程のいずれかで、協調作用(cooperativity)があることを示すものです。一方、自発性素子の放出はその平均頻度を用いて放出量を正確に表現できるので、外液の Ca 濃度を変え放出量の変化を相対的平均頻度としてグラフに表したものが図-6.B です。正常リンゲル液(K 2.5mM)では変化はゆるやかですが、外液 K を少しずつ増し神経終末を脱分極させてゆくと、 Ca 濃度と放出量の関係はだんだん急峻になってゆくのが分かります。神経終末に興奮が達した時の大きい脱分極による放出に近付いてゆくのだと思います。また終末の脱分極の程度により、放出サイトの総数がましてゆくこと、 Ca ion に対する見かけの解離常数が減少してゆくこと等が示唆されています。

このような単一シナプスで条件を変えながら長時間記録をとる実験は、1970年代はオシ

ロスコープの掃引波形を 30m フィルムの連続撮影カメラで記録していましたが、70年の後半からは FM データーレコーダーに連続記録するようになり、さらに80年代なかばになりますと、digital audio processor (PCM) と家庭用 video cassette recorder に少し手を入れて改造し、周波数帯域が直流から 20KHz の廉価な連続記録器が使えるようになってきました。そこで静止時の自発性伝達物質素子の放出の長時間連続記録により、放出時点を点過程として統計的に時系列解析を試みました。中央電算機室分室の PDP-11の時代にコンピュータを使わせていただき、電算機室の江原さん、教室の八名さん、後半は輪湖さん・簗さんの諸氏にプログラムなどお世話になりました。図-7は正常リンゲル液での静止時、定常状態の自発性素子放出時点あるいはその間隔の時系列統計のいくつかと、その結果についてのポアソン性の検定とを示したものです。それらは、定常な data であるならばポアソン性を有意に否定するものではなく、すなわちその生起はランダムで、個々の放出は後に履歴効果または aftereffect を残さず、互いに独立であることを意味します。他方、この自発性放出のレベルを上げるような条件として、

図-6 外液 Ca 濃度と伝達物質素子放出との関係

A : Ca 濃度と神経刺激による平均放出素子数との関係。黒丸は終板電位の素子数、白丸は終板電流より計測。

B : Ca 濃度と4種の K 濃度レベルにおける自発性放出素子の平均頻度との関係。

normal Ringer

Interval histogram

Variance-time curve

Log survivor function

Intensity function

図-7 正常リンゲル液中の定常状態で自発性素子放出の時系列解析

単一接合部からの連続記録をコンピュータ, PDP11/60で統計解析し, ボアソン性の検定を行った結果のプロッター出力の数例. 強度関数 (intensity function), 変動-時間曲線 (variance-time curve) における点線は, 内側 5%, 外側 1%の有意水準を示す.

外液のK濃度を12mMに増した場合およびカフェイン, またはテオフィリンを作用させた場合は, 図-8に見られるように統計量によってはランダム性から外れるものが見いだされました. 特に放出間隔のヒストグラムにおいて, 高K液中では最短の部分がポアソン過程とした場合の理論値より有意に少なく, テオフィリン処置の場合は有意に多いこと, 同様に強度関数 (それぞれ個々の素子放出後の放出確率の時間的变化) において, 放出

直後の確率の, 高K液での有意の減少, テオフィリンの場合の有意の上昇, また高K液ではバリエーション-平均値関係の下降傾向などが目だつものでした. 高K液による脱分極により開く神経終末膜のCaチャネルを透過したCaイオンと, カフェイン・テオフィリンにより終末内部より遊離するCaイオンとは, 空間的にか機能的にか違いがあることが示唆されるのであります.

最後に多くの方々が一般的興味を持たれるかも

図-8 1 mM-テオフィリンおよび12mM-K⁺により素子放出頻度を増加させた場合の、図-7と同様の統計解析。

図-9 伝達物質放出にたいするアデノシンとテオフィリンの相互作用

図-10 静止時自発性素子放出の低濃度テオフィリンによる増加と、アデノシンデアミナーゼにより内在性アデノシンを分解した場合の増加との比較

しれないと思われることを—薬理学で恐縮ですが—お話して終わりに致したいとおもいます。近年アデノシンという物質は、常に生体内に存在して各種組織—平滑筋、心筋をはじめ中枢神経系、種々のシナプスにおいてその機能をモジュレートしていることが知られておりますが、カフェイン・テオフィリンはそのアデノシンのレセプターのアンタゴニストであります。神経筋接合部において伝達物質素子の放出量を正確に測定しながら、種々の濃度のアデノシンを外液に与えてみると、濃度依存性に自発性素子放出は減少し、その抑制効果の half-maximum は平均 $0.8 \mu\text{M}$ 程度です。アデノシンの灌流液中にテオフィリンを加えてその効果をみたくものが図-9 です。アデノシンの濃度—抑制効果曲線は加えたテオフィリンの濃度に応じ

て右へ平行移動し、競合抑制していることを示しています。テオフィリンのアデノシンレセプターに対する抑制の解離定数は、この場合 0.03mM でした。カフェインを用いた場合のそれは 0.06mM というやや高い値でした。正常リングル中での静止時、この濃度近辺のテオフィリンを単独で与えて伝達物質素子の放出への影響をみたものが図-10です。テオフィリン $0.03 \sim 0.05\text{mM}$ の辺りで、自発性の伝達物質放出は約10%増加しています。この増加の程度は同一接合部で、アデノシンを分解する酵素—アデノシンデアミナーゼを作用させた場合と一致し、それは内在性のアデノシンによって、常時放出がモジュレートされている部分であることを示すものであります。同様な実験結果は、神経刺激による伝達物質放出量（平均素子数）についても得られました。伝達物質放出に関するこれら薬理学的な仕事は、教室の滝川さんに協力してい

ただいたものです。このような内在性のアデノシンによる抑制は、おそらく広く中枢神経系のシナプスにおいても働いているものと思われ、このアデノシンによる抑制が取れると多少脳も元気に機能するのではないかなと思ひ、コーヒーを愛用しております。

大変準備も悪く、下手な話をご静聴いただきましてありがとうございました。このような席からではございますが、長い長い間お世話になってまいりました大学の諸先生方、事務の方々そして生理学教室の、今は亡き坂本先生・真島先生をはじめとして、何事につけても色々と支えていただいた教室員の方々に、心から感謝を捧げたいと存じます。最後に順天堂大学のますますのご発展をお祈り申し上げます。