

## 生理学事始め

九州大学大学院医学研究院統合生理学教室 大村 裕

私が研究のため R.W. Gerard 教授の研究所であるアメリカ・イリノイ大学医学部・精神神経研究所を訪れたのは 1953 年秋であった。教授室で先生に挨拶をすませた途端、「1 週間以内に、カエルの骨格筋から細胞内電極で、静止電位と活動電位を記録しなさい」と告げられた。日本からよく来たなどの言葉はない。

1953 年の夏、田崎一二さんが NIH から一時日本に帰国し、東京医科歯科大学の勝木次先生ところで研究されていた。九大生理の私のところに田崎さんが電話してこられた。「君が Gerard さんの所に行くことを彼から聞いたが、細胞内電極による研究をすることに間違いはない。これができないと話にならないから、医科歯科に来れば、教えてあげる。こちらに来てはどうか」と親切な言葉をいただいた。ガラス管を用いた細胞内微小電極法による研究は、R.W. Gerard 先生と J. Graham によるカエル骨格筋の細胞内静止電位測定の成功が最初で、1946 年である。日本では 1953 年までこの方法による研究の発表はなかった。医科歯科の助手であった萩原生長さんと共に実験をしていた田崎さんからガラス微小電極法に用いる前置増幅器の作成法を教わった。その初段に用いる真空管は 6AK5 のメタルチューブ、カソードフォロア方式の増幅器であった。ガラス微小電極は、直径約 0.5cm のガラス管を微小ガスの炎の上で熱して両端から引いて作成する。先端は約 0.5  $\mu\text{m}$  である。これに 3M KCl をつめて電極抵抗 10-20M $\Omega$  にする。3M KCl を電極に充填するのは、田崎信子夫人に教わった。夫人の考案によるアルコール置換法で、3M KCl を電極に充填する。

Gerard 先生のテクニシャン(後にダラスの大学教授)と 6AK5 を買いに行き、2-3 日後にカエル骨

格筋から静止電位と活動電位を記録することに成功した。活動電位の測定には苦勞した。収縮時に電極が抜けるからである。後に日本に帰って、ガラス微小電極の先端約 8mm のところで折って用いると筋の収縮時でも抜けないことを見出した。

Gerard 教授にさっそく実験を見ていただいたら、すぐ「Mrs. Graham が組織培養のニューロンを観察しているから、それを使ってニューロンが興奮するかどうかを見なさい」と云われた。2 本の細胞内電極を用い、一本を電流刺激用に、1 本を電位記録用に用いることで神経細胞の実験はできる。しかし 20 $\mu\text{m}$  以下の培養神経細胞に 2 本の電極を刺入することは不可能である。そこでホーイストンブリッジを用いて、1 本の電極を刺入して、電流刺激と電位記録を行えば良いと考えた。さっそくブリッジを組んで行ってみると、10pF 程度のガラス微小電極の容量に対し、対極では数  $\mu\text{F}$  以上の容量を必要とする。何か間違っているのではないかと考え NIH の田崎さんに電話で話してみたところ、一緒に実験をやってみよう、NIH に来ないかとのことである。1954 年の正月すぎであった。田崎さんとホーイストンブリッジを組んでも同様である。そこで実験をやってみようということになり、二人で市場に行ってナマズを買ってきた。ナマズの延髄に 2 個あるマウスナー神経細胞は直径 50 $\mu\text{m}$  以上である。麻酔下に延髄を露出して微小電極を刺入し静止電位を得たので、逆方向性に延髄を刺激して見事に活動電位を得ることができた。シカゴに帰って培養細胞で実験し、活動電位を得ることに成功し、1954 年 9 月ウィスコンシン大学で行われた秋期のアメリカ生理学会で発表することができた[1]。田崎さんのお陰である。この方法は、Gerard 教授の所にあとで来た高木貞

敬さんと一緒にやったカエルの臭球の実験で威力を発揮した [1]。このブリッジ法を用いて京都大の荒木辰之助さんがカエル脊髄の運動神経細胞から細胞内電位を記録したのは、私が日本に帰国してからである。ちなみに2008年に田崎一二さんをNIHに訪問した時、モデルを用いて実験を行っておられた。96才であった。惜しくも2009年1月4日、散歩中に転倒され亡くなられた。誠に偉大な先達をわれわれは失った。

鹿児島大では桜島の磯の溶岩の下に冬でも棲息しているイソアワモチを実験材料とした。食道のまわりにあるニューロンは300 $\mu\text{m}$ の大きさである。雄大な桜島の景観のもとで教室での研究は快適であった。前野巍君(島根医大名誉教授)らと、イソアワモチのニューロンは $\text{Na}^+$ 欠如でも $\text{Ca}^{++}$ がある限り興奮が起こり膜電流固定下で内向き電流が発生すること、 $\text{Ca}^{++}$ がなくなると興奮は起こらず膜の二重構造が破壊されることを電顕実験とともに証明した [2]。さらに、イソアワモチのニューロンが興奮する時、ニューロンの軸索起始部の興奮性が細胞体より高いので、軸索起始部で発生した活動電位がそのまま軸索を下降するから細胞体は活動電位を発生しないという説があった。これを確かめるために、膜インピーダンスの変化を追跡することにした。膜が興奮すれば膜抵抗は著明に減少するが、細胞体のような大きな面積のものと軸索起始部のような小さな面積のものでは、減少の程度に差があるに違いないと考えたからである。微小電極を4本細胞内に刺入して(細胞が大きいので膜電位が均等に固定されているかどうかモニター用に1本、膜電位測定用に1本、電流用に2本の計4本を2か所に並列に入れた)、2.5kHzの交流を流し、ホイストンブリッジを工夫して膜インピーダンスの減少を測定した。同時に、軸索起始部を糸で結紮してこの部の興奮を止めた時のインピーダンス変化ならびに膜電位固定下でのデータと合わせて、ニューロンが興奮する時には細胞体も興奮することを明らかにした。軸索起始部の結紮は、前野君のお家芸的な器用さによる [3]。

末梢の仕事とともに何か中枢の研究も行いたい

と常々考えていた。そのころ細胞内電極により脊髄運動ニューロンで得られる興奮性シナプス電位、抑制性シナプス電位など、オーストラリアのJ.C. Ecclesが輝かしい業績をあげていた。またEcclesの業績は、日本から留学していた額額教三さん、伊藤正男さん、佐々木和夫さんらの協力ですます隆盛になっていた。日本では勝木保次先生とその協力者による聴覚の中枢機構の研究が微小電極を用いて確実に着々と進んで、輝かしい成果が続いていた。そのようなある時、大学へ通う電車の中で読んでいたJournal of Physiology誌でB.A. CrossとJ.D. Greenの論文に遭遇した。視床下部の室傍核と視索上核の単一ニューロン活動が血液浸透圧により変化する。高浸透圧で前者のニューロン活動は抑制され、後者のそれは上昇する。したがって、これらのニューロンが産生しているバゾプレシンやオキシトシンの分泌が変化し、尿量や乳汁分泌なども変化する。すなわち飲水行動との関連を考察した立派な論文である。視床下部ニューロン活動を記録した最初のもので、昭和34年(1959年)であった。これがヒントとなったのは、摂食機構に関してである。視床下部に存在する満腹中枢と摂食中枢はすでにそれぞれ1942年と1952年に見出されていた。しかしニューロンレベルでの実験は全然ない。摂食行動に関してニューロンレベルで調べていけば、複雑な視床下部の神経機構を解きほぐすステップになるのではないかと考えて研究を行った。麻酔下のネコを用い、ガラス微小電極で満腹中枢と摂食中枢の単一ニューロン活動を同時に記録して、両中枢が相反的活動をしていることを明らかにした。また両中枢の相互作用を時系列的理論で考察した。これには加納省吾さん(九州大名誉教授)の大きな協力があった。また辺縁系の扁桃体や錐体外路系の淡蒼球と両中枢との関係、さらに頸動脈から注入したブドウ糖溶液による両中枢のニューロン活動を調べた。この結果を1964年にサイエンス誌に発表した [4]。また胃に風船を入れて拡張すると、満腹中枢のニューロン活動は上昇し、摂食中枢のニューロン活動は低下する。

さて、1965年に国際生理科学学会が東京で行わ

れた時、「摂食行動の神経機序」のサテライトシンポジウムが慶應大医学部生理の林稿教授の主催で行われた。その時シラキウス大学の M.G. Wayner 教授が私のところに来たいと云われた。1967年に Wayner さんが金沢大学医学部に来られてからのある昼休みのことである。摂食の神経機構の話になった。摂食行動に関する定説として、ハーバード大の J. Mayer は視床下部の満腹中枢（腹内側核）にブドウ糖を感受するニューロンを想定して、糖定常説を1955年に提唱した。すなわち摂食により、血糖値が脳内で2倍に上昇すると、この核のニューロン活動が亢進し、摂食が停止する。従って血糖値も正常になる。つまり脳内血糖値を一定に保ち、それをモニターするニューロンの想定である。一方、ケンブリッジ大の G.C. Kennedy と H.M. Bruce は脂肪定常説を提唱した。1951年である。糖は一定であるとはいえ、最高値と最低値の間隔が広く、短期間にその値が変化するため、長期の調節は別のものによってなされているのではないか。身体の脂肪量をモニターして、それによって摂食量を決めるのではないかと Kennedy は考えたのである。そして1966年、血中の遊離脂肪酸 (FFA) をモニターするニューロンを満腹中枢に想定した。実際にイギリスの女性は40年間に20tの食糧を摂るが、11kgしか太らないことを調べたのは Kennedy らで、いつも例としてひかれる。使うエネルギーを考えた場合、これだけ食べて食物誤差が1日0.35gに過ぎない。ヒトにしる、動物にしる、普通の空腹状態では血糖値は変わらないが、血中で変化して増加してくるものは FFA である。これ自身は脳細胞のエネルギー源になり得るものである。Wayner さんとの話は、実際にブドウ糖や FFA に反応するニューロンが視床下部にあるかないか、実験できないだろうかということになった。すなわち、直接ブドウ糖や FFA を満腹中枢のニューロンにかけてみたらということである。数本のガラス毛細管を束ねて作成した多連微小電極法を用いて種々の伝達物質やそれらのアンタゴニストをニューロンに投与することは、我々はずっと行ってきていた。ガラス管内に充填したものが電解質溶液であれば、例えばプラスチャー

ジのものであれば、同じプラスの電流をその管に流すことによってプラスチャージの物質は管外に出て、ニューロンに作用させることができる。しかしブドウ糖のような非電解質のものは無理である。この時、私は Wayner さんに「いや大丈夫だ」と答えた。それはモントリオールの K. Kanjevic が1965年に出した論文を思い出したからである。Kanjevic によれば、ガラスの粉末入りのリンガー液をガラス毛細管電極に詰めて電流を流すと、ガラスの粉末が押し出されるという。そこで実際に  $0.4M^{14}C$ -ブドウ糖リンガー液をガラス微小電極に充填して、管外に出るブドウ糖は平均  $3.5 \times 10^{-12} \text{ mol}/10^{-6} \mu\text{l}$  であることを確認した。結局、ラット満腹中枢内にブドウ糖で活動上昇するニューロン（ブドウ糖受容ニューロン）が、一方摂食中枢にブドウ糖で抑制されるニューロン（ブドウ糖感受性ニューロン）がそれぞれ1/3あることを発見し、1969年 Nature に発表した[5]。この実験では、大学院生の小野武年君（富山医科薬科大学名誉教授）が大いに活躍した。ニューロンに作用するブドウ糖濃度は2mMである。また1分子のブドウ糖が1受容部に作用することもわかった。ブドウ糖受容ニューロンについては、抗体を金沢大学分子免疫学教室の右田俊介教授にお願いして作成し、さっそくラットの満腹中枢ニューロンに投与した。新鮮な抗体を投与すると、ブドウ糖受容ニューロンの活動だけが一時的上昇した後、すぐにサイレントになり回復しない。抗体が古くなると、ニューロン活動抑制だけで回復する。また、ブドウ糖受容ニューロンの活動は FFA で抑制され、一方ブドウ糖感受性ニューロンは FFA で活動促進される。

基本的には、摂食中枢のブドウ糖感受性ニューロンと満腹中枢のブドウ糖受容ニューロンに作用するブドウ糖が満腹物質であり、FFA 空腹物質である [6]。

その後、我々は摂食によって脳内血糖値が上昇すると第三脳質壁の上皮細胞がこの上昇に反応して線維芽細胞増殖因子を放出することを見出した [7]。この線維芽細胞増殖因子は満腹物質であるが、両中枢に作用すると同時に海馬に到達して、

学習記憶を上昇させる [8]。また摂食により血中に増加したブドウ糖は、脂肪細胞にも働いて、レプチンを血中に放出させる。その時、血中レプチン濃度は2倍 ( $2 \times 10^{-8}$  M) になる。この血中レプチンの1/5000が脳内に入り、両中枢に働いて摂食を抑制すると同時に、海馬に働いて学習記憶を促進する [9]。一方、摂食時に摂食中枢から放出されるオレキシンは生後10週までのラットにおいて学習記憶を抑制する [10]。これはオレキシン受容体  $R_2$  の作用である。

このように摂食は身体の内平衡を完成させると同時に、脳の高次機能を修飾するのである。生体の妙といえる。

## 文 献

1. Takagi SF & Oomura Y: The effect of nicotine on the synapse of the central nervous system. *Am J Physiol* **192**: 447-452, 1958
2. Oomura Y, Ozaki S & Maeno T: Electrical activity of a giant nerve cell under abnormal conditions. *Nature (Lond.)* **191**: 1265-1267, 1961
3. Oomura Y & Maeno T: Does the neuron soma actually generate action potentials? *Nature (Lond.)* **197**: 358-359, 1963
4. Oomura Y, Kimura K, Ooyama H, Maeno T, Iki M & Kuninomiya M: Reciprocal activities of the ventromedial and lateral hypothalamic areas of cats. *Science* **143**: 484-485, 1964
5. Oomura Y, Ono T, Ooyama H & Wayner MJ: Glucose and osmosensitive neurons of the rat hypothalamus. *Nature (Lond.)* **222**: 282-284, 1969
6. Oomura Y, Nakamura T, Sugimori M & Yamada Y: Effect of free fatty acid on the rat lateral hypothalamic neurons. *Physiol Behav* **14**: 483-486, 1975
7. Hanai K, Oomura Y, Kai Y, Nishikawa K, Morita H & Plata-Salaman CR: Central action of acidic fibroblast growth factor (aFGF) on feeding regulation. *Am J Physiol* **256**: R217-R223, 1989
8. Sakai K, Oomura Y, Figurov A & Yagi H: Acidic fibroblast growth factor facilitates generation of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *Brain Res Bull* **33**: 505-511, 1994
9. Oomura Y, Hori N, Shiraishi T, Fukunaga K, Takeda H, Tsuji M, Matsumiya T, Ishibashi M, Aou S, Li XL, Kohno D, Uramura K, Sougawa H, Yada T, Wayner M & Sasaki K: Leptin facilitates learning and memory performance and enhances hippocampal CA1 long-term potentiation and CaMK II phosphorylation in rats. *Peptides* **27**: 2738-2749, 2006
10. Aou S, Li XL, Li AJ, Oomura Y, Shiraishi T, Sasaki K, Imamura T & Wayner MJ: Orexin (hypocretin-1) impairs water maze performance and CA-1 Schaffer collateral long-term potentiation in rats. *Neuroscience* **119**: 1221-1228, 2003