

【退任記念講義】

生理学に惹かれて

栗 原 敏

細胞生理学講座

MY ATTRACTION TO PHYSIOLOGY

Satoshi KURIHARA

Department of Cell Physiology, The Jikei University School of Medicine

I was attracted to physiology when I was a 3rd year medical student, thanks to Professor Toshio Sakai, who passed away on May 23, in 2012. In this short article, I describe my personal history in becoming a physiologist and my research works in Japan and at University College London where I spent about 2 years learning how to measure intracellular Ca^{2+} concentrations using a Ca^{2+} sensitive photoprotein, aequorin. I performed experiments on the mechanism of the Frank-Starling law of the heart in London. After returning to Japan, I continued my research on length effects in mammalian cardiac muscles and showed that the Ca^{2+} sensitivity of troponin is affected by tension (cross-bridge attachment).

I also investigated the intracellular mechanisms of the effects of neurotransmitters of the autonomic nervous system on mammalian cardiac muscles.

In addition to these research works, I explored how intracellular Ca^{2+} changes in rapid cooling contracture (RCC) in skeletal and cardiac muscles, which was one of the major works of the Department of Cell Physiology at The Jikei University School of Medicine. A low concentration of caffeine is required for RCC in skeletal muscle but not for RCC in cardiac muscle. The changes in intracellular Ca^{2+} concentration induced by rapid cooling differ between skeletal and cardiac muscles, probably due to the different types of Ca^{2+} release channels (ryanodine receptors) in each muscle. I also showed the mechanisms of the effects of caffeine on skeletal muscle.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2013;128:1-15)

Key words: muscle, intracellular Ca^{2+} , aequorin, muscle length, catecholamine, rapid cooling contracture

I. はじめに

平成24年3月31日で東京慈恵会医科大学教授を定年退任するにあたり、退任記念講義を行う機会を与えられた。この講義では、なぜ私が生理学の道を選んだのか、生理学者としてどのような研究をしたのかについて話した。

この小論は退任記念講義で話した私が生理学を目指した経緯と、おもな研究成果の一部をまとめたものである。

II. 生理学者をめぐすまで

私は昭和40（1965）年に東京慈恵会医科大学

に入学し、2年間の医学進学課程の教育を受けた後、昭和42（1967）年に西新橋の専門課程に進んだ。4月から基礎医学の講義が始まり、第二生理学教室の最初の講義で、酒井敏夫教授が教室の先生方を連れて西講堂に入ってこられたとき、何か他の教室とは異なる新鮮な雰囲気を感じた。その後、講義、演習などが始まり、酒井教授が学生に親しく接して下さり、教育熱心だったので多くの学生が教室に出入りするようになった。私は演習で、西丸和義先生（本学大正10年卒）が書かれた脈管学の小論を読むことになり、それが契機となって酒井先生に誘われて、カエルの水かきの毛細血管を実体顕微鏡下に観察して、実験のまねごとをやるようになった。以来、生命現象を直接

観察し記録する生理学に興味を持ち惹かれるようになった。

酒井先生は、蛙の骨格筋に拘縮を起こさない少量のカフェイン（1 mM程度）を作用させてから、溶液の温度を急速に、室温から4℃以下に低下させると最大収縮が生じることを見つけており、これを急速冷却拘縮（急冷拘縮）（rapid cooling contracture, RCC）と命名した¹⁾。急冷拘縮は、酒井先生が米国ロックフェラー大学に留学していた時に、骨格筋に少量のカフェインを作用させるとさざ波のような不規則な収縮波が生じることを観察し、これを抑制するために低温にしたところ、予想に反して大きな収縮が生じることを見つけたことが発見の端緒となっている。先生はガマの膀胱平滑筋でも急冷拘縮が起こることを見つけていて、私にこの研究をさらに進めるようにいわれた。ガマの膀胱は薄いので、標本全体の温度を瞬時に変化させることができる利点がある。授業が終わってから毎日のように、時には日曜日も第二生理学教室の第8研究室の片隅で実験をやった。ガマ膀胱平滑筋は高カリウム溶液中でも急冷拘縮が起こることなどから、急冷拘縮は膜電位変化によらない収縮であるという結論を得た。また、Ca²⁺が無い溶液中でも観察されたので、細胞内のCa²⁺貯蔵部位から放出されるCa²⁺によって誘起される

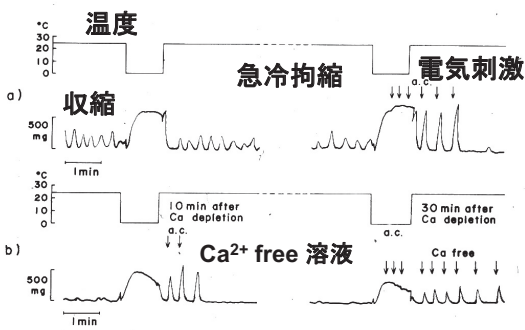


Fig. 1. ガマ膀胱筋の急冷拘縮

摘出したガマ膀胱平滑筋の張力（収縮）を記録し、溶液（リンゲル氏液）の温度を、室温から4℃に急速に低下させると収縮が誘起された（急冷拘縮）。急冷は50 Hzの交流電気刺激をあたえて誘起した最大収縮と同程度の張力を発生させ、Ca²⁺を除去した溶液中でも観察できた。平滑筋にも細胞内にCa²⁺を蓄積している小器官があること、そこから急冷によってCa²⁺が放出されることが示唆された。医学部3年生から5年生の時に行った実験で、第11回日本平滑筋学会で発表した²⁾。

と考えた（Fig. 1）。酒井先生から、第11回日本平滑筋学会（会長：大井実教授，第二外科学講座）（昭和44（1969）年，箱根小湧園）で研究結果を発表するよういわれた。学会とはどのようなものか全く知らない私は発表を躊躇した。しかし、自分を試してみようという気持ちになり発表した²⁾（Fig. 2）。この学会発表は大変よい刺激となり、翌年は、広島市で日本平滑筋学会が開催され、酒井先生に連れられ広島県呉市の西丸先生のご自宅にある脈管学研究所を訪れ、西丸先生から研究者の心を伺い大いに啓発された。“出来ないのではない、やらないのだ”，“自らに求める心”などの教えはこの時に伺ったもので、私のその後の心のよりどころとなっている。

III. 第二生理学教室で研究に惹かれる

卒業を前に臨床医学の道を歩もうかと考えたが、好きなことをやりたいという一心で、酒井先生が主宰する第二生理学教室に助手として採用していただき研究生活を始めることになった。当時、電気生理学が全盛で、ガラス微小電極を刺入することが困難な平滑筋でも活動電位の記録ができるようになり、九州大学歯学部生理学教室の栗山熙教授が精力的に仕事をしていました。酒井先生の指示



Fig. 2. 第11回日本平滑筋学会総会（於：箱根小湧園、1969年7月15, 16日）

第11回日本平滑筋学会総会で研究成果を発表する機会を与えられたときに、会場の箱根小湧園の前で撮影した写真（昭和44（1969）年）。会長の大井実教授を中心に、恩師の故酒井敏夫教授、中野昭一助教授（当時）、同級生の足立穰一君と一緒に撮った写真。

で、卒業後は栗山研究室で平滑筋の電気生理学を学ぶことになった。留学の目的は電気生理学の基礎を学び、温度変化時の膜透過性の変化を知ることであった。英国から留学で来て研究していたCreed女史がモルモット膀胱平滑筋の膜特性を調べていたので、私はCreed女史から、微小電極の作成法、微小電極刺入法などを教えてもらった。モルモット膀胱平滑筋の膜電位には $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pumpが関与していて起電性があること、低温では K^+ に対する透過性が低下して脱分極が起こることなどを見いだした^{3) 4)}。

約8ヵ月間の短期国内留学を終えて第二生理学教室に帰った。教室では栗山研究室で学んだことを再現し、モルモット膀胱平滑筋の膜電位が測定できるようになった。モルモット膀胱平滑筋の興奮収縮連関の研究をやりそうと考えているうちに、骨格筋の急冷拘縮を抑制するプロカインは平滑筋に対してどのような作用を持つのか試してみた。当時、プロカインは骨格筋の急冷拘縮やカフェイン拘縮を抑制することが知られていたもので、プロカインはモルモット膀胱平滑筋の自発収縮を抑制すると予測したが、予想に反して自発収縮を亢進させた。プロカインは K^+ 透過性を抑制して脱分極を起こすことが明らかになり、これが学位論文になった (Fig. 3)⁵⁾。

平滑筋の研究は栗山研究室で精力的に行われており、同じ分野の研究に参入するには限界があると感じていたところ、名取禮二先生からの依頼で

酒井先生が心筋の研究を手掛けることになった。私もお手伝いすることになり、手始めにガマ心筋筋で急冷拘縮が生じるか試したところ、急冷拘縮が起こることがわかり、心筋でも Ca^{2+} 貯蔵部位があり、そこから急速冷却（急冷）によって Ca^{2+} が直接放出されることが明らかになった⁶⁾⁷⁾。

私は温血動物心筋のほうが冷血動物心筋よりも筋小胞体 (sarcoplasmic reticulum, SR) がよく発達しているので、モルモットの心室筋 (乳頭筋) で急冷の効果を試したところ、急冷で拘縮が生じることが分かった。モルモット心室筋では、急冷する前に繰り返し単収縮を誘起しておかないと急冷拘縮を誘発することができない。急冷前の単収縮の刺激頻度が高いと急冷拘縮も大きく、刺激を停止してから急冷を開始するまでの時間が長いと急冷拘縮は減衰するなどの特徴があることが分かった。急冷拘縮は、高濃度KCl溶液中でも繰り返し誘起できるので、膜の脱分極が直接関与していないことが分かった。これらの結果などから、温血動物心室筋の急冷拘縮は、筋小胞体に蓄積した Ca^{2+} が急冷によって直接放出され、その結果、誘起されるものと考えた (Fig. 4)⁸⁾ (ロンドンに留学する前からデータを持っていたが、帰国してさらに実験をやり発表したもので、論文発表が遅れた)。当時、興奮収縮連関のメカニズムの詳細は明らかになっていなかったもので、急冷が直接、筋小胞体から Ca^{2+} 放出を誘起するという説は、筋生理学者から興味を持たれ、筋小胞体の貯蔵 Ca^{2+} を推定で

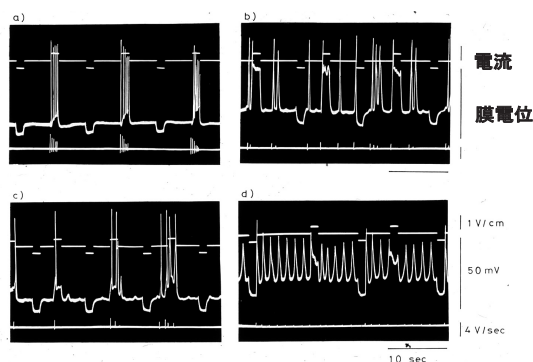


Fig. 3. モルモット膀胱平滑筋に対するプロカインの作用

モルモット膀胱平滑筋の活動電位を記録しながら、細胞内に一定の電流を流して膜抵抗を測定し、プロカインを作用させた。プロカインは膜を脱分極させて自発放電頻度を増加させた。また、膜抵抗を増加させた⁵⁾。

Kurihara S. The effect of procaine on the mechanical and electrical activities of the smooth muscle cells of the guinea pig urinary bladder. Jpn J Physiol. 1975; 25: 775-88. より転載。

きることは魅力的であった (Fig. 5)。

これらの実験結果をまとめて、昭和52 (1977) 年7月、パリで開催された第27回国際生理学会世界大会で発表した。心筋でも筋小胞体が Ca^{2+} を蓄積し、膜電位変化を介さないで筋小胞体から Ca^{2+} を放出させることができる急冷は筋生理学者の興味を惹いた。パリではUniversity College LondonのBrian Jewell教授と会う機会を得て、話を聞いてもらい興味を持ってくれた。Jewell教授らは、単収縮をいろいろな頻度で誘発して階段現象は細胞内蓄積 Ca^{2+} で説明できることを発表した直後だったので、私の考えを受け入れてくれた。パリからの帰路、University College Londonの生理学教室を訪れる予定だった。University College Londonを訪問し、当時のチェアマンだったWilkie教授とSir Andrew Huxley教授に会うことができ、私の研究を聴いてもらい留学の希望を伝えた。当時、教室では米国のMayo Clinic薬理学教室 (John Blinks教授) での留学を終えて帰国したDavid Allen博士が、発光蛋白イクオリン (イクオリン、下村脩博士はイクオリンが正しいとしている) (aequorin) を使って研究を始めようとしていた。

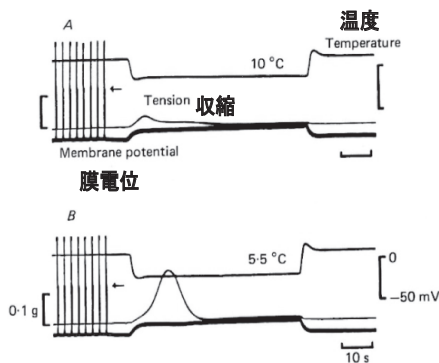


Fig. 4. モルモット右室乳頭筋の急冷拘縮
モルモットの右室乳頭筋を摘出して張力を測定し、1 Hzで単収縮を誘起した後、液温を急速に低下させると収縮が生じる。温度、張力 (収縮)、膜電位を同時に記録しており、液温を30°Cから10°C (上段)、5.5°C (下段) に急速に低下させると活動電位を伴わない収縮がおこる。膜は脱分極するがわずかである。急冷拘縮を観察するためには、急冷前に単収縮をいろいろな刺激頻度で誘起しておくことが必要で、刺激をあたえておかないと急冷拘縮は生じない。矢印は単収縮張力のピークを示しており、張力と重なっているのは活動電位⁹⁾。
Kurihara S, Sakai T. Effects of rapid cooling on mechanical and electrical responses in ventricular muscle of guinea-pig. *J Physiol.* 1985; 361: 361-78. より転載。

David Allen博士の指導者だったBrian Jewell教授から、細胞内 Ca^{2+} を測定する研究を一緒にやってはどうかと誘われ、昭和53 (1978) 年1月に、University College Londonに留学することになった。

IV. University College Londonの生理学教室に留学

1. 発光蛋白イクオリンで心筋細胞内 Ca^{2+} を測定する

イクオリンは発光クラゲ (Aequorea aequorea) から抽出された蛋白で、 Ca^{2+} と特異的に反応して発光する性質があり (Fig. 6)⁹⁾、 Ca^{2+} 結合部位が3ヵ所あることが想定されていた。また、 Ca^{2+} がなくてもごく微弱な光を出す性質があることが、AllenとBlinksによって報告されていた¹⁰⁾。イクオリンの発光はわずかに Mg^{2+} によって抑制されるが¹¹⁾ (Fig. 7)、細胞内 Mg^{2+} 濃度は急速に、また、大きく変化をしないので実際にはほとんど影響されないものと考えられる。発光はpHの影響を受けにくく、ATP濃度の影響がないことなどから、

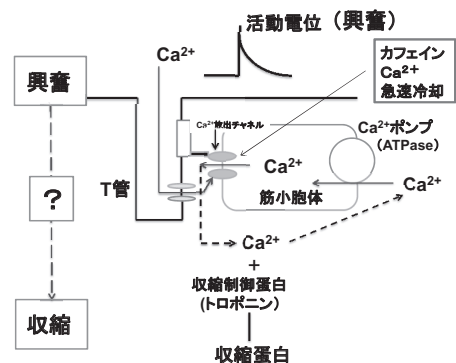
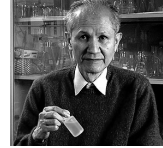


Fig. 5. 興奮収縮連関の模式図
細胞膜の興奮 (活動電位) が収縮という機械的現象に変換される過程は多くの生理学者の興味を惹いた。米国のA. Sandozがexcitation-contraction coupling (E-C Coupling) という概念を提唱した。その後、筋小胞体に Ca^{2+} 放出チャネルと Ca^{2+} ポンプがあること、T管の存在とそこに電位センサー (心筋では Ca^{2+} チャネル) があることなどが明らかになった。また、収縮制御メカニズムも解明され、 Ca^{2+} 結合蛋白トロポニンの存在と収縮制御の分子機構が明らかになった。カフェインは直接 Ca^{2+} 放出チャネルに作用し、 Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出を促すことが明らかになった。急冷は温度変化が直接 Ca^{2+} 放出チャネルを開口させて、筋小胞体内の Ca^{2+} を放出させると考えられた。

Aequorin(イクオリン、エクオリン)

下村脩博士がイクオリンと命名(分子量 28,000)
Ca²⁺と特異的に反応して発光(波長465nm)する



緑色蛍光蛋白(GFP, Green Fluorescent Protein)も発見した
ノーベル化学賞を共同受賞(Roger Tsien, Martin Chalfie)(2008年)

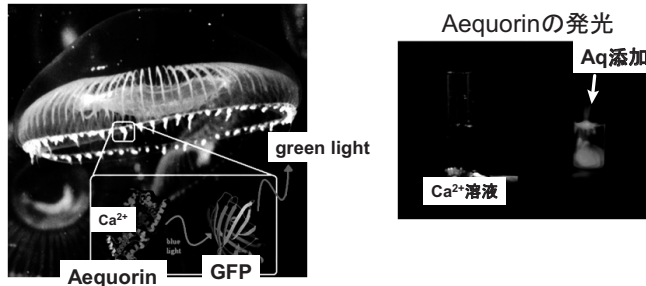


Fig. 6. イクオリン (エクオリン) (aequorin) は発光クラゲから抽出された発光蛋白で、下村脩博士が発見した⁹⁾。イクオリンはCa²⁺と特異的に反応して、発光には酸素、ATPを必要とせず、pHやMg²⁺の影響がわずかであるなどの性質を有しており、細胞内Ca²⁺指示薬として汎用された。イクオリンはCa²⁺と反応すると465 nmの波長の光を発する。下村博士は同時に、緑色発光蛋白(GFP)を発見した。これが後に、遺伝子のマーカーとして使われるようになり、下村博士はノーベル生理学・医学賞を受賞した。

発光強度の対数表示

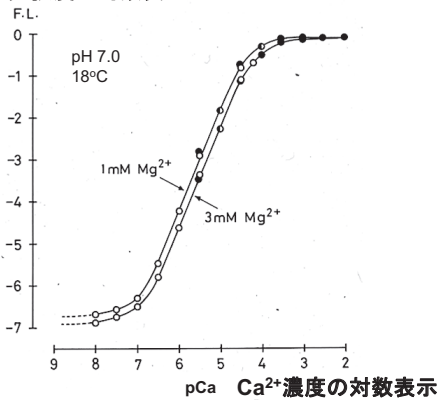


Fig. 7. 溶液中で測定したCa²⁺濃度とイクオリンの発光の関係。横軸はCa²⁺濃度の対数表示、縦軸は各Ca²⁺濃度における発光量を最大発光値(mMオーダーの溶液中での発光値)で除した値の対数表示(fractional luminescence, L.F.)。pHは7.0、温度18℃、溶液中のMg²⁺濃度が、1 mMと3 mMで測定。Mg²⁺は発光をわずかに抑制する。しかし、細胞内Mg²⁺濃度は比較的安定に維持されており、細胞内Mg²⁺濃度は約1 mM程度と考えられている¹¹⁾。

Konishi M, Kurihara S. Effects of caffeine on intracellular calcium concentration in frog skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 1987; 383: 269-83. より転載。

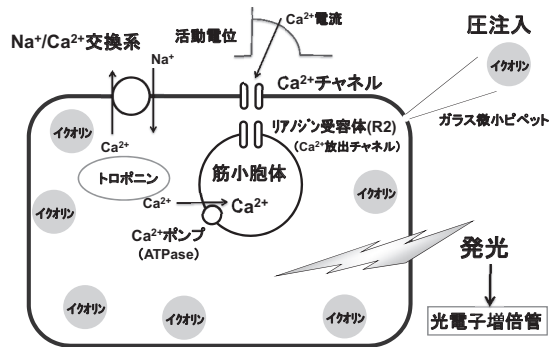


Fig. 8. イクオリンによる細胞内Ca²⁺濃度測定の様式図。心筋細胞を模式的に示した。細胞内には筋小胞体があり、Ca²⁺を放出するCa²⁺放出チャネル(リアノジン受容体)とCa²⁺を取り込むCa²⁺ポンプがある。また、Ca²⁺を結合し収縮・弛緩を調節しているトロポニンがある。イクオリンをガラス微小ピペットで細胞内に圧注入しておく。活動電位が発生すると、Ca²⁺電流が流れ、筋小胞体からCa²⁺が放出される(Ca²⁺誘発性Ca²⁺放出)。細胞内に増加したCa²⁺はイクオリンに結合すると発光し、これを光電子増倍管で検出する。細胞内に増加したCa²⁺はトロポニンに結合すると収縮が誘起され、筋小胞体のCa²⁺ポンプによって取り込まれると、トロポニンからCa²⁺が解離して、筋は弛緩する。細胞内に増加・減少するCa²⁺をイクオリンの発光として検出できる。

イクオリンは細胞内Ca²⁺指示薬として神経、筋などに応用されていた¹²⁾。

温血動物心筋細胞内のCa²⁺をイクオリンで測定するためには、ガラス微小ピペットにイクオリンを充填して、細胞内に刺入してから窒素ガスで圧をかけて細胞が壊れないように注入しなくてはならない。60個から120個くらいの細胞にイクオリンを注入してから、光電子増倍管で微弱な光を検出し加算平均しないと良好な信号が得られない (Fig. 8)。張力と同時測定すると細胞内Ca²⁺濃度変化 (Ca²⁺ transient, CaT) に続いて、張力は遅れて増加・減少することがわかる。収縮に先立って細胞内Ca²⁺濃度が変化し張力はそれに遅れて発生している。CaTの減衰相 (下降相) は、(1) 細胞内に増加した細胞内Ca²⁺が筋小胞体に再び取り込まれる、(2) Ca²⁺結合蛋白トロポニン (troponin) のsubunitであるトロポニンC (TnC) に結合する、(3) Na⁺-Ca²⁺交換によって細胞外に排出されるなどの機能を反映しているものと考えられる (Fig.9) (帰国後に、活動電位、張力、Ca²⁺信号を同時記録したものである)¹³⁾。

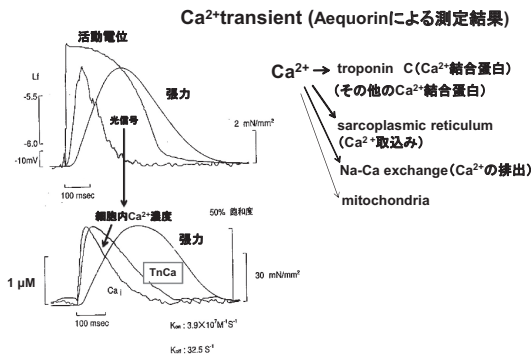


Fig. 9. イクオリンによる細胞内Ca²⁺濃度変化 (Ca²⁺ transient) の測定結果¹³⁾

上段は、活動電位、張力、イクオリンの光信号を同時に記録した結果を示してある。活動電位に続いて光信号は増加・減少している。光信号がピークに達すると張力が遅れて発生している。下段は、光信号を細胞内Ca²⁺濃度に変換し、Ca²⁺がトロポニンC (troponin C) に結合して複合体 (TnCa) が形成される経過を示したものである。細胞内に増加したCa²⁺はトロポニンCに結合し、筋小胞体に再び取り込まれたり、Na⁺-Ca²⁺交換によって細胞外に排出される。一部はミトコンドリアに取り込まれて、再び、濃度が減少する。Ca²⁺とトロポニンの複合体 (TnCa) に遅れて張力が発生することが分かる。

Kurihara S. Regulation of cardiac muscle contraction by intracellular Ca²⁺. Jpn J Physiol. 1994; 44: 591-611. より転載。

2. Frank-Starlingの心臓の法則

University College Londonでは心臓のFrank-Starlingの法則の細胞内メカニズムの解明に取り組んだ。ある範囲で筋を伸長すると発生張力が増大する。その時の細胞内Ca²⁺濃度を測定し、発生張力の増加と細胞内Ca²⁺濃度との関係を明らかにすることを試みた。最大張力を発生する筋長 (Lmax) から18%筋長を短縮させると、張力は著しく低下するが、光信号 (細胞内Ca²⁺濃度) のピークはほとんど変化しない。しかし、Ca²⁺信号の下降相 (減衰相) の時間経過 (減衰時間) が遅くなるのが明らかになった。再び、筋を伸長すると、張力は回復し、Ca²⁺信号の減衰時間が短縮した (Fig. 10)¹⁴⁾。このように、発生張力はCa²⁺信号のピークよりも減衰相と関係があることが明らかになった。筋長変化は細胞内Ca²⁺濃度のピーク値よりも、Ca²⁺濃度を低下させる他の因子と関係が深いことが考えられる。細胞内に増加したCa²⁺の大部分はトロポニンCと結合するので、トロポニンCのCa²⁺結合能 (親和性) が高くなると遊離Ca²⁺がトロポニンCに結合しやすくなり、Ca²⁺信号の

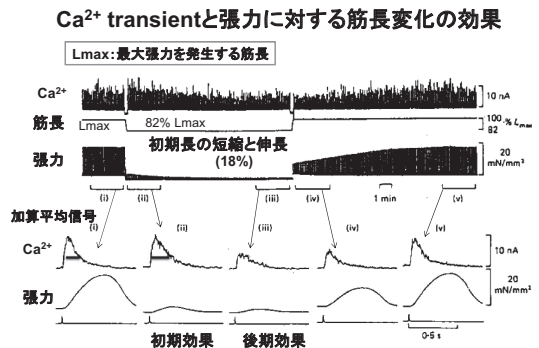


Fig. 10. ネコの乳頭筋のCa²⁺ transient (細胞内Ca²⁺濃度変化) と張力に対する筋長変化の効果

上段半分は記録された実際の信号、下段は加算平均信号を示す。それぞれ、細胞内Ca²⁺濃度、筋長、張力を示している。筋長を最大張力を発生するLmaxから18%短縮すると (82%Lmax) 張力は著しく減少するが、Ca²⁺信号のピークには大きな変化が見られない (初期効果)。しかし、時間とともに、張力もCa²⁺信号のピークも低下する (遅発効果)。筋長をもとにもどると、反対の効果が観察される。加算平均信号を見ると、筋長短縮時には、Ca²⁺信号のピークはほとんど変化しないが、Ca²⁺信号の持続時間 (横バーで示した) が延長している (初期効果)¹⁴⁾。

Allen DG, Kurihara S. The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. J Physiol. 1982; 327: 79-94. より転載。

減衰が速くなるものと解釈した (Fig. 11) ¹⁴⁾。

筋長変化時にはこのような早期効果のほかに、遅発効果があることも明らかになった。筋長を Lmax から短縮させると、Ca²⁺ 信号の下降相は延長するが、数分以内に Ca²⁺ 信号のピークは次第に低下してくる。同様に筋を伸長した時にも同じような変化が観察され、伸長によって Ca²⁺ 信号の下降相は短縮し、時間と共にピークは次第に増大する ¹⁴⁾。このような筋長変化に伴って観察される遅発効果は、カフェインの作用を受けることなどから筋小胞体の Ca²⁺ 含量が関係していることが示唆されている。

我々は、この他、ラット、ネコの心筋を使って、刺激頻度、細胞外 Ca²⁺ 濃度変化、カテコールアミンの影響、カフェインの効果などを観察した。

これらの実験結果は、Journal of Physiology に論文発表する前に、昭和 54 (1979) 年 9 月、Antwerp で開催された第 5 回心臓に関するワークショップで発表した ¹⁵⁾。

その後、帰国前にイクオリンに関する基礎を学ぶために、Mayo Clinic の Blinks 教授のところに約

2 ヶ月間滞在した。Mayo Clinic ではイクオリンの抽出・精製法を学んだ。Blinks 教授は大変慎重な方で、精製度の高いイクオリンの抽出を行い、世界中の研究者に実費で分けていた。我々も長年にわたり、Blinks 教授のところからイクオリンを手し実験に使用していた。

V. 帰国後、イクオリンを使って心筋の収縮特性を解明する

帰国後は、温血動物心室筋の Ca²⁺ 信号 (Ca²⁺ transient, CaT) を測定し、収縮との関係をさらに調べた。

1. 筋長効果—筋長依存性か張力依存性か—

University College London でやった研究をさらに発展させることを試みた。これまでは初期長 (単収縮を誘起する前の筋長) (initial muscle length) を変化させたときの Ca²⁺ 信号の変化を測定したが、単収縮中に筋長を Lmax (最大張力を発生する筋長) から急速に短縮させた時の Ca²⁺ 信号も観察した。急速な筋長の短縮によって Ca²⁺ 信号の減

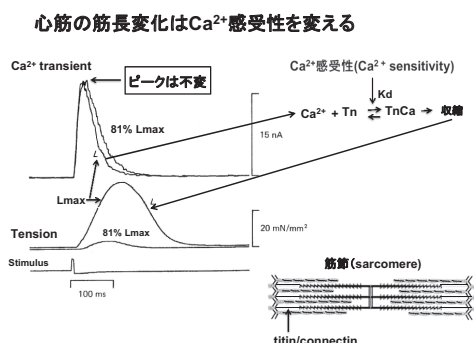


Fig. 11. 心筋の筋長変化は収縮蛋白系の Ca²⁺ 感受性を変化させる

筋長の短縮によって、Ca²⁺ とトロポニン (トロポニン C) の結合 (親和性) が低下し、Ca²⁺ はトロポニン C から解離しやすくなり、結合した Ca²⁺ が即座に解離するので細胞内 Ca²⁺ 濃度は増加し Ca²⁺ 信号の下降相が延長する。逆に、伸長は Ca²⁺ 感受性を上昇させるので、Ca²⁺ とトロポニン C との結合が強くなる。その結果、Ca²⁺ はトロポニン C と結合しやすくなるので Ca²⁺ 信号の下降相は速く減衰する ¹⁴⁾。L は Ca²⁺ 信号、Lmax は最大張力を発生する筋長。筋節を模式化した。弾性蛋白タイチンがフィラメントの配列を決めている。

Allen DG, Kurihara S. The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. J Physiol. 1982; 327: 79-94. より転載。

収縮中に筋長を短縮したときの細胞内 Ca²⁺ 濃度

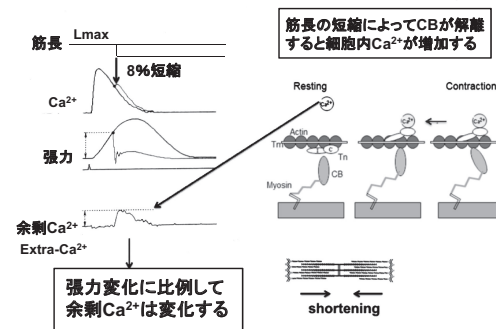


Fig. 12. 単収縮中に筋長を急速に短縮した時の細胞内 Ca²⁺ 濃度変化

単収縮中に筋長を Lmax から 8% 急速に短縮すると張力は低下し、細胞内 Ca²⁺ は一過性の増加・減少 (ハンプ) を示す。これを余剰 Ca²⁺、あるいは、Extra-Ca²⁺ と呼ぶ。収縮している筋の筋長を急速に短縮 (quick release) すると、クロスブリッジ (CB) が解離して、筋は短縮 (shortening) する。トロポニン C と Ca²⁺ との親和性が低下して、Ca²⁺ がトロポニン C から解離するため細胞内 Ca²⁺ が増加するものと考えられる。この余剰 Ca²⁺ は筋長変化ではなく張力変化に依存していることが示された ¹⁶⁾。

Kurihara S, Komukai K. Tension-dependent changes of the intracellular Ca²⁺ transients in ferret ventricular muscles. J Physiol. 1995; 489: 617-25. より転載。

衰相は一過性に増加・減少しハンプ (hump) が観察された (余剰 Ca^{2+} , extra- Ca^{2+} と呼ばれることもある) (Fig. 12)¹⁴⁾¹⁶⁾. この余剰 Ca^{2+} は、筋長変化の程度が大きいと大きくなり、筋長変化の程度が小さいと減少した. 単収縮の経過中のいろいろな時点で同じ程度の筋長変化 (L_{\max} から 8% の筋長短縮) を与えると、筋長変化は同じでも、筋長変化に伴う張力変化の程度が大きいと余剰 Ca^{2+} は大きくなった. 余剰 Ca^{2+} はトロポニンから解離した遊離 Ca^{2+} を反映しているとする、筋長の急激な短縮によって結合していたクロスブリッジ (cross-bridge, CB) がはずれて、それに伴って張力が低下し、その張力変化がトロポニンの Ca^{2+} 親和性 (結合能) を低下させた結果、 Ca^{2+} がトロポニンから解離しハンプが生じたものと考えられた. このように張力に依存して (クロスブリッジの結合に依存して) トロポニンの Ca^{2+} 親和性が変化することによって、心筋の収縮・弛緩が円滑に行われていると考えることができる. 細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇して、 Ca^{2+} がトロポニン C に結合し、アクチンとミオシンの相互作用を抑制していたトロポニン I の抑制がとれると (脱抑制) クロスブリッジが形成されて張力が発生する. 張力が発生すると、トロポニン C と Ca^{2+} の結合がより強くなり張力発生が促進される. Ca^{2+} 濃度が減少するとトロポニン C から Ca^{2+} が解離し、トロポニン I がクロスブリッジの結合を再び抑制する. それによって張力は低下する. 張力低下はトロポニン C と Ca^{2+} の結合能をさらに低下させてクロスブリッジの解離を促進する. このようなメカニズムが働いているので、心筋の収縮・弛緩が円滑に行われているものと考えられる (Fig. 12)¹⁶⁾.

単収縮中に筋長を変化させた時の余剰 Ca^{2+} は、筋長変化によってもたらされるのではなく、張力が変化することによって発生することを確かめるために、張力を特異的に抑制する 2,3-butanedione monoxime (BDM)¹⁷⁾ (10 mM) 存在下で筋長を L_{\max} から急速に短縮させたが、 Ca^{2+} 信号には変化が見られなかった. 筋長を変化させても張力が変化しないと余剰 Ca^{2+} が観察されないことが明らかになった (Fig. 13)¹⁸⁾. この結果は、張力 (クロスブリッジ) に依存して、トロポニン C の Ca^{2+} 結合能が変化するという考えを支持する (Fig.

13).

心筋にリアノジン (ryanodine) ($5 \mu\text{M}$) を作用させると、 Ca^{2+} 信号と収縮は著しく抑制され、両信号の時間経過が遅延した. 心筋をリアノジン処理した後、パルス幅 40 msec, 刺激頻度 10 Hz で刺激すると、強縮を誘起することができる. 細胞外 Ca^{2+} 濃度を変化させると、細胞内 Ca^{2+} 濃度と強縮張力が変化するので、細胞内 Ca^{2+} 濃度-張力関係を求めることが可能となる. スキンド標本の pCa-張力関係を生筋で測定できるのである. 筋長を短縮させると細胞内 Ca^{2+} 濃度-張力関係は右方に移動するので、 Ca^{2+} 感受性が低下することが分かった (Fig. 14)¹⁹⁾. また、強縮中に筋長を急速に短縮すると張力は瞬時に低下し、それに伴って細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加し、短縮で観察された余剰 Ca^{2+} と同様の変化が、強縮中の筋長変化でも観察された²⁰⁾.

2. カテコールアミンの影響

心筋は自律神経系の支配を受けており、収縮・弛緩はカテコールアミンによって修飾されている. 我々は、 β_1 受容体刺激による Ca^{2+} 信号と張力

BDM存在下での長さ変化の効果

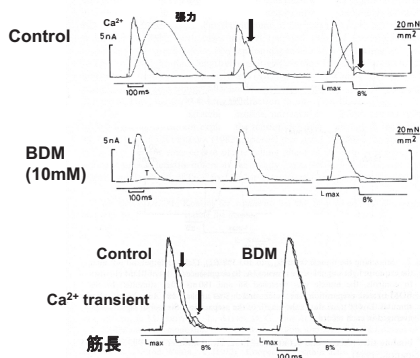


Fig. 13. 張力変化が Ca^{2+} 感受性を変化させることを BDM (2,3-butanedione monoxime) を用いて示した¹⁸⁾. 上段はコントロールで、筋長を 8% 短縮すると余剰 Ca^{2+} が観察される (矢印). しかし、BDM (10 mM) で処理して張力を抑制しておいてから、筋長を短縮させても余剰 Ca^{2+} は観察されない (中段). 下段は、コントロール (左) と BDM 存在下での (右) 余剰 Ca^{2+} (矢印) を示している. 筋長変化でなく張力が変化しないと余剰 Ca^{2+} は出現しない. Kurihara S, Saeki Y, Hongo K, Tanaka E, Suda N. Effects of length change on intracellular Ca^{2+} transients in ferret ventricular muscle treated with 2,3-butanedione monoxime (BDM). *Jpn J Physiol.* 1990; 40: 915-20. より転載.

の変化を観察した。β₁受容体刺激 (isoprenaline, Isoを用いた) はCa²⁺信号を増大させ、減衰時間を短縮させた²¹⁾。また、収縮を増強し、収縮が頂点に達するまでの時間 (time to peak) と弛緩時間 (relaxation time) を短縮させ、収縮・弛緩の時間経過を速くした (Fig. 15, 16)²¹⁾²²⁾。これらの効果はβ₁受容体拮抗薬で抑制された。

前述したように、心筋で強縮を起こさせて細胞内Ca²⁺濃度-張力関係を求め、Isoの作用を観察した。細胞内Ca²⁺濃度-張力関係はS字状曲線を描き、Hillの式で近似できた。IsoはこのS字状曲線を右方に移動させ、かつ、傾斜 (slope) を鈍化させた。これらの結果は、β₁受容体刺激は収縮蛋白系のCa²⁺感受性を低下させることを示唆している (Fig. 16)²²⁾。

β₁受容体刺激は細胞内cAMP濃度を増加させ protein kinase Aを活性化し、種々の蛋白を磷酸化することが知られている。標的蛋白 (target protein) は、Ca²⁺チャネル、Ca²⁺放出チャネル (リアノジン受容体)、フォスフォランバン (phospholamban, PLN)、トロポニンI (TnI) がおもなものである。Ca²⁺チャネルの磷酸化はCa²⁺電流を増大させ流入Ca²⁺が増える。その結果、Ca²⁺放出チャネルからのCa²⁺放出が促進される。細胞内に増加したCa²⁺は筋小胞体のCa²⁺ポンプによ

て取り込まれるが、Ca²⁺ポンプを抑制していたフォスフォランバン (PLN) が磷酸化されるとCa²⁺ポンプの抑制がとれて、Ca²⁺取り込みが促進される。したがって、細胞内Ca²⁺濃度が減少する時間経過が速くなりCa²⁺信号の減衰時間が短縮する。筋小胞体のCa²⁺取り込み促進によって、筋小胞体内のCa²⁺含量は増加し、Ca²⁺放出チャネルからのCa²⁺放出量は増加する。このように細胞内Ca²⁺信号は増大するとともに、減衰相が速くなる。TnIの磷酸化は、収縮蛋白系のCa²⁺感受性を低下させるので、強縮における細胞内Ca²⁺濃度-張力関係は右方に移動し収縮は抑制されるが、抑制効果以上に細胞内Ca²⁺濃度が増加するので、結果的に単収縮は增高する。さらに、TnIからCa²⁺が速く解離するとともに、筋小胞体のCa²⁺取り込み速度が速くなっているため、弛緩時間が短縮する (Fig. 16)。収縮力の増加と速い弛緩は、生体内で心臓の一回拍出量を増やすのに都合がいい。

3. 急冷拘縮の細胞内Ca²⁺濃度変化

急冷拘縮は筋小胞体からのCa²⁺放出によって生じることが推察されていたが、細胞内Ca²⁺濃度変化と収縮との関係は明らかでなかったため、カエル骨格筋、温血動物心筋の急冷拘縮時の細胞内Ca²⁺濃度を測定した。

1) 骨格筋に対するカフェインの効果

著作権の関係により画像を表示することができません。

以下のURLをご参照ください。

<http://ajpheart.physiology.org/content/273/3/H1068.full.pdf+html>

Fig.14. 心筋に強縮を誘起した時の細胞内Ca²⁺濃度と発生張力との関係

フェレットの乳頭筋にイクオリンを注入した後、リアノジン (5μM) を作用させて、パルス幅40 msec, 10 Hzで刺激すると強縮を誘起することができる。強縮時の細胞内Ca²⁺濃度と張力との関係を求めることによって、スキンド標本におけるpCa-張力関係と同様に、生筋におけるpCa-張力関係が得られる。筋長を短縮させると最大張力が低下するとともに、細胞内Ca²⁺濃度-相対張力関係は右方移動するので、収縮蛋白系のCa²⁺感受性が低下することが分かる¹⁹⁾。右側の図はそれぞれの筋長での記録。左図上段は右図の結果から得られた細胞内Ca²⁺濃度-張力関係。左図下段は、Lmaxと90% Lmaxの最大張力を1として基準化して重ねたもの¹⁹⁾。

Komukai K, Kurihara S. Length dependence of Ca²⁺-tension relationship in aequorin-injected ferret papillary muscles. Am J Physiol. 1997; 273: H1068-H74. より転載。

ラット心室筋におけるβ₁受容体刺激効果

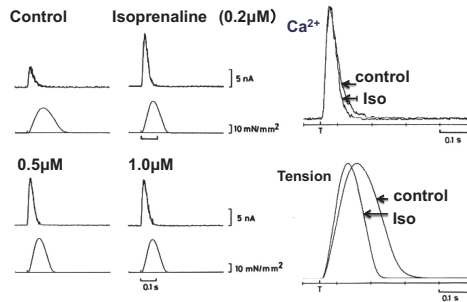


Fig. 15. ラット心室筋におけるβ₁受容体刺激効果
 ラットの右室乳頭筋から記録された、Ca²⁺ transientと張力に対する isoprenaline (Iso)(0.2-1.0 μM)によるβ₁受容体刺激効果²¹⁾。IsoによってCa²⁺信号と張力は増大し、両信号の時間経過が速くなる。右の図はCa²⁺信号と張力をそれぞれ重ねて表示したもので、上段はCa²⁺信号、下段は張力、Ca²⁺信号の減衰の後半が速くなり、弛緩時間は短縮している。また、張力がピークに達する時間 (time to peak tension) が短縮している²¹⁾。この実験結果は、Berne RM & Levy MN の Physiology (3rd ed.) に引用された。
 Kurihara S, Konishi M. Effects of β-adrenoceptor stimulation on intracellular Ca transients and tension in rat ventricular muscle. Pflügers Arch. 1987; 409: 427-37. より転載。

β₁受容体刺激効果

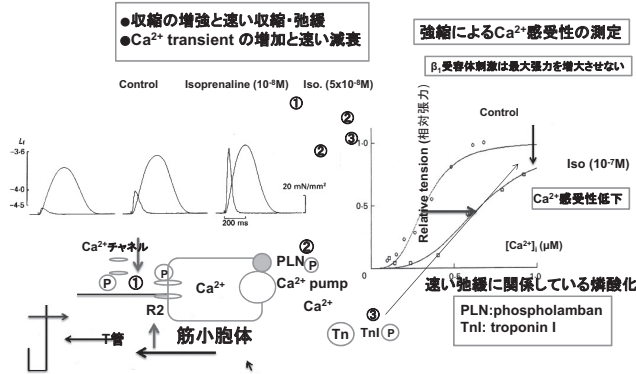


Fig. 16. フェレット心室筋に対するβ₁受容体刺激効果²²⁾
 左上段はフェレット心室筋から記録されたCa²⁺信号 (速い信号)と張力 (遅い信号)に対する isoprenaline(Iso)の効果。図中の番号は、左下段の模式図中の番号と一致させて示してある。IsoはCa²⁺チャネル、フォスフォランバン (phospholamban, PLN)、トロポニンIをリン酸化し、Ca²⁺電流を増加させると共に筋小胞体のCa²⁺放出チャネルからのCa²⁺放出を促進する。それによって細胞内Ca²⁺信号は増大して収縮は大きくなる。細胞内Ca²⁺は活性化されている筋小胞体Ca²⁺ポンプによって再び速やかに取り込まれる。結果的に、筋小胞体内のCa²⁺含有量が増加する。筋小胞体によるCa²⁺取り込みの促進はCa²⁺信号の減衰を速くする。上段右図はフェレット乳頭筋に強縮を起こさせ、その時の、細胞内Ca²⁺濃度—張力関係を示したものである。IsoはCa²⁺濃度—張力関係を右方に移動させるので、収縮蛋白系のCa²⁺感受性を低下させることが分かる。しかし、Isoは最大張力には影響しないことを別の実験で確認した。Ca²⁺感受性の低下はトロポニンIのリン酸化によるもので、トロポニンのリン酸化によってCa²⁺はトロポニンから容易に解離し、弛緩が促進されるものと解釈されている。速い弛緩は、Ca²⁺ポンプの活性化によるCa²⁺取り込みの促進と、トロポニンIのリン酸化によってトロポニンから速くCa²⁺が解離することによる。Lfは光信号の単位。
 Okazaki O, Suda N, Hongo K, Konishi M, Kurihara S. Modulation of Ca²⁺ transients and contractile properties by β-adrenoceptor stimulation in ferret ventricular muscles. J Physiol. 1990; 423: 221-40. より転載。

カエルの前脛骨筋から単一筋線維を摘出して、細胞内にイクオリンを圧注入した後、 Ca^{2+} 信号と張力を同時記録した。カフェイン拘縮がおこらない低濃度のカフェインを作用させると単収縮張力は増大し Ca^{2+} 信号はわずかに増加した (Fig. 17)¹¹⁾。さらにカフェイン濃度を上げると、単収縮張力は増加したが Ca^{2+} 信号のピークはコントロールよりむしろ低下し、 Ca^{2+} 信号の下降相が延長した。カフェインは Ca^{2+} 誘発性 Ca^{2+} 放出を促進し、プロカインが抑制することが知られているので、カフェイン存在下でプロカインを与えると、 Ca^{2+} 信号のピークは増大し収縮張力もわずかに増大した。また、張力の下降相が延長した。

光信号検出器 (光電子増倍管) の感度を上げて、刺激を与えていない静止時の細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した。少量のカフェインは細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させ、プロカインはこれを抑制した。静止時細胞内 Ca^{2+} 濃度に対するカフェインの効果はプロカインによって抑制されるが、カフェインが単収縮を増強する効果は、 Ca^{2+} 信号の増大だけでは説明できず、むしろ、カフェインが静止時細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる効果とよい関係があるものと考えた (Fig. 18)¹¹⁾。また、プロカインの効果もこの考えを支持している。このように、カフェインの単収縮増強作用は筋小胞体からの Ca^{2+} 放出量の増加によるものと考えられていたが、その効果はわずかで、むしろ、静止時の細胞内 Ca^{2+} 濃度を全体的に上昇させる効果と良好な関係があるものと

考えられた。

2) 骨格筋の急冷拘縮と細胞内 Ca^{2+} 濃度変化

カエルの骨格筋単一筋線維を用いて、細胞内 Ca^{2+} 濃度と張力を同時記録し、急冷の効果を観察した。低濃度カフェイン (0.5-1 mM 程度) を作用させてから、液温を 18 °C から 4 °C 以下に急速に低下させると、細胞内 Ca^{2+} 濃度は一過性に増加・減少したが、収縮は起こらなかった。カフェイン濃度を上げると、急冷による細胞内 Ca^{2+} 濃度は一過性の上昇に続いて、ゆっくりと持続的に増加した。持続的な細胞内 Ca^{2+} 濃度増加が生じる前に、収縮張力は最大値に達した。張力が最大値に達した後も、細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇し続け、その後、急激に増加した。このように細胞内 Ca^{2+} 濃度は 3 相の変化を示した。第 1 相は一過性の Ca^{2+} 濃度変化、第 2 相はゆっくりとした持続的な Ca^{2+} 濃度上昇、第 3 相は急激で大きな Ca^{2+} 濃度増加で、収縮は第 2 相の初期で最大に達した (Fig. 19)²³⁾。

カフェイン存在下でプロカインを加えると、低濃度プロカインでは第 3 相がおもに抑制され、プロカインの濃度を上昇させるにしたがって、第 2 相、第 1 相が抑制された²³⁾。これらの結果から、骨格筋の急冷拘縮には低濃度カフェイン処理が必要で、カフェインによって Ca^{2+} 放出チャネルの開口を促しておいてから急冷すると、チャネルの開口が促進され Ca^{2+} 放出が生じる。 Ca^{2+} ポンプによって Ca^{2+} は再び筋小胞体に取り込まれるので、一過性の Ca^{2+} 濃度上昇にとどまる (第 1 相)。し

単一骨格筋線維に対するcaffeineの効果

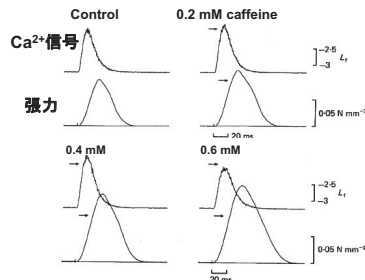


Fig. 17. カエルの単一骨格筋線維に対する低濃度カフェインの作用

カエル (*R. temporaria*) の前脛骨筋の単一筋線維にイクオリンを注入して、 Ca^{2+} 信号と張力に対する低濃度カフェインの効果を観察したもの¹¹⁾。低濃度カフェインは張力を増強し Ca^{2+} 信号のわずかな増加を伴う。カフェイン濃度を上げるに従って張力は一層大きくなるが、 Ca^{2+} 信号のピークはむしろ減少した (0.6 mM)。カフェインによって Ca^{2+} 信号の下降相がやや延長した。また、収縮と弛緩が遅延した。 L_f は光信号の単位。

Konishi M, Kurihara S. Effects of caffeine on intracellular calcium concentration in frog skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 1987; 383: 269-83. より転載。

しかし、カフェイン濃度をさらに増加させると、第1相に続いてCa²⁺放出は一層促進され持続的にCa²⁺濃度が上昇し、Ca²⁺ポンプによるCa²⁺取り込みと拮抗するが、ある一定の濃度に達すると、Ca²⁺放出がさらに一層促進されて第3相が出現する。プロカインの効果と合わせて考えると、第3相はCa²⁺誘発性Ca²⁺放出(Ca²⁺-induced Ca²⁺ release, CICR)で、第2相はCICRとCa²⁺ポンプによるCa²⁺取り込みとが拮抗している相で、第1相は温度変化がおもな要因となってCa²⁺放出チャネルが開くものと推察される。急冷拘縮の張力は第2相の初期で最大に達しているの、急冷拘縮そのものは低濃度カフェインと急冷によって放出されたわずかなCa²⁺で誘起され、第3相のようなCa²⁺誘発性Ca²⁺放出(CICR)と考えられるCa²⁺放出が主体となって生じる大量のCa²⁺によるものではないことが分かった。

3) 温血動物心室筋の急冷拘縮

フェレットの左室乳頭筋の表層細胞内にイクオリンを圧注入した後、張力とCa²⁺信号を同時記録し、頻回刺激(例えば、1 Hz)をあたえてから、液温を30℃から4℃以下に急速に低下させると、Ca²⁺濃度の増加・減少が観察され急冷拘縮が生じ

た。心筋の急冷拘縮はカフェインを必要としないが、急冷前の頻回刺激が必要である。また、急冷の程度(何度まで温度を低下させるか)によって、Ca²⁺信号の振幅と張力の大きさが変化した(Fig. 20)。4℃以下に急冷した時のCa²⁺信号のピークは約1.5 μMであった。急冷中でもCa²⁺濃度は減少するので、いくつかの抑制剤を用いて低温下におけるCa²⁺除去機序を調べた。その結果、低温下では細胞内に増加したCa²⁺の大部分は、ミトコンドリアに取り込まれることが明らかになった(Fig. 20)²⁵⁾。

また、筋小胞体のCa²⁺含有量の何%くらいが急冷によって放出されるのか、サポニン処理したスキンド標本を用いて測定した。筋小胞体に十分Ca²⁺を取り込ませておいてから筋小胞体周囲のCa²⁺を除去し、急冷によってCa²⁺を放出させ急冷によるCa²⁺放出量を測定する。また、同様に筋小胞体内にCa²⁺を取り込ませてから高濃度カフェインでCa²⁺を放出させ、筋小胞体内の全Ca²⁺量を測定してその比を算出すると、筋小胞体内の約45%のCa²⁺が急冷によって放出されることが明らかになった²⁶⁾。

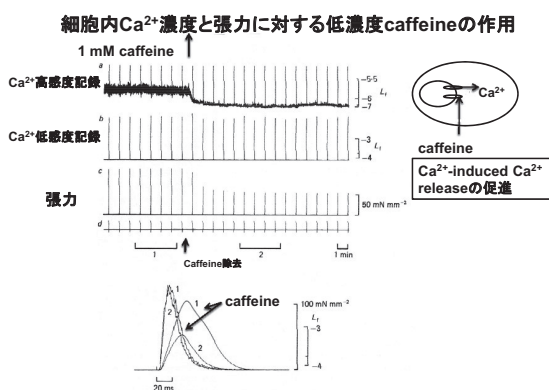


Fig. 18. 骨格筋の静止時細胞内Ca²⁺濃度と張力に対する低濃度カフェインの作用

最上段の記録は、Ca²⁺信号を検出器の感度を上げて記録したもので、次段には低感度の記録を示した。その下に張力を示してある。この例では、1 mMカフェインを作用させてから、カフェインを除去した後の、張力とCa²⁺信号の変化を示した。カフェインを除去すると、張力は低下した。Ca²⁺信号の低感度記録を見ると、Ca²⁺信号のピークはほとんど変化していないが、高感度記録では、静止時(刺激していない時)の細胞内Ca²⁺濃度がカフェインで上昇していて、カフェイン除去で低下することが分かる。最下段はカフェインの有無によるCa²⁺信号と張力の記録を重ねて示したもの。番号1はカフェイン存在下、番号2はコントロールの記録。カフェインは単収縮を増強し時間経過を延長させる。Ca²⁺信号のピークは変化していないが下降相が遅延している¹¹⁾。

Konishi M, Kurihara S. Effects of caffeine on intracellular calcium concentration in frog skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 1987; 383: 269-83. より転載。

単一骨格筋線維の急冷拘縮とプロカインの抑制効果

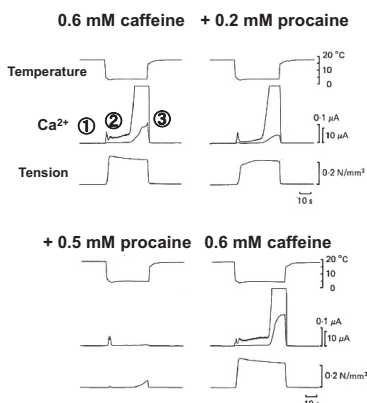


Fig. 19. カエルの単一骨格筋線維の急冷時の細胞内Ca²⁺濃度と収縮張力の関係, およびプロカインの抑制効果²³⁾

Ca²⁺濃度を示す光信号は低感度記録と高感度記録を重ねて示した. 単一筋線維に0.6 mMカフェインを作用させ, 急冷(液温を18℃から4℃に低下)すると細胞内Ca²⁺濃度は3相に変化した(①, ②, ③). 第3相は著しく大きな信号なので, 低感度記録(100分の1の感度で記録)も重ねて示した. 第1相は急冷に伴う一過性の細胞内Ca²⁺濃度の変化, 第2相はゆっくりとした持続的な細胞内Ca²⁺濃度の増加, 第3相はある閾値に達した時に著しく増加する相. 急冷拘縮は第2相の初期にピークに達している. 第3相は張力とは無関係に増加する相であることが分かる. 0.6 mM カフェイン存在下でプロカイン(0.2 mM)を加えると, 第3相と第2相の抑制が見られるが, 第1相はほとんど影響を受けない. プロカイン濃度をさらに上げると(0.5 mM), 第2相がほとんど消失し張力も著しく抑制されるが, 第1相はまだ観察される. プロカインを除去すると両信号はもとに戻復する. Ca²⁺信号は電流値で示してある²⁵⁾.

Konishi M, Kurihara S, Sakai T. Change in intracellular calcium ion concentration induced by caffeine and rapid cooling in frog skeletal muscle fibres. *J Physiol*. 1985; 365: 131-46. より転載.

急冷による心筋細胞内Ca²⁺濃度変化の温度依存性

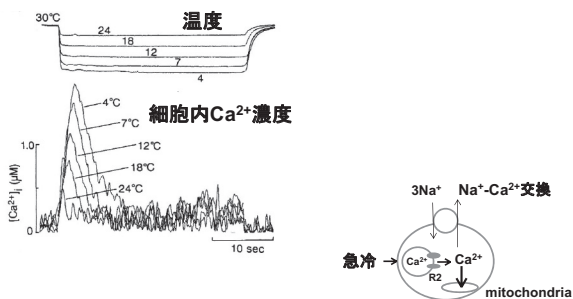


Fig. 20. フェレット心室筋の急冷拘縮時の細胞内Ca²⁺濃度変化

フェレットの右室乳頭筋にイクオリンを注入した後, 単収縮(1 Hz)を誘起してから刺激を止めて, 溶液の温度を30℃から急速に24, 18, 12, 7, 4℃に低下させた時の, 細胞内Ca²⁺濃度変化²⁴⁾. 心筋ではカフェインがなくても急冷によって細胞内Ca²⁺濃度は増加し, その後, 減衰する. 細胞内Ca²⁺濃度のピークは急冷時の温度が低いほど大きい. 低温下では細胞内に増加したCa²⁺はミトコンドリアに取り込まれることが他の実験で示されている²⁵⁾.

Tanaka E. Ca²⁺ release induced by rapid cooling and caffeine in ferret ventricular muscles. *Jpn J Physiol*. 1997; 47: 263-72. より転載.

VI. 結 語

この小論では、私が生理学を目指した経緯とこれまでの研究成果の一部を要約した。酒井敏夫教授（当時）のご指導で、学生時代から生命現象をリアルタイムで観察することができる生理学に惹かれた。平滑筋の急冷拘縮の実験を手掛け、それを契機に、平滑筋の電気生理学を九州大学歯学部生理学教室で学んだ。その後、心筋の急冷拘縮に関する研究を行った。細胞内Ca²⁺濃度測定法を修得するためにUniversity College Londonに留学する機会を得た。そこで発光蛋白イクオリンを使う筋細胞内Ca²⁺濃度測定を修得し、Frank-Starlingの心臓の法則の細胞内機序を中心に研究を行った。

帰国後は、温血動物心筋の細胞内Ca²⁺濃度を測定して、筋長変化の効果、自律神経系伝達物質の作用機序、骨格筋に対するカフェインの作用機序、骨格筋と心筋の急冷拘縮の細胞内Ca²⁺濃度変化に関する研究を行った。

VII. お わ り に

教授を退任するに当たり、故酒井敏夫名誉教授をはじめ、第二生理学教室（現、細胞生理学講座）の諸氏に深甚の謝意を表す。26年間の長きに亘り教授職を務められたのも、私を温かく見守り協力して下さった方々のおかげである。また、学外の共同研究者と私を支援して下さい下さった多くの方に感謝する。

著者の利益相反 (conflict of interest:COI) 開示:

本論文の研究内容に関連して特に申告なし

文 献

- Sakai T, Kurihara S. A study on rapid cooling contracture from the viewpoint of excitation-contraction coupling. *Jikeikai Med J.* 1974; 21: 47-88.
- 栗原敏, 中野昭一, 酒井敏夫. ガマ膀胱筋の Mechanical Response について. *日平滑筋会誌.* 1969;5:180.
- Kurihara S, Creed KE. Changes in the membrane potential of the smooth muscle cells of the guinea pig urinary bladder in various environments. *Jpn J Physiol.* 1972; 22: 667-83.
- Kurihara S, Kuriyama H, Magaribuchi T. Effects of rapid cooling on the electrical properties of the smooth muscles of the guinea-pig urinary bladder. *J Physiol.* 1974; 238: 413-26.
- Kurihara S. The effect of procaine on the mechanical and electrical activities of the smooth muscle cells of the guinea pig urinary bladder. *Jpn J Physiol.* 1975; 25: 775-88.
- Sakai T, Kurihara S. Rapid cooling contracture of cardiac muscle. *日生理誌.* 1973; 35: 77-8.
- Sakai T, Kurihara S. The rapid cooling contracture of toad cardiac muscles. *Jpn J Physiol.* 1974; 24: 649-66.
- Kurihara S, Sakai T. Effects of rapid cooling on mechanical and electrical responses in ventricular muscle of guinea-pig. *J Physiol.* 1985; 361: 361-78.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa Aequorea. *J Cell Comp Physiol.* 1962; 59: 223-39.
- Allen DG, Blinks JR, Prendergast FG. Aequorin luminescence: relation of light emission to calcium concentration—a calcium-independent component. *Science.* 1977; 195: 996-8.
- Konishi M, Kurihara S. Effects of caffeine on intracellular calcium concentration in frog skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 1987; 383: 269-83.
- Blinks JR, Prendergast F, Allen DG. Photoproteins as biological calcium indicators. *Pharmacol Rev.* 1976; 28: 1-93.
- Kurihara S. Regulation of cardiac muscle contraction by intracellular Ca²⁺. *Jpn J Physiol.* 1994; 44: 591-611.
- Allen DG, Kurihara S. The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. *J Physiol.* 1982; 327: 79-94.
- Allen DG, Kurihara S. Calcium transients in mammalian ventricular muscle. *Eur Heart J.* 1980; 1 Suppl A: 5-15.
- Kurihara S, Komukai K. Tension-dependent changes of the intracellular Ca²⁺ transients in ferret ventricular muscles. *J Physiol.* 1995; 489: 617-25.
- Horiuti K, Higuchi H, Umazume Y, Konishi M, Okazaki O, Kurihara S. Mechanism of action of 2, 3-butanedione 2-monoxime on contraction of frog skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil.* 1988; 9: 156-64.
- Kurihara S, Saeki Y, Hongo K, Tanaka E, Suda N. Effects of length change on intracellular Ca²⁺ transients in ferret ventricular muscle treated with 2,3-butanedione monoxime (BDM). *Jpn J Physiol.* 1990; 40: 915-20.
- Komukai K, Kurihara S. Length dependence of Ca²⁺-tension relationship in aequorin-injected ferret papillary

- muscles. *Am J Physiol.* 1997; 273: H1068-74.
- 20) Saeki Y, Kurihara S, Hongo K, Tanaka E. Alterations in intracellular calcium and tension of activated ferret papillary muscle in response to step length changes. *J Physiol.* 1993; 463: 291-306.
- 21) Kurihara S, Konishi M. Effects of β -adrenoceptor stimulation on intracellular Ca transients and tension in rat ventricular muscle. *Pflügers Arch.* 1987; 409: 427-37.
- 22) Okazaki O, Suda N, Hongo K, Konishi M, Kurihara S. Modulation of Ca^{2+} transients and contractile properties by β -adrenoceptor stimulation in ferret ventricular muscles. *J Physiol.* 1990; 423: 221-40.
- 23) Konishi M, Kurihara S, Sakai T. Change in intracellular calcium ion concentration induced by caffeine and rapid cooling in frog skeletal muscle fibres. *J Physiol.* 1985; 365: 131-46.
- 24) Tanaka E. Ca^{2+} release induced by rapid cooling and caffeine in ferret ventricular muscles. *Jpn J Physiol.* 1997; 47: 263-72.
- 25) Tanaka E, Kurihara S. Contribution of mitochondria to the removal of intracellular Ca^{2+} induced by caffeine and rapid cooling at low temperatures in ferret ventricular muscles. *Jpn J Physiol.* 1997; 47: 251-62.
- 26) Tanaka E, Konishi M, Kurihara S. Role of Ca^{2+} in the rapid cooling-induced Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum in ferret cardiac muscles. *J Physiol Sci.* 2012; 62: 241-50.