岡崎国立共同研究機構

生理学研究所年報

第2巻



1981

巻　頭　言

本格的研究開始の年

昭和55年12月を以て生理学研究所は竣工した。研究棟の右側の柱の定礎碑にこのことが銘記されている。7階建10,000平米の建物が三島台にそびえ立つ日が遂に来たのである。長い創設の作業は周辺の未完了部分をのぞいて殆んど完遂された。超高圧電子顕微鏡設置のための作業と，基礎生物学研究所と当研究所との共用となるべき若干の施設が将来に残されるだけとなっている。正に研究者にとってはパラダイスともいうべき環境が完成されつつあるのである。われわれ生理学研究所に所属するものにとって，本年こそ研究大躍進の初年度でなければならない。研究はこれにたずさわる人によって行われる。いかなる研究も個人の創意工夫なしには成就されない。比類なき研究環境が設定されれば直ちに研究の成果があげられるわけではない。人と環境とが調和した時に，初めてすぐれた研究の成果があげられる。日本の大学は明治以来乏しい研究環境の中で渾身の独力を重ねてきた。今日の日本の産業の繁栄は大学で営々として行われてきた基礎研究をぬきにして考えられない。日本の大学にふさわしい研究環境の与えられる日を請い願ってきたわれわれは，今日これを岡崎の地で実現しつつあるといってよいであろう。

研究にたずさわる人とその環境はすでに与えられた。われわれは国民の血税によってあがなわれたこの研究所において，人生を燃焼し尽さなければならない。若い研究者にとってはこよなき研究環境が与えられた。熟年研究者にとっては正に垂涎の的以外の何ものでもない。しかし，若い研究者たちは国民の負托にこたえる重責から免れ得ないことを片時も忘れてはなるまい。実らざる研究のexcuseが嘗ては許されたかも知れないが，ここ岡崎ではそれは許さるべくもない。研究者は正に背水の陣を岡崎の地に敷いていると覚悟すべきであろう。

日本の産業は先進諸国の産業界をおびやかすまでに成長した。産業界の刻苦勉励のたまものである。たゆまざる技術の導入と技術革新の

たまものである。

日本の学界は先進諸国の学界をおびやかすに到っているであろうか。答えは勿論ノーである。学者の真理発掘には技術の導入だけでは足りないのである。世界をこえる創意工夫があってこそ，わが国が世界の先進諸国に伍すことが出来るのである。

大学は文化の創造とその継承とを主たる目的としている。大学は研究と教育という二面の責任を同時に負わされている。研究面での不成功は教育面での成果によって免責されるかも知れない。研究所は完全に教育から免責されている故に，研究面での不成功の excuse はあり得ないのである。これは研究所のもつ絶対的使命といってよいであろう。しかし，あえてわれわれはこの重責への挑戦を辞さないであろう。

学問の躍進には必ずこれを支える研究機器の開発があったことは，学問の歴史がこれを示している。他人によって，他国によって開発された発想や研究機器のみに頼るだけでは，彼我の学問上の懸隔は永久にちぢまることはない。新しい真理は新しい創意，新しい研究機器の開発に依存する所絶大である。

嘗ては外国で開発された研究をわが国にいち早く導入することが学者の主たる任務であった。人々はこのことに満足していた。しかしこれはあくまで本邦初演であって世界初演ではない。われわれはあえて後者に挑戦することに心掛けねばならない。今や本邦初演は研究者の自嘲の言葉にしかすぎないのである。

内 薗 耕 二

主 な 職 員 （昭和５５年度）

所　　長　　内 藤 耕 二

分子生理研究系

超微小形態生理研究部門

教　　授	亘　　弘
助 教 授	志 賀　　潔
助　　手	東　　晃 史
〃	二 科 安 三

細胞内代謝研究部門

客員教授	矢内原　　昇
客員助教授	鈴 木 利 光
助　　手	佐 藤 晴 子

細胞器官研究系

生体膜研究部門

教　　授	山 岸 俊 一
助 教 授	杉 山 博 之
助　　手	久木田 文 夫
〃	古 家 喜四夫

能動輸送研究部門

客員教授	中 尾　　真
客員助教授	太 田 英 彦

機能協関研究部門

教　　授	渡 辺　　昭
助 教 授	寺 川　　進

生体情報研究系

神経情報研究部門

教　　授	金 子 章 道
助 教 授	大 塚 輝 彌
助　　手	立 花 政 夫
〃	田 内 雅 規

高次神経機構研究部門

客員教授	塚 原 仲 晃
客員助教授	外 山 敬 介
助　　手	村 上 富士夫

液性情報研究部門

客員教授	濱　　清

情報記憶研究部門

客員教授	久 野　　宗

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門

教　　授	入 沢　　宏
助 教 授	野 間 昭 典
助　　手	倉 智 嘉 久

高次液性調節研究部門

客員教授	大 村　　裕
客員助教授	西 野 仁 雄

生理機能研究施設	超高圧電子顕微鏡室		組織培養標本室
	助教授	有井達夫	助手 古家園子
動物実験施設	助教授	尾崎 毅	
技術課	課長	大平仁夫	
		市川 修	勝丸博信
		山下幸子	稲田和久
		小原正裕	津島由彦
		前橋 寛	大庭明生
		池田明聡	加藤勝己
		永田 治	細野 道
		伊藤昭光	
特定領域奨励研究員		谷 裕一郎	
特別協力研究員		星野 稔	
		坂口博信	
中国政府派遣進修生		楊 雄里	
文部省内地研究員		袋谷賢吉	
文部省外国人研究員		Andrew T. Ishida	
学術振興会外国人研究員		Wolfgang Trautwein	

目　　次

巻　頭　言 …… i

主 な 職 員 …… iii

部門別研究の概要

分子生理研究系 …… 1
細胞器官研究系 …… 16
生体情報研究系 …… 37
生体調節研究系 …… 55
生理機能研究施設 …… 70
研　究　員 …… 76
技　術　課 …… 86

研 究 活 動

論　　文 …… 87
学 会 報 告 …… 100

共同研究報告

昭和 54 年度 …… 109
昭和 55 年度 …… 131

研究会報告

昭和 54 年度 …… 191
昭和 55 年度 …… 384

部門別研究の概要

分 子 生 理 研 究 系

《 超微小形態生理研究部門 》

研究の概要

本部門では生理機能のうちとくに生体高分子に特徴的な秩序構造とそれにともなう特異的な機能を分子・電子レベルで検討し，解明にみちびくと共に，細胞内での物質代謝と細胞の働きとの関連を研究して，細胞内物質の構造と機能を分子レベルで解明することを目的としている。

本年度は部門の報告にある研究と共に，細胞内代謝部門との共同研究によって^{1}H−NMRによりSubstance P アナログ物質の液中における構造を研究したが，さらに共同研究の報告書に見られるように^{31}P−NMRによって筋肉や唾液腺の興奮過程における代謝機構の研究を開始した。

研究課題

共鳴ラマン分光法によるフラビン酵素の反応中間体の研究

二科 安三　志賀 潔　亘 弘

研究目的

我々の研究の目的にはフラビン酵素の反応機構を明らかにすることがある。フラビン酵素の反応特異性は補酵素であるフラビン分子の化学的性質とフラビン，タンパク，溶媒の間での相互作用によって規定されるといえる。そこで反応機構を明らかにするため種々の手段を用いて研究を行っている。

ここでは共鳴ラマン分光法を用いた研究について述べる。ラマンスペクトルは分子振動に対する情報を提供するものであり，反応機構を明らかにするために重要な反応中間体の構造の知見を与えるものである。また，フラビンータンパク間の相互作用がある場合にその相互作用部位に関わる振動の振動数が変化することが予想されるので，それぞれのラマン線の帰属が確立すれば，その相互作用の部位に関する情報を得ることができる。

そこで(1)反応中間体であるフラボセミキノンのラマンスペクトルおよび(2)ラマン線の帰属を確立するのに必要な種々のフラビン誘導体のラマンスペクトルについて報告する。

研究内容

(1) フラビン酵素はその酸化還元状態によって，酸化型，セミキノン型，完全還元型の状態をとる。フラビン酵素の反応機構を明らかにする為に分子振動の情報を与える共鳴ラマン分光法を利用する為にすでに測定されている酸化型

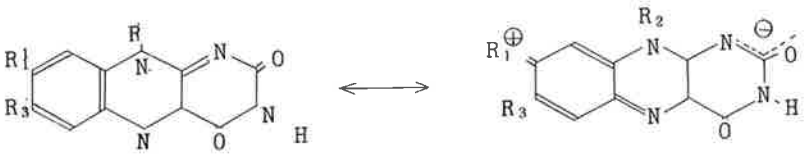
以外のスペクトルの測定を試みた。

(イ)リボフラビン結合タンパク（ＲＢＰ）に結合したリボフラビンと８－メトキシリボフラミンのセミキノンの共鳴ラマンスペクトルを測定した。リボフラビン－ＲＢＰ錯体の中性セミキノンには酸化型にはなかった1617cm^{-1}に強いｌｉｎｅがみられた。このｌｉｎｅは重水中ではシフトしなかった。８－メトキシＲＦ－ＲＢＰ錯体の場合には1623と1615cm^{-1}にダブレットのｌｉｎｅがあり，重水中では1615cm^{-1}のｌｉｎｅだけが低派数シフトした（1604cm^{-1}）。㊥励起光源はAr^{+}レーザーの514.5ｎｍを使用。

(ロ)同様に完全還元型の共鳴ラマンスペクトルの観測を試みたが，同じ感度での測定ではラマン線は現われなかった。

以上の結果からフラボセミキノンの～1620cm^{-1}のｌｉｎｅはフラビンの酸化還元状態の指標になることがわかった。

(2)　フラビンのラマン線の帰属を確立していく為に種々のフラビン誘導体の共鳴ラマンスペクトル（酸化型）を測定した。それらは８－ハロゲン化－，８－デメチル－，８－アミノ－，８－メトキシ－，リボフラビン，ルミフラビン，３－メチル－ルミフラビンである。リボフラビンの1631cm^{-1}のｌｉｎｅはハロゲン化－ＲＦの場合に系統的にシフトすることからＲｉｎｇ Ｉ のベンゼン環由来であることが確立した。８－位をアミノあるいはメトキシ置換したときにはＲｉｎｇ ⅡのＣ（４ａ），Ｎ（５）の振動置換を受ける1583cm^{-1}のｌｉｎｅがかなりシフトする。これはフラビン環の共鳴構造によりかなり置換基の電子が非局在化していることを示すものである。



研　究　報　告

Nishina, Y., Shiga, K., Horiike, K., Tojo, H., Kasai, S., Matsui, K., Watari, H. and Yamano, T. (1980) Resonance Raman spectra of semiquinone forms of flavin bound to riboflavin binding protin., J. Biochem., 88, 411-416.

Nishina, Y., Shiga, K., Horiike, K., Tojo, H., Kasai, S.,

Yanase, K., Matsui, K., Watari, H. and Yamano, T. (1980) Vibrational modes of flavin bound to riboflavin binding protein form egg white, J. Biochem., 88, 403-409

研究課題

脳内活性物質の抽出・精製及び合成：マウスのＲＥＭ　ＳＬＥＥＰの生物検定法

東　晃史

研究目的

脳の有する高次の中枢神経機能については，従来電気生理学的な面から追求されてきたが，これに比して物質レベルからの研究はほとんど未開拓の状況にある。本研究は脳の高次中枢機能に関連する物質，すなわち脳内活性物質について理工学的・生態学的立場から総合的に解明することを目的としている。

本研究課題の下にほぼ１０年にわたり脳内活性物質のうち特に睡眠物質について基礎的研究を積み上げてきた。マウス・ラットに対して長期睡眠効果を有する睡眠促進物質（Sleep Promoting Substance－略称SPS）の存在が確認され，その睡眠効果は睡眠研究の国際的リーダーといっても過言ではないFranceのJouvet, M. と本研究の共同研究者の１人である長崎との共同研究によって確かめられた。この国際的共同研究によってSPSは徐波睡眠のみならずREM睡眠も増加させる知見が得られている。[*1] 元来SPSは徐彼睡眠に焦点を絞って生物検定を行なってきており，活性フラクション探索のため，おびただしい数の検定を反復せねばならぬ必要上，可能な限り同時測定の動物を増やす方向でREM睡眠の定量は無視してきた。このため６年間にわたって開発されてきた生物検定用の“複数マウスの睡眠及び行動の長期・連続計測システム”は大巾な改良を余儀無くされた。この一年間の研究は従来の測定方法の延長上にREM睡眠をも含めた総合的睡眠及び行動パターンをも含む行動全般の測定法の開発に主力がそそがれ，以下に示すような測定法上の画期的な成果を得ることができた。

研究方法・結果

従来から使用しているマウスの頭上約４cmの高さに設置されたＢＭトランスデューサーの出力信号にREM睡眠特有の信号を検出できることを発見した。[*2] 図１はマウスＲＥＭ睡眠中の体動を記録紙に記録したものである。

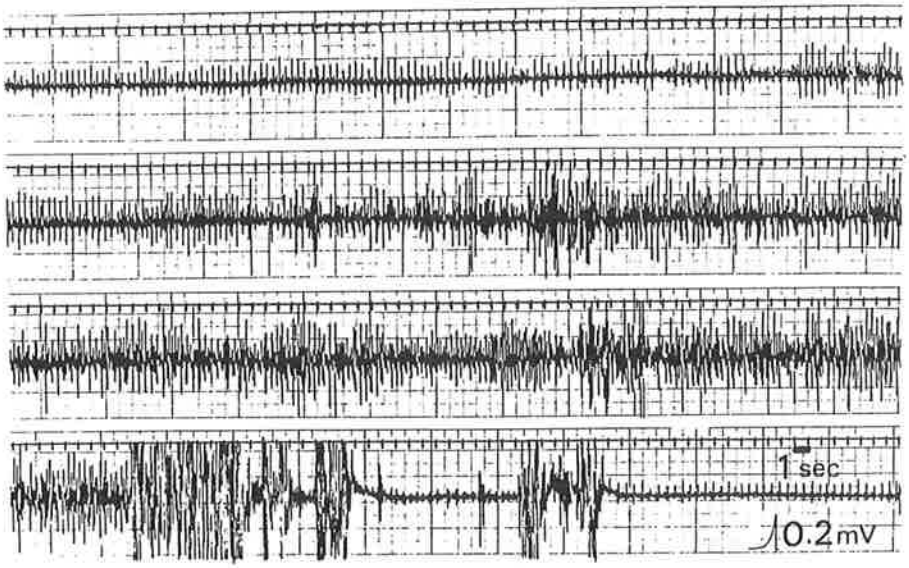


図1.　REM睡眠中のBMトランデューサーの出力信号

図の左上と右下の1秒間2回程度のパルス状の信号はマウスの静止時の呼吸を反映した体動であり，2列目，3列目の記録はREM睡眠の進行に伴なって次第にマウスの呼吸が乱れ，不規則な体動が断続的に発生する模様を示したものである。図2 A及びBはEEGと体動の同時記録である。それぞれの図の上段は

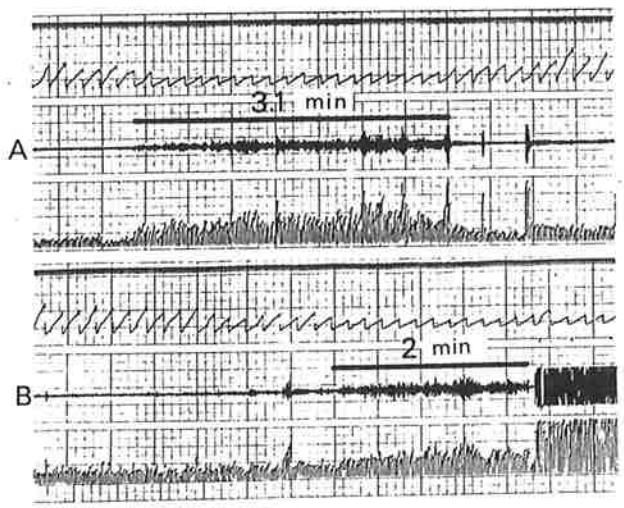


図2　A：NREM － REM － NREM
　　B：NREM － REM －覚醒
上段：EEG（2－4Hz）の10秒毎の積分値，中段：体動
下段：体動の1秒毎のピーク値（Aのみログアンプ使用）

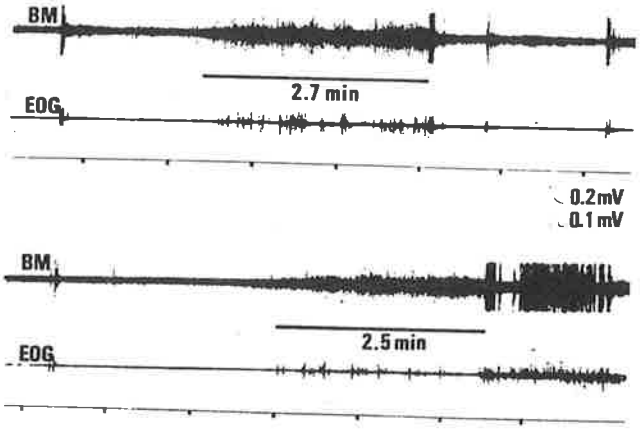


図３　上：NREM － REM － NREM
　　下：NREM － REM －覚醒

EEGの２－４Hz成分の10秒毎の積分値の連続記録である。中央に太い線で示した間隔（ 3.1分と2.0分）がマウスのREM睡眠に相当する。Aは徐彼睡眠の間にREM睡眠が発生した例であり，BはREM睡眠の後に覚醒状態に移行した例である。図3は体動と眼球運動（EOG）を同時に記録したものであり，REM睡眠の時間は2.7分及び2.5分と判定される。図4はEEGもEOGも無視して，

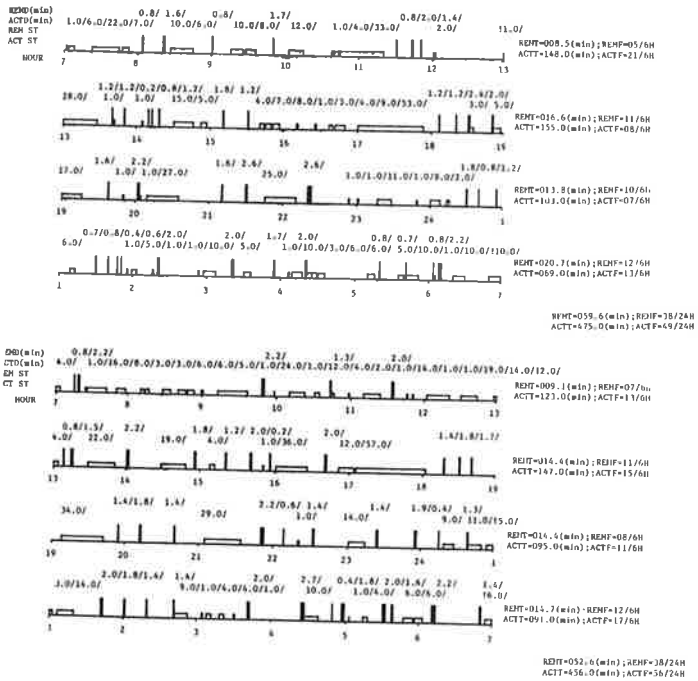


図４　REM睡眠発生の経時的変化（２日間），黒棒：REM，
白棒：活動状態

体動計測のみによってマウスのＲＥＭ睡眠及び覚醒期の活動状態（active state)の 2日間の生起状態を経時的に示したものである。この場合マウスのＲＥＭ睡眠は，１日目に３８回発生し，ＲＥＭ総時間は59.6分，２日目は各々３８回，52.6分であった。この判定法と国際的常識といえるところのＲＥＭ睡眠の判定法（EEG，EOG及びEMGの３つのパラメーターの相互比較）との判定結果の一致率は９５％であった。図５は体動判定の方法によってＲＥＭ睡眠のみの選択的奪眠を行った結果である。この方法でＲＥＭ stage を確認できるのは発生後５秒以内である。REM stage確認後ただちに棒でつついてマウスを覚醒させる作業を午後７時から午後７時までの１２時間行った。

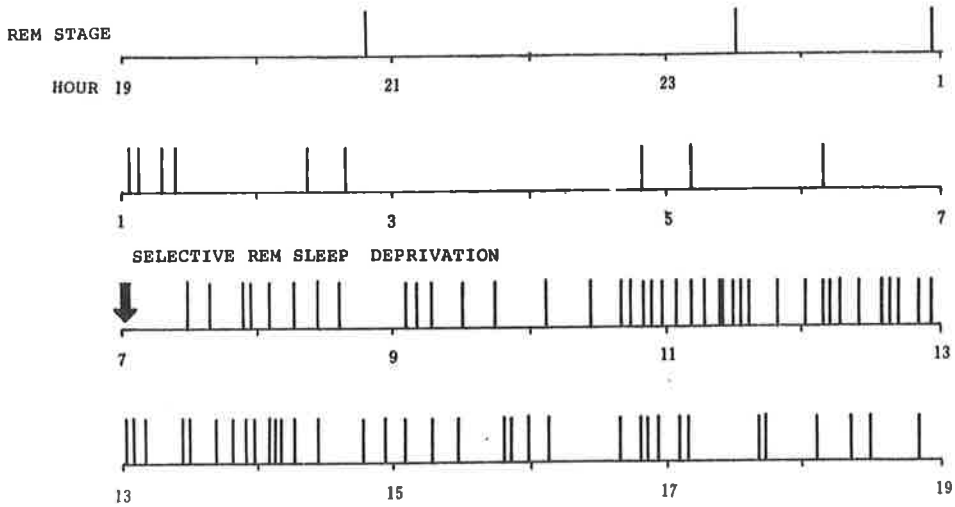


図５　ＲＥＭ睡眠の選択的奪眠

図５の３列目及び４列目は正常状態のマウスのＲＥＭstage発生回数（図４の１列及び２列目）に比べ約５倍量増加していることを示している。ＲＥＭ睡眠の選択的奪眠が執拗なまでのＲＥＭ睡眠を誘発する現象は既に古くから知られており，この結果は体動計測を指標とする判定法が正確にＲＥＭ stage を捕えていることの証拠になるであろう。

通常ネズミではＲＥＭ stage判定のパラメーターにneck muscleのEMGが重要視される。EMGがNREMstageで小さくなった上に，さらにＲＥＭ stageで小さくなるという，この極小のＥＭＧの出現期間を指標としている。《動き，かつ柔らかい》筋肉に電極を装着せざるを得ないために，電極位置の変動，筋肉の損傷，導出ワイヤーの切断等，動物の活発な活動による絶えざる測定上の不安定要因をかかえこんでおり，安定した信号の長期計測には極めて不利な計測条件といえる。またneck muscle からの導出であるため，心電図の

混入を避ける必要があり，電極設置に要領を要する。これはとりわけ小型の動物では難かしい。加えるにNREM stageのEMGが《さらに小さくなる》という判定条件は工学的自動計測の上からも一方ならぬ工夫を要する。小型の動物に対して現状ではREM stageに対して高い確立で，目測と自動判定の一致率を得ることは不可能といっても過言ではない。これに比べマウスの《体外》に装着したBMトランスデューサーにより，極めて安定かつシャープであるのみならず百発百中極めて簡単にしかもマウスのほぼライフスパンにわたってREM stageを判定できる意義は格段に大きいと思われる。

考　　察

この判定法の導入により，これまで開発してきたマウスのNREM stageの自動解析システムの最も大きな特徴であったマウスのQuietness stageの判定精度がほぼ完璧に近くなった。これは開発されたシステムが鎮静剤・精神安定剤・麻酔剤・興奮剤・麻薬等の個体レベルの脳の《精神機能》にかかわる生物検定にも即応用可能になったことを示している。この何々剤と薬学的に表現される精神神経生理学上の《個体の状態》いいかえれば《脳の状態》に対応する未知の活性物質の探索こそendorphive等の例を上げるまでもなく，receptor研究と関連した生理活性物質研究の大目的であることを勘案すれば，マウスを利用した個体レベルの総合的生物検定システム開発の意義はさらに大きいと考えられる。即ち《動いている状態》及び《睡眠状態》の定量はさほど困難ではない。《活動しないけれども覚醒している状態》こそが会話のできない実験動物に対して《脳の最高の機能》に肉迫するための定量化が最も遅れている分野であり，分析と定量を手法とするscienceの中で文学的表現が最も多用される由縁でもある。

そもそもこのマウスを使用した総合的生物検定のシステム開発はSPS研究の展開上必要不可欠の前提条件を克服する必要性から始められた。薬理効果は一般に個体の体重にほぼ比例する。したがって同一の薬理効果を得るためにマウスを使用するならば，ラットの1／10，ウサギや猫の1／100のサンプル量を消耗するだけで事足りる。いまラット1匹1,300円と計算して，精製に先立ち10万匹のラットの脳を必要と仮定すると1億3千万円の材料代を要する。生物検定に消耗するサンプル量を1／10に減らせるならば，単純計算で材料代は1千3百万円ですむことになる。残り9万匹のラットを断頭し，生化学的処理を施こす時間と労力に要する経費は，省力化した同様の目的の実験を何回も繰り返すことを可能にする。

一方精神現象の検定は8日法，22日法，60日法といったplacebo投与を含めた実験スケジュール上の常識があり，したたかな長期計測のデータがなければ，薬的（活性物質の効力）を社会的に認めさせることが難かしい。これは精神現象の総合性とまさしくそのために得られたデーターに対する理解の巾が広いために，物質の影響を評価することが極めて難かしい証左でもある。

加えるに精神現象活性物質《探索》の実験ではかくの如き長期計測をした後1つの結論が得られ，なおかつその結論の99.9％は無駄な努力を覚悟して反復実験せねばならない。さらに生体からの抽出物の検定を同一ネズミで何回も繰り返すことができないという事情がある。使い捨ての注射器の毎く，次から次へと慢性実験用に人為的に細工され，かつ生体現象が正常であることをモニターされた動物を供給できる能力が《同時に》備わらなければ，システム開発が成功したことにはならない。実験の工程に熟練度を必要とせず，所定の実験がトラブルなくランニングできる《抜本的技術》の確立こそがこの種の研究の雌雄を決する前提条件になると思われる。現状においてこれらの前提条件はほぼすべて確立されたと考える。

＊1　Sleep-promoting effect of the sleep-promoting substance (SPS) and delta sleep-inducing peptide (DSIP) in the mouse H. Nagasaki, K. KITAHAMA, J. L. VALATX and M. JOUVET, 1980, Brain Research, 192.

＊2　投稿中

《細胞内代謝研究部門》

研究課題

生理活性ペプチドの構造と機能 — NMRスペクトルによる解析 —

亘　弘　　日置 善雄　　矢内原 昇

研究目的

神経ペプチドの立体構造と機能の関係をNMRスペクトルにより解析することを目的とする研究の1つとして，神経伝達物質としてほぼ証明されるにいたったP物質を対象に選び研究を行なった。P物質は11アミノ酸残基からなるポリペプチドであるが，そのC末端ヘキサペプチド，H−Gln−Phe−Phe−Gly−Leu−Met−NH_2が活性部位であることが知られている。[1~2] 本研究ではとくにこのヘキサペプチドおよびその誘導体について，構造と活性の関係を比較検討した。

研究方法

^1H − NMR 測定に用いた合成P物質誘導体[3]は下記のとうりである。

pGlu−Phe−Phe−Gly−Leu−Leu−NH_2 (I)

pGlu−Phe−Phe−Gly−Leu−NH_2 (II)

ARA−Gln−Phe−Phe−Gly−Leu−Met−NH_2 (III)

ARA−Gln−Phe−Phe−Gly−Leu−Met−N　(IV)

ARA−：N−〔1−(9−adenyl)−β−D−ribofuranuronosyl〕−

360MZ ^1H −NMRによる測定ではBruker−Wm−360spectrometerを用いた。温度変化にはBruker B−VT 1000 variable temperature Unitを用いた。試料溶液は試料1mgを溶媒0.5mℓに溶解して調製した。試料管として5mφ tubeを使用した。溶媒として，DMSO−d_6 (99.8%，Merk製)およびD_2O(99.75%, Merk製)を用いた。内部基準としてTMS，TSPを用い，帰属は主としてhomo decouplingにより行なった。

研究経過

誘導体(I)および(II)のスペクトルを比較すると，α−，β−および2−プロトンにおいてはChemical shiftにとくに大きい差はないが，pGluのNHおよびC末端NH_2プロトンではchemical shift，temperature coefficientに差があることがわかった。

誘導体(I)は(1) DMSO－d_6 中においてpGluのNH基とC末端NH基の温度係数がかなり小さい。(2)D_2Oを添加したときconformationに対する影響が誘導体(II)に比し顕著である。(3) DMSO－d_6中において，呼吸ピーク(6)はPhe残基の磁気異方性の影響をうけている可能性があること，などから，誘導体(I)は或る程度rigidなconformationであることが示唆された。一方誘導体(II)は(1) DMSO－d_6 中において本誘導体の各アミノ酸残基のchemical shiftとJ値はランダムコイルペプチドのそれと類似している。(2) DMSO－d_6 中における各アミノ酸残基のアミドプロトンの温度係数はほぼ同一値を示す。(3) DMSO－d_6 中およびD_2O中においても，Gly残基の $^3J_{HN\alpha}$, $^2J_{\alpha\alpha}$ および$\triangle\delta\alpha\alpha$値には変化がみられないこと，などから，誘導体(II)は溶液中でランダムコイルを形成し，β－turnまたはα－helixのような構造はとらないと推定された。

誘導体(III)および(IV)のスペクトルを比較すると，各アミノ酸残基のNHプロトンおよびC末端Met残基のα－プロトンにおいてchemical shiftの差が認められた。とくにGln残基のNHプロトンが著しく低磁場shiftし，水素結合の形成が示唆された。なお，誘導体(III)はモルモット回腸収縮作用においてP物質の約7倍の活性を示すが，核酸糖部のOH基とGln残基α－アミドのカルボニル間に水素結合を形成している可能性が認められた。これらの誘導体については，さらに検討中である。

考　　察　本研究で検討したP物質活性部位に関連した誘導体はIII＞I＞IV＞IIの順に活性は低下し，とくにIVおよびIIはきわめて低活性が，または不活性である。一方，誘導体IIIはP物質の約7倍，Iは約1.5～2倍のモルモット回腸収縮作用を示す。稲垣ら[4]はすでに活性を保持するP物質フラグメントをNRMにより解析し，Gln残基のNHとC末端カルボニルとの間に水素結合が形成されている可能性を温度係数，溶媒組成変化によるChemical shiftから推定した。本研究で検討したP物質誘導体のうちC末端Met残基を欠くペプチド(II)においては，C末端アミドカルボニルとGln残基－NHの水素結合は認められず，一方，他の誘導体(I)，(III)および(IV)では，この位置に水素結合の存在が示唆された。Gln残基－NH基の温度係数値はII＞III＞I＞IVの順に低下し，これらの値と生理活性の間に相関関係は認められなかった。しかし，(IV)が弱いながらも拮抗作用を有することを考慮すると，受容体との結合に必要とする一条件である可能性が考えられる。

核酸塩基の導入により高活性を示す理由については，さらに検討を要する。

参考文献

(1) Otsuka, M. & Konishi, S. (1976) Substance P and Excitatory Transmitter of Primary Sensory Neurons. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biol., XL, 135-143

(2) Yanaihara, N., Yanaihara, C., Hirohashi, M., Sato, H., Iizuka, Y., Hashimoto, T. & Sakagami, M. (1977) Substance P Analogs: Synthesis, and Biological and Immunological Properties. In: Substance P, Nobel Symposium 37, Raven, New York, 27-33

(3) Hirohashi, M., Yamamoto, Y., Nishida, T., Yanaihara, N., Hioki, Y., Watari, H. & Otsuka, M. (1981) Structure-function relationship of stbstance P active core. Peptide Chemistry 1980, 175-180

(4) Inagaki, F., Miyazawa, T., Yanaihara, N. & Otsuka, M. (1978) Substance P Analogs: NMR Spectra and Conformations in Solution. Peptide Chemistry 1977, 103-108

発表

亘　弘，矢内原　昇，日置　善雄，赤坂　一之（1980）脳内活性物質の360プロトンNMR.，第19回NMR討論会講演要旨集，145-148

研究課題

生理活性ペプチドの生合成過程と代謝

矢内原　昇　　鈴木　利光　　佐藤　晴子

研究目的

1931年，von EulerとGaddumがウマ脳および消化管の両者にP物質が有在することをはじめて示唆したが，最近の生理活性ペプチドの分野における注目すべき成果の一つは脳一腸管ペプチドの発見である。すなわち，消化管の内分泌ホルモンと考えられていたVIP，CCK（コレシストキニン），グルカゴン，モチリンの免疫活性が脳で認められ，ガストリンの免疫活性が下垂体あるいは松果体で検出されたが，一方，視床下部または脳由来の活性ペプチド

であるソマトスタチン，ニューロテンシン，P物質，エンケファリンあるいはTRHなどの免疫活性が胃腸膵で検出された結果，中枢と胃腸膵に同一またはきわめて類似したペチプドが生合成されている可能性が示されるにいたった。これら脳一腸管ペプチドの生理的意義については，まだ不明の点が多いが，中枢および末梢のニューロンにおいて伝達物質として作用していることが示唆されるようになった。

VIPはvasoactive intestinal pobypeptide の略であり，28アミノ酸残基のペプチドであるが，血流増加，血圧低下など血管系に主として作用し，そのほか，平滑筋，膵液分泌などに作用することが知られている。脳一腸管ペプチドのなかでは，P物質についでその神経伝達物質としての役割が究明されようとしている。VIPは生体内で広範囲に分布し，消化管，脳，唾液線，性尿管の神経組織に分布している。[1)]

VIPを含め，個々の神経ペプチドの生合成に関する知見はまだ少ないとしてもVIPについても，VIP産生腫瘍あるいは神経芽細胞腫瘍培養細胞には大分子型VIP免疫活性が存在する[3)]ことが明らかにされた結果，他のペプチドホルモン同様，大分子型の前駆体が細胞内で生合成され，そのprocessingにより終局的に活性型のペプチドに変換されると考えられる。

本研究は大分子型VIPの存在が明らかにされた神経芽細胞腫瘍培養細胞NB－1[4)]を対象とし，生物化学的ならびに免疫化学的に追求し，VIPの生合成過程と代謝を明らかにすることを目的としている。

研究方法

ヒト神経芽細胞腫培養細胞：本培養細胞系NB－1は10%のfetal calf serumを含むRPMI 1640培地を用い，ウオータージャケット型インキュベーター中，37℃，5%CO_2存在下で培養した。

培養細胞系NB－Iにおけるdibutyryl cAMP添加による免疫活性VIP濃度の変化：コントロール群，添加群ともに1群につき4～5枚のdishをとり，falconの直径60 mmdishに6×10^5～8×10^5個の細胞を用い，培養時間を24，48および72時間にした。この場合，dibutyryl cAMP 1mMを添加した。つぎに，dibutyryl cAMP濃度と免疫活性VIP濃度の関係を検討するため，培養時間を72時間とし，dibutyryl cAMP濃度を0，0.1，0.5，1.0，2.0，3.0および5.0 mMに変化させた。

培養細胞組織の抽出：細胞をピペッティングによりdishよりはがし，800 rpmで5分間遠心後上清を除き，Ca-free PBS(280 m osmol)で1

回洗滌後，0.1M酢酸 1mℓ中室温20分間放置したのち，3000rpm で10分間遠心し，上清を集めた。この操作を2回操り返し，集めた上清を抽出物とし，これを2分し，凍結乾燥した。その1分はRIAに，他の1分はLawry法によるたんぱく濃度測定に供した。各培養 medium についても，2分し凍結乾燥したのち，それぞれをRIA およびたんぱく濃度測定に供した。

RIA：本アッセイに用いた抗VIP血清は合成ブタ VIPを抗原として作製したR502であり，その抗原認識部位としてVIP分子全体が必要である。本アッセイ系の最小測定限界は5 Pg／tube である。

研究経過

培養細胞系における dibutyryl cAMP添加による免疫活性VIP 濃度への影響を時度経過で検討した結果，2千時間後ですでに明らかな上昇を認め，そのVIP濃度の上昇は細胞組織抽出物および medium 中ともに48時間後で plateau に達し，72時間後のVIP濃度とほとんど差は認められなかった。なお，dibutyryl cAMP無添加の場合はいずれも添加群のような顕著な免疫活性VIPの上昇は認められなかった。つぎに培養時間，72時間における dibutyryl cAMP濃度と免疫活性VIP濃度の関係を検討した結果，0.5 mM dibutyryl cAMPの添加VIP濃度は著明に上昇し，0.5 mM 以上の濃度のdibutyryl cAMP濃度の添加によってもVIP濃度は0.5 mM添加の場合と大きい差は認められなかった。現在，さらに培養時間およびdibutyryl cAMP濃度の関係を詳細に検討中である（図1，図2）。螢光抗体法による免疫組織化学的研究によっても，1mM dibutyryl cAMP添加後，培養細胞系にはVIP陽性細胞が無添加群に比し，明らかに増加することが認められた。

考察

以上の結果は神経芽細胞腫培養細胞系NB－1はdibutyryl cAMPにより分化加促進されることを示すとともに，細胞内でのVIPの合成が促進されることを明らかに示している。一方，本培養細胞系についてdibutyryl cAMP添加によりtyrosine hydroxylase活性およびdopamine β-hydrcxylase活性の上昇が報告されている。また，dibutyryl cAMPの添加により形態学的にも突起の伸展が促進された。

本研究のdibutyryl cAMPによるVIP合成促進の機構について検討中であるが，本培養細胞系NB－1にはVIPのほか，ニューロテンシン，ソマトスタチンおよびP物質など他の神経ペプチドの存在も知られていることから，

VIPについてのみならず，上記他の神経ペプチドに対するdibutyryl CAMPの影響についても検討する必要があろう。

本研究結果は本培養細胞系が神経ペプチドの生合成ならびに代謝過程の解明に重要な糸として使用できることを示唆するものであり，さらに研究を展開しているところである。

文　献

1) 矢内原　昇，矢内原千鶴子，望月　徹，坂上政則，窪田真理（１９８０）脳－腸管ペプチドの構造と機能。日本内分泌学会誌 57, 208−213.

2) Yamaguchi, K., Abe, K., Miyakawa, S., Ohnami, S., Sakagami, M. & Yanaihara, N. (1980) The presence of macromolecular vasoactive intestinal polypeptide(VIP) in VIP-producing tumors. Gastroenterology 79, 687−694

3) Yanaihara, N., Kobayashi, S., Sato, H., Yanaihara, C., Sakagami, M., Sakura, N., Hashimoto, T., Ishikawa, S., Iwanaga, T. & Fujita, T. (1980) Vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in a human neuroblastoma cell line and the coexistence of other neuropeptide immunoreactivity in the cell line. Endocrinol. Japon. (Suppl. 1), 37−42

4) 三宅清雄，北村忠久，下嘉　孝（1975）ヒト神経芽腫　細胞株ＮＢ－Ｉの形態学的分化，脳神経外科 3, 407−414

IR-VIP concentration in ganglioneuroblastoma cell line NB-1 in the presense or absence of(But)2cAMP

Time (hr)	(But)2 cAMP (mM)	medium (pg/dish)	cell extract (pg/dish)	(pg/μgprotein)
24	0	〈 249	292 ± 19*	1.1 ± 0.1
	1	10910 ± 1122**	8348 ± 1316	48.3 ± 7.6
48	0	531 ± 71	560 ± 29	1.6 ± 0.1
	1	16510 ± 981	15520 ± 1942	55.8 ± 7.0
72	0	608 ± 102	861 ± 89	2.9 ± 0.3
	1	18020 ± 1358	14753 ± 1408	57.0 ± 5.4

8×10^5 cells／10%FCS-RPMI1640(3mℓ)／dish
*S. E. (n＝5, **n＝4)

図　1

Relationships between IR-VIP and(But)2cAMP in NB-1

(But)2cMAP (mM)	VIP-like immunoreactivity		
	medium (pg/dish)	cell extract (pg/dish)	(pg/μg protein)
0	1560 ± 32*	2369 ± 569	12.0 ± 2.9
0.1	4335 ± 142	7481 ± 448	33.7 ± 2.0
0.5	15098 ± 498	15131 ± 400	64.7 ± 1.7
1.0	14348 ± 1083	12569 ± 1026	58.2 ± 4.7
2.0	15630 ± 1260	13188 ± 1158	66.6 ± 5.8
3.0	16980 ± 707	12381 ± 1362	57.3 ± 6.3
5.0	11250 ± 455**	11200 ± 1501	60.2 ± 8.1

6×10^5 cells/10%FCS-RPMI1640 (3mℓ)/dish
incubated for 3days
* S. E. (n=4, **n=3)

図 2

細　胞　器　管　研　究　系

《生体膜研究部門》

概　　要

本部門では昨年度に引きつづきイカ巨大神経を用いた神経膜興奮機構の解析に関する研究と培養神経筋細胞を用いたアセチルコリンリセプターの形成および同定に関する生化学的研究を進めてきた。

研究課題

細胞内Caによる膜興奮動態および膜内表面構造の変化

山岸　俊一　　古家喜四夫

研究目的

興奮性細胞にとって細胞外液中のCaイオンの存在は必要不可欠のものであり，これによって膜興奮と膜構造が維持されている。一方，細胞内のCaイオンの作用については灌流イカ巨大神経線維を用いてK^+溶液に1mM濃度のCaイオンを加えた場合，膜興奮性は10分以内に消失してしまい，静止膜抵抗も減少の一途をたどる。これは膜の性質でみる限り，外液Caなしの条件に類似しCaイオンは膜の内外面に対し正反対の作用を及ぼしている。

ところが，種々の細胞にとって微量のCaは，筋収縮，開口分泌，細胞間連絡，膜のK^+透過性上昇など生理的に重要な役割を果しており，細胞内で局所的に一定濃度，短時間にあらわれるCaイオンによるオルガネラの非安定化作用こそがCaの生理作用の本体であろうと考えている。

本研究は，興奮膜内表面を構成する物質とCaの相互作用について膜の性質の解析および形態変化を探ることにより，Caイオンが膜におよぼす生理作用（可逆的効果）および非可逆的変化をもたらす諸条件を明らかにしようとしたものである。

結果および考察

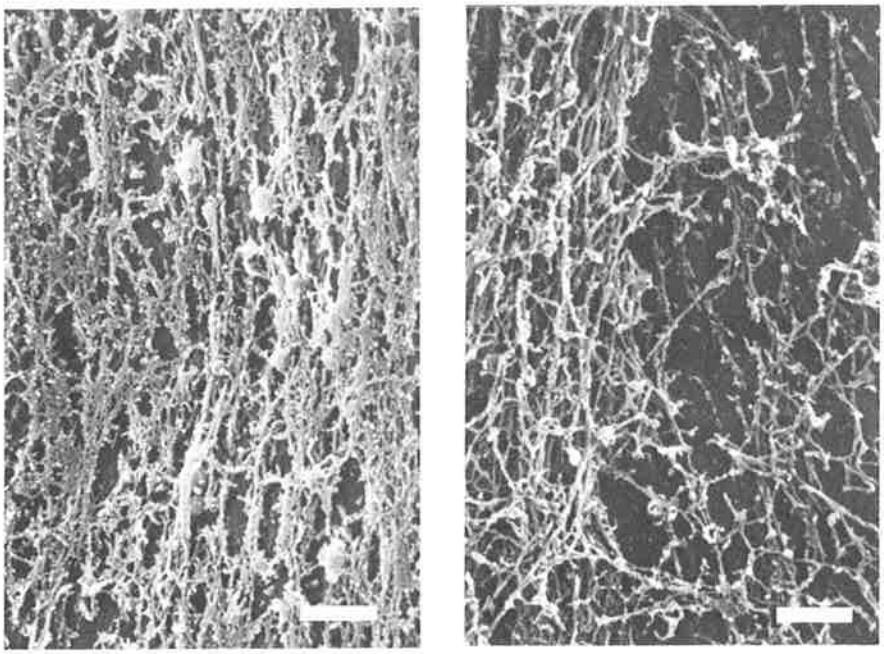
(1) 膜興奮に対するCaイオンの効果

人工海水に浸したイカ巨大神経線維を25mM～250mMK^+の塩溶液で灌流しながら電流刺激を与えると通常120mVをこえる値の活動電位が得られる。これに0.3～30mMの範囲のCa^{2+}塩溶液を加えると活動電位の大きさは次第に減少してゆくが，当初2～3msecのdurationは一過性に数倍に延長する。またこの時，活動電位を発生させるための閾値は十数mV低下する。このCaイオン灌流は2分間以内に止めれば活動電位はほぼ元の状態に回復

するが，7～10分を超える長時間の灌流では膜抵抗が1／2以下に著しく減少し且つ活動電位が不可逆的に消失してしまう。Ca を作用させたのち素速くvoltage clampを行ない膜電流変化をしらべると，内向き電流のわずかの減少，ピーク時コンダクタンスの減少とともに，より顕著に遅い外向き電流値の減少が認められた。この所見はCa イオン作用中の活動電位durationの延長が外向きK電流成分のCaによる抑制によって起ったことを示している。これは多くの細胞の静止膜状態で報告されている“ Ca によるKコンダクタンス上昇”とは別に興奮時のいわゆる“ K. activation”に対しCa イオンが抑制作用をもたらすことを示している。また，詳細にみればCa イオンはTEA存在下で内向きNa電流を長びかせる作用をも示すことがわかった。

(2) 細胞内Ca^{2+}による膜内表面構造の変化

細胞内Ca^{2+}の興奮膜に対する生理作用と同時に，灌流実験を行ったイカ巨大神経を固定したのち切り開き，走査電顕により神経膜内表面の観察を行った。膜内表面近傍では微小管およびneurofilamentなどの線維が網目構造を形成している。その個々の線維は厚いコートを持ち，線維間は密に詰っているがCaイオン灌流によりそれらのコートがなくなり線維間が粗になっていく。また網目構造自身Caイオン灌流により次第に壊されていき，広い部分で膜内表面が露出してくることが観察された。このことはCaイオンが細胞内構成成分を壊し溶出させる働きのあることを示している。ただ現段階ではこのような線維構造が壊されることと興奮性の関連や，膜自身の構造に対するCa イオンの作用に関する所見はまだ明らかではなく，今後の検討課題である。



a　　b

図1　神経膜内表面の走査電顕写真
(a)　100mMK-glutamate10分間灌流
(b)　100mMK-glut ＋ 1mMCa-glut 10分間灌流
どちらもたて方向に神経の長軸があるスケールは1μ

研究課題　**中性分子を用いた，Naチャネルと Kチャネルの機能及び構造の解析**

久木田文夫　　山岸　俊一

研究目的　神経膜との相互作用が少ないと思われる親水性の中性分子は神経膜とイオンの相互作用つまり神経膜のイオン透過の量及び時間経過に間接的に影響を及ぼす。神経が正常に興奮する際の　aチャネル及び K チャネルの活性の量的な変化を解析することにより，活動時のチャネルの構造に対する知見を得る。

研究方法　細胞内灌流したヤリイカ（Doryteuthis bleekeri）巨大神経線維の細胞内外液に一定量のイオンを加え，中性分子（蔗糖，ブドウ糖，グリセリン，エチレングリコール，尿素等）の濃度及び種類を変えた場合の，Na電流及び K電流の大きさ及び時間経過を詳細に解析する。

研究結果及び考察　中性分子を細胞内外液に加えたことの，分子の種類に依らない効果は，神経興奮の時間経過を緩やかにし，膜電流を小さくすることである。中性分子の作

用としてはイオンチャネルの出入口でのイオンの流入流出の阻止及びイオンチャネル細孔内への中性分子の侵入等が考えられるが，それらの効果が何故興奮の動力学に影響を与えるかを明らかにすることは単一イオンチャネルの開閉の集合として，興奮性膜の動力学を理解するうえで重要である。尿素は他の中性分子と異なり，膜電流を大きくする作用があるが，尿素が溶液中のイオンの移動度を殆ど低下させないことと関係している。尿素には蛋白質の変性作用があり，他の中性分子は安定化作用がある。いずれも水の構造が関与した巨大分子の高次構造に対する作用であるので，興奮性膜のイオンチャネルなどの巨大分子の構造変化やチャネルの細孔でのイオンの脱水和などへの影響も考慮する必要がある。尿素が細胞内表面の細胞骨格を破壊することは，細胞内灌流した神経線維が内圧の変化に対して極端な脆弱性を示すことからも明らかであるが，膜興奮に対する細胞骨格の役割に関して議論できる段階でない。

低温での神経興奮の解析

研究課題

久木田文夫　　山下　幸子　　山岸　俊一

研究目的

神経線維の興奮伝導は0℃以下の低温では不可逆的に阻害される。神経伝導の阻害が神経膜固有の性質によるものか，細胞内外液が凍ることによる副次的な効果であるかを明らかにする。

次に低温での神経興奮は非常に緩やかな時間経過をとることが期待されるので，神経興奮の時間経過中に，種々の物理・化学的な量を測定し，神経興奮に関する分子レベルでの運動学的情報を得ることができる。この目的に用いる低温での神経標本が，正常な神経と比べ，どのような特徴をもつかを詳細に解析する。

研究方法

ヤリイカ（Doryteuthis bleekeri）の巨大神経線維の細胞内灌流標本を用い，細胞内外液の浸透圧を釣り合わせながら，細胞内外液を40～50 vol %のグリセリン溶液に置き換える。これらの溶液は－20℃以下まで凍らない不凍液である。不凍液を細胞内外液とした神経線維の囲りに，電子冷却装置で冷却した細胞外液を循環して，神経線維を冷やす。又液体窒素を気化させた，N_2ガスを神経線維に吹きつけ冷却する方法も用いた。電気生理学的な測定は通常の膜電位固定法により行ない，電位測定用のガラス電極の内部液としては50 vol %のグリセリンを含むKCl溶液を用いた。

細胞内灌流しないイカ巨大神経線維の外部よりエチレングリコールを徐々に細胞内に浸透させ，興奮の伝導を金属電極による外部誘導により測定した。この場合，外液を電子冷却により直接冷却した。

研究結果及び考察

神経膜の興奮は0°C以下でも常温での正常な興奮と同じように観察されることが分かり，0°C 以下での神経伝導の阻害は神経膜固有の性質ではないことが分った。冷いN_2ガスの吹きつけにより，外液が完全に凍る温度ような極端な低温にした場合は興奮の発生は抑えられ，温度を上昇すると損傷は著しいが，興奮が発生する。エチレングリコールを浸透させた細胞内灌流をしない神経線維の興奮伝導は細胞外液が過冷却の状態や凍った状態でも観察された。これらの結果は低温での神経興奮伝導の阻害は細胞内外液の凍結による不可逆的な損傷だけでなく，膜構造の熱力学的な構造変化によるイオンチャネルの活性の抑性による可能性を示唆している。図1に細胞内外液にグリセリン溶液を用いた場合の細胞内記録による非伝播性の活動電位と同条件での膜電位固定下での膜電流を示す。低温では時間経過が著しく緩やかになり，膜電流の大きさは小さくなるが，活動電位の大きさは余り変化しない。膜電流の速度定数と大きさの温度変化のQ_{10}値は，それぞれ5及び2で，正常の神経より大きい。さらに温度を下げると−20°Cまでは正常と変りない興奮を示すことが観察されたが，それ以下の低温は外液を循環させる方法では得られなかった。図2には直接外液を冷やした，エチレングリコールを浸みこませた神経の興奮伝導の外部誘導による記録を示す。伝播速度が極端に遅くなり，温度変化のQ_{10}値も非常に大きい。今後，直接外液を冷やす方法をとり温度をさらに下げると興奮伝導の阻害の臨界温度の測定及び興奮現象を現段階の2桁からさらに数桁緩やかにしての観察が可能になる。

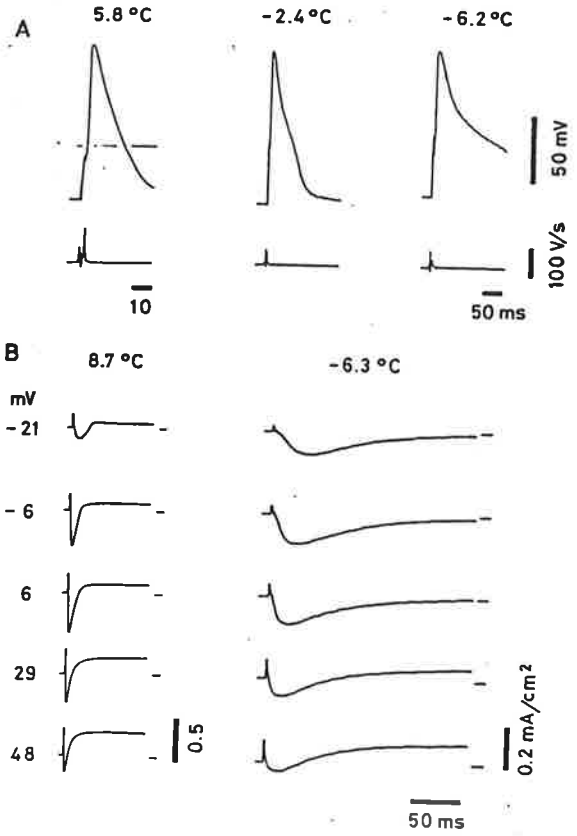


図1　細胞内外液にグリセリン溶液を含む場合の活動電位と膜電流

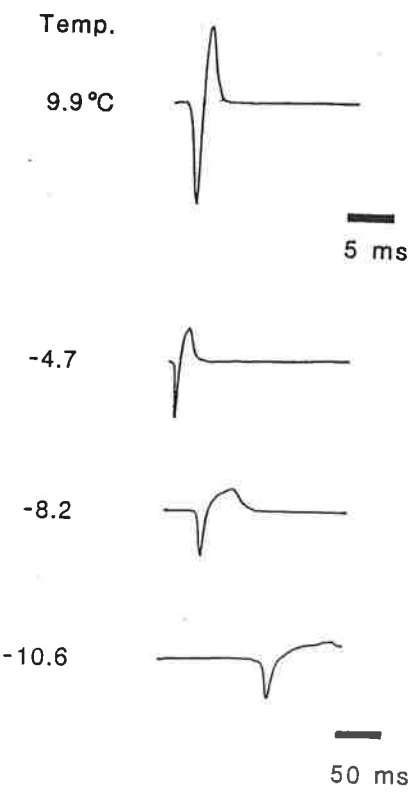


図2　エチレングリコールを浸透させた細胞内灌流してない神経での興奮伝導

培養骨格筋細胞におけるアセチルコリン受容体の合成と分化

研究課題

杉山　博之　　山下　幸子

研究目的

骨格筋のアセチルコリン受容体には，成熟した神経筋接合部に集中局在するシナプス型受容体と除神経した筋肉の非接合部に現れる非シナプス型受容体の2種類が知られている。また，神経支配を受ける前の殆児骨格筋は非シナプス型の受容体を持つが，神経支配が成立し神経筋シナプスが成熟するにともないシナプス型の受容体が支配的となる。この非シナプス型→シナプス型への転換を制御する機構を理解することは，神経筋シナプスの成熟の機構を分子レベルで理解するための重要な手がかりとなることが期待される。この目的のため，本研究では筋肉細胞におけるアセチルコリン受容体の生合成の経過を調べ，シナプス型・非シナプス型の両受容体が生合成上どのような関係にあるのかを検

討した。

研究方法・結果　材料としては，細胞培養したラット，マウス，ニワトリの骨格筋細胞を用いこれらの受容体を^{3}Hまたは^{125}Iで標識したα－ブンガロトキシン（αBT）と結合させた複合体を抽出し，等電点電気泳動，ゲル濾過等の方法で分析した。その結果，次に要約される知見が得られた。

1）マウスおよびラットの骨格筋培養細胞は，神経の存在しない条件で培養しても，その細胞表面膜上に2種類のアセチルコリン受容体を有する。この2種類は，等電点の比較からシナプス型・非シナプス型の2型に対応するものと考えられる。これに対し，ニワトリの筋細胞にはシナプス型に対応する受容体分子は見い出されない。

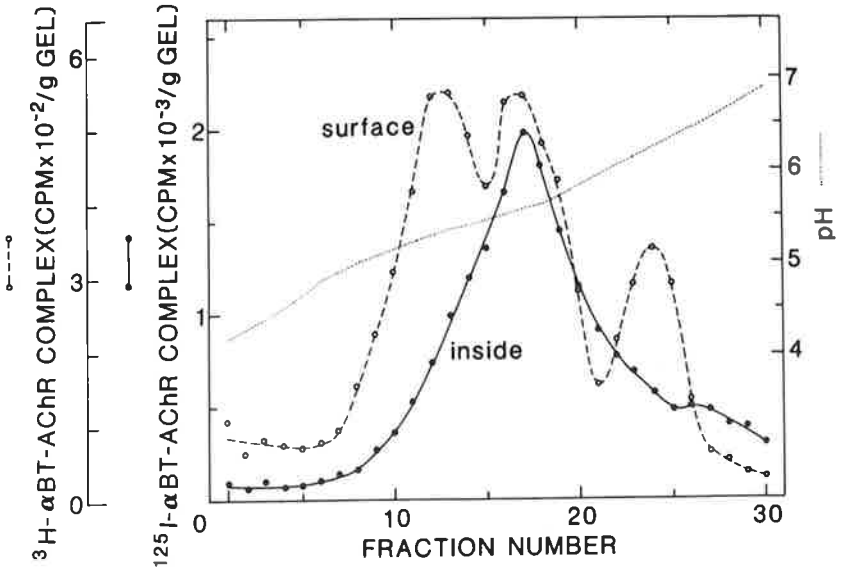


図1　ラット骨格筋培養細胞アセチルコリン受容体の等電点電気泳動による分析。
同一細胞の表面膜上受容体および細胞内前駆体を^{3}Hおよび^{125}Iで識別標識して泳動した。表面受容体は2種類，前駆体は1種類あることが分かる。

2）ラット筋細胞の表面受容体は2種類あるが，同一細胞の細胞内前駆体には非シナプス型に近い等電点をもつ一種類が見い出されるのみである（図1）

3）ただし，ラット筋細胞内には上述の前駆体の他に，分子量が更に半分以下のα－ブンガロトキシン結合成分が見い出された。これはおそらく，「前駆体の前駆体」とも言うべき分子で，アセチルコリン結合部位を担うサブユニ

ットであろうと考えられる。

考　　察

以上の結果より，現在のところアセチルコリン受容体の合成と分化に関する次のような作業仮説を考えている（図２）

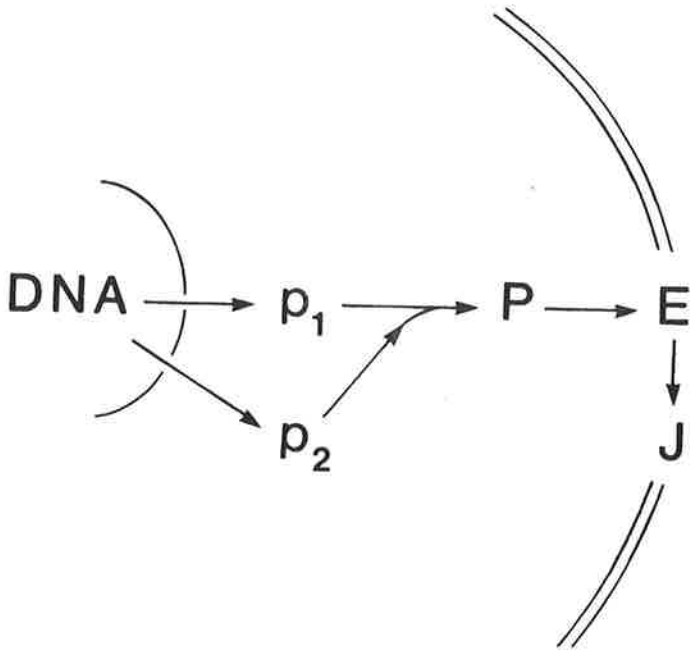


図２　ラット骨格筋細胞におけるアセチルコリン受容体の合成と分化の模式図

1）受容体のアセチルコリン結合部位を担うユニット（p_1）と，イオン透過性を制御するユニット（p_2）は別々に合成され，両者は細胞内膜系上で結合し前駆体（Ｐ）を形成する。

2）前駆体は細胞表面膜に組み込まれる段階以降で非シナプス型（Ｅ）とシナプス型（Ｊ）受容体に分化する。このように，ＥとＪの２型は同一遺伝子にもとづいて合成される共通の前駆体より分化するのであって，別個の遺伝子にもとづき別個の前駆体を通して合成される別個のタンパク質であるとは考えにくい。

3）ニワトリの場合，ラット・マウスと異り，Ｅ・Ｊの分化の機構が欠落している。

今後，この仮説を更に確かめ検討を加えて行きたいと考えている。

《機能協関部門》

概　　要　本部門は，生体膜部門と協同して神経線維の興奮性膜の挙動を電気生理学的方法を利用して研究するとともに，光学的方法を用いて，興奮に伴う膜高分子の変化についての手がかりを得ようとしている。

研究課題　**細胞容積の変化に伴う膜電位変化**

寺川　進　　渡辺　昭

研究目的　細胞膜が機械的変形を受けるさいに膜電位変化を起す現象は，機械的刺激の受容器においてもっとも顕著に見られる。イカの巨大線維において機械的刺激と膜電位変化との間の関連を求めることは，膜電位の成因についてひとつのデータを与えるとともに，メカノレセプターの受容器電位の解析を行う手がかりとなる。これらの目的で次の実験を行った。

研究方法・結果　イカの巨大線維に細胞内灌流を行い，蛋白分解酵素（Pronase 0.01mg/mℓ，1分）で軸索内原形質を除いたのち，更に，細胞内にCl^-またはBr^-を注入して10－15分間放置し，細胞内原形質をできるだけ完全に除いた。この操作ののち，時には細胞内陰イオンをF^-で交換し，時にはCl^-またはBr^-のままで灌流液の入口を閉じ，出口は，サーボモーターで駆動される容積1μℓの微量注射筒と，ポリエチレンチューブで連絡した（第1図）。

細胞内電位の誘導を行いながら，細胞内灌流液の一定量を注入し，約2秒ののち同量をとりのぞいた。巨大神経線維の直径は，灌流液の注入とともに増加し，灌流液の除去とともに減少してもとの大きさに戻った。このさいに，膜電位に変化が見られたが，その大きさや方向は，条件によって大きな差異が見られた（第2図）。注入容積が小さい時には，多くの線維で過分極性の応答が見られ，注入容積が増加すると，過分極性の応答の途中から，急に脱分極性の応答のはじまることが多かった。これらの大きな注入容積に対する脱分極性の応答は，同じ線維で同じ刺激をくり返した時でも一定でなく，また一旦発生した脱分極の一部が非可逆的な膜電位減少に移行するので，今回の実験ではこれを追及することを避け，注入容積をなるべく小さい範囲（ふつう0.2μℓ以下）に

制限して実験を行った。

このような条件下での容積パルスに対する応答は，多くは１ｍＶ以下の過分極であった。まれには２０ｍＶの過分極を得た例もあったが，その生起の条件は明らかでない。このような大きな応答は，ある時期に，くりかえし見られたが，その後は，実験条件を種々変更しても再現できなかった。

この過分極性の電位は，膜に内向き電流を与えて膜電位を過分極の位置に保持すると，ある膜電位のレベルで消失し，更に強い過分極性電流を与えることにより，脱分極性の応答に変化した（第３図）。この際，逆転電位が，はじめのスパイク状の相と，あとの遅い相との間で異る場合があり，応答の性質が，はじめの相とこれに続く相との間で，必ずしも等しくないことがわかった。

脱分極性電流を与えることによって，過分極性の応答がより大となることは少なかった。おそらく，脱分極による膜抵抗の減少によるものと考えられる。また，膜の外部にK^+を与えて容積変化に対する応答を見ても，過分極性応答の振巾は必ずしも増大せず，むしろ小さくなることも多かった。しかし，細胞内のＫの濃度が低いとき，しばしば非常に長いプラトーを持つ活動電位が見られたが，このプラトーの中間に圧パルスを加えた際，著明な（１０ｍＶ以上の振巾を持つ）過分極方向に向う応答を見た（第４図）。

神経線維の機械的刺激に対する応答は，温度変化によってその大きさを変化させ，低温により応答は大となり，高温により応答は小となった。しかし，これらの温度変化による応答の振巾の変化には過渡的部分が多く，一旦ピークを作ったのち，一定の温度に保持しても，次第にもとの大きさにもどった（第５図）。

細胞膜の過分極性の電流パルスを与えて膜抵抗を測定したところ，容積パルスを与えて過分極を起しているとき，膜抵抗がわずかに減少しているのがみとめられた。この減少は，低温により応答が増加している時には大きく，高温により応答が減少しているときには，みとめられないほどに小さくなった。したがって，これらの容積パルスに対する応答は，膜の，ある部分が，静止電位とは異なる起電力を保持し，膜が伸展する時に，その起電力に直列に入る抵抗が減少するとして，記述しうるものと考えられる。

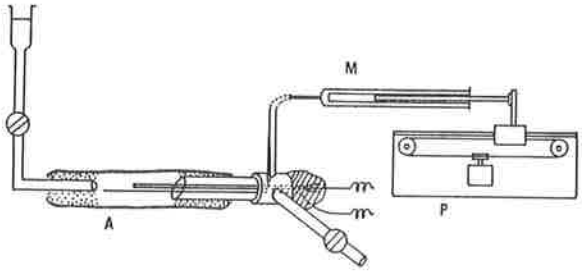
容積パルスに対する応答への次の様な薬物の効果はみとめられなかった。テトロドトキシン（３００ｎｍ），ネオマイシン（１㎎／㎖），４－アミノピリジン（１ｍＭ），プロカイン（０.１％），グルタルアルデヒト（０.１％），テトラエチルアンモニウム（１０ｍＭ，細胞内）は応答を可逆的に小さくしたが，完全におさえることはなかった。

この応答に，Naーチャネルまたは K ーチャネルのみが特に関与しているとは考えにくいことがわかる。

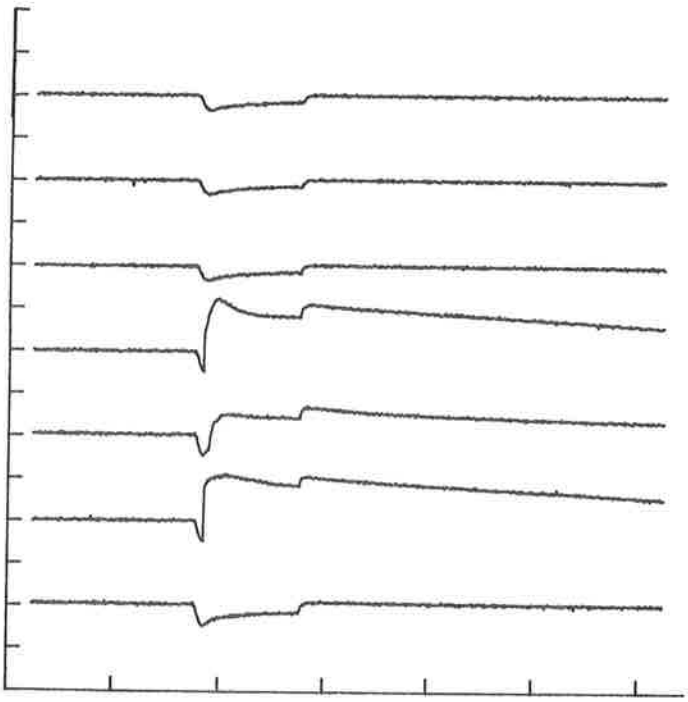
考　　察

以上の事実から，イカの巨大線維における機械的刺激に対する応答は，従来記述されてきたチャネル部位が特に関与していないことがみとめられる。したがって，この応答は，もっと非特異的な構造において起っていると考えなければならない。しかし，このような過分極性の応答が，膜がある程度可逆的に損傷をうけ，非特異的な電流の「もれ」を作ったためとも考えにくい。なぜならこの時に発生する起電力は，細胞内外の溶液の拡散電位によって規定されるので，静止電位より小さく，したがって応答は脱分極の方向でなければならないからである。

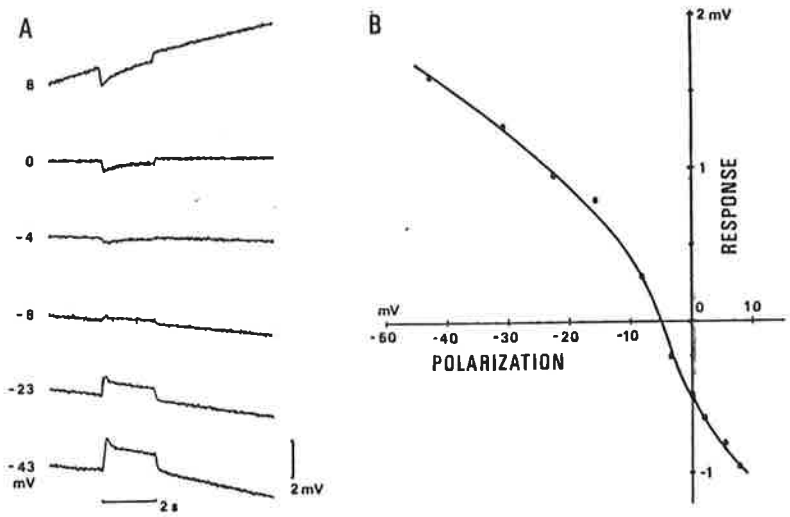
一つの可能性として，次のような機構が考えられる。Singer－Nicolson モデルによると，膜は，その大部分が燐脂質よりなる 2分子層で占められ，その所々に蛋白分子が島状に点在するものとされる。これらの蛋白分子は，必ずしもチャネルを形成せず，一端のみが外液に露出し，他端は，燐脂質の海の中に終っているものも多い。このような状況で，もし膜が機械的な伸展をうけ，同数の膜分子によってより広い面積を作りあげなければならない時，これらの潜在的蛋白分子の盲端が外液に露出することは容易に考えられる。このとき，これらの蛋白分子は，種々のイオン透過性を持った新しいチャネルを形成し，膜電位は変化し，膜抵抗は減少するものと思われる。低温においては，脂質分子の流動性の減少のため，このような現象は生起しやすいであろう。高温においては，脂質分子の流動性の増加のため，分子の再配列が行なわれやすく，面積が変化しても新しいチャネルの形成に至ることがないために応答が小さいものと考えられる。チャネル形成にあずかるものは，必ずしも蛋白分子ではなく，特殊な脂質分子またはいわゆるイオノフオアである場合もあるであろう。このような性質が高度に発達した膜は，機械的刺激の受容膜としての役割をはたすことができるものと考えられる。



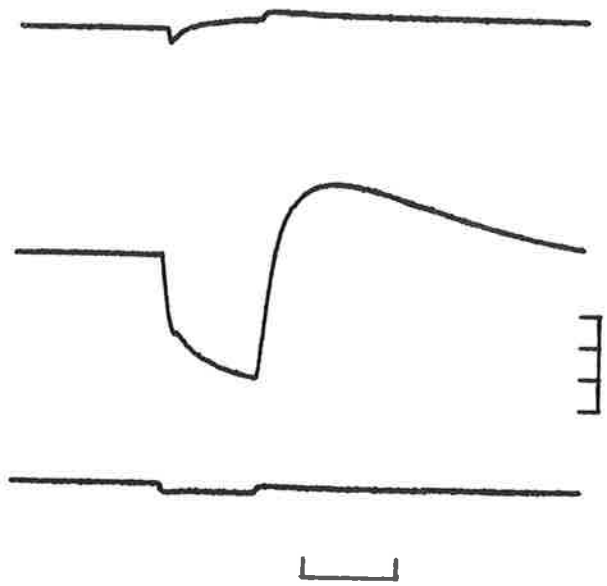
第1図　実験装置の略図。A，イカの巨大線維。M，微量注射筒。P，ペンモーター。電圧を加えることにより，Mのシリンダーを正確にある位置まで移動させることができる。移動の時定数は100msていど。



第2図　連続して記録された7回の細胞内液注入による膜電位の変化，注入期間は2秒。注入は45秒間隔で行った。上の3つの記録での注入量は0.25$\mu\ell$。4つ目の記録から注入量を0.32$\mu\ell$に増加させている。過分極性応答の途中から急に脱分極性応答に移行しているのが見られ，あと2回，同様の応答が現れたのち過分極性応答に復帰した。時間の刻みは2秒，電位の刻みは2.5mV，外液はNaCl 470，KCl 10，CaCl 260(mM)，内液は400mM KCl。直径650μm，20°C(81-1-21-1)。

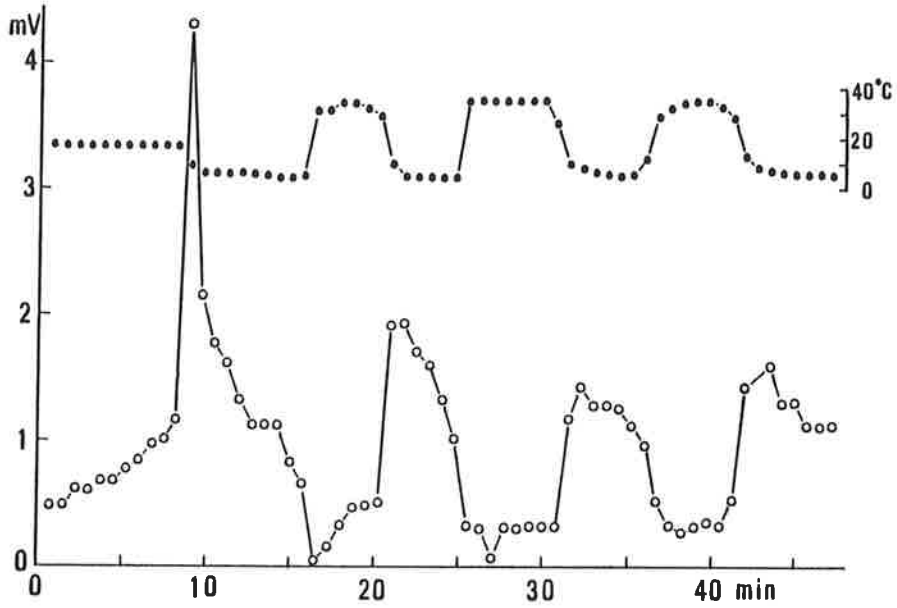


第 3図　膜に過分極性または脱分極性の電流を流して膜電位を種々のレベルにずらせた時の，容積刺激による膜電位の応答の変化。Aは実際の記録で，各々のトレースの左側の数字は，このトレースが開始される点での膜電位のずれの大きさを示す。Bは応答のピーク値と膜電位との間の関係を示す。外液は NaCl 470, $CaCl_2$ 60, 内液は KCl 400（すべて mM），直径 675μm，20℃（81-1-14-1）。



第 4図　プラトー相で容積刺激を与えた時に見られる大きな膜電位変化。上のトレースは静止状態の膜での応答。膜電位レベルは −44mV。中のトレースは，膜に過分極性電流パルスを与えることにより発生し10分間続いたプラトーの間

に容積刺激を加えたさいの応答。膜電位レベルは－16mV。下のトレースは膜電位がほぼ静止レベル（－38mV）に戻ったさいの応答。時間のスケールは2秒，電位の較正は2mV／Div 外液は第3図に同じ。内液は50mM KCl. 直径475μm 20°C（81-1-22-4）。



第5図　温度による応答のサイズの変化。白丸は容積刺激に対する応答のピーク値を示す。刺激は45秒間隔で2秒間 加え，注入量は0.32μℓである。外液を連続的に灌流し，高温液，低温液に変化させた。黒丸はチェンバー内の外液の温度変化を示す。外液の組成はNaCl 470, KCl 10, $CaCl_2$ 60 内液の組成はKCl 400（すべてmM），膜は低温で過分極し，高温で脱分極するのがみとめられた。線維の直径は625μm。室温 19.6°C（81-2-3-1）。

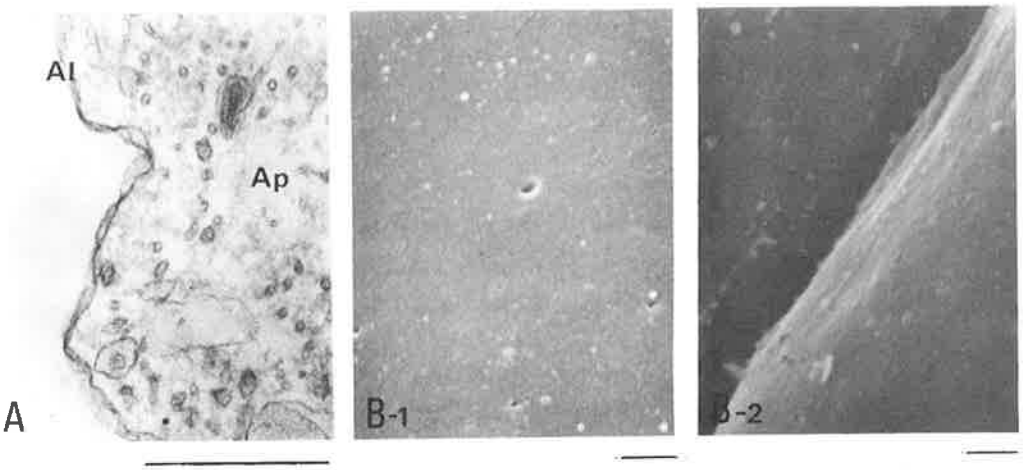
イカ巨大神経膜の表面構造　　**研究課題**

寺川　　進

膜興奮の基本的過程は，膜に存在するチャンネルの分子状態の変化である，と考えられている。このチャンネルの実体は必ずしも明らかではなく，特に，形態学的研究は遅れている。本研究では興奮現象を理解するために，チャンネルといわれるものの形態学的同定とその分布の様子の解明を最終目的とする。　　**研究目的**

研究方法　本年度は，予備実験として，走査型電子顕微鏡によりイカ巨大軸索膜の外表面の観察をおこなった。巨大軸索の周囲に付随するコラーゲン層やシュワン細胞層は田崎法に従って，トリプシン，グルタールアルデヒド処理後，実体顕微鏡下に針でとり除いた。軸索標本は，脱水，臨界点乾燥し，金で薄くコートして，日立S-450にて観察した。

研究結果及び考察　膜表面には大小の顆粒が散在し，所々に，ピノサイトティックな小孔が認められる。顆粒の大きさは，コーティングの厚みが加わっているため，最小のもので20nm程度である。これらの顆粒は，時に一列に並んでいるが，多くの場合は不規則に分布している。これらがチャンネルであるかどうかを知るには適当な標識の開発が必要である。この方法は分解能の点でフリーズフラクチャー法に劣るが，細胞外表面からしか作用しない標識を利用できる可能性のある点で有用であると思われる。



A；軸索の透過型電顕像。コラーゲン層やシュワン細胞層がとり除かれ，軸索膜表面が露出している。Al：axolemma，Ap：axoplasm。
B；軸索膜外表面の走査型電顕像。B－1：平坦な部分，B－2：ひだ状に膜が折れて山と谷を形成している部分。横棒はいずれについても 0.5μm を示す。

《能動輸送部門》

研究目的

(1) 高等動物細胞膜の能動輸送機構として最も重要なNa^+, K^+交換能動輸送について，その本態と目されるNa^+, K^+-ATPaseを純化，その物理化学的性質，特に反応サイクル中の各ステップに応じた物理化学的変化を観察し，それにともなうサブユニット間相互作用の変化を明らかにする。更に反応サイクル中にみられるNa^+, K^+イオンの結合，遊離，Mg^{2+}の結合性の変化を観察して反応スキームをNa^+, K^+の位置移動と関連づけながら完成する。これが大きな目標である。

(2) Na^+, K^+-ATPaseの生物学的意義を明らかにする一助として，その臓器特異性が発生的にどの様に由来するかを明らかにする。さしあたり培養細胞のうち，神経細胞由来のものとグリア由来のもののNa^+, K^+-ATPaseの性質を比較し，脳型か非脳型かを明らかにしたい。

(3) 能動輸送と同様にＡＴＰを消費する細胞膜現象のうち赤血球形状変化に関係ある細胞膜裏打ち構造の分子機構を明らかにして，神経細胞その他の細胞膜裏打ち構造のモデルとしたい。近年，興奮，伝導，分泌，嚥喰等に細胞膜裏打ち構造が関係する事が明らかにされはじめており，広義の能動輸送及びその調節との密接な関係が想像されるにいたっている。

(4) 赤血球のin vitroに於ける老化予防には細胞内ＡＴＰ含量及びその生産消費機構を維持する事が大切であるがそれは上述の細胞裏打ち構造の維持と関係があるらしい。これと同時に細胞膜脂質二重層の強化が必要である。それには等浸透圧の蔗糖，マニトールが有効であるのでその機構は水の受動輸送によると想像される。この機構を明らかにする事によって有効性の補強と使用条件の規定を行う。重要機構は，Na^+, K^+, $C\ell^-$の受動輸送とＡＴＰによる裏打ち構造の維持に関係するらしい。

方法，結果，考察

研究報告

(1) Ⓐ NaK-ATPaseのNa^+型及びK^+型のみかけの分子量の相異

馬腎髄質外帯より調製したミクロソーム分画を更にJorgensenに従ってSDS処理した。この分画をNikkol(octa-ethyl glycol dodecyl ether)で可溶化(27万Ｇ60分遠心後の上清を東洋ソーダG4000SW或

いはG3000 SWでNikkol存在下高速ゲルクロマトグラフィーをすると溶出液中のリガンドによって溶出部位が異なり，リガンドを各種組合わせて溶出した結果をまとめると，Na^+型とK^+型は分子量が異なることが推定された。（第52回生化学大会，第5回生体エネルギー研究会）標準蛋白の大きさから，みかけの分子量を推定するとNa^+型では約40万の大きさが大部分であり，K^+型は更に80万附近にメインの蛋白があった。この関係を確めるためNikkol添加Polyacrylamide gradeant gelによる電気泳動を行った。結果はG4000 SWで得られたものとほぼ等しい。SWカラムで40万80万の他に20万以下のみかけの分子量を示す分画にもNa，K-ATPaseの活性p-NPPaseの活性がありウワバインで阻害された。この結果は電気泳動でも同様であった。この結果，少くともATP分解活性に関するかぎり，分子量10万の単一サブユニット1個と他のリピト或いは小さいサブユニットが1個ついただけでも活性は示す事を示唆する。又，Na^+型，K^+型でみかけ分子量の異る二型を酵素作用の1サイクルの間に経過する可能性を示唆する。これがNa^+，K^+の移動とどの様な関係をもつかはこれからの研究に待つ。又後述の架橋剤を使用して傍証を得る努力をするつもりである。

Ⓑ 膜中のNaK-ATPaseに対する2価SH試薬の作用膜中のNa^+，K^+-ATPaseのサブユニット構造を知る目的で，2価SH試薬N－α－(Bromoacetoxymethyl)maleimide(AM)によるNa^+，K^+-ATPaseタンパクの架橋および酵素活性に対する影響を調べた。ブタ腎のDOC処理部分精製酵素をTris HCℓ-EDTA(pH 7.5)存在下，AM2mMと37℃，30分反応させると，SDS-PAGEでは，AM非存在に対して分子量10万のタンパク量の約20%の減少とともに高分子領域へのピークの移動があり，MW7万の量は不変であった。この時酵素活性阻害は約90%，NEM単独では43%阻害でこの差47%が10万同士の架橋および分子内架橋を含むものと考えられる。生理的リガンドのうちNa^+，K^+，ウワバインはMW10万の架橋に少しの変化を与えるだけだが，ATPによってMW10万の架橋は減少し酵素活性は強い保護をうけた。ATP(3mM)にK^+(2mM)を共存させると，同様に10万の架橋に対する保護はあるが酵素活性は74%まで阻害された。この活性阻害の増加はATP K^+の組み合せにおけるmaleimide反応性の増加によるもので，架橋と活性阻害はこの場合もほぼ平行した。部分反応に対する知見も合わせると，AMはNa^+ K^+-ATPaseの触媒活性タンパクMW10万の架橋を行い架橋の最初の反応は活性部位近傍のSH基に関係していると思われる。

Ⓒ Na, K-ATPaseはNa^+ K^+, Mg^{2+}の3種の陽イオンを必要とするまれな酵素でその様なリガンドの結合遊離は能動輸送と云う機能に本質的な関係がある。まづNa^+については結合の方について既に若干の知見が得られているのでNa^+, K^+-ATPaseからのNa^+の遊離についてしらべた。

膜Na^+, K^+-ATPaseは細胞質側でNa^+を結合し，ATPによるリン酸化に伴い細胞の外側へ輸送し遊離する。このNa^+遊離の段階はE_1～PからE_2－Pへの転換の段階に対応する事が予想されているが，詳細は不明であり，何個のNa^+がどの様にして遊離するのか充分には知られていない。酵素へのNa^+の結合の測定からNa^+に対する親和性がリン酸化に伴い低下し，2－3個のNa^+が放出されると報告されている。またE_2－PからのATPの合成には高濃度のNaCℓを要しその$K_{0.5}$は約0.6Mと報告されている。従ってE_1～PとE_2－Pの間の平衡定数のNa^+濃度依存性を調べる事によってNa^+遊離の機構を解析できると思われる。方法 $E_1 \sim P \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} E_2\ P \xrightarrow{k_3}$ とし，①k_3はキレート剤添加後の脱リン酸化の初速度から②E_1～PとE_2－Pの量はADP感受性及びKCl感受性EPの量から③k_1とk_2は①②及びキレート剤添加後の脱リン酸化速度の解析からそれぞれ求めた。結果① Na^+濃度20mM～1.2Mの範囲では，Na^+濃度の増加に伴いk_1は減少，k_2とk_3は増加した。② k_2/k_1はNa^+濃度の約3乗に比例して増加した。③ ADP感受性EPとK^+感受性EPとの和は全EP量の90～110%であった。

Ⓓ 更にMg^{2+}のかわりをするCa^{2+}を用いる事によって生ずるリン酸化酵素はEDTAで金属を遊離し易すく，且生じたりん酸化酵素は分解しにくくなる事を利用して動力学的な研究を行い，中間体の経過順序をきめた。E.ATPよりE_1～Pの形に直接変化すると考えて矛盾のないデータとなった。

(2) Na^+, K^+ ATPaseは脳型と非脳型の2形にわけられ，種々の証処によればアイソザイムらしい事を示している。杉山助教授よりいただいたニューロブラストーマN18TG2とグリオーマB6Bu1を大量に培養し，膜分画を水性二層法により分離し[^{32}P]ATPを合成してNa^+, K^+-ATPaseをしらべた所各々脳型と非脳型を示した。アイソザイムの成立機転と脳におけるNaK能動輸送の生理的意味を考察するのによい材料であると思われる。今後に大きな規模の培養を行いこの二株及び類縁の本来のNa^+, K^+-ATPaseの性質を詳細に知りたい。

(3) 赤血球の形が細胞内部のATPによって形を変ずる事は中尾等によって報告されたが，この変形の際水の出入，或いはイオンの出入が関係している

か否かを改めて，精密にしらべた。I^{131} アルブミンによる細胞間体積をみる方法，ヘマトクリット法，コールターカウンターモデルSを用いる方法の3種を用いた。ATPの減少して球形化した赤血球にアデニンとイノシンを添加するとATPの増量とともに形は円盤にかわるが，容積は殆んど変化しない。そのかわりに表面積が変化する事が示された。ATPにより脂質二重層と裏打ち構造の両者が変化する事を示している。両者の分子構造とその生理的意味を探究するのに重要な知見と考える。赤血球の裏打ち構造の主要部をしめるスペクトリンのリン酸化は赤血球の形態変化に関与していると考えられているが，その程度は，intact赤血球と赤血球膜でかなり差がある。その差の生ずる理由をしらべる一環として溶血上清に存在するプロテインキナーゼによるものと考え本酵素を精製しその性質を調べた。基質としてスペクトリンを用いた。精製は硫安分画DEAEセルローズカラム，ホスフォセルローズカラム，DEAEセファデックスカラム，ハイドロオキシアパタイトカラムを用いておこなった。その結果硫安分画標品より1500倍精製された最後の分画のSDS電気泳動はほぼ単一なバンドを示した。その分子量は3万4千であり，このバンドは自己リン酸化をうけた。本酵素はカゼイン，ホスビチンをよい基質にするが，ヒストンやホスホリラーゼbなどを基質にしない。赤血球膜タンパクではスペクトリンの他にバンドⅢ蛋白もリン酸化の基質になる。これらのリン酸化はcAMPによっては活性化されなかった。至適pHは9.0附近でありATPに対するkm＝122mMであった。

(4) Ⓐ 細胞膜強化のためのアデニンイノシン等滲透圧蔗糖液とその機構

(Ⅰ) 趣旨，血液或いは赤血球を保存する際アデニン及びイノシンを添加することによって赤血球のATPレベルin vitroの性状及び輸血後寿命がよく保たれる事は既に報告し，又多くの追試でも確認されている。しかし代謝産物であるヒポキサンチン及び不純物ヂヒドロキシアデンによる副作用を恐れるため，アデニンの添加量を少く，イノシンの添加はやめると云うのが最近の傾向である。しかしこれは中尾等の説明に反し，又実際上の効果は数段おとる事も既に報告した。輸血直前に余剰のアデニン，イノシン及びヒポキサンチンを除く方法を考察したが，そのためには滲透圧溶血抵抗等の機械的性質が充分よく保たれる必要がある。そのため溶血の機構を明らかにし，赤血球の長期保存にたえる保存液を工夫した。

(Ⅱ) 材料及び方法，ヒト赤血球は日赤血液センターより供給された濃厚血液を用いアデニン及びイノシンは味の素及び協和発酵の製品を用いた。活性炭

はクラレより供給されたハイドロンcoatedのものを用いた。滲透圧溶血抵抗はParpart法，漏紙通過速度は平畑等の方法を若干かえて用いた。ATP，アデニン，イノシン，ヒポキサンチンは高速液体クロマトグラフによった。

(III) 結果，等滲透圧の溶液で赤血球の溶血を観察すると，グリセリンでは直ちに溶血し，グルコーズも数分後にはかなり溶血するが蔗糖，乳糖，マニトール中では溶血しない。しかも滲透圧溶血抵抗は時間とともに極端に増加する。この増加は37℃でも数時間かかり，又細胞容積は減少しNa^+, K^+, $C\ell^-$ は細胞外に溶出した。溶質の細胞膜透過性の差にもとづく細胞容積の減少が滲透圧溶血抵抗の原因と考えられる。しかしこれら不透過性物質の割合が多すぎると漏紙通過速度がおそくなる危険がある。そこで適当な濃度を工夫した。又この濃度でアデニン，イノシンを除くハイドロン活性炭のカラムを通過させた後溶血抵抗及び漏紙通過法を観察して充分よく維持される事が明らかとなった。

(IV) 結論，6週間以上の長期保存血でも機械的抵抗性が強く，且漏過速度の早い保存液が開発された。理論的にも明らかとなった。アデニンとイノシン添加，保存後除去の方法が可能となった。

(B) その後ウサギを用いて輸血後寿命の測定を行い好結果を得た。

新保存液AIS-CPDを用いた人赤血球ウサギ血の保存結果とくにウサギ血の輸血後寿命につき好結果が得られたので報告する。

(I) 方法・材料，家兎は日本白色種（バリアシステム飼育による北山ラペスJW／KBL）の生後4－5ケ月のものを用いた。滲透圧溶血抵抗はDacieの方法に従い，輸血後寿命は^{51}Cr標識血液を採血した家兎に自家輸血して測定した。

(II) 結果，蔗糖添加により赤血球は溶血しにくなりMevも小さく保たれた。保存状態で溶血度は7週間CPD保存液が約10％に対し蔗糖添加では2％前後であった。蔗糖添加アデニン，イノシンCPD保存液（AIS－CPD）中では人血，ウサギ血液共にATP量，2，3 DPG量共に正常に近い値を示した。滲透圧溶血抵抗は蔗糖添加により徐々に抵抗性を増し，アデニン，イノシンの添加はこの傾向を緩和させる作用を示した。ウサギ5週間保存血の輸血後寿命はコントロルは28％に対し80％以上となり5例で統計的にも有意の差を示した。血中生存の赤血球の半寿命は2回の実験共に正常値に等しいところから保存赤血球は新鮮血と等しい生命を保つものと考えられた。

(III) 結論，新保存液AIS－CPDは細胞内メタボリズムの保持液として有望であるという結果を示した。

生体膜研究部門の他，東京医科歯科大学医学部第一生化学教室，東京都立衛生研究所，日本赤十字研究所，クラレ中央研究所，東京大学医学部解剖学教室，東京医科歯科大学中央検査部生化学部，昭和大学歯学部補綴学教室等との共同研究を含む。

生　体　情　報　研　究　系

《神経情報研究部門》

概　　要

本研究部門では網膜における視覚情報の受容・伝達・処理機構について研究を続けているが，本年度は(1)二重反対色型の受容野を持つ新しいタイプの双極細胞を発見し，その応答を分析した，(2) in vivo の標本を開発し，安定した条件下で水平細胞の応答を定量的に解析した,(3) HRP細胞内注入法を用いて記録した水平細胞と視細胞との結合を形態学的に明らかにした。これらの研究によって視覚情報処理基礎過程に対する理解を深めた。

研　究　課　題

コイ網膜双極細胞の二重反対色型受容野

金子　章道

研　究　目　的

視覚情報のうち色覚情報は分光感度の異なった3種類の錐体によって受容され，R(赤)，G(緑)，B(青)の3要素に分解される。しかし各要素は独立した経路によって中枢へ伝達されるのではなく，2つ以上の要素が反対色説な組合せとなって，視神経から送り出されていることが知られている。硬骨魚においては大部分の視神経はdouble opponent型の受容野を持っている。Double opponent型の細胞は高等動物の視覚中枢でもみられ,色の同時対比の発現に関与しているのではないかと考えられている。本研究においてはコイ網膜を用い，この網膜内色覚情報処理機構を究明するため，錐体と神経節細胞との間にあってこれらを連絡している双極細胞につき，各受容野の分光感度の測定を行ない，錐体と双極細胞との連絡に関する考察を行なった。

研　究　方　法

明順応したコイ網膜の双極細胞の受容野は同心円状に配列した拮抗する中心部と周辺部から構成されており，白色光による中心部照射により脱分極性応答を示すON中心型と，過分極性応答を示すOFF中心型に分けられる。これらの双極細胞につき，直径100μmの小光点（中心部），及び内径0.5㎜ 外径3㎜の環状光（周辺部）を用い，種々の単色光に対する刺激強度－応答振幅曲線を求め，同一の応答振幅を得るに必要な光強度の逆数をもってその波長の感度とした。分光感度の測定は0.3Luxの白色背景光の下で行なった。

研究結果及び考察

合計85例の双極細胞（ON中心型68，OFF中心型17）のうち，約21%の細胞はdouble-opponent型の受容野を持っていた。図1はその1例で白色小光点照射に対し過分極性の応答を示すOFF型の細胞である。この細胞は受容野中心部の単色光による照射に対し赤では過分極，青や緑では脱分極性の応答を示した。受容野周辺部では赤で脱分極，青や緑で過分極を中心部とは極性の反転した応答を示した。受容野の分光感度は中心部も周辺部も赤錐体の分光吸収に近かったが，短波長例では緑錐体からの極性の反転した入力によって1 log unit以上も低下していた。赤錐体の分光吸収との間で差スペクトルを求めると緑錐体の分光吸収に近かった。同様な色応答を示す細胞はON型のものにも見られた。これらの結果からこのタイプの細胞はdouble opponentの受容野を持った双極細胞であることが結論される。双極細胞のレベルでDouble opponent型が認められたことは，色受容機構における網膜外網状層シナプスの重要性を示唆するものである。

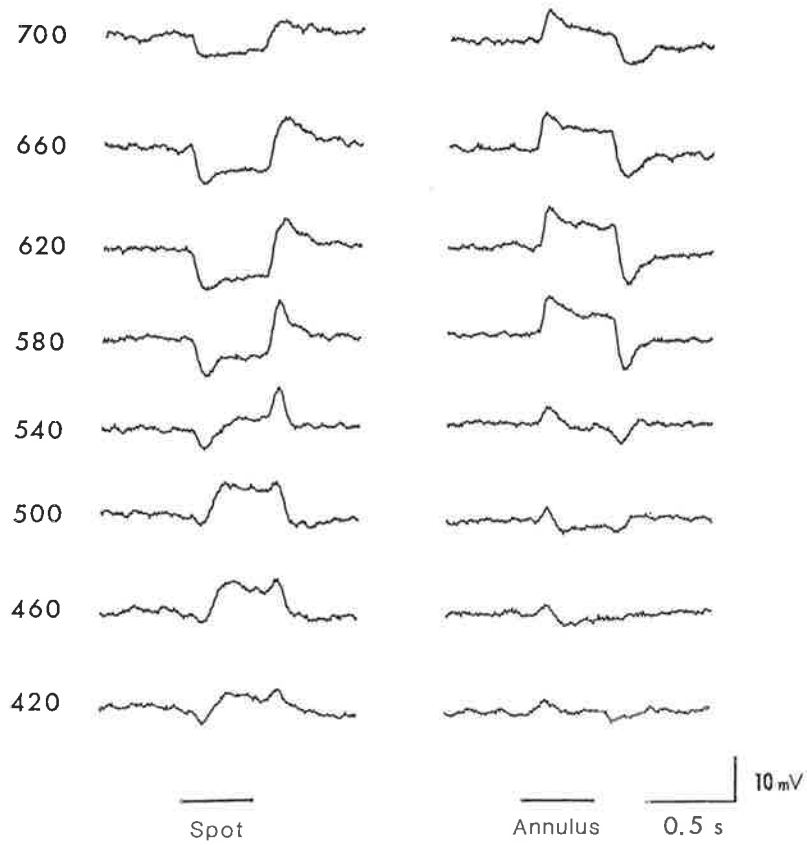


図1. Double opponent型双極細胞の色刺激に対する応答。Spotは直径100μmの小光点，Annulusは内径0.5mm外径3.5mmの環状光刺激。記録最下段の横線は照射時間を示す。

カメ網膜の視細胞と水平細胞の結合

研究課題

大塚　輝彌

研究目的

水平細胞は視細胞から入力を受ける2次ニューロンであり，細胞間の電気シナプスにより樹状突起の拡がりよりもはるかに大きな受容野を有している。水平細胞は双極細胞の周辺受容野の形成に関与していると考えられている。水平細胞には全ての波長の単色光刺激に対して過分極応答を示すL型（luminosity type）と単色光刺激の異なる波長により脱分極或いは過分極を示すC型（chromaticity type）の2種類が知られている。これらの細胞の受容野の形成と色応答の違いは水平細胞に直接入力を送る視細胞の種類・数・分布が大きな要因となっている。

最近Golgi-EM法によって多くの形態学的知見が得られ，水平細胞は樹状突起の先端にある小突起（knob）と呼ばれる構造で視細胞とのシナプスを形成していることが明らかになった。そこで本研究ではHRP細胞内染色により水平細胞の小突起を光学顕微鏡下で観察し，細胞内記録の得られた水平細胞と直接結合している視細胞を形態学的に同定した。

研究方法と結果

5％HRP溶液を詰めたガラス微小電極をクサガメの眼球杯標本に刺入し白色光又は単色光刺激に対する応答から水平細胞のタイプを生理学的に同定した後，電気泳動法によりHRPを細胞内に注入してこれを染色した。網膜を色素上皮より剥離し，DAB，H_2O_2にて発色させた後，水平細胞の小突起を光学顕微鏡下で100倍の油浸レンズを用いて観察した。視細胞の種類は有色油滴の有無・色により判定した。即ち杆体には油滴がなく，赤・緑・青・複合錐体には各々赤色・橙色・無色・黄色の油滴が認められる。

研究対象となった10個の水平細胞はL型が8個（2個は細胞体部H1CB，6個は軸索終末部H1AT），C型が2個あった。

表は10個の水平細胞と結合している視細胞の種類と数を示した。H1CBは杆体との結合がなく，赤・緑・複合錐体との結合が主であり，少数の青錐体にも結合が見られた。一方，H1CBと同じ細胞でありながら，軸索終末H1ATにおいては杆体との結合が見られた。H1ATの錐体との結合は細胞体とほぼ同じであった。L型の応答を示した水平細胞でも，細胞によって結合している錐体の数に違いが見られた。この形態学的な違いから，同じL型水平細胞でも個々の細胞によって分光感度に何らかの差異があるかも知れないと予想される。

個々の細胞によって，その樹状突起の形態や拡がりにばらつきが見られたが，結合している視細胞数は常にほぼ２０～３０個であった。

次に単一の水平細胞に結合している視細胞の空間的な分布を２つの例について示す（図）。細胞体（H1CB）も軸索終末部（H1AT）も約２０～３０μｍの短い樹状突起を出しその末端が小突起を形成して杆体・錐体の軸索終末を結合している（図Ａ）。単一小突起は従来の報告とは異なり杆体と錐体の両者に見られた。図のH1ATは杆体，赤・復合・緑錐体の各視細胞に結合しているが，これらの視細胞の空間的分布には規則的な配列は見られなかった。

２相性の光応答を示すＨ2型細胞はＨ1CＢと同様に杆体の結合が見られず主として赤・青錐体と結合している。従来この種の細胞は主として緑錐体と結合しているものと推定されているが，本研究における例では緑錐体との結合は少数であった。

表のＢに示したH２型細胞と結合している視細胞の空間的分布を図（Ｂ）に示した。Ｈ２型細胞はＨ１型とは対照的に，細胞体から約５０μｍの長い樹状突起を放射状に拡げ，この突起に沿って赤・青・緑錐体の３種の視細胞がまばらに結合していた。これらの水平細胞が存在する網膜部位の視細胞の割合は杆体，赤・緑・青・複合錐体の順に．17，.32，.19，.20であり，図１及び表１の結果は水平細胞と視細胞の結合が選択性を有していることが示されている。

考　　察

これらの観察により，水平細胞は特定の視細胞と結合していることが明らかになった。又，水平細胞はその樹状突起の拡がりの中に存在する全ての視細胞と結合しているのではなく，２０～３０個の視細胞に選択的に結合していることが見出された。

今回観察した視細胞と水平細胞との結合が機能的にどのような結合であるかをさらに電子顕微鏡で精査し，信号伝達の方向も明らかにしなければならない。Ｈ2についてはこれまで一般的に考えられて来た結合とは大きな相違があり，標本の数を増して観察を積み重ねると共に，その微細構造を検討する必要がある。又，それぞれの細胞について生理学的データと形態学的データとの関連を詳細に検討する必要があると思われる。

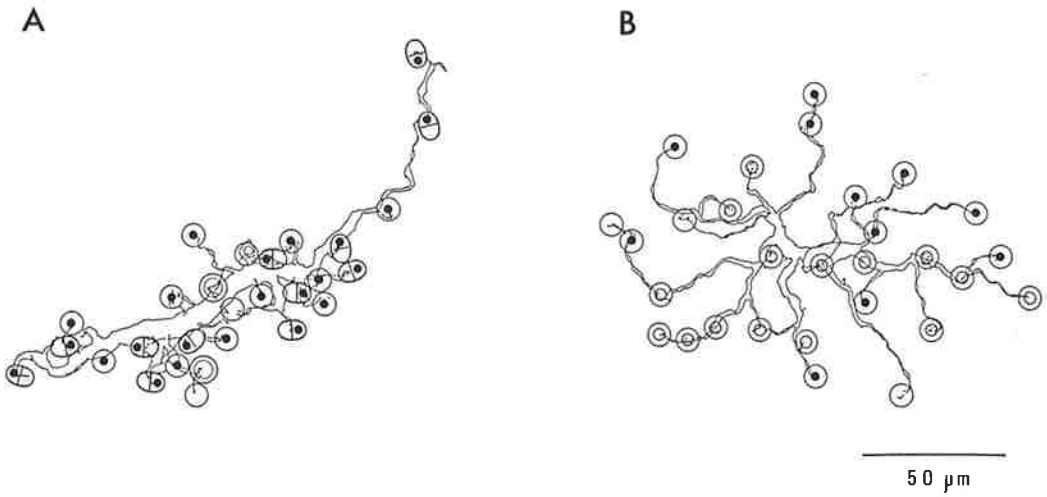
	ROD	CONE				?	total	
		red	green	blue	double			
H1CB	0	7	7	0	6	(3)	20	
	0	11	6	3	11	(2)	31	
H1AT	4	6	6	1	7	(3)	24	
	2	12	2	0	11	(2)	27	A
	4	7	4	3	9	(2)	27	
	5	7	3	3	10	(1)	28	
	5	4	2	3	14	(3)	28	
	5	8	2	2	13	(0)	30	
H2	0	12	3	8	2	(4)	25	
	0	11	3	15	0	(2)	29	B



表：水平細胞と結合している視細胞。

横列は杆体と4種の錐体（赤・緑・青・複合の錐体）及び判定不能の数，結合した視細胞の合計数を表わしている。

欄外のA，Bは図の細胞を表わし，シンボルは各視細胞に対応する。



図：L型水平細胞軸索終末(A)及びC型水平細胞(B)と視細胞との結合。水平細胞の外形と結合している各種の視細胞をシンボルで示してある。各細胞の種類は表の欄外参照。

研究課題　脊椎動物網膜における水平細胞の応答特性

— 暗順応網膜のL型外水平細胞について —

田内　雅規　　楊　雄里　　金子　章道

研究目的　脊椎動物網膜の水平細胞は視細胞から直接入力を受ける第二次ニューロンであり，その出力は視細胞にフィードバックするか，或いは直接双極細胞に結合して，双極細胞の受容野形成に関与すると考えられる。キンギョやコイの網膜には形態学的にも異なる4種の水平細胞が存在し，その内の3種は錐体系から，他の1種は杆体からの入力を受けている。錐体入力を受ける3種の水平細胞は更にL型外水平細胞，C型外水平細胞（2種）に分類され，それぞれ特異的なスペクトル応答を示す。L型外水平細胞は全ての波長の刺激に対して過分極性応答を示すが，C型水平細胞は波長によって応答の極性が異なる。

最近，金子らによりある種の双極細胞は受容野中心部と周辺部が各々色対立性を示すdouble-opponent型の受容野を持つ事が明らかになった。このような双極細胞の受容野構成に当然水平細胞が関与しているものと考えられるので，双極細胞の受容野を理解するためにも水平細胞の応答特性をより定量的に解析する必要があるが，現在のところ水平細胞の応答に関する定量的な記載が乏しい。その理由の一つとして考えられるのは，従来の実験の殆んどが剥離網膜標本について行われてきたものであり，こうした標本では視物質の再生が不完全なため，生体の場合と比較し得るような安定した順応条件下で実験を行うことが極めて困難なことである。我々は今回，in vivoの標本を用いる実験技術を開発し安定した条件下で水平細胞の記録を行った。今回の実験は特にL型外水平細胞への入力を定量的に明らかにする事を目的として行った。

研究方法　体長15〜20cmのキンギョ（Carassius auratus）にgallamine triethiodideを約2mg背側筋内に注射して非動化した後，頭部のみ露出させて水槽中に固定した。実験中，動物は口から濾気した水(約150mℓ/分)を流して人工呼吸を施した。眼球は外眼筋を切除して，眼窩にeye-holderを挿入し固定した後，角膜とレンズを除去した。硝子微小電極を瞳孔から挿入し網膜細胞を硝子体側から記録した。光刺激装置は各々独立な2つのチャネルを持ち，それぞれ光の強度，波長，形状および位置を任意に制御できるものである。尚，本実験で用いた刺激光は全て直径3.2mmのスポット光である。

研究結果

図1にL型外水平細胞の分光感度特性を示す（白丸）。実線は赤錐体の分光感度曲線である。赤錐体は620 nm付近に感度極大を持つのに対して，L型外水平細胞は550～600nmにある。700nm以上の波長の刺激に対しては赤錐体と他の錐体（緑および青錐体）の感度差が極めて大きいので（〉2log unit）これらの単色光に対しては赤錐体のみが応答し得ると考えられる。そこでL型外水平細胞の分光感度曲線を上方にずらし，赤錐体のそれと700nm以上の波長で合わせてみると，2つの感度曲線はこの波長範囲では極めてよく一致している。この事実は，L型外水平細胞では赤錐体からの入力のみならず，青又は，緑に最大感度を持つ視細胞からの入力が加わっていることを示すものである。

一般に分光感度の異なる複数の入力を分離するには，色光を定常背景光として与えて一方の入力をdesensitizeする方法(selective adaptation)を用いるのが常套であるが，我々はそれによって網膜が明順応してしまうのを避けるためこの方法を用いず，替りに波長の異なる2種の光を同時刻に与える方法（混色刺激）を用いた。この方法を用いて入力の同定を行うには次のようにする。即ち，いま水平細胞に対し1種類の視細胞のみが入力していると仮定すれば異なる2つの波長の刺激光をある強度の片方の波長の光に読み換えることが出来るから，その波長の光強度—応答振幅曲線から混色刺激に対する応答の振幅は予測が可能である。また，異なる種の視細胞から独立した入力がある場合には，水平細胞の応答振幅は各々の視細胞が単独に刺激された時の入力の代数和になることが予想される。図2は混色刺激の実験結果を示す。ここでは刺激1として502nm(−2.0log)を，刺激2として760nm(−0.4log)を用い2つを同時刻に与えた。左と中央の記録はそれぞれ502nm，706nmの単独刺激に対する応答である。図右2の記録はこれら2つの刺激を同時に与えた際の応答である。波形1は入力が単一であると仮定し，2つの刺激光と等価な502nmの単色光に対して予想される応答，また3はそれぞれ706nmおよび502nmの刺激によって得えられた応答（図2の左と中央の記録）を算術加算して得られたもので2つの独立した入力を想定した場合の応答である。図に明らかなように，混色実験ではどちらの予測に基づく応答よりも大きな振幅が得られた。他方，502nmとそれ以下の波長の刺激（例400nm）を用いて混色した場合，或いは706nmとそれ以上の波長の光を混色した場合には，単一入力とみなして予想される応答と良く一致した。

以上の結果から次のような結論が得られた。

1. L型外水平細胞は赤錐体とそれ以外の視細胞（恐らく緑錐体）からも入力を受けている。

2. L型水平細胞に対する複数の入力の間には応答の増強を起こすような機構の存在が予想される。

現在，我々はこれら2入力間の増強効果を更に検討し，網膜外網状層におけるニューロンの相互干渉の解析を続行中である。

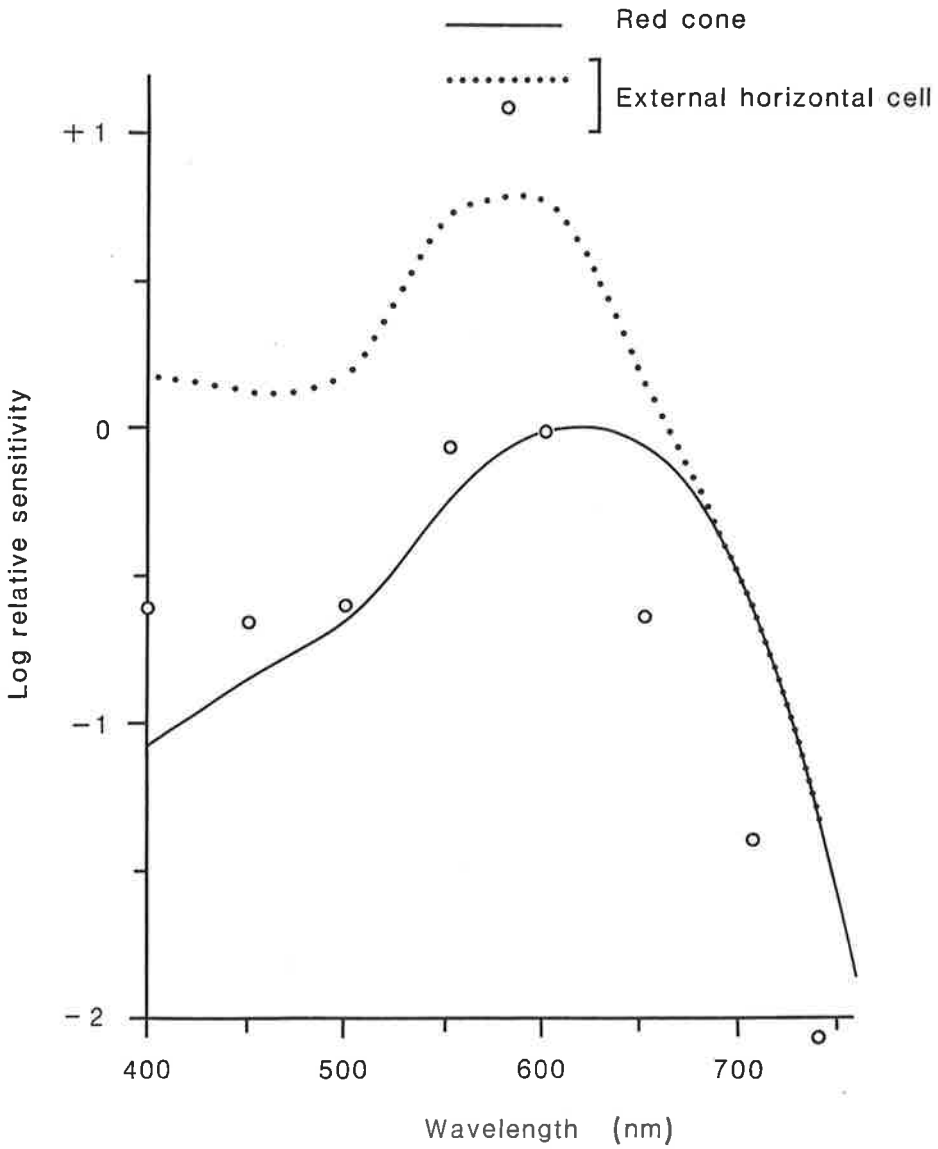


図1：L型外水平細胞の分光感度特性

白丸はL型外水平細胞の分光感度（設定閾値＝10mv）で実線はコイの赤錐体の分光感度である。点線はL型外水平細胞の740nmでの値を赤錐体の同波長での値と重ね合わせた時のL型外水平細胞の分光感度曲線。

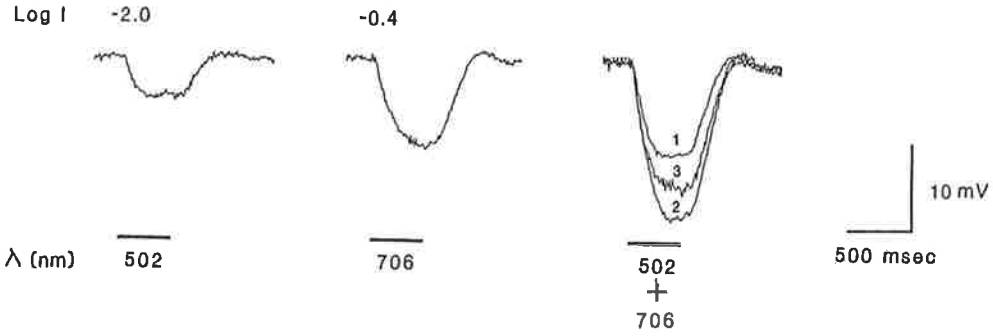


図２：“混色刺激”に対するＬ型外水平細胞の応答

左の記録は５０２ｎｍ(－2.0 ｌｏｇ)の刺激光に対する応答。中央は７０６nm(－0.4 ｌｏｇ)に対するもの。右のトレース１は単一入力を仮定した場合混色刺激と等価の５０２ｎｍの刺激に対する応答，トレース２は混色刺激（５０２ nm，－2.0ｌｏｇ＋７０６nm，－0.4ｌｏｇ)に対する応答，トレース３は左と中央の記録の代数和。

《高次神経機構部門》

概　　要　本研究部門は，感覚器官を通じて大脳・脳幹や小脳に伝わってきた信号を判継・解続し，それに基づく意志決定をする一連のメカニズムの研究をおこなっている。主な研究課題として①中枢神経系における神経回路の研究，②神経回路網の可塑性の研究，③感覚情報の伝達回路の研究をおこなっている。

研究課題　**計算機画像処理システムを用いた赤核細胞樹状突起の計測**

前田　純　　村上富士夫　　塚原　仲晃

概　　要　神経細胞の形態に関するパラメータを量的に抽出し，神経細胞の形態と機能との関係を明らかにしたり，神経細胞の電気活動のシミュレーションを行なうため，計算機画像処理システムを開発し，ネコの中脳赤核細胞のＨＲＰ細胞内染色標本から神経細胞像を抽出した。その後，この像から樹状突起の太さの変化を，細胞体中心からの距離に対する関係として求めた。

研究方法・結果　計測に用いた画像処理システムは，光学顕微鏡に直結したミニ・コンピュータにとり込み，対話型処理で画像内の神経細胞を分離抽出する。抽出された神経細胞像には，ノイズや赤血球などの不要なものが含まれているので，ノイズ除去および画面編集のプログラムで修正を行なう。一つの画面で抽出される領域は，一辺５０μｍ～１００μｍの正方形で，その領域をたて，横それぞれ２５６×２５６の画素に分割している。実際の神経細胞は，細胞体の中心から数百μｍの拡がりがあるため，このような部分画面を，お互いに重なり合うようにして，神経細胞を抽出し，後にそれを合成することにより，神経細胞の全体を精度よく抽出することができた。またこのような，標本の移動を容易にするために，光学顕微鏡のステージ，およびフォーカスを，パルスモーターで制御する３次元ムーヴィングステージを新らたに開発した。ステージの移動量は，ステージに接触させた２個のディジタルマイクロメータでｘ・ｙ方向それぞれを知ることができる。このようにして抽出された神経細胞の例を図１に示す。標本は，エポン包埋された中脳赤核細胞，ＨＲＰ細胞内染色標本で，切片の厚さは１００μｍである。図内に示した正方形が，一枚の部分画面を示し，その大

きさは一辺80μmである。この標本では91枚の部分画面の合成により全体の細胞像を抽出した。細胞体の大きさは短径約60μm，長径110μmで，樹状突起の拡がりは300μm ～ 500μmあった。抽出された神経細胞から，次に樹状突起の太さの計測を行なった。神経細胞の樹状突起のプロセスにおいて，まず樹状突起の中心線を求める。中心線は，2値画像の骨格化のアルゴリズムを用いて求めた。細胞体中心からの距離は，この中心線上の距離で計算し，樹状突起の太さは，中心線からの最短の太さで定義した。図2にその結果の例を示す。このようにして得られた，樹状突起の太さにつき細胞体の中心から300μm以上追跡できた19本の樹状突起（6細胞）について，樹状突起の分岐間の平均距離と各分岐の樹状突起の平均の太さを求めたものが図3である。ここで細胞体の平均半径を40μmとし，第一樹状突起の平均長は79.5μm，第2樹状突起155.3μm，第3樹状突起130.2μm，第4樹状突起106.8μmとなった。

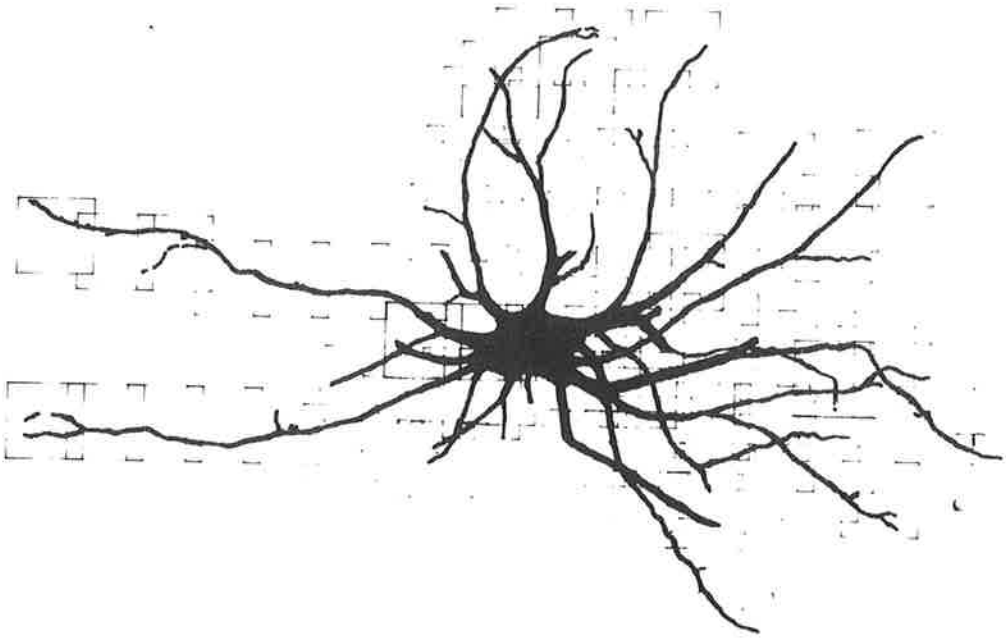


図1　赤核細胞の抽出例。正方形のわくは各部分画面を示し，91枚の部分画面の合成により全体像を抽出したもの。部分画面の一辺は80μm

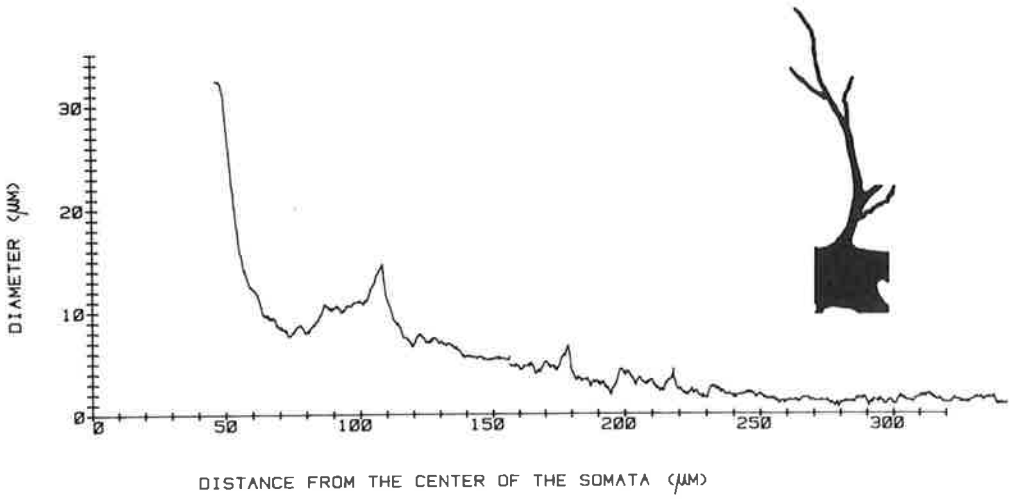


図２　樹状突起の太さの細胞体中心から距離に対する関係。
右図の樹状突起について求めたもの。

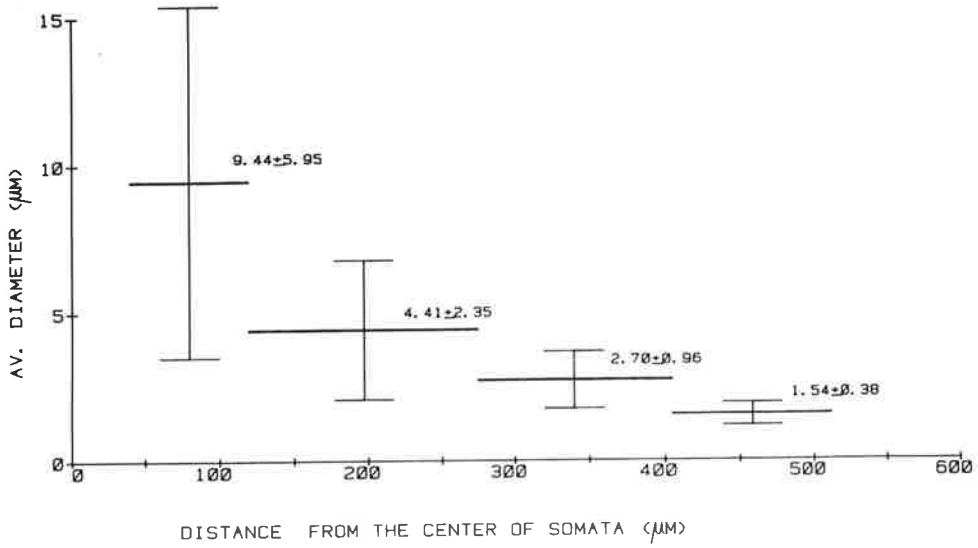


図３　樹状突起の太さの平均。
６細胞の１９本の樹状突起について各分岐間の平均を求めたもの。

考　　察　　我々は画像処理の手法を用いて，神経細胞像を高い精度で抽出することができた。システムの最小分解能 0.2μm は，光学系のもつそれに対して，十分高いものである。このような分解能を有する一方で，画面をつなぎ合わせて行くこ

とにより，神経細胞の樹状突起の拡がりの全体まで抽出できた。各樹状突起は，分岐点を除いて，太さが単調に減少し，その傾向は細胞体中心から２００μｍ以上続く。このような単調減少の傾向は，樹状突起の電気活動のモデルを考える場合に，樹状突起を円筒形で近似するのではなく，より実際の太さを反映した細かなモデルを考える必要性を示唆している。それに対してはこのシステムにより抽出された精度の高い神経細胞の形態に関するパラメータが有用である。

猫の赤核細胞の可塑性シナプスの電子顕微鏡による研究　　**研究課題**

村上富士夫　　勝丸　博信　　塚原　仲晃

研究目的

猫の大細胞性赤核は対側の小脳中位核から単シナプス興奮性入力を受けており，その投射部位は細胞体近傍であることが知られ，電子顕微鏡を用いた研究[2]もこれを支持するものとなっている。一方赤核細胞では，同側の大脳皮質感覚領の刺激によって単シナプス性のＥＰＳＰが発生し，その時間経過が緩慢であり，細胞内通電によって膜電位を変化させた時の振幅の変化がわずかであることなどから，塚原ら[1]はその投射部位が樹状突起末端部でことを示した。

ところで中位核を破壊し，２週間以上経過した猫では，大脳由来のＥＰＳＰの時間経過が早まることを塚原らはさらに見出し[3]，これが大脳から新しいシナプスが赤核細胞細胞体部近傍に形成されたことによることを電気生理学的パラメータの測定及びニューロンモデルによる計算によって示した。

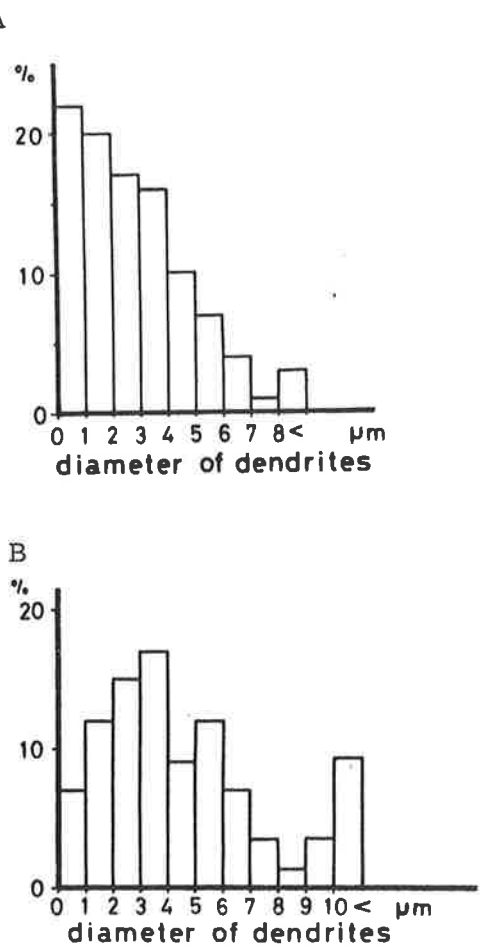
本研究では，この中位核破壊によって新たに起るシナプスの形成を形態学的にも証明することを目的として研究をおこなった。

研究方法

実験には成熟した二群の猫を用い，一群は正常猫，残りの群は片側の中位核を破壊後長期間飼育しておいたものとした。電子顕微鏡像から赤核細胞及びその樹状突起を固定するためにＨＲＰを細胞内注入した，また大脳から赤核へのシナプスは変性法を用いることによって同定した。

研究結果と考察

変性によって固定された大脳から赤核へ投射するシナプスは主に断面の直径の細い樹状突起に見出された，図１Ａは横軸に樹状突起の断面の直径をとり，縦軸に正常猫の赤核で見出された変性のうちでその太さの樹状突起につくものの割合をとってプロットしたものである。この図から明らかなように大部分の変性は直径の細い，即ち遠位樹状突起上に存在する。



次に我々は中位核を破壊した猫での変性を調べたのであるが，これが大脳由来のものなのか，それとも中位核破壊によって生じた変性が残っているものなかを区別する必要がある。そこで中位核のみを破壊した猫を用いて中位核由来の変性の消失時期を調べたところ，約２ケ月がほぼ完全に消失することが明らかになった。

そこで中位核を破壊してから２ケ月以上経過した猫を用いて大脳感覚運動領由来の変性を調べた結果が図１Ｂである。縦軸と横軸は図１Ａと同様である。図からもわかるように正常猫（Ａ）ではあまり見出されなかった直径９μ以上の比較的太い樹状突起や細胞体部にかなりの変性終末が見出され，また分布の中心が太い直径の方へ移動していることが明らかとなった。

以上の結果は最初に述べた電気生理学的研究の結論を支持するものである。即ち正常猫では大脳感覚運動領から赤核細胞へ投射するシナプスの多くは遠位樹状突起上にあるが，中位核を破壊した猫では，より直径の太い樹状突起や細胞体部に新たにシナプスが形成されることを示すものであると考えられる。

図１　説明は本文参照

1) Tsukahara, N., Murakami, F., and Hultborn, H., Electrical Constants of the red nucleus, Exp. Brain Res., 23 (1975) 49-64

2) Nakamura, Y. and Mizuno, N., An electron microscopic study of the interposito-rubral connections in the cat and rabbit, Brain Research, 35 (1971) 283-286

3) Tsukahara, N., Hultborn, H., Murakami, F. and Fujito, Y. Electrophysiological study of formation of new synapses and collateral sprouting in red nucleus neurons after partial denervation. J. Neurophysiol., 38 (1975) 1359-1372

研究課題

視覚中枢におけるシナプスの可塑性の研究

外山　敬介　　東京大学医学部；　小松由紀夫　　名古屋大学医学部；
前田　　純　　坂口　博信　　生理学研究所

研究目的

目でとらえられた外界の映像が視神経を通して大脳に送られて，始めて我々は外界を認識することが出来る。大脳の視覚領には，いろいろな形の図形に特異的に反応する多数の神経細胞があり，これらの細胞によって大脳の視覚領は図形の特徴を分析すると考えられる（Hubel & Wiesel, 1962, 1965）。この視覚領細胞の働きは特徴抽出機能とよばれる。この視覚領細胞の特徴抽出機能が動物の生後発達のある時期（感受性期）に与えられた視覚体験によって大きく変えられることが明らかにされた（Hubel & Wiesel, 1963；1965；Wiesel & Hubel, 1965a, b）。このことは視覚領の神経回路が発達の初期の段階では可塑性を持つことを示すものである。更にその後の研究により，感受性期に与えられた視覚体験に適応した反応性を視覚領細胞が覚得することが示された（Hirsch & Spinelli, 1970；Blakemore & Cooper, 1970）。感受性期には視覚領の神経回路のどこかに可塑的なシナプスがあり，これに基いて視覚領細胞が体験した視覚刺激に対して最もよく反応するように神経回路が形成される（自己組織化）という学習説が掲唱されている（Blakemore & Van Sluyters, 1975）。

これらの研究においては視覚領の可塑性が神経細胞の反応性の変化としてとらえられ，反応性の変化の基礎となるシナプスの可塑性は解明されていない。本研究は視覚領における特徴抽出機能の神経回路の自己組織化の基礎となるシナプス可塑性の神経機構の解明を企てるものであるが，これを次の3段階に分けて行う。1）先ず可塑性シナプスの基本機構を調べ，2）これによって得られた知見に基いて神経回路の自己組織化の原理を明らかにする。3）これらの分析的手法によって得られた知見に基いて視覚領の神経回路モデルを構成し，視覚領の働きとモデルの働きを比較，検討し，モデルの当否を明らかにする。1）および2）の研究によりシナプスの可塑的変化を規定する因子が明らかになり，これによって生じる神経回路の変化（自己組織化）が学習として有用か否かの解答が得られるものと期待される。更に3）の研究により視覚領の神経回路の構成の原理が明らかになると期待される。

方　　法　幼若ネコ（生後約４週）より視覚中枢の脳切片（厚さ 0.3 － 0.5 ㎜）を切り出し，これを酸素と炭酸ガス（O_2：CO_2＝95：5）の混合ガスで飽和したクレーブス・リンゲル氏液に入れ灌流する。灌流開始後約１時間で脳切片標本の神経細胞は正常な働きを回復する。この後，脳切片標本を記録用チェンバーに入れ，33°C に保ち，酸素と炭酸ガス飽和したリンゲル氏液で灌流する。

脳切片標本の白質に条件刺激（Ｓｃ）とテスト刺激（Ｓｔ）の電極を置き，皮質に微小電極を置いてＳｔによってひき起される誘発電位を記録した。

研究経過　本年度はこの一連の研究の第一段階としてネコの大脳視覚中枢（１７野）の脳切片標本を用いて（Yamamoto & Mclwain, 1969），シナプス可塑性の基本的な神経機構を明らかにすることを試み，脳切片標本においても視覚領細胞のシナプスの可塑的変化が起ることを証明した。またシナプスの可塑的変化をシナプス電流という最も直接的な形でとらえることに始めて成功した（Komatsu, Toyama, Maeda & Sakaguchi, 1981）。

ⅰ）皮質電位の可塑的変化

Ｓｃによって白質に含まれる視覚求心線維に条件刺激（２Hz，1時間）を加えると，刺激後約３０分後からＳｔによってひき起される皮質の誘発電位の振幅が（２－６倍に）増大し，この皮質電位の増強はその後１５時間にわたり持続する。この皮質電位の増強は生後約４週のネコの脳切片標本で高率し約８０％）に起り，その前後の週令のネコの標本ではその発現率が著しく低下する。したがってこの皮質電位の増強の発現する時期はHubel & Wiesel らによって証明された反応性の可塑性のそれと一致する。

ⅱ）可塑性シナプスの局在

この皮質電位の増強の基礎となる可塑性シナプスの局在を電流源密度解析法（current source-density analysis, Nicolson & Freeman, 1975）を用いて調べた。Ｓｃより条件刺激を与える前に，先ず微小電極によりＳｔによってひき起される皮質電位を皮質表面より１００μ毎に記録した。この皮質の表面からの深さの関数として記録された皮質電位の深さについての一次微分は電位の勾配を示し，２次微分，電流源密度を表す。この電流源密度解析によって，白質の視覚求心線維を刺激してひき起される皮質電位の電流源がⅡ・Ⅲ層とⅣ層に局在することが明らかになった。視覚領域内に神経細胞が比較的均一に分布することを考慮すると，皮質電流の分布は細

胞の活動電流よりはむしろシナプス電流の分布を表すものと考えられる。

白質刺激後質電流はⅣ層において最も早く起こり（潜時約1.4ミリ秒），Ⅱ Ⅲ層ではこれより0.6ミリ秒以上遅れて起る。この潜時からⅣ層の早い皮質電流は視覚求心線維と皮質細胞に単シナプス性に生じた興奮性シナプス電流，Ⅱ，Ⅲ層とⅤ層の遅い皮質電流はⅣ層の皮質細胞からⅡ，Ⅲ層の皮質細胞からⅡ，Ⅲの皮質細胞の間のシナプスに生じた複，または多シナプス性の興奮性シナプス電流を表すものと思われる。

条件刺激後8時間で同様の電流源密度解析を行った結果，Ⅳ層の皮質電流の約3倍，Ⅱ，Ⅲ層の皮質電流が6－8倍に増強していることが明らかとなった。

考　　察

これらの実験結果から条件刺激によってⅣ層で視覚求心線維と視覚領細胞との間のシナプスとⅡ，Ⅲ層において視覚領細胞間のシナプスで伝達の増強から起ったものと考えられる。このようなシナプスの可塑性変化が大脳という最高中枢から得られる最も単純な実験標本において証明されたことはシナプスの可塑性の基礎的な研究の道を開くものとして大きな意義を持つものと思われる。

《液性情報研究部門》

研究目的

シナプス結合を介しての生体機能調節が適切に行われるためには，適切な細胞の組み合せ，伝達物質と受容タンパク質の適合，シナプスの数および位置の適当な配分，電気シナプスではシグナル物質とコネクソンの適合など多くの要件が満たされていなければならない。吾々の研究室ではこのような要件の形態学的な基盤およびその成り立ちのしくみの一端を解明する目的で研究を進めている。

研究方法

a) Golgi染色法，あるいはＨＲＰ法によって標識された細胞について超薄連続切片からの立体再構築，および超高圧電顕立体観察を併用して細胞間結合の立体的な解明をはかると共に，シナプスの種類，数およびその位置分布の解析を行う。

b) 免疫抗体標識法を用い，出来うれば夫々のニューロン系に特有な物質を見出し神経回路網形成のしくみの解明をはかり度い。

c) 特に化学シナプスと電気シナプスの混在する混合シナプスについて実験条件下での両者の対応を細胞計測学的に検討しその機能分担を解明する。

本研究部は発足後日が浅く，目下研究室のセットアップ中なのでまだ研究成果を報告する段階に達していないので活動状況の報告は行えない。

生 体 調 節 研 究 系

《高次神経調節研究部門》

研 究 目 的

生体調節系は高次神経調節部門，高次液性調節部門，生体システム工学部門（未設置）の三部門からなり立っていて，各部門は互いに連係を保ちつゝ生体における諸種の調節機構を，動的かつ，定量的に理解する方向の研究をすゝめている。

高次神経調節部門では，脳より心臓に対する自律神経が最も密に分布している洞房結節と房室結節とを対象として研究を行ない，生体における心臓による調節の諸機構を明らかにする。

研 究 方 法

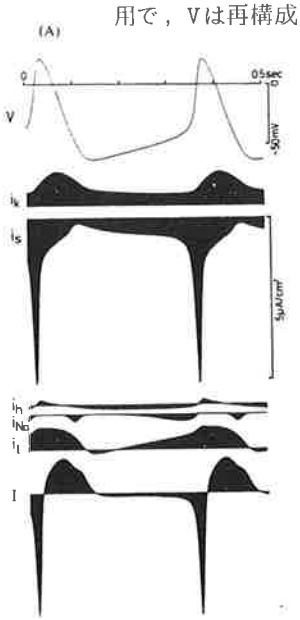
Noma and Irisawa（1976）により開発された，微小洞房結節標本とNoma et al,（1980）にはじめて創られた　微小房室結節標本を用いた。今年度は，コラゲナーゼ処理による単一心筋細胞の研究（Taniguchi et al.,）細胞内注入法の開発（Trautwein, Noma & Taniguchi），細胞内灌流法の開発（Kokubun）により従来の多細胞系における心筋生理学より，単一細胞系における生理学的な興味に発展した。

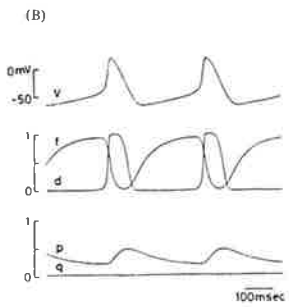
研 究 結 果

1）前年度に印刷中として報告した報文はすべて印刷された。すなわち，洞房結節における過分極電位に活性化する電流系（ih）については，Pflüger's Archiv 385, 11-19（1980）に報告され，洞房結節におけるカリウム電流の関与については Pflüger's Archiv 388, 255-260(1980)に報告された。この２つの実験から，ペースメーカー機転は従来から考えられてきたカリウム電流の関与のみでなく，遅い電流系の活性がかなり重要であることが示唆された。このことは，洞房結節細胞におけるアドレナリンの作用機転についても立証された。アドレナリンは洞結節細胞の遅い内向き流を増加せしめると共に，ik，ih等の各電流系を増加させる。これらの電流系のKinetics には変化を与えづに，各電流系の最大イオンコンダクタンスを増加させている。この中でも遅い電流系の増加は極めて有意義で，ペースメーカー電位の後２／３はこの電流系の増加にもとづくことをあきらかにした。この報告は，Pflüger's Archiv 388, 1-9,（1980）に報告された。

以上の洞房結節細胞のイオン流の測定から，遅い電流系（is）のペースメー

カー電位への関与は極めて大きなものとなったが，実際ｉｓの測定は極めて困難で目下の実験方法では限界があった。そこで，現在の方法で出来うる最良のデーターを採集し，ｉｓの閾値，ｉｓの活性化係数（ｄ∞） ｉｓ の不活性化係数（ｆ∞），ｄ及びｆの時間関係，等を電圧固定法より求めた。その結果，実験では－30 乃至－20ｍｖに大きなＷＩＮＤＯＷ ＣＵＲＲＥＮＴ をもつことがわかったが，この成績を利用してｉｓを再構築すると定常状態における電流電圧曲線は実験値と一致しないことが判明した（日本生理学会，徳島 1981 にて発表)。測定したパラメーターを電位と時間とを変数とする微分方程式に組み込み，心臓ペースメーカーの繰り返し興奮をコンピューターで再現することは，実験と理論との差を知るうえに極めて大切であり，さらに，歩調取り部における種々のイオン機構を理解するうえにも心須であった。Ｈｏｄｇｋｉｎ－Ｈｕｘｌｅｙ方程式をといた結果，各イオン流の全電流における分割があきらかとなった。これは実験にもとづいて歩調取り電位の再構成をこころみた始めての報告となった。（Ｊｐｎ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．３０，８４１－８５７，１９８０)。図はこの報告よりの引用で，Ｖは再構成した活動電位ｉｋはカリウム電流，ｉｓは遅い内向き電流ｉｈは過分極側で活性化する電流，ｉＮａはナトリウム電流，ｉℓは背景電流である。Ｉは全電流であり，初期の下向きのふれは最大立上り速度を示している。最大立上り部の大部分がｉｓによっていることを示している。活動電位はピークに達したのち，ｉｓの不活性化およびｉＫの活性により，最大拡張期電位をむかえる。この時点で外向きの背景電流は内向きにかわり，同時にｉＫが徐々に減少するとともにｉｓの増加がおこる。ｉｈ，ｉＮａの関与はきわめてすくないが，電流系の総和は内向きとなるので，膜は徐々に脱分極すると説明できる。図Ｂは，各々のカイネテック変数を示している。Ｖは再構成後の活動電位，ｆ，ｄ，は遅い内向き流の各々不活性及び活性変数，Ｐはカリウム電流の活性変数，ｑはｉｈのそれである。すなわち，この模型では歩調取り電位は遅い内向きの流の不活性からの回復が極めて大きな因子となっていることを示している。





2）前年度に引きつづき房室結節の電流系について研究が行われた。先づ，房室結節細胞が従来考えられていたような不活性な細胞ではなく，個々の細胞は静止電位－４０ｍｖ，最大拡張期電位－７０ｍｖ，逆転電位＋２０ｍｖ立上り速度１０Ｖ／ｓｅｃを示す活動電位であり，自発性興奮を示すものであることを明らかにした。また従来その存在について議論が多かったｉＮａについても膜を過分極することにより必らず起こり，脱分極時に不活性化されていることを示した（Ｊｐｎ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．３０　５２９－５４０，１９８０）。また房室結節細胞の電圧固定実験についても報告され，洞房結節細胞ときわめてよく類似したものであることが明らかとなった（Ｎａｔｕｒｅ　２８５，２２８－２２９，１９８０．ＫＯ－ＫＵＢＵＮら，１９８１印刷中）

房室結節細胞を用いてイオン・ポンプの研究が開始された。既に洞房結節ではポンプが発見されているが，房室結節細胞のｉｓをブロックした標本はこの問題の解決に適していることが指摘された。（日本生理学会発表１９８１）。Ｋ欠乏Ｔｙｒｏｄｅ液を灌流後種々濃度のＫ－Ｔｙｒｏｄｅ液を再灌流するときにみられる膜の過分極現象を指標としてＫイオンをＴｌ　Ｒｂ．Ｃｓ．NH_4．Ｒｉ等におきかえた所，大体この順序にＮａ－Ｋポンプの活性が弱ったことをあきらかにした。さらに，Ｎａ－Ｃａ交換機転についても報告した。

3）本年度は新らしい計画として単一細胞の分離実験が行われた。多細胞標本は細胞間の結合，細胞間隙のクレフトの存在，等のために膜電流の測定にも限界があり，単一細胞標本の作成が望まれていた。胎生心筋細胞においては，単一細胞標本がえられているが，胎生心筋細胞は多くの点でａｄｕｌｔ細胞とことなっている。ＶＡＨＯＵＮＹら（１９７０）は成筋における単一細胞の作成に成功し，その後Ｌｅｅら（１９７９）はこの方法により心室筋細胞を分離して，はじめてｉＮａの分折をこころみた。しかし，心室細胞の特長であるプラトー相はこの方法ではみられなかった。ＩＳＥＮＢＥＲＧの方法では，プラトー相の存在する細胞を牛の心室筋からえられるので，この方法を利用して各部心筋の単一細胞を得ることにした。（谷口ら，Ｊｐｎ．Ｊ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．１９８１　ｉｎ　ｐｒｅｓｓ）。その結果，始めて洞房結節，房室結節等より単一細胞を分離しえ，これから多細胞標本でえられた波形と全く同様な波形をもつ活動電位波形を得ることが出来た。また，洞房結節細胞等は３－１０個の細胞集団として遊離されることが多く，細胞集団は一層であり，同期した興奮を示した。この標本は活動電位のみでなく，アセチルコリンやアドレナリン等の受容器も生体内にある場合と同

様に無傷で残こることが特長であった。

単一心筋細胞を心室筋から作成し，吸引電極を使用して活動電位を記録し，細胞内の灌流をこころみた。細胞内灌流液にEGTAを加えると，活動電位と収縮とは分離を示し，活動電位の持続は延長した。TEAの細胞内灌流によっても活動電位持続の延長をみたが，その波形はEGTAの場合とことなっていた。EGTA灌流下での膜電流系はiNaとisとが主でikはほとんど認められなかった。従ってプラトー相は，殆んどisによることが判った。電流，電圧曲線には心室筋特有の負のスロープを示す性質が，殆んど全例にみとめられている（国分，1981）。

西ドイツよりTRAUTWEIN教授が来所し，共同研究をこころみた。単一心筋又は房室結節のクラスター標本を用い，細胞内にCAMP，CGMP等の注入をこころみた。前者はアドレナリンの効果を類似したのに対し，後者の効果はアセチルコリン効果に類似するとは考えられなかった。即ち後者の注入は始めプラトー相の抑制をきたし次いでプラトー相の促進がみられ，はじめの抑制は，CAMP自身の効果であり，これにつづく促進効果は非選択性効果であると考えられた（TRAUTWEIN，NOMA AND TANIGUCHI 1981）また，NOMA KOKUBUN AND TANIGUCHI（1981）はアセチルコリン過分極の潜時が従来の多細胞標本では100msecと長かったが単一細胞やクラスター標本では潜時は短かく拡散とAch-induced K電流とによって，短かい潜時の説明が可能となった。その他，Naイオンの細胞内注入によってNa-Kポンプの誘発も可能となった（倉智，日本生理学会1981）。このように，単一細胞作成の成功は種々の新らしい知見を産み出しているので，これらのプロジェクトは次年度に継続し，活気ある研究が期待できる分野となった。

考　　察　洞房結節にはじまる歩調取り機転の研究は，その再構成が出来上ったことにより，更によい展望がえられることになった。これらの研究により，房室結節のイオン流についてより適格な理解がえられるようになった。本年度における大きな進歩は，谷口ら（1981）による単一細胞分離の実験であり，この方法が確立したことによって，細胞表面におけるアセチルコリン受容器の分布があきらかとなった。さらに次の進歩は，従来，多細胞標本では不充分であった活性物質の細胞内注入が可能になったことである。この方法により従来は巨大細胞以外は行われなかった細胞内注入の効果を心筋細胞を用いてみることができた。さらに，正常の活動電位波形をもつ細胞への細胞内灌流法の利用により，

細胞内注入法を一層発展させることが可能となった。これらの新しい方法により，次年度はより定量的な成績が得られることを期待している。

《高次液性調節研究部門》

研究目的

本部門は，生体の恒常性維持とくに体液性の生体機能の維持機構を高次中枢レベルで解明する部門として発足した。生体内ではホルモン分泌や自律神経系の作用によって，内臓諸器官をはじめ生体にとって基本的な生命維持機構がコントロールされている。ホルモン系の分泌，自律神経系の活動，さらに体液成分の調節は，血中代謝産物や各種ホルモンなどの濃度変化や内臓の各種状態を感知する内在性情報処理機関が行う。この中枢神経系の一つが視床下部を中心とする辺縁系である。

視床下部には体液成分に対して感受性をもつ化学受容ニューロン群が存在する。すなわち性ホルモンやインスリン等の各種ホルモンや，ブドウ糖，遊離脂肪酸などの代謝産物の濃度をモニターしている。このような内界情報以外にここには網様体あるいは辺縁系を介して外界情報も入力してくる。この視床下部で処理された情報はより高次の神経機構である大脳皮質連合野に送られる。これにより生体の恒常性維持機能はより合目的的に適切に働くであろう。こうして生体にとって内外界の情況に応じた適切な生体行動の表出となる。すなわち摂食・飲水行動，性行動，体温調節行動等であり，これらが高次液性調節研究部門の重要な研究課題となっている。

本部門では中枢の生体恒常性維持機構を研究する上で内界情報が最も反映され，行動表出が最も明確である「食欲」と「摂食行動」を対象に選び，視床下部を中心とした「摂食」に関与する神経回路網とそのニューロンの活動特性の解析を主テーマとして研究に取り組んでいる。

これまでのところ，視床下部内の神経回路やニューロン特性，視床下部とその他の中枢部位との機能的連絡が明らかになってきている。それらの結果に基づき，５５年度の研究活動としては，視床下部とも直接連絡路をもつ大脳皮質前頭前野における摂食行動発現の神経機構をテーマとした。すなわち空腹感から摂食行動に移行する神経機構が前頭前野で発動されるのではないかという想定である。そしてその部位の行動とカップルしたニューロン群がどのような体液性調節やシナプス調節を受けているのかという解析である。

前頭前野が摂食行動に重要な役割を果していることを示す報告はいくつかある。サルの前頭眼窩野の破壊で摂食抑制が起こり，前頭前野背外側領域の破壊

では食べ慣れた食物の方を新たな食物より強く好むようになる。また前頭前野の破壊でレバー押し摂食行動が亢進し，肥満が起こる場合もある。ラットでも類似の結果が報告されている。また手がかり刺激を正確に認識できなくなり，非手がかり刺激にも反応行動を起こしたりする。

一般的にこの領域は空間記憶，感覚統合，注意，反応の抑制性制御等に関与していることが破壊による行動実験や単一ニューロン活動の研究により明らかにされてきている。摂食行動に対する前頭前野背外側領域の役割を，この一般的機能から類推すると 1) 内界情報の認知（空腹感の発動），2）意味ある外界刺激の統合的認識（食物の手がかり認識），3）誘因となる外界刺激により起こる動因行動（摂食行動）の適切な方向づけ，4）外界情況の変化に対する反応修正（再意味づけ，適応）が考えられる。破壊による摂食行動の変化はこの四つの機能の欠落により説明できる。

一方これらの機能が伝達物質などに影響を受けている。脳幹や前脳基底部からノルアドレナリン（ＮＡ）系，ドーパミン（ＤＡ）系，アセチルコリン（ＡＣｈ）系の神経経路が大脳皮質に広範囲に投射していることが最近のオートラジオグラフィー，組織化学，ＨＲＰ法等を用いた研究で明らかになってきた。また行動実験では，ＮＡが適正反応－固執傾向，ＡＣｈが覚醒－睡眠，ＤＡが空間記憶に関与することが示唆されている。しかしこれらの皮質下から，広範囲に広がる求心性の伝達物質が行動下で実際に活動しているニューロンにどのように作用しているかは明らかでない。また摂食行動における前頭前野の役割が単一ニューロンレベルで調べられた報告も少ない。

そこで我々は，光刺激で高Ｆｉｘｅｄ ｒａｔｉｏ（ＦＲ）のレバー押し行動をひきおこし，音刺激でレバー押し行動をやめて報酬としての食物が獲得できる課題をサルに学習させ，そのオペラント摂食行動中の前頭前野単一ニューロン活動を記録した。課題の条件をいろいろ変化させてニューロン活動を調べることにより摂食行動における前頭前野のニューロンレベルの機能を解析した。さらにニューロンの活動パターンの同定後，ＮＡ，ＤＡ，ＡＣｈや神経調節物質として最近注目されているモルフィン（Ｍ）を微量投与しその作動特性を調べた。

研究方法

(1) 実験動物ならびに行動課題

実験動物としては前頭葉の分化がすすんでいるサルを用いた。4－6 *kg* の雄のアカゲザル2頭の3半球を用い，実験前18時間絶食状態にした。毎日4～6時間の実験を数週～数か月行った。サルをモンキーチェアに置き，頭部を固定

した。サルの前面２０cmに，手がかり刺激として食物用の赤ランプ，水用の緑ランプ，非手がかり刺激として同型の赤ランプ，ならびにレバーを備えたパネルを置いた。個々のサルに一定のＦＲ（２０ないし３０）を設定し，それで訓練を続けた。手がかりランプがついた時だけレバー押しが有効であるようにした。サルは赤の手がかりラスプがつくとただちにレバー押しを開始する。設定したＦＲのレバー押し後手がかり音が聞こえサルはレバー押しを止める。約１秒後１片の食物（パン，ダイズ，干ブドウ，イモ）がパネル下方の報酬箱にでて，サルは手を伸ばしてそれを取って食べる。報酬呈示とともにランプは消える。咀嚼摂食終了後不定期の非試行期を置き，再び手がかり赤ランプをつけ課題を続行させる。

(2) 手　　術

ネンブタール（35mg/kg）麻酔下で無菌的に微小電極固定装置ならびに頭部固定用の金具を埋え込んだ。金属電極用には直径 2.1 cmの金属シリンダーを用い，Evartsの方法で記録できるようにした。頭蓋にA,25とL,18を中心とした直径 2cmの穴をあけ，シリンダーを垂直ないし頭蓋に直角に置き，歯科用セメントで固定した。硬膜は傷つけずに残した。多連微小電極用には金属プレート（５×７×１cm）を用いた。頭蓋に歯科用セメントで固定した金属プレートを脳定位固定装置にとりつけた左右２本ずつのイヤバーではさみ，脳定位的に実験を行った。多連微小電極法の場合前頭部は頭蓋を露出させるだけで記録前日に小穴をあけるようにした。

同時に刺激用同心双極電極を外側視床下野（LHA）（A,11.0ならびに12.0，L 2.2，H 2.0）と扁桃体の皮質内側核（ACM）（A,14.0；L,6.0，H,1.0）と基底外側核（ABL）（A,13.5；L,7.8，L,－1.0）に埋めこんだ。

術後抗生物質を投与し感染を防いだ。

(3) 記　　録

術後１週間して細胞外単一ニューロン活動の記録を開始した。記録電極はガラスコーティングエルジロイ電極（2－7MΩ）を用い，硬膜を通して油圧マイクロマニプレータで刺入した。前置増幅器，主増幅器を介して得た単一ニューロン活動はブラウン管オシロスコープで観察すると同時にウインドディスクリミネーターでパルス変換し，さらにパルスカウンターでパルス数／秒に変換した。インパルス課題遂行中の手がかり刺激，レバー押し，報酬の信号ならびに電気眼位図，電場電位を脳波計ならびに９チャンネルのデータレコーダに記録した。

ユニット同定後，数回の試行を行いニューロンの活動パターンを判定した。判定後パターンにより手がかり刺激の単独呈示，消去，報酬呈示の遅延，報酬内容の変更および非手がかり刺激の呈示等を行いニューロン活動を調べた。長期記録が可能の場合，1日量の食物を食べさせ課題遂行中のニューロン活動の変化および自発発火頻度の変化を調べた。

ニューロン活動記録後，刺激電極に電気刺激装置からアイソレータを介し，中心のエナメル線を負とした矩形波電流を与え刺激とした（0.05～1mA，0.03～0.1msecの持続，0.3～500Hzで1発～3発）。記録ニューロン部位の電場電位の加算または刺激前後のインパルスの加算により刺激効果を判定した。

(4) 薬 物 投 与

活動パターンの判定後あるいは判定前に多連微小電極を用いて薬物感受性を調べた。電極は7連微小電極に電解研磨したタングステンを微小ガラス管に挿入したもの（2～5MΩ）を先端約15μ突出させて接着したものを用いた。用いた薬物はNA（0.5M），DA（0.5M），ACh（1M），アトロピン（0.5M），M（10mM），フェノキシベンザミン（0.1M），グルタミン酸（Glu）（0.5M）である。前頭前野背外側領域の頭蓋に2㎜程の穴をあけ硬膜を注射針で切断し脳実質を露出してから電極を刺入した。刺入にはパルスモータ駆動マイクロマニプレータを用いた。7連電極の先端からの放出薬物が記録しているニューロンに十分作用することを確かめるため非特異的興奮作用を持つGluを投与し，作用がすみやかに表われることを確認した。課題試行，薬物投与，薬物投与下の課題試行に対するニューロン活動の変化は自発放電のみられるユニットで調べたが，Gluを同時投与して発射頻度を上昇させて調べたものもある。

(5) データ解析

ニューロン活動はオンライン処理またはデータレコーダからの再生でシグナルプロセッサで解析した。1) 手がかり光刺激，2) 最初のレバー押し，3) 手がかり音刺激の各時点をトリガー点にして前後数秒～10数秒間の反応をbin10～90 msecごとのインパルス数の加算ヒストグラムで表わした。摂食行動系列を1）手がかり光刺激：求餌行動の開始，2）高FRレバー押し：求餌行動，3）手がかり音刺激：求餌行動の停止ならびに報酬獲得の予期，4）報酬呈示ならびにその取得と摂食，に分類しこの4事象におけるニユーロン活動を光刺激呈示前の対照期と比較した。パターンの判定は数回の試行中，ユニットが安定して記録できたものでインパルスヒストグラムと，各試行における活動変化の恒常性（60%以上）で決定した。

薬物反応性は1秒ごとのインパルス数をペンレコーダに記録し，電流効果が否定され，再現性のみられたもので判定した。

(6) 組織学的検索

1㎜ごとの前額面に1個の割合で特徴的な活動を示すニューロンが記録できた際に，エルジロイ電極先端に陽電流を通電し（20μA，30秒）鉄沈着をつくった。実験完了後，ネンブタールを大量投与し，左心室から2%黄血塩を含む10%ホルマリン液で灌流し脳を固定した。凍結切片法により50μmないし100μmの切片にし，ニッスル染色を行った。鉄沈着をつくった点が緑色に染色されており，これらの点を指標に記録部位を同定した。

結　　果

I　ニューロン活動

総計256個のニューロンの活動パターンを判定した。64%のニューロンが摂食試行の4事象のうち1個以上の事象で活動性の変化を示した。手がかり光刺激に対して活動変化を示すものが30%，レバー押し期間に活動変化するもの18%，手がかり音刺激に際して活動が変化するもの25%，報酬期に変化するものが16%であり，相互に重複がみられた。2事象以上に活動変化を起こす複合型は約半数であった。

1. 手がかり刺激

1－1　手がかり光刺激

手がかり光刺激呈示期に活動変化するニューロンには，手がかり光刺激にだけ特異的に応じるものと，それ以外の視覚刺激に対しても非特異的に反応するものとがある。前者はレバー押しができないようにした手がかり光刺激の単独呈示や課題消去の過程で手がかり用の赤ランプに対する反応性が減弱あるいは消失する。レバー押しを再び可能にして報酬を出すようにするとニューロンの反応性がただちに回復する。後者では非手がかり赤ランプや報酬を呈示しサルがそれを見た時などに対して活動性変化を示す。

手がかり光刺激の事象にだけ活動変化を示す単独型が30%，それ以外の事象でも変化をおこす複合型が70%である。単独型と複合型のうち報酬視覚刺激等視覚性の事象に対してだけ活動が変化するいわば視覚型ニューロンは8野外側部に多く存在した。このうち非特異的な視覚刺激に対し反応するニューロンは視覚刺激に際しておこる眼球運動で興奮する場合が多く，このようなニューロンは扁桃核刺激で逆行性に応答した。

1－2　手がかり音刺激

単独型と複合型はやはり３：７の比であった。多くのニューロンがレバー押し後の音刺激の場合にだけ活動変化を示し，単独音刺激では反応性がみられなかった。

８野内側部では，手がかり音刺激一単独型の占める割合が他部位に比べ有意に大きかった。

手がかり音刺激に比較的持続性の反応をするニューロンの中で，報酬呈示を遅延すると反応が報酬の出るまで延長し持続するものが存在した。

１－３　手がかり光・音刺激

上述のニューロンの中に，手がかり光刺激と手がかり音刺激の両者にだけ応ずるものが存在した。反応の大きさ，方向がほぼ同等のこのようなニューロンは主溝底部に有意に多く存在した。

手がかり刺激に対する活動変化は上昇性ののものが多く（７５％），持続は２００ミリ秒から２秒以上のものまである。

2.　レバー押し

レバー押し行動中活動変化をするニューロンのうち単独型は５６％，複合型は４４％であった。単独型のうち活動上昇のものと低下のものとほぼ半数であった。複合型では多くが活動低下のものであり（７：３）手がかり刺激で活動上昇するものが多い。活動低下型は局在性ははっきりしないが，活動上昇性のニューロンは主溝外側部～下膨隆部に局在する傾向にあった。

レバー押し期間は１０～１０数秒続くが，レバー押し前半の方が活動変化の著しいタイプ，その逆の後半に変化を示すタイプ，全期間一定の活動変化を示す場合と種々のパターンが存在した。

全体の２％に最初のレバー押しの前後にだけ特異的に活動上昇を示すニューロンがあった。これは，光刺激に同期したヒストグラムと第１回目のレバー押しに同期したヒストグラムを比較し，どちらかより顕著な活動変化を示すかで判定したが判定困難な場合もあった。同等の変化の場合，便宜的に光刺激に反応したものとした。

3.　報　　酬

報酬期の活動変化については２種類のニューロンに分類できた。報酬を見た時に活動変化するもの２７個，食べる時に活動変化を示すもの１５個存在した。報酬の視覚的認知に際し活動変化を示すものには複合型が多いのに対し，摂食中に活動変化を示すものは単独型が多かった。共に活動上昇を示すのが一般的であった。

報酬を見た時に反応するニューロンには呈示した報酬の種類によって反応性の異なるものが存在した。

ニューロン活動の長期記録が可能の場合，満腹（１日量の摂食）後の活動性の変化を調べた。自発発火頻度は上昇するもの変化しないもの低下するものの3型ともみられた。１日量摂食後，報酬時の活動変化がみられなくなったニューロンが存在した。

Ⅱ　神経伝達物質，神経調節物質

1.　薬物反応性

薬物反応性の判定ができたニューロンは総計５３個であった。ＮＡに対し半数（19／38）が反応し，８０%が抑制性であった。投与後約３秒の潜時で反応がおこり，投与中止後も２～１０秒効果が持続した。１分あるいはそれ以上持続するものもあった。ＡＣｈについては６０%（15／26）が反応し大部分は興奮性であった（87%）。ＮＡと同様２～３秒，長いもので１０秒の潜時でニューロン活動が増加し，中止後４～４０秒持続した。少数のニューロンで高頻度発火が持続して戻らない場合があった。ＤＡおよびＭについては約１０%反応した。

ＮＡ抑制性ニューロンに対するＡＣｈ反応性は，興奮性，抑制性および無反応のものがあり一定の傾向を示さなかった。その他の薬物の相互関係は例数が少なくまだ結論的でない。

2.　レバー押し摂食行動中のニューロン活動のパターンと薬物反応性

手がかり刺激に活動変化を示すニューロンは，ＮＡに対する反応性が高く（５／６）すべて抑制性であった。一方，課題試行中，各事象で変化しないものはＮＡに対する反応性も低かった（４／１９）。Ｍに興奮性を示したニューロンは報酬期にも活動上昇した。高頻度で自発放電をしているニューロンは，試行中の活動変化も薬物反応性も示さないものが多かった。

3.　薬物投与下のニューロン活動

ＮＡ投与下の試行時活動変化を手がかり刺激で変化を示すニューロンで主に調べた。ＮＡの投与により手がかり刺激に対する反応性が低下する傾向にあった。すなわち，発火頻度基礎値の抑制に比べ手がかり刺激反応時の発火頻度の方が著明に抑制された。ＮＡ投与中止後１０分後に試行を行うとパターンの回復がみられた。レバー押し期間中活動低下するニューロンについて，ＡＣｈ投与下で活動変化を調べた。ＡＣｈの同時投与により発火頻度が増加するとともにレバー押し期間の変化が消失した。同じニューロンでGlu投与下で試行を行なう

と発火頻度は同様に増加するがレバー押し期間中の活動低下はより著明になりACh と対照的な作用を示した。

考　察

1. 手がかり刺激

手がかり光刺激や視覚性刺激単独型のニューロンは8野外側に，手がかり音刺激単独型は8野内側，手がかり音・光刺激型は主溝底部に多く存在した。8野におけるこのニューロンの機能的分布は，視覚連合野（下側頭葉），聴覚連合野（上側頭回）との解剖学的連絡部位の分布とよく一致している。今までの報告では手がかり刺激に対するニューロン活動の機能的分布は明確でなく広範囲に広がった分布を示してきた。これは課題が単一の手がかり刺激の反応だけをみる場合が多く感覚性のものから高次の心理学的な反応までも含めて同一カテゴリーに含めたためと考えられる。

8野とくに弓状溝周囲の破壊では視覚弁別や聴覚弁別は障害されず，多感覚性の交叉弁別が障害される。したがってこの領域は多感覚性の統合的処理を行っていると考えられてきたが単一ニューロンレベルでは単一の感覚刺激の処理に関与する場合が多いことが明らかになった。多感覚性の統合的処理は，この領域全体として関与しているかもしくは，この部を経由することが大切な過程であるのかもしれない。主溝底部に多感覚性の反応を示すニューロンが存在している。この部位の破壊では空間記憶が特異的に障害される。弓状溝周囲にきた個々の感覚性入力が主溝底部でより統合されている可能性もある。

手がかり刺激に反応するニューロンには選択機能を持っているものがあり，同一の刺激でも「手がかり」としての「意味」を持たなくすると反応性を示さなくなる。再び「意味」を持たせるとすみやかに反応性が回復するという高度の適応性をもつ。このことは，このタイプのニューロンが外界刺激の物理的性質よりも，意味的性質の認識に関与していることを示している。また「注意」という個体の能動性をニューロンレベルで示しているとも考えられる。視覚刺激に対してそのような性質をもつニューロンの存在は報告がすでにいくつかあるが，聴覚刺激に対しても同様のニューロンが存在することが明らかになった。

こうして破壊による摂食行動変化を説明しうる意味ある外界刺激の統合的認識，外界情況の変化に対して反応修正を担っている可能性のあるニューロンの存在が明らかとなった。

2. レバー押し

レバー押し中活動の低下するものは比較的広く分布しているのに比べ，レバ

ー押し中活動上昇するものは主溝外側から下膨隆部に局在していた。このことは両者の活動が異なる意味を持っている可能性を示している。レバー押し期に活動低下するものは感覚性入力に対し活動上昇を示す複合型が多いことから，レバー押し行動に集中していることを反映しているのかもしれない。

一方レバー押し中活動上昇するものは単独にレバー押し期にだけ活動上昇しているものが多く，外界感覚入力の処理には関与せず自発運動，動機にもとずく行動の制御に関係していることが示唆される。下膨隆部の破壊で反応一無反応タイプの行動課題が特徴的に障害され固執傾向がみられる。したがってこの部に多く存在するレバー押し中活動上昇するニューロンは，動機にもとずく行動（摂食行動）の適切な方向づけを担っているのであろう。

２０ないし３０回のレバー押しのうち第１回目のレバー押し前に際してだけ活動上昇するニューロンが２％存在した。後のレバー押しに対しては活動変化をしないので単なる上肢の運動を反映しているとは考えにくい。レバー押し行動開始に関係する「意志」あるいは「動機」を反映しているとも考えられる。

3. 報　酬　期

報酬を見た時に活動変化をするニューロンの中に，報酬の種類によって活動変化の程度あるいはパターンが異なるものがみられたが，このことはこれらのニューロンが報酬，食物の性質のコード化ないし認識をしていることを示唆する。

一方食べている時に活動変化するニューロンは局在性ははっきりせず，数もそれほど多くない（全体の６％）が一般的に単独型の変化を示す。したがって，このニューロンは，外界認知系とは異なる報酬系ないし内界認知系のニューロンと考えることができる。咀嚼運動，味覚性入力等の影響が考えられるが，どの要因に起因しているかは今後の問題である。

4. 薬物反応性

ＮＡは大半が抑制性の作用をもち，手がかり刺激反応ニューロンに対して特に効果を及ぼした。これは，ＮＡが外界認知系に関与していることを示唆する。背側ＮＡ束を破壊すると刺激に対する感受性が亢進し，非手がかり刺激に対しても行動を起こし，行動に固執傾向がみられることからも，ＮＡが前頭前野の外界刺激に対する反応性を抑制的に制御していると考えられる。

ＡＣｈは最近前頭前野等に求心性線維を送る起始細胞が無名質のＭｅｙｅｎｒｔの基底核にあるという報告が出ている。この部位は自己刺激部位でもあるし，摂食行動に深く関与している部位でもある。ＡＣｈ自身は睡眠ー覚醒，学習ー記

憶，錐体外路系の機能に関与している。今回の実験ではAChは前頭前野に対し興奮性の作用を示した（８７％）。抑制性の作用が浅層にみられるという報告があるが我々の記録部位は大部分１㎜より深いところから記録であるのでこのような結果となったのであろう。ニューロン機能との関係はまだはっきりしないがレバー押し期に変化を示すニューロンには，ACh反応性のあるものが比較的多い。動因行動であるレバー押し期に活動低下するニューロンに対し，発火頻度を上昇させてその活動変化を消失させるケースを観察したが興味深いことである。

以上のように前頭前野ニューロンは，摂食行動において外界情報の認知，摂食行動の方向づけ，状況変化に対する適応に対応した活動を行っており，脳幹，基底前脳部からの求心性成分でその活動性の修飾を受けていることが示唆された。また，空腹の程度も前頭前野の活動に対して影響を持っているようである。視床下部ー辺縁系と前頭前野の解剖学的連絡がＨＲＰ法や変性法等で明らかにされてきているが，今回の我々の実験では扁桃核と弓状溝周囲の視覚型ニューロンに特異的な機能的連絡がみられた。外側視床下野との関係では反応の数も少なくその局在や活動パターンとの相関も一定の傾向はなかった。外側視床下野の機能的連絡機構は，個々のニューロンへの直接的なものでなくある領域の活動性に影響を及ぼすようなものである可能性があるが今後さらに検討する必要があるだろう。

生 理 機 能 研 究 施 設

《超高圧電子顕微鏡室》

研 究 課 題　鉄微粒子の電子顕微鏡像における位相変化の解析

有井　達夫

研 究 目 的

生物試料における電子顕微鏡像は，通常，散乱され対物絞りにさえぎられた電子を取り除き，対物絞りを通過した電子のみで結像するところのいわゆる散乱コントラストである。一方，試料を通過した電子は試料中での電場の影響を受け，電子波の位相は一般に変化する。この効果を利用し生物試料においては倍率に応じて不足焦点の量を変化させ，散乱コントラストに加えて位相の変化している位置に位相コントラストをつけて結像させている。この意味において位相コントラストも又電顕像において重要な意味を持っている。

ところで，電子線の位相は磁束の存在によっても変化する。そこで，この位相変化を調べることにより試料中の磁束分布に関する情報を得ることが出来る。そこで我々は粒径２００ｎｍ以下の単結晶多面体鉄微粒子の磁束分布に関する情報を得る目的で，電子線の位相変化について研究を行った。[1] この試料は，形状が明らかであり，そのため平均内部ポテンシャルによる位相変化の量を，定性的には知ることが出来る試料である。また強磁性を示すので，磁束による効果は大きいことが期待される。なお，これまで，このように小さい多面体微粒子における磁束分布を明らかにした報告はない。

この研究を通して電子線の位相変化に関する加速電圧依存性についても検討することを目的とする。

研 究 経 過 及 び 結 果

粒径１００～２００ ｎｍの鉄微粒子は，アルゴンガス１０Ｔｏｒｒ の雰囲気中で，タングステンボート上にて抵抗加熱を行い蒸発することにより作製した。この微粒子は１２枚の等価な｛１１０｝面で囲まれた菱形１２面体の単結晶微粒子であり体心立方構造をとる。焦点を外して撮影するいわゆるローレンツ電子顕微鏡法により名古屋大学の超高圧電子顕微鏡を用いて加速電圧６００ＫＶにて撮影した。

その結果，これらの菱形１２面体の鉄微粒子は，単磁区構造をとらず，特定の（１１０）面内で磁束は時計方向，又は反時計方向に回転していると考えられ

るコントラストを得た。これは同一試料を裏返えして観察することにより，平均内部ポテンシャルの効果を差し引いた結果，得られたものである。この結果は，外村（日立中研）等の協力を得ての電子線ホログラフィー法による観察においても確かめられた。

なお，磁束による透過電子の位相変化は加速電圧に依存しないことを確認しこれに対して平均内部ポテンシャルによる位相変化は加速電圧の増加と共に$\sqrt{E}$に反比例して減少することを確認した。このため入射電子の加速電圧を高めることが，三次元的な形態をとる磁性体微粒子および凹凸のある磁性薄膜において，磁束に関する情報を得るには，相対的に有利である点を明らかにした。

1) Arii, T., Mihama, K., Matsuda, T. and Tonomura, A. (1981)
「Observation of magnetic structure for polyhedral fine iron particles by Lorentz microscopy and electron holography」
J. Electron Microsc. vol. 30 No. 2 掲載予定

《組織培養標本室》

研究課題　神経グリアハイブリッド細胞の興奮性獲得過程の分析

古家　園子　　古家喜四夫（生体膜部門）

研究目的　神経グリアハイブリッド細胞（NG108−15）は通常の培養条件下では興奮性を示さないが，ジブチルサイクリックＡＭＰ処理により長い突起を伸ばし，興奮するようになり，培養筋細胞とシナプスを形成することができるようになる。この分化の各段階の細胞について電気生理学検索を行うとともに，同一の細胞又は同一の培養について細胞の微細形態を超薄切片法，フリーズフラクチャー法にて調べ，どのような段階を経てどのような興奮性が表れ，それがどのような微細形態の変化と対応しているかを詳細に比較検討した。

研究方法　NG108−15細胞を１ｍＭジブチルサイクリックAMPを含む10％ 牛胎児血清含有ＤＭＥＭ培地で培養した。対照群はジブチルサイクリックＡＭＰを含まない培養液で培養した。経時的に対照及びジブチルサイクリックＡＭＰ処理細胞について微小電極法にて電気生理学的性質を調べ，後，固定して形態観察を行った。

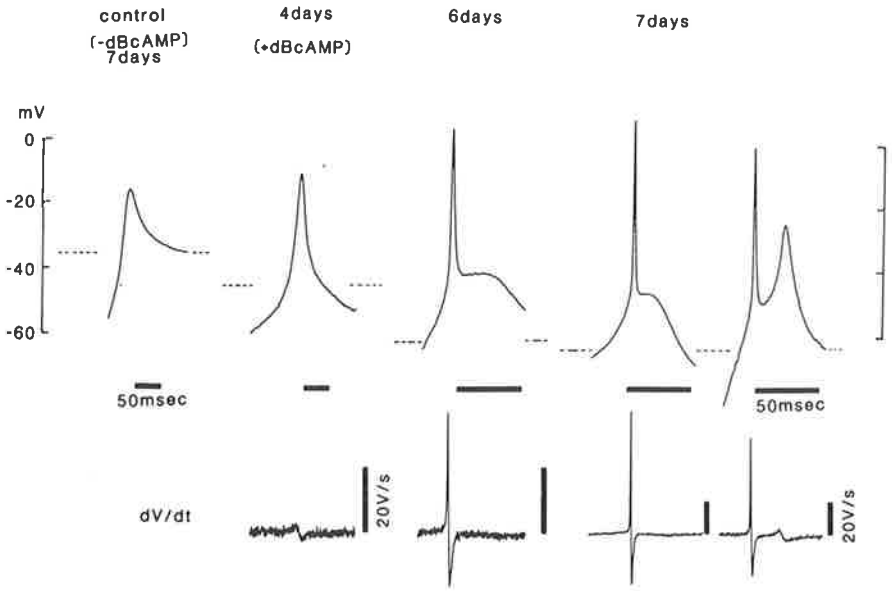
研究結果　NG108−15細胞をジブチルサイクリックＡＭＰで処理すると，培養３日目頃より活動電位を発生する。この活動電位はテトロドトキシンで阻害されず，カルシウム濃度をあげると大きくなり，塩化コバルトやベラパミルで阻害されることからカルシウムスパイクであることがわかった。培養５〜６日では活動電位は大きくかつ速い立ち上り速度を持つようになり，テトロドトキシンである程度阻害されるようになる。培養７日以上では更に大きい最大立ち上り速度がみられるようになり，活動電位が２つのピークから成ることが多い。最初の立ち上りの速いピークは10^{-6}Mのテトロドトキシンで完全に抑えられ，２番目のゆっくりとしたピークはコバルトやベラパミルで阻害された。これらのことから，この細胞では分化の過程でまずカルシウムスパイクが発生し，次にナトリウムスパイクが発生してきて，成熟した細胞では２つのスパイクを持つことがわかった。

形態的にはカルシウムスパイクが発生する培養３日目頃より神経突起が伸び始め，ゴルジ装置や滑面小胞体が増加し始め，ミクロチュブル，ニュウロフィラメント，1000°A程度の有核小胞等もみられるようになり，培養１週間で完成した神経細胞の形態を示す。500Åのclear vesicleは神経突起に多数みられることもあるが，多くの細胞ではほとんどみられなかった。
フリーズフラクチャー法により膜内粒子を調べると，対照群ではP面の粒子数が1241 ± 250／μ^2 であるのに対し，ジブチルサイクリックAMP処理７日目の細胞では2415± 621／μ^2 と倍増していた。E面での膜内粒子数には有意の差は認められなかった。

考　　察

興奮性獲得に伴い倍増したP面の膜内粒子について，現在，カルシウムスパイクのみの時期，ナトリウムスパイクがでてくる時期に分け，数と大きさの分布を解析中である。又，神経体と神経突起，フィロポディアの部分に分けても膜内粒子の数と大きさを分析する予定である。

写真(P74) ジブチルサイクリックAMP処理細胞のフリーズフラクチャー像（P面）
バーは1μ を示す。


control
(-dBcAMP)
7days
4days
(+dBcAMP)
6days
7days
mV
0
-20
-40
-60
50msec
50msec
dV/dt
20V/s
20V/s



《動物実験施設》

昭和５５年度は，６月に完成予定の陸棲動物室の完成後の運用に備えて，数次にわたる陸棲動物室委員会（委員長　山岸俊一教授）が開かれ，設備機器の整備計画，運用方針，感染事故防止対策，等について慎重な討議と設備機器の選定作業が進められた。

７月より，生理研研究棟の完成（３月）まで生理研仮研究室として貸与された実験室と，一部の飼育室を除いて，陸棲動物室の運用を開始し，この間，臨時的な施設運用の指針として，「陸棲動物室利用のしおり」が作成され，当座の円滑な運営がはかられた。

１０月には，技官１名が配置され，飼育設備，洗浄滅菌設備，空調設備等の保守点検作業を開始した。

５６年１月には，尾崎毅助教授が専任として着任し施設の本格的運用にむけて，陸棲動物室の検収検疫体制の整備，手術室，実験室，測定室に配備する機器や動物の健康管理のための用具の点検整備を進めた。

水棲動物室においては，今年度新たに５００リットル飼育水槽４基と５０リットル５個組水槽２基を増設し，また，飼料保存用低温室１室を基生研より移管設置し，飼育水槽の需要増大に応えられる体制とした。

３月には，陸棲動物室に焼却炉が完成，設備の大半が稼動出来る体制となり施設の本格的運用のためのマニュアル作りと，施設設備の細部の点検作業をほぼ終了した。

また，昭和５５年度は実験用ラットからの感染病として流行が伝えられている「韓国型出血熱」の患者の発生が，各地の医学系研究機関で報告された。効果的な予防対策もないまま，動物実験関係者に不安をつのらせている現状から当施設では，この病気に関する情報の収集に努めるとともに関係者に広報活動を行ない，実験動物からの感染事故防止に努めた。現在までの所，当施設ではラット，マウスの飼養数，利用者数とも比較的少数であったことも幸いして，事故の発生は認められないが，１日も早くこの病気に対する効果的な予防対策を確立する必要がある。

研　　究　　員

《特定領域奨励研究員》

研究課題　**長期に亘る脳活動記録法及び脳内活性物質の測定**

谷　裕一郎

研究目的　脳内活性物質と脳活動との関連を明らかにするため，脳内活性物質の作用機序を個々の細胞レベルの活動の表現である神経インパルスの発火パターンの解析，脳波および動物行動パターンの解析を通じて検討を進める。

研究方法　脳内活性物質の生物検定のため，生涯に亘って脳波記録のできる電極をマウス脳内に装着し，マウスの生活や行動を制限しないよう測定器と動物が一体となったシステムを実現して，この慢性実験システムで研究を進めた。

研究結果　脳内活性物質を精製する過程で，その絶対量が微量なことから，生物検定に消費するサンプル量は，出来る限り少なく，かつ実験例数を多くすることが望まれる。その必要性により，哺乳動物の最も小さな実験動物であるマウスを用いて，脳活動としての脳波を活性物質との関連について長期に亘り安定に記録できる慢性実験システムの開発を進めてきた。そこでは，自由な行動を出来る限り制限しない条件のもとでの脳内活性物質の生物検定システムとして，その有効性，精度上の安定性について検討を行った。

つぎに，脳内活性物質を精製した後，その活性物質の作用機序を明確にすることが大きな課題となる。そのためには，脳活動を個々の細胞レベルの活動で，すなわち，神経インパルスのレベルで記録することが必要となる。この観点から，脳地図のしっかりしている実験動物であるネコを用いて，脳活動としての神経インパルスを記録し，それと脳内活動物質との関連を出来る限り自然に近い状態で，無麻酔下で研究を行なった。

Synaptic mechanisms in the vertebrate retina

A. T. Ishida

During the portion of the past fiscal year in which I was employed at the National Institute for Physiological Sciences, I primarily made preparations for upcoming experiments, revised a manuscript concerning my previous studies, and received comments and advice concerning the experiments which I wish to pursue.

Virtually all of the components of the experimental set-up which I plan to use have been received. These include: (1) Optical bench, for providing stimuli of chosen wavelength, intensity, and shape, to the retina. This consists of an ensemble of light sources, lenses, interference filters, neutral density filters, shutters, prisms, mirrors, aperatures, and supporting fixtures. Mounts for lenses, filters, and shutters, were made also with the help of several persons. (2) Recording chamber and perfusion system, for immobilizing the tissue under study and maintaining it with oxygenated saline. Most of these components are ready for use. (3) Electronic devices, for recording, amplifying, and displaying the intracellularly-recorded responses which I intend to study are also ready to be used.

In addition, I have received a variety of amino acids and amino acid analogs which I will test as neurotransmitter candidates in the outer plexiform layer of Cyprinid fish retinas.

In regard to presenting my previous observations for discussion, I delivered seminars concerning both the morphology of bipolar cells and the effects of D- and L- amino acids on horizontal cells, in the retina of goldfish (Caras-

sius auratus). This lead to several discussions with Professor Kaneko, and well as Drs. Ohtsuka and Tauchi, in which I was able to learn about their observations concerning the morphology of bipolar cells in the retina of carp (Cyprinus carpio) as well as effects of amino acids and related compounds on both the electroretinogram and the membrane potentials and light-evoked responses of horizontal and bipolar cells. Furthermore, I made final revisions on a manuscript entitled "D-Aspartate Potentiates the Effects of L-Glutamate on Horizontal Cells in Goldfish Retina" to be submitted for publication.

Finally, I was fortunate to have the opportunity to meet Drs. A. Takeuchi and K. Onodera (Juntendo Univ., Tokyo), H. Shinozaki and M. Ishida (Tokyo Metropolitan Medical Inst., Tokyo), M. Murakami and the members of his laboratory (Keio Univ., Tokyo), and H. Takeuchi (Gifu Univ., Gifu). On these occasions, I was able to discuss the detection of released transmitter candidates, the localization of postsynaptic sites, and the specificity and mode of action of various transmitter agonists and antagonists.

《 特別協力研究員 》

研 究 課 題

脳内活性物質の抽出，精製，同定に関する研究

星野　稔

研 究 目 的

針麻酔の発現機構はいまだ明らかでないが，内因性モルヒネ様物質（エンケファリンやエンドルフィンなど）の関与が考えられている。本研究は，針刺激によって生ずる鎮痛効果と脳内活性物質の関連を明らかにし，その本態を解明する目的で，先ず(1)疼痛閾値の測定法の確立，(2)針刺激に有効な刺激条件の検討を行なった。生物材料はラットを用いた。

研究方法・結果

(1) 疼痛刺激方法はいくつかあるが，本研究では輻射熱刺激に対する尾逃避反応法によった。当初既製の輻射熱刺激装置を使用したが，測定値のバラツキが大きかったので，顕微鏡のコンデンサーレンズと光源用ランプを組み立てて熱刺激装置を作製した。

尾部と後肢のみが外に出るようにしたプラスチック製の箱にラットを入れ，尾端近くの部分をマジックインキで黒く塗り，焦点を結ばせた。また，室温は測定値のバラツキに大きく影響することがわかったので，室温はなるべく２３℃になるように努めた。対照において尾逃避反応の潜時が２秒前後になるように光量を調節すると，測定値のバラツキが小さくなった。

(2) ヒトの足三里および三陰交に相当する部位にステンレス針（0.2㎜φ）を筋肉に達するまで刺入した。刺針は一側にのみ行なった。刺入針を介して，1Hz，パルス幅１msec，後肢の筋がかるく収縮する程度の出力で二相性の刺激波を約１時間加え，尾逃避反応の潜時の経時変化を調べた。一定時間毎に疼痛閾値を５回測定し，測定点間でStudentのt－テストにより危険率５％で有意差の検定を行なった。

考　　察

十分な成績が得られていないが，針麻酔が成功した例では，針通電後徐々に疼痛閾値が上昇し，通電開始後約３０分で最大に達し（４０％の閾値増加），通電を停止した後，１５分間は疼痛閾値がゆるやかに減少し，３０分後には通電前の水準に戻る傾向にあった。この経時変化は，すでに報告があるように，

針麻酔の発現において体液性因子の関与を示唆する。

研究課題　感覚機構の研究

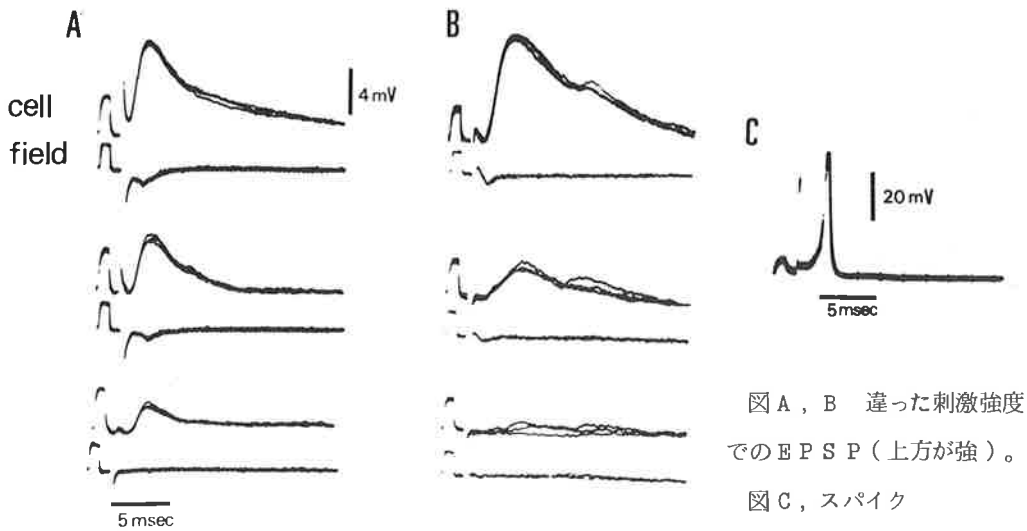
坂口　博信

研究目的　中枢での情報記憶の基礎過程である可塑性を研究する。

研究方法　赤核細胞を用いた中枢神経シナプスの可塑性については高次神経機構研究部門において多くの研究の集積がある。しかしながら，赤核細胞に関しては伝達物質等，基本的なことで未知な部分は多い。脳の生理，薬理的研究に有用である脳切片を用い，試験管内での赤核細胞の研究を試みた。

生後3－6週間の子猫の脳をとり出し，かみそり刃で，赤核領域をふくむ厚さ0.5～0.8㎜の脳切片を作製する。この切片は95％O_2と5％Co_2の混合ガスで飽和したクレブスリンガー液中に1時間，インキュベートされた後，記録用の灌流槽中に置かれ，赤核細胞の電気活動が記録された。

研究経過　細い電極を用い，赤核細胞の細胞内記録を行なうとスパイク（図C）と立上り時間の違う2種類のＥＰＳＰ（図Ａ，Ｂ）が観察された。赤核細胞は，小脳中位核と大脳運動領より単シナプス性の入力を受けており，生体での実験との対応から考えて，それぞれ小脳性と大脳性のものであることが予測できる。このような電気活動は6時間以上持続し，脳切片は十分，生体のモデルとして今後の実験に有用であることがわかった。



図Ａ，Ｂ　違った刺激強度でのＥＰＳＰ（上方が強）。
図Ｃ，スパイク

《文部省内地研究員》

研究課題

In vivo キンギョ網膜中間水平細胞の明暗順応特性の研究

袋谷　賢吉（富山大工）　　金子　章道（生理研）

研究目的・方法

網膜内神経細胞の明暗順応特性は，遊離網膜を用いて既に多くの研究が行なわれている。しかし，この標本には，視細胞内視物質の再生過程が不完全になる欠点がある。本研究では，筋弛緩並びに人工呼吸を施したキンギョを用いて網膜中間水平細胞の明暗順応特性を調べた。活動電位は数時間にわたり安定に記録され，種々の背景光強度について，照射時並びに消光後の刺激光に対する感度変化を測定した。

研究結果

飽和電位Vs を生ぜしめる最小の背景光強度をIsとすれば，Vsの10%以下の応答を与えるような弱い背景光照射では，感度変化はなかった。暗順応時の絶対感度を基準（0log unit(l.u.) にとれば，Vsの45%応答を与える背景光照射により，感度は−0.4 l.u.に減少し，消光後直ちに回復した。Vsの95%応答を与える背景光照射により，感度は－1.5 l.u. に減少し，漸時回復して5分後には定常値（－1.0 l.u.）に達した，さらに消光後数分で0 l.u.に回復した。Isより0.8 l.u. 強い背景光の照射に対し，数分間の不応期後，感度は上昇を続け約10分後には定常値（－2.8 l.u.）に達した。消光後1分で感度は－1.0 l.u. 以上に上昇し，以後はゆっくり回復した。さらに，Isより1.8 l.u. 強い背景光では，10分間の照射中全く応答せず，消光後1分間に感度は－1.5 l.u. 以上に上昇し，以後はゆっくり回復して約30分で0 l.u. に達した。又，背景光消光後の回復期における感度と膜電位の間には線形な関係が見られた。

考察

以上の結果を，Dowling and Rippsによるエイ網膜水平細胞についての実験結果と比較すると，本実験結果の方が明暗順応が早いことや，彼らの結果では，感度と膜電位の間には線形性がないなどの違いがある。これらの相違の原因について種々の考察を行った。

《日本学術振興会外国人研究員》

研究課題　「単一心筋細胞の分離とサイクリックヌクレオシドとカルシウムの細胞内注入」

Wolfgang Trautwein, II Physiologisches Inst. der Universität des Saarlandes, Homburg(Saar) W-Germany.

心筋の電気的活動については1964年膜電位固定実験が初めて成功して以来多くの研究成果が発表され，活動電位を形成する膜電流系の概要が明らかになり，H－H式モデルが実験データーに基づいて組み立てられている。しかしながら個々の電流系の速い変化については従来の標本ではそれが多細胞より成っているため測定が困難であった。最近開発が試みられている単一心筋標本はこの点でより詳細な測定が可能になる事は明らかであり，さらに細胞内に各種の物質を注入しその効果を記録できる事が期待できる。生理研高次神経性調節部門で試みられていた単一細胞分離の研究にザール大学で行ってきた成果を加え方法の完成に向けて協同研究を行ない今回はC－AMP，C－GMP等の細胞内注入を試みた。

ウサギとモルモットの心臓をネンブタール麻酔下に冠動脈を介して灌流し始めた後摘出，続いてコラゲナーゼ 0.04 %, 無カルシウムタイロード液で約1時間灌流すると容易に単一細胞を単離できるまで結合織の消化が進んだ。心内腔を開き洞房結節，心房，房室結節，心室筋各部よりピンセットで一部を剥離し記録灌流槽中で細胞を分離し，微小電極を用い細胞内電位を記録した。

単離された多くの細胞はカルシウムを含むタイロード液中で拘縮し電気的活動を示さなかったが，２０～３０%の細胞は正常な形態を保ち，ほぼ正常な活動電位を示した。アドレナリンの作用発現に不可欠と言われているC－AMPを細胞内に注入するとプラトー相はより正電位に移動し，プラトーの延長が記録された。洞房結節細胞では心室筋で見られたプラトー相の変化は殆んど認めなかったが，自発興奮頻度は明らかに増加した。これ等の所見はC－AMPのアドレナリン作用に対する細胞内での役割を確認するものである。最近迷走神

経伝達物質であるアセチルコリンの作用下で網膜内にＣ－ＧＭＰが増加するとの所見に基づいてＣ－ＧＭＰがアセチルコリン作用発現に関与しているのではないかとの仮説が提唱されている。アセチルコリンの膜電流に対する作用は二種類に分けることができ，その一は古くから知られているカリウム透過性の上昇であり，他は活動電位に関与している緩徐内向き電流の抑制である。一体Ｃ－ＧＭＰがどのように関与しているかを調べるため，Ｃ－ＧＭＰ注入による活動電位の変化とアセチルコリンによって誘発される過分極応答の変化を調べた。その結果，活動電位は心室筋で抑制される。抑制につづいてプラトー相の延長が記録されＣ－ＧＭＰの作用は二相性であった。一方洞房結節細胞では自発興奮頻度は単純に延長された。一方アセチルコリンに対する過分極応答はＣ－ＧＭＰ注入によって変化しなかった。以上の実験結果はＣ－ＧＭＰが細胞内より活動電位発生に関与している膜電流系に作用するけれども古くから知られているカリウム透過性の増大というアセチルコリンに対する応答発現には関与してない事を示している。この結論はアセチルコリンは細胞膜上の受容分子に結合し，個有のカリウムチャンネルを開くという仮説を支持する。

カルシウムの注入によっても同様に活動電位は変化したけれどもアセチルコリンに対する過分極応答は変化しなかった。

《中国政府派遣進修生》

研究課題　網膜における視覚神経情報処理機構の研究

楊　雄里（中国科学院上海生理研究所）

剥離網膜は視覚神経情報処理機構の研究に用いられて既に多くのデータを提供して来たが，灌流液中では正常の生体状態とは環境が異なるため，長時間，安定な活動は望めない。更に網膜は色素上皮から外されて，視物質の再生が完全でないので，順応条件を変化させる実験には適さない。我々はこの制約を打破するためIn vivoの標本を開発した。既ち,非動化した金魚を用い，口から流水を通して人工呼吸を行いながら，眼盃から網膜細胞の細胞内記録を行った。今回，この標本を用いて，明順応条件のもとにL型外水平細胞の応答特性を調べた。

結果

1. 明順応条件下における外水平細胞は短波長(＜600nm)刺激に対して応答の時間経過が早く，特に著名なon-transientがみられた。暗順応状態では応答は緩除でtransientはみられない（図1）。また，このtransientは酸素欠乏の状態にすると消失した。

2. 暗順応状態におけると同じように（本報告書P42参照），明順応状態でも外水平細胞が赤錐体と緑錐体から入力を受ける事，およびこれら2種類入力の間にfacilitation（或はdisinhibition）が存在する事をスペクトル感度曲線と混色刺激実験によって明かにした。又，強い赤色背景光のもとで短波長光を照射すると，予期に反して脱分極性の応答がみられるという結果が得られた（図2）。この脱分極応答は長波長光の照射では出現せず，また背景光を青あるいは緑にしても認められなかった。これまでL型外水平細胞はどのような刺激条件下において過分極性応答のみを示すものと考えられており，今回の実験で見出された脱分極性応答がどのようなメカニズムで発生するのかは誠に興味深い。このような水平細胞の応答は受容器－水平細胞間に複雑な相互作用が存在する事を示唆するものであり，引き続いてそれらの点について検討中である。

なお，この研究は田内，金子両博士と共同で行った。

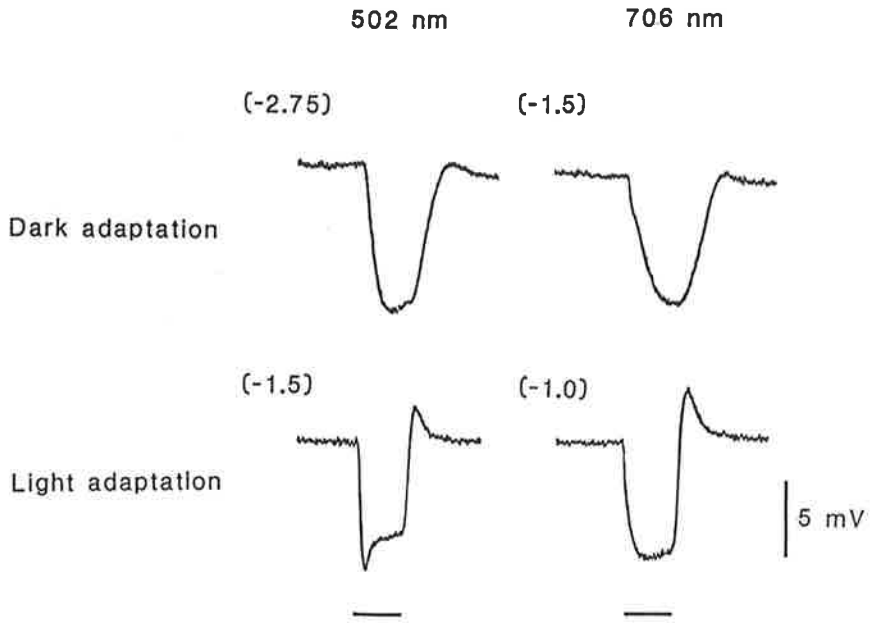


図 1. 暗順応および明順応条件でおける in vivo 金魚の L型水平細胞の応答波形．刺激には 3.2 ㎜直径の光点を用いた。波形左上括弧内の数字は光刺激の相対強度（対数）を示す。下の横線は 0.4 秒の光照射を現す。

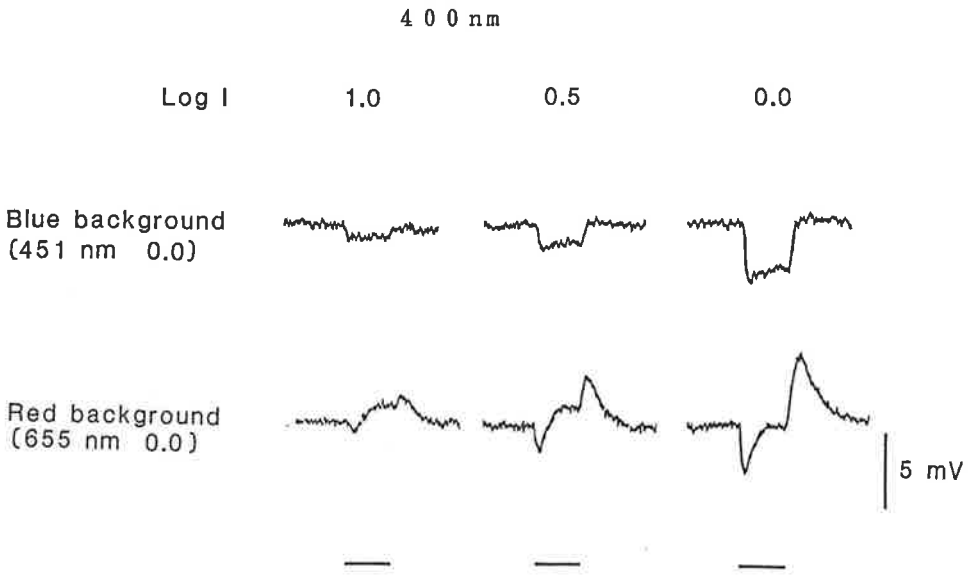


図 2. 異なる波長の背景光のもとに短波長刺激（400nm）でおこった応答波形の比較。左側の括弧内の数字は背景光の波長と強度を示す。強い赤色背景光下で脱分極成分が現われる。刺激時間，0.4 秒

技　　術　　課

技術課技官は１４名となり，技官組織としての体裁は整ってきたが，生理学実験研究棟や共通研究施設などが完成するまでは，仮設置の機器類の保守管理をすることに追われ，研究部門と研究施設とを有機的に稼動させながら一貫した流れとして研究に組込ませてゆくまでには至っていない。しかし，本年度中には動物実験施設（陸棲動物室），工作室，電子計算機室，生理学実験研究棟などが完成する見込みなので，技術室の技術支援構想を少しでも軌道にのせて行きたいと念願している。

1. 昭和５５年2月２２日（金）～２３日（土）の両日，生理学研究所仮研究棟において「生理学技術研究会（第２回）」を開催した。初日の２２日は一般の技術研究発表，２３は「専門技術職のあり方」「慶応義塾大学医学部研究機器開発室のシステム」「生理研における技術課技官の活動」を主題とする総合討論を実施した。この研究会の内容については以下の報告書にまとめられている。

◦ 生理学技術研究会報告　第２号：1～３８（Ｂ５，6月刊）

また，昭和５６年3月１３日（金）～１４日（土）の両日，完成した生理学実験研究棟において「生理学技術研究会（第3回）」を開催した。報告書は次年度に印刷される。

技術課は毎週月曜日の朝１時間の定例技官ミーテングを開き，技官相互の連絡，技術研修を実施している。また，本年度から技術研修・技術向上のため技術課独自のプロジェクトを設定，各技官はこれらのいずれかに参加することにしている。活動は勤務時間外で，毎週１回２時間ほどこれにあてている。本年度のプロジェクトは以下のもので，２～３年継続して行ない，成果はレポートにして発表の予定である。　①微小電極の研究開発　②生理学研究におけるＥＤＰについて　③実験動物の解剖と標本の作成。

研　究　活　動

Nishina, Y., Shiga, K., Horiike, K., Tojo, H., Kasai, S., Matsui, K., Watari, H. and Yamano, T. (1980) Resonance Raman spectra of semiquinone forms of flavin bound to riboflavin binding protein. J. Biochem., 88, 411-416.

Nishina, Y., Shiga, K., Horiike, K., Tojo, H., Kasai, S., Yanase, K., Matsui, K., Watari, H. and Yamano, T. (1980) Vibrational modes of flavin bound to riboflavin binding protein from egg white. J. Biochem., 88, 403-409.

Otani, S., Note, Y., Nishina, Y. and Matsumura, Y. (1980) A study of complex between roseoflavin and apoprotein., "Flavins and Flavo-proteins" (eds. Yagi, K. & Yamano, T.) Japan Science Society, 593 - 597.

Higashi, A., Uchizono, K., Hoshino, M., Tani, Y., Yano, T. & Yazawa, K. (1980) Characteristics of a compact accelerator and its application to classifying the behavioural stages of the mouse., Med. & Biol Eng. & Comput., 18, 256 - 249.

Sugiyama, T., Miura, R., Yamano, T., Shiga, K. and Watari, H. (1980) A reversible spin conversion of cytochrome $\underset{-5}{b}$ at high temperatures., Biochem. Biophys. Res. Commun., 97, 22 - 27.

Tojo, H., Horiike, K., Shiga, K., Nishina, Y., Watari, H. and Yamano, T. (1980) Coenzyme-induced subunit association of the flavoenzyme D-amino acid oxidase: Kinetic light scattering study., FEBS

Letters., 114, 4-6.

Ohta-Fukuyama, M., Miyake, Y., Shiga, K., Nishina, Y., Watari, H. and Yamano, T. (1980) The circular dichroism studies on flavoproteins containing covalently bound coenzymes., J. Biochem., 88, 205-209.

東城博雅，堀池喜八郎，山野俊雄，志賀　潔，二科安三，亘　弘（1980）D-アミノ酸酸化酵素と塩酸グアニジンの選択相互作用および単量体分子量の決定.，生化学，52, 621

Watari, H., Nishikawa, H., and Asato, R. (1980) Study on phospholipid in biomembrane by 31-phosphor nuclear magnetic resonance., J. Physiol. Soc. Japan 42, 221

Nishina, Y., Shiga, K., Watari, H., Horiike, K. and Tojo, H. (1980) Resonance Raman spectra of semiquinone forms of flavins bound to riboflavin binding protein., J. Physiol. Soc. Japan., 42, 221

Shiga, K., Nishina, Y., Watari, H., Horiike, K. and Tojo, H. (1980) The π-electronic structure of 8-amino-8-demethyl-D-riboflavin., J. Physiol. Soc. Japan., 42, 221

亘　弘，矢内原昇，日置善雄，赤坂一之（1980）脳内活性物質の360プロトンNMR.，第19回NMR討論会講演要旨集，145-148.

二科安三，志賀　潔，堀池喜八郎，東城博雅，笠井佐夫，松井邦夫，亘　弘　山野俊雄（1980）リボフラビン結合タンパクに結合したフラボセミキノンの共鳴ラマンスペクトル.，生化学，52, 620

Yanaihara, N. (1980) Hormone precursors, Clinics in Endocrinology and Metabolism 9(2), 223.

Yanaihara, C., Inoue, A., Mochizuki, T., Ozaki, J., Sato, H. and Yanaihara, N. (1980) Bombesin-like immunoreactivity in mammalian tissues, Biomed. Res. 1. 96.

Yanaihara, N. (1980) Immunochemical application of synthetic peptides to studies on the prohormone-hormone system, Biomed. Res. 1, 105.

Yanaihara, C., Sakagami, M., Mochizuki, T., Sato, H., Yanaihara, N., Iwanaga, T., Fujii, S. and Fujita, T. (1980) Immunoreactive VIP (vasoactive intestinal polypeptide) in canine intestinal mucosa and muscle, Biomed. Res. 1, 449.

Yanaihara, C., Mochizuki, T., Matsumoto, T., Oyamada, K., Sato, H., Kubota, M. and Yanaihara, N. (1980) Immunoreactive neurotensin in human and monkey intestines, Biomed. Res. 1, (Suppl.) 67.

Yanaihara, N., Kobanashi, S., Sato, H., Yanaihara, C., Sakagami, M., Sakura, N., Hashimoto, T., Ishikawa, S., Iwanaga, T. and Fujita, T., (1980) Vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in a human neuroblastoma cell line and the coexistence of other neuropeptide immunoreactivity in the cell line, Endocrinol. Japon. S. R. No. 1, 37.

Hirohashi, M., Yamamoto, Y., Nishida, T., Yanaihara, N., Hioki, Y., Watari, H. and Otsuka, M. (1981) Structure-function relationship of substance P active core, In Peptide Chemistry 1980, ed. K. Okawa, Protein Research Foundation, Osaka, pp. 175.

Kukita, F. and Yamagishi, S. (1980) Modification of sodium and potassium channel activities of squid giant axon by non-electrolytes, Proc. Jpn. Acad., 56(B), 51-55.

Yamagishi, S., Furuya, K. and Kukita, F. (1980) Nerve excitation induced by intracellular perfusion of Ca, Mg and Mn ions in squid giant axons, J. Physiol. Soc. Japan., 42, 240.

久木田文夫，山岸俊一（1980）神経興奮時のイオンチャネルの大きさ，日本生物物理学会第18回予稿集，340.

古家喜四夫，山岸俊一（1980）2価イオン灌流による活動電位の誘発，日本生物物理学会第18回予稿集，341.

Sugiyama, H. (1980) Isoelectric focusing of acetylcholine receptors in mouse and chick muscle cells in culture, Biomed. Res., 1, 91-95.

Sugiyama, H. (1980) Isoelectric fucusing analysis of acetylcholine receptors on the surface of mouse and chick muscle cells in culture, J. Physiol. Soc. Japan., 42, 254.

杉山博之，山下幸子（1980） ラット骨格筋アセチルコリン受容体の合成と分化，神経化学，19, 126-129.

Kukita, F. and Yamagishi, S. (1981) Properties of channels of squid giant axons changed by perfusing solutions with non-electrolytes, In Nerve Memdrane-Biochemistry and Function of Channel Proteins-. Nerve Membrane-Biochemistry and Function of channel ed. by Matsumoto, G. and Kotani, M. 221-234.

Yamagishi, S. and Furuya, K. (1981) Initiation of the spike by intracellularly perfused calcium in squid giant axons, Proc. Jpn. Acad., 57(B), 54-58.

Kukita, F. and Yamagishi, S. (1981) Excitation of squid giant axons below 0°C. Biophys. J., 34,No. 3.

山岸俊一(1981) 神経膜の内表面と外表面の機能, 膜, 6, 33-43.

久木田文夫, 山岸俊一(1981) 興奮性膜のイオンチャネルの研究の最近の進歩, Abstact(in English),表面科学, 1,

Bauer, H. C., Daniels, M. P., Pudimat, P. A., Jacques, L., Sugiyama, H. and Christian, C. N. (1981) Characterization and partial purification of a neuronal factor which increases acetylcholine receptor aggregation on cultured muscle cells, Brain. Res., 209, 395-404.

Terakawa, S.(1980)
Excitability of squid axon membrane in the absence of ion-concentration gradient across the membrane.
Upsala J. Med. Sci. 85:217-224,

Baumgold, J., Terakawa, S., Iwasa, K., & Gainer, H. (1981)

Membrane-associated cytoskeletal proteins in squid giant axons.
J. Neurochem. 36:759-764,

Shiba, A., Sano, K., Nakao, M., Yoshida, J., Cho, H., and Hayashi, T. (1980) Electrophoretic analysis of the protein in palatine saliva, J. Prosthetic Dentistry, 43, 385-391.

Fukushima, Y. and Nakao, M. (1980) Changes in the affinity of Na- and K- transport ATPase for di-valent cation during its reaction sequence, J. Biol. Chem., 255, 7813-7819.

Shiba, A., Sano, K., Nakao, M. and Hayashi, T. (1980) A new method of collecting saliva from human palatine glands for electrophoretic study, Arch. Oral Bial Biol. 25, 503-504.

Nakao, M., Fujii, Y., Hara, Y., Nomura, T., Nakao, T. and Komatsu, Y. (1980) Mambrane protein phosphorylation in intact normal and hereditary spherocytic human erythrocytes, J. Biochem., 88, 327-335.

Nakao, M. and Nakayama, T. (1980) Decrease in phospho-fructokinase activity during blood preservation and the effect of intracellular ATP., Biochem. Biophys. Res. Commun., 95, 1294-1298.

Nakao, M., Nakayama, T., Nagakura, K., and Ohta, H. (1980) Some problems in enzyme determination in red cells mainly due to the membrane structure, Hemoglobin, 4, 707-716.

Kaneko, A. and Stuart, A. E. (1980) Coupling between horizontal cells in the carp retina examined by diffusion of Lucifer yellow. Biol. Bull. 159, 486

Kaneko, A. and Tachibana, M. (1980) Correlation between response types and dendritic pattern of frog retinal ganglion cells. Integrative Control Function of the Brain. III, 67-69

Kaneko, A., Nishimura, Y., Tauchi, M. and Shimai, K. (1980) Distribution of afferent synapses along on-center bipolal cell axons in the carp retina. Biomed. Res. 1, 345-348.

Kaneko, A. and Tauchi, M. (1980) Ionic mechanisms underlying the depolarizing photoresponse of on-center bipolar cells in the carp retina. J. physiol. Soc. Japan, 42, 292.

Kaneko, A., Nishimura, Y., Tauchi. M. and Shimai, K. (1980) Contact of telodendron of red sensitive cones in the carp retina. XI Intern. Congress of Anatomy, Mexico, Abstr. 106

田内雅視・金子章道（1980）電気的応答から見た視細胞の性質，眼科 Mook 14，1－2　眼と電気生理，金原出版（東京）

A. Kaneko and T. Saito, (1980) Ionic mechanisms underlying photoresponses in the carp off-center bipolar cells. Neurosci. Lett., Suppl. 4, 63.

Kaneko, A. Nishimura, Y. Tauchi. M. and Shimai, K(1980) Physiological and Morphological studies of signal

pathways in the retina. Satellite Symp. of XXVIII Intern. Congr. Physiol. Sci. "Information Process in the Retina" Abst. 2.

Ohtska, T. (1980) Quantitative studies of the cone mosaic in the turtle retina. J. Physiol. Soc. Japan, 42, 289

大塚輝彌(1980) 亀網膜錐体の分布と配列, 日本動物生理学会抄録 38

Yamada, M. and Tauchi, M. (1980) Light-induced oscillatory response in rods of the bullfrog. J. Physiol. Soc. Japan 42, 298.

Tanaka, I. and Tauchi, M. (1980) Quantum sensitivity of single rods. J. Physiol. Soc. Japan. 42, 289

田内雅規・金子章道(1980) 網膜の双極細胞におけるシナプス電位の発生機序。日本動物生理学会抄録集, 17

金子章道・小幡邦彦共訳(1980)。クフラー, ニコルズ「ニューロンから脳へ」広川書店.

Tsukahara, N. (1980) Synapatic plasticity in the red nucleus. Proc. Intr. Congr. Physiol. Sci. 14, 43-44

Tsukahara, N. (1980) Editor's commentary, Integrative Control Functions of the Brain, vol. III 349

Maeda, J. and Tsukahara, N. (1980) Digital image processing system for measuring the dendritic

diameters of HRP-stained neurons, Integrative Control Functions of the Brain vol. III, 368-370

Oda, Y., Notsu, T. and Tsukahara, N. (1980) Associative conditioning mediated by the cortico-rubral synapses in the cat, J. Physiol. Soc. Japan, 42, 278

Banod, T., Tsukuda, K. and Tsukahara, N. (1980) Parasympathetic oculomotor neurons controlling lens accomodation in the cat, J. Physiol. Soc. Japan, 42, 261

Maeda, J., Murakami, F. and Tsukahara, N. (1980) A digital image processing system for measuring dendritic geometrical parameters of HRP stained neurons, Neurosci. Lett. S4

Tsukahara, N. (1981) Synaptic plasticity in the mammalian central nervous system, Ann. Rev. Neurosci. 4, 351-379

Tsukahara, N., Oda, Y. and Notsu, T. (1981) Classical conditioning mediated by the red nucleus in the cat. J. Neurosci. 1, 72-79

Tsukahara, N. (1981) Synaptic plasticity in the red nucleus. Adv. Physiol. Sci. Vol. 2 Regulatory Functions of the CNS. Subsystems

Kimura, M., Shiida, K. Tanaka, K. and Toyama, K. (1980) Three classes of area 19 cortical cells of the cat classified by their neuronal connectivity and photic responsiveness., Vision Res., 20, 69-77

Kimura, M., Komatsu, Y. and Toyama, K. (1980) Differential responses of "simple" and "complex" cells of cat's striate cortex during saccadic eye movements., Vison Res., 20, 553-556.

Toyama, K. (1980) Interneuronal interactions in three dimensional space of visual cortex., Abs. of XXVII Int. Cong. of Physiol. Sci. 262

Kimura, M. Komatsu, Y., Shibuki, T. and Toyama, K. (1980) Corollary motor inputs to striate "complex" cells of the allert cat during saccadic eye movements., Abs. of XXVIII Int. Cong. of Physiol. Sci. 513

Komatsu, Y., Shibuki, K. and Toyama, K. (1980) Responses of neurons in and around the Clare-Bishop area during photic stimulation and eye movements of the cat., Neurosci. Lett. Sup. 4, S69

Kimura, M. Komatsu, Y., Shibuki, K. and Toyama, K. (1980) Proc. Physiol. Soc. of Japan, 42, 284

外山敬介（1980）相関解析，脳の統御機能5　活性物質と神経回路網

Toyama, K. (1980) Neuronal mechanisms of visual cortical plasticity. in "Neuronal mechanisms of visual cortical plasticity" 65-77
A Wiely Medical Publication

外山敬介（1980）大脳視覚中枢の機能マップ，日本医事新報，2928, 142

外山敬介（1980）視覚中枢の神経生理学，日本医師会誌，84, 42

Yanagihara, K. and Irisawa, H. (1980) Inward Current Activated During Hyperpolarization in the Rabbit Sinoatrial Node Cell. Pflugers Archiv. 385, 11-19.

Noma, A., Kotake, H. and Irisawa, H. (1980) Slow Inward Current and its Role Mediating the Chronotropic Effect of Epinephrine in the Rabbit sinoatrial Node. Pflugers Archiv. 388, 1-9.

Yanagihara, K. and Irisawa, H. (1980) Potassium Current During the Pacemaker Depolarization in Rabbit Sinoatrial Node Cell.
Pflugers Archiv. 388, 255-260.

Yanagihara, K., Noma, A. and Irisawa, H. (1980) Reconstruction of Sino-atrial Node Pacemaker potential Based on the Voltage Clamp Experiments. Jpn. J. Physiol. 30, 841-857.

Noma, A., Irisawa, H., Kokubun, S., Kotake, H., Nishimura, M. and Watanabe, Y. (1980) Slow current system in the A-V node of the rabbit heart. Nature. 285, 228-229.

Kokubun, S., Nisimura, M., Noma, A. and Irisawa, H. (1980) The Spontaneous Action Potential of Rabbit Atrioventricular Node Cells.
Jpn. J. Physiol. 30, 529-540.

Irisawa, H. (1980) Cardiac pacemaker potential and neural regulation. Kodansha Scientific.
Integrative Control Functions of the Brain. Vol. 3, 185-195.

Irisawa, H. and Yanagihara, K. (1980) THE SLOW INWARD CURRENT OF THE RABBIT SINO-ATRIAL NODAL CELLS. in Developmeuts in Cardio Vascular Medicine Martinus Nijhoff, Hague.
THE SLOW INWARD CURRENT AND CARDIAC ARRHYTHMIAS. Vol. 7, 265-284.

Osterrieder, W., Noma, A. and Trautwein, W. (1980) On the Kinetics of the Potassium Channel Activated by Acetylchoine in the S-A Node of the Rabbit Heart. Pflugers Archiv. 386, 101-109.

西村昌雄，入沢 宏，(1981) 心筋細胞の自動性.
代謝 Vol. 18 No. 2 「心筋」 121-128

Tonomura, A., Matsuda, T., Endo, J., Arii, T. and Mihama, K. (1980) Direct observation of fine structure of magnetic domain walls by electron holography, Phys. Rev. Letters 44, 1430-1433.

Tonomura, A., Matsuds, T., Endo, J. Arii, T. and Mihama, K. (1980) Direct observation of magnetic domain structures of ferricles by electron holography, J. Electron Microsc. 29, 277.

Arii, T., Mihama, K., Matsuda, T. and Tonomura, A. (1980) Magnetic flux configuration of iron fine particles observed by Lorentz microscopy and electron holography, J. Electron Microsc. 29, 335.

Mita, S., Yasuda, H., Marunouchi, T., Ishiko, S. and Yama-da, M. (1980) A Temperature-sensitive Mutant of Cultured Mouse Cells Defective in Chromosome

Condensation, Exp. Cell Res. 126, 417–416.

学 会 報 告

東城博雅，堀池喜八郎，山野俊雄，志賀　潔，二科安三，亘　　弘
「D－アミノ酸酸化酵素と塩酸グアニジンの選択相互作用および単量体分子量の決定」
日本生化学会　53回大会　1980. 8. 東京

二科安三，志賀　潔，堀池喜八郎，東城博雅，笠井佐夫，松井邦夫，亘　　弘
山野俊雄
「リボフラビン結合タンパクに結合したフラボセミキノンの共鳴ラマンスペクトル」
日本生化学会　53回大会　1980. 8. 東京

亘　　弘，西川弘恭，安里令人
「リン脂質膜^{31}P－NMRスペクトルのSimulation」
日本生理学会　57回大会　1980. 3. 神戸

二科安三，志賀　潔，亘　　弘，堀池喜八郎，東城博雅
「フラビンセミキノンの共鳴ラマンスペクトル」
日本生理学会　57回大会　1980. 3. 神戸

志賀　潔，二科安弘，亘　　弘，堀池喜八郎，東城博雅
「変種フラビン（8－ネミノフラビン）のπ電子構造について」
日本生理学会　57回大会　1980. 3. 神戸

亘　　弘，矢内原昇，日置善雄，赤坂一之
「脳内活性物質の360プロントNMR」
NMR討論会　19回大会　1980. 9. 札幌

志賀暁子，上田　宏，志賀　潔，二科安三，亘　　弘
「薬剤 ― 蛋白相互作用の分光学的研究」
日本皮膚学会　31回中部支部総会　1980. 11 岐阜

矢内原　昇

「生理活性ペプチド－神経 Peptide の免疫化学」

第５５回日本医学会シンポジウム　1980. 6. 東京

矢内原千鶴子，永井賢司，矢内原　昇

「脳内モチリン免疫活性」

第4回神経科学学術集会　1981. 1. 京都

久木田文夫，山岸俊一

「神経興奮時のイオンチャンネルの大きさ」

日本生物物理学会　第１８回年会　1980. 10. 東京

古家喜四夫，山岸俊一

「２価イオン灌流による活動電位の誘発」

日本生物物理学会　第１８回年会　1980. 10. 東京

杉山博之，山下幸子

「ラット骨格筋アセチルコリン受容体の合成と分化」

第２３回日本神経化学会　1980. 11. 松山

原　輸吉，中尾　真

「Na, K-ATPase からの Na^{+} の遊離」

日本生化学会　1980

中尾真，中山年正，田端介富，道源正子

「超遠心沈澱によるヒト赤血球の変化」

日本生化学会　1980.

佐藤真悟，中尾真

「スペクトリン酸化の精製及び性質」

日本生化学会　1980

浦山　修，佐藤真悟，中尾　真

「膜中のNa，K－ATPaseに対する2価SH試薬の作用(II)」

日本生化学会　1980

藤田道也，大田英彦，上里忠良

「小腸上皮細胞滑面小胞膜の分離・精製」

日本生化学会　1980

中尾順子，中尾　真

「Na，K－ATPaseのNa^{+}型及びK^{+}型のみかけの分子量」

日本生化学会　1980

笹川　滋，本田憲治，村　　徹，柴　雅之（日本血液センター）　中尾　真，中川成之輔（東京医歯大）　中尾順子（都衛研）　中島俊秀，高倉孝一（クラレ中検）

「赤血球濃厚液の保存におけるマクレオシドの添加効果とその除去システム」

第28回日本輸血学会

中尾　真，道源正子，中川成之輔（東京医歯大）　中尾順子（都衛研）

「蕪糖添加新保存液ＡＩＳ－ＡＣＤの輸血後寿命」

第28回日本輸血学会

中尾順子，長井二三子（都衛研）　中尾　真（東京医歯大）

「蕪糖添加新保存液ＡＩＳ－ＣＰＤの保有効果」

第28回日本輸血学会

大田英彦，上里忠良，藤田道也

「ガラクトース転移酵素の固相測定法」

日本生化学会　1980

上里忠良，大田英彦，藤田道也

「離乳期におけるラット小腸アルカリ性ホスファターゼのFetus型からAdult型への移行」

日本生化学　1980

Terakawa, S.
Oscillatory response of squid axon membrane exposed internally and externally to a solution containing a single divalent-cation salt.
28th International Congress of Physiological Sciences 1980. 7 Budapest

Terakawa, S.
Periodic responses in squid axon membrane separating a single-salt solution.
Satellite Symposium of the 28th IUPS: Physiology and Pharmacology of Epileptogenic Phenomena.
1980. 7 Frankfurt-M

Terakawa, S.
Periodic responses in squid axon membrane separating a single-salt solution.
Symposium in honor of Torsten Teorell: Ion and Water Movement in Membranes. 1980. 7 Upsala

田内雅規，金子章道
「網膜の双極細胞におけるシナプス電位の発生機序」
日本動物生理学会　第2回大会　1980. 12 大阪

大塚輝彌
「亀網膜錐体の分布と配列」
日本動物生理学会　第2回大会　1980. 12 大阪

金子章道，立花政夫
「コイ網膜双極細胞の色受容野：double opponent cells」
神経科学学術集会　1981. 1 京都

A. Kaneko, Y. Nishimura, M. Tauchi and K. Shimai
"Physiological and morphological studies of signal pathways in the retina. "Sarellite Symp. XXVIII IU95 Congr. on "Information Processing in the Retina". 1980. 7 Austria

A. Kaneko and A. E. Stuart
"Coupling between horizontal cells in the carp retina examined by diffusion of Lucifer yellow.
Gen. Sci. Meeting of Marine Biol. Lab. 1980. 8
Woods Hole, Mass

塚原仲晃，藤戸　裕
「空間特異性と極性特異性をもつ神経回路の形成」
日本生物物理学会　第１８回年会　１９８０．１０　東京

村上富士夫，勝丸博信，塚原仲晃，斉藤基一郎
「ＨＲＰを用いて同定した赤核細胞の電子顕微鏡による研究」
日本生物物理学会　第１８回年会　１９８０．１０　東京

前田　純，塚原仲晃
「計算機画像処理によるＨＲＰ染色赤核ニューロンの計測」
日本生物物理学会　第１８回年会　１９８０．１０　東京

前田　純，村上富士夫，塚原仲晃
「ＨＲＰ染色赤核ニューロンの樹状突起の計測　―　計算機画像処理システムによる解析　―」
神経科学学術集会　第４回　１９８１．１　京都

村上富士夫，勝丸博信，塚原仲晃，斉藤基一郎
「赤核細胞のシナプス結合様式　―　ＨＲＰ細胞内注入ニューロンの電子顕微鏡による研究」
神経科学学術集会　第４回　１９８１．１　京都

藤戸　裕，窪田道典，塚原仲晃

「大脳皮質半側破壊仔ネコにおける赤核新生シナプス結合の特異性」

神経科学学術集会　第４回　１９８１．１　京都

小田洋一，野津起人，桑　一弘，塚原仲晃

「条件反射に伴う赤核ニューロンの電気活動」

日本生理学会　第５８回大会　１９８１．４　徳島

板東武彦，佃　健次，山本亘彦，塚原仲晃

「目の焦点調節を制御する大脳視覚連合領細胞について」

日本生理学会　第５８回大会　１９８１．４　徳島

斉藤基一郎，村上富士夫，勝丸博信，塚原仲晃

「ネコ赤核ニューロンとシナプスの形態計測学的研究 — ＨＲＰ細胞内染色法」

日本解剖学会　第８６回総会　１９８１．４　鳥取

外山敬介

「視覚領の３次元神経結合」

第２８回国際生理学会シンポジウム　１９８０．７　ブタペスト

外山敬介，小松由紀夫，木村　実，渋木克栄

「視覚領の複雑型細胞に対する眼球運動の随伴入力」

第２８回国際生理学会　１９８０．７　ブタペスト

小松由紀夫，渋木克栄，外山敬介

「視覚領複雑型細胞に対する遠心性コピー入力」

日本生理学会　第５７回大会　１９８０．３　神戸

外山敬介，小笹　徹

「３次元図形刺激に対するＣｌａｒｅ-Ｂｉｃｈｏｐ領ニューロンの反応」

神経科学学術集会　第４回　１９８１．１　京都

小松由紀夫，外山敬介，前田　純，坂口博信
「電流密度解析による大脳視覚領の可塑性シナプスの同定と局在の研究」
神経科学学術集会　第４回　1981. 1 京都

大村　裕，西野仁雄，粟生修司，山辺和俊，野田照実，吉松博信，服部希一，
S. K. シクダール，井上真澄，小野武年，佐々木和男，福田正治
「摂食行動におけるアカゲザル前頭前野ニューロンの活動」
第２７回生理学中部談話会

国分真一郎，小竹　寛，野間昭典，入沢　宏
「房室結節の遅い電流系について」
第５７回日本生理学会大会　1980. 3 神戸大学

野間昭典，小竹　寛，入沢　宏
「洞房結節におよぼすエピネフリン変時作用のイオン機序」
第５７回日本生理学会大会　1980. 3 神戸大学

国分真一郎，谷口淳一，野間昭典，入沢　宏
「心臓より単離した単一細胞の形態と活動電位」
第２７回生理学中部談話会　1980. 10 立山

野間昭典，国分真一郎，入沢　宏
「家兎洞房結節の緩徐内向き電流の解析」
第２７回生理学中部談話会　1980. 10 立山

Noma, A., Kokubun, S., Taniguchi, J.
Ionic mechanism underlying muscarinic acetyl-
choline response in the rabbit sinoatrial node.
GIF LECTURE IN NEUROSCIENCE, Nov. 1980, Paris

Irisawa, H., Noma, A.
Ionic mechanisms underlying the pacemaker
activity to the rabbit sinoatrial node cell.

WORKSHOP ON CARDIAC RATE AND ARRHYTHMIAS, Nov. 1980, AMSTERDAM

外村　彰，松田　強，遠藤潤二，有井達夫，美浜和弘
「電子線ホログラフィー法による強磁性微粒子の磁区観察」
第３５回日本物理学会年会　東京

外村　彰，松田　強，遠藤潤二，有井達夫，美浜和弘
「ホログラフィー干渉顕微鏡による強磁性体微粒子の磁区観察」
第３６回日本電子顕微鏡学会　横浜

有井達夫，美浜和弘，松田　強，外村　彰
「鉄の三次元微粒子における磁区構造の観察」
第３６回日本電子顕微鏡学会　横浜

Tonomura, A., Matsuda, T., Endo, J., Arii, T., Mihama, K.
「Direct observation of magnetic domain structures of feromagnetic particles by electron holography」
Proc. of European congress on Electron Microsc -opy 1980. Hague

外村　彰，松田　強，有井達夫，美浜和弘
「電子線木口グラフィーによる磁区観察法 － 膜厚効果の除去 －」
日本物理学会 1980 年秋の分科会　福井

共同研究報告

神経芽細胞腫由来NG 108－15 細胞の薬理学的及び生理学的性質

昭和 54 年度
共 同 研 究

東田陽博（名大環境医学研究所），芳賀達也（浜松医大）
杉山博之（生理研）

神経芽細胞腫由来の雑種細胞NG 108−15細胞は，電気的興奮性を示すほか，アモチルコリンを合成し，筋肉細胞と機能的なシナプスを形成する。等神経細胞の特徴的な性質を示し，神経の有力なモデルと考えられる。我々は，この細胞の各種薬物に対する反応性を電気生理学的および生化学的な方法を組合せ用いることによって検討した。特に，前年度の共同研究の結果をうけついで，α−アドレナリン性の薬物に対する作用に主な重点を置いて，細胞の反応の有様，受容部位の特徴，シナプス機能に対する影響の有無について検討した。本年度の共同研究によって，次のような結果が得られた。

1） NG 108−15 細胞膜上には，明らかにα−受容体が存在することは，昨年度の共同研究の予備的結果から明らかであったが，本年度は，そのα−受容体部位の薬理学的性質を更に詳しく検討し，その性質はα−受容体のうちでも，特にα_2型と言われるものであることが分った。

2） 電気生理的な応答の目安として，細胞膜電位の変動を用い，アセチルコリン，セロトニン，ドーパミン，アドレナリンに対する応答を検討した。その結果，NG108－15 細胞はアセチルコリン，ドーパミン，セロトニンに対しては 3 ～10秒続く最高26～30 mVの脱分極を示すにも拘らず，アドレナリンに対しては有意の応答を示さないことが分った。

3） NG108－15 細胞と骨格筋細胞との間のシナプスの機能に対するアドレナリンの作用を検討した。筋肉細胞より検出されるMEPPの頻度で見る限り，アドレナリンの投与はNG 108 −15 細胞・筋肉細胞間シナプスの機能に，積極的な影響を及ぼさないことが分った。

以上の結果及び既に発表されているアデニレート・サイクレースに対するアドレナリンの作用の結果を総合すると，この細胞のα−受容体の反応様式は，しばしば言われているような「受容体活性化 ⟶ 環状 AMP レベルの変動 ⟶ 膜電位応答」という図式では必ずしも説明できず，別の反応機構を考える必要があるとの結論を得た。

（文献）

神経化学 （Bulletin of the Japanese Neurochemical Society ）１８巻1979年

NG-hybrid 細胞の機能と微細形態の関連性についての解析

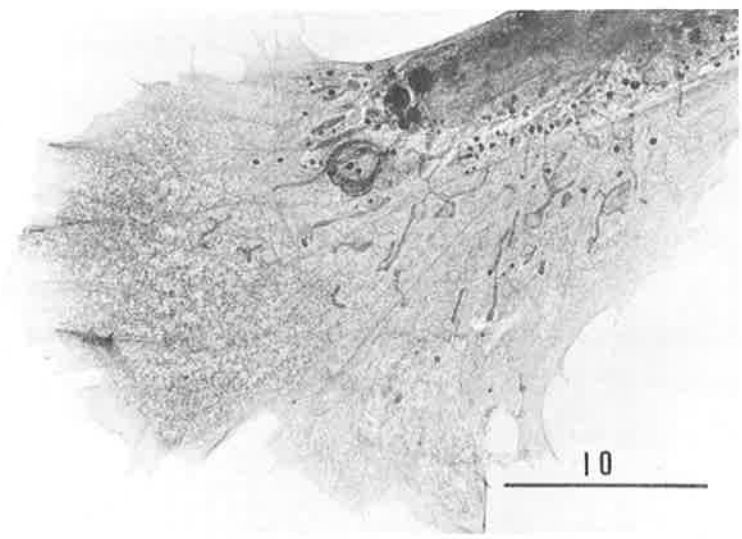
濱清（東大医科学研究所）
杉山博之，古家園子（生理研）

NG-hybrid細胞の微細構造，特に細胞全体像の観察のため，whole mount 細胞の超高圧電顕観察を計画した。

培養細胞の超高圧電顕観察には従来フォルムバールを張った金メッシュ上に培養した細胞を用いられていたが，この培養条件は細胞の形態観察に適しない事が分った。そのため今研究年度においては超高圧電顕観察に適した培養，標本作製法の開発のための実験を行い次のような方法でほぼ満足すべき結果を得た。直径5㎜の孔を多数あけたサーモノックス板に厚いフォルムバール膜をはる。このサーモノックス板に培養した細胞を37℃アルデヒド固定液で15分間固定，よく洗ってから1％OsO_4で5分間後固定，1％酢酸ウランで5分間洗色後アセトン脱水。液体CO_2で置換後臨界点乾燥を行う。5㎜径の孔の部分にメッシュセメントを塗った銅メッシュを押しつけて，フォルムバール膜と共にサンプルをメッシュに移す。このサンプルを1000KVで立体観察することにより細胞内の膜系，繊維系，微細梁等の3次元的構成を知ることができた。

（文献）

Hama, K.（1980）Whole mount observation of cultured cells. "38th Ann. Proc. Electron Microscopy Soc. Amer. ", San-Francisco, California, G. W. Bailey（ed）. 802-805.



臨界点乾燥を行った培養細胞の1000KVEM像

生物試料における分子間相互作用の研究
QuasiD-アミノ酸酸化酵素の精製とその性質

志賀　潔，　二科安三，　亘　弘（生理研）
堀池喜八郎，東城博雅，山野俊雄（阪大医）

D-アミノ酸酸化酵素は腎，肝，脳に存在するフラビン酵素（ビタミンB_2含有酵素）の一種であり，D-アミノ酸（グルタミン酸，アスパラギン酸を除く）を酸化してケト酸を生成する酵素である。その生理作用は未だ明らかでないが，神経化学伝達物質であるグリシンが本酵素のよい基質となる事，および自然界にD-アミノ酸が存在し一定の役割を示す事等の事実は，本酵素の生理作用解明が近い事を示唆していよう。この事とは別に，本酵素はオキシダーゼ型フラビン酵素の典型例として極めて頻繁に研究材料として使用され，また合成アミノ酸の光学分割等にも有効に用いられている。

本研究ではD-アミノ酸酸化酵素精製の過程で本酵素のアイソザイムと考えられる酵素（Quasi D-アミノ酸酸化酵素）の存在を確認し，精製に成功したので報告する。

この酵素はD-アミノ酸酸化酵素とともに，フラビン酵素研究材料として有効に利用されうる事又，精製において両酵素の混入には十分の注意が払われねばならない事を本報告で強調したい。

Quasi D-アミノ酸酸化酵素の精製は豚腎を用いて行うが，その方法はすでに確立されているD-アミノ酸酸化酵素に対するのと同じであり，この両酵素はヒドロキシアパタイトを用いたクロマトグラフィーにより分離される。即，D-アミノ酸酸化酵素はQuasi D-アミノ酸酸化酵素より先に溶出される。（図1，両酵素のハイドロキシアパタイトによるクロマトグラム。DはD-アミノ酸酸化酵素を，QはQuasi D-アミノ酸酸化酵素を示す）。

両酵素の分子量はわずかに異っており（D-アミノ酸酸化酵素の分子量はQuasi に比べ700程度大），アミノ酸組成にも少々のちがいがあるが，スペクトル的性質は両者極めて類似している（図2，上段はQuasiの，下段はD-アミノ酸酸化酵素のスペクトルを示す。A：吸収スペクトル，B：CD スペクトル）。

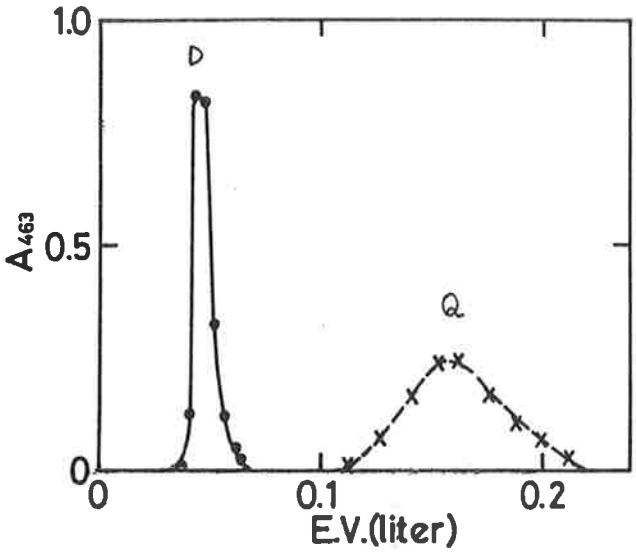


図1　ハイドロキシアパタイトによるクロマトグラム。
（説明は本文参照）

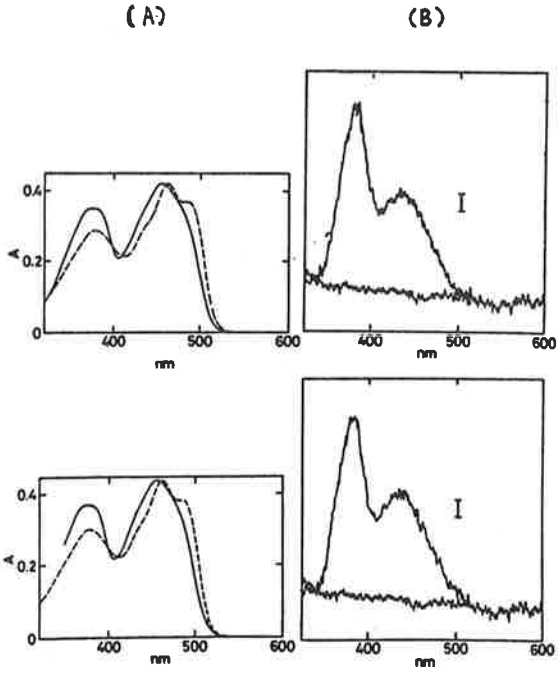


図2　吸収スペクトルと円偏光二色性スペクトル
（説明は本文参照）

網膜内神経回路網の機能分化における役割

金子章道（生理研），斉藤建彦（聖マリアンナ医大）
山田雅弘（電総研）

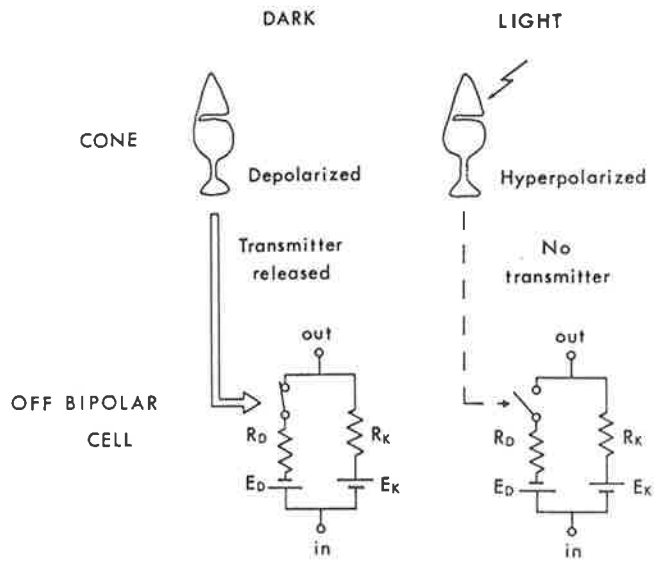
脊椎動物網膜の双極細胞には，受容野中心部の光照射に対して脱分極性の応答を示すON中心型細胞と，過分極性の応答を示すOFF中心型細胞が存在し，これら2つのタイプの間には形態学的な差異も認められている。視細胞はいずれのタイプのものでも光照射により過分極性の応答を示すので，双極細胞に見られる2つの応答のタイプは第2次ニューロンである双極細胞側のシナプス後膜の性質によって決定されていると考えられる。ON型双極細胞ではスポット光照射による脱分極応答に伴って入力抵抗が減少すること，応答の逆転電位は＋40 mV附近に存在すること，シナプス伝達をブロックすると膜電位は光照射による脱分極とほゞ同じレベルまで脱分極するが，この脱分極は外液のナトリウム濃度に強く依存することなどから，光照射に伴いシナプス後膜のナトリウムイオン透過性が亢進して応答が発現するものと考えられている。視細胞から放出される伝達物質はON型双極細胞のシナプス後膜に対しナトリウムイオンに対する膜透過性を抑制しているものと思われる。本研究ではON型との対比において，OFF型双極細胞の応答が発現するシナプス機構の究明を目的として実験を行った。

剥離し，灌流液中に保ったコイ網膜のOFF型双極細胞から細胞内記録を行ない，二連式微小電極を用いて応答の膜電位依存性を検討した。また灌流液のナトリウム濃度を変えて応答のナトリウムイオン依存性を調べた。光刺激には直径200 μm の白色小光点，内径1㎜外径3㎜の環状光を用いた。刺激光強度は最大応答の得られるところとした。

数十例のOFF型双極細胞につき実験を行った。スポット光に対する過分極性応答は膜を過分極させると振幅が増大し，脱分極させると減少し，＋60 mV附近で応答の反転が見られた。半数以上の例において過分極性の光応答に伴い入力抵抗が増加した。1 mMのコバルトイオンを含む灌流液を与えてシナプス伝達を遮断すると，膜電位は過分極し光応答は消失した。また外液のナトリウムイオンを除去しても細胞は過分極し，光応答が見られなくなっただけでなく電場による視細胞刺激（視細胞側から硝子体側へのパルス電流の印加）によって生じたOFF型双極細胞の一過性脱分極も消失した。以上の結果からOFF

型双極細胞の応答は図に示すように，暗時視細胞から持続的に放出されている伝達物質によって双極細胞の膜のナトリウムイオン透過性が高く保たれており，脱分極状態にあるものが，光照射により脱促通的に発生したものと説明される。

このように視細胞の伝達物質の作用が2次ニューロンの性質によって異なり，二様の応答を発生させていることは誠に興味深い。伝達物質は一種類なのか二種類なのかという問題は伝達物質の同定と共に今後の課題である。



図，暗時及び光照射時の視細胞からの伝達物質の放出とOFF型双極細胞に対する作用。暗時視細胞は脱分極していて伝達物質が持続的に放出されている。この伝達物質はOFF型双極細胞のシナプス後膜に作用してナトリウムイオンに対する膜透過性を増大させている。その結果細胞は脱分極した状態にある。光が照射されると視細胞は過分極し，伝達物質の放出が止むため，シナプス後膜のナトリウムイオン透過性は減少し，膜電位はEkに近づく。

Kaneko, A. and Saito, T. Ionic mechanisms underlying photo-responses in the carp off-center bipolar cells. Neurosci. Lett. Suppl. 4, S63, 1980

上皮膜組織での輸送駆動力と輸送速度のエネルギー論的研究

今井雄介，藤本　守，小寺邦彦，窪田隆裕，佐々木貞雄
中垣育子，村上政隆（大阪医大）亘　弘（生理研）

外分泌腺，腎尿細管といった体内に折りたたまれた単層上皮膜では分泌または吸収といった生命体にとって不可欠な大量の物質輸送が行われている。上皮細胞では，一方の膜が外界に面し，他方の膜が生体内界に面している。一方の膜が物質を取り込むとき，他方の膜は放出の役割を担う。この方向性ある物質輸送は輸送上皮膜の特徴であり，内から外へ向うとき分泌，外から内へ向うとき吸収と呼ぶ。一般に神経またはホルモンがこの上皮膜輸送を制御するが，変化は分泌において劇的であり，吸収において緩徐である。今回イヌ唾液腺およびカエル腎尿細管での上皮膜輸送系における輸送駆動力と輸送速度の測定を行い，生物学的また物理化学的なエネルギー的側面につき検討を加えた。

輸送過程は散逸的である。即ち輸送が行われている所では何らかの形のエネルギーが消費されている。エネルギーは生物学的な代謝反応の形で直接供給されることもあるが，そのエネルギーを電気化学ポテンシャルとして蓄積し，輸送にはこの二次的なポテンシャルエネルギーが用いられるときもある。前者は能動輸送と呼ばれ，後者は受動輸送と呼ばれている。従って上皮細胞膜における電気化学ポテンシャル差を測定することは極めて重要である。藤本・小寺・窪田は再吸収機能を主とするカエル近位尿細管細胞の各種イオンの電気化学ポテンシャルプロファイルを二連または三連式の微小イオン電極法を用いて（細胞膜電位と細胞内イオン活量の同時測定）決定した。上皮細胞膜および経上皮的な各種イオンの電気化学ポテンシャル差より，拡散駆動力の大きさと方向を調べた。調べられたイオン種はK^+，Na^+，Cl^-，H^+，HCO^-_3の多種にわたるものである。さらに各種の代謝阻害剤またはアミノ酸，糖などの作用を検討した。今井，佐々木，中垣，村上等は電気化学ポテンシャルを構成する膜電位と濃度差を別個に測定した。即ちイヌ顎下腺につき終末部分泌細胞の細胞内電位を測定し，分泌神経の刺激が著しい過分極を惹き起すことを見た。また細胞内イオン濃度の決定には組織イオン含量のフレームフォトメターによる測定と共に，組織を急速凍結し，その新鮮凍結超薄切片を凍結乾燥し，電顕レベルでの各種元素濃度の分布をX線マイクロアナライザーで調べた。すべての研究で一致した結果は輸送上皮細胞においては常に細胞内を負とする大きなNa^+

の電気化学ポテンシャルが存在するということである。即ち細胞内へのNa^+流入のエネルギーはこのポテンシャルエネルギーから供給され，さらに各種成分の共輸送のエネルギーにも用いられる。一方Na^+の細胞からの放出過程は常にポテンシャル勾配に逆うもので，代謝反応と直結した能動輸送が想定される。能動輸送過程は前記の電気化学ポテンシャル差を維持する機構とさらに積極的にNa^+を放出する機構の二つがある。前者は上皮膜細胞の基底側方膜にあるNa^+-K^+ATPaseによるポンプ機構によるもので，イヌ顎下腺については中垣等により，その局在が証明された。後者はNa^+を対イオンであるCl^-と共に輸送する機構で，上皮膜における水輸送はこのポンプの働きによる局所浸透現象が基本となる。しかしこのポンプ機構はエタクリン酸により特異的に阻害されるということ以外については多くは解っていない。一方村上，今井はこの散逸的なイオン輸送過程に伴う熱発生過程をイヌ唾液腺につき測定した。静止時の腺は約10 mWg^{-1}の熱発生があるが，分泌時にはこれが数十mWg^{-1}に上昇する。しかしこの輸送時の熱発生について受動過程による部分と能動過程による部分に分離することはできていない。今井等はイヌ唾液腺の灌流実験を通じて，イオン輸送速度を測定した。血管側の分析から，腺細胞基底側方膜を介する各種イオンの流束，唾液側の分析から腺腔側膜を介するイオン流束を求めた。また正味のイオン流束は水輸送を伴うものであるので，これらの過程を全組織コンダクタンスの変化から求める新しい手段を導入した。これにより分泌刺激が組織間液の細胞内液への移動を起すものであることが明らかになった。分泌刺激は膜透過性に変化を起すものであるので村上，亘はさらに膜の相転位に関して温度走査型微小熱量計を用いて研究している。

輸送駆動力（X_i）と輸送速度（J_i）の積はエネルギー速度またはパワーの次元を持つ。回路網熱力学的に考察すれば，上皮膜組織の各部分での各種イオン流束とその電気化学ポテンシャル差の積であるパワーは，その部位で遊離されるエネルギー速度か，または，符号が逆ならば供給されなければならないエネルギー速度を示すものである。上皮膜でのNa^+輸送についてみると細胞に入るときはエネルギーが散逸し，細胞を出るときにはエネルギーが代謝反応等から供給される。今回の研究を通じて上皮膜輸送に伴うエネルギーの流れについての定量的な考察が一部可能となった。

（文献）

Imai, Y., Mori, H., Murakami, M. & Yosida, H. :J. Theor, Biol. 77(2) 115 (1979)

Nakagaki, I. , Goto, T. , Sasaki, S. & Imai, Y. : J. Histochem. Cytochem. 26 (10) 835 (1978)

Fujimoto, M. & Kubota, T. : Jpn. J. Physiol. , 26 631 (1976)

Kubota, T. , Honda, M., Kotera, K. & Fujimnto, M. : Jpn. J. Physiol. 30 775 (1980)

培養神経細胞の成長と粘弾性

竹中敏文，吉岡　亨（横浜市大）
山岸俊一，杉山博之（生理研）

細胞の分化，増殖，成長等生体膜の活性化に伴い，流動，活性化エネルギーが高まることはよく知られている。この活性化エネルギーを測定するには膜の粘弾性を測定すればよい。しかし膜の粘弾性の測定は意外に困難で，従来は1977年にShinitzkyとInber が蛍光色素の配向を利用したマイクロ粘度測定法があるのみである。我々は膜の粘弾性が超音波の吸収により測定し得ることを利用して，培養神経細胞の成長に伴う粘弾性の変化を測定しようと試みた。超音波による測定は，200 MHz超音波発生器，及び超音波顕微鏡を用いた。試料としては厚さ5 μのマイラーフィルムにコラーゲンを塗付し，この上に種々の細胞を培養した。この培養細胞を超音波顕微鏡で観察することからはじめたが，たちまち種々の改良を余儀なくされた。その改良点は以下のようにまとめられる。

(1) 膜上にはわせた培養細胞が振動により簡単にはがれて浮遊しはじめるのでこれを防止する方法を見出す。

(2) マイラーフィルムのシワが，光学顕微鏡の干渉稿のようになって観察の邪魔をするのでフィルムの張り方を工夫する。

(3) 現在の顕微鏡の解像力は種々の制約のため，あたかも 4 × 10 倍の光顕に等しい解像力しかないため，これを少くともあと10倍 アップして，細胞の核が見えるようにする。

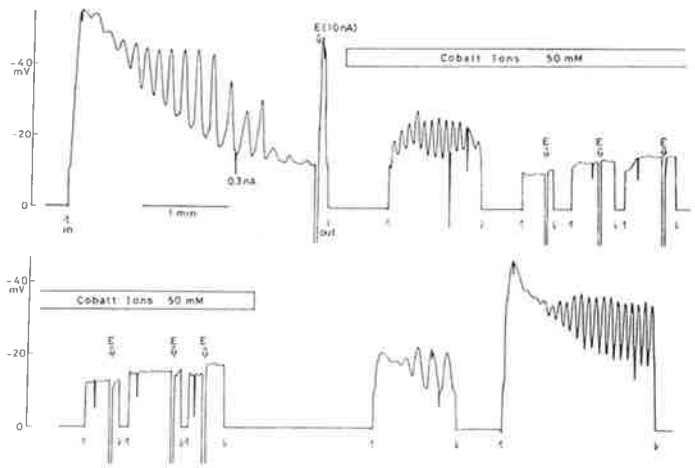
すでに米国では商品化され，光顕用の固定した切片では染色なしで核が観察されている。そこで初期の目的を一ランク下げて，イカ巨大星状神経節の部分をグルタール固定し，約20 μの厚さに切って，pre-synaptic nerv と post-synaptic nerv の接合部を観察した。その一例を下図に示す。



培養線維芽細胞の過分極性膜電位応答のイオン機構

岡田泰伸，土屋和興，矢田俊彦（京大医）
山岸俊一（生理研）

培養線維芽L細胞は，膜への電気的，機械的刺激に対して一過性の過分極応答を示すところの一種の「興奮性」を持っている。又，この細胞はlow density lipoprotein（LDL），及びhigh density lipoprotein（HDL）の膜表面投与による化学的刺激に対しても過分極応答を示す。適当な条件下では，このような膜応答を自発的・周期的に繰返すところの膜電位振動をも示す。これらの過分極応答は，それが機械的・電気的域いは化学的刺激により誘発されたものであれ，自発的・反復性に生じたものであれ，膜のK^+コンダクタンスの増大に困る事は，この膜応答の逆転電位がK^+の平衡電位に等しい事などにより明らかである。A 23187や，電気泳動法によりCa^{2+}を細胞内注入する事により過分極が引起される事から，このK^+コンダクタンス増は細胞内Ca^{2+}濃度増によりトリッガーされる事，即ちいわゆるCa^{2+}-activated K^+ channelの開口により引起される事が結論される。又，この事は，Ca^{2+}-activated K^+channelの阻害剤であることの知られているquinine，quinidineでこれら膜応答が抑制される事からも支持される。そして，細胞外をCa^{2+}-free条件にしたり，Ca^{2+}存在下でも適当量のCo^{2+}（図），Mg^{2+}，Ba^{2+}，La^{3+}，ruthenium redを細胞外に与えることにより，これら膜応答はすべて抑制されるところから，この膜応答時の細胞内Ca^{2+}



（図）Co^{2+}による膜電位振動及び過分極応答の抑制。E：電気刺激（10nA）。in：微小電極刺入。out：微小電極抜去

濃度増の原因は細胞外からのCa^{2+}流入にある事，及びその通路はおそらくCa^{2+} channel である事が結論される。Ca^{2+}channel 阻害剤として知られている処のnifedipine やD－600 によりこの膜応答が速やかに可逆的に抑制され，このとき細胞内Ca^{2+}注入を行うとやはり過分極が引起される（即ち，K^{+} channel はこれら薬物により損傷を受けていない）ことからもこの結論は支持される。膜電位振動の発生メカニズムに関しては未だ充分明らかではないが，おそらく形質膜上のCa^{2+}ポンプによるCa^{2+}排出と，Ca^{2+} channel によるCa^{2+}流入がフィードバック的に働く事により，ある条件下で細胞内Ca^{2+} 濃度に振動現象が生み出される事に由るものと考えられるが，その点に関してはCa^{2+}ポンプの役割の実験的証明をも含めて現在研究中である。

（文献）

1)) Y. Okada, W. Tsuchiya & A. Inouye (1979) Oscillations of membrane potential in L cells.
IV. Role of intracellular Ca^{2+}in hyperpolarizing excitability. J. Membrane Biol. 47, 357 － 376

2) Y. Okada, W. Tsuchiya, T. Yada, J. Yano & H. Yawo (1981) Phagocytic activity and hyperpolarizing responses in L-strain mouse fibroblasts. J. Physiol. (London) 313 (in press)

3) W. Tsuchiya, Y. Okada, J. Yano, A. Inouye, S. Sasaki & Y. Doida (1981) Effects of cytochalasin B and local anesthetics on electrical and morphological properties in L cells. Exp. Cell Res.(in press)

筋紡錘における機械受容変換機構の超微小形態

伊藤文雄（名大医），出崎順三（愛媛大医）
亘　　弘（生理研）

筋紡錘神経末端でCa スパイクが発生していることをIto&Komatsu[1]は発見した。このCa^{2+}が筋紡錘のどこに貯留し，何によって処理されているかをしらべる目的で，この研究を行なった。トノサマガエル縫工筋または半腱様筋から筋紡錘を単1分離する。支配感覚神経を嚢のすぐ外側の有髄節で空気隔絶し，その両側のリンガー液槽からカロメル電極で電位を誘導する。予じめテトロドトキシン1×10^{-6} g/mℓ を与えて，Na スパイクを遮断した後，筋紡錘を両端に向かって差動伸張する。その間にCa スパイクが発生することを確かめる。この標本を20 mM$Cacl_2$ リンガー液中で12時間，4℃に保在する。その後，電子顕微鏡でCa の所在を追求した。

その結果，内嚢中に多数のCa 顆粒が貯留していることを発見した。この内嚢には無髄神経を取り囲むようにムコ多糖が存在し，Ca はそれらのムコ多糖に貯留しているように見える。無髄神経末端には多数のミトコンドリアがある。これらの結果から我々は，無髄神経を取り囲んでいるムコ多糖にCa を貯留していて，筋伸張に伴なって無髄神経内へCa が流入すると想定する。それによって神経末端は脱分極され，受容器電位が起る。それによってCa スパイクが引金される。無髄神経内に入ったCa^{2+}はミトコンドリアにより処理されると考えている。

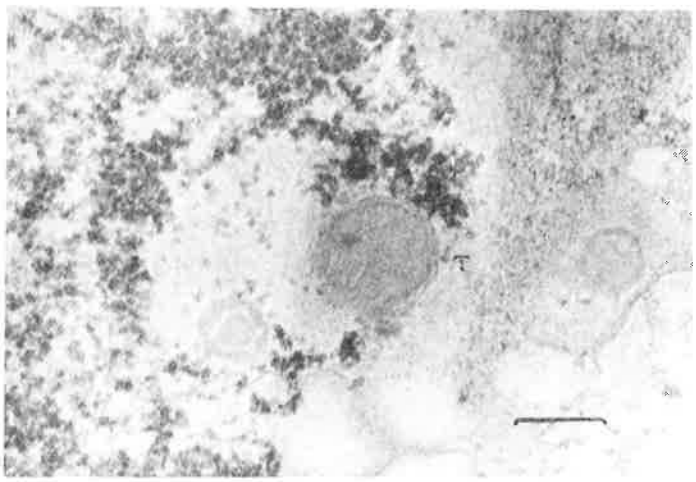


図1　カエル筋紡錘内嚢中のCa貯留
T：無髄神経末端，較正0.5 μm

1) Ito, F & Komatsu, Y. (1979) Calcium-dependent regenerative response in the atterent nerve terminal of the frog muscle spindle. Brain Res. 175, 160-164.

レーザーラマン分光による細胞膜の物理化学的性質の解析

二科安三，亘　弘，志賀　潔（生理研）
西野輔翼，岩島昭夫（京都府立医大）

マウス由来の線維芽細胞である３Ｔ３細胞および３Ｔ３細胞をsimian virus 40で悪性化させた細胞より，それぞれ細胞膜画分を分離し，その脂質成分の性質の差をレーザーラマン分光法により解析した。まず，これらの生体試料を用いた場合，純品の脂質で報告されている1050 − 1150 cm^{-1} 領域におけるピークを検出できるかどうかについて検討を行なった。室温による測定ではhydrocarbon chainのtrans conformationを反映すると考えられる1070および1130 cm^{-1}付近にピークが検出された。一方，gauche conformationによる1085 − 1090付近のピークは検出できなかった。また，検出できたピークの位置は，純品の脂質から得られるピークの位置とは多少ずれていた。

本研究の目的を達成するためには，膜脂質のtrans／gauche 比を求める必要があり，gauche conformationからのシグナルも検出されなければならない。

そこで，sampleの濃度の検討，sampleにレーザー光線を照射する位置の検討などを行なっている。

一方，DPH により細胞膜をラベルし，蛍光偏光を測定することにより，membrane fluidityを測定している。室温においては，細胞が悪性化することにより，fluidityが減少するという結果が得られている。これは，アミノ酸の膜輸送の変化から予期していた結果とは逆の結果となるが，しかし，この実験結果は，whole cellを用いての結果であり，細胞膜画分でのfluidityを測定した上で考察すべき問題である。

測定温度を変化させることによりfluidityがどのように変化していくかを測定し，その結果と，レーザーラマン分光測定によりtransition temperatureを求めた結果とを結合して，正常および悪性化細胞膜の差を明らかにする計画である。

神経膜の組織化学的研究

平野　寛，西山文朗，川井範夫（杏林大，医）
山岸俊一，古家喜四夫（生理研）

神経膜の内表面の分子的な構築に関する組織化学的検索の報告は殆どなく，極めて興味ある検討の対象である。本共同研究においては細胞内灌流を行ったヤリイカ巨大神経線維を用いて細胞膜内表面に対する①Concanavalin A（Con A），②フェリチン標識 Con A（Fer－Con A），③Cationized Ferritin（CF），④Native Ferritin（NF）の結合効果について電子顕微鏡による検討を行った。

Con A（50～100$\mu g/m\ell$，PH7.0），Fer－Con A（50$\mu g/m\ell$，pH 7.0～7.2）は結合が認められず，マンノースを中心とした糖鎖は膜内表面に存在しないと考えられる。

NF（0.5$mg/m\ell$，pH7.3）についても結合像は認められず，膜内表面には殆どプラスに帯電した残基は殆ど存在していないと推測される。

一方，CF（0.5$mg/m\ell$，pH 7.3）は神経膜内表面における明瞭な結合像が認められた。これは膜内表面にはマイナスに帯電した残基が存在している証拠であろう。

次年度はCF 結合状態の時間的経過をしらべつつ，膜興奮の生理状態と併せて検討を進める計画である。

培養神経細胞の生理学的性質とinuitroにおける発達

福田　潤，亀山正樹，山口和彦（東大・医・生理）
山岸俊一（生理研）

神経細胞が形質膜を合成しつつ突起を伸ばしている時，新らしく出来た形質膜がどのような生理学的性質を持つか，特に膜興奮に関与するイオンチャネルや化学容容に関与する受容器蛋白分子が持つ性質を調べる目的で，種々の神経細胞の培養を試みた。現在，主に脊髄神経節細胞について多角的に解析をすすめており，相応の成果を得たのでそれについて報告する。

成熟モルモットの後根神経節を無菌条件下で摘出した後，コラゲナーゼ処理を加え，震蕩によって神経細胞を単離する（図１）。次いで神経細胞をコラゲン被覆したプラスティック皿上で培養液とともに37℃でインキュベートする。神経細胞は突起を伸ばしはじめ（図２），数日后に非常に長い複雑な突起を形成する（図３）。このようにして得られた培養神経細胞を倒立位相差顕微鏡下で直視しながらガラス管微小電極を刺入して電気生理学的性質を調べた。

1）培養神経細胞の静止膜電位は－40～－65 mVであり，入力抵抗は20～30 MΩ，入力容量は50－70 μF，時定数は1.2－2.0 msecであった。

2）培養神経細胞はNa スパイクとCa スパイクを生じた。

3）Na スパイクには２種類の成分があることが判明した。１はフグ毒（TTX）感受性のあるNa スパイク，他はTTX-耐性を示すNa スパイクであった。

4）この２種のNa スパイクは長期間（１ケ月）の培養期間中，著明な変動を示さなかった。

5）Ca スパイクは培養開始直后には小さいが，数日にして大きくなり最大値に達する。更に培養をつづけると，小さくなる傾向が観察された。これは膜中のCa チャネルの密度が変化するものであると考えられる。

6）培養神経細胞はGlutamate，GABA，カテコラミン類に感受性を示したが，Aehに対しては大きな感受性を示さなかった。

（文献）

J. Fukuda and M. Kameyama, Enhancement of Ca spikes in nerve cells of adult mammls during neurite growth in tissue culture. Nature 279, 564－548（1979）.

J. Fukuda and M. Kameyama, Tetrodotoxin-sensitive and tet-

rodotoxin-resistant sodium channels in tissue-cultured spinal ganglion neurons from adult mammls. Brain Research 182, 191 - 197 (1980)

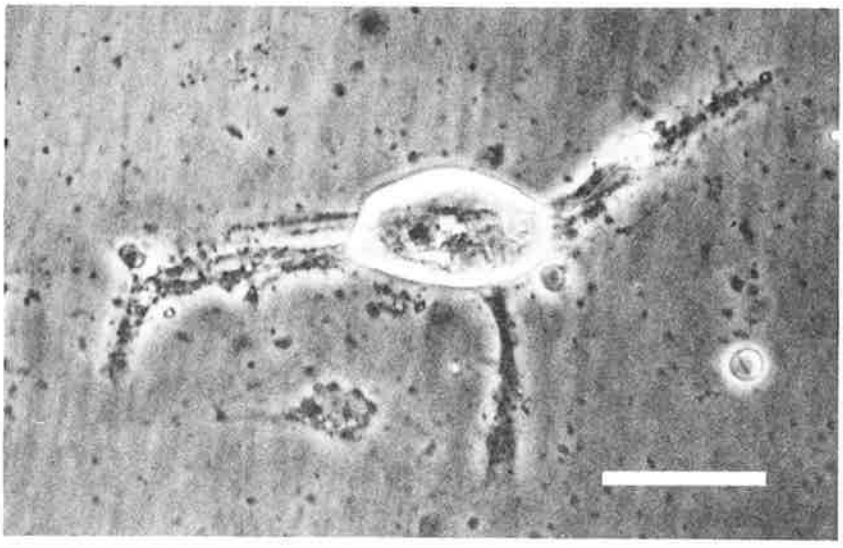
J. Fukuda and M. Kameyama, A tissue-culture of nerve cells from adult mammalian ganglia and some electrophysiological properties of the nerve cells in vitro. Brain Res 202, 249 - 255 (1980)

J. Fukuda. All-or-none action potentials in nerve cells of adult mammals during neurite outgrowth in tissue culture. Dynamic Aspect of Bioelectrolytes and Biomembrane, Kodansha, Tokyo. (in press)



図１：モルモット後根神経節細胞コラナーゼ処理によって神経節より単離，軸索がついているのが見える。（50μm）

図２：モルモット後根神経節細胞培養開始后２日目，神経突起の再生が観察される。（50μm）



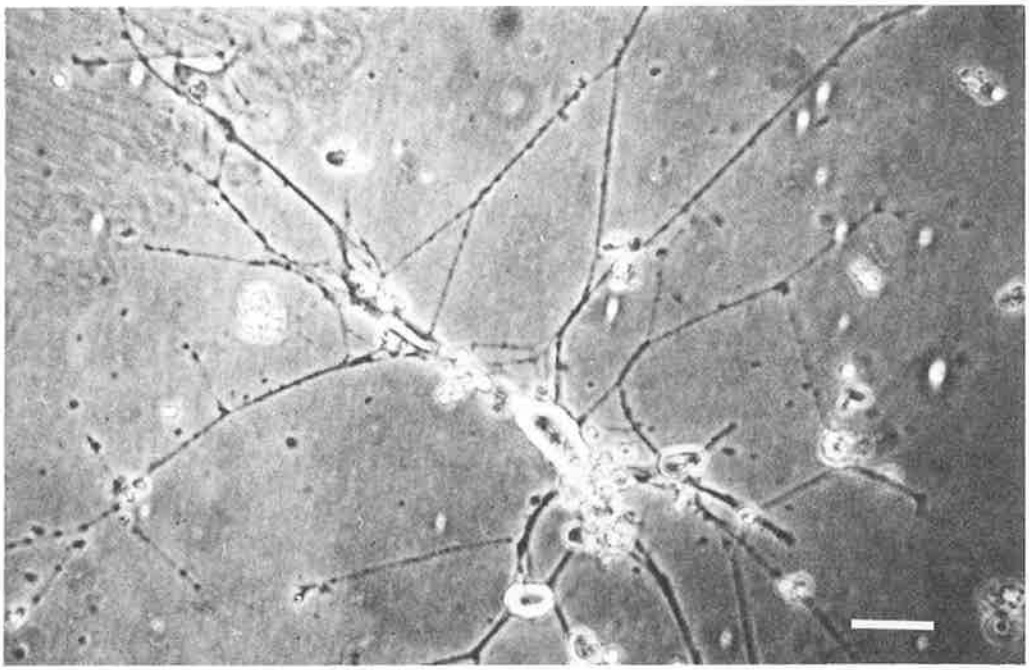


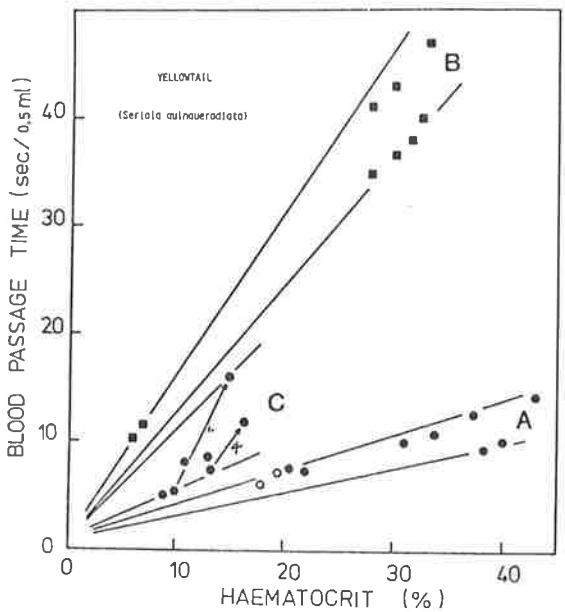
図3：モルモット後根神経節細胞
培養開始后5日目，長い神経突起の
再生が観察される。　（50μm）

赤血球変形能の比較研究

C. M. Hughes（ Bristol大比較動物呼吸生理）
菊池佑二，小山富康（北大応電研）亘　　弘（生理研）

序）毛細血管内での血液の流動性を決めるものとして，近年，赤血球の変形能が重視されて来ている。これまで，主にヒトの赤血球についての研究から，赤血球膜の弾性，血球内ヘモグロビン溶液の粘性，血球膜内面と血球内蛋白質の間の相互作用，血球膜外面と血漿蛋白質の間の相互作用等が赤血球変形能を規定する因子であることが明らかにされてきている。又，これ等の因子が血球の代謝状態，加令等によって変化することも知られている。下等脊椎動物の赤血球は，内部に核，ミトコンドリアを含み，代謝が盛んであることなどから，哺乳類の無核赤血球に比して，上記の諸因子の変形能に及ぼす影響がより著明に表われることが期待される。本研究では，血液を比較的大量に取ることのできる魚（ブリ）を用い，ヘパリン採血した新鮮な全血について赤血球変形能の比較検討を行なった。

方法）赤血球変形能を定量化するためこれまで種々の方法が試みられて来ているが，ここでは半自動微小孔通過法を用いた。これは赤血球の直径より小さい一定径の微小孔を多数持つニュークリポアフィルター膜に血液を一定圧力差で流し，その通過速度から赤血球変形能の指標を得る方法である。全血について迅速に測定できる利点を持ち，明確な物理量とは云い難いが，微小循環に対してより適切な指標となる赤血球の微小孔通過時間（ Kikuchi et al 1980, Experientia 36, 325 ）を再現性よく求められるものである。



結果）魚から採血する三つの方法によって得られる試料について検討した。A．頭部挫傷により不動化した後，直ちに心臓から採血する。これによって得られる血液は正常状態の静脈血に近いものと考えられる。B．麻酔下に背側大動脈にカテーテルを挿入し，固定

する手術を行なう。手術完了後直ちにカテーテルから採血する。このときは血液の酸素分圧が著しく低い。C．麻酔及び手術の負荷から回復した後，カテーテルから慢性的に採血する。この方法によれば，麻酔の影響がなく正常呼吸状態の下でよく酸素化された血液を得ることができる。図1に示すように血液のフィルター通過速度は採血方法によって著しく異なる。各採血方法によって血液の何らかの性状が異なることが予想されるが，この図は性状の差異が著明に赤血球変形能に反映することを示している。血液の酸素レベルが採血法によって異なることは上記の通りであるが，予備実験では意外なことに低酸素状態でむしろ微小孔通過性が高まるという知見が得られ，B法によって得られた血液の成績と矛盾することになった。何が最も大きい要因であるかについては詳しい検討を要する興味深い問題である。

カテーテルから採血を繰返すと，一般に赤血球の減少，ヘマトクリットの低下を来すが，逆にヘマトクリットが増加する場合も見られる。その際，血液のフィルター通過速度はヘマトクリットの増加分から予想される以上に低下する（図中の矢印で示した変化）。これは循環血液中に新たに遊離される赤血球の変形能が低いことを示唆するものと思われる。

図2に心臓から採血したA群について赤血球の微小孔通過時間の温度依存性を示した。※印を付した縦棒は37℃ のヒトの赤血球の通過時間の分布範囲を示す。ブリの正常温度15℃ から温度を上げていくと赤血球の通過時間は著明に短くなってくる。図2に見るとおり，37℃ではヒトの赤血球とほぼ同じ時間で直径5 μmの微小孔を通過するようになる。ブリの赤血球はヒトの赤血球の約1.5倍の体積を持つこと，内部に核を持つことなどから，ヒトの赤血球に比べて著しく通過時間が長くなるのではないかと思われたが，得られた結果は予想に反するものであった。

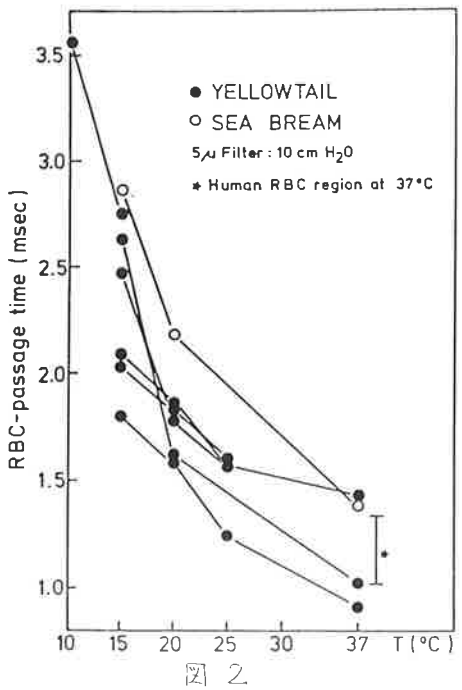


図 2

結語）有核赤血球の核は赤血球の変形能にさほどの障害とならないこと，並びに何らかの状況変化により変形能は大巾に低下することが明らかとなった。細胞の物理的性質と化学的性質との関連を研究する一般的観点からも，魚の赤血球は有用な材料になり得るものと思われ，今後更に研究を継続していく考えである。

シナプス機能の生化学的形態学的研究

田中　亮（名市大医）
山岸俊一，杉山博之（生理研）

(1) Ca，Mg-ATPase

放出に何らかの形で関与すると考えられるこの筋肉様収縮性タンパク質の局在を，ネズミ脳のシナプトソームを使い酵素化学的に調べた。これはシナプス小胞に集中しており，従来の考え方と異り，シナプス小胞とシナプス前膜の触合の時に，膜タンパクを移動させ膜脂質の部分を露出させる働きがあると解釈するのが妥当である。

(2)シナプス前後膜

シナプス前後膜の結合部に糖タンパク質ガラクトシル転移酵素の活性が高い事が判った。膜の相互認識と結合に関し，中枢神経系のシナプス以上に厳密さを要する場合は例が少ないと考えられるので，我々はネズミ脳のシナプス結合部を単離し酵素活性を他の膜画分と比較，検討した。その結果はシナプス前膜と後膜の認識結合に糖タンパク質転移酵素－糖タンパク質基質が関与する事とシナプス小胞とシナプス前膜の認識結合に糖タンパク質の糖部分の付加が関与する事の２つの可能性を示唆した。

(3)放出機構への微小管の関与の可能性

ラット脳のチューブリンとウサギ骨格筋ミオシンが定量的に共沈したり，Ca-ATPase 活性を上げたりし，緊密な相互作用をすることを我々は発見した。これは微小管系と収縮タンパク質系間に直接の相互作用があり，それが系の機能に影響を与え合っていること，系が共同して機能していることの可能性を示唆した。

1) Fujii, T., and Tanaka, R. "Interaction of Rat Brain Microtubule Protein and 6S Tubulin with Rabbit Skeletal Muscle Actomyosin" Life Sciences 24, 1683-1690, 1979.

2) Goodrum, J. F., Bosmann, H. B., and Tanaka, R. Neurahem, Res. 4 331- 337, 1979.

"Glycoprotein Galactosyltransferase Activity in Synaptic Junctional Complexes Isolated from Rat Forebrain"

3) Takeda, M., and Tanaka, R. "Stimulation by Subsynaptosomal Fractions of Transmitter Efflux from plain Synaptic Vesicle Fractions" Neuroch, Res. 4, 643-654, 1979.

VIP分泌細胞のニューロン性およびパラニューロン性特性の解析

昭和55年度
共同研究

矢内原　昇（生理研），藤田恒夫（新潟大医）
菅野富夫（北大獣医）

神経伝達物質様あるいは神経分泌ホルモン様の物質を分泌細胞内の分泌果粒に含んでおり，放出刺激をうけて分泌果粒内容を開口放出によって細胞外に放出するという性質をもった細胞群にたいして1975年藤田はParaneuronという名称を与えた。この名称は，胃腸膵内分泌系gastro-entero-pancreatic endocrine system の研究から発展してきたという背景があり，胃腸膵ホルモン分泌細胞のニューロン様の性質が形態学的，生化学的，生理学的に研究されてくることによって次第に豊富な内容を表わすようになってきている。VIP も，その発見当初は腸粘膜に散在する腸ホルモン分泌細胞から分泌されるものと考えられていた。やがて，VIP の特異的抗体が得られ，その抗体によって免疫組織化学的に検索すると，VIP のほとんどすべてがニューロン内に局在するという報告が現われてきた。Fahrenkrug らは，腹部迷走神経を電気刺激すると低閾値でAchが，高閾値でVIPが放出されることから，両方ともに同一迷走神経の化学的伝達物質である可能性について論じている。

矢内原はVIPを合成し，それにたいする特異的抗体を作った。藤田はその抗体によって免疫組織化学的にVIPの検索を続け，ヘビElaphe quadrivirgata（Boie）の膵島の毛細血管周囲にVIP陽性の神経終末を多数発見した。その部分を電顕で観察して，毛細血管周囲腔に多数の神経終末があることが明らかにされた。膵島のA，B，D細胞の間にわりこむようにして，神経分泌細胞の終末のように，VIP を含むと思われる神経終末が毛細血管周囲に終る像をイヌについても観察した。膵島の血管には，膵島内脈系と名付けられているように，動脈が膵島の中心部に真直ぐに入り，中心部から膵島周辺の膵外分泌腺に向って放射線状に分布しているという血管系もあり，このような血管系がウマなどで特に発達していることが確かめられている。菅野らはCCK の膵外分泌作用をインシュリンが増強し，この増強効果は膵島内脈系で現われることを示す証拠をいくつかあげている。VIP神経の上記のような局在と，VIP の血管拡張作用とを考えあわせると，VIPの生理的作用の一つは，膵島内脈系の血流の保持にあるものと推定される。VIP神経が，刺激時にVIPをPhasic に放出するほかに，相当量のtonic にも放出することはFahrenkrug らや菅野らが

報告してきたところである。摘出ネコ腸管灌流標本からのＶＩＰのtonic放出は，灌流液中のＣａ イオンに依存することを菅野らは報告している。さらに矢内原研究室と菅野研究室との共同研究によって，ブタでは，麻酔下で数分間，周期の増減リズムをもったＶＩＰのtonicな放出があることを確かめた。

最近，帯広畜産大学解剖学教室の山田は，ネコの幽門粘膜に，ＶＩＰ の２万倍稀釈抗体でも染めわけることのできる閉鎖型内分泌細胞を発見した。藤田研究室の岩永は腸管壁在神経叢にＶＩＰ神経があることを確かめている。これらの報告は，本共同研究に関連した研究集会で発表された。

ニューロンとパラニューロンに共通するペプチドの一つとしてＶＩＰ をとりあげ，共同研究を行ってきた。今日，一般に理解されているPhasicなＶＩＰ放出のほかに，tonic な放出があり，その役割は膵島内脈系などの血管系の拡張効果にあるものと推定される。このような役割以外のＶＩＰ の役割についても研究をすすめてゆく必要があろう。

参考文献

1. Yanaihara, N., Sakagami, M., Sato, H., Yamamoto, K., Hashimoto, T., Yanaihara, C., Ito, Z., Yamaguchi, K., & Abe, K. (1977) Immunological aspects of secretin, substance P, and VIP. Gastroenterology 72:803-810.
2. Fujita, T. & Kobayashi, S. (1979) Proposal of a neurosecretory system in the pancreas. an electron microscope study in the dog. Arch histol. jap. 42:277-295.
3. Fujii, S., Kobayashi, S., Fujita, T., & Yanaihara, N. (1980) VIP-immunoreactive nerves in the pancreas of the snake, Elaphe quadrivirgata(Boie): another model for insular neurosecretion. Biomed. Res. 1:180-184.
4. Kanno, T. & Saito, A. (1980) A comparison of secretory actions of VIP, secretin and CCK-PZ in the isolated and erfused kitten pancreas. Endocrin. Jap. S. R. 1, 51-57.
5. 菅野富夫，原田悦守，葉原芳昭，矢内原昇，矢内原千鶴子 (1981) 膵内外分泌相関とニューロン，第１回膵ホルモン研究会記録 (Biomedical Research Foundation) 印刷中

電気化学的勾配の有無による膜タンパク配向の変化

浦山　修，中尾　真　（東京医科歯科大）
杉山博之，山岸俊一　（生理研）

生理的条件下で電気化学的勾配に寄与する陽イオンはNa^+，K^+であるが膜両側のNa^+，K^+濃度の変化に応じてナトリウムポンプNa，K−ATPaseのチャネルタンパク部位は露出部位を変ずる事が予想される。ポンプ活性はヒト赤血球では弱いので膜内外を区別できるものとして培養細胞を検討した所以下にのべる様に意外な興味ある結果が得られたので別題名の下にまとめつつある。

方法

マウス神経芽腫N 18TG 2とラット膠腫C6Bu1を用い，この2種を，aBcAMP（N18では分化促進が知られている）の培地への添加・無添加の4系列で培養し，それぞれのNa ポンプ活性の強弱を調べた。活性測定はホモジネートあるいは細胞膜分画について，（$\partial-^{32}P$）ATPの分解で生じるウアバイン感受性部分の^{32}P をイソブタノール抽出後液体シンチレーションによって行った。

結果・考察

(1)　N18およびC 6細胞のホモジネートのNa，K−ATPase比活性（μmol pi／mg／hで示す）はそれぞれ0.2および0.5でN18細胞膜では 0.5と 2.5倍の比活性の上昇があったが，C 6細胞膜では活性上昇はみられなかった。これらの比活性はラット脳重ミクロソーム分画の約1／100，ヒト赤血球膜とほぼ同じ値であった。これらの細胞は脳起源のものであるがNa，K−ATPaseは低下していると考えられる。

(2)　aBcAMP添加系との比較では，N18が無添加0.21，添加0.16，C 6がそれぞれ0.5，0.54でその影響はほとんど認められなかった。

(3)　N18およびC 6の細胞膜Na，K−ATPaseはともに2mMウアバインでほぼ完全阻害されるが，1 μm時にはN18の残存作性が55%，C6の方は90%とN18は脳型，C 6は腎型のアイソザイムに分類できそうである。N18が脳型に属するNa，K−ATPase活性を示した事は，はじめて得られた知見であるので確認を急ぎたい。N18とC 6は興奮性にも違いがみられるらしいので生物学的にも重要な意義をもち又目的とする生化学，生理学的材料としても，極めて有望であると考えられる。

脊椎動物網膜におけるシナプスの機能と微細構造

嶋井和世，西村陽三（慶応大・解剖）袋谷賢吉（富山大・工）
金子章道，田内雅規（生理研）

網膜にある光受容細胞のうち錐状体細胞はそのシナプス端である錐状体小足に数本のbasal filamentsを有していることが知られている。しかし，この突起に関する検討はほとんどなされておらず，特にその働きに関しては僅かな知見があるにすぎない。そこで，この突起とそれを取り巻くneuropilとの関係をHRPを細胞内注入した錐体について検討した。

5％HRP溶液を詰めた微小電極を錐体に刺入し，電気的応答を記録しスペクトル感度を同定した後，電気泳動法によってHRPを細胞内注入した。図に示す細胞はDiamino benzidineにて発色させた光学顕微鏡像では隣接する2個の細胞に反応生成物が見られ，両細胞に同時にHRPが注入された事を示している。この標本を再包埋後の超薄切片法にて電子顕微鏡観察を行なうと，共に複錐体のうちの主錐体であった。

このシナプス端は写真の如く電子密度の高い反応物の存在により判別が可能で，さらにそこから突出するbasal filamentsも複雑な外網状層内で判別が容易であった。このbasal filamentsの走行とそれが接触する細胞を検索する前に外網状層を構成する細胞の微細構造上の同定基準を示す。

水平細胞の細胞体と樹状突起：水平細胞の細胞体はその位置と形態にて容易に同定できる。細胞体にはneurofilamentが豊富に存在し，その細胞質の電子密度を高くしている。free-ribosomesも多数散在し，mitochondriaやGolgi apparatusも多数認められる。external horizontal cellの外網状層に面する細胞質内に，しばしば多数の小胞を認める。樹状突起は細胞体と同様にneurofilamentsやfree-ribosomesを豊富に含むが，mitochondriaやGolgi apparatusを含んでいる像はほとんど認めない。

双極細胞の樹状突起：この突起内にはmicrotublesが並走し，mitochondriaも存在するがその数は水平細胞のものと比較するとかなり少ない。細胞質の電子密度は水平細胞よりも低い。

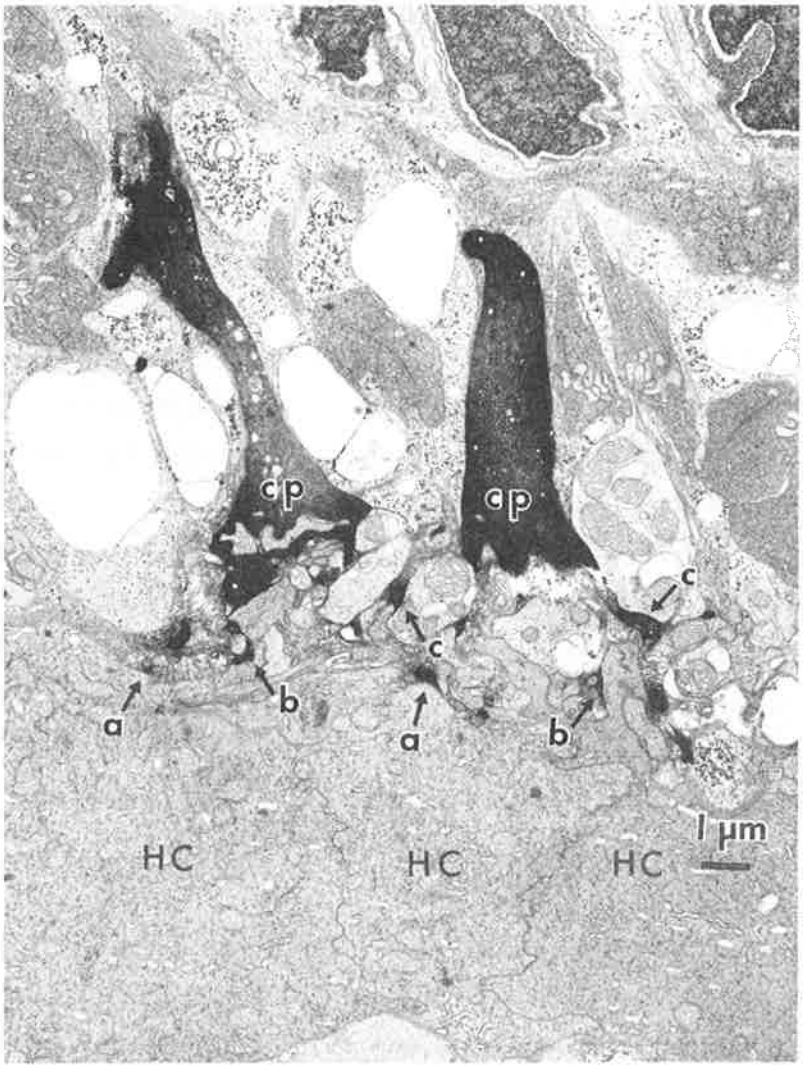
basal filaments：直径約0.2 μの太さの突起で，その走行中に太さをあまり変化させない。その細胞質は多量の線維性物質から構成され，外網状層内で最も高い電子密度を示す。この突起はしばしば錐体小足にあると同様な小

胞を含んでいる一方，free-ribosomes やmitochondriaを含んでいる像はほとんどない。

Miiller細胞：細胞質内にグリコーゲン顆粒を多量に含んでいることと，外網状層を形成するどの細胞よりも電子密度が低く，明調であることにより容易に同定できる。

HRPが注入されたbasal filamentsとその周囲の接触関係を上記同定基準をもとに検索すると，以下の如く5種類の関係が認められた。(1)水平細胞の細胞体との接触（図，矢印ａ）。(2)水平細胞の樹状突起との接触（図，矢印ｂ）。(3)双極細胞の樹状突起との接触（図，矢印ｃ）。(d)錐状体細胞の basal filaments との接触。(e)近隣の錐状体小足への陥入とそこでの接触。これらの部位では basal filaments の細胞膜と相手の細胞の膜が単に対立しているのみならず，わずかながら互いの膜の電子密度が高くなっている。加うるに水平細胞の樹状突起との接触，双極細胞の樹状突起との接触，他の basal filaments との接触部位ではいずれの basal filaments もその膜がやや電子密度を高くしている部分に，その小足にあったと同様の小胞を含んでいる。一方水平細胞の細胞体では細胞体側にやや小形の小胞を含んでいる。しかしこれらの所見は一般的な化学シナプスの条件を満たしていない。従って現在はこれらをシナプスと判定はできないが，さらにこれらの詳細について検討中である。

A. Kaneko, Y. Nishimusa, M. Tauchi & K. Shimai, Contacts of telodendria of red-sensitive cones in the carp retina. XI Intern. Congress of Anatomy, Abstr. 106, (1980)



ＨＲＰを注入した２つの錐体の小足（ＣＰ）とそこから突出する basal filament Basal filanent は他の錐体，水平細胞，双極細胞と接触を作るが，図では，水平細胞体との接触（矢印ａ），水平細胞の樹状突起との接触（矢印ｂ），双極細胞の樹状突起との接触（矢印ｃ）が認められる。ＨＣ：外水平細胞．

細胞内灌流による単一心筋イオン電流の解析

赤池紀生，西　勝英（熊本大学医），倉岡俊介（銀杏短大）
入沢　宏，野間昭典（生理研）

コラゲナーゼをカルシウムを含まないタイロード液に溶かし，これを心臓冠血管に灌流すると心筋細胞を比較的良い状態に保ったままで結合織を溶解することができ，単一に分離された細胞を得る事ができる。この様にして得られた細胞はパウエル等（1980）によって最初に電気生理学的検討がなされたが正常の活動電位を記録する事ができなかった。今回の共同研究ではそれぞれ独自に開発してきた技法をさらに改良するため，共同実験を行い得られた分離細胞電気的活性を調べた。その結果，1)コラゲナーゼ濃度は0.04％で処理時間は40分から1時間位（35－36℃），灌流圧は約60 *cm*静水圧の時最も収量がよい事，2)分離後1－2時間高カリウム（110 mM），低クロライド（25 mM），無カルシウム液に保つ，3)開胸手術は人工呼吸下，できるだけ冠血流を止める事なくカニューレを大動脈に挿入し灌流を始める事等によって得られた細胞の状態を有意に改良できた。さらに心臓各部から細胞を分離し，それぞれの活気的活動を記録した結果次のような事が明らかになった。1)洞房結節や房室結節から得られた細胞は組織標本で記録されたものと同様の自発興奮を示し，活動電位の各パラメーターはほぼ正常であった。2)これ等の細胞の自発興奮はアセチルコリンで抑制され，アドレナリンで促進された。3)アセチルコリン投与によって誘発される過分極反応は従来測定されてきた100 msec よりもはるかに短く30 msec 以下である。4)心室筋活動電位は100～300 msec のプラトー相を示し，この細胞の緩徐内向き電流は正常に保たれている事を示していた。5)アドレナリンを投与するとプラトー相はより正電位側に移動すると共にその延長が認められた。6)静止電位は5.4 mM カリウム濃度で－70.3±6.2 mV，10.8 mM で－70.3±6.2 mV でカリウム電位に依存している事がわかった。以上の結果はコラゲナーゼ処理によって得られた心筋細胞はそれぞれの組織部位特有の活動電位を示すのみでなく，神経伝達物質に対する反応の機序も正常に保っている事を示している。またアセチルコリンに対する応答の潜時が骨格筋終板電位に比較して著しく長いとする従来の測定結果はムスカリン受容器ではアセチルコリンの結合に続いて細胞内反応機序が存在すると考える根拠であったが，本実験の結果はアセチルコリンと受容分子の結合体がイオンチャンネルである

かあるいは密接にイオンチャンネルに結合しており，イオンチャンネルの開時間が長い事とチャンネル密度が低い事によって比較的遅い反応の時間経過が記録されるとする仮説（ Noma & Trautwein, 1978 ; Noma, Peper, & Trautwein, 1979 ）を支持している。

Noma, A., and Trautwein, W:(1978) Relaxation of the ACh-induced potassium current in the rabbit sinoatrial node cell. Pflugers Arch., 377 ; 193-200

Noma, A., Peper, K., and Trautwein, W.: (1979) Acetylcholine-induced potassium current fluctuations in the rabbit sinoatrial node. Pflugers Arch., 381 ; 255-262

Powell, T., Terror, D. A. and Twist, V. W. ; (1980) Electrical properties of individual cells isolated from adult rat ventricular myocardium. J. Physiol., 302 ; 131-153

生体膜構成素子の動態と機能との関連

西川弘恭，吉崎和男，小栗顕二（京府医大）
亘　　弘（生理研）

生体膜構成素子であるリン脂質の極性部位は，膜を構成する脂質－脂質，脂質－蛋白質，および脂質－膜周囲溶液中のイオンとの間の相互作用に主たる役割を担っている。これらの相互作用を明らかにするには，脂質のパラフィン部分ではなく極性基部分を直接観測する必要がある。この目的のためにリン脂質極性部位のリン原子を^{31} P－核磁気共鳴（^{31} P－NMR）法で観測し，リン脂質と Ca^{2+} イオンとの相互作用ならびにコレステロールの影響を検討するとともに，赤血球ゴースト膜のみならず，カエル脊髄索でもリン脂質のスペクトルが検出できたので報告する。さらに蛍光色素であるANSを用い，生体膜と麻酔薬との相互作用についても検討した。

赤血球ゴースト膜の^{31}P－NMR スペクトルには線巾の広い2つの共鳴線がみられ，低磁場側はphosphatidylserineとphosphatidylethanolamineに，高磁場側は，phosphatidylcholineとsphingomyelin によるものであり，Ca^{2+} イオンにより低磁場側はbroadening を生じて消失する。赤血球ゴースト膜を構成するこれらのリン脂質と Ca^{2+} イオンとの相互作用ならびにコレステロールの影響を調べたところ，phosphatidylserina の極性基部は Ca^{2+} イオンによるbroadening を最もうけやすく従って生体膜でもこのリン脂質の極性部に Ca^{2+} イオンが結合しやすいと考えられる。さらにコレステロールはsphingomyelin の共鳴線巾を著明に減少させるとともに，phosphatidylserineと Ca^{2+} イオンとの相互作用を促進させることが明らかとなった。従って生体膜でもリン脂質極性基部の Ca^{2+} 結合能や運動性にコレステロールが修飾しているものと思われる。

一方，生体試料として食用ガエルの脊髄索の^{31}P－NMR スペクトルを測定すると，灌流を行いつつ生きた状態に保つと糖リン酸エステル，無機リン酸，モノリン酸エステル，およびクレアチンリン酸が検出でき，嫌気的条件下ではクレアチンリン酸の減少や無機リン酸の増加がみとめられた。ところでこの脊髄索を小断片にしてこれらの可溶性リン化合物を洗い流した後，ミエリン中のリン脂質の検出を目的としてスペクトルを測定したところ，－1.9と－0.5 ppm に狭い共鳴線と＋13.4 ppm に巾広い共鳴線が出現した。この高磁場側の共鳴

線は，静磁場の方向と試料の方向との間の角度依存性を示し，さらに超音波処理後の脊髄索ではこの共鳴線は消失した。脊髄索から抽出したliposomeでは低磁場側と高磁場側に巾広い共鳴線を示した。従ってこれらの共鳴線は生体膜での特異な構造性を反映していると考えられる。

またdipalmitoyllecithinで人工膜をつくり蛍光物質であるANS でラベルすると，その蛍光がガス麻酔薬で減少することが知られている。ところが赤血球ゴースト膜やシナプトゾームなどの生体膜では，むしろその蛍光強度が増加し，ガス麻酔薬に対する生体膜の特異性が明らかとなった。さらに生体膜でのガス麻酔薬による蛍光強度の増大は，ANS の蛍光の量子収率の変化によるものでなく，従って麻酔薬はANS の生体膜での結合部位の増加をきたしたと考えられる。そこでこの結合部位の増加に伴なう結合部位の種類の差の有無を検討するために，ANSの蛍光寿命の変化を調べた。しかし臨床麻酔濃度よりも高濃度の各種ガス麻酔薬を用いても，その蛍光寿命に有意な変化は見出せなかった。従ってガス麻酔薬は単にANS の結合部位の増加を来たしたものと思われる。

（文　献）

Nishikawa, H., Fujii, T., Yamada, S., Yoshizaki, K. & Watari, H.（1980. 4）

^{31}P nuclear magnetic resonance study on perfused brain slices of guinea pig.

J. Biochem.　87,　P663-666.

西川弘恭，吉崎和男，安里令人　（1980. 2）

核磁気共鳴の医学への適要

脳神経外科　8,　P131-136.

西川弘恭，吉崎和男，安里令人　（1980. 8）

MMRの生体組織への応用

生物物理　20,　P253-257.

小栗顕二　（1980. 12）

麻酔と生体膜

麻酔　29, P1577-1594.

神経膜の細胞化学的研究

平野　寛，西山文朗（杏林大医）
山岸俊一，古家喜四夫（生理研）

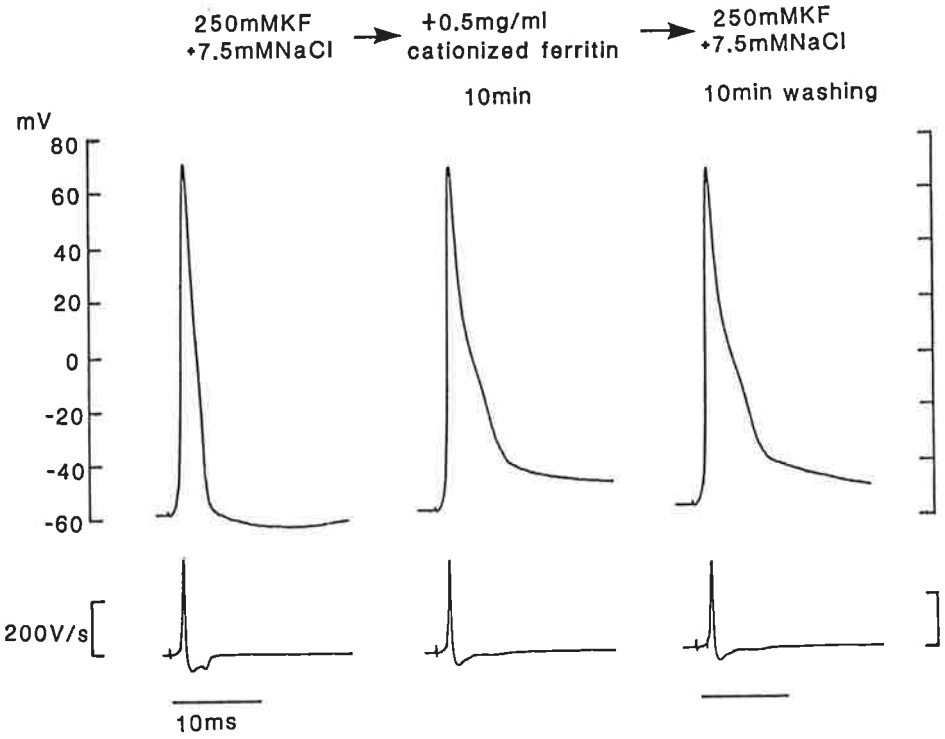
通常のフェリチン分子（native ferritin, NF; pI≒4.6）をカチオン化した陽性荷電フェリチン（cationized ferritin, CF; pI≒7.8）が細胞表面に結合すると，レクチンや抗体など多価性リガンドを作用させた場合と同様，膜外表面に沿って結合部位が移動し，クラスター（Cluster）や集塊を形成，細胞内へ急速にとり込まれる，という所見を平野らがこれまでに報告している。

一方，細胞膜内表面における結合様式については，殆ど知られていない。本共同実験においては神経膜内表面に直接CFを作用させて，電顕的及び電気生理学的観察とを同一標本で平行して行い，CFが細胞膜内表面に結合した結果を検討した。

ヤリイカ（Doryteuthis bleekeri）巨大神経線維をとりだし，ローラー法で細胞質成分を外側に排出し，pronase（Calbiochem，最終濃度0.01／%）を含む細胞内灌流液（50mM KF, Hepes, pH 7.4）で神経膜内表面を露出させ，洗滌（250mM KF, Hepes, pH7.4），未固定のまま或いは0.1～2%グルタルアルデヒド前固定後，CF又はNF（0.5mg／mℓ, Pentex-Miles, 250mM KF, Hepes, pH 7.4）を9～11℃にて3，10，20，又は30分間神経膜内表面に直接作用させた。一部の標本はCFと10分間反応後，CFを含まぬ液（250mM KF, Hepes, PH7.4）にて30分間保った。反応時及びその前後の過程を通じ活動電位を平行して記録した。但し外液は人工海水（520mM Nacl, 5mM Kcl, 50mM $Cacl_2$, Hepes, pH8.0）を用いた。反応後，洗滌，アルデヒドとオスミウム酸による二重固定を経て通常のエポン包埋薄切標本を作製，透過型電子顕微鏡にて観察した。

巨大神経線維外側はシュワン細胞や結合組織により被覆されているが，神経膜内表面は機械的及び酵素処理により露出している（写真参照）。未固定のまま反応させると，CF投与3分後には既に膜内表面に瀰漫性にCFが結合している。反応10分後には膜内表面に沿いCFの集塊が形成される（写真）。前固定標本ではCFは膜内表面上にほぼ一様に結合分布する。一方膜活動電位は，未固定のままCFと反応させるとduration（約2msec）が2倍程度に延長

される。静止電位（ −50ｍＶ ）及び活動電位（ 120ｍＶ ）には殆んど変化がなかった。膜電位固定法（ Voltage clamp ）によると，内向きＮａ電流は延長するが，外向きＫ電流は変化を示さなかった。膜活動電位に対するＮＦ の影響は認められなかった。細胞膜内表面においてもＣＦ は結合する。結合したＣＦ は膜を構成する高分子を架橋し，ひいてはＮａ Channel の開く時間が延長される方向に作用することが示唆される。



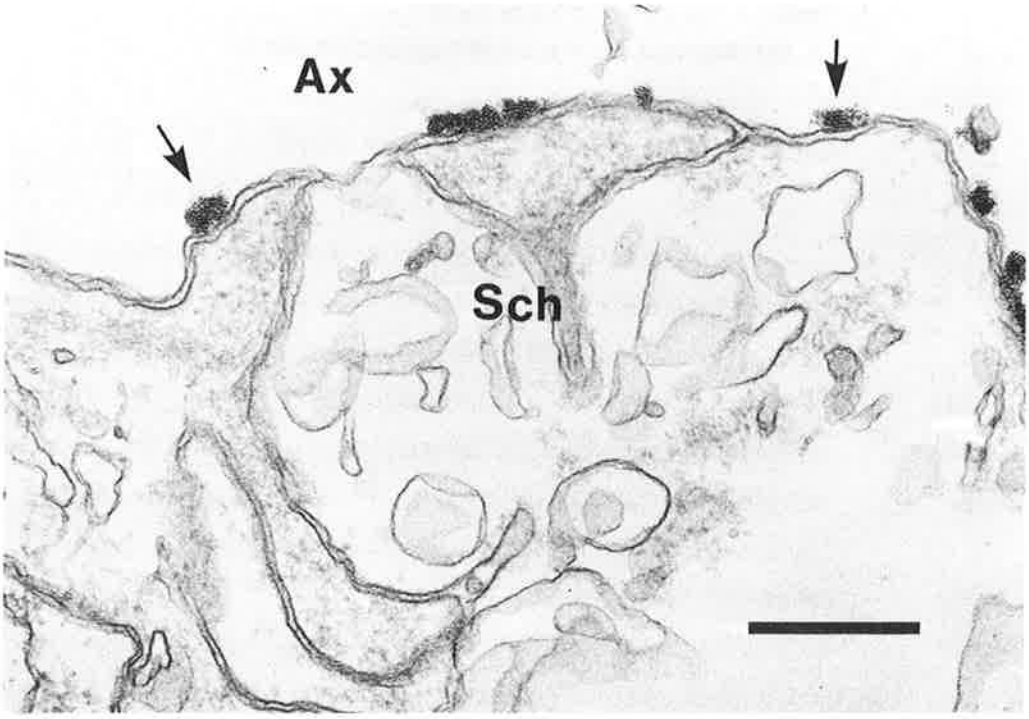


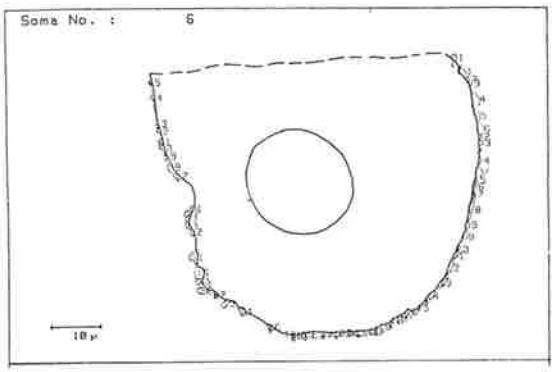
図２：膜内表面が露出した巨大神経線維（ＡＸ）と，シュワン細胞（Ｓｃｈ）。
カチオン化フェリチンを１０分間灌流。結合したカチオン化フェリオンは膜内表面で集塊を形成（矢印）。　スケールは0.5μm。

赤核ニューロンとシナプスの量的研究
（ HRP 細胞内注入ニューロンの電子顕微鏡による研究 ）

斉藤基一郎（筑波大基礎医学系）
村上富士夫，勝丸博信，塚原仲晃（生理研）

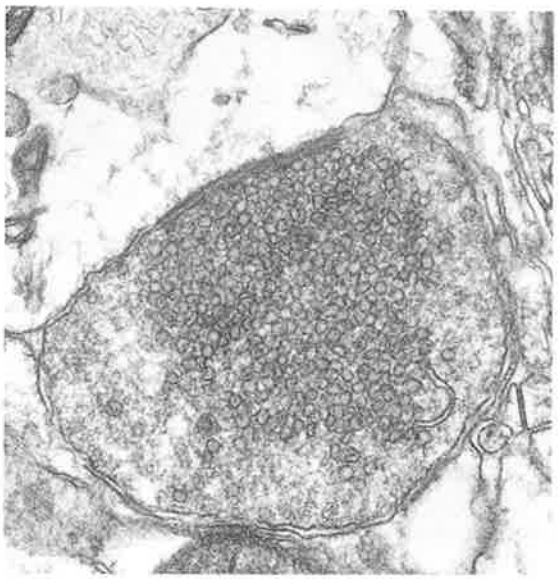
ニューロンのサイズと樹状突起の分布状態，終末の種別とその割合はニューロンの機能特性を考える場合，重要なパラメータと考えられるけれど，ごく最近までニューロンの超微形態と機能特性間の直接の比較は出来なかった。そこで我々は，ネコ赤核ニューロンの活動を細胞内誘導法で記録し，その電極を用い4％HRPを細胞内に注入し，遠位樹状突起を含む大細胞性赤核ニューロンの受容部のほぼ全貌を標識し，それらにシナプス結合する神経終末の電顕モンタージュ写真からコンピューターに直結した画像解析装置でニューロンとシナプスに形態計測をほどこした。

なお，同定には対側の小脳中位核刺激によって発生する順行性活動電位を用いた。大細胞性赤核ニューロンはほぼ円形の核と良く発達した細胞質，四方に伸びる樹状突起がその特徴となる多極細胞である。この胞体の平均短－長軸長は各々，38.2±25.4μm，78.8±38.2μmで，終末の平均被覆率（Covering ratio）は①胞体；67.1±6.1％，②基幹樹状突起（50～150μm長）；57.3±4.3％，③遠位樹状突起；46.5±23.3％であり，その遠位樹上突起上でのバラツキは大きい。また，ニューロン各部別の平均終末サイズ（断面積）は，①2.34±2.01μm^2，②2.18±1.80μm^2，③1.35±1.17μm^2であり，これら各部位に於ける終末の平均接触長は①2.51±1.81μm，②2.04±1.29 μm，③1.47±0.98μmで，終末のサイズは遠位樹状突起部（直径6 μm 以下）では小さく胞体につくそれの約2／3となる。また，終末分布をみるとStypeとFtype終末の割合（S／F比）は①胞体；20.3：79.7（0.21）②基幹樹状突起；23.7：76.3（0.31）で，これらの部位にFtype終末が多い。一方，遠位樹状突起部ではその値が逆転しStype終末が増加（70.5：29.5）する傾向にあり，S／F比は2.38となる。なお大脳皮質体性感覚領破壊による変性終末の大部分は遠位樹状突起（直



X－Yプロッターに出力したニューロンとシナプスの一例

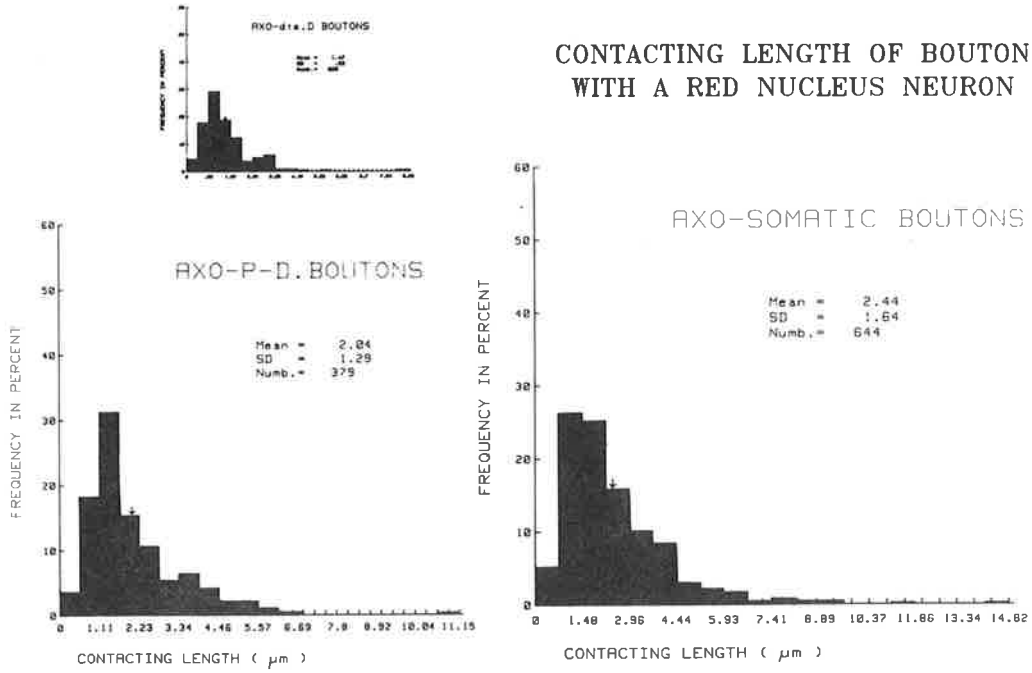
径6μm以下）に非対称性シナプスを形成し，この終末の一部は他の終末や樹状突起シナプスを受ける。また，この変性終末のうち，球形シナプス小胞を含むものは全変性終末の81％（47／58）を占めていた。通常，大細胞赤核の胞体ー樹状突起横断面上には平均2～6個のspiveやthoruがありgrowth cone vesicle様構造物をその中に認める。このspiveはStypeやFtype終末と顕著なシナプスを形成する。目下，大細胞性赤核内のsproutivg（発芽）線維とその終末態度についても検索中である。



大脳皮質体性感覚領破壊後の変性終末（stype）の一例



樹状突起上にみられた棘（Spine）の例



*REFERENCE

Tsukahara, N. Hultborn, H. , Murakami, F. and Fujito, Y. : Electrophysiological study of formation of new synapses and collateral sprouting in red nucleus neurons after partial denervation. J. Neurophysiol. 38 : 1359–1371, 1975.

自発興奮性細胞の単離

中村隆雄（国立循環器病センター）
谷口淳一，殿村雄治（阪　　大・理）
野間昭典，入沢　宏（生　　理　　研）

近年心室筋細胞の単離法が開発されてきたが[3][4][5]，単離細胞標本は従来の多数の細胞を含む折片標本の持つ難点，即ち，膜電位固定実験下での電位均一性，あるいは，細胞間隙のイオン濃度の変化等の問題点を解決するためだけでなく，今まで困難であった細胞内注入実験等を行なう上でも不可欠である。しかしながら心臓の自動能，またその制御機構を明らかにして行くには，自発性興奮を示す細胞の単離が必要であり，本研究では自動能を示すことが知られている洞房，房室結節の細胞をコラーゲナーゼ処理（ 0.04％，1時間 ）によって家免心臓より単離し以下の所見を得た。

(1) 結節細胞の形態は，板状の心室筋細胞に較べて棒状あるいは鈎錘形をしており，枝分れした細胞が多く細胞の長さと幅は心室筋でそれぞれ 115 ± 40 μm，29 ± 9 μm であるのに対し，結節細胞では 112 ± 40 μm，9 ± 5 μm（ 洞房結節 ），93 ± 23 μm，14 ± 6 μm（ 房室結節 ）と幅の狭い細胞が多かった。

(2) 正常タイロード液中で結節細胞は自発性拍動を示し，3 － 10 個の細胞から成る細胞塊からは歩調取り電位をもつ活動電位が長時間記録できた（ 図1 A，B ）。

(3) 同様の結節細胞塊を用いて膜電位固定実験を行ない，切片標本より記録した電流の時間変化に近似した電流が記録できたが，電流値は切片標本の 1／5 － 1／10 であった。これは膜電流系へのコラーゲナーゼ処理による影響が少なかったことを示している。

(4) 両結節細胞の自発性興奮は，10^{-7} M アセチルコリン（ Ach ）で抑制され，5.5×10^{-6} Mアドレナリンで促進され，神経伝達物質に対するリセプターおよび一連の反応機構がよく維持されていることを示した。

(2)―(4)の点において我々の単離した結節細胞は，切片標本と同等な正常性を持っていることを示された。

従来 Ach による過分極応答は 100 msec 程度の〝遅れ〟が報告され[1][2]，Ach による反応の第2メッセンジャーとして提唱された CGMPを介した反応に要する時間に対応させて考えられてきたが[1]，静止した房室結節の細胞塊の膜電位を記録しながら，1M Ach を含む微小ピペットを細胞表面に接近させ，電気泳動的

にAchを与えた。（10msec，9nA）ところ，膜電位はAchを与えた直後からS字状曲線を描いて過分極し，明らかな〝遅れ〟は認められなかった。洞室結節，心房筋細胞でも同様の結果が得られた。これらのAchによる過分極の時間変化は，心筋のAchリセプター密度およびAchによって開かれるKチャンネルのキネティックスから計算される時間変化でよく説明された。

さらに自発性を示す房室結節細胞内にCGMPを注入すると，拍動数は毎分92回から144回に促進され，活動電位の最大立ち上がり速度は，13.5 V／secから16.0 V／secに増加したが，Achによる過分極の大きさは，CGMPを注入しないときと変らなかった。

以上の観察は，Achによって開かれるKチャンネルが，細胞内代謝経路を介さず直接Achリセプターと結びついていることを強く示唆した。

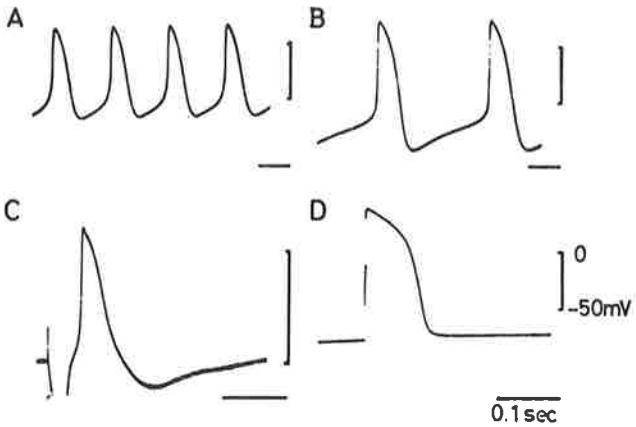


図1　単離した細胞塊より記録した活動電位
A　洞房結節　　B　房室結節
C　心房筋　　D　心室筋

文献

(1) GLITSCH, H. G. and POTT, L. (1978) Effects of acetylcholine and parasympathetic nerve stimulation of menbrane potential in quiescent quines-pig atria. J. physiol. (Lond.), 279: 655-668.

(2) HILL-SMITH, I and PURVES, R. (1978) Synaptic delay in the heart; an ionophoretic study. J. physiol. (Lond.), 279: 31-54.

(3) ISENBERG, G. and KLOCKNER, U. (1980) Glycocalyx is not required for slow inward calcium current in isolated rat heart myocytes. Nature, 284: 358-360.

(4) POWELL, T. and TWIST, T. W. (1976) A rapid technique for the isolation and purification of adult cardiac muscle

cells having respiratory control and a tolerance to calcium. Biochem. Biophys. Res. Commun., 79 : 327-333.

(5) VAHOUNY, G. V., WEI, R., STARKWEATHER, R. and DAVIS, C. (1970)
Preparation of beating heart cells from adult rats. Science, 167 : 1616-1618.

神経膜興奮のチャンネル機構の理論的諸問題

郷　信広（九大理），安部晴男（西日本工大）
山岸俊一，久木田文夫（生理研）

神経興奮に関するイオンチャンネルの機序については，近年チャンネル物質探索のための生化学的アプローチ，膜面割断法による形態学的アプローチ，諸種の生理機能解析によるアプローチが，それぞれの方法により盛んに行なわれている。

この共同研究においては，生理研生体膜部門で進められているイカ巨大神経の興奮機序に関するデータをもとにしながら，各方面の研究を併せて比較検討を行い，興奮チャンネルの存在様式の可能な条件について理論的検討を加えた。未だ充分な結果を得るに至っていないが，今後次に述べる2つの方向について検討を深めて行く予定である。

1. 従来の研究においては，興奮性細胞におけるイオン透過の現象のマクロな量の測定を行い，それを膜の“透過係数”等，マクロな物性定数を用いて記述して来た。しかし，チャンネル機構と云うとき，そこには現象を司る分子的仕組が想定されている。そこで，一般的な意味でチャンネル分子の存在を仮定し，その分子の持つべき性質の枠を，興奮現象のマクロな記述に現われる膜のマクロな物性定数から，定めて行くことを試みている。

2. 膜を通してのイオンの透過を理解する上で，化学ポテンシャルの概念が基本的に重要である。これは，現象が本来，本質的に統計的であることを意味する。（独立に振る舞っている分子が，周囲の分子の濃度の対数を感ずることはできない。化学ポテンシャル勾配に比例する流れは，平均値であって，個々の分子の振る舞いは，大きな揺ぎを持つ，即ち，統計的である。）チャンネル分子も，本来統計的に振る舞っているはずである。通常の測定では，マクロな平均値のみを見ているので，そのまわりの揺ぎが観測されない。しかし，揺ぎにこそ，現象を荷う分子の存在が反映している。そこで，分子レベルに存在する揺ぎが，マクロなレベルにも表われる条件を見い出して行くことが，一つの大きな課題となる。そのために，マクロな現象の“安定性”の解析を試みている。

脳切片標本による大脳視覚領の可塑性の研究

外山敬介（東大医）小松由紀夫（名大医）
前田　純，坂口博信（生理研）

1. 研究の目的

目でとらえられた外界の映像が視神経を通して大脳に送られて，始めて我々は外界を認識することが出来る。大脳の視覚領には，いろいろな形の図形に特異的に反応する多数の神経細胞があり，これらの細胞によって大脳の視覚領は図形の特徴を分析すると考えられる（Hubel & Wiesel，1962，1965）。この視覚領細胞の働きは特徴抽出機能とよばれる。この視覚領細胞の特徴抽出機能が動物の生後発達のある時期（感受性期）に与えられた視覚体験によって大きく変えられることが明らかにされた（Hubel & Wiesel，1963；1965；Wiesel & Hubel，1965a，b）。このことは視覚領の神経回路が発達の初期の段階では可塑性を持つことを示すものである。更にその後の研究により，感受性期に与えられた視覚体験に適応した反応性を視覚領細胞が覚得することが示された（Hirsch & Spinelli，1970；Blakemore & Cooper，1970）。感受性期には視覚領の神経回路の何処かに可塑的なシナプスがあり，これに基いて視覚領細胞が体験した視覚刺激に対して最も良く反応するように神経回路が形成される（自己組織化）という学習説が提唱されている（Blakemore & Van Sluyters，1975）。

これらの研究においては視覚領の可塑性が神経細胞の反応性の変化としてとらえられ，反応性の変化の基礎となるシナプスの可塑性は解明されていない。本研究は視覚領における特徴抽出機能の神経回路の自己組織化の基礎となるシナプス可塑性の神経機構の解明を企るものであるが，これを次の3段階に分けて行う。1）先ず可塑性シナプスの基本機構を調べ，2）これによって得られた知見に基いて神経回路の自己組織化の原理を明らかにする。3）これらの分析的手法によって得られた知見に基いて視覚領の神経回路モデルを構成し，視覚領の働きとモデルの働きを比較，検訴しモデルの当否を明らかにする。1）および2）の研究によりシナプスの可塑的変化を規定する因子が明らかになり，これによって生じる神経回路の変化（自己組織化）が学習として有用か否かの解答が得られるものと期待される。更に3）の研究により視覚領の神経回路の構成の原理が明らかになると期待される。

2. 研究内容および成果

本年度はこの一連の研究の第1段階としてネコの大脳視覚中枢（ 17野 ）の脳切片標本を用いて（ Yamamoto & Mclwain, 1969 ），シナプス可塑性の基本的な神経機構を明らかにすることを試み，脳切片標本においても視覚領細胞のシナプスの可塑的変化が起ることを証明した。またシナプスの可塑的変化をシナプス電流という最も直接的な形でとらえることに始めて成功した（ Komatsu, Toyama, Maeda & Sakaguchi, 1981 ）。

1 ）方法

幼若ネコ（ 生後約4週 ）より視覚中枢の脳切片（ 厚さ 0.3 － 0.5㎜ ）を切り出し，これを酸素と炭酸ガス（ O_2 ：CO_2 =95 ：5 ）の混合ガスで飽和したリンゲル氏液に入れ灌流する。灌流開始後約1時間で脳切片標本の神経細胞は正常な働きを回復する。この後，脳切片標本を記録用チェンバーに入れ，33℃に保ち，酸素と炭酸ガスで飽和したリンゲル氏液で灌流する。

脳切片標本の白質に条件刺激（ Sc ）とテスト刺激（ St ）の電極を置き，皮質に微小電極を置いてStによってひき起される誘発電位を記録した。

2 ）皮質電位の可塑的変化

Scによって白質に含まれる視覚求心線維に条件刺激（ $2H_2$ ，1時間 ）を加えると，刺激後約30分後からStによってひき起される皮質の誘発電位の振幅が（ 2－6倍に ）増大し，この皮質電位の増強はその後15 時間にわたり持続する。この皮質電位の増強は生後約4週のネコの脳切片標本で高率（ 約80％ ）に起り，その前後の週令のネコの標本ではその発現率が著しく低下する。したがってこの皮質電位の増強の発現する時期はHubel & Wieselらによって証明された反応性の可塑性のそれと一致する。

3 ）可塑性シナプスの局在

この皮質電位の増強の基礎となる可塑性シナプスの局在を電流源密度解析法（ current source － density analysis, Nicolson & Freeman, 1975 ）を用いて調べた。Scより条件刺激を与える前に，先ず微小電極によりStによってひき起される皮質電位を皮質表面より100μ 毎に記録した。この皮質の表面からの深さの関数として記録された皮質電位の深さについての1次微分は電位の勾配を示し，2次微分が電流源密度を表わす。この電流源密度解

析によって，白質の視覚求心線維を刺激してひき起される皮質電位の電流源がⅡ，Ⅲ層，Ⅳ層，Ⅴ層に局在することが明らかとなった。視覚領内に神経細胞が比較的均一に分布することを考慮すると，皮質電流の分布は細胞の活動電流よりはむしろシナプス電流の分布を示すものと考えられる。

白質刺激後皮質電流はⅣ層において最も早く起り（潜時約1.4ミリ秒），Ⅱ，Ⅲ層とⅤ層ではこれより0.6ミリ秒以上遅れて起る。この潜時からⅣ層の早い皮質電流は視覚求心線維と皮質細胞に単シナプス性に生じた興奮性シナプス電流，Ⅱ，Ⅲ層とⅤ層の遅い皮質電流はⅣ層の皮質細胞からⅡ，Ⅲ層の皮質細胞の間のシナプスに生じた複または多シナプス性の興奮性シナプス電流を表すものと思われる。

条件刺激後8時間で同様の電流源密度解析を行った結果，Ⅳ層の皮質電流が約3倍，Ⅱ，Ⅲ層の皮質電流が6－8倍に増強していることが明らかとなった（図1）。

4）結論

これらの実験結果から条件刺激によってⅣ層で視覚求心線維と視覚領細胞との間のシナプスとⅡ，Ⅲ層において視覚領細胞間のシナプスで伝達の増強が起ったものと考えられる。このようなシナプスの可塑的変化が大脳という最高中枢から得られる最も単純な実験標本において証明された事はシナプスの可塑性の基礎的な研究の道を開くものとして大きな意義を持つものと思われる。

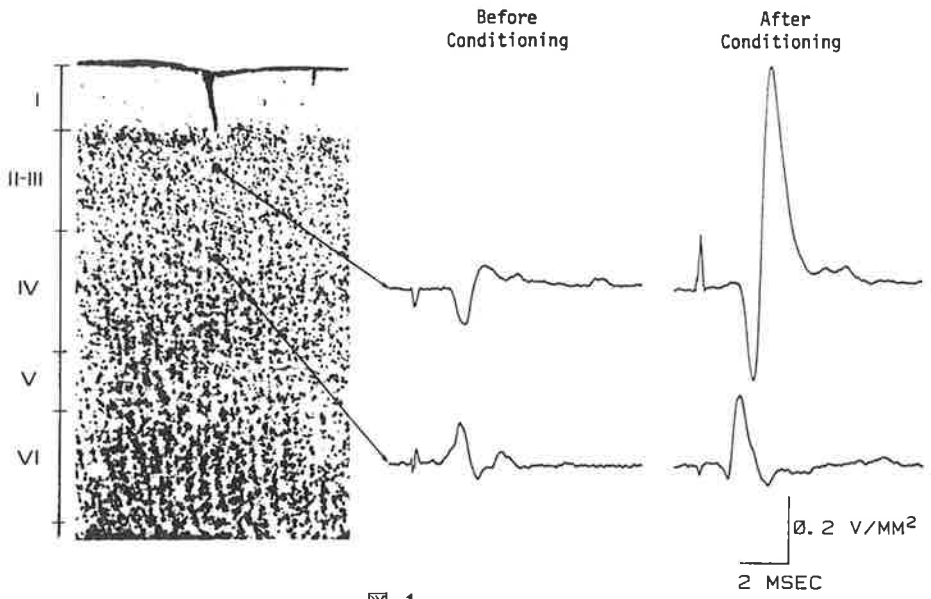


図 1.

電気シナプスを介する興奮伝導

鈴木良次（阪大基礎工）入沢　宏（生理研）

心臓は種々の細胞のgap junctionを通しての電気緊張的相互作用による結合系でありこの相互作用によって時空間的に調和のとれた周期的収縮を繰り返す。各種の細胞についてイオンの流れを組み込んだ非線型の方程式が得られている（入沢，野間，1980）[(1), (2)]。したがって数理的に見れば心臓は多数の非線型リミットサイクル振動子と閾値素子が拡散（Box-diffusion）で結合したシステムとみなせる。心臓内興奮伝導，特に興奮伝導異常を理解するにはこのモデルシステムの興奮パターンを調べる必要がある。

すでに2個の細胞から成るシステムではHopf分岐理論と数値計算によってgap junctionが2個の細胞の周期興奮を位相同期させるだけでなく位相反転させることが明らかとなった[(3)]。多細胞のシステムを同様の方法で解析すると上述の位相同期は多数の細胞が完全に同期して興奮することに対応すること，位相反転は興奮波が伝導することに対応することがわかる。しかしながら我々の理論的方法はほぼ等しい細胞の結合系にしか適用できない。様々な種類の細胞の結合系の研究には数値計算が必要となる。特にgap junctionのコンダクタンスが空間的に変化する場合伝導のブロックや不完全伝導が期待されるが，このシステムの解析には数値計算が不可欠である。上述の非線型方程式は(1) 10個程度の変数を持ち(2)方程式の右辺に指数関数を含み(3)興奮の周期に較べて非常に短い時定数の変数があるため数値計算は実行時間が可成り長くなる（中型計算機で十時間程度，大型計算機で一時間程度）が実行不可能ではないので興味ある結果が期待される。

（文献）

(1) McALLISTER, R. E., NOBEL, D. & TSIEN, R. W.：Reconstruction of the electrical activity of cardiac purkinje fibres. J. Physiol. 251, 1-59 (1975)

(2) BEELER, G. W. & REUTER, H.：Reconstruction of the action potential of ventricular myocardial fibres. J. Phisiol. 268, 177-210 (1977)

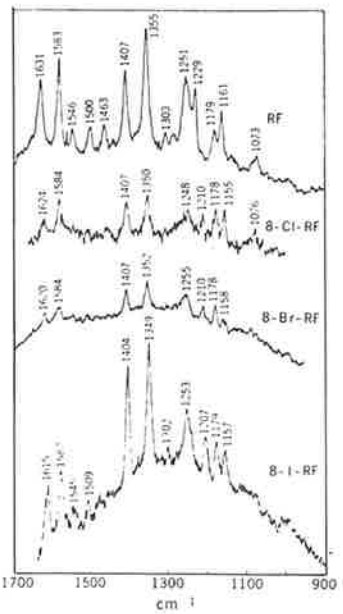
(3) KAWATO, M., SOKABE, M. & SUZUKI, R.：Synergism and antagonism of neurons caused by an electrical synapse. Biol, cybern. 34, 81-89 (1979)

フラビンおよびフラビン蛋白の分子生理学的研究

三宅可浩，太田美穂（国立循環器病センター研）
堀池喜八郎，三浦　洌，東城博雅，山野俊雄（阪大医）
志賀　潔，亘　　弘（生理研）

フラビンおよびフラビン蛋白は生体内における生理機能，とくに，生体酸化還元とエネルギー代謝上きわめて重要な役割を演じている。本研究はフラビンの機能を知るために，分子あるいは分子下レベルでの物理化学的性質を検討するとともに，酵素化学的研究，蛋白化学的研究を行った。

リボフラビンで観測される 1631 cm^{-1} のラマン線が8－ハロゲン化リボフラビンでは 1615～1624 cm^{-1} にシフトし（図1），これらのラマン線がイソアロキサジン環のベンゼン環に由来することが確認された。電子供与性の高いアミノ基やメトキシ基で8位を置換した場合，N(5)，C（4a）原子の振動変位を含むモードであるリボフラビンの 1583 cm^{-1} のラマン線が低波数シフトし，一方，8－デメチルリボフラビンでは高波数シフトした。ルミフラビンではπ電子構造がリボフラビンとあまり異るものでないが，ラマンスペクトル上は 1200～1300 cm^{-1} の領域でかなり異り，このことは，N(10) 位の置換基の効果で，N(3)－H…水素結合の効果でないことが示された。また，リボフラビンセミキノンでは酸化型では観測されない 1617 cm^{-1} の強いラマン線がみられ，D_2O 中でシフトしないこと，旧黄色酵素とフェノール誘導体のCT錯体で，電荷移動吸収帯での共鳴ラマンスペクトルに，フラビン環およびフェノールの振動の一部がラマン線として観測されるなどの結果が得られた。[1]



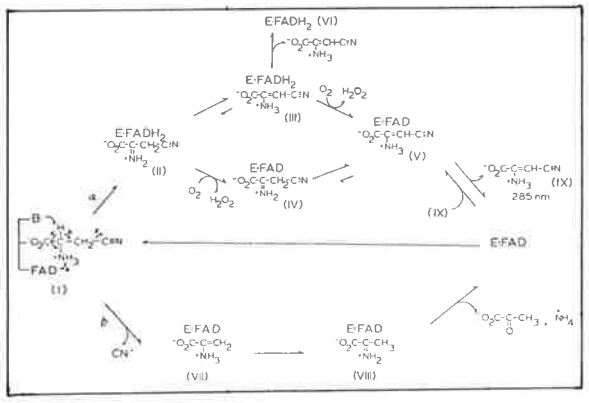
（図1）リボフラビン結合蛋白に結合したリボフラビンおよび8－ハロゲン化，リボフラビンのレーザーラマンスペクトル，488.0nm 励起，RF，リボフラビン：RF，7.79×10^{-5} M；8－Cl－RF，8.55×10^{-5} M；8－Br－RF，6.0×10^{-5} M；8－I－RF，6.39×10^{-5} M；

フラビン誘導体については，8－ジメチルアミノ－8－デメチル－D－リボフラビンの

吸収スペクトル，円偏光二色性および磁気円偏光二色性スペクトルを220nmから540nmの領域で測定し，さらに，このスペクトルを10個のガウス関数により分解した。また，P-P-P近似による量子化学的計算を行い，その性質を検討し，さらに，フラビンの5位における反応性についても検討を加えた。[2)]

円偏光二色性スペクトルについて，コレステロールオキシダーゼ，コリンオキシダーゼについても検討した。このフラビン酵素はそれぞれアポ蛋白のヒスチジン残基N(1)およびN(3)にFADの8位のメチル基が共有結合したものであり可視部円偏光二色性は酸化型，還元型とも，ほぼ同波長に同強度のモル楕円率を示したが，その正負は逆転したものであった。EDTA共存下での光照射で得たセミキノン型酵素についても長波長域で円偏光二色性の帯を示すが，その正負は逆転したものであった。この結果から，両酵素において，フラビンとその週辺の各々の遷移モーメントの相互配置が重要な役割を演じていることが示唆された。[3)]

酵素反応機構について，D-アミノ酸酸化酵素の基質アナログを用いた実験から，ひとつの反応機構が示された。すなわち，本酵素の通常の酸化反応（図2.a）の他に，シアンの脱離反応（図2.b）が存在すること。さらに，反応中間体として，酸化型酵素とα-アミノ-β-シアノアクリル酸とのCT複合体を生ずることが示された。その結果，本酵素反応の反応過程において，従来とは異る反応の存在することが示されると同時に，酸化反応と脱離反応は図2に示すように協奏的過程を経て進行することが示された。[4)]



本酵素はサブユニット解離会合系として存在する。その系に対する補酵素FADの効果をレーザー光散乱計を用いて速度論的解析を行い，この会合過程の反応速度はFADの結合によって誘起される蛋白質のコンホメーション変化が律速であることが示された。[5)]

（文　献）

1. Nishina, Y. Shiga, K. Horiike, K. Tojo, H. Kasai, S. Yanase, K. Matsui, K. Watari, H. & Yamano, T. (1980. 8)
Vibrational modes of flavin bound to riboflavin binding

protein from egg white-Resonance raman spectra of lumiflavin and 8-substituted riboflavin. J. Biochem. 88, p. 403

2. Shiga K. Nishina, Y. Ohmine, I. Horiike, K. Kasai, S. Matsui, K. Watari, H. &Yamano, T. (1980. 1)
A study of the absorption, circular dichroism and magnetic circular dichroism spectra of a flavin derivative-The-electron structure of 8-amino-8-demethyl-D-riboflavin. J. Biochem. 87, p. 281
3. Ohta-Fukuyama, M. Miyake, Y. Shiga, K. Nishina, Y. Watari, H. & Yamano, T. (1980. 7)
Circular dichroism studies of flavoproteins containing covalently bound coenzymes. J. Biochem. 88, p. 205
4. Miura, R. Shiga, K. Miyake, Y. Watari, H. & Yamano, T. (1980. 3)
Studies on the reaction of D-amino acid oxidase with -cyano-D-alanine. J. Biochem. 87, p. 1469
5. Tojo, H. Horiike, K. Shiga, K. Nishina, Y. Watari, H. & Yamano, T. (1980. 5)
Coenzyme-induced subunit association of the flavoenzyme D-amino acid oxidase: A Kinetic light scattering study. FEBS Letters. 114, p. 4

車軸藻類節間細胞及びイカ巨大神経の電気的特性の内部灌流法による比較研究

田沢　仁・親免輝男（東大理）　山岸俊一（生理研）

1961年Tasakiら，とBakerらによりイカの巨大神経の内部灌流が成功して以来細胞内外両環境を制御することが可能となり，内部灌流法は膜興奮の機構解明に多大の貢献をしてきた。一方植物細胞では興奮性をもつ緑藻の一種車軸藻類の節間細胞を用いて1964年田沢が細胞内灌流に成功した。動物細胞と異なり植物細胞は通常細胞中央に大きい液胞をもち原形質と液胞の間には液胞膜が存在する。細胞内灌流はそれ故液胞灌流となり，イカの内部灌流のように原形質に相当する部分の化学組成を制御することはできない。1976年田沢らは節間細胞の液胞を強力なCa^{2+}キレート剤，EGTAを含む液で灌流したところ液胞膜が崩壊して原形質部分は灌流液組成と混合する結果を得た。このようにして得た液胞膜除去細胞を再度組成既知の液で灌流すれば，より正確に原形質部分の化学組成を制御できる。液胞膜除去細胞は数時間に亘り原形質流動を続行し，原形質膜を介して正常細胞と同じ大きさの膜電位を保持している。さらに電気刺激に応答して活動電位も発生する。

以上のべたように植物の典型的な興奮性細胞である車軸藻類節間細胞でも細胞内灌流法が確立され，これを用いての膜生理学的研究が数年来特に田沢・新免らによって活発に行われてきた。その結果，イカの巨大神経の従来の成果と比較検討を加えることが或程度可能となってきた。動植物界におけるそれぞれ典型的なこれら二つの興奮細胞の示す諸現象を比較研究することは膜における興奮性発現の機作を理解する助けとなるであろう。

以上の目的に沿って，両細胞の電気生理学的特性をその材料の特徴と共に次のようにまとめることに合意した。1. 材料の特徴。2. 採取・培養法　3. 実験法　4. 細胞のイオン組成，pH　5. 静止時，興奮時の膜電位，膜抵抗，フラックス　6. イオン透過係数　7. I－V特性　8. 興奮性の制御（）細胞外カチオン　㈱ 細胞内カチオン，アニオン，pH ㈱ 起電性イオンポンプとの関連　9. 興奮とイオンチャンネルの活性化。

次に車軸藻類で欠けているデータの一つとして細胞内pHと興奮性の関係をしらべた。ホシツリモではpH6.6～7.9の範囲で，オーストラリアシャジクモでは6.2～8.7の範囲で活動電位を発生した。イカの神経では少くともpH 6～10まで活動電位が発生するという報告がある。

聴覚情報の受容，伝達および中枢処理に関する研究

田中康夫，谷口郁雄（独協医大）
山岸俊一，金子章道（生理研）

聴覚系では自然現象の変化を感受するばかりでなく，コミュニケーションのための情報（たとえばヒトでは言語音）をも受容し中枢へ伝送する多段の巧緻な処理機構が備わっている。それだけに受容および中枢処理の詳細は複雑で，いまだ十分明らかではない。本研究は蝸牛毛細胞における受容器電位ならびに聴覚路中継核における単一神経線維放電を記録し特徴を抽出することにより音響情報処理の詳細を知ろうとするもので，今年度は音響実験室および測定機器室の設営を進め，機器の導入を行った。無響室については1000 Hzにおいて透過損失値65 dB以上の遮音条件がみたされ，特に空調雑音に対する考慮がなされた。電気シールドにも完全が期され，テレビ電波などの遮蔽にも注意が払われた。

音響実験室の設営と相まって，各自研究を進めており，モルモットの蝸牛ではアルシアンブルーを用いたマーキングにより毛細胞内電位を同定した。外毛細胞では内毛細胞と異り，直流性の反応は小さかったが，交流反応は中音域でも歪むことなく記録し得た。外毛細胞内の電位レベルは常にランダムに変動しており，これは下等動物の毛細胞で認められている電気的共振と類似の現象であって，周波数選択性を高めることに関係があると考えられる。中継核におけるニューロン構成をしらべるためにHRP法を行った実験では，マウスの蝸牛外リンパへの注入で内外および腹側の台形体核の遠心性線維と蝸牛神経核の求心性線維に取り込みがみられ，また下丘に注入した際は同側の内外上オリーブ核と反対側の蝸牛神経核の求心性細胞に取り込みがみられた。^{14}Cデオキシグルコース法によっても下丘ニューロン構成の可塑性が検討された。

（文　献）

1）Tanaka, Y., Asanuma, A. and Yanagisawa, K. (1980). Potentials of outer hair cells and their membrane properties in cationic environments. Hearing Research, 2: 431-438.

2）Tanaka, Y., Asanuma, A. and Yanagisawa, K. (1980). Intracellular potentials of the organ of Corti in guinea pigs. Nagoya J. Med. Sci., 42: 78-80.

3) Taniguchi, I. (1980). Auditory afferent and efferent neurons in the mouse brainstem studied by axonal transport of horseradish peroxidase. Nagoya J. Med. Sci., 42 : 75 - 77.

4) Taniguchi, I.(1980). A possible role of the corticofugal projection upon the inferior colliculus studied by the (14C) deoxyglucose technique. Proc. Intnl. Uni. Physiol. Sci. , 14 : 740.

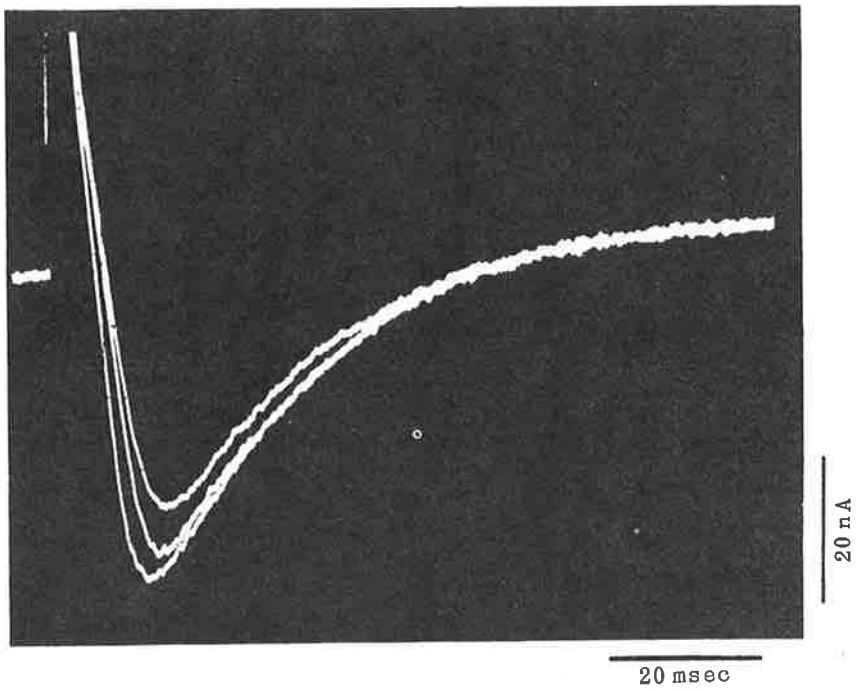


図 1. 低酸素の緩徐な内向き電流に及ぼす作用

－ 40 MV の保持電位から － 10 MV へ脱分極パルスを与えた際に発現する緩徐な内向き電流の対照記録（下段），低酸素記録（上段），再対照記録（中段）が重ね撮りされている。緩徐な内向き電流は低酸素により減少するが，酸素濃度を正常に戻すとほぼ対照値へと復帰する。パルス開始 100 msec における外向き電流は低酸素により変化を生じない。

房室結節イオン電流への低酸素の影響　（共同研究概要報告）

入沢　宏，野間昭典（生理研）
真柴裕人，小竹　寛（鳥取大学・医）
渡部良夫，西村昌雄（名古屋保険衛生大学）

虚血栓心疾患における房室結節性不整脈の発現機序を細胞膜電位と膜電流の面から検討するため，ウサギ房室結節を空間定数（0.7㎜）の1／2以下の標本（0.2×0.2×0.1㎜）に細切，通常の微小電極法と二重微小電極による電圧固定法により細胞膜電位と膜電流を記録し，正常酸素灌流（100％O_2で飽和，PO_2 550㎜Hg）から低酸素灌流（100％N_2で飽和，PO_2 30㎜Hg）に切り替えた際の変化を検討した。約80％の房室結節標本は自動能を示し，単一細胞への微小電極持続刺入が維持された5例の正常酸素灌流下の活動電位指標の平均値は低酸素灌流により，自発性興奮頻度は122から112／分に低下し活動電位振幅は86から82mVに，最大拡張期電位は－67から－63mVへと僅かに脱分極を示した。オーバーシュートはあるが，最大脱分極速度17は14V／secへ，50％活動電位持続時間は95m96msecへと変化した。従って低酸素の房室結節活動電位に与える影響は自動能の低下，最大拡張期電位の減少，最大脱分極速度の減少の3点であった。これらの変化をきたすイオン機序を調べる為に以下の実験を行った。電圧固定法により膜電位を－40mVに保持後種々の脱分極パルスを与えると，容量電流に引き続き緩徐な内向き電流が発現した。本電流は対照時パルス開始後5～10msecで最大に達し，15～30msecの時，定数で不活性化され，－10mVで最大の45.6nAを記録したが，低酸素灌流8分後35.3nAへと23％減少した。脱分極を更に維持すると単一指数関数的に190msecの時定数で外向きK^+電流が活性化された。この電流は0mVの脱極パルス500 msec後13.2nAを記録したが，低酸素灌流8分後も13.8nAとほぼ不変であった。膜を－80mV以上に過分極すると3秒の時，定数で活性化される内向き電流が発現した。この電流は－80mVの過分極パルス500msec後，13.5 nAを示したが低酸素に感受性を示さなかった。以上より低酸素による房室結節の自動能と伝導能の抑制は主として緩徐な内向き電流の減少によると結論づけられた。

光過敏現象の分子生理学的研究

上田 宏*，志賀暁子*，矢崎喜朔*，酒井勝彦*，志賀 潔**，二科安三**，
亘 弘**（*名古屋保険衛生大学医，**生理研）

キサントトキシンはその光増感作用を利用して尋常性白班，乾癬および菌状息肉症等の治療に用いられている。その作用機構の詳細は未だ明らかでないが，生体内にとりこまれたキサントトキシンが蛋白分子と結合する過程がその機構の重要な部分をなしている事は十分に予想される。従って本研究ではキサントトキシンと蛋白との相互作用を分光学的に検討し，もって作用機構解明の端緒としたい。これは本薬剤を用いた療法の改善に有効であり，又，限界をも明らかにすると考えられるからである。

用いた蛋白はフラビン（ビタミンB_2）含有蛋白の一種である卵白リボフラビン結合蛋白（RBP）である。本蛋白は二科の方法により卵白より簡単に精製する事ができ，分子量32,000の極めて安定な蛋白であるので今回のモデル実験には非常に有効な蛋白分子と考えられる。

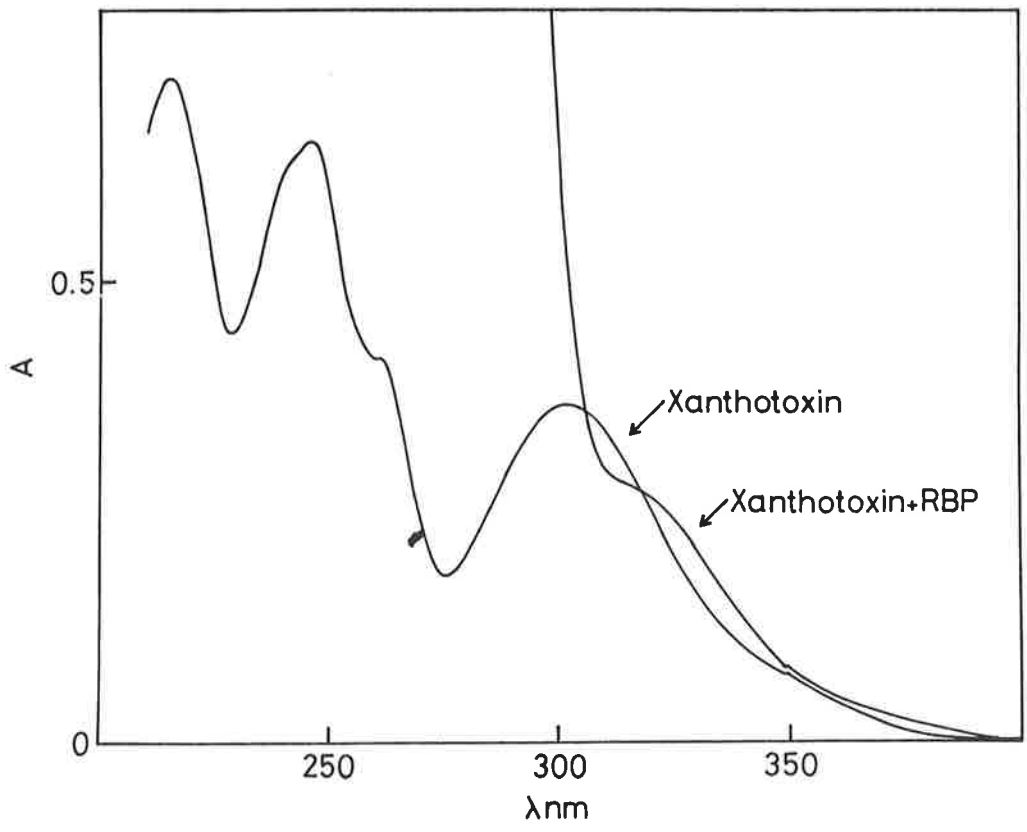


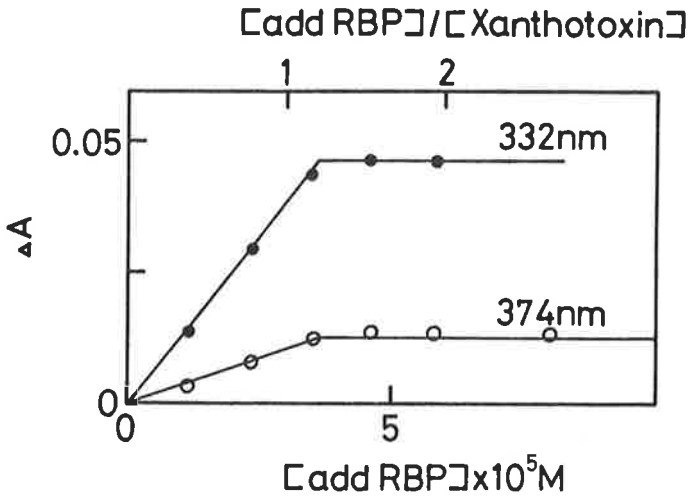
図1にキサントトキシンおよびこれにRBPを添加したものの吸収スペクトルを示す。両者の吸収スペクトルには300～400nm のあたりに顕著な差がみられ，この事はキサントトキシンとRBPが結合した事を示す。この結合に伴って生ずる吸収の変化を利用してキサントトキシンとRBP との反応の滴定曲線を得る事が可能である（図2）。これより明らかなように両者は1：1の割合で特異的に結合する。又適当な条件下でキサントトキシン－RBP複合体を透折する事によりこの複合体よりキサントトキシンを除去できるので，本結合は非共有結合によるものであると結論できる。従って以下の式により図2を使って解離定数を計算でき，それは 10^{-7} Mの程度であった。

解離定数：K＝[キサントトキシン][RBP]／[複合体]

又，両者の結合はリボフラビンと競合的（リボフラビンの存在下で複合体はRBPとキサントトキシンへ解離しやすい）であるので，キサントトキシンとリボフラビンは本蛋白の同一部位に結合する事が期待されよう。

以上の反応は分光学的に追跡できるので極めて短時間に精度よく定量的な実験を行う事が可能である。この事は本反応系が薬剤－蛋白相互作用研究のための都合のよいモデル系となる事を意味する。

さらに生体中には多種多様のフラビン蛋白およびフラビン類が存在しているので，キサントトキシンを治療に用うるに際し，これらフラビン類の治療効果におよぼす影響が今後問題にされねばならない事を本研究は示唆する。



（文　献）　二科安三（ 1977 ），大阪大学医学雑誌　29，261

志賀暁子，上田宏，志賀潔，二科安三，亘弘（ 1980 ），第31回日本皮膚科学会中部支部総会抄録集 121

生理活性ペプチドの神経細胞における作用機序

東田陽博（金沢大癌研）・芳賀達也（浜松医科大）
杉山博之（生理研）

生理活性ペプチドの作用の機序を知る目的で，我々はマウス・ニューロブラストーマ由来のハイブリッド細胞 NG 108－15 をモデル系として用い，いくつかのペプチドに対する細胞の応答性を調べた。表 1.に，代表的な 8 種の生理活性ペプチドに関する膜電位応答性の結果を示す。

表 1. 生理活性ペプチドに対する NG 108－15 細胞の膜電位応答

Peptide	Cells tested	Positive responses per trials (%)	Dose used (μM)
Angiotensin Ⅰ	9	4／13 (31)	1 —100
Ⅱ	12	6／14 (43)	0.1 —100
Bradykinin	9	9／ 9 (100)	0.1 —10
Leu-enkepherine	9	5／15 (33)	10 —1000
LH-RH	8	0／12 (0)	0.3 —100
Neurotensin	7	5／11 (45)	0.06—60
Somatostatin	14	2／14 (14)	0.9 —100
Substance P	7	0／11 (0)	1 —100

表に示すように，NG 108－15 細胞はいくつかの生理活性ペプチドに対して何らかの膜電位応答を示し，この細胞がこれらのペプチドに対する受容体をもっていることが分った。ただし，応答の様子は必ずしも単純ではなく，大部分の場合に膜電位変化は二面性を示す。すなわち，過分極に続いて脱分極の見られることが多かった。図 1.に代表的な例として neurotensinに対する反応の様子を示した（図 1.の上段）。

また，この NG 108－15 細胞はアセチルコリンを合成・放出し，培養系で骨格筋細胞とシナプスを形成することが知られているので，この系を用いて，

neurotensinのアセチルコリン放出に対する影響を調べてみた。

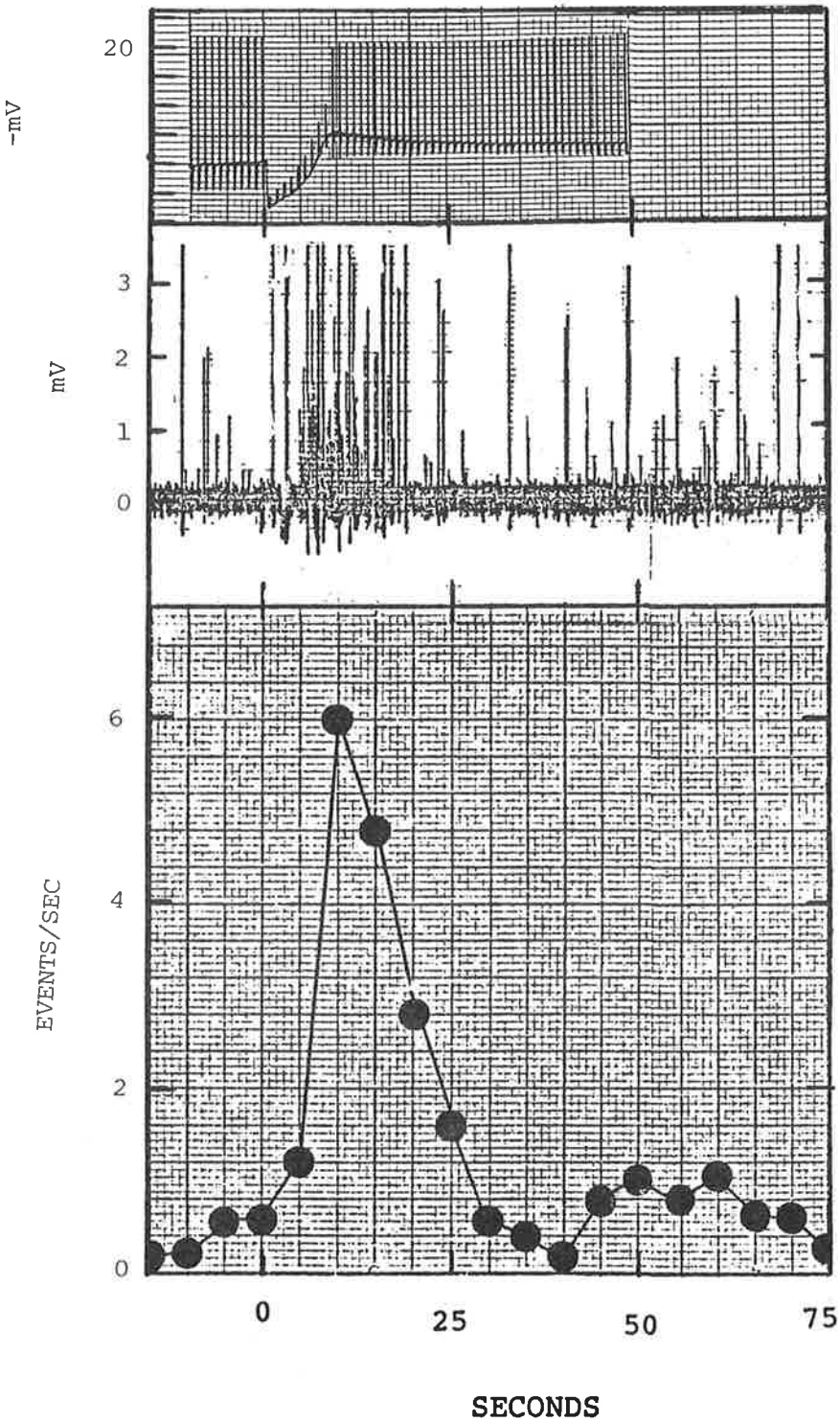


図1.
NG108-15細胞に対するneurotensinの影響（time zeroで10 μmのneurotensin溶液を細胞上に2 μl投与）。
上段：
NG108-15細胞の膜電位応答。
中段：
NG108-15細胞とシナプスを形成している骨格筋細胞の膜電位変化（postsynaptic potentials）。
下段：
中段に示したpostsynapticな電位変動の頻度を示す。

結果を図1.の中，下段に示す。以上より，neurotensinのNG108－15細胞に対する作用は次のように要約されることが分った。

1）NG108－15細胞はneurotensinを含め，少くとも6種類の生理活性ペプチドに対する受容体をもつ。

2）これらの受容体はイオン透過チャネルとカップルしており，結果として膜電位の変動をもたらす。

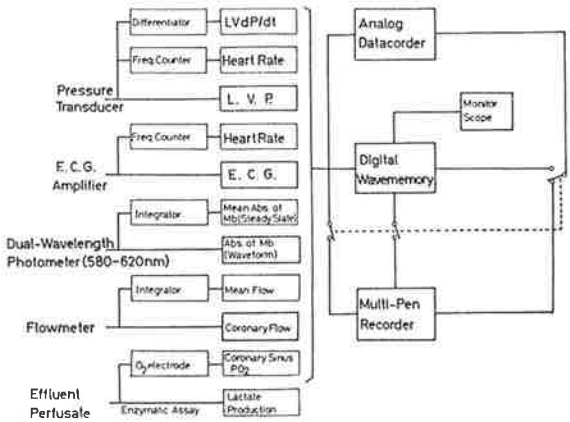
3）Neurotensinの受容体の活性化は，おそらくその結果生ずる脱分極を介して同じ細胞よりのアセチルコリンの放出を著しく増大するような作用をもつ。

周期的興奮現象の分光学的研究

田村　守（北大・応用電気研）
入沢　宏（生理研）

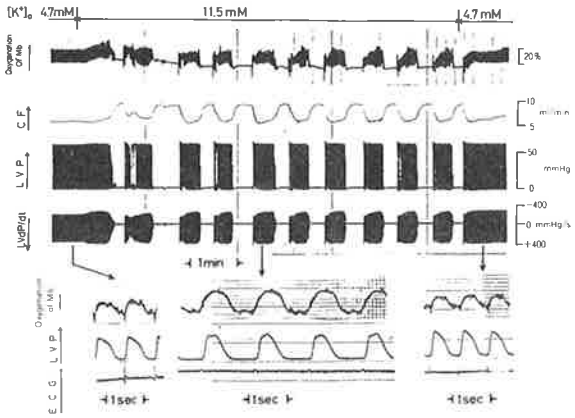
心臓の持つポンプ作用は，(1)歩調取り電位の発生と伝導，(2)心臓の収縮－弛緩及びエネルギー再生，(3)冠循環系からの酸素供給，といった電気生理学的，生化学的，血行力学的過程によって支えられている。これらは独立した機能単位として従来より多くの研究が行われてきた。我々はKrebs－Ringer液による剔出ラット灌流心を用い光学的な測定法を併用しながら心臓全体で上記の諸過程がどのように相互に関連しているかを調べてきた。ここでは特にK^+イオンの作用について，剔出灌流心とSA－nodeでの歩調取り電位に対して比較検討した。

図－1に剔出ラット灌流心での測定系全体のブロックダイヤグラムを示す。200～250 gの体重のラットを断頭後，開胸し，大動脈上部で切断，カニューレを差し込み，灌流装置に固定する。分光学的な測定対象はミオグロビン及びチトクローム酸化酵素を選んだ。現在まで心電図，左心室圧，その時間微分，心拍数，冠流量，冠静脈酸素分圧，心筋酸素消費速度，ミオグロビンの酸素飽和度，チトクローム酸化酵素の酸化－還元，ピリジンスクレオチドの酸化－還元（蛍光法）を同時に測定出来る。



灌流液のK^+イオンを例えば20 mM近くまで増加すると，心臓の拍動は直ちに停止する。一方K^+イオンを12～14 mMにすると図－2に示すような不整拍動が見られ，拍動期と停止期が交互に30秒～1分周期で規則正しく繰り返すようになる。停止期に電気刺激を与えると正常に拍動し，又心電図でP－波が見られることより，この場合は伝導系の異常に由来する不整拍動と考えられる。停止期にミオグロビンは30～40％脱酸素化され組織は幾分低酸素状態になる。但し，冠流量はむしろ増大する。拍動の開始とともに冠流量は低下し，酸素消費は増加するにもかかわらず，ミオグロビンは停止期に比べむしろ上り酸素化

される。これは拍動しているほうが心筋組織への酸素供給に都合がよいと言える。拍動期のミオグロビンの波型は正常灌流時のそれと大差なく，エネルギー代謝系は直接には影響を受けないと考えられる。



高K^+灌流時，組織のNADH／NAD^+は大幅に上昇することが知られているが，細胞膜結合性のグリセロアルデヒド－3－リン酸脱水素酵素がK^+，Ca^{++}により調節されており，これとの関連が注目される。

ウサギのSA nodeに直接電極を差し込み，活動電位に対するK^+，Ca^{++}の影響を見た。15mMのK^+では静止電位が脱分極しその周期はnormal Tyrode液でのそれより1／3まで下がるが，図－2のような繰り返し現象は見られなかった。

（文献） 田村守，荒木隆一郎 （1979．12）
心筋代謝と酸素分圧
代謝，16 P．21

Tamura, M. Araki, R., Ishikawa, T., Sagisaka, K., Yamazaki, I.
Direct observation of Reduction of Met-and Ferryl-myoglobins in the hemoglobin-free perfused rat heart.
（1980）J. Biochem., 88 P. 1211

田村守，荒木隆一郎，匂坂勝弘，山崎勇夫（1980）
心臓の周期性とメタボリズム（1980）
臨床科学 16 P．1240

ラット肝ミトコンドリア中のコリン脱水素酵素の活性と構造の関係

柘植治人（岐阜大・農）

哺乳動物の肝臓及び腎臓には，コリンの酸化代謝サイトが存在する。この系は，一般にコリンサイクルと呼ばれ，その初発酵素がコリン脱水素酵素（EC．1.1.99.1）である。本酵素はミトコンドリヤ内膜にかたく結合して存在し，容易に遊離してこない。また，非常に不安定のため短時間のうちに失活するため研究困難な酵素であった。筆者らは本酵素の精製を試み，活性の保持のために，ミトコンドリヤの超音波処理液に0.1％ Triton×-100を加えると共に，蛋白質量に対し1／15のDTNBを添加することによって，可溶化酵素の安定化に成功した。[1] この様にして得たTNB-修飾酵素は，特に溶液状態で安定であるばかりか，通常の酸素電極を用いて活性を調べることが可能である。ついで，TNB-修飾酵素をDEAE-Sepharose CL-6 Bによるカラムクロマトグラフィー，自家調製したコリンーSepharose 4 Bによるカラムクロマトグラフィーの後，高比活性画分を集めて，DTTでDTNBの修飾を除去した。DTT処理した酵素を再度，DEAE-Sepharose CL-6 Bカラムで精製し，回収率約15％，ミトコンドリヤ標品に対し，約240倍の比活性を有する酵素を得た。本酵素標品は非常に稀薄なため可視部には，殆んど吸収ピークを示さない。0.5％ＳＤＳを含む溶液によるDisc電気泳動の結果，一本の主ピークと二本の薄いピークが検出されたが，コリンを基質とする溶液中で染色すると，主ピークと薄い一本のピークのみが活性を示した。[2] この標品を用いて，紫外及び可視スペクトル及び，コリンによる吸収スペクトルの変化を研究したところ，500～370 nmにわたり，わずかな双子のピークを記録したが，コリンの大過剰によってもピークの減少は観察されなかった。[3] しかし，0.5％SDSを含むDisc電気泳動の結果から，主ピークにわずかながら蛍光が観察された。[4] 以上の実験結果より，本酵素が共有結合型のフラビンを補酵素として含む可能性を示唆した。

1） 柘植治人・大西英治・二村芳弘・中野雄司・大栄養と食糧
橋一二・ラット臓臓コリン脱水素酵素
2） 柘植治人・中野雄司・大西英治・二村芳弘・大B. B. A.
橋一二・A Novel Purification and Some Properties……

3 ） 柘植・中野・二村・大橋・志賀・亘・ 未発表

4 ） 柘植・二村・中野・大橋・ 未発表

脳内活性物質と針刺激の関係についての研究

森　　和，矢野　忠（筑波大学）
山岸俊一，矢内原　昇，東　晃史（生理研）

1977年，Mayerはモルヒネの特異的拮抗剤であるnaloxoが針麻酔の鎮痛効果に拮抗することを報告して以来，針麻酔とモルヒネ様物質の関係が注目され始めた。

現在，enkephalin，endorphin，noradrenalline，5-HT などの脳内活性物質が針麻酔物質の候補としてあげられているが，決定的ではない。そこで，針麻酔時に産生される脳内活性物質の抽出を目的として，まずラットを対象に針刺激による鎮痛効果を得るための刺激条件の検討と疼痛の定量的測定法の開発を行なった。

1. 疼痛の定量的測定法—疼痛の測定法としてラットに適した熱刺激による尾逃避反応試験tail flick testを行なった。既製の疼痛計を使用したが測定値のバラツキ幅が大きく，微妙な疼痛閾値の変化をとらえることができなかったので，顕微のコンデンサー用の集光レンズとランプを組み立てた疼痛計を作成して，これを用いた。

測定法として室温23℃，湿度60％の環境化で尾端から3㎝の部位をマジックインキで黒く塗り，焦点を結ぶよう調節した。熱量調節はスライダックで光量を調節するが，Controlにおける疼痛閾値を1.7秒～2.0秒にセットするとバラツキ幅が小さくなり，安定的に測定することができた。

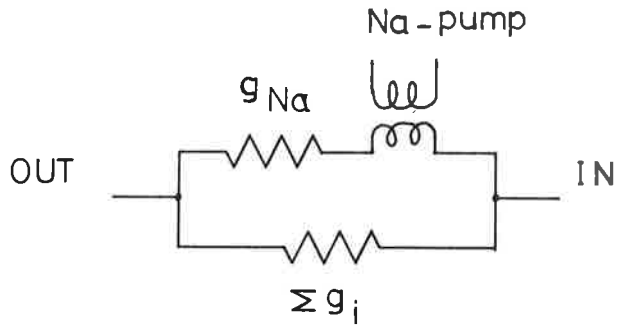
2. 針麻酔の刺激条件—尾部及び足部のみ外に出るような拘束箱の中にラットを入れて実験を行なった。刺激条件としてヒトの足三里に相当する部位に0.2φのステンレス針を筋肉に達するように刺入し，1Hz，パルス幅1msec，刺針部位の筋肉が軽く収縮する程度の電圧で2相性の刺激波を1時間通電し，疼痛閾値の変化をみた。

疼痛閾値の測定は，15分おきに5回行ない，その平均と標準誤差を求めた。鎮痛効果の判定はStudentのt-testによった（有効は危険率5％以下）。まだ十分な成績を得ていないが，有効例でほぼ30％以上の疼痛閾値の上昇を認めることができた。

腺上皮膜 Na^+ 輸送過程の NMR による研究

今井雄介・村上政隆（大阪医大），西川弘恭・
吉崎和男（京府医大），亘　　弘（生理研）

上皮膜での Na^+ 輸送は細胞の一方の膜での Na^+ 取込みと他方の膜での Na^+ 放出の両機構が連結して達成される。取込みは受動輸送であり放出は能動輸送であることは従来の研究で明らかにして来た。今年度はNMR 測定の前提となる上皮膜での Na^+ 輸送の制御方法につき研究した。腺上皮膜での Na^+ 輸送は灌流法を用いれば神経またはホルモンにより容易に制御できるものであるが灌流臓器をNMR試料管内に納めることに技術的な困難を伴う。一方 Na^+ の能動輸送をすることで有名な蛙皮は試料管に容易に納まることが期待できる。蛙皮は in vitro の条件でも常にNa 1 を外側から内側へ輸送している。そこで蛙皮での Na^+ 輸送を効果的に抑制する方法を検討した。Ussings chamber を用い，蛙皮両側に正常リンゲル液槽を置き，膜電位（ Em ），短絡電流（ Isc ）および膜コンダクタンス（ gm ）を同時に測定する　即ちX－Yレコーダの×端子に電位を記録し，Y端子には経上皮電流を記録する。通電は 0.05 Hz の交流としてリサージュ波形を描かす。これは僅かにヒステリシスを持つがほぼ直線となり，×載片より Em，Y載片より Isc，勾配より gm が得られる。この結果蛙皮において Isc が Na^+ の能動輸送をしていることを示し，これは Ussing により証明されている。イオン流をその電荷の輸送に注目して電気的な等価回路にすると蛙皮は図1で示される。図中インダクター対は変換器を示し，化学反応と輸送を連結させる Na ポンプの表示として用いている。gNa は Na^+ の取り込み経路のコンダクターであり，Σgi はその他イオン電荷の受動輸送の経路を示す。Na^+ 放出のポンプを抑制する手段としてまず温度の効果を調べた。液温の低下は著明な Isc の低下と Em の低下を惹き起す。しかし同時に gNa と Σgi の和である gm の低下も惹き起す。即ち低温は Na^+ ポンプを抑制するものであるが，同時に受動輸送経路のコンダクタンスも低下させる。したがって低温はポンプのみの抑制手段として用いること



はできない。次に$Na^+ - K^+$ ATPaseの抑制剤として知られるouabainを用いた。この薬剤はIsc，Emを減少させるが効果が現われるまでに長時間を必要とする。そのため効果が現われた時点で細胞での諸条件が変化している可能性がある。gmも低下させるものであってその原因も明確でない。即ちouabainもポンプのみの抑制手段として適当な手段とはいえない。利尿剤として知られているamilorideはNa^+の受動的コンダクターgNaのみを遮断するといわれている。amiloride 10^{-6} MはIscとgmの急激な低下を（数秒以内）起し，Iscは零に近くなる。gmは半分以下となるが有限の値となり，この値はΣgiを示すものである。amilorideを種々の濃度で用いてIscとgmの関係を見ると直線関係になる。即ちNa^+の取込みの減少が直接ポンプによるNa^+の放出の減少となっていることが示される。このことからNa^+が細胞内のポンプ機構に達しないようにするamilorideの使用はNa^+輸送を制御する手段として一番すぐれているものと結論した。また作用が短時間で起り，完全に可逆性を持っていることも利点になる。

NMRでは非破壊的な生体試料からのNa^+の量と状態についての情報が得られる。能動輸送系でのNa^+は膜と相互作用しているので蛙皮でのNa^+定常輸送条件と輸送停止条件ではNa^+の状態の差を検出することが期待される。しかし蛙皮はリンゲル液中で実験を行う必要がありfreeのNa^+信号が上記変化を覆い隠すため，結合したNa^+の信号のみを取出すにはdecay constantの差を利用する等のNMR技術の使用が必要となろう。これらについて検討を行いつゝあり，蛙皮でのNa^+輸送について実験を継続中である。

電子計算機による神経情報処理方式の検討

村田計一，堀川順生，南　定雄（東京医歯大）
亘　　弘（生理研）

オンラインまたはオフラインで処理される神経系の情報としては，誘発電位などA／D変換器によるアナログ情報の採取，神経放電の時系列の採取およびそれらの粗資料の主として統計的処理である。アナログ情報は一つの現象を種々の分析時間で処理すべき要求がしばしば現れ，また時系列処理においても着目すべき統計量により採取格納すべき内容が異なり，アナログ録音の再生によるオフライン処理を繰り返すのが通例である。データレコーダの再生によるオフライン処理に必要な所要時間は実験に費した時間（総録音時間ではない）の２～３倍を要するのが通例である。また情報採取にあたって，既に採取された情報に基き以降の情報採取の方向が変更決定される場合が非常に多い。

これらの理由から必要な情報を多元的に平行して同時にオンライン情報採取処理することが必要である。神経系に加える刺激，特に情報採取の期間中持続する刺激をプログラム制御により発生する必要がことに聴覚刺激の場合など屢々生ずる。一方情報採取の速度は多くその計算機の最高速度で行なわれCPUの処理能力の限界に達する。これらの点から多元的な同時情報採取刺激発生の一つの方法として情報採取を個々のハードウエア，あるいはミニコンピュータ制御の情報採取機構に，刺激発生，情報採取をゆだね，これらの入出力端末装置をCPUにより制御する方式が考えられている。神経系の刺激実験では長時間に亘って連続的に情報採取を続けることは稀で，多くの場合個々の試行の間に数百ミリ秒から数秒の休止期があり，その長さは入出力装置との間の情報交換，その処理に必要な時間を上廻っている。

相互作用する多チャンネルのインパルス列のシミュレーションと解析

伊藤嘉房（名大医短）　亘　弘（生理研）

点過程をインパルス列のモデルとみなし，多チャンネルの点過程の相互作用・重ね合せ・分解などに関係のある種々の計算を，生理学研究所に設置されている電子計算機M－150を用いて行った。

まず，インパルス列をDataとし，インパルス列から分布関数および結合分布関数を求める際の問題点を検討した。Dataは長ければ長い程便利であるが，それが生体組織から得られるものである以上必要に応じていくらでも長くというわけには行かない。そこでDataが次第に長くなるとき，それによって得られる分布関数および結合分布関数の収束の速さが問題となる。当然のことながら具体的に計算を実行してみてもlong-tailedな分布の場合や，高次の結合分布を求める際のように収束が極めて遅い場合がある。分布の間に適当な距離を定義しそれを用いて収束の速さを具体的に表現できるようにすべきものと思われた。

ついで具体的に与えられた分布関数および結合分布関数を用いて，点過程の相互作用・重ね合せ・分解についての計算を行った。従来，理論的かつやゝ抽象的理解に留っていた事実が具体的に例示され，容易にイメージを摑むことができた。こうしておいて，さらに，分布関数および結合分布関数の列が極限に収束する際，相互作用・重ね合せ・分解についての計算結果がどのように収束するか調べた。我々は多くの場合，不完全な分布関数または結合分布関数を用いて物を云わなければならないので，具体的な例について上記のような収束の情況を知ることができて有意義であった。この問題についても将来，収束の速さを具体的に表現する手段を持つことが必要であるように思われた。

（文献）

Ito, Y. (1978) Superposition and decomposition of stationary point processes.
J. Apple. Prob. 15, 481－493.

Ito, Y. (1980) Renewal processes decomposable into i. i. d. components. Adv.
Appl. Prob. 12, 672－688.

燐核磁気共鳴（^{31}PNMR）による筋収縮におけるエネルギー利用の研究

山田和廣，米谷快男児（大分医大）
吉崎和男（京都府立医大）　亘　　弘（生理研）

生きている組織の^{31}PNMRを記録した最初の報告はRichards を主とするオックスフォード大学の生化学教室による筋肉のスペクトルについてのものである（Hoult et al，1974）。間もなく，ロンドン大学のWilkieにより，生理的な条件下で骨格筋の収縮による^{31}PNMRの変化が調べられた（Dawson et al，1977）。以来さまざまな生体組織の^{31}PNMRが観測されるようになったが，筋の^{31}PNMRによる研究が，特に筋肉においては他の方法を用いてそのエネルギー代謝がよく調べられていることもあいまって，現在最も進んだ段階にある。

NMRによって，他の手段では求めることのできない情報が得られるのであるが，一方感度が悪いために，特に生体組織のスペクトルを得るためにはシグナルの加算が必要となる。したがってNMRの時間的分解能はよくない。^{31}PNMRが筋収縮におけるエネルギー利用機序の研究に特に有用な方法となるためには，クレアチン燐酸，ATP，および無機燐などのシグナルの，収縮に伴う時間的変化を測定できることが要件となるであろう。NMRそのものは，およそ10msの比較的良い時間的分解能をもっており，筋収縮を繰り返して，刺激と同期した任意の時点におけるシグナルを加算することによって，その時間的分解能を最大限に発揮させることが可能となる。一方筋肉の収縮には限りがあるから，上のような方法を適用するためには，その前程としてできるだけ感度をよくする必要がある。このためには試料管中に入れる筋肉の量を多くすることが有効であり，大口径試料管を備えたNMR装置が特に有用となる。この場合酸素供給上の制限から大きい筋肉ではなく，薄い筋肉を多数用いねばならない。

本研究では，このような高時間分解能NMRを，筋収縮のエネルギー利用機序の解明に利用することを目的とするものである。その第1段階は大口径試料管を用いて^{31}PNMRの感度がどこまで向上するかを調べること，第2段階は刺激と同期したシグナルの加算を行う方法を確立することである。我々は各共同研究者の各々の分野における経験を基として，このような研究を開始した。本研究の主要目的についてはその成果を報告しうる段階には到っていない。しか

し，吉崎はその一環として筋細胞内におけるクレアチン燐酸，および無機燐酸の拡散定数を測定し，水溶液中におけるそれぞれの値よりも約半分に減少していることを見出した。この事実は筋細胞形質中には筋細胞の ^{31}PNMR スペクトルの最も重要なシグナルを与えるこれら物質に対する特に異常な拡散の障害構造がみとめられないことを示している。

Hoult, D. I. , Busby, S. J. W. , Gadian, D. G. , Radda, G. K. , Richards, R. E. & Seeley, P. J. (1974)
Observation of tissue metabolites using ^{31}P nuclear magnetic resonance.
Nature, Lond. , 252, 285 - 287.

Dawson, M. J., Gadian, D. G. & Wilkie, D. R. (1977)
Contraction and recovery of living muscles studied by ^{31}P neclear magnetic resonance.
J. Physiol. , Lond. 267, 703 - 735.

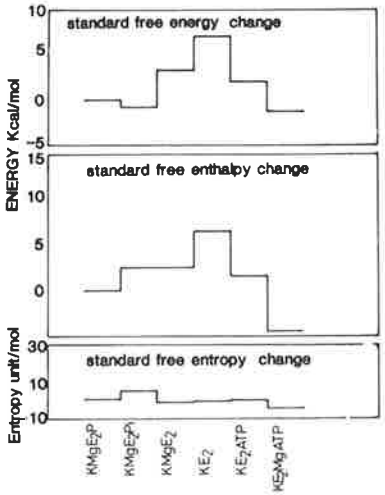
Yoshizaki, K. , Seo, Y. , Nishikawa, H. & Morimoto, T. (1980)
Diffusion coefficients of intracellular molecules in muscle measured by pulsed - field gradient NMR.
J. Physiol. Soc. Japan, 42, p218

Na^+, K^+輸送 ATPaseにおけるリン酸化中間体の核磁気共鳴による研究

谷口和弥（北海道大学歯）亘　弘（生理研）

Na^+, K^+-ATPase反応中に数種類のリン酸化酵素が出現する。反応を酸又は表面活性剤で停止すると酵素タンパクの特定のアスパラギン酸残基のβカルボキシル基が，リン酸化される。リン酸化酵素はATPと平衡にあるE_1PとPiと平衡にあるE_2Pとに反応論的には区別され，それぞれ高エネルギーと，低エネルギーのリン酸結合とされている。しかし反応中にEPがアスパルテイルリン酸を形成しているか否かは不明である。ATPの加水分解のエネルギーが，どの素反応でNa^+とK^+の輸送のエネルギーに変換されるかをしるためにはこれらEPの反応中のリン酸の結合様式をしることが必要である。

EPの^{31}PNMR測定の前段階として，EPの生成の熱力学的パラメータを，Na^+, K^+-ATPase の部分反応におけるリガンドのみかけの解離定数の温度依存性から推定した。図は$KMgE_2P$から$KMgE_2Pi$，$KMgE_2$，KE_2，KE_2ATPを経由してKE_2 MgATPが形成される際の自由エネルギー変化（△G°），エンタルピー変化（△H°）及びエントロピー変化（△S°）を示している。K^+を結合した酵素KE_2に比し$KMgE_2P$生成の△G°は約7 KCal/mol低い。この反応の駆動力はMgとPiの結合による，△H°の減少で進行し，その間大きな△S°の変化はない。KE_2へATPとMgが結合する際の△G°の減少も，これらリガンドの結合による△H°の減少にもとずいている。Piから形成される$KMgE_2P$，ここでは述べないがOuabain MgE_2P及びMgE_2Pの生成の△G°はいずれも



－5～－7 KCal／molであり，アスパラギン酸と無機リン酸から形成されるアスパルテイルリン酸の生成の△G°より約十数KCal/mol低い。この問題に対する解決の糸口を，目下準備中の^{31}PNMRの測定により見出したいと考えている。

（文献）

谷口和弥（1981，2）　Na^+, K^+-ATPase（Na^+ポンプ）へのリガンド結合の熱力学的パラメータ　生体の科学 32，42-50

Taniguchi, K., Tazawa, H., Tamaki, T. & Iida, S.　（1979）

Interaction of Inorganic phosphate with Na^+, K^+-ATPase.
In Cation Flux Acriss Biomembranes.
Academic press PP 41-47.

核磁気共鳴測定による中性領域における血漿アルブミン分子の構造転移とＭＯＬＥＣＵＬＡＲ　ＡＧＥＩＮＧの研究

曽我美　勝，長岡俊治，井上　洋，恵良聖一（岐阜大・医・生理）
亘　　弘（生理研）

血漿アルブミンは0.15 M Nacl中においてpH 7～9（2 mM Ca^{2+}が共存するとpH 7～8）でＮ－Ｂ転移（$N \rightleftarrows B + mH^+$）と呼ばれる構造転移をする。またＢ型は血漿アルブミン分子のMoleculer Ageing と呼ばれる分子内ＳＨ，Ｓ－Ｓ交換反応によりＡ型と呼ぶ構造に変化し（$B \rightleftarrows A + nH^+$）[1] このＡ型は容易に酵素分解される。Ａ型分子の構造ゆらぎの変化を^1H NMRを用いて解析することを計画した。最初に牛血漿アルブミン（BPA）のＮ－Ｆ転移（pH 4.5～3.7，$N + qH^+ \rightleftarrows F$），Ｎ－Ｂ転移についてＮＭＲ測定のための基礎的研究をした。

(1) D_2O中におけるＮ－Ｆ転移，Ｎ－Ｂ転移のqD域

^1H NMR測定はD_2O中において行うため，Ｎ－Ｆ転移，Ｎ－Ｂ転移のpD領域を測定する必要がある。分子楕円率，$[\theta]_{222}$，$[\theta]_{262}$を用いてＮ－Ｆ転移[2]のpD域がpD4.2～4.9なることを見出した。Ｎ－Ｂ転移のpD域は現在実験中である。

(2) 高濃度牛血漿アルブミンD_2O溶液の作製

^1H NMRを積算回数を少なくして，S／Nの良いスペクトルを得るため20～30％ BPA D_2O溶液を作製した。活性炭脱脂をしたBPA H_2O溶液をAmicon Model 202，漏過膜ＸＭ－50を用い加圧により10倍に濃縮し，次に減圧しD_2Oを元の体積まで加え加圧により濃縮した。この操作を数回繰り返し30％ BPA D_2O溶液を作製した。この方法では95 vol.％以上D_2Oで置換することは困難であった（Varian HR－220 型による試験的測定に使用した）。このため活性炭脱脂脱イオンしたBPAを凍結乾燥し，更にD_2Oに溶かし凍結乾燥した試料をD_2O（0.10 M NaCl）に溶解して作製した。10％（1.52 mM），20％（3.03 mM），30％（4.55 mM） BPA D_2O溶液をＮ－Ｆ転移，Ｎ－Ｂ転移のpD域にDCl，NaODを用いてpDを調節した。Ｎ－Ｆ転移pD域においてのみ，pD 4.72より，20％，30％ BPA溶液はゲル化した。10％ BPA溶液はＮ－Ｆ転移pD域でゲル化しなかった。このため^1H NMRの測定に10％以下のBPA D_2O溶液を使用した。

高濃度BPA溶液のN－F転移によるゲル化の機構を解明するためにChen 等（ 1972， 1974 ）の方法により，X線結晶解析により構造の判明した5種類の蛋白質の 240 ～ 200 nmの分子楕円率の測定値より α － helix，β － form，disordered form の各波長における標準分子楕円率を求めた。BPA 溶液の 240 ～ 200 nmの分子楕円率を測定し，各構造の標準分子楕円率を用いて二次構造（ f_α，f_β，f_D ）を求めた。N型の f_α，f_β，f_D はそれぞれ 0.73，0.15，0.12 であった。N－F転移により $\triangle f_\alpha = -0.12$，$\triangle f_\beta = 0.07$ $\triangle f_D = 0.05$ であった。高濃度ＢＰＡ溶液のＮ－Ｆ転移におけるゲル化はＦ型の β － formの増加が寄与するのであろう。Ｎ－Ｂ転移では f_α の変化も僅かで，しかも f_β は殆んど変化しない。

(4) ^{1}H NMR

10％ BPA D_2O溶液をpD6.02（ N型），pD4.42（ N－F転移域），pD4.08（ F型）において220 MHz NMR（ Varian HR-220， 京大工学部石油化学 犬伏 俊郎，森島 績，米沢貞次郎）による測定を依頼した。^{1}H NMRスペクトル全体かなりブロードで，Gassner等（ 1978 ）[4] の結果に一致している。aromatic，aliphatic 両領域にN型，F型でシグナルパターンにかなりの変化を示した。最も低磁場側のシグナルは恐らくHisのCHと考えられるがＮ－Ｆ転移に依存したシフトを示した。今後Bruker 360 MHz NMRを用い，ウインドウ処理によるConvolution difference spectra,[4] spin diffusion[5] 等により，Ｎ－Ｆ転移，Ｎ－Ｂ転移，Ｎ－Ａ異性化反応における構造変化，特に動的構造変化について研究を続行する。

（文 献）

(1) Inoue, H. Nagaoka, S. Era, S. & Sogami, M. (1981) Intramolecular sulfhydryl-disulfide exchange reaction of bovine plasma albumin - - - N-A isomerization. VII International Biophysics Congress and III Pan-American Biochemistry Congress (Mexico)

(2) Sogami, M. Era, S. Nagaoka, S. & Inoue, H. (1981) Circular dichroic and fluoropolarimetric studies on tryptophyl residues in acid-induced isomerization of bovine plasma albumin

Int. J. Peptied Protein Res. (in press)

(3) Era, S. Nagaoka, S. Ashida, H., Inoue H. & Sogami, M. (1981)
CD-resolved secondary structures of bovine plasma albumin in acidic region.
VII International Biophysics Congress and III Pan-American Biochemistry Congress (Mexico)

(4) Gassner, M., Jardetzky, O. & Conover, W. (1978)
Comparison of convolution and pulse methods for line narrowing in protein NMR spectra.
J. Magn. Reson. 30, 141

(5) Akasaka, K. Konrad, M. & Goody, R. S. (1978)
Selective spin diffusion. A novel method for studying motional properties of biopolymers in solution.
FEBS Lett. 96, 287

核磁気共鳴法による生体高分子の動的構造の研究

赤坂一之（京大理）　亘　　弘（生理研）

放線菌ズブチリシンインヒビター（SSI）を主材として，タンパク質のプロトンNMRスペクトルの特徴，特にスピン拡散現象について研究した。

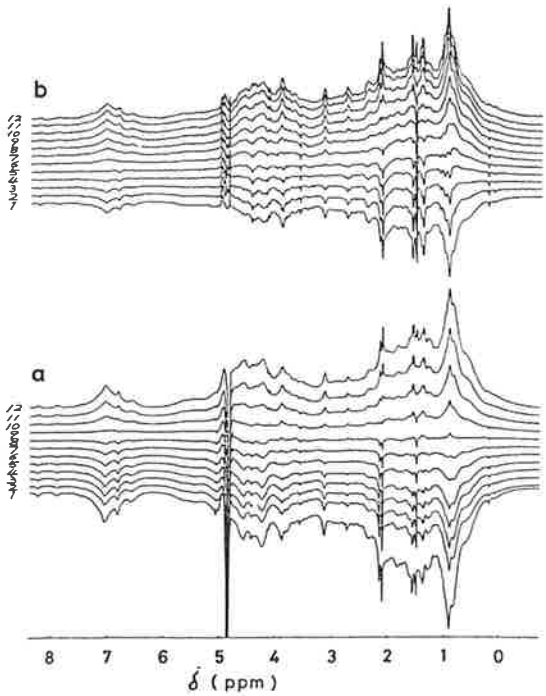
SSIのプロトンスペクトルの一部をラジオ波照射すると，スペクトル全域に飽和が伝わって信号が減少する。これをスピン拡散という。このようなラジオ波照射の下では，SSI のプロトンたて緩和時間が著しく短くなることを見出した（下図）。この現象は交叉飽和とスピン拡散によって説明することができる。交叉飽和とスピン拡散の速さをこの実験から求めることができるが，この速さはタンパク質の動的な構造（固いユアと露出した柔らかいセグメント）に敏感な量である。

（文献）

AKASAKA, K. （1981. 11）Long itudinal Relaxation of protons under Cross Saturction and Spin Diffusion. J. Magnetic Resonance（印刷中）

反転回復法によるSSI のプロトンたて緩和時間の測定。(a)ラジオ波照射せず，(b) $\delta = 4.8$ ppm にラジオ照射しながら測定（ラジオ波出力　$\gamma H_2 / 2\pi = 24$ Hz）。

1－　1　mS
2－　50　mS
3－　100 mS
4－　150 mS
5－　200 mS
6－　300 mS
7－　400 mS
8－　500 mS
9－　700 mS
10－　1　S
11－ 1.5　S
12－　3　S



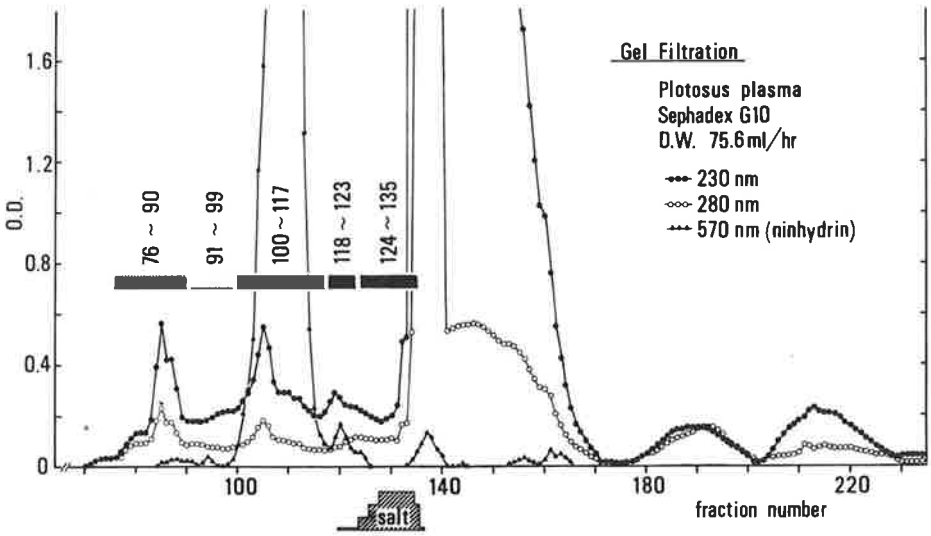
高次感覚器における受容細胞・求心神経間伝達物質

小原昭作，梅北俊一，松本百合枝（帝京大　医）
金子章道（生理研）

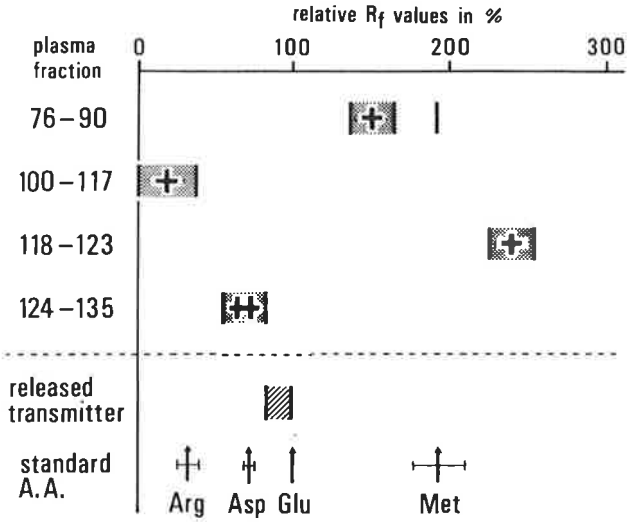
聴・側線器を含む高次感覚器で，受要細胞・神経間の求心性シナプス伝達物質は同定されておらず，グルタミン酸（Glu）などの示唆があるに過ぎない。本研究では，ゴンズイの電気受容器（特殊側線器）について，その伝達物質の同定を目的とし，生物由来の活性物質を追求する。

この求心性伝達物質については既に次のデータがある。1)単離した受容器からは連続電気刺激により伝達物質が放出され，生物検定により検出できる。2)この物質は薄層クロマト（TLC）上の展開で，Rf 25～30 の部位から再回収できる。2)この部位はフルオレスサミン陰性であり，したがってGlu とは考えられない。これらを対照として以下の実験を進める。

ゴンズイ血漿を限外ロ過により分画すると，低分子画分（M.W＜1000）に，生物検定により求心神経放電を促進する活性因子を得る。これをゲルロ過し



図，1　血漿低分子量画分のゲルロ過溶出パターンと活性部位。生物検定は，230nmの吸光度を指標としたブロック別に行なった。
　　：強い活性。　　：弱い活性。塩を含む画分はイオン交換クロマトで脱塩してある。生物検定の条件：pH7.20～7.25，18°C～20°C



図，2　血漿中活性因子のTLC上での再回収部位。図はGluのRf値を100％として正規化した。各フラクション数は図1の活性画分と等しい。

　　，　　，　　：相対的活性強度。破線以下は，　　：伝達物質の再回収部位。　　：基準アミノ酸Rf値と標準偏差。展開条件：エタノール72・アンモニア水28，シリカゲル60使用，室温。

（セファディクスG 10，D.W），図1に示す4つの主な活性画分を得た。これらをさらに，種々の溶出液によりゲルロ過，イオン交換クロマトなどで再分画を計った。各活性画分は，凍結乾燥，アセトン塩酸抽出の後，TLCに展開し，分割後，リンゲル液中に再回収して生物検定を行なった。

可逆的な促進を示す活性因子はRf 50～60，0～10，80～90，20～30で再回収され，後者2つの部位はフルオレスサミン陰性であった（図2）。したがって血漿中活性因子のうち3つは，刺激・放出実験で得た伝達物質とは，明らかに異なる。しかし，Rf 20～30の活性因子はその促進作用も強く，伝達物質と関連する可能性がある。今後はこの因子を中心としてさらに追求すると共に，遊離受容器群からの抽出活性因子との比較検討を進める。なお血漿中の他の因子も，その生物活性の機構をさらに検索することにより，伝達物質同定の手掛りを与える可能性はあろう。

（文　献）

1) Obara, S., Higuchi, T., Umekita, S. and Matsumoto, Y. (1980) Glutemate as an agonist to the afferent neurotransmitter in the ampullary electroreceptor of the marine catfish, Plotosus. XXVIII International Congress of Physiologikal Science, Budapest.

2) Umekita, S., Okitsu, S., Matsumoto, Y. and Obara, S. (1979) Fractionation of biphasic effects of the blood plasma

on the afferent synapses in a specialized lateralis receptor of the marine catfish, Plotosus. Neurochemical Research, 4, 675.

3) Umekita, S. , Matsumoto, Y. and Obara, S. (1981)
The afferent neurotransmitter in the ampullary electroreceptors : Examination of the facilitatory factors in Plotosus blood plasma.
J. Physiol. Soc. Japan, in press.

感覚の成り立ちの中枢機構の研究

塚原仲晃（生理研），森　憲作（群馬大・医学部）
田中啓治（NHK基礎研），堀川順生（東京医歯大・難研）
藤戸　裕，小田洋一（大阪大・基礎工）

視覚，聴覚，嗅覚等各種感覚の中枢神経系における処理機構を明らかにするために，其々の感覚の研究者の協力を得て総合的研究をおこなった。

視覚に関しては田中が担当し，特に外側膝状体細胞から皮質視領細胞への興奮結合についての研究をおこなった。それによると，視覚系の中継核である外側膝状体の細胞は，その受容野の特徴によって，オン中心型とオフ中心型に，またそれとは独立の分類であるX型とY型に分けられるが，大脳皮質第1次視覚野（17野）はこれら全ての種類の細胞から軸索投射を受けることが知られている。これらの入力線維と皮質細胞の間を次の2つの方法を用いて調べた。①外側膝状体細胞と皮質細胞からの同時記録による相関解析②外側膝状体細胞の光刺激に対する反応と，拮抗剤の局所注入により皮質内抑制性入力をブロックした状態での皮質細胞の反応の比較，その結果皮質細胞のうち単純型細胞について次の結論を得た。①過半数の単純型細胞が，オン中心型とオフ中心型の両方の外側膝状体細胞から興奮入力を受ける。②殆んど全ての単純型細胞が，X型またはY型のどちらか一方の外側膝状体細胞だけから興奮入力を受けるがX型の外側膝状体細胞から入力を受けるものが多い。オン中心型とオフ中心型の受容野は，一部第一次視覚野で合流し，エッジの位置に敏感な単純型細胞の反応をつくり出していると考えられる。一方X型とY型の受容野については，第一次視覚領の単純型細胞の段階では，独立の流れを形成している。

聴覚に関しては堀川が^{14}C－デオキシグルコースを用いて，ラットの脳幹聴覚系における特徴周波数配列様式の解析及び等周波数面の表出を試みた。既ち，蝸牛で周波数分析された情報がどのように聴覚上位中枢に伝達されるのか，また周波数の聴覚上位中枢での部位的表現がどのようになっているのかを解析する目的で，L. Sokolo^{++}らによって関発された^{14}C－デオキシグルコース法を用いて脳幹聴覚系の神経細胞集団の活動をオートラジオグラフィによって視覚化し，周波数の配列に関した構造を再構成することを試みた。実験動物として成熟ラットを使用し，音刺激には単一純音，周波数の異なる純音の組合せ，及び対照刺激としての白色雑音を用いた。白色雑音刺激では脳幹聴覚系のそれ

ぞれの核で一様なデオキシグルコースの取込みが見られるのに対して，単一純音刺激では蝸牛神経核及び下丘で明瞭な選択的取込みが見られた。単一純音刺激の場合蝸牛神経核では前腹側核及び背側核のそれぞれに1本の線状の取込みが見られ，下丘では1層の面状の取込みが見られた。2つの純音の組合せで刺激した場合には，蝸牛神経核ではそれぞれの核内に2本の線状の取込みが見られ，下丘では2層の面状の取込みが見られた。蝸牛神経核では背側の取込みが高音に，下丘では逆に腹側の取込みが高温に対応していた。下丘における等周波数面は鞍型をしており，その面は下丘へ入力している求心線維の走行と平行していた。これらの結果から蝸牛神経核での一次元に配列している細胞群から下丘の二次元に配列している細胞群への聴覚情報の投射が明らかになり，下丘でのより複雑な情報処理の存在が示唆された。

嗅覚に関しては森が嗅球および嗅皮質における緩徐抑制性電位について研究をおこなった。嗅球の僧帽細胞及び嗅皮質の細胞から記録される強力で持続時間の長い抑制性電位の生理学的解析をおこなった。Isolate したカメの嗅球において，嗅神経を単一電気刺激すると，僧帽細胞からは，EPSP に引き続いて，2つの異なった成分をもった5秒にもわたる過分極電位が記録された。この過分極電位の初期相は，Cl^- イオンのコンダクタンスの上昇を伴う IPSP（fast IPSP）であるが，これに引続く緩徐抑制性電位は，細胞内の Cl^- イオンの濃度変化に対して殆んど変化をうけず，脱分極及び過分極のいずれの場合にもその振幅が減少する性質をもっていた。またウレタン麻酔したウサギの嗅皮質（梨状葉）の主要細胞においても，嗅球または外側嗅索を刺激すると，EPSP および fast IPSP に続いて緩徐抑制性電位が記録された。嗅皮質の緩徐抑制電位は，数百ミリ秒から1秒以上持続し，膜のコンダクタンスの増加を伴なっていたが，僧帽細胞の場合も，同様に Cl^- イオンチャンネルの開きによるものとは異っており，また脱分極及び過分極通電いずれの場合にも振幅が減少した。したがって，これら緩徐抑制性電位は，細胞膜の電位に大きく依存していることが推定される。また緩徐抑制性電位は梨状葉の主要細胞のみならず，抑制性介在細胞でも記録され，この電位が，嗅皮質のニューロン全体の興奮性のコントロールに大きな役割を果していることが想像される。

藤戸，塚原らは中枢神経系における情報処理機構の理解に不可欠と考えられる，シナプス結合の可塑性に関して次のような研究をおこなった。生後数週時に同側大脳感覚運動野及びその周辺皮質を慢性的に吸引除去した仔猫において，新たに対側の大脳感覚運動野から単シナプス興奮性及び多シナプス抑制性結合

が形成される。この新たに形成された対側大脳からの単シナプス投射において，対側感覚運動野の外側部が前肢支配赤核細胞に，またその内側部が後肢支配赤核細胞にそれぞれ接続することを示し，この新たに形成された神経回路が，体性局在性を保持することを示した。この対側大脳－赤核シナプスの接続部位については，対側大脳脚刺激によるEPSPは立上り時間が3ミリ秒台の遅いものであり，そのEPSPは対側小脳中位核刺激による早い立上りのEPSP に比べて著しく弱い膜電位依存性を示したことから，このシナプスは赤核細胞の樹状突起末端部に接続すると考えられる。また単シナプス性興奮性結合は遅い伝導速度の線維群の発芽により形成され，多シナプス性抑制結合は速い伝導速度の線維群の発芽によることから，発芽線維群と標的細胞の極性との間に結合特異性が存在することがわかった。さらに同側大脳皮質の破壊と同時に対側大脳皮質の前肢領を慢性的に破壊した仔猫において，残存の対側後肢領から後肢支配赤核細胞だけでなく前肢支配赤核細胞にも新たな投射が形成された。このことは体性局在性〔トポグラフィカルな特異性〕それ自体も可塑性を有することを示す。

また小田，塚原らは，古典的条件付けとの関連において，可塑性の研究をおこなった。小田らは学習の細胞学的研究をめざして，可塑的神経要素を含み，その活動が行動に反映される単純な神経系を用いて学習標本をつくり，神経メカニズムの解析を試みた。ネコの中脳赤核細胞を中心とする大脳皮質－赤核－脊髄路系は(1)皮質－赤核シナプスが短期的変容（周波数増強，テタヌス後増強）及び長期的変容（小脳核破壊や前肢神経交叉接合により皮質－赤核シナプスが新生する）を示し（塚原ら 1974，1975，1976）(2)赤核細胞の軸索が2シナプス性に運動ニューロンに結合し，上の意味で学習モデルとしての利点をもつ，皮質遠心路を赤核の尾側（A 1.5～p 0.5）で切断したネコの大脳脚に与える条件刺激（CS）と，対側の前肢皮膚に与える無条件刺激（US）を古典的条件付けのパラダイムで組合せた。この組合せを30秒に1回，1日120回与えた。10日間の条件付け訓練で，一定電流値のCSに対する前肢の屈曲応答の出現率は，10％から90％に上昇し，100％の割合で屈曲を出現させる大脳脚の最小刺激電流値は，訓練前の1／2に減少した（27例）。条件応答の獲得はCSとUSをランダムな時間間隔で組み合せた標本（2例）やUSのみを与えた標本（1例）ではおこらなかった。更にCSのみ与えるあるいはCSとUSの順序を逆転して与える消去訓練を行うと，条件応答が消失した（4例）。故にこの学習はCSとUSの組合せと順序が必要な連合学習であることが示唆された。又

CSとUSの間隔を100ミリ秒にすると条件応答の獲得が最大となることがわかった。学習に伴う変化部位を推定するため，赤核への2入力，大脳脚と小脳中位核，からの信号伝達効率を2つの部位の刺激電流値で比べた（9例），100％の頻度で屈曲をおこす最小電流値は，条件付けにより大脳脚は1／2 に減少するのに対し，小脳中位核の電流値はコントロールと有意差がなかった。このとき，赤核細胞の発射活動を無麻酔覚醒状態で細胞外記録すると，90個の細胞のうち72個が大脳脚刺激に応じ，その82％が小脳中位核刺激にも応答した。従ってこの82％ の細胞については2入力に対し赤核細胞の細胞体以下が共通の経路をたどって運動ニューロンに投射する故，条件付けに伴う変化はこの2経路の共通であい部分即ち皮質－赤核シナプスではないかと推定した。

生理学研究所研究会報告

昭和 54 年度
研　究　会

課　題　名

Functional Architecture of Visual Cortex (1979. 4. 9)

Hubel, D. H.*** (Harvard Univ.)

概　　要

視覚系の情報処理機構ならびに発達過程を調べるために哺乳類（サル・ネコ）を用いて実験を行った。

大脳皮質17野（第1次視覚中枢）に微小電極を刺入し単一ニューロンの光応答を記録して受容野の性質を調べたところ，これらのニューロンは図形の特徴抽出機能を備えていることが明らかになった。しかも，左右どちらの眼から主な入力を受けているか（ocular dominance），あるいは，どの向きのスリット光に対して選択的に応答するか（orientation specificity）という点に着目すると，それぞれに関して共通の性質を示すニューロンが集まって皮質表面に対して垂直なカラムを形成し，各カラムは規則的に配別していることが判明した。（前者をocular dominance colomn，後者をorientation colomnと呼ぶ）。

この2種類のカラムは機能上の概念であったが，放射性のアミノ酸やデオキシグルコースを用いたオートラジオグラフィの手法によって解剖学的にもこれらのカラムの存在が証明され，機能と構造との対応関係が明確になった。

次に，視覚系の発達過程を明らかにするために生まれたばかりで視覚経験のないサルの大脳皮質17野のニューロンの光応答を調べたところ，受容野の性質は基本的に成体と違いがなかった。一方，生後数カ月以内に片眼を閉じて数日から数週間飼育すると，網膜や外側膝状体には変化はないが大脳皮質17野において閉じた方の眼から入力を受けるニューロンの数が激減し視覚に重大な障害が生じた。この時，ocular dominance colomn の幅に変化が生じていることが解剖学的にも明らかとなった。従って，17野における複雑な神経回路網は学習の結果ではなく，遺伝的にプログラムされているが完成したものではなく生後数カ月以内の時期に重大な変化が生じうる。その機序は今後の課題である。

課　題　名　Membrane Currents of Ca-Channel Mutants in Paramecium
（1979. 4. 18）

佐藤侑子**（Wisconsin Univ.）

課　題　名　Actin in Plants（1979. 5. 11）

Bennett, H. S.**（Univ. of North Carolina）

課　題　名　最近の神経生理学のトピックス（1979. 5. 18）

久野　宗**（Univ. of North Carolina）

細胞の興奮とイオン機構（1979. 7. 6 ～ 7）　　**課　題　名**

生体膜におよぼすカドミウムの効果　　林　秀生（埼玉医大　第２生理）
Na-free液中での神経筋伝達　　川合述史（東京都神経研　病態神経生理）
アセチルコリン受容器とイオンチャンネル　　佐藤　誠（岩手医大　第１生理）
総合討論　　林，川合，佐藤，Borkowska．屋井，丹羽，山岸
The bioelectric characteristics of Colorado beetle's muscle fibers
　　Borkowska（Copernicus Univ. Dept. of Physiology）

概　要

各種興奮性膜の興奮のイオン機構を研究会の目的とする。神経－神経，神経－筋，接合部の性質を討論により明らかにしたい。

Na-free液中での神経・筋伝達　　**抄　録**

川合　述史（東京都神経研）

神経筋伝達に際して，神経終末部に生ずる電気的変化とそのイオン機構をしらべるため，イセエビ歩脚の神経筋標本を用いシナプス前線維の細胞内記録を行った。神経終末部近傍の軸索に通電および記録用の微小電極を２ないし３本刺入し，また支配筋である伸張筋の神経筋接合部からシナプス後電位を記録した。テトロドトキシン（ＴＴＸ）を3～30μM投与右，強い通電電流によってall-or-none型の活動電位とそれによって生ずるシナプス後電位が得られた。ＴＴＸ存在下でシナプス前線維に生ずるこの活動電位の性質をさらに検討するため，外液のNaを減らしCaを増し，またシナプス後電位にNaが関与していない抑制性シナプスを用いてしらべた。ＴＴＸ存在下でNaを約半分（200 mM）以下に減らすと，軸索の活動電位は伝導しなくなり，抑制性シナプス後電位（IPSP）は消失した。しかしＫ電流の阻害剤である４アミノピリジンを加えると，low-Na液やNa-free 液中でもＩＰＳＰが発生した。このＩＰＳＰは通電電流の強さによってgradedに変化した。以上の結果は，low-Na又はNa-free液中でシナプス前線維にCaスパイクが発生し，４アミノピリジン投与でＫ電流を阻止する事によって神経終末部まで伝導するためと考えられる。CaをBaで置換しても同様の活動電位とＩＰＳＰの発生がNa-free液中で得られた。

The bioelectric characteristics of Colorado beetle's muscle fibers

Dept. Anim. Physiol.
N. Copernicus Univ.
Toruń, Poland

Borkowska M. J.

The ionic requirements for resting potential of the indirect flight muscles in the Colorado potato beetle (Leptinotarsa decemlineata Say)were studied using conventional intracellular microelectrode method. The composition of the physiological saline was based on the concentrations of ions in the hemolymph which are, by vertebrate standards, unusually bizarre (in mM):NaCl-2, KCl-54.9, $CaCl_2$-21.7, $MgCl_2$-73.5. The mean value of the resting potential of the investigated muscle fibers in physiological saline was equal 75±9.98 mV (mean±SD) only slightly decreasing with time (up to 2h). Dramatic increasing the osmotic pressure by glucose or saccharose did not cause any marked changes of the resting potential. Bathing the preparation in gradually increasing concentrations of K^+ (0 to 500mM) led to a decrease of the resting potential but with a marked divergence from the Nernst equation. Muscle fibers kept in high concentrations of K^+ depolarixed with time significantly. Almost no influence of different concentrations of Na^+ and NH_4^+ in the bathing medium on the resting potential was observed. Both lowering and rising Ca^{++} or Mg^{++} concentrations in saline led to a decrease of the resting potential value. Replacing Cl^- by an epuivalent amount of the acetate, citrate or bicarbonate anions exerted no marked influence on the muscle fiber resting potential. Neither clear effect of the blockage Na or K channels nor application the metabolic inhibitors (DNP, KCN) or ouabain on the resting potential

level was found. It seems on the basis of obtained results that muscle fibers of Colorado beetle at rest may be classified as multiionic electrodes.

Resting potential, ions, passive transport, active transport, ionic channels, mnscle fiber, insects

Borkowska M. J. Olszewska E. and: Janiszewski L. Electrophysiological characteristics of insect muscle fibers. Proc. Int. Union Physiol. Scis, Vol. XIII, XXVII Int. Congr. Physiol. Sci., Paris, 1977.

Borkowska M. J.: Wstepna charakterystyka zjawisk bioelektrycznych W mies'rednich lotu stonki ziemniaczanej Leptinotarsa decemlineata (Say). Ph. D. Thesis: 1-210, 1978.

細胞の興奮とイオン機構：生体膜におよぼすカドミウムの効果

林　秀生（埼玉医大）

生体膜に対するカドミウム（Cd）効果を，カルシウム（Ca）と関連させて下記の3つの系で検討した。すなわち，1）心筋の収縮性，2）シナプス，および 3）能動輸送である。

Ⅰ-1）　ウシガエル心房・心室筋を用いた。カドミウム（10μM）は活動電位・静止電位に著変なしに心房筋の収縮力を半減した。Ⅰ-2）Cdによる収縮力減弱効果は，Caにより競合的に，ATPにより非競合的に結抗される。対照値に迄回復させるに要するCaおよびATPは，Cdとのモル比がそれぞれ100および0.5である。Ⅰ-3）Cdの心筋収縮抑制効果は，acidosisで著るしく増強した。Ⅰ-4）Cdの心筋へのとりこみを，組織化学および原子吸光分光分析により証明した。

Ⅱ-1）　ウシガエル心臓神経（迷走神経）―心臓標本を用いて，刺激（神経）をおこなった際の心拍間隔の延長を指標にして，神経伝達物質の放出量を推定した。Ⅱ-2）Cd（5μM）投与により伝達物質放出量は殆んど消失した。Ⅱ-3）　10倍程度のCaにより，このCd効果は完全に拮抗された。　Ⅱ-4）アセチルコリンの投与による心拍リズムの延長の程度はCdにより減弱しなか

った。又，神経の活動電位も変化しなかったので（Cdにより），シナプス部位にCdが働いてCa流入を押えてアセチルコリンの放出が抑制されることが推定された。

Ⅲ－1） ウシガエル皮膚を用いて，Na能動輸送に対するCdの効果を検討した。Ca（2mM）は，大多数例でNa能動輸送を促進した。E_{Na}に著変なく，R_{Na}が減少し，R_{Σ}が増大することが，SCCとPD増大の原因である。Ⅲ－2）微小電極法により，outer barrierの抵抗減少がR_{Na}減少に対応することが判明した。Ⅲ－3）若干例で，能動輸送は増大の後，減少した。これはE_{Na}の減少によるもので，Na，K－ATPase活性のCdによる抑制に帰因すると考えられる。Ⅲ－4）蛙皮にはCdのbarrierが存在する。カドミウム，カルシウム，心筋収縮性，迷走神経 ── 心臓標本，アセチルコリン放出，カエル皮膚，Na能動輸送

Hayashi, H. and Horiuchi, E.: Effects of cadmium ion on the bullfrog heart.	J. Physiol. Soc. Japan, 33(6), 368-369,	1971.
Hayashi, H. and Takayama, K.: Inhibitory effects of cadmium on the release of acetylcholine from cardiac nerve terminals.	Jpn. J. Physiol., 28(3), 333-345,	1978.
Hayashi, H., Takada, M., and Arita, A.: Effects of cadmium on the active transport of sodium by the abdominal skin of a bullfrog.	Jpn. J. Physiol., 27(3), 337-352,	1977.

分泌腺における刺激の受容機序（1979. 7. 30～31）　　課　題　名

Nervous and hormonal control of anterior pituitary gland
K. Kurosumi (Gunma Univ.)
Noradrenaline-induced biphasic response in the guinea pig liver cells
K. Egashira (Fukuoka Univ.)
Ionic mechanism of hyperpolarizing responses associatad with endocytosis in L-cells
Y. Okada and K. Tuchiya (Kyoto Univ.)
胃腺におけるCa依存性薬物刺激　M. Takeguchi (Toyama Med. Pharm. Univ.)
Intercellular electrical coupling in epithelial cells
T. Kanno (Hiroshima Univ.)
Dissimilarity among the secretory responses induced by different concentration of the secretagoues in the Pancreatic acinar cell
T. Kanno (Hokkaido Univ.)
Calcium as an intracellular messenger for neurotranmitter and peptide hormones in mammalian exocrine glands
O. H. Petersen (Univ. Dundee)
摘出唾液腺組織片における刺激時のKイオンの放出と取り込み
A. Nishiyama (Yamagata Univ.)
スナネズミ耳下腺の分泌機構
A. Ichikawa (Yokohama Municpal Univ.)
Biosynthesis, intracellular transport and secretion of fibroin in the posterior silkgland of the silkworm, Bombyx Mori
H. Tashiro (Kansai Med. College) and
S. Sasaki (Osaka Med. College)
Transport processes of ions in salivary grand
Y. Imai (Osaka Med. College)
Intracellular ionic response to solute loading in renal

proximal tubules

M. Fujimoto (Osaka Med. College)

General Discussions　A. Nishiyama (Yamagata Univ.)

概　　要

7月30日，31日上記課題の研究会が亘（生理研）の司会で開催された。課題に直接関連を有する発表として，江頭（福岡大）は肝細胞，竹口（富山医薬大）は胃の塩酸分泌細胞，菅野富夫（北大）およびPetersen（英国　ダンディー大）は膵腺胞細胞，今井（大阪医大）および西山（山形大）は唾液腺腺胞細胞に対する自律神経伝達物質，ペプチドホルモンなどの刺激作用について報告を行った。講演および討論の焦点は，1)分泌刺激の細胞内メッセンジャーとくにCaイオン，2)刺激による結合Caの遊離，および外液からの流入，3)刺激によって流出入するイオンの輸送様式などにあったが，多くの結論はcytosol Caの増加が有機物質およびイオン液の分泌に重要であり，細胞膜，とくに外分泌腺においては基底側細胞膜の刺激時に発生するイオンフラックスの変化は透過性の増大によるということであった。しかし管腔側細胞膜における物質放出，とくにイオン放出に関する研究は少なく，この面の研究がおくれていることを示した。なお研究上の注意として標本に充分な酸素供給を行い，適濃度の刺激を用いる必要があることを指摘する報告があった。分泌腺以外の細胞で機能上Caが重要であることを指摘した研究として，岡田（京大）は，L細胞（培養fibroblast）のendocytotic activityが，菅野義信（広島大）は分離した桑実胚の再接触によって形成される膜の透過性が細胞内外のCaによって調節されることを述べた。その他，藤本（大阪医大）は尿細管壁におけるCl吸収の輸送様式を，田代（関西医大）はカイコ，フイブロインの細胞内輸送，分泌とmicrotubule－microfilament構造との関連を，市川（横浜市大）は形態学的立場から砂ネズミ耳下腺の分泌粗粒の合成経路を，黒住（群馬大）は下垂体前葉に対する神経の直接支配の形態学的研究を発表した。これらの研究は将来stimulus－secretionの過程を分子のレベルで解明する上に基礎となる研究であろう。（西山明徳）

睡眠物質と睡眠機構に関する研究会（1979. 8. 1～2）　　課　題　名

TOPICS:SLEEP SUBSTANCES

Chairman, Uchizono, K.

Reviewer	Monnier, M. (Switzerland)	40 min.
	Drucker-Colin, R. (Mexico)	40 min.
	Higashi, A. (Nat. Inst. Physiol. Sci.)	40 min.
	Torii, S. (Toho Univ. Med. School)	40 min.

Discussants

Takahashi, Y. (Metro. Inst. Neurosciences)

Kato, S. (Nat. Musashi Center. Neurol. Psychiat.)

Nagasaki, H. (Tokyo Metro. Inst. Gerontol.)

Uchizono, K. (Nat. Inst. Physiol. Sci.)

Iriki, M. (Tokyo Metro. Inst. Gerontol.)

TOPICS:SLEEP MECHANISMS

Chairman, Matsumoto, J.

Reviewer	Hobson, J. A. (U. S. A.)	40 min.
	Jouvet, M. (France)	40 min.
	Matsumoto, J. (Tokushima Univ. Med. School)	40 min.
	Toru, M. (Nat. Musashi Center Neurol. Psychiat.)	40 min.

Discussants

Hishikawa, Y. (Osaka Univ. School of Med.)

Nakamura, Y. (Tokyo Med. Dent. Univ.)

Sato, T. (Aichi Gakuin Univ.)

Kiyono, S. (Aichi Colony for Ment. Physic. Handicapped)

概　　要

睡眠物質の研究は我国でも近年行われており，睡眠物質の睡眠機構における位置づけについても，研究が始められている。この機会に我国の代表的な睡眠研究者により，睡眠物質と睡眠機構の現状を解析し，今後の研究の方向を検討

することを目的とする。国際睡眠学会への参加者を含めて計画した。

抄　　録　Biological Properties of Delta-sleep Inducing Peptide DSIP

M. Monnier and G. A. Schoenenberger

Faculty of Medicine, University of Basel, Switzerland

The effects of synthetic DSIP, previously reported in rabbits (1. 2. 3), have been confirmed in cat (4), rat (5) and goldfish (6).

Site of release. The hypnogenic stimulation of the medio-central intralaminar thalamus must be taken into account, since the radioimmunoactivity of a DSIP analog (N-Tyr-DSIP) in rats was significantly greater in the thalamus than in other brain parts. Antibodies generated by DSIP in rabbit showed no cross-reactivity with other natural neuropeptides (7). Immunochemical tests suggest an accumulation of free DSIP in the hypothalamic tuber.

Dose-response curve and activity in different species. The dose-response curve is not linear, but parabolic on a narrow range of concentrations, with maximum at 6. 5 nmol/kg for intraventricular infusion and 30 nmol/kg for intravenous injection in mammals (8). The effect of DSIP against saline becomes significant 15 min after onset of intraventricular and 60 min after intravenous administration (3. 5). Higher doses do not increase, even decrease, the sleep effect. A single injection allows a precise determination of sleep latency, amount and duration over several hours. The average total sleep value, compared to initial reference or control values (saline) was significantly increased: NREM slow wave sleep predominated in rabbits versus rats, and REM in cats versus rabbits.

A marked synchronizing trend (spindles, SWS, latent ultradian biorhythm) was detectable in all mammals (1. 2. 3. 4. 5). In man, the first investigations on DSIP initiated by the authors and co-workers are reported.

Pessage through the blood-brain barrier, already suggested by the EEG and behavioral effects of intravenous DSIP in rabbits (3) and rats (5), is now confirmed, since DSIP analogs (D-Ala-DSIP) injected both intraperitoneally and intracerebrally to the goldfish significantly decrease its general activity (6).

Degrabation of DSIP studied in vitro by incubation with extracts of mouse brain, reveals that DSIP is a substrate for proteolytic enzymes. N-terminal Trp is first released (rapid action of cerebral amino-peptidase), along with other amino-acids and dipeptides.

Conclusion. The data reported support the concept of a neurochemical, temporal organization of sleep, in which DSIP might act as a synchronizing "programming coordinator", acting at supratransmitter level.

(SNSF 3.780.076)

References.

1. Monnier, M. et al. Sleep 1976, 257-263, Karger Basel (1977).
2. Schoenenberger, G.A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 1282-1286 (1977).
3. Monnier, M. et al. Neurosci. Lett. 6, 9-13 (1977).
4. Polc, P. et al. Neurosci. Lett. 9, 33-36 (1978).
5. Kafi, S. et al. Neurosci. Lett. (1979). In press.
6. Olson, R.D. et al. Pharmacol. Biochem. Behavior. 9, 522-524 (1978).
7. Kastin, A. J. et al. Brain Res. Bull. 3, 691-695 (1978).
8. Schoenenberger, G.A. 6th. Int. Symp. Med. Chem. Brighton (1978).
9. Marks, N. et al. Brain Res. Bull. 2, 491-493 (1977).

The methods for the multichannel bio-assay of sleep inducing substances in the mice

Nat. Inst. Physiol. Sci.
Akifumi Higashi

The quantitative analysis of integrated behavior of life activities such as the sleep active movements may be carried out by classifying the living patterns of the animal into some categories capable of being treated in a quantitative manner, and by counting the occurrence frequencies of such categorized terms with time. The collection of huge amounts of data in a parallel fashion, however, does not necessarily clarify the interrelation between such parallel informatioms. Particularly in protracted observations, it is desirable to obtain as many informations as possible from minimun amounts of original data, and simultaneous measurements on many numbers of animals are also required. It is very important, under such experimental conditions, to establish the monitoring system with which normal living pattern may be distinguished from the abnormal pattern on a real time basis. It in ideal to have a system which enables us to carry out the screening on the basis of the changes of basic states and also to proceed to more datailed analysis whenever required. In order to realize these monitoring and screening systems, the logic for the screening should be established in the first place. If various independent elements are successfully combined to compose a logic which may significantly correspond to a certain living pattern of the animal, one may expect to obtain sufficient informations from relatively small numbers of observed data. In order to realize simultaneous and long-term observations on many mice, I

have developed some surgical operation techniques for the mouse, a method for chronic experiments and several methods for data processings.

(1) I have designed a new head holder that immobilizes the mouse head, as well as permits the mounting of a connector that can handle an increased number of wires from embedded electrodes. The holder was cast in ABS resin which was injected into the metal mold and hardened by heating. The mouse head is far more inmobilized by using the head holder than by fixing at three points of ear canals bilaterally and the upper incisors, according to the technique developed for rats.

(2) I have developed a slip-ring setup equipped with double springs and a micro-infusion pump, which hardly prevents a mouse from moving freely. Protecting the conductive wires with one steel spring, which has been usually applied to rats or larger animals, is not suitable for such small animals as mice. Due to the restrictive effect of the spring on the movement of mice. observation of their normal behaviour is almost impossible. By the double springs method, the wires leading from the implanted electrodes stably conduct information from the animal for a period of up to a year without restricting delicate movement of the mouse and being bitten off.

(3) I assembled a compact accelerator and named it the BM transducer. The peculiar characterisics of the transducer are its extremely small size (5mm×5mm×5mm) and a light gross weight (0.92gram). The sensitivity of the transducer at 1g is about 17μV. The frequency characteristic of it have nearly flat responses from 20Hz-1000Hz for input frequencies under the condition of 0.316$\bar{g}$ and 1$\bar{g}$. The directional characteristic of it show nearly circular figures in response to both 20Hz and 200Hz.

The transducer attatched to the head of a mouse could serve as indicators of body movement and muscular electricity during the sleeping phase of the mouse.

(4) I have developed one model system of real time online data processing for screening the pharmacological effect on the brain by multiple mice prolonged consecutive measurements. In this system only two elements for each mouse, EEG and body movement (BM), were measured. The BM were sampled every 10m sec and cumulated for a period of 10sec to give the maximum value of BM. The EEG was separated into 2-30Hz and 2-4Hz components, which were integrated for the 10sec period, respectively. Three elements, namely the maximum value of BM, the integrals consisting of 2-30Hz and of 2-4Hz, were combined and utilized for classifying the behavioral stages of the mouse into the following four stages: active stage; shallow sleep stage; deep sleep stage; and REM sleep stage.

(5) The trials of quantitizing the depth of sleep with slow EEG waves in the mouse have been done and the existence of a daily rhythm showing deep sleep and shallow sleep stages was found. The daily rhythm of sleep in the mouse is not only the rhythm of the frequency in appearance of homogeneous short sleep but consists of the sequential appeances of following patterns: the deep sleep state at dawn following on active state during night, the succeeding shallow sleep state and the awake state but without any body movements.

(6) The duration of the short intervals of sleep might be one of the important indicators for studying the pharmacological effects of various narcotics and sleep-awake mechanism. A method for quantitative analysis of short sleep intervals in the mouse was introduced. The short sleep intervals were in a range from 10sec to 200sec

in the mouse. Compared to short sleep at night short sleep by day appeared to have longer duration. The number of short sleep intervals scored in the method was about 400 during the day and about 200 at night. About 3 percent of the total sleep by day and about 10 percent of that was occupied by short sleep intervals of less that 10sec.

(7) The experiment of sleep deprivation has been done. A mouse placed on the top of the drum made of a metallic net (8cm in diameter), half sunken in water and rotating at a rate of 1rpm. About $\frac{1}{6}$ of a circumference is repeatedly travelled by a mouse for a period of 24hrs, i. e., from 7:00 am to the next 7:00am. The influence of sleep deprivation on the mouse was quantitatively examined by analyzing the time course of the change of sleeping time, the change of the duration of short sleeps and the change of the values of 10sec integrals of EEG consisting of 2-4Hz and of 2-30Hz components. It was demonstrated that it was important to know how effectively the sleep was actually deprived in the experiment of sleep deprivation of experimental animals. In other words, no evaluation of the effect of sleep deprivation may be made without quantitizing the extent of sleep deprivation.

REM 睡眠物質としての有能ブロム化合物

鳥居　鎮夫（東邦大・医）

髄液中に血液中の10倍近くのブロムが含まれており，しかもその大部分が有機物として存在している。クロマトグラフィーの反復によって，ブロム化合物の純化物を得，最終的に2-octyl-γ-bromoacetoacetate（γ-βr）と同定した。その構造式から，γ-βrは低級脂酸（酪酸）の関連化合物と考えられることから，REM睡眠機構に関与すると想定した。この想定を証明するために，合成したγ-βrをネーユの下位離断脳標本を用いて，その睡眠覚醒サイクルに

及ぼす効果を調べた。0.1 mg/kg，i.v.で，REM睡眠が有意に増加，NREM睡眠，覚醒は減少の傾向を示した。

次に，同じくネーユの下位離断脳標本について，随液内γ-βr量とREM睡眠との相関を調べた。大脳槽に挿入したポリエチレン質から自然に流出する髄液を5分間隔で，0.02 mℓ宛採取して濾紙にしみこませ，クロマトグラフィーによりγ-βrを分離したあと，放射化分析法によりブロム量を測定した。REM睡眠が出現している状態では，髄液内γ-βrは0.9±0.3 mg/dℓ，REM睡眠が出現していない状態では0.6±0.08 mg/dℓで，分数に有意の差を認めた。

γ-βrは血液にも存在しているが，非常に微量のため，従来の化学的方法では測定にかからない。最近，山根らは蛍光物質dansyl-cysreineと反応させて，γ-βγのdansyl化物をつくって，測定密度を上げ測定を可能にした。

予備的実験であるが，7名の医学部学生（21才）の血液について調べた成質では，午後10時が最も低くて，平均100 pmol/mℓであり，午前10時が最も高く平均400 pmol/mℓであった。覚醒時に減少し，睡眠中に増加する傾向が認められた。

Delta Sleep Inducing Peptideのイヌ脳室内注入による睡眠および成長ホルモン分泌の変化に関する予備的検討

高橋　康郎・海老原成光（東京都神経科学総合研究所）
中村　芳子・高橋　清久

Delta Sleep Inducing Peptide（DSIP）の脳室内注入または静注によってウサギ・ネズミではdelta sleepが増大することが報告されているが，ネコではむしろREM sleepが増加するとの報告があり，DSIPの睡眠に及ぼす効果に種差があることが示唆されている。われわれはイヌの睡眠に対してはどのような効果があるか，更にdelta sleepと密接な関係がある成長ホルモン（GH）分泌にどのような影響があるかについて予備的検討を行った。

雄ビーグルにポリグラフ記録用電極，側脳室カテーテル，静脈留置カテーテルを慢性的に植えこみ，長期にわたって睡眠記録を行うとともに，DSIPの脳室内注入，無痛的採血による血漿GHおよびcortisnl値の測定を実施した。

1）睡眠に及ぼす効果：下記3種の操作を13:00にそれぞれ連続6日間づつ

実施し，delta sleepおよびREM sleep の累積出現量を比較した。

a) 防音室内に入室しb，cと全く同じ操作をするが，脳室内に何も注入しない。b) 生理食塩水0.5 mlに溶解したDSIP 20μg/kg を脳室内注入。c) 生理食塩水のみ0.5 ml注入。

Delta sleepの累積出現量はb), c)ともにa)に比して注入後，約10時間にわたり減少したが，DSIP注入後3～5時間にわたって生理食塩水注入後にくらべdelta sleep量は約2倍の有意の増加が認められた。REM sleep 量はb), c)間で有意差が認められなかった。

2) GHおよびcortisol分泌に及ぼす効果：睡眠に関係するGH分泌の影響を除外するため09:00～18:00の間，自動強制覚醒装置により覚醒状態を続けさせ，14:00に生理食塩水，DSIP 4μg/kg，20μg/kg，40μg/kg をそれぞれ脳室内に注入した。採血は強制覚醒期間30分～15分間隔でおこなった。生食注入後はGHおよびcortisol値に変動はみられなかったが，DSIP注入後1.5～2時間に血漿GHは5～25ng/ml のピークを示し，同時にcortisol の分泌亢進を伴った。

以上の予備的検討の結果ではイヌでもDSIP脳室内注入によってdelta wave sleep が選択的に増加すること，GHおよびcortsol分泌亢進がみられることが示されたが，注入後の時間的経過から考えて，この結果をDSIPの効果を結論するには至らなかった。今後は投与量を変え，例数を増して更に検討を加える必要があると考えられる。

Delta Sleep Inducing Peptide (DSIP) の酵素免疫測定法の開発

加藤　進昌（国立武蔵療養所神経センター）
辻　　章夫（昭和大・薬）
中村芳子・高橋康郎（東京都神経科学総合研究所）

睡眠を誘発する物質としてMonnierらによって，視床を電気刺激した家兎の血中からnonapeptideが単離，ついで合成され，Delta Sleep Inducing Peptide (DSIP)と名づけられた。演者らはこのDSIPに対する特異抗体を作成し，それを用いて生体内のDSIPを感度よく測定することのできる酵素免疫測定法(enzyme immunoassay. EIA)の開発を目的として，以下

の実験を行い，若干の知見を得たので報告する。

1) 抗体の作成 ： 抗体は，DSIP 1 mgに対し牛血清アルブミン(BSA) 2 mgを架橋剤としてglutaraldehydeを用いて結合させ，Bio-Gel P-2 のカラムを通し，これにFreund's complete adjuvantを加えてできた乳化物を抗原として作成した。家兎背部の約100カ所に皮内注射し，これを3週毎に繰返して採血した。この家兎抗血清は最終希釈10～20万倍にて使用することができた。

2) HRP-DSIP 結合体の調整 ： 標識酵素として，horseradish peroxidase(HRP)を用いた。DSIP との結合には，中根らの報告した過ヨウ素酸酸化法を応用し，最後にBio-Gel P-60(1×60 cm)のカラムを通し精製した。分離は良好で，最終希釈800倍で使用でき，また，長期保存によっても安定であった。

3) 不溶化第2抗体の調整 ： 本法では二抗体固相法(DASP)によって$^{B}/_{F}$分離を行ったが，固相にポリアセタール・ビーズを用いた。抗家兎IgG ヤギIgG 粗分画(第2抗体)を，あらかじめ正常家兎IgG を活性化Sepharose 4Bに結合させて作成しておいたカラムに通し，affinity chromatographyによって特異的IgG を分離した。ビーズをこの特異的IgG の希釈液中に1週間以上，4℃で浸漬し，適宜とりだして使用した。

4) EIA の方法 ： すべての希釈に0.1％BSA を含む0.05M phosphate buffered saline，pH7.0を用いた。標準DSIPもしくは被検血清100 $\mu\ell$に，第1抗体液200 $\mu\ell$，HRP-DSIP液100 $\mu\ell$，感作ビーズ1ケを加え，室温2時間で反応させた。2時間後ビーズを3回洗浄し，これにp-hydroxyphenyl propionic acidとH_2O_2を含む基質溶液400 $\mu\ell$を加え，30分反応させて発けい光させ，ビーズに結合した酵素量をけい光法によって定量した。

本法によって作成した標準曲線によって，DSIP 50 pgから100 $^{ng}/_{tube}$の範囲が感度よく測定可能で，各点の変動係数も4.9～9.2％とほぼ良好であった。また，GH，TSH，insulin，enkephalins，α-endorphin との間に交叉反応を認めなかった。

本法は，Kastin et al.(1978)の報告したradioimmunoassayに比較して感度面でやや劣り，現在のところまだ予備的段階であるが，犬血漿100 $\mu\ell$を添加しても，十分上記と同じ感度で測定可能であった。犬にDSIP 250 μgを静脈注射し，経時採血した検体を測定した結果は，注入後15分で5～10 $^{ng}/_{m\ell}$となる他，30分以後は検出不能で，半減期は非常に短いと思われた。作用発現

に長時間要するとの実験結果と考えあわせ，興味深い。

ラットから抽出した睡眠因子（BE-SDR）及びデルタ睡眠誘発因子（DSIP）による睡眠効果

長崎　紘明※　　北浜　邦夫
M．ジューベー　　J－L．バラックス
（クロード・ベルナール大・実験医学）

睡眠因子は，断眠ラットの脳幹から抽出されるもの，断眠ヤギの脳脊髄液から抽出されるもの，電気睡眠ウサギの血液から抽出されるものなどがあり，また脳室投与，静注，腹腔投与などの方法によって，それらの効果に相異がみられる。さらに，投与される動物種によっても効果に相異がある。この実験では断脈ラットから抽出される睡眠因子（BE-SDR）と，電気睡眠ウサギから抽出される睡眠因子（DSIP）の効果について，純系マウスの日周性の睡眠－覚醒サイクルを示標にして検討した。

方法：10個体の純系マウスC57BL16，雄，6月令に慢性電極を植え込み，EEGとEMGを連続記録した。BE-SDRは東京医歯大・医材研・石川正幸教授，菰田泰夫助教授から供給されたものを用い，DSIPは蛋白奨励会から購入したものを用いた。睡眠因子の投与は，暗期（19時～7時）の10～30分前で，腹腔に投与した。BE-SDRはマウス当り0.05π，0.1π，0.2π，0.4π（1πはラットの1脳幹当量）とし，DSIPはマウス当り0.75μとした。投与間隔は3～4日とし，同一個体に繰返し投与した。睡眠時間は24時間の連続記録を30秒単位で判定し，投与例（4個体または7個体）の平均を求めた。

結果1. 逆説睡眠に与える効果：逆説睡眠に対するBE-SDRの効果は投与量に比例して増加した。最大増加量は24時間中の逆説睡眠量が40%増加した。（0.2π投与群）一方，0.1μ投与群では20%増加であり，対照群（生理食塩水投与群）との平均値の有意差検定ではP<0.01であった。また，0.4π，0.1π，0.05πのBE-SDR投与群とDSIP投与群の逆説睡眠量は対照群と比較して，平均値に有意な差はみられなかった。潜時はおよそ10時間で，昼間の逆説睡眠量が顕著に増加した。

結果2. 徐波睡眠に与える効果：徐波睡眠に対するBE-SDRの効果は投与量に比例して増加した。最下増加量は24時間中の徐波睡眠を20%増加させた。

（ 0.4 π投与群）。0.2 π投与群では10%増しであるが0.1 u， 0.05πのBE-SDR投与群では対照群との間に有意な差はみられなかった。また， DSIP投与群では10%増しであった。0.4 π， 0.2 πのBE-SDR投与群及びDSIP投与群と対照群の平均値の差の検定は$P<0.01$であった。

結論 ： 睡眠因子BE-SDRは投与量に比例して，逆説睡眠量及び徐波睡眠量を増加させた。一方， DSIPは徐波睡眠を増加させるが，逆説睡眠量には影響を与えなかった。

（※現住所　東京都老人研究所・生理学部）

血圧変動に対する腎交感神経活動性応答に及ぼすDSIPの効果
── 無麻酔家兎 ──

入来　正躬　　古沢　恵美（東京都老人総合研究所）

睡眠における交感神経系活動性変化の重要性は，睡眠時の心搏数，皮膚血管反応等により主張されていた。しかし睡眠中の交感神経活動電位を直接記録することによる研究は，従来交感神経活動性記録が，麻酔不動化された動物でのみ可能であり，無麻酔動物では不可能であったため行われていなかった。我々は無麻酔家兎の腎交感神経活動電位を記録することが出来るようになったので，DSIP投与後，すなわち睡眠期における交感神経系の調節状態について，血圧変動に対する腎交感神経活動性応答典線（以下RSNA応答曲線と略記する）を用いて検討を行った。

方法 ： 実験は無麻酔家兎を用いて行った。腎交感神経活動電位を，慢性的に埋め込んだ双極銀電極を用いて誘導し，その活動電位を2秒間積分した値を腎交感神経活動性（RSNA）の指標として用いた。血圧変動は，あらかじめ慢性的に埋め込んだ大動脈バルーンと下大静脈バルーンを膨満させることにより行った。血圧は安静時血圧より，±5，±10，±20㎜Hg 変化させた。各血圧（平均血圧）におけるRSNA をプロットして， RSNA応答曲線を求めた。

結果 ： DSIP投与（40nmol/kg静注）10分後に求めたRSNA 応答曲線は，投与前の応答曲線と差がない。 DSIP投与2時間後では(DSIPは静注後約1時間後よりδ活動性を増加させ，数時間持続すると報告されている-Monnier)，安静時血圧と，その時のRSNAは投与前と著変は認められないにもかかわらず，応答曲線の傾斜は，特に低温側でゆるやかである。即ち平均血圧変動に対する腎交感神経活動性の応答が，この時機では鈍化している。

以上の結果は，睡眠中の交感神経系の調節状態を示す興味ある事実と考えられ，今後例数を増して詳細に検討して行きたい。

Testing the Neurotransmitter Tenets of the Reciprocal Interaction Model of Sleep Cycle Control

J. Allan Hobson

Laboratory of Neurophysiology, Department of Psychiatry, Harvard Medical School, U. S. A.

Mammalian sleep is characterized by the periodic alternation of two distinctly different behavioral and physiological phases: nonREM (or slow wave sleep) and REM (or fast wave sleep). In man, the REM phase of sleep is correlated with the psychological experience of dreaming. Control of the cycle is a function of the the pontine brainstem but the control mechanism is unknown. Experiments have been performed to test the theory, based on cell recording and previous pharmacological studies, that the neurons of the pontine reticular formation are activated by acetylcholine to generate the REM phase of sleep and that this cholinergic activation process is enhanced by a simultaneous withdrawal of inhibition of the same neurones owing to cessation of firing of noradrenergic neurones in the nearby locus coeruleus.

A first set of experiments revealed that experimental production of the REM phase of sleep by microinjection of carbachol into the pontine reticular formation was enhanced in consistency and duration by utilizing smaller volumes of vehicle than previously employed. The β-adrenergic blocking agent, propranolol, was also effective in increasing the REM phase. Since robust

effects were still observed at the lowest possible volumes deliverable by carbachol-filled cannulae, carbachol-filled micropipettes capable of simultaneous activation and recording. from cells were introduced. Microiontophoretic delivery of carbachol activated cells at the pipette tip and produced all or part of the REM phase, depending on the location of the tip. This new method, called cholinergic microstimulation, will be useful in future studies designed to specify, in quantitative detail, the REM sleep activation mechanism.

The results are of general significance in revealing that microscopic quantities of two classes of chemical substances, restricted to very small areas of brain, are capable of influencing global aspects of an animal's behavior. The specific nature of the effective molecules, one a cholinergic agonist, the other an aminergic antagonist, indicates the same behavior may be mediated by symmetrically opposite but complementary mechanisms as predicted by the reciprocal interaction hypothesis.

睡眠の神経性・体液性機構について

松本　淳治（徳島大）

Parabiotic rat の左右脳に発現する徐波睡眠（SS），逆説睡眠（PS）の同期率から見て，体液性因子は主にPSに関与することを発表した（Experientia, 28:1043, 1972）。その後，睡眠機構を表題のように二つに分けて研究を行っている。

1. 神経性機構

乳児が入眠する際には手が温かくなるという俗説を確かめるべく，手背部に円盤状サーミスターを貼布し，脳波・眼球運動・筋電図その他のポリグラムに手背部皮膚温を同時に記録するようにした。

その結果，乳児・成人ともに手背部皮膚温は覚醒 SS に移行する際には上昇することが認められた。諸文献によると手の皮膚の血管は交感神経のみによって支配されており，その部の皮膚温の上昇は交感神経活動の低下によることを意味している。したがって覚醒から入眠への主因子としては交感神経活動の抑制が考えられる。

そこでこの考えを実証するべく，中等度の覚度水準にあるネコの視床下部の交感帯に属する腹内側核を，14Hz から 1Hz へ次第に漸減させてゆく低頻度，1.0 V の低電圧による抑制的に電気刺激を行ったところ，10秒以内に入眠することが認められた。このことは徐波の出現，呼吸の規則化，脈拍の減少によって確認された。

2. 体液性機構

蛋白質合成阻害剤である Cycloheximide（2.5 mg/kg）をラットの側脳室に注射して睡眠に対する影響を調べたところ，PS は 6～14時間抑制され，SS は24時間として見ると影響を受けなかった。しかし，SS を Light sleep(LS) と Deep sleep (DS) に分けて見ると，DS は抑制されるが，LS は抑制されずにむしろ増加する傾向が見られた。さらに注射時間を午前 0 時，6 時，午後 0 時，6 時に変えて注射したところ，午後 6 時に注射した際には DS，PS ともに抑制度が弱く，蛋白質合成阻害に拮抗する因子（恐らく蛋白質合成力）にも Circadian rhythm の存在することが考えられる。

なお，Cycloheximide による PS 抑制は DOPA 投与にかって除かれず，Cycloheximide によって細胞内ノルアドレナリンは減少しないという文献結果から見ても，恐らく PS に関与するノルアドレナリンの作用機序は細胞内レベルのものではないと考えられる。

要約すると，覚醒から睡眠への入眠機構には神経性因子（交感神経活動の低下）が関与し，以後の睡眠持続機構には体液性因子（セロトニン，ノルアドレナリンなど）が関与する。

睡眠覚醒リズムと脳内モノアミン・関連酵素の研究

融　　道男（国立武蔵療養所）

1. 断眠にともなう脳内モノアミン代謝の変化 ： われわれは睡眠機構への

化学伝達物質の関与を研究するために，断眠（sleep deprivation）という実験条件を用いた。スキンナーボックスで回避行動を習熟させたラットが30時間以上にわたってレバーを押し続け，その間REMもNREMも抑制されることを確めたので，この方法を応用して24時間にわたり全睡眠を遮断したラットをつくった。内在性セロトニン（5HT）は，断眠直後にいったん間脳部で減少するがその後自然光の中で短時間の睡眠をとらせると，著しい増加を示すことが注目された。この時同じ部位の5-ハイドロキシインドール酢酸（5HIAA)の増加も認められたため，断眠後の睡眠時に脳内特に間脳で5HTの代謝が増大していることが推察された。これを更に確かめるために，24時間断眠後に^{3}H-トリプトファン（Trp）をラットの腹腔内に注入し，短時間の睡眠後の標識物質の変化をみたところ，^{3}H-5HT量は視床において対照動物より有意に高く，^{3}H-5HIAA量は終脳および視床において有意に高いことが見出された。一方，腹腔内に注入した^{3}H-Trpはほ断眠後眠らせた動物で対照動物よりも圧倒的に高く脳内にとりこまれることが見出された。視床の変化が最も大きかったが，各脳部位とも対照に比し，^{3}H-Trpの蓄積量は有意に高かった。

2. 脳内各部位のモノアミン・関連酵素の24時間リズム ： トリプトファン水酸化酵素活性をラットの終脳，視床，視床下部，中脳＋橋吻側部，橋尾側部＋延髄の5部位で4時間毎に測定したが，いずれの部位にも24時間リズムはみられなかった。視交叉上核を含む部位についても同様の測定を行ったが，リズムは見いだされなかった。しかし，松果体において明期に低く，暗期になると1.5～1.8倍に活性の上昇する明白な24時間リズムが存在することを見いだした。このリズムは内因性のサーカディアンリズムであり，酵素学的な検討により，暗期になると酵素蛋白の増加を生じることが明らかとなり，これが活性上昇の背景であると推定された。チロシン水酸化酵素活性についても，ラットの線条体，視床，視床下部，黒質，青斑などの部位でリズムを見いだすことができなかった。また従来リズムが存在すると主張されていた松果体においてもリズムは見いだされなかった。

睡眠中の異常行動

菱川　泰夫（大阪大・医）

Jouvet（1965）は，ネコの青斑核のCaudal portionを両側性に破壊するとREM睡眠になっても全身の骨格筋のatoniaが起こらなくなり，REM睡眠中に動物は内的な刺激に支配された異常行動を示すことを明らかにした。このようなREM睡眠に関係した動物の異常行動は，人間の睡眠中のどのような異常行動に相当するのかという点について検討したい。

人間の子供には夢中遊行症と呼ばれる異常行動がしばしば起こる。この子供の夢中遊行症はNREM睡眠の深い段階から起こるものであり，REM睡眠から起こるものではないことが明らかにされている。したがって，子供の夢中遊行症はJouvetがネコで観察したREM 睡眠の際の異常行動に相当するものとは考え難い。

次いで慢性の脳器質障害，とりわけ脳動脈硬化症の患者には，しばしば夜間の睡眠中に起き上がり，周囲の状況に対する見当識を失った状態で幻覚に支配されているような異常な言動を示すことがあり，これは夜間せん妄と呼ばれている。この老年の慢性脳器質障害の患者にみられる夜間せん妄はREM睡眠から起こることが多いことは，Feinbergら（1969）や原田ら（1975）の報告によって明らかにされている。この夜間せん妄はJouvet（1965）がネコで観察した異常行動に相当するものと思われるが，それを呈した患者では橋の青斑核の領域が障害されていたものか否かは明らかではない。

ところで，人間の中枢神経系の変性疾患のうちに青斑核も障害されることが知られているものにShy-Drager 症候群がある。この症候群の患者のREM睡眠を検討することは興味ある課題である。筆者らは3例のShy-Drager 症候群の患者につき，夜間睡眠を調べたところ，夜間睡眠は深いNREM睡眠が全くなく，不安定な眠りであり，REM睡眠になってもmental muscle の著しいatoniaは起こらないで，そのうちの1例ではREM睡眠中に上肢や口唇を激しく動かし，夜間せん妄に類似した異常行動を示した。

以上の成績と検討に基づき，人間においても青斑核の領域がREM睡眠中のmuscle atonia の発現に関与していて，その部位の障害が夜間せん妄の発現に関係があり，Jouvet（1965）がネコのREM睡眠の時に観察した異常行動は人間の慢性脳器質障害の際にみられる夜間せん妄に相当するものと推測される。

睡眠と覚醒時における橋網様体刺激により閉口筋運動ニューロンに誘発されるシナプス電位の細胞内記録法による解析

中村　嘉男（東京医科歯科大顎口腔総合研究施設）
Scott H. Chandler, Michael H. Chase（ＵＣＬＡ医）

ポリグラフ用の記録電極を植え込んだ無麻酔慢性ネコの頭部を無痛状態で固定した条件で，自然に起こる睡眠と覚醒期において，橋網様体刺激の閉口筋運動ニューロンにたいする効果を細胞内記録法により解析し，次の結果を得た。

1. 覚醒ならびにNREM睡眠期には，橋網様体刺激（２～４発，２msec 間隔の矩形波電流）は，潜時２～15msec，振幅１～３mV，持続20～80msec の多シナプス性の脱分極電位を誘発した。この脱分極電位に一致して，三叉神経中脳路核刺激による閉口筋運動ニューロンのスパイク誘発は促通された。これにたいして，REM睡眠期には，覚醒ならびにNREM睡眠期と同一の橋網様体刺激は，潜時10～15msec，持続20～30msecの多シナプス性過分極電位を誘発した。これは20～30msecで，振幅３～７mVのピークに達した。この過分極電位にひきつづいて，10～20msecの持続をもち，振幅１～３mV の脱分極電位が誘発された。三叉神経中脳路核刺激による閉口筋運動ニューロンのスパイク誘発は，これらの過分極および脱分極電位に一致して，それぞれ抑制および促通された。

2. 橋網様体刺激により閉口筋運動ニューロンに誘発される電位の性質を解析するために，細胞内通電により膜電位を変えると，覚醒ならびにNREM睡眠期に誘発される脱分極電位は，過分極電流により振幅が増大したので，EPSPと考えられる。これにたいして，REM睡眠期に見られる過分極－脱分極電位の振幅は，過分極ならびに脱分極の両相とも，脱分極電流により増大し，過分極電流により減少した。過分極電流の強度を徐々に増大させると，過分極相は消失し，これと同時に脱分極相も消失した。また，過分極通流により，覚醒およびNREM睡眠期に誘発される脱分極電位と同様の時間経過をもつ脱分極電位は見られなかった。このことから，REM睡眠時に誘発される過分極およびこれにひきつづく脱分極電位は，それぞれIPSPおよび脱抑制によるものと考えられる。さらに，覚醒およびNREM睡眠期に橋網様体刺激により閉口筋運動ニューロンに誘発されるEPSPは，REM睡眠期には残存していないと考えられる。

以上の結果にもとづいて，(1)橋網様体から閉口筋運動ニューロンへは，興奮

性および抑制性の２種類の経路がある，(2)覚醒とNREM 睡眠期には前者の経路が作動すると同時に後者の経路は遮断されており，このため橋網様体刺激によりEPSP が誘発される，(3)REM睡眠期には，逆に興奮性経路が遮断され，抑制性経路が作動するためにIPSP が誘発される，(4)動物の行動状態に依存するこの中枢スイッチング機構により橋網様体の同一刺激は，閉口筋運動ニューロンにたいして，覚醒ならびにNREM 睡眠期とREM 睡眠期との間で，全く逆の結果をおよぼす，と結論した。

覚醒睡眠周期に伴う孤束核ニューロンの活動性の変化

佐藤　豊彦　　江口　国博（愛知学院大）

孤束核およびその周辺のニューロンは徐波睡眠の発現に重要な役割を果していると考えられているが，その単位放電の様相については未だ報告がない。我々は慢性ネコの孤束核領域に微小電極を刺入して単位放電を記録した。

徐波睡眠中に自発放電頻度の増大するニューロンが孤束核から６ケ見出された。然し，放電頻度の増大は徐波睡眠の発現に先行することはなく，脳波上に徐波が持続的に発現する時期になって初めて増大を示した。従って，孤束核は徐波睡眠に関係を有すると推測されるが，その引き金役を果しているとは考え難い。孤束核周辺のニューロンは徐波睡眠中も覚醒時とほぼ同様な放電頻度を示すものが多かった。

心電図のQRS群の直後に放電頻度の増大又は減少を示すニューロンが６ケ得られたが，いずれも孤束核の外部で，主にその背側部から得られた。そのうち５ケは覚醒睡眠周期とは無関係に安定した放電頻度を示した。また，中脳網様体の電気刺激に応答しなかった。他の１ケは群発放電を示し，介在ニューロンと考えられる。このニューロンは睡眠相に応じて放電頻度が変化した。要するに，血圧の求心路に関与するニューロンは覚醒睡眠周期とは無関係に作動することが多いが，介在ニューロンでは関係が現われるのではないかと思われる。

中脳網様体の電気刺激に応答するニューロンは孤束核およびその周辺で特別な局在は示さなかった。然し，橋のニューロンとは異り，反応の強さが覚醒睡眠期諸相に応じて変化することが多く，単一の相においてのみ誘発反応が発現する場合は認められなかった。また，誘発反応が徐波睡眠中に増強されるもの

は殆どが促進性反応で，減弱するものは殆どが抑制性反応であった。従って，徐波睡眠中には中脳から孤束核領域へ向う促進および抑制性信号の均衡の変化が一つの特徴と思われる。

MAM小頭症ラットの睡眠

清野　茂博（愛知県コロニー発達障害研究所）

交配後，膣栓と精子を検出した日を妊娠0日とし，妊娠14日目のラットにメチルアゾキシメタノール（MAM acetate）を20mg/kg，腹腔内投与すると出生仔に100%，高度の小頭症がみられる。この小頭症ラットで松谷らは，6カ月令の大脳両半球の5-HT含有量が，正常値1.08±0.31μg/g-wet wt.に対し，1.83±0.53と有意に増えていることを報告し，Johnstonらは7-10週令の外側部新皮質のNEが，正常値0.44±0.04ng/mg tissusに対し，1.03±0.03と増えているが，total amountは，正常値より　%減少していることを報告している。

われわれはSD系ラットで作出したMAM小頭症の雄について，約100日令で睡眠・覚醒サイクルをしらべた。24時間，昼と夜の各12時間について%Ar，%SS%PS，PS／TS，平均PS持続時間，PS出現回数の各指標について，正常群との間に有意差は検出されなかった。

このことは少なくとも，5-HTとNEの大脳におけるspecific amountが増えても，睡眠・覚醒の主なパラメーターは影響されないことを示している。

LH-RHの生理的薬理的作用（1979. 8. 3）　　課　題　名

有村　章*(Tulane Univ.)

Gravity and Substrate Cues for Orientation in Crustacea.（1979. 9. 18）　　課　題　名

Hermann Schöne**(Max Plank Inst.)

課　題　名　化学受容膜の性質（1979. 10. 12 ～ 13）

側線器受容膜に対するネオマイシンの効果　柳沢慧二・塩沢光一（鶴見大歯）

グルタミン酸受容器の分布と性質　竹内　昭・小野寺加代子（順天堂大医）

第一次求心性神経細胞のγ－アミノ酪酸受容体　西彰五郎（久留米大医）

培養骨格筋細胞のAchR−神経筋接合形成とのかかわり　杉山博之（生理研）

アセチルコリンレセプターの最近の話題　葛西道生・田口陸久（阪大基礎工）

神経筋接合部およびシナプトソームにおける
β－ブンガロトキシンの作用　阿部輝雄（新潟大脳研）

ラット舌上皮の甘味受容タンパク質　佐藤昌康・島崎久仁子（東京都神経研）

Axon initial segmentの微細構造　浜　清（東大医科研）

神経膜外表面および内表面に対するCa^{++}の作用　山岸俊一（生理研）

軸索内の情報伝達　黒川正則・田代朋子（東大脳研）

アミン受容体とアミン関連酵素の調節　永津俊治（東京工大）

オピエート・レセプターとkyotorphin　高木博司（京大薬）

概　　要　化学受容器膜，シナプス後膜，その他化学物質に感受性をもつ膜の生理学的性質，形態学的特徴及び受容体分子の性質については，近年，電気生理学的方法，電子顕微鏡，生化学的技術の併用によって飛躍的な研究の発展がなされているが，本研究会においてはこれらの問題についてそれぞれの研究発表と総合的な討議を行い，この分野の研究の進展をはかる。

抄　　録　**側線器受容膜に対するネオマイシンの効果**

柳沢　慧二　　塩沢　光一（鶴見大・歯）

側線器の受容膜は種々の金属イオンに対して反応し，その結果側線神経放電の変化をひきおこす。この受容機構は味受容器における塩味受容と似たものであると考えられる。すなわち，バイドラーが味覚器で考えたように刺激物質の膜への吸着によって作用が発現するのであろう。刺激イオンと膜との反応はまたルイスの酸・塩基の定義に従えば，酸・塩基反応と考えても良い。ピアソンはさらに又経験則として，ルイス酸・塩基に“かたさ，やわらかさ”の概念を導入した。この考えに基づいて種々の金属イオンの側線器に対する作用の差を整理してみると，イオンの刺激効果の強さの序列とそのイオンの“やわらかさ”

の度合いの序列とが良く一致した。従って側線器受容膜の蛋白質アミノ酸残基と金属イオンとの，酸・塩基反応が化学受容の最初の過程であろう。

一方，側線器は従来から知られているように，機械的刺激受容器としても働いている。Ca^{2+} の側線器に対する作用は，化学的刺激と機械的刺激とできわめて差があるので，両刺激の受容部位が異なっていることが考えられる。ネオマイシンを投与すると耳障害がおこるが，この原因はネオマイシンが受容細胞膜のイノシトールリン脂質の Ca^{2+} 吸着部位を占領してしまうためであるというモデルが提出されている。この考えによれば，ネオマイシンは化学受容に影響を及ぼさず，また機械的刺激受容の障害は Ca^{2+} によって防ぐことが出来る。ネクトルスの側線器において，この考えが成立することを確かめた。本研究によって，側線器の化学受容と機械受容とで関与する膜の部位が異なることが示されたといえるであろう。

グルタミン酸受容器の分布と性質

竹内　昭　　小野寺加代子（順天堂大）

ザリガニの歩脚の開節を用い，グルタミン酸を電気泳動的に与えてグルタミン酸受容器の分布を調べた。数本の筋線維を分離してNomarski顕微鏡で観察すると，２本の軸索が筋線維上に広範囲に分布し，神経終末を作っている。グルタミン酸電極を神経終末の近くに置いて，グルタミン酸を電気泳動的に与えると脱分極を生ずる。感度は通常10～30 mV/nC で，最高 100 mV/nC であった。神経終末から2μm離れると感度は５％以下に減少し，弱い感度は神経終末から20～30μmにわたって観察された。カイニン酸を電気泳動的に与えると，神経終末で生ずる脱分極は拮抗的に抑制されたが，神経終末から離れた所では脱分極はカイニン酸により増強された。これはシナプス受容器とシナプス外受容器とが幾分性質が異っていることを示唆する。なおグルタミン酸による脱分極はグルタミン酸投与後，300μsec 以内に生ずる。これはこの筋におけるシナプス遅延より短く，グルタミン酸が直接筋の受容器に作用していることを示す。

第一次求心性神経細胞の γ-アミノ酪酸受容体

西　彰五郎　　東　　英穂（久留米大・医）

ネコ第一次知覚神経細胞体にはその終末部と同様，GABA受容体が賦与されている。

GABAの諸濃度灌流あるいは電気泳動投与によるコンダクタンスの相対的増加またはGABA電流のHill係数を求めてみると，灌流では2，電気泳動投与では3に近い値が得られる。この結果はGABA充容体が複数のSubunitsで構成され，Subunit間にCooperativityが存在することを示唆する。GABA脱分極の逆転電位は凡そ−24 mVにあり，外液のNa^+，K^+，Ca^{++}濃度を変化させても逆転電位は変らず，Cl^-濃度を減少させた場合にのみ，より脱分極側に移動する。外液のCl^-濃度の10倍変化に対しほぼ60mVの勾配をもって逆転電位は変移するので，GABA脱分極はCl^-コンダクタンスの選択的増大に基因するものと考えられる。ClO_3^-より小さい水和径の各種イオンを細胞内に注入するとGABA脱分極は著明に増大することから，GABAによって賦活化される陰イオンチャネルの径は5.7 Å程度と推察される。外液のCl^-をClO_3^-より大きい陰イオンで置換すると，GAT_3A脱分極は置換直後増大するが，漸時抑制される。この抑制は置換陰イオンの水和径，電荷，分子構造とは特定の関連がなく，GABA・受容体反応の解離恒数(Km)をも変化させないので，置換イオンが直接陰イオンチャネルに作用して抑制効果をもたらすものと考えられる。

Picrotoxin，bicuculline（10^{-7}〜10^{-5}M)は共にKmを変化させずにGABA電流を抑制する。低濃度（10^{-8}〜10^{-5}M）のbarbiturates（thicpentoneおよびpentobarbitone)は，Kmを変えずにCABA脱分極を増大する。また，正常Krebs液中では陰イオンチャネルを通過できないBrO_3^-が，10^{-6}M barbiturates 灌流下で通過できるようになるので，これらの濃度のbarbituratesはallosteric siteに作用し，チャネルの径を開大させるものと思われる。一方，高濃度（10^{-4}〜10^{-3}M）のbarbituratesはGABA受容体膜のみならず，電気的興奮膜にも作用し，イオンコンダクタンスを非選択的に低下させる。

培養筋肉細胞のAChR ── 神経・筋接合形成とのかかわり

杉山　博之（生理研）

神経，筋接合部において，筋肉細胞膜は特殊に分化している。たとえば，

1）接合部ではAChに対する感受性が著しく高い。言いかえれば，AChRの分布密度が著しく高い。

2）接合部に見い出されるAChE分子は，他の部位に見られるAChE分子と異った構造を持ち，沈降係数16Sの大きな会合体を形成している。

3）接合部のAChR分子は，他の部位に見られるAChR分子よりも酸性度が高い（等電点が0.2～0.4 pH単位低い）。

以上の性質のうち，1)に対応する性質は，培養筋肉の場合，神経の影響なしで発現されるらしいことが知られている。即ち，hot spotsと呼ばれるAChR分子の凝集した領域が形成される。また，2)に述べた16S型のAChEも，マウス骨格筋クローン細胞G8-1によって，神経の影響なしで合成されることを我我は見い出した。そこで今回は，3)の酸性型のAChRについて検討した結果，G8-1細胞がやはり神経の影響なしに合成すると思われる結果を得たので報告した。

G8-1細胞を^{125}Iでラベルしたα-ブンガロトキシン（^{125}I-αBT）で標識した後^{125}I-αBT-AChR複合体を抽出し，等電点電気泳動で分析したところ，pH 5.4附近の主ピークの他に，pH 5.0附近に明らかに肩が見られた。この部分を集めて再泳動したところ，やはりpH 5.0附近に収束し，この肩の部分は主ピークとははっきりと異なる成分であると考えられる。^{125}Iによる人為的産物であるという可能性を検討するために，^{3}Hでラベルしたα-BTを新たに合成し，^{3}H-αBT-AChR 複合体を同様に分析した結果も，この結論を支持した。以上のことから，G8-1細胞は神経の影響が存在しない条件下でも，酸性型のAChR分子を合成することが出来るものと考えられる。この酸性型AChRは，シナプス型のAChRであろうと考えているが，この点については，現在のところ確証はない。

アセチルコリン・レセプターの最近の話題

葛西　道生　　田口　隆久（大阪大・基礎工）

アセチルコリン・レセプター（AChR）がシナプス下膜に存在し，情報伝達の重要な機能を担っていることは，1900年代の初めから仮定されていたが，その実体が解明されてきたのは，1970年代以後のことである。豊富にAChRが存在するシビレエイ（Torpedo）の電気器官を材料に用いた生化学的研究により，分子の大まかな構造がわかりかけてきた。

サブユニット構造，及びその分子量について定説は確立されていないが，いくつかの測定結果が出ている。Changeux らのグループは分子量40,000，43,000，50,000，66,000のサブユニット構造を，Raftery らのグループは分子量40,000，50,000，60,000，64,000の構造を主張していた。Changeux らは，特に43,000のタンパク質が重要でこれがイオノフオアでないかと考えていた。

最近，Cohen ら，及びRaftery らのグループは，AChRを含む膜小胞をアルカリ処理することによって，膜内タンパク質をより単純にすることに成功した。この結果によると，43,000の成分は確かに存在するが，これがなくてもAChRは機能することが明らかになった。

われわれは，AChRの研究には，入手の容易さから，シビレエイ（Narke japonica）を用いている。イオンの透過機構や興奮のメカニズムを分子レベルで研究するためには，Narke japonicaのAChRの構造をTorpedo と比較しておくことが，まず必要になる。そこで，先に述べたアルカリ処理の方法を用いて，AChRの構造を調べる実験を開始した。中間報告として次のようなことがわかった。精製した膜小胞中には，分子量40,000と分子量172,000の蛋白質の含量が多く，この両者（あるいは一方）が，AChRの機能に重要な働きをしているらしい。Erabutoxin を用いたアフイニテイクロマトグラフィーで精製したAChRでは172,000の含量が高いし，膜をショ糖密度勾配で分離した実験では40,000の含量が高いものほど^{22}Naで見たCarbamylcholine に対する応答性が高い。もう少し検討する必要がある。また，従来はAChRの精製には主としてアフイニティークロマトグラフィーが用いられてきたが，アルカリ処理を用いるとより短時間に，より簡単で，純粋な精製が可能になる。

神経筋接合部およびシナプトソームにおけるβ-ブンガロトキシンの作用

阿部　輝雄（新潟大・脳研究所）

β-ブンガロトキシン（β-BuTX）は，アマガサヘビ（Bungarua multicinctus）毒より分離された神経毒素であり，骨格筋神経接合部において神経終末からのACh（アセチルコリン）放出を阻止する。β-BuTXの神経筋接合部およびシビレエイ電気器官より調製したシナプトソームにおける作用を電気生理学的，形態学的，生化学的に検討した。

β-BuTXはフォスフォリパーゼA_2活性を有するが，その活性のためにはCa^{2+}が必須である。β-BuTXは終板のAChに感受性に影響を与えることなく，ACh放出を阻止する。神経終末からのACh放出に対するβ-BuTXの効果をみるため，終板電位（e.p.p.）の振幅の変化を調べた。添加とほとんど同時に振幅が急激に減少し，その後一時的に回復するが，やがて次第に減少し，約30分で0になる。

ACh放出阻止におけるβ-BuTXのフォスフォリパーゼA_2活性の役割を知るため，

(1)　アーブロモフェナシルブロミドで化学修飾し，フォスフォリパーゼ活性をほとんど取り除いたβ-BuTXの作用

(2)　Ca^{2+}の代りにSr^{2+}を用いたリンゲル中でのβ-BuTXの作用

を観察した。これらの実験から，添加直後のACh放出の減少はフォスフォリパーゼ活性に依存しないが，その後のACh放出の停止のためにはフォスフォリパーゼ活性が重要であることが示唆された。

高濃度（約10$\mu g/ml$以上）のβ-BuTX　は神経筋接合部において迅速な除神経（denervation）をひきおこす。この際の神経終末の形態学的変化の過程は神経を切断した場合のそれに似ているが，後者よりはるかに速い。

β-BuTXはシビレエイ電気器官より調製した純コリン作動性のシナプトソームにおいて，コリンの高親和性輸送を強く阻害する。この阻害においてもフォスフォリパーゼ活性の関与が示唆された。コリンの高親和性輸送の阻害は，神経終末におけるACh合成の低下をきたすから，ACh放出の停止の原因となりうる。しかし，既に述べたような神経筋接合でのβ-BuTXの複雑な作用を考慮すると，コリンの高親和性輸送系がβ-BuTXの直接的な標的であるとは考えにくい。

ラット舌上皮の甘味受容タンパク質

佐藤　昌康　　島崎久仁子（東京都神経研）

甘味感覚の初期過程は，甘味物質と味細胞表面膜上の受容体タンパク質との結合であると仮定されている。これまでウシ，ラット，マカクザルを用いた実験結果では，この受容体は，0.1 M 燐酸 buffer で抽出した40～60％飽和硫安分画中に含まれる可能性が高い。我々は，ゲル濾過法及び平衡透析法により，^{14}C-ショ糖，^{35}S-サッカリンとラット舌上皮から抽出した40～60％ 飽和硫安分画との結合が特異的であるかどうかを検討してみた。さらに，TritonX-100 を用いて再抽出した膜構成タンパクについても検討を行った。その結果，1）ゲル濾過による binding assay では，ショ糖，サッカリンとの結合が舌上皮から抽出した0～40%，40～60%，60～80%の各飽和硫安分画に認められた。しかしこれらの結合がラベルしていないショ糖，サッカリンの存在でそれぞれ阻害されることで，40～60%分画は他の二分画と異っていた。他方，40～60%飽和硫安分画を舌の筋肉から作成し，上皮からのものと比較すると，ショ糖，サッカリンの結合量は，上皮の場合の$\frac{1}{2}$以下であった。さらに筋では，^{35}S-サッカリンとの結合は，3 mMサッカリン，0.1 M ショ糖によっても阻害されなかった。また，2）平衡透析法を用いて^{35}S-サッカリンと上記3分画との結合を調べた結果も40～60%飽和硫安分画への結合が最も大きかった。次に，3）上皮ホモジネートの遠沈後の沈査を TritonX-100を 0.1％含む buffer で可溶化し3つの硫安分画として再抽出したものと^{35}S-サッカリンとの結合を調べたが，結合は buffer抽出の40～60%飽和硫安分画へのものより小さかった。これらの事実は，buffer抽出の40～60%飽和硫安分画に甘味受容タンパクが存在し，それは比較的表在性のタンパクであることを示唆するものである。

軸索初節部の微細構造

瀬　　清　　小坂　俊夫（東京大学・医科学研究所）

軸索初節部（AIS）は活動電位発生部位として注目されて来た。一方，硬骨魚類嗅球の僧帽細胞およびエリマキ細胞，哺乳類海馬の錘体細胞などのAISには

多くの神経終末が附着していて，AISの細胞膜はこれらの神経終末に対してシナプス前膜あるいはシナプス後膜となっている。海馬錐体細胞のAISの場合，表面に 100 ～ 200 の抑制終末が見られ，ほぼ細胞体表面に見られるものの数と一致する。表面積との比で見る場合，前者は約35%を占めるのに対し，後者は 5 ～ 10%である。したがって，AISは活動電位発生部位としてのみでなく，抑制入力部として重要な意味をもつと考えられる。

これらの部位では，活動電位発生部位とシナプス後膜部とが併存しており，それぞれの形態学的な特徴を直接比較することができるので細胞膜の微細構造と機能との対応を考える手がかりになると考えられる。

AISの微細構造上の特徴としては，細胞膜に見られる特有な裏うち構造，神経細管の索状集合およびフリーリボゾームの存在などがあげられる。これらの三者は必ずしも共存しているとは限らない。無髄部が長い場合には，その遠位部では三者とも存在しないので，最初の無髄部分とAISとは区別して考える必要がある。

AISの裏うちは細胞直下に顆粒状をなす部分，顆粒の先端をつなぐ細胞膜と平行な板状構造部分，および板状構造から軸索内部に分って広がる繊維様部分から成り，活動電位発生部に特有な膜内たんぱくの存在に関係すると想像されている。ランビエー節では膜の裏うちが存在する部分に一致して，E破面上に大型の膜内顆粒で存在することが見られているが，AISの場合には技術的な困難さのためまだそのような所見が得られていない。AISがスパインまたは突起を出す部分では裏うちは存在しない。

AISがシナプス後膜となる場合，多くは対称型であるが，後膜の裏うちは，AIS部に一般に見られる裏うち構造と異なり，細胞膜に連続して見られる均質な薄層から成っている。シナプス後膜の裏うちの一部は伝達物に対する受容体の局在に関係すると考えられており，AISの裏うちと形態的に全く異っていることは注目に値する。

AISの表面には多数の剛毛をもったおちこみが見られ，また細胞質内には多数の剛毛小胞が見られるが，これらはAIS膜構成分子の活発な交代を示すものと考えられる。

神経膜外表面および内表面に対するCa^{++}の作用

山岸　俊一（生理研）

興奮性膜にとっては，細胞外液中のCaイオンの存在は必安不可欠である。細胞内灌流をしているイカ巨大神経の場合，細胞外液中よりNa，Kイオンを除いて$CaCl_2$溶液のみとした場合でも活動電位を発生させることができるが，Caイオンを除くと興奮性は数分のうちに消失する。Sr，Ba，MnイオンはCaイオンの代りに興奮を起させることができる。第2にCaイオンはKイオン透過量が低い条件の膜ではNaイオンと共に活動電位形成に関与する。第3にCaイオンはCa-isethionate溶液を用いCaイオンのみが透過イオンという条件を与えたとき，はじめて静止膜電位においてネルンスト電位の表現をとり膜電位形成に関与する。

細胞内液にあってはCaイオンは活動電位を消失させるイオンとして働き，イカ巨大神経においてはKCl溶液中に5mM以上のCaイオンを加えると2～3分のうちに興奮性が消失し，10分以上の灌流で興奮はもはや回復しなくなり，外液Caと比べ著しい性質の違いを示す。10分の灌流の間に膜抵抗は5分の1以下に減少する。Ca灌流後3分以内にKCl溶液に戻せば活動電位の回復をみることができる。

細胞内を予めKF溶液で良好な状態に保ち，続いて3～20mM $CaCl_2$ 溶液に切換えると，静かに過分極経過を辿りながら約20秒後に，80mV以上の振巾をもつ急激なスパイク発生が起った。これは外液Na依存性で，TTXで抑制されるので，活動電位と性格を同じくしており，Caイオン自身によってひき起された，所謂“Naスパイク”と見なすことができる。以上の所見から，内液Caは灌流後1分以内に“Kチャンネル”続いて“Naチャンネル”のゲートに作用してただ1度の生理的反応をひき起したのち，膜の選択透過能を消失させる。即ち膜の生理的構造を不可逆的に崩してしまうと判断される。

ニューロン内の情報伝達系

黒川　正則（東大・医）

ニューロンの内部には細胞体から軸索末端へ向う順行性の流れと，その逆方向の流れが共存している。順行性の流れは速度の違いによって三種類に大別される。高速（50～500㎜／日）の流れは小胞体膜系および顆粒が主体で，ゲル電気泳動によって50個程度のポリペプチドがみいだされるが，個別的な同定はまだ成功していない。中間速（5～30㎜／日）の流れは，主としてミトコンドリアの酵素および構造蛋白から成る。順行性の軸索流の約80％を占めるのは低速（1～10㎜／日）の流れであり，本研究会ではこれを主題として，知見の現状を述べる。[1) 2) 3)]

低速の軸索流の75％を占めるのは分子量 200 K，160 K，68 K のトリプレット，56 K，53 K の α－および β－チューブリン，43 K のアクチンである。トリプレットの形態的な対応はこれまで不明であったが，我々は末梢神経からニューロフィラメントを分離，精製し，これがトリプレットのみから構成されていることを示した。アクチン＋チューブリン／トリプレットの量比が軸索容量（ないし成長）に対応すること，アクチンの一部は移動の途中で軸索膜（の裏打ち構造）に組込まれると見られること，コルヒチンはチューブリンの移動のみを選択的に抑制することなどについて述べる。

1) H. Mori, Y. Komiya and M. Kurokawa (1979)
J. Cell Biol. 82, 174-184
2) H. Mori and M. Kurokawa (1979) Cell Structure and
Function 4, 163-167
3) Y. Komiya and M. Kurokawa (1980) Brain Res. (in press)

アミン受容体とアミン関連酵素の調節

永津　俊治（東京工大）

神経伝達物質としてのアミンには，カテコールアミンのドーパミン，ノルアドレナリン，アドレナリン，インドールアミンのセロトニンがあり，これに対

応する受容体は前シナプス神経終末と後シナプス神経細胞体に存在する。神経終末内のアミン生合成酵素の活性と量はシナプス活動に伴って調節されており，急性の短時間調節（活性の上昇）と慢性の長時間調節（量の上昇）とがある。調節酵素はカテコールアミンニューロンではチロシン水酸化酵素，セロトニンニューロンではトリプトファン水酸化酵素で，生合成第一段階のプテリジン要求性一原子酸素添加酵素である。急性の短時間内の活性上昇は神経終末よりのアミン遊離に伴って起こり，神経終末の前シナプス受容体をアミンが刺激してcAMP依存蛋白キナーゼが活性化されチロシン水酸化酵素が燐酸化されて補酵素プテリジンに対するKm値が低下されて活性化されるとの仮説がある。後シナプス受容体刺激でも急性の活性化がおこり，この場合はニューロン回路を介すると推定されている。ウシ副腎のチロシン水酸化酵素テトラヒドロプテリンの側鎖の立体構造と反応条件により，補酵素に対して高いKm値と低いKm値を示すので，2種のコンホメーション変化または2種の酵素の存在が推定されるが，このKm値の変化は燐酸化のみならず細胞内ポリアニオンでも起こる。慢性の長時間調節では，アミンニューロンの細胞体でのチロシン水酸化酵素の蛋白合成増大（誘導）がおこり，軸索流で移動して神経終末でも酵素が増量するが，細胞体表面のアセチルコリン（ニコチン）受容体が刺激されてアデニレートサイクレースが活性化され，cAMPが生成して蛋白キナーゼが活性化され，核でのチロシン水酸化酵素のm-RNAの合成が促進されて酵素蛋白の合成が促進されるとの仮説が提唱されている。急性慢性両変化共に，Ca^{2+} の関与が考えうる。

オピエート・レセプターとKyotorphin

高木　博司（京都大・薬）

最近，脳組織におけるオピエート・レセプターの存在が証明され，その性質がある程度明らかにされつつあるが，まだ，結晶の形では分離されていない。一方，オピエート・レセプターに結合する内在性モルヒネ様物質としてメチオニン－，およびロイシン－エンケファリン，α－，β－，γ－エンドルフィンなどのペプチドが分離された。私たちの研究室では，ウシ脳から新らしいモルヒネ様ペプチドとして，チロジル・アルギニンを分離し，これをKyotorphinと命名した。Kyotorphinとオピエート・レセプターの結合鎮痛作用などについてしらべた成績について述べる。

自律神経中枢機構の研究会（1979. 10. 19 ～ 20）

課　題　名

自律神経活動と消化管ホルモン　　新島　　旭

摂食中枢と味覚中枢との関係　　大村　　裕

ラットにおける卵巣ステロイドホルモン分泌とその神経支配について

川上　正澄

視床下部・下垂体・副腎皮質系における階層支配の特徴　　広重　　力

皮膚刺激と副腎支配神経の遠心性放電の反射性反応の意味　　佐藤　昭夫

中枢における自律神経系とは ── 形態学の立場より ──　　水野　　昇

心臓神経枝について ── HRP法に依る所見 ──　　三浦　光彦

血管平滑筋のmuscarinicとadrenergic receptorの性質　　栗山　熙

自律神経を含んだ平滑筋組織の電気刺激　　富田　忠雄

循環系の統合と調節について　　態田　　衛

交感神経血管拡張線維　　入内島十郎

体温調節と循環　　入来　正躬

洞房結節細胞に対する交感神経作用物質の効果　　入沢　　宏

血圧振動の中枢機序　　宮川　　清

心拍リズムの変動に及ぼす自律神経作用　　二宮　石雄

概　　要

昭和54年10月19•20日，生理学研究所において16名の参加者が各自の専門とする分野の問題点について話題を提供し，全員で活発に討論した。討論の中心は「自律神経中枢機構」に関するものであり，先ずこの分野の生理学的研究の現状を把握し，自律神経中枢機構の今後の研究方針を検討した。この会合は自律神経研究の将来の方向にとって大変有効であったと信ずる。

抄　　録

自律神経活動と消化管ホルモン

新島　　旭（新潟大・医）

モルモット，ラット等を使用し消化管（GEP）ホルモンの自律神経活動に及ぼす影響を調べた。麻酔下に開腹し，求心性あるいは遠心性の自律神経活動を1対の銀線電極にて導出し，磁記テープに記録すると同時にリセット時間5秒のレートメーターを通してポリグラフで描記した。

1. 内臓求心系に対する消化管ホルモンの作用　A．ガストリンの迷走神経胃枝の求心性活動に及ぼす作用。ペンタガストリン1または2.5Mgの静注により数分～数10分間にわたり求心性活動の増強を観察した。　B．ブドウ糖感受性の迷走神経肝臓枝求心性活動に及ぼすインシュリンの作用。レギュラーインシュリン20muの門脈内注入により求心性活動の増加がみられた。　C．セロトニンの腸間膜神経求心活動に及ぼす影響。セロトニン10～100ngを大動脈内に注入すると約10分間の潜時の後，数10分に渉って続く求心活動の増加がみられた。50ngを十二指腸内に注入した場合は潜時は約1分であり，粘膜下の求心性神経終末が求心活動の増強にあづかっていることが推測された。

2. 内臓遠心性に対する作用　A．迷走神経胃枝の遠心性活動に及ぼすガストリンの働き。ペンタガストリン10～100ngの静注で数分間続く。著しい活動の増加を観察した。ガストリンの中枢作用を示唆する現象と思われる。　B．迷走神経腹腔枝に及ぼすインシュリンの働き。インシュリン1～10mu を頸動脈内に注入後数10分にわたり遠心性活動が増加した。インシュリン分泌の神経を介するポジィティブフィードバック機構の存在が考えられる。

LH surge 及び排卵の周期性発現に対する大脳辺縁系の役割

川上　正澄（横浜市立大・医）

〔目　的〕

内側視索前野－視床下部系が雌ラット発情前期にみられる排卵性ゴナドトロピンの一過性放出に必須の神経機構であることは多くの報告によりよく知られている。しかし，それらの脳部位の外方に位置する外側視索前野ならびに外側視床下部領域の排卵性ゴナドトロピンの一過性放出における役割りに関する報告は少ない。今回，われわれは急性実験下で以下の実験を行い，外側視索前野－視床下部領域の排卵および血中LH，FSHの一過性放出に及ぼす影響を調べた。

〔材料・方法〕

実験には500－1900h明，1900h－500h 暗の飼育室で飼育した4日性周期を示すWister系成熟雌ラットを用いた。神経切断は小型直ナイフを用いて脳定位的に作製した。神経切断術は発情前期の臨界時刻前にエーテル麻酔下で急性的に行った。採血は頸静脈に留置したカニューレにより無麻酔的に行い，排卵

は翌朝（発情期午前中）に開腹の後卵管膨大部に取り出し顕微鏡下で確認した。血中LH，FSH濃度はradioimmunoassayにより測定した。

実験(1)： 発情前期の臨界時刻前に前脳部，視床下部前部および視床下部中部それぞれの外側領域において両側性に神経切断を行った。前額面に平行に保持した小型ナイフは，実験群では脳定まで降ろし，偽手術群では視床の高さで止めて引き上げた。実験(2)： 発情前期の臨界時刻前に外側視床下部前部の神経切断（ALH切断）を行い，いったん麻酔から覚醒したのち1430h前後にエーテル麻酔下で前脳部内側部を電気化学的に刺激した。刺激には同芯型双極電極を用い，内芯に陽極電流を通電した。実験(3)： 去勢後4週間以上経った雌ラットをday0の1200hにestradiol benzoate(EB)20μg 皮下投与で前処置した。Day 3の午前中にALH神経切断を両側性に行い，同日の1200hにProgesterone（P）2mg を経皮的に追加投与した。偽手術は実験(1)と同様に行った。

〔結 果〕

実験(1)： 外側視床一部中部における神経切断（MLH切断）群では，その偽手術群に比し自然排卵が有意に阻止された。偽手術群では発情前期夕刻に血中LH，FSH濃度の上昇がみられたが，MLH切断群では血中LH濃度が1700h，1800hで，血中FSH濃度は1600h，1700h，1800hで偽手術群のそれぞれの濃度よりも有意に低値を示した。ALH切断群では，同様にその偽手術群に比し自然排卵が有意に阻止された。その偽手術群では発情前期夕刻に血中LH，FSH濃度の上昇がみられたが，ALH切断群では血中LH，FSH濃度がともに1700h，1800hで偽術群のそれぞれの濃度よりも有意に低値を示した。それに対して，前脳外側部における両側性神経切断を行ったラットでは，ナイフを脳底まで降ろしたにもかかわらず自然排卵はほとんど阻止されず，発情前期の夕刻にみられる血中LH，FSHの放出も影響を受けなかった。実験(2)： ALH切断を施したラットの前脳内側部を刺激すると，排卵が誘起され刺激後60～90分にピークを有する血中LH，FSH濃度の上昇がみられた。実験(3)： ALH偽手術を施した去勢雌ラットでは，EB－Pの投与によってday 3の夕刻に血中LH，FSH濃度の上昇がみられた。ALH切断を施したラットでは血中LH濃度が1800hで偽手術群のそれよりも有意に低値を示したが，FSH濃度はいずれの時刻においても偽手術群との間に有意の差がみられなかった。

〔まとめ〕

外側視床下部の前部あるいは中部における神経切断はともに排卵を高率に阻

止し，それに先行する血中LH，FSHのSurge も消失させた。しかし，前脳外側部における神経切断は排卵および血中LH，FSH Surgeにほとんど影響を与えなかった。また，外側視床下部前部の神経切断を施したラットの前脳内側部を刺激すると，排卵が誘起され血中LH，FSHのSurge もみられた。以上のことより，視床下部外側部には排卵性ゴナドトロピンの放出に関連を持つ神経機構が組み込まれており，この神経機構は排卵性ゴナドトロピン放出における基本的神経機構である内側視床前野ー視床下部系に対し修飾的に影響を与えている可能性が示された。

自律神経中枢機構の研究会

広重　　力（北海道大・医）

視床下部下垂体副腎皮質系における階層支配の特徴（発表テーマ）

本発表では視床下部下垂体副腎皮質系を遠心路と求心路の2つにわけ，各々の経路の作動特性をあきらかにすることによって，この閉鎖回路の要ともいうべき視床下部の重要性をあきらかにすることに力点をおいた。その際，求心路の作動，すなわち，ネガティブ・フィードバック効果の作動に視床下部ー脳幹系のカテコルアミンおよびセロトニンが重要であることを強調し，神経内分泌系の調節機構に占める脳内アミンの役割に注目した。

まず，遠心路として視床下部 → 下垂体 → 副腎皮質系の階層支配の特性をあきらかにするために，視床下部性入力，すなわち，内因性ACTH 放出因子（CRF）入力を下垂体門脈ー視床下部正中基底部破壊でブロックし，下垂体ー副腎皮質系のサブシステムの作動様式を分析した。出力としては副腎皮質ホルモンの血漿濃度を用いた。その結果，午前に比して午後は，下垂体レベルで2倍，副腎皮質レベルで2倍，計4倍の振幅増幅（AM）が作動していることがわった。これのみでは十分でなく，さらに振動数変調（FM）が加味されて，生理的な血漿コルチコステロンの午後値が達成されると解釈された。一方，求心路としては従来から知られている遅効性のフィードバック抑制に加えて，速効性の微分型フィードバック抑制の存在が証明された。しかも前者には脳内セロトニン作動ニューロンが，後者にはカテコルアミン作動ニューロンがそれぞれ密接に関与していることが示唆された。これらの知見にもとずき，視床下部下垂

体副腎皮質系の作動様式，とくにACTHの拍動性分泌機序について考察を加えた。

文　献

1) Kaneko, M. and T. Hiroshige(1978)：Am. J. Physiol. 234, R39-R45, 1978.
Fast, rate-sensitive corticoteroid negative feedback during slress.

2) Kaneko, M. and T. Hiroshige：Am. J. Physiol. 234, R46-R51, 1978.
Site of fast, rate-seusitive feedback inhibition of adren

皮膚刺激と副腎支配神経の遠心性放電の反射性反応の意味

佐藤　昭夫（東京都老人総合研究所）

これ迄私共の研究室で，麻酔動物に皮膚刺激を加えた際に自律神経遠心性活動が反射性に亢進又は抑制し，その結果心臓，胃腸，膀胱などの内臓運動が亢進又は抑制することを明らかにして来た。

他方，皮膚刺激がホルモン分泌に及ぼす影響も興味深い問題である。アドレナリン，ノルアドレナリンを分泌する副腎髄質は交感神経副腎枝の支配を受けている。今回，筆者等は交感神経副腎枝の遠心性活動に対する皮膚刺激効果を調べたのでその結果を報告する。

麻酔ラットの交感神経副腎枝の遠心性自発放電活動を連続的に記録し，この活動に対する各種皮膚分節の20秒間の痛み刺激効果を調べた。四肢刺激では持続時間の比較的短い（20秒～5分）亢進性反応が認められ，胸部の下部，腹部刺激では持続時間の比較的長い（1～20分）亢進性効果が認められた。その他の部位例えば首や大腿部の皮膚刺激でもごく僅かな亢進性効果が認められた。急性脊髄ラットでは上記の反射のうち，胸部下部，腹部からの反射のみが認められ他の部位からの反射は全て消失した。

以上の結果から次の事が結論づけられる。皮膚－副腎神経活動反射は，脊髄水準で強力な脊髄分節反射機構を持つ。脊髄無傷の状態では上脊髄水準からの

調節を受けるため，強い脊髄分節性が多少減退する傾向がある。

皮膚刺激により副腎髄質から実際にカテコールアミンが分泌するかどうかについては検討中である。

中枢における自律神経系とは　── 形態学の立場より ──

水野　昇（京都大・医）

中枢神経系のなかに自律神経「系」を形態学的に把握することは可能であろうか。このような観点から自律神経起始細胞の分布とそれらに終わる神経線維について検討した。

自律神経起始細胞の存在形態は，HRPの逆行性軸索輸送を利用する標識法によって，近時一層明確になった。これらの所見には従来の「定説」の修飾・改変を要請するものも少くない。仙髄副交感線維の起始細胞は仙髄中間外側核の境界をこえて，核の背内側方の後角基部にまで分布し，また少数のものは前角にも散在する。胸腰髄交感神経線維の起始細胞は中間外側核のほか，脊髄中間帯を横切って中間内側核から中心管の背側方にまで分布する。心筋を支配する迷走神経線維の起始細胞は疑核の領域のほか，延髄網様体の外側部において，疑核と迷走神経背側核を結ぶ帯状域にも分布する。舌咽および顔面神経副交感線維の起始細胞は，一連の構造として，三叉神経脊髄路核の内側縁の主として背方部に沿って分布する。動眼神経副交感線維の起始細胞は狭義のEdinger-Westphal核内には存在せず，その近傍の中心灰白質を中心に分布する。

中枢自律神経核への求心線維に関する所見はきわめて不十分である。一般にこれらの求心線維の種類・起始部は多彩で多岐にわたる。自律神経核内にみられる軸索終末の定量的分析の結果によると，それぞれの核の比較的近傍に存在するいわゆる介在神経細胞からの求心線維終末の占める割合が大きい。

以上，自律神経核の起始細胞は中枢内において集合はしているが，典型的な神経核の場合にみられるほどの集合度を示さない。また，中枢自律神経核への求心線維群の分析は今のところまだ不十分であって，これらを一つの「系」として形態学的に明確に把握できる段階には達していない。

HRP法による迷走神経心臓枝及び非心臓枝の延髄起始核についての研究

三浦　光彦　　岡田　淳一（群馬大・医）

最近，ネコ及びラットを使ったHRP法による実験から，迷走神経心臓枝の延髄起始核として，(1)疑核（NA）の腹外側に位置する網様体，(2)迷走神経背側運動核（X），(3)NAとX との中間に位置する網様体，(4)NA細胞柱（但し，鰓節性運動神経細胞以外）などがあげられた。以上の所見の追試を兼ねて，迷走神経心臓枝及び非心臓枝の起始核の異同，心臓枝に混入する他の線維要素を調べた。起始核については，心臓枝は上記(1)の領域に，非心臓枝は上記(2)の領域にHRP陽性細胞が優勢に分布していた。その他，混合線維源として，星状神経節及び節状神経節が陽性であった。

カテコラミンとアセチルコリンの冠動脈平滑筋細胞におよぼす効果の動物差について

栗山　熙　　伊東祐之　　北村憲司（九州大・医）

内臓平滑筋の性質は動物種および部位によって著明に異なることが知られている。また血管も弾性血管と低抗血管（筋性血管）でも異なることが知られている。ここでは冠状動脈平滑筋におよぼすカテコラミンとアセチルコリンの反応性について観察し，冠状動脈平滑筋のカテコラミン受容器とアセチルコリン受容器の分布と性質についてモルモット，イヌおよびブタを用いて研究した。

1. アセチルコリン受容器はいづれの動物の冠状動脈に分布し，その性質はマスカリン性受容器である。モルモットでは膜のK－透過性が増加し，そのために著明な過分極を示す。しかし過分極と同時に収縮を発生する。この収縮はK－ 透過性の増加と直接的関係はない。ブタではアセチルコリンは膜電位および膜低抗の変化を示さないで収縮を発生する。これに反してイヌでは膜電位の変化はなく収縮も発生しないが，K－ 拘縮は弛緩する。

2. ノルアドレナリンはモルモット冠動脈では膜の脱分極をもたらし収縮を発生させるが，イソプレナリンは過分極と弛緩をもたらし，遮断剤の作用から前者はα－受容器，後者はβ－受容器の興奮によると考えられた。ブタではノル

アドレナリンもソプレナリンと共に膜を過分極し弛緩する。この作用はβ－受容器の活性化によるもので α－受容器は存在しないことが分った。しかしイヌではノルアドレナリンとイソプレナリンは共にブタと同様の作用を示した。高濃度のノルアドレナリンおよびフェニレフリンは膜電位の変化なくして収縮を発生し，イヌではβ－と α－受容器を有するβ－受容器の作用が優位であることを示した。

3. これらの結果は動物種による差異を明確にしたのみならず薬物－収縮関連機構の詳細な研究が必要であることを示している。

1. 冠動脈血管平滑筋　　2. アセチルコリンとカテコラミン受容器
3. 薬物－収縮連関機構

自律神経を含んだ平滑筋組織の電気刺激

富田　忠雄（名大・医）

平滑筋組織を電気刺激する場合，その反応が電流による平滑筋線維の膜電位の変化を介した直接的反応なのか，あるいはその組織中に存在する自律神経を刺激した結果遊離される伝達物質による間接的反応なのかを区別する必要がある。普通にはテトロドトキシンが神経の活動電位を抑え，平滑筋の活動電位に影響を与えないことを利用して，直接反応と間接反応とを区別している。また，神経のクロナキシーは，平滑筋のものより短かいことを利用して，矩形波電流のパルス幅が短かい時（0.1msec）は神経のみを長い時（10msec 以上）は主に平滑筋を刺激すると考えられている。本研究はこのような点に関して，交流刺激を用いて再検討しようとするものである。

今回はモルモット輸精管を用い，20－5,000Hz の周波数で 0.2 ～ 4 秒間の刺激に対する収縮反応を調べた。収縮を起こす電場の閾値は 20Hz と 50Hz とでは大差なく 1 V/cm 前後である。50～500Hz では周波数の平方根に比例して上昇し，それ以上の周波数では閾値上昇率の増加がみられ，10KHz での閾値電場は 20 V/cm 以上に達する。一定電場で刺激すると弱い刺激（3 V/cm）のときは 50－100Hz で最大収縮が得られ，200Hz 以上では反応しない。強さを増すと，最大反応を起こす周波数が高い方へ移って行き，10 V/cm 以上の電場では 200～500Hz で最大反応がみられ，1 ～ 2 KHz でも弱い収縮を起こし得る。テトロドトキシンを

与えると閾値が上昇するが，低周波の方が著明であり，周波数による収縮反応の差が弱くなる。外液のK濃度を24mMに増すと，閾値の上昇がみられるが，電場を増すと正常と同じ最大反応がみられ，200Hzを最大とする山型の周波数特性が得られる。さらに48mMに増すと，20Hzで最大反応がみられ，周波数の対数にほぼ逆比例して収縮は弱くなる。このような周波数依存性は神経や平滑筋の活動電位の発生ならびに伝導と密接に関与しているものと考えられる。

循環系の統合と調節

熊田　衛（筑波大）

循環系がシステムとしてその固有の機能をはたしうる状態を統合（INTEGRATION）とよぶ。統合がたもたれるのは，循環系の内部にそなわっている自己調節系と，循環機能を外部から調節する外因的調節機構が作動する結果である。そこで循環系のシステムとしての動作を理解するには，2つの調節系のそれぞれの性質と，その相互関係を知る必要がある。循環系の外因的調節には中枢神経系（CNS）が中心的な役割りをはたしていることを考えると，循環統合についてつぎの2つの問題がKEY-ISSUEとなってくる。(1)CNSがなくとも循環系の統合がたもたれるだろうか。(2)CNSによる循環調節の基本構造となる循環中枢（以下VMC）はどこにあり，どのようなメカニズムで作動しているだろうか。

(1)については，GUYTONのグループの研究がある。イヌのCNSを機能的に破壊しても呼吸と血圧を人工的に確保するとつぎの基本的な統合機能は十分にたもたれる。a．ある範囲内で出血させても局所への血流分布と酸素供給は正常とほとんどかわりない。b．輸液をおこなっても血液量，局所への血流分布と酸素供給は正常とおなじである。いいかえれば物質の輸送機能に関しては自己調節機能のみによって正常にちかくたもたれるわけである。

(2)については確定的な結果はまだえられていない。しかし破壊実験，刺激実験，ユニット記録などの結果から延髄網様体のPRESSOR AREAではないかという考えがある。これと対立する考えとして，VMCを視床下部ー延髄にわたって広くにまたがるという考え，またカテコールアミン系のうちA，グループまたはA_5グループにVMCを考える説もある。

交感神経血管拡張線維

入内島　十郎（広島大・医）

イヌやネコの骨格筋の血管には血管収縮線維のほかに，やはり交感神経に含まれる血管拡張線維の支配が存在する。下肢筋の血管を支配する収縮線維と拡張線維は脊髄を出るレベルが異っており，Fruminら（Am. J. Physiol. 173：428, 1953）のイヌにおける実験によれば，L_1 の前根の刺激は下肢の血流の減少を起こしたが，L_2 の刺激は血流の増加を起こした。

SonnenscheinおよびWeissman（Am. J. Physiol. 235:H482, 1978）はネコを用いてこのレベルによる収縮線維と拡張線維の分布の差を，より詳しく追究した。下肢の血管を支配する収縮線維は T_{12} から L_4 までの前根に分布しており，L_1-L_3 にピークがあるに対して，拡張線維の方は L_2-L_5 に分布していて L_4 にピークが存在した。交感神経索を離れるレベルは収縮線維も拡張線維も同様に L_5-L_7 あるいはそれ以下であった。

イヌの大腿動脈を閉塞してその末梢端の圧を測ると（これを大腿動脈末梢圧と呼ぶことにする），圧は閉塞当初はいちじるしく下るがその後次第に上昇し，数10秒でかなりの高さにおちつく，この末梢圧は血圧を側副血行路の抵抗と末梢抵抗で分割したものである。L_3 の白交通枝の刺激でこの末梢圧は下降し，L_2-L_3 の間の交感神経索の刺激で上昇した。これはいうまでもなく，前者により末梢抵抗が減少し，後者により増加したからである（Iriuchijima, Cardiov. Physiol. 1972 P. 87, 1972, Igaku Shoin）.

ラットの大腿動脈の血流の測定は困難であるが，大腿動脈末梢圧の測定により，この動物の拡張線維の存否を検討することが出来る。末梢圧を測定しつつ交感神経索を種々のレベルで電気刺激したところ，どのレベルでも，また α-ブロッカーを用いたのちも末梢圧の減少を認めることはできなかった。これは，ラットにはこの種の拡張線維は存在しないというBolmeら（Acta physiol. scand. 78:60, 1970）の主張を支持する結果である。

循環と体温調節

入来　正躬（東京都老人研）

循環と体温調節の問題の比較生理学的検討を試みる。

脊髄・視床下部・皮膚等の温度受容組織の温度刺激によりひき起される心搏数の変化の方向は，実験対象となる動物種により異なる。行動性体温調節を主とし環境温により体内温の変動するEctotherms,行動性体温調節とともに自律性体温調節により環境温にかかわらず体内温が一定に保たれるEndothermsその中間に泣するとされている冬眠動物についての結果を比較検討し，温度刺激に対する心拍数の変動の意義について再検討する。

洞房結節細胞に対する交感神経作用物質の効果

野間昭典　　小竹　寛　　入沢　宏（生理研）

洞房結節細胞に対するアセチルコリンの影響を検討してきたので，今回はその拮抗神経よりの伝達物質と考えられるアドレナリンの効果を調べた。アドレナリンは最大拡張期電位，活動電位の立上り速度，ピーク電位第4相脱分極の傾斜等を，全て増加させることにより頻脈を起こさせるが，変化の背景に存在するイオン流については，最近Di Francesca，Brown and Noble らの研究がある以外殆んど知られていない。しかも，この研究は極めてpreliminaryで電圧固定も不充分である所から系統的な膜電流の研究が必要とされてきた。

洞房結節細胞のイオン流は主として遅い内向き流（is），外向きK電流(ik)および超遅内向き電流で過分極電位側で活性化するもの（ih）のdynamicな電流から成り立っている。

電圧固定の結果，isは約1.2～1.3倍の増加を示したが，この際 is のカイネテックスには変化を示さなかった。ikについても，一様に1.3倍の増加を示したが，カイネテックスについては変化がなかった。さらにih電流については大きさとカイネックス共に増加の傾向を示した。このようにアドレナリンはdynamic な電流系をほとんど全てに亘り増加させた。この中でも最も顕著な

変化を示したものはisで，ikの増加によっては最大拡張期電位と第4相の傾斜とともに，わずかな変化しか示さなかったのに対しisの増加によって第4相の脱分極速度が顕著に増加する事を知った。

1. Effect of adrenaline on the ionic currert of the sinoatrial node cells, Pflügers Arch. Submitted for publication. 1980

血圧振動の周期

宮川　清（信州大・医）

延髄のnucl. reticularis lateralis, nucl. reticularis parvocellularis, 及びnucl. reticularis gigantocellularisに散在する249 neuronからunit dischargeを記録した。そのなかでvasomotor neuron と考えられるものは20%を占め，その中に交感神経の放電と並行して放電する第Ⅱ型（70%），それと相反性にdischargeする第Ⅰ型（30%）を区別した。この二つのneuronは血圧振動時，交互に放電する。第Ⅱ型のneuronは血圧上昇期に，第Ⅰ型のneuronは血圧下降相に，前者は血圧調節神経の切断により，放電が活発化し，後者は抑制される。脳虚血時に第Ⅱ型細胞が興奮，血圧を上昇させ，脳血流が再開によりこの興奮が減少すると同時に，第Ⅰ型細胞の興奮が高まり，第Ⅱ型細胞は抑制性の伝達物質をふきかけられ，強力に抑制を蒙る。血圧振動催起時の中枢における，ニューロン間の力関係が明らかになると同時に側圧負荷実験によって催起される血圧振動での血圧調節神経の役割が明らかになった。

この血圧振動の周期は何が決定するか，という問題を解くためには，側圧負荷装置の物理的特性が厳密に定義されなければならない。そのような負荷装置を用いての実験でも，一振動での脳血流量と周期との相関は低く，周期は連続的でなく，転位的に変化する。今回このことについて，血圧振動を長時間記録し，2962波を用いてその周期のヒストグラムを作成した。これによると16秒と25秒に鋭い峯をもった，二峯性のヒストグラムが得られた。これは血圧振動の周期変動の量子性を示すものと考えられる。16秒と25秒を中心とした二つの優

越した固有周期があり，下位に更に細かな固有周期がある。周期はその下位の周期を転位しては，遂に，その16秒，25秒の周期に引き込まれて行くものと考えられる。周期決定は中枢で，しかも有機体特有の構造物で作られるため，量子性を持っているものと考えられる。

心拍リズムの変動に及ぼす自律神経作用

二宮石雄　　林　孝和（国立循環器病センター研究所）

心拍数に及ぼす自律神経の影響に関して多くの研究がされて来たが，拍動毎の変動を24時間以上にわたって記録し解析した報告はない。そこで，心電図のＲ－Ｒ間隔ヒストグラムを１時間毎に求め，これを24時間にわたり連続して計測した。

無麻酔・自由行動の家兎で30万～35万拍動について，その変動を調べた結果，分布は正規分布を示さず頻脈側にピークをもつＳ型のものと徐脈側にピークをもつＶ型に２分出来た。前者に交感神経系がより関与し，後者に迷走神経系がより関与していることが神経ブロック実験により判明した。

一般に除神経をすると変動は減少し，著明なピーキング現象を示し，分布もより左右対称の型をもつようになった。

以上の結果から，自律神経系は心拍リズムをより正確にするように働くのではなく，変動させることにより日常の心拍調節を行っている。

課　題　名　聴覚の脳機構（1979. 10. 26 ～ 27）

Effects of neomycin on the lateral line hair cells.
柳沢　慧二（鶴見大歯・生理）

Membrane properties of cochlear hair cells in different cationic environments.　田中　康夫（独協医大・耳鼻科）

Adaptation taking place at hair cellafferent fiber synapse.　古河　太郎（東京医歯大・医・生理）

Sharpening of tuning curves in amphibian papilla fibers.
大山　浩（金沢医大・第一生理）

Auditory fiber input to cerebellum.
川村　光毅（岩手医大・解剖）

Change in activity of the rat auditory pathway after monaural deprivation.　村田　計一（東京医歯大・難治研）

Ultrasonic reception in rodents.　亀田　和夫（北大歯・生理）

Echo location in bat.　Suga Nobuo (Univ. Washington)

Formant detectors in the auditory cortex of the cat.
丸山　直滋（新潟大・脳研）

概　　要　本研究会は，N. Suga（Washington 大学）と，M. W. Merzenich（California 大学）の両教授の来日を期に聴覚の神経機構に関する研究会を開いた。

研究発表者９名（参加者を含めると40名に達した）は聴機能に関し，解剖学及び生理学的方法論で研究した成果を発表した。

N. Suga は，コウモリが超音波によって空間定位を行っていることから，コウモリの聴覚を研究しているが，長年に亘る研究成果の review を行い，超音波スピーカの製作法なども披露した。川村はHRP法を用いて聴神経の小脳への上行路を検索した研究成果を発表し，HRPが神経系の解剖学的解析に有力な方法であることを示した。この他に聴覚器有細胞のイオン環境に対する変化，キンギョの有毛細胞の順化が，シナプスでおこることなど多数の研究成果の発表があり，盛んな討論が行われた。

EFFECTS OF NEOMYCIN ON THE LATERAL-LINE HAIR CELLS 抄 録

K. Yanagisawa and K. Shiozawa

Department of Physiology
Tsurumi University School of Dental Medicine,
Yokohama

Effects of neomycin and calcium on the mechano-sensitivity of the lateral-line organ were investigated. Experiments were performed on the neuromasts of the epidermal lateral-line organs in the tail of the mudpuppy. Afferent spikes were recorded by a suction electrode. 8 Hz sine waves of mechanical vibration were employed as stimuli. Afferent spikes were averaged by a signal processor. To investigate the effect of neomycin on the mechano-sensitivity, different concentrations of neomycin in distilled water were applied to the organ. When a solution of neomycin with a concentration of 10^{-4} was applied to the neuromasts for 5 min, the afferent synchronization was completely suppressed. This effect was reversible. Afferent synchronization was improved remarkably by application of $CaCl_2$ solutions. Suppressive effects of neomycin were reversed by application of excessive calcium. After application of neomycin the mechano-sensitivity was suppressed, but the chemical responses to cations were unchanged. This phenomenon may be explained by differing receptive mechanisms in mechano- and chemoreception. From the results of experiments on tadpoles' lateral-line organ, Yoshioka et al. explained the chemical responses with the aid of a site-binding chemical adsorption model and suggested these sites were in the protein at the membrane surface. From observing the drug action of neomycin, we conclude that the action site of calcium for enhancement of mechano-sensitivity is related to membrane lipids.

MEMBRANE PROPERTIES OF COCHLEAR HAIR CELLS IN DIFFERENT CATIONIC ENVIRONMENTS

Y. Tanaka

Dokkyo University School of Medicine,
Department of Otolaryngology, Tochigi

The mechano-sensitivity of lateral-line organs is known to be a function of the external calcium concentration (1). Therefore, studies involving an action of calcium on the sensory hair surface should be pursued also in the cochlea, of which the endolymph is characteristic in high potassium concentration. It has been reported that the calcium content of cochlear endolymph is very low (2). Calcium lack produced by chelation of EDTA in the scala media reduced cochlear microphonic potentials (3). Calcium ions and the other divalent cations introduced into the scala media reduced the microphonic potentials in proportion to their concentration. Cadmium was the most toxic. For maintaining the sensitivity of the receptive function in the cochlea, it is the first prerequisite that the sensory hair surface is exposed to the endolymph of high potassium concentration and a proper calcium concentration of small amount is the second prerequisite.

REFERENCE

1) O. Sand:
Effects of Different Ionic Environments on the Mechanosensitivity of Lateral Line Organs in the Mudpuppy.
J. comp. Physiol., 102, 27-42 (1975)

2) S. K. Bosher and R. L. Warren:
Very Low Calcium Content of Cochlear Endolymph, an Extracellular Fluid.
Nature, 273, 377-378 (1978)

3) Y. Tanaka, A. Asanuma and K. Yanagisawa:
Effect of EDTA in the Scala Media on Cochlear Potentials.
Proc. Japan Acad., 55, Ser. B, 31-36 (1979)

ADAPTATION TAKING PLACE AT HAIR CELL-AFFERENT FIBER SYNAPSE

T. Furukawa

Tokyo Medical and Dental University
School of Medicine
Department of Physiology, Tokyo

In adapted state, responses to a continuous stimulus is reduced, but the ability to detect small changes in the stimulus intensity is usally well maintained. In goldfish sacculus (fish's

inner ear), adaptive process with the above mentioned properties was demonstrated as a change in the amplitude of the excitatory post-synaptic potentials (E.p.s.p.s) recorded intracellularly from primary afferent fiber terminals. Since there is no adaptive change in the microphonic potentials, adaptation with such a dynamic property must be produced at the afferent synapse of hair cells[1].

Fig. 1 shows the intensity-response relation studies under different conditions. The response to the start of the sound (filled circles) rises as a sigmoid curve with increase of the sound intensity until it saturates at about 94 dB SPL. The saturation is most likely attributable to the non-linear summation at the post-synaptic membrane. Now, the e.p.s.p.s run down fairly rapidly until a quasi-steady state (crosses) is reached. The dynamic responses of this fiber to a step increment or decrement of the sound intensity are shown by open circles and triangles for adapting sound of 100 & 107 dB, respectively.

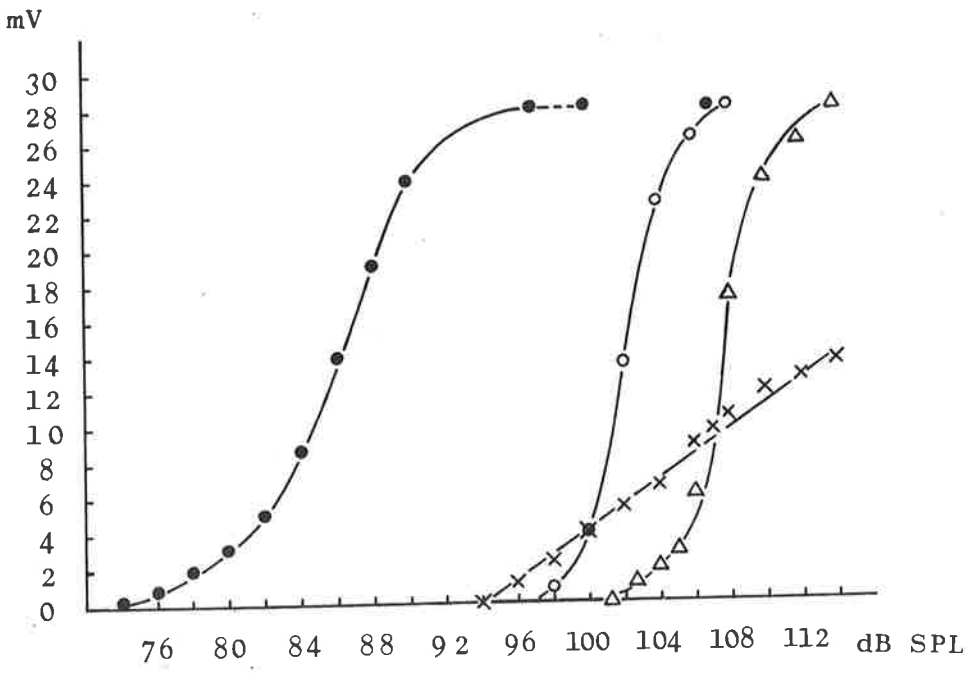


Fig. 1. Amplitude of e.p.s.p.s recorded from single afferent fiber. Sound stimulus (frequency, 400 Hz; duration 100-200 msec) was delivered once every 1-2 sec from a loudspeaker placed in front of the fish. Spikes were blocked with TTX.

The mechanisms underlying these observations are mostly explicable from a model in which different sensitivities are assumed for different release sites within hair cell (multiple release site model[2]). Discussions will be made on how graded release, adaptive rundown of e.p.s.p.s, and incremental as well as decremental responses could be explained.

REFERENCE

1) C.H. Norris, P.S. Guth, and E.A. Daigneault
The site at which peripheral auditory adaptation occurs.
Brain Res. 123, 176-179 (1977).
2) T. Furukawa and S. Matsuura
Adaptive rundown of excitatory post-synaptic potentials at synapses between hair cells and eighth nerve fibres in the goldfish.
J. Physiol. 276, 193-209 (1978).

SHARPENING OF TUNING CURVES IN AMPHIBIAN PAPILLA FIBERS.

H. Ooyama

Kanazawa Medical University
Department of Physiology, Uchinada,
Ishikawa 920-02

Although controversies are present, as to whether there are large discrepancies or not between the tuning curves (threshold response areas of cochlear nerve fibers measured with pure tones), and the mechanical resonances of the basilar membrane, the general trend is to recognize that the formers are significantly narrower than the latters, and that the rises of the nerve fiber thresholds toward high frequency range from the best frequncy are quite steep.

So, some sharp filtering mechanisms should be present between the mechanical input and the neural output. One attracting hypothesis for neurophysiologists to apply is the lateral inhibition which has been worked out by Hartline on the limulus eye (1), but the presence in the primay auditory fibers of which has been negated (2). Inhibitory processes in a broad sense, however, might

work emphasizing the spacial border of excited area, which corresponds to the sharpening of tuning curves in auditory system.

In the amphibian papilla nerve of frog or toad there is a phenomenon which is called periheral inhibition (2), and somewhat simillar phenomena seem to be present in the mammalian cochlear nerve too (3). We compared the tuning curves for the amphibian nerve units with pure tone bursts of various rise times (4). Tuning curves toward both the high and low frequencies rose gradually from the best frequencies of the units. When the rise time was increased the rise of threshold toward the high frequencies became very steep. When the thresholds were arbitrarily defined as the intensity of stimulus which gave certain numbers of spikes, the rise of threshold toward high frequencies became steep also. Both these phenomena may be expected from the presence of the peripheral inhibition. As the determination of tuning curves in mammalian cochlear nerves comes generally under the two conditons, namely, slow rise times of stimulus tone bursts and multiple spikes as the index of the threshold, it was suggested that the peripheral inhibition or corresponding phenomenon might contribute in the sharpening of the mammalian tuning curves (circular in the occasion of 4).

This time, we studied the response of amphibian papilla nerve fibers with pairs of single sine wave stimuli to determine how the peripheral inhibition sets in. When the first or conditioning sine wave was weak, oscillation of the firing probability for the second or test wave followed. The period of the oscillation coincided with the best frequency of the unit, which might suggest the presence of mechanical resonance in the ear. When the conditioning wave was strong, suppression for the test stimulus continued for 10-100 msec after the conditioning stimulus.

We are yet to formulate the set-in time and intensity of the

peripheral inhibition and explain the sharpening of tuning curves from this process quantitaively. From this study, however, it seems that the broad tuning curves obtained by rather unconventional fast rising tone bursts were not due to some deffects in our stimulating system, nor due to the wide spectral distridution at the start of the stimulus tones.

REFERENCE

1) H. K. Hartline:
The Receptive Fields of Optic Nerve Fibers.
Am. J. Physiol., 130, 690-699 (1940)

2) E. F. Evans, J. Rosenberg and J. P. Wilson:
The Frequency Resolving Power of the Cochlea.
J. Physiol., 216, 58-59P (1971)

3) Y. Katsuki, T. Watanabe and N. Suga:
Interaction of Auditory Neurons in Response to Two Sound Stimuli in Cat.
J. Neurophysiol., 22, 603-623 (1959)

4) H. Ooyama, J. Yano, T. Sugai and Satsuki Sawada:
Effect of the Rat of Rise of Tone Burst on the Tuning Curve in the Presence of Peripheral Inhibition.
J. Acoust. Soc. Am., 64, S85 (1978)

CHANGE IN ACTIVITY OF THE RAT AUDITORY PATHWAY AFTER MONAURAL DEPRIVATION

K. Murata, J. Horikawa, H. Funai and S. Minami

Tokyo Medical and Dental University,
Medical Research Institute,
Department of Neurophysiology, Tokyo

Excitability was examined by [14C]-deoxyglucose (DG) uptakes and by evoked potential in the brain stem auditory nuclei of rats.

DG (20 μci/100g) was injected intravenously one to twentythree days after one ear destruction. Exposing to 70 to 90 dB SPL white noises for 45 minutes, the brains were sectioned for the autoradiography. The autoradiographs were analyzed by a graphic processor and a PDP-11. Immediately after the deprivation,

the uptakes of DG were clearly asymmetric at each level of the right and left auditory pathways up to the inferior colliculi (ICs). The uptake in the cochlear nucleus ipsilateral to the deprived ear was as low as that in the surrounding background, while the dominant DG uptakes were observed in the ipsilateral superior olivary complex (SO), lateral lemniscus (LL) and IC. The asymmetry remained for four days after the deprivation. Then the uptakes recovered gradually in the ipsilateral SO, LL and IC.

Auditory evoked potential in response to a click were recorded from the ICs or SOs with the chronically implanted electrodes before and after the deprivation. Just after the deprivation, the contralateral IC potential decreased to 20 to 30% of the initial size, while the ipsilateral changed little. From eighth to tenth day, the amplitude of contralateral IC potential began to improve, and reached to 50 to 60% of the initial amplitude on fifteenth to eighteenth day. The potential changes in the ipsilateral IC and in SOs of the two sides were not so remarkable as those in the contralateral IC.

ULTRASONIC RECEPTION IN RODENTS

K. Kameda, T. Kamada and N. Yonezawa

Hokkaido University School of Dentistry
Department of Physiology, Sapporo

Previous study of ours on ultrasonic emission among certain species of rodents will be briefly described before we report about peripheral auditory mechanisms of mongolian gerbils(*Meriones unguiculatus*) with emphasis on ultrasonic reception.

Cochlear microphonics(CM) was recorded. Threshold curves (Fig.1) extended well over the ultrasonic ranges usually emitted by rodents. Sensitivity, defined as the reciprocal of CM threshold (1/Th), depended also on the sound direction. In Fig.2, directional sensitivity relative to that for sound source in front(0°) was expressed as the distance from center. The higher the frequency, the greater was the directional preference: ultrasound may be more suited for sound localization.

Compound action potentials(N_1, N_2) were also recorded. Their features, i.e. thresholds, amplitudes and latencies, were analyzed with respect to sound frequency and intensity.

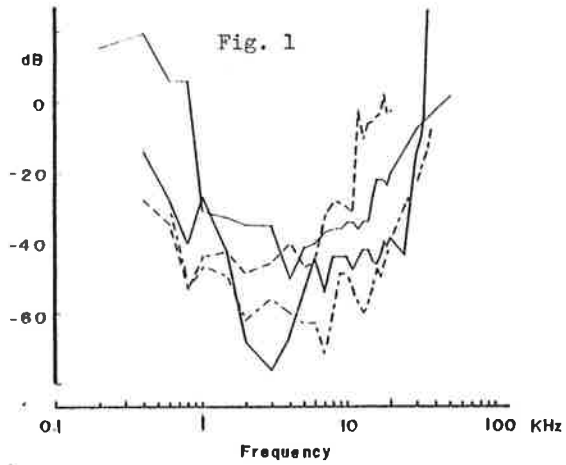


Fig. 1

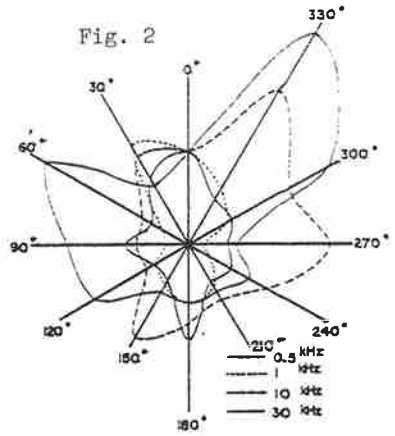


Fig. 2

HOW AUDITORY IN ORMATION IS REPRESENTED BY THE BAT'S BRAIN

Nobuo Suga

Department of Biology, Washington University
St. Louis, Missouri 63130, U.S.A.

For echolocation, the mustached bat (*Pteronotus parnellii rubiginosus*) emits orientation sounds, each of which consists of a long constant-frequency (CF) component followed by a short frequency-modulated (FM) component. The CF component is an ideal signal for target detection and measurement of target velocity. The FM component is suited for localization, ranging, and characterization of the target. The auditory cortex of this species is very large and contains three functional areas specialized for processing biosonar information: DSCF, FM and CF/CF processing areas. (1) The DSCF processing area is devoted to processing information carried by the second harmonic of the CF component of Doppler-shifted echoes. It has a radial frequency axis representing target-velocity information and a circular amplitude axis representing subtended target-angle information. Along the frequency axis, best frequency changes at

a rate of 20-30 Hz/neuron, i.e., velocity information is represented by increments of 5.6-8.4cm/sec/neuron. The systematic representation of stimulus amplitude by the location of activated neurons is called *amplitopic representation*. In terms of binaural interaction, the DSCF processing area consists of two functional subdivisions which are suited for either target detection or localizstion. (2) In the FM processing area, neurons are specialized for responding to particular combinations of FM components in orientation sounds and echoes. For their excitation, an important stimulus parameter is echo delay, which is the primary cue for target ranging. Therefore, they are functionallly sensitive to target range. Two classes of *range-sensitive neurons* were found: (a) *tracking neurons*, whose preferred echo delay (*best delay*), i.e., preferred target range (*best range*), for response to an echo following the orientation sound becomes shorter and narrower as the bat closes in on targets and (b) *range-tuned neurons*, whose best range is constant, responding to targets only when these are within a certain narrow fixed range. Range-tuned neurons are systematically arranged according to their best ranges, so that they form a neural axis representing target range from 7 cm to 310 cm. This is called *odotopic representaiton*. Best range varies at a rate of 2.0 cm/neuron along the range axis. Many range-tuned neurons are tuned not only to particular echo delay, but also to a preferred echo amplitude. That is, they are specialized to respond best to targets with particular cross-sectional areas and at particular distances. Furthermore, they respond better to Doppler-shifted echoes from targets approaching. (3) In the CF/CF processing area, neurons are specialized for responding to particular combinations of CF components which are harmonically related. The amplitude relationship between the CF components to be combined is very important in some neurons for their excitation. Their putative function is to dectect the presence of nearby echolocating conspecifics which may be competing for insect prey in the same area. It should be noted that neurons in the FM and CF/CF processing areas are specialized to "examine" combinations of information-bearing elements for processing complex sounds. (Work supported by NSF.)

FORMANT DETECTORS IN THE AUDITORY CORTEX OF THE CAT

N. Maruyama, K. Saitoh and M. Kudoh

Niigata University, Brain Research Institute,
Department of Neurophysiology, Niigata

The authors have already reported that about 25% of units in the auditory cortex AI exhibited sustained responses to pure tones and about 75% of the remaining units exhibited the sustained responses to bands of noise in cats paralyzed with flaxedil. In the present experiment, synthesized formants were applied to the units unresponsive to both pure tones and bands of noise.

The results are based on a study of 96 units. Out of 30 units unresponsive to both pure tones and bands of noise, 10 responded well to the synthesized formant. The effective range of formant frequency in each unit was so restricted that about 10% deviation of the formant frequency made the stimulus ineffective. The best formant frequencies of the 10 units ranged between 2000 Hz and 23000 Hz. Although a wide band of noise centered at the best formant frequency was slightly effective in some cases, it can be said that these units were responsive exclusively to the synthesized formant. They, therefore, would act as formant detector neurons in the auditory cortex.

As for the bandwidth of components of the synthesized formant, the best bandwidth varied from 0 to 180 Hz wide with units.

REFERENCE

1) N. Maruyama, K. Saitoh and M. Kudoh:
Sustained responses of auditory cortex neurons in cats.
J. Acoust. Soc. Jap. (in press)

PATHWAYS FOR ACOUSTIC IMPULSES TO THE CEREBELLUM

K. Kawamura

Iwate Medical University,
School of Medicine,
Department of Anatomy, Morioka

Cortical neurons in layer V of the cat auditory cortex send their axons to the intermediate and deep layers of the superior colliculus and the dorsomedial part, mainly, of the inferior colliculus. Collicular cells terminate in the dorsolateral subdivision of the pontine nuclei which receives fibers directly from the auditory cortex as well. It thus appears that acoustic inputs from the cortex and the colliculi converge upon the same pontine area, from which pontocerebellar (mossy) fibers arise and terminate in the granular layer of the vermal acoustic area in the cerebellum, mostly in lobules VI and VII.

The medial part of the caudal half of the medial accessory olive, on the other hand, receives collicular fibers and gives rise to olivocerebellar (climbing) fibers that end in the molecular layer of the mid-vermal cortical region.

REFERENCES

1) K. Kawamura and T. Hashikawa:
Olivocerebellar projections in the cat studied by means of anterograde axonal transport of labeled amino acids as tracers.
Neuroscience, 4 (1979) to appear

2) A. Brodal and K. Kawamura:
The olivocerebellar projection. A review.
Adv. Anat. Embryol. Cell Biol. (1979) to appear

FUNCTIONAL ORGANIZATION OF MIDBRAIN AND FOREBRAIN AUDITORY STRUCTURES

M. M. Merzenich

Coleman Memorial Laboratory, University of California, San Francisco, U.S.A.

Recent studies conducted in the Coleman Laboratory have been directed toward establishing a better understanding of: a) the processing accomplishments; and b) the basic organization of the information processing machinery of the central suditory nervous system. First, in psychophysiological studies conducted in profoundly deaf patients implanted with intracochlear electrodes (in studies direct-

ed toward development of an electrical stimulation prosthesis for the profoundly deaf), it is possible to predictably and independently control the extent and site as well as the temporal discharge patterns of primary suditory neurons. These studies indicate what, of the sptaio-temporal information delivered to the central auditory nervous system, actually constitutes the code for different aspects of sound sensation. Some of the important implications of these studies re the nature and structure of central auditory processing machinary will be discussed.

Second, features of this central auditory machineray have been revealed in physiological "mapping" studies designed to define the response characteristics of neurons as a function of their locations within auditory nuclei and cortical fields. Such studies have revealed: a)There is actually an intriguing discontinuous representation of the cochleaa within at least some central auditory nuclei. b) There is a representation of the cochlear across at least one axis of all auditory nuclei and cortical fields. c) There is a complex second level of abstraction of information within brain stem nuclei, with several very different abstracted products all delivered (with spectacular topographic coincidence) to different largely segregated sectors of the same basic midbrain processing machinery (the central nucleus of the inferior colliculus). d) There are two largely segregated auditory systems with very different response characteristics and organizations, projecting forward from the inferior colliculus. e) In one of these systems, at least several forebrain components contain a number of large response-specific processing modules ("biaural bands"). f) Evidence supports the conclusion that larger cortical processing mudules contain cortical processing modules ("minicolumns") of smaller dimension.

Third, a series of studies have been conducted at all levels of the central auditory nuclei to define how auditory nuclei and cortical fields are interconnected. The experimental approach adopted allows a definition of all of the sources of input and destinations of output from the same cortical or nuclear loci and hence, with physiological definition of injection sites, a three dimensional reconstruction of all internuclear and nuclear-cortical field connections. There

are very complex interconnections between auditory nuclei and auditory cortical fields, with, again, important implications for the auditory information processing machinery.

Finally, studies have been conducted in cortical fields (because of practical advantages, principally in somatosensory cortex) to determine whether or not topographically organized maps are static, or whether (e.g., on the basis of use) they are subject to "plastic" changes. These studies demonstrate that (at least in the somatosensory system): a) all cortical territory is being competed for; b) remarkable plastic changes (new, progressive topographic reordering) can occur in cortex when its normal input is silences, but remains connectionally intact.

All of these studies bear very important implications for the information processing accomplishments and for the structure of the information processing machinery of the central auditory nervous system. Such studies provide us with increasing insight as to how auditory perception is a product of the central auditory nervous system.

THALAMOCORTICAL ORGANIZATION OF THE AUDITORY SYSTEM IN THE CAT STUDIED BY RETROGRADE AXONAL TRANSPORT OF HRP

Kahee Niimi

Department of Anatomy
Okayama University Medical School
Okayama

The thalamic projections to the auditory cortex in the cat have been traced with horseradish peroxidase (HRP). The primary auditory area receives fibers from the main laminated portion of the ventral principal part of the medial geniculate body (MGB) at anterior and middle levels. These projections are organized topically in the mediolateral direction and probably also in the anteroposterior and dorsoventral directions. The secondary auditory area has its main input from the lateral portion of the magnocellular part of MGB. It

also receives a few fibers from the dorsal principal part and the ventromedial portion of the ventral principal part of MGB. The suprasylvian fringe and the dorsal part of the posterior ectosylvian area (Ep) receive fibers largely from the dorsal principal part. The ventral part of Ep receives cortical afferents from both the ventromedial portion of the ventral principal part and the dorsal principal part of MGB. The insulotemporal area receives fibers mainly from the dorsal principal part, and partly from the ventromedial portion of the ventral principal part of MGB at posterior and most posterior levels. The posteroventral part of SII receives many fibers from the dorsomedial portion of the magnocellular part of MGB, and a lesser number from the dorsal principal part of MGB and the supragenicular nucleus.

NEURAL MECHANISM OF VOCALIZATION AND HEARING IN BIRDS

N. Saito

Dokkyo University School of Medicine
Department of Physiology

The auditory discrimination capacities of avian species and their response to "biologically relevant" sounds have been worked out in considerble detail. In connection with their auditory perception, song development and the underlying neural substrates will be reviewed:

1) Perception of species-significant sound
   i) Response to vocalization sound ii) "featur detecting" cell
2) Song learning
   i) Type of song ontogeny ii) Nerve innervation of the syrinx
3) Neural control of vocalization
   i) Hypoglossal laterality
   ii) Functional projection of vocalization centers
4) Connection among auditory and vocalization centers

Structural and functional features of vocalization system would provide some insight into general principles of avian auditory mechanism underlying high sensitivity and perception of such complex sounds as species-specific vocalization.

REFERENCE

1) Karten, H. J. (1968). The ascending auditory pathway in the pigeon (Columba livia). II, Telencephalic projections of the nucleus ovoidalis thalami. Brain Res., 11, 134-153.
2) Konishi, M. (1963). The role of auditory feedback in the vocal behavior of the domestic fowl. Zeitschrf. Tierphsychol., 20, 349-367.
3) Konishi, M. (1969). Hearing, Single unit analysis, and vocalizations in songbirds. Science, 166, 1178-1181.
4) Leppelsack, H. J. (1978). Unit responses to species-specific sounds in the auditory forebrain center of birds. In: Auditory processing and animal sound communication (symp. 1977). Proc. Fed., 37, No.10., 2336-2341.

5) Nottebohm, F., et al. (1976a). Central control of song in the canary, Serius canarius. J. Comp. Neur., 165, 457-486.
6) Nottebohm, F., et al. (1976b). Left hypoglossal dominance in the control of canary and white-crown sparrow song. J. Comp. Physiol., 108, 171-192.
7) Saito, N., Maekawa, M. and Kimura, K. (1978). Lateral innervation of the syringeal muscles of the chicken. Proc. Jap. Acad., 54, B5, 251-256.
8) Scheich, H. (1977). Central processing of complex sounds and feature analysis. In: Life Science Report 5, Dahlem Komferenzen, Berlin, 161-182.
9) Bonke, B. A. et al. (1979). Connectivity of the auditory forebrain nuclei in the guinea fowl (Numida meleagris). Cell Tissue Res., 200, 101-121.

CEREBRAL LATERALIZATION OF EMOTION

T. Tsunoda

Medical Research Institute
Tokyo Medical and Dental University, Tokyo

The present study investigates the hypothesis that there exists a difference of the laterality for processing emotional stimuli in terms of contra-lateral shift for the pure tone sound by the sexual ejaculation between the Japanese and non-Japanese.

An influence of auditory cerebral dominance for 1 KHz pure tone after ejaculation by musturbation was measured as a function of time lapse on healthy 13 Japanese and 6 non-Japanese men. All the Japanese subjects showed the contra-lateral shift of the laterality from non-dominant to dominant hemisphere immediately after the ejaculation and it took 110 minutes for the recovery. Five out of six non-Japanese subjects (4 Westerners and 1 Korean) showed no contralateral shift. Exceptionally, one Austrian showed the same response as the Japanese. The different reactions observed in the critically stimulated emotional condition by ejaculation suggest that the possible difference of the laterality for emotion and sexual function; i.e. left for the Japanese and right hemisphere for non-Japanese.

The above obtained results well coincide with Tsunoda's hypothesis stating that emotional function is lateralized in the verbal hemisphere in the Japanese and in the non-verbal one in Westerners, and the difference is caused by the environmental difference among mother tongues and not by genetic factors.

課　題　名　The Japanese Contribution to Nerve and Muscle Physiology.

（1979. 10. 31）

Huxley, A. F.**(London Univ.)

Biomembraneと生体物質との相互作用（1979. 11, 1 ～ 2）　　課　題　名

電子伝達系に対するphloretinの効果
今西幸男　木村俊作（京都大学工学部）

合成高分子膜の血液障害度測定法について　神前　五郎（大阪大学医学部）

各種透析膜に対する血液の反応　太田　和夫（東京女子医科大学）

抗血栓性材料の機能　松本　博志（東京大学医学部）

膜面層の構造と組織のEM観察　坂奥喜一郎（東京農工大学工学部）

センダイウィルスと赤血球膜の相互作用　大西　俊一（京都大学理学部）

ポリアミノ酸を一成分とするABA型ブロック共重合体膜の構造，物性
中島　章夫（京都大学工学部）

生体膜蛋白質と脂質膜との相互作用（チトクロム b_5 を例として）
佐藤　了（大阪大学蛋白質研究所）

赤血球ゴースト膜と陽イオンの相互作用　亘　弘（国立生理学研究所）
西川　弘恭（京都府立医科大学）

エネルギー変換膜　香川　靖雄（自治医科大学）

脂質透析による脂溶性物質の選択的除去　岡村　純（大阪大学医学部）

半透膜にとじこめた酵素溶液を含む系の反応性　魚住光郎（大阪大学医学部）

総　合　討　論　亘　弘（国立生理学研究所）

討　論　参　加　浅原　照三（九州工業大学）
妹尾　学（東京大学生産技術研究所）

概　要

Biomembraneとは，生物学者の立場からいうならば生体膜のことであり，一方工学者の立場からは医用合成高分子膜（biomedical artificial membrane）を指す。後者は前者の機能を指向すると同時に，合成高分子膜についての知見の集積は生体膜機能の理解を深めるものである。

本研究会の目的は生体膜，医用合成高分子膜およびその双方に関心を有する研究者が一堂に会し，各自の研究成果をセミナー方式で交換，討論することによって相互理解を深め，Biomembrane研究の発展に寄与することにある。

抄　　録　電子伝達系に対するphloretinの効果

今西　幸男　　木村　俊作（京都大学工学部）

phlorizinのaglyconeであるphloretinは，膜系の電気ポテシャルの分布を変化させる事が知られている。このphloretinがミトコンドリアの呼吸系に与える影響を調べた。phloretinはstate-4呼吸について，site Ⅰにおける電子伝達の流れを阻害したのに対し，site Ⅱの流れを促進した。site Ⅲについては阻害作用を持たなかった。脱共役剤であるDNP添加によるstate-3呼吸については，phloretinはsite Ⅰ，site Ⅱ両者における電子の流れを阻害した。DNPの代わりにADPやFCCP，又脂溶性カチオンであるTPPCを添加して得られるstate-3呼吸も同様に阻害された。この様にphloretinは或る条件下では呼吸阻害剤として，或る場合には脱共役剤様の作用を及ぼす。蛍光色素ANSを用いた実験より，ミトコンドリアの膜界面の電位はphloretin添加により負になる事が示され，膜の電気ポテンシャルの分布が変化している事がわかった。コハク酸基質によるstate-4呼吸は，phloretinが存在しても存在しなくても同様に，膜のエネルギゼーションを起こす事がわかった。従って，呼吸速度の上昇はphloretinが脱共役剤として作用した結果ではない。この事は，化学浸透圧説による呼吸速度を表わす式$J_O = L_{OH} \cdot \triangle\mu_H + L_O \cdot A_O^{ex}$において，phloretin添加により$1L_{OH} \cdot \triangle\mu_H 1$（負の項）が$L_O \cdot A_O^{ex}$の項よりも大きく減少するためと考えられる。従って，phloretinは化学親和力$\triangle\mu_H$，A_O^{ex}ではなく，現象論的係数L_O，L_{OH}の変化を誘導すると考えられる。

合成高分子膜の血液障害度測定法について

神前　五郎（大阪大・医）

健全な血管内皮は血液に対する傷害度が最小であるが，合成高分子膜はいろいろな程度の血液傷害作用を持つことが知られている。その傷害程度を簡単にしかも数量的に測定する方法の確立を試みた。

長さ1 *m*内径1.5 *mm*のガラス管の内面を合成高分子膜でCoatして，その中

を2 ml/min の速さで新鮮ヒトクエン酸加全血を流す方法（Exp I），とSalzman法を modify して表面に各種高分子膜をCoatした直径0.5 mmのガラス・ビーズ0.5 g を入れたプラスチック製円筒の中を1 ml/min の速さでクエン酸血を流して（Exp II），①全血 Ca^{++} 再加凝固時間がContact activation によって短縮するかどうか，②血小板の数の減少が起るか否か，③血漿中のβ-TG が増加するかをパラメーターとして検討した。そして何の処理もしていないガラス面，シリコン塗布を行ったガラス面を両極端の対照として用い，又京大工学部中島章夫教授の御好意による，ABA型ブロック共重合体Casting の影響をも検討した。

結果。上述の①全血 Ca^{++} 再加凝固時間で検討するとExp I，II共にガラス面とシリコン塗布面との比較で最も大きい差を認めることができた。又Exp IでABA型ブロック共重合体でCasting すると，①の凝固時間はガラスとシリコン塗布の中間の値を得た。血小板数の減少をパラメーターとするときは，Exp IIの方が明らかな差が出やすい。Exp I でも差があるが著明ではなかった。β-TG の測定では今の所有意の差をみとめていない。又グラスビーズの表面へ粘着した血小板を走査電顕で観察することは有意義であると考えられた。基本的にはExp IIを用い，さらに測定するパラメーターを増やして確実な測定法の確立を計りたい。

各種透析膜の生体適合性に関する研究

太田　和夫（東京女子医大・腎臓病総合医療センター）

人工腎臓の発展は目覚しく，ダイアライザーに使用される透析膜も多様化してきている。これらの膜は物質透過性もさることながら，生体適合性の面でも十分に検討を加えなければならない。今回はcelluloseおよび最近開発されたpolymetylmethacrylate，ethylene rinylalcohol copolymer（EVA），polysulfon 膜などを用いて白血球，赤血球に与える影響ならびに血液と接触した後の膜の走査電顕所見より血小板の膜面に対する付着状態を観察すると同時に免疫グロブリン，補体などについても検討した。

1）血液透析中における白血球の動態

セルロース系の透析膜を用いた場合，白血球は透析開始後急速に減少し，15

分で最低に達し，以後上昇，透析前値に復するか，ないしはそれ以上に達する。最低値は前値の33%であった。一方，PMMA では 110％，EVAは55%という成績がえられた。同時に補体成分，C_3，C_4についても検討したが一定の傾向はえられなかった。

2）赤血球の浸透圧抵抗の変化

CPC装置を用いて透析中の赤血球膜抵抗の変化を観察したが，ex vivo では膜抵抗の低い赤血球が増加したが，臨床の透析においてはむしろ逆に膜抵抗の低い赤血球は減少した。これは恐らくsubhemolytic damage をうけた赤血球が脾臓などで処理されたためにもたらされた現象と考えられた。

膜面の走査電顕所見では血小板の付着に膜による差異が認められた。すなわちセルローズでは付着した血小板は偽足状の突起を出すのに反し，PMMA，PVA polysulfon などではこのような現象はみられていない。

血液透析に使用する膜については従来から効率面での検討が中心であったが，効率面での一応の成果がえられた現在においては，生体適合性の面でのさらに深い研究を進めなければならない。

抗血栓性材料の機能性

松本　博志（東京大・医）

抗血栓性材料は人工血管，人工心肺回路，人工肺，人工透析装置，人工心臓などの血液と接する人工臓器の作製のためには必須のものであり，これまで種種の研究工夫がなされてきた。私はこれらの人工臓器のなかでも人工管の作製に必要な抗血栓性人工材料の作成を中心に研究を重ね，今日臨床上末梢動脈の血行再建や静脈の血行再建のみならず乳幼児の重症先天性心疾患の治療にも使用可能な新しい人工血管の開発をおこなった。この研究の過程ではA. Carrel に端を発する人工血管の開発の試みの時代からVoorhees の大動脈に臨床使用可能な人工血管の開発とそれ以後の臨床的研究とについて十分検討を加えた。さらに生体血管のもつ界面化学的性状についても分析を加え，抗血栓性材料の作成にあたっては材料の表面化学構造をグラフト重合法を利用して表面改質をおこない血栓形成量と表面の化学改質の間には材料表面の疎水性と親水性との分布比率の点で一定の相関のあることを見いだした。すなわち材料の表面の機

能性と抗血栓性の間には一定の関係があり，調節の可能性の存在することをみた。これらの研究成果をもとに人工材料表面と血液との相互作用については，これまで主張されてきた血液凝固因子，特に第Ⅶ因子の活性化，にもとづく cascade reaction の適用には多少無理が生じてくることと，血小板と物質交換などの化学的共役性のない人工材料表面との相互作用が極めて重要であることを見いだしている。本日はこれらについても論じた。

1) 松本博志　人工血管の開発　学術月報 31:19，1979　学術月報 31:19，1979
2) 松本博志　新しい人工材料の作成と人工血管開発の方向　人工臓器 8:Suppl，1979
3) H. MATSUMOTO　Expanded polytetrafluoroethylene as artificial veins
Chemical and Engineering News，Jan-15, 1979

膜面層の構造と EM 観察

坂奥喜一郎（東京農工大・工）

1. はじめに ： 高分子材料の「構造および組織」（Morphology）と機能物性とは密接な関係が存在する。高分子が溶液や融解状態から凝固するとき，凝固条件によって同一素材でも Morphology の異った固体が得られる。高分子物へ機能物性を積極的に附与するために，素材の混和（Composite または Blend），分子間架橋，および異った Morphology の附与などが試みられてきた。代表例は，高分子膜の気体の分離，逆浸透圧を利用しての液体成分の分離（海水の淡水化，人工透析）などがあるが，そのお手本の一つは生体膜である。数万年かかって「自然の巧妙なからくり」で作られた生体膜と，わずか50年の歴史しか持たない高分子膜とでは，比較することがおこがましい程，生体膜は優れた Morphology と機能物性を有する。

構造の観点から高分子材料を非結晶の高分子材と結晶性の高分子材に分けて考えよう。ゴム，一般のポリスチレン（PS），塩化ビニール（PVC），シリコンゴム等は非晶である。非晶内の分子鎖の相対的な配置は分っていない。ポリエチレン（PE），ポリプロピレン（PP），ポリエチレンテレフタレート（PET，テトロン，ダクロン），ポリテトラフロロエチレン（PTFE，テフロン），ナイ

ロン等は結晶性の高分子である。現在考えられている高分子の凝集状態を模型図でまとめるとFig.1となる。

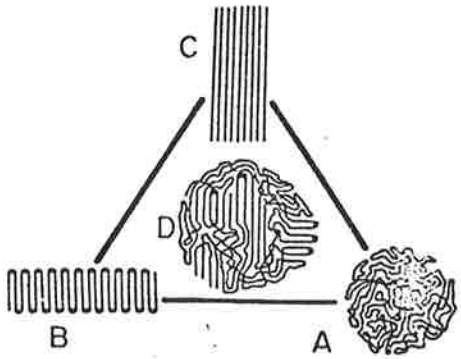


FIG. 1. SCHEMATIC REPRESENTATION OF POLYMER MOLECULES IN THE SOLID STATE.(WUNDERLICH'S BOOK OF MACROMOLECULAR PHYSICS, P.184).
THE CORNERS INDICATE THE LIMITING CASES: A, AMORPHOUS; B, CHAIN-FOLDED; C, CHAIN-EXTENDED.
THE AREA INDICATES INTERMEDIATE CASES: D, FRINGED MICELLE.

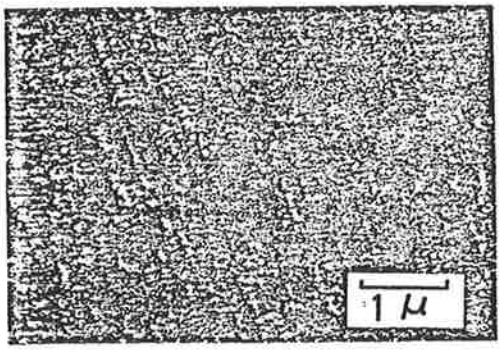


FIG. 2. DARK FIELD IMAGE OF DRAWN PE MEMBRANE BY 200 Kv TEM. EACH BRIGHT SPOT IS CORRESPONDED TO THE CRYSTALLITE.

2. 膜面層の構造 : Polymer processing (融解した高分子材料から加工凝固する過程)は，流動によるShear 応力，温度勾配，延伸(一軸，二軸)等の作用が加わっている。このような動的凝固の過程を高分子材料が通ると，分子鎖セグメントの配向，Lamella の平行集積，結晶面の配向，Micro voids の発生等にともなって組織構造の異った固体が得られる。界面層の構造と物性との関係を知ることは重要であるにもかかわらず，その構造の詳細は分っていない。

100 Å～数μ程度の膜厚を有するフィルムの成型は，素材を溶媒に溶かし，この溶液で下地わぬらし溶媒を蒸発させて作成する。下地は平らなガラス面，液面，無数のMicro voids を有するガラスファイバーで作った円筒の内外面(海水の淡水化)等である。溶液の濃度と成型温度を変えて膜厚をある程度は調整できる。成型時に自由表面であった膜面は，非晶性の高分子膜については20 Å程度より小さい凹凸しか存在しない平らな面である。生体膜と異って分子鎖セグメントの大部分が膜面に平行か，又は垂直であるような薄膜は開発されていない。結晶性の高分子の薄膜は，二次元球晶，Lamella 細片と非晶の集

合体（例えばNylon 6），粒状構造（例えばPET ）となっている。結晶粒の分布はTEMの暗視野像（Fig.2）で観察され，TEM像の結晶粒の大きさはX線回折から求めた結果とよい一致を示す。非晶性の薄膜の成型はMicro voidsの発生を避けることができ得るが，結晶性高分子の薄膜は，Lamella 間や粒子間に隙間が存在する。従って膜物質と化学反応の置換のみを対象とした透過や透析に対しては，非晶性，又は結晶化度の小さい高分子膜が適当である。結晶化度の発達した高分子膜はMicro voidsを通しての物理的な透過（フィルター効果）が存在する。膜厚が5μ以上の高分子膜は，融解した高分子材をスリットを通して流動押出によって成型する。この凝固過程には空気流による冷却（Balloon film），二軸延伸，ロール加工等の過程が入いってくる。

二軸延伸膜（例えばPP）を局所的にTEM観察すると，数μ程度の拡がりで延伸比の異る構造を示す。結晶化度の大きい素材（PP，POM，PE）から成型したBalloon film は，成型のMachine 方向に結晶のａ軸とｃ軸（分子鎖セグメント方向）が優先的に配向する性質がある。Shear 応力と温度勾配（成型速度）適当に調節すると，Machine方向に垂直なLamella の集積構造（Fig. 3 ）をもつ膜が得られる。熱処理で Lamella 結晶の欠陥を少くすると（結晶の発達と安定化），100％に及ぶ伸び変形に対して回復力（エネルギー弾性）を有する膜となる。この変形時には Lamella間に隙間的な Void 分布と，Tie fibrilが観察される。さらに延伸し延伸状態で熱固定をすると，幅50Å程度，長さ 200～2000Å 程度の無数の Voidsを有するフィルター膜が得られる。（Fig. 4）。内部も一様なLamella 集積構造を有する膜厚の限界は約 0.04 ㎜である。

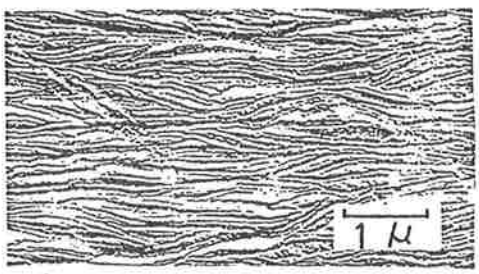


FIG. 3. ORDERD LAMELLAE STACK OF POM MEMBRANE.

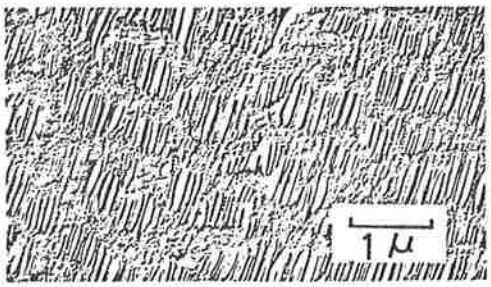


FIG.4. VOIDS DISTRIBUTION IN PP MEMBRANE.

多様の膜面の構造と組織に対して，筆者らは，抽出した人フィブリノーゲン，牛アルブミン，牛γグロブリン，新鮮な人血（有形成分）の粘吸着を，in vitroであるが膜面の局所的な構造差，表面エネルギー差，接触時間（0.5～20分）

を変数として，TEMとSEM観察を中心とし　その他の測定と併行させて研究対象としている。

センダイウイルス（HVJ）と赤血球膜の相互作用

大西　俊一（京都大・理）

センダイウイルス（HVJ）による赤血球の融合反応を，スピノラベルしたホスファチジルコリンを用いて解析した。ウイルスエンベロープから赤血救膜へのリン脂質の移行反応は，ウイルスの吸着量に依存する。吸着量が小さい（5コ/cell）ときは遅く，移行は時間にほぼ比例して増加する。吸着量が多くなると移行は促進される。移行曲線にはある臨界時間tcのところで変曲点が現われ，その後での促進が大きい。tcはウイルス吸着量が増すと小さくなる。トリプシン処理したウイルス（HVJtrp）からの移行はきわめて遅いが，同時にインタクトのHVJを加えると著しく促進される。移行曲線には変曲点が現われ，tcはHVJの量とともに小さくなる。HVJから赤血球膜への移行はインキュベーションの温度に依存する。19℃まではほとんど移行がみられないが，それより高温側で著しく促進される。移行曲線には変曲点がみられ，tcは温度とともに減少する。これらの結果から，ウイルスは標的細胞の赤血球膜に修飾を加え，それが膜内を伝播し，伝播した膜のところに吸着しているウイルスのエンベロープとの間のリン脂質の交換およびエンベロープ融合を促進するというモデルをたてた，そうすると，$tc=(S/4\pi D)(1/V)$，ただしSは赤血球の表面積，Dは修飾の伝播速度，Vはウイルス吸着量である。また，$1/tc=K\exp(-\triangle E/RT)$ ただし，$\triangle E$は伝播の活性化エネルギー，Kは定数が得られる。実測値はこれらの式によくしたがい，$D=1.6\times10^{-11}cm^2\ S^{-1}$（37℃），$\triangle E=13$ kcal mol^{-1} が得られた。修飾とその伝播の実体としては，エンベロープ融合により赤血球膜内に入ったウイルスの膜タンパク質とその拡散と考えられる。とくにFタンパク質が，2つの膜の間のリン脂質の交換とエンベロープ融合を促進すると考えられる。なお，蛍光退色回復法により，融合赤血球膜上のウイルスタンパク質の拡散を測定したところ，$10^{-11}cm^2\ S^{-1}$ のオーダーの値が得られ，上述のモデルを支持した。ここで述べた研究は，次の3つの論文に発表される。

1. T. Maeda, A. Asano, K. Ohki, Y. Okada, S. Ohnishi, Biochemistry 14, 3736 (1975).
2. T. Maeda, A. Asano, Y. Okada, S. Ohnishi, J. Virol. 21, 232 (1977).
3. K. Kuroda, T. Maeda, S. Ohnishi, Proc. Natl. Acal. Sci. US, in press.

ポリアミノ酸を一成分とするABA型ブロック共重合体膜の構造・物性

中島　章夫（京都大・工）

ポリ－L－グルタミン酸－γ－ベンジル，ポリ－L－グルタミン酸－γ－メチル，あるいはポリ－N^{ε}－カルボベンゾキシ－L－リジンをA成分とし，両鎖端に芳香族アミンをつけたポリブタジエンをB成分とするA－B－A型3元ブロック共重合体は，ヘリックス溶媒中でA成分はα－ヘリックス形を，B成分はランダムコイル形をとり，高分子の臨界ミセル濃度でミクロ相分離が起こってミクロ不均一構造が現出する。本研究では溶液からのミクロ不均一構造（ミセル）の形成を，A・B成分間の界面張力の寄与と，ランダムコイル鎖のエントロピー変化の寄与の和として熱力学的に取扱い，ミセルの形と寸法について関係式を導出し，定量的な考察を加えるとともに，溶液からキヤスト法で作られた膜について電子顕微鏡による観測を行い，熱力学からの評価が電顕の結果と矛盾しないことを見出した。また，これらのミクロ構造に関する知見をもとに等価力学モデルを組み，動的弾性率ならびに損失率の温度依存性データを解析し，前掲のミクロ相構造が妥当であることを確めた。

膜の水透過係数Kは膜厚を△×とする膜に1～4気圧の圧力△Pを加えて水の流束Jを測定し，J＝（△P/△×）から評価した。得られた重要な結果はポリペプチド単独重合体のK（cm^2/sec. atm）が10^{-9}のオーダーであるのに比し，ブロック共重合体では疎水性のポリブタジエンブロック含率の増加と共にKが10^{-6}程度まで増加することである。このことはポリペプチドの鎖端とポリブタジエン鎖端のコイル形態をとる鎖部分に存在するCO基，NH基が水分子と結合し，かつ，水のクラスターの寸法を小さくすることによるとして説明される。

また，これらの膜の組織親和性に関するウサギによる植え込みテスト（岡大温研，野一色氏）ではブタジエン含率約40%の膜で3種のブロック共重合体膜ともに大きい異物反応度を示さないことが確められた。

1) 中島，久後，林，佐藤：ポリペプチドーポリブタジエンーポリペプチドABA型ブロックポリマーのミクロ相構造とバイオマテリアルとしての性質
日本化学繊維研　講演集，36巻125頁～138頁，1979.
2) 中島，林，久後，篠田：Synthesis and Structure study of ABA type Block Copolymen consitling of PBLG as the A component and Polybutadiene as the B component: Macromolecules in press. 1979.

膜タンパク質と生体膜との相互作用 ── チトクロムb_5を例として

佐藤　　了（大阪大・蛋白研）

生体膜の内在性タンパク質の例として肝細胞小胞体膜のチトクロムb_5（以下b_5と略す）をとりあげ，それが分子的特性において一般の水溶性タンパク質とどのように異なるか，またそれがリン脂質二分子層膜にどのように結合するかを検討した結果，次のような知見を得ることができた。

1)　b_5分子は両親媒性で，N末端から89番目のアミノ酸残基は親水性領域を形成しており，それよりC末端の33残基は疎水性領域をつくっている。この両親媒性のために，b_5は水溶液中では単分子分散することができず，8単量体から成るミセルを形成している。トリプシンはb_5分子の二つの領域の間を特異的に切断し，ヘムを含んだ親水性断片をつくる。

2)　b_5のミセルをホスファチジルコリン（PC）小胞と接触させると，b_5は小胞膜に結合するが，この結合は0℃より37℃でよく起こり，37℃においても完結に15～20分を要する。トリプシン処理で得られたb_5の親水性断片は全く結合を起こさないことから，PCの二分子層膜との結合にはb_5分子の疎水性領域が必要なことは明らかである。

3)　この場合b_5分子がPC膜にどのようなトポロジーで結合しているかをカルボキシペプチダーゼY処理やその他の方法でしらべたところ，b_5の親水性領域は膜の外表面に露出しており，C末端に近い疎水性領域は膜の内部に押入さ

れているが，最もC末端に近い8残基は再び膜の外表面に露出しているという結果が得られた。なお，膜内部に埋っているのは約18残基の疎水性アミノ酸に富む部分であり，この部分はα-ヘリックスに著しく富んでいることが明らかとなった。

Shoji Tajima & Ryo Sato. Inhibition of the binding of cytochrome b_5 to phosphatidylcholine vesicles by cholesterol. Biochim. Biophys. Acta 550, 357-361(1979)

Kiyoshi Kondo, Shoji Tajima, Ryo Sato & Kozo Narita. Primary structure of the membrane-binding segment of rabbit cytochrome b_5. J. Biochem. 86, 1119-1128(1979)

Shoji Tajima & Ryo Sato. Topological studies on the membrane-binding segment of cytochrome b_5 embedded in phosphatidylcholine vesicles. J. Biochem. in press.

赤血球ゴースト膜と陽イオンの相互作用

亘　　弘（生　理　研）
西川　弘恭（京都府医・大）

ヒト赤血球膜は脂質，蛋白質，糖で構成され，その膜構造については種々のモデルが提出されており，これら構成成分の相互作用が色々な物理的方法で検索されている。ヒト赤血球膜における脂質の主な成分はリン脂質とコレステロールで，それぞれ全脂質の約67%，約28%を占めている。リン糖質はphosphatidylcholine，sphingomyclin，phosphatidylethanolamine，phosphatidylserine であって，この極性基が陽イオンと相互作用している。そこで赤血球膜リン脂質のリンについて^{31}P-NMR測定を行い，超音波処理およびCa^{++} イオン添加によるスペクトルの変化を観察し，これら処理による膜リン脂質のpolar head groupへの影響を検討した。

ヒト赤血球は保存血を用い，赤血球ゴーストはDODGEらの方法で調製した。このゴーストをresealingのためゴースト浮遊液1容と前記等張溶液20容を混合し，30分間攪拌した後，25,000Gで遠心し，沈渣を試料とした。この一部は超音波処理を加えずに超遠心により100,000Gで，60分間遠心し，沈渣を試料として^{31}P-NMR 測定を行った。一方，前記のresealed ゴーストを超音波

発生装置により60 W，0℃で60秒間破砕し，これを超遠心により100,000 G で60分間遠心し，沈渣を^{31}P-NMR測定した。さらにCa^{++}イオンの膜リン脂質への影響を観察するため，この超音波処理した沈渣に種々のCa^{++}イオン濃度を含んだNacl等張溶液を沈査の10倍容量加え，30分間攪拌した後，上記同一条件にて超遠心器により遠心し，沈渣を^{31}P-NMR測定した。これらは0℃～4℃で行われた。スペクトルの膜構成リン脂質への帰属はSigmaのL-α-phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, sphingomyelin, とL-α-phosphatidylcholine 各々50 mgを154 mM Nacl（5mM Tris-Hcl，pH＝7.4）溶液2 mlとよく混合し，^{31}P-NMR測定を行い，決定した。NMR装置はJNM-PFT-100（JEOL, Tokyo, Japan）を40.3 MHz，24,000 ガウスで使用した。磁場のロックは10mm径のNMR試料管に同軸状に入れた1 mm管に重水を充填して行った。測定温度は24℃で行った。

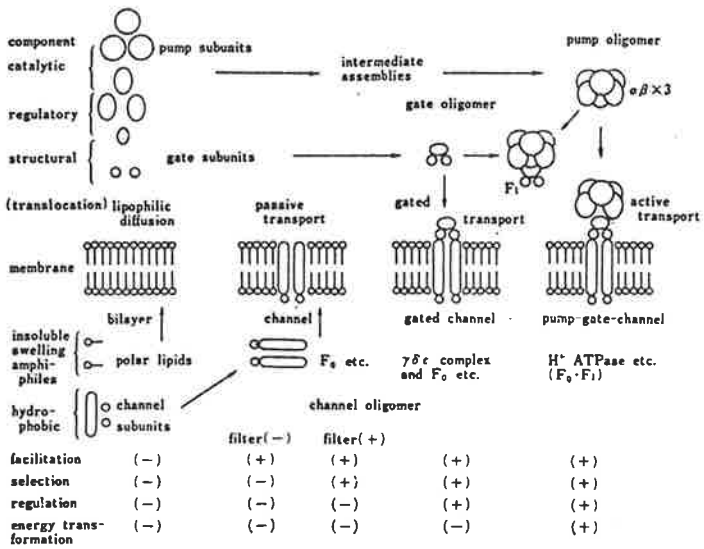
全血を0.9％Nacl（5 mM Tris-Hcl，pH＝7.4）溶液で3回洗浄したヒト赤血球浮遊液の^{31}P-NMRスペクトルを2,000回積算して求めた。スペクトルには低磁場側から2.3-diphophoglycerate, inorganic phosphate, ATPとADPのピークがみられた。ところが超音波処理と超遠心をせずreselingしたヒト赤血球ゴーストを赤血球と同じ条件で^{31}P-NMR測定したスペクトルでは，このようなピークはみられなかった。このことは赤血球をゴーストにまで処理する過程で可溶性の線巾の狭いスペクトルを示す上記成分は取り去られることを示している。超音波処理を加え，resealingしたヒト赤血球ゴーストの超遠心による沈渣のスペクトルを観察した。高磁場側の＋11.8 ppm の位置にピークがみられ，＋2 ppmの位置に肩がみられた。高磁場側のピークをもつスペクトルの線巾は約10 ppmである。さらにresealing したゴーストを超音波処理した後のスペクトルを求めたが10.4 ppmと0.6 ppmにピークがみられた。両スペクトルの線巾は高磁場側のものに比し，低磁場側のものが広い。線巾と化学シフトの位置から考えて可容性の赤血球中のリン化合物ではなく，赤血球膜を構成するリン脂質のpolar head groupのリンによるものである。この化学シフトから赤血球ゴーストのスペクトルで低磁場側の各々肩と吸収ピークはphosphatidylethanolamineとphosphatidylserine，高磁場側の吸収ピークはphosphatidylcholineとsphingomyelinによるといえる。また両スペクトルの面積はこれらリン脂質の赤血球膜中の存在比に大体一致している。超音波処理をしたresealedゴーストCa^{++}イオン0，0.5，5，10 mMを加えたが，0.5 mM Ca^{++}イオン濃度ではほとんどスペクトルに変

化はみられなかった。Ca^{++} イオンによるスペクトルへの影響は2つのピークのうち低磁場側のピークが5mM Ca^{++} 濃度で肩になり，10mM Ca^{++} イオン濃度では巾の広い一つのスペクトルのごとくになる。これは (a) リン脂質の polar head group と Ca^{++} イオンの相互作用により polar head group の動きが制約されるため (b) Ca^{++} イオンと膜蛋白質の相互作用により，蛋白質の動きが制約され，間接的にリン脂質の polar head group の動きが制約されるため。が考えられる。negative charge をもつ phosphatidylserine による低磁場側の吸収スペクトルの broadening が5mM Ca^{++} イオン濃度でみられることから，Ca^{++} イオンとリン脂質の polar head group の直接的な相互作用による polar head group の動きの減少が主として考えられる。

エネルギー変換膜

香川　靖雄（自治医科大）

生体のエネルギーの大部分はミトコンドリア，葉緑体，細菌形質膜などの生体膜で合成されるATPに依存している。生体膜そのものの研究はイオン透過性をはじめとして，古典的な生理学的手法で研究されて来たが，その機能を担うチャンネルやゲートを直接に精製してその物性をしらべ，さらにそれを人工膜に再構成して機能を精密に分子のレベルからしらべることはほとんど成功していなかった。1978年に英国の P. Mitchell 博士が無傷のミトコンドリアや葉緑体を用い，エネルギー変換膜におけるATPの合成は H^+ の輸送現象に伴うエネルギーを介することを研究し，ノーベル賞を得たが，その研究の確実な証明は単離した H^+-輸送性 ATPase を人工のリン脂質二重層に再構成



輸送のポンプ，ゲート，チャンネルの再構成（Kagawa, Y.: Reviews on Bioenergetics. Biochim. Biophys. Acta, 505: 45～93, 1978）.

した実験によっている。(Ann. Rev. Biochem. 1977, 1979)

さらにこの反応の分子機構を明らかにするため，H^+ ATPase を9個のサブユニットに分けて右図のように再構成し，従来は生理学上の概念にすぎなかったポンプ，チャンネル，ゲートの機能を段階的に再現した。

ポンプ部分は膜ATPaseの中ではじめて結晶化され，分子構造を東大若林研と共同で電算機画像解析で解明し，チャンネルの一つのサブユニットの構造も化学的に解明されている。

1) Kagawa, Y. Reconstitution of energy transformer, gate and channel : subunit reassembly, crystalline ATPase and ATP synthesis.
Biochim. Biophys. Acta, 505, 49-93(1978).

2) Kagawa, Y. Structure and Function of H^+-ATPase.
J. Bioenergetics and Biomembranes 11, in press. (1979).

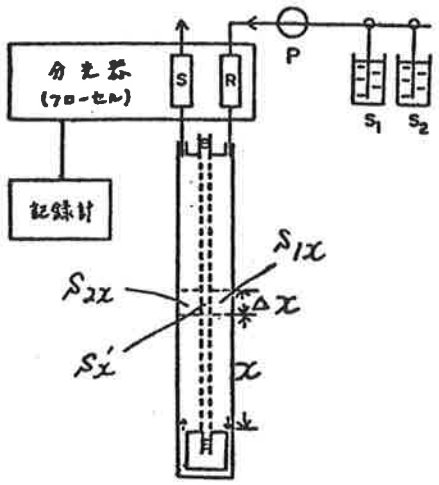
脂質透析による脂溶性物質の選択的除去

岡村　純（大阪大・医）

肝不全時には，肝臓の有する働きのうちで脂溶性物質から水溶性物質への転換が破綻して血中に脂溶性物質が蓄積する可能性が高い。従来のaqueous hemodialysis ではこれらの蓄積した脂溶性物質の除去が困難である。われわれは，脂質透析をおこなって脂溶性物質の除去を行うことを目的として，silicone oil hemodialysis という新しい手段を開発した。脂溶性物質のパラメーターとして indole, glutethimide を選び，血液中に負荷したこれらの物質が silicone oil hemodialysis によって有効に除去できることをあきらかにし得たので，glutethimide 中毒により昏睡に陥った雑種成犬に応用した。その結果，昏睡より覚醒することに成功し，手法そのものに救命的な合併症を来さなかった。ただConventional hemodiolysis と同様血小板減少が認められた。これらの結果を基礎として，肝不全モデル動物に応用してその有効性を実現するつもりである。

Biomembrane と生体物質との相互作用
半透膜にとじこめた酵素溶液を含む系の反応性

魚住光郎　　橋本正史　　東　照正（大阪大・医）



左の図のように，半透膜２枚の間に酵素溶液を閉じこめて，膜の外部を基質溶液が流れるように設計した反応器における基質濃度の変化を定常状態において解析した。反応器の部分を流れの方向にｘ軸を取り，区画△ｘにおける基質濃度をS_{1x}, S_{2x} S'_x，酵素室の断面積をA_1, A_2，灌流液の流速をｆ，酵素反応は Michaelis-Menten 式に従うとすると，

$$\frac{dS_{1x}}{dt} = k\cdot d\cdot\triangle x(S'_x - S_{1x})\frac{1}{\triangle x\cdot A_1} - f\frac{\partial S_{1x}}{\partial x}\frac{1}{A_1}$$

$$\frac{dS_{2x}}{dt} = k\cdot d\cdot\triangle x(S'_x - S_{2x})\frac{1}{\triangle x\cdot A_2} + f\frac{\partial S_{2x}}{\partial x}\frac{1}{A_2}$$

$$\frac{dS'_x}{dt} = -k\cdot d\cdot\triangle x(2S'_x - S_{1x} - S_{2x})\frac{1}{\triangle x\cdot B} - Vm\frac{S'_x}{S'_x + Km}$$

定常状態では$\frac{dS_{1x}}{dt} = \frac{dS_{2x}}{dt} = \frac{dS'_x}{dt} = 0$である。

上式のS_{1x}，S_{2x}，S'_xに対し近似解として放物線が与えられる。
その解を代入すると，

$$\left\{\frac{VmVi}{f} - (So - S)\right\}\left\{\frac{So}{So - S} - \left(\frac{f}{2kA} + \frac{1}{2} + \frac{kA}{4f}\right)\right\} = Km$$

Vi：酵素室の容積
A：半透膜一枚の面積

左辺を展開し，次の近似式を得る。

$$\frac{1}{f(So - S)} = \left(1 + \frac{Km}{So}\right)\frac{1}{VmVi} + \left(\frac{1}{2kA} + \frac{1}{2f} + \frac{kA}{4f^2}\right)\frac{1}{So}$$

この式は半透膜で形成された或る一つの単細胞モデルの構造と機能の関係を示している。

課　題　名　光受容の神経機構（1979. 12. 3 ～ 4）

Second-order neurons in dace retina.
Y. Hashimoto (Tokyo Women's Med. College)

Color dependence of horizontal cell responses in the carp retina.
M. Yamada (Electrotechnical Laboratory)

Effects of GABA and its antagonists on cones and horizontal cells in the carp retina.
M. Murakami & Y. Shimoda (Keio Univ. School of Medicine)

Regeneration of rhodopsin in Mantis shrimp.
H. Suzuki (Tohoku Univ. School of Medicine)

Biochemical steps in photoreceptor excitation.
D. Bownds (Univ. of Wisconsin)

Recent advances in the research of vertebrate photoreceptors (tentative)
J. E. Brown (State Univ. of New York, Stony Brook.)

Reciprocal relation between intensity and duration of light stimulus required to elicit an electrical response in rods.
M. Tauchi (Nat. Inst. Physiol. Sci.)
I. Tanaka (Research Inst. Nat. Rehab. Center for Disabled)

The ERG b-wave : A test of its Müller cell origin hypothesis.
T. Tomita & M. Fujmoto (Yale Univ. School of Medicine & St. Marianna Med. College)

Measurement of K^+ and Cl^- activities in horizontal cells of the carp retina.
J. -I. Toyoda & M. Fujimoto (St. Marianna Med. College)

Ontogenetic studies of dopaminergic cells in the retina; A histofluorescence study.
S. Kato (Kanazawa Univ. School of Med.)

概　　要　本研究会は脊椎動物視細胞の光受容から視細胞電位発生の機構を電気生理学的手法で研究しているJ.E. Brown 教授（New York 州立大学）と生化学的方法から研究しているD. Bownds 教授の来日されたのを期に，国内の視覚生

理学，特に，脊椎動物の網膜を研究対象としている研究者が集まり，網膜視細胞における光受容電位発生の機序の研究発表と討論を行った。

視細胞電位発生の機構は現在２つの法に大別される。光が視細胞の視物質に吸収され一連の生化学的過程を経て細胞内のcGMP量の減少により視細膜のNa透過性が減少し視細胞電位が過分極するという説と細胞内Caイオン濃度が増加するためNa透過性が減少するという説がある。cGMP法を支持する生化学的データを発表したD. Bownd教授とCaイオンを細胞内注入することにより直接的にCaイオン濃度と膜電位の関係を証明した。J.E. Brown教授の研究発表があり国内参加者との討論があった。cGMP減少の過程でCaイオン濃度の減少がおこるなどCaイオンの増減は顕徴である。各々単独に働くのか両者の複合作用によるものか，今後さらに研究を継続する必要があをとの結論に達した。

国内からの研究発表は視細胞からの信号を受取る２次ニューロンのシナプス機構の研究発表が主であった。特に水平細胞のイオン機構（豊田・藤本），視細胞－水平細胞間のフィードバック・シナプスの化学伝達物質の同定（村上・霜田），このシナプスによる色情報の統合（山田），又，ERG-b 波の発生源の解析（富田・藤本），蛍光抗体法によるドパシン細胞の同定など最近の知識や成果が多数発表され討論が行われた。

この研究会の研究発表と討論を通して網膜の神経機構の解明には学際的な方法論が必要になってきていることが認識された。

課　題　名　**機械受容器の受容機構とその制御に関する比較生理学的研究（1979. 12. 8～9）**

カエル筋紡錘受容機構のモデル

伊藤文雄　　小松由紀夫　　金子亘弘（名古屋大学医学部）

〔^{3}H〕-Triphenyl Methyl Phosphoniumイオンを用いた微小細胞の膜電位の測定。　　吉岡　　亨（横浜市立大学医学部）

聴側線系感覚上皮の細胞間結合について

浜　　清（東京大学医科学研究所）

聴器および側線器とイオン環境

柳沢慧二　　浅沼　厚　　塩沢光一（鶴見大学歯学部）

ネコ蝸牛への遠心性支配について　　村田　計一（東京医・歯大学難治研究所）

ザリガニ機械感覚毛の微細構造と機能　　久田　光彦（北海道大学理学部）

筋支配神経終末の走査形電子顕微鏡による観察

上原康生　　出崎順三（愛媛大学医学部）

内耳有毛細胞支配神経のHRPによる研究　　谷口郁雄（独協医科大学）

蝸牛毛細胞の電位とイオン環境　　田中康夫（独協医科大学）

概　　要　この研究では，聴器・側線器・筋伸張受容器および触受容器などの機械受容器が力学的変形を如何にして生体細胞膜の電気的信号に変換しているか，またその感受性を如何に制御しているか，その変換器膜の超微細構造とイオン透過性を明らかにすることを目的にしている。そのためには，いろいろな種類の動物のいろいろな機械受容器について比較検討することによって，個々の受容器の特異性と共通点を分析することが緊急な課題であるので，この研究を計画した。

吉岡亨は〔^{3}H〕-Triphenyl Methyl phosphoniumイオンを使って微小細胞の膜電位を測定する方法を哺乳類内耳毛細胞に適用して成果をあげた。浜清は聴側線系感覚受容器の微細構造を鮮明な電子顕微鏡像で解説し，それらの受容器の機能を研究する上での貴重な基礎を与えた。この研究と関連して柳沢慧二は聴器と側線器のイオン環境を比較生理学的に研究し，両者の共通性を

説いた。村田計一の蝸牛有毛細胞への中枢制御機構の研究は，機械受容器における増幅装置を中枢神経遠心系が制御するという点で，筋紡錘に対するH運動制御に対応づけて興味深いものであった。谷口郁雄は内耳有毛細胞支配神経をHRPで軸索染色し，上記の村田計一の研究の構造的基礎を与える意味で重要であった。田中康夫は蝸牛毛細胞の静止膜電位が非常に低いのはイオン環境に原因するとした。久田光彦のザリガニ機械感覚毛の受容機構に関する研究は触受容器も聴器毛細胞の受容機構と基本的に同じであるという概念が与えられ，成果の一つであった。上原康生は筋支配神経終末の走査形電子顕微鏡像を示し，機械受容器の研究に走査電顕の有用性を示した。最後に伊藤文雄はカエル筋紡錘において機械受容機構のモデルを提案した。従来は受容器電位が直接インパルスの発生に関与しているとされていたが，両機構の間にCaスパイクや adortive spike などの増幅機構を想定した。

カエル筋紡錘受容機構のモデル　　抄　　録

伊藤文雄　　小松由紀夫　　金子亘弘（名古屋大・医）

筋紡錘神経末端において，筋伸張による受容器膜の変化が如何なる機構によって求心性インパルスに符号化されるかという，機械受容の初期過程を解明し，その模型を考えることが，本研究の目的である。従来は神経末端の変換器膜で，その膜の変形に比例して振幅が変る受容器電流が起り，これが数本の無髄神経分枝から1本の有髄神経に集合して，その最終絞輪から求心性インパルスが発射するという単純な模型が推定されていた。しかし最近の我々の研究により，複雑で且つ何段階もの手順を経て符号化されていることが明らかになった。

実験には，カエル縫工筋または半腱様筋から筋紡錘を単離し，その支配神経有髄末端（カプセルの直外部）を空気隔絶した。その中枢側プールに等張Kcl溶液を満し，細胞内にみたてた。筋紡錘はリンガー液中で差動伸張したので，隔絶部の神経は動かず人工電位産物も極めて少ない。得られた結果から，次のモデルが構成された。

1）変換機構：0.1μmの直径で，100μm以上も長い無髄神経末端で起る受容器電位のイオン機構は未だ充分判っていないが，Ca^{2+} 透過性増天に原因すると考えられる。その部分は内カプセル（ムコ多糖類を含む）に包まれている。

ムコ多糖類が変換機構の一部を演じている可能性もある。　2）増幅機構：細くて長い無髄線維に沿って信号を有髄線維に有効に伝える為に，その無髄線維にはCaスパイクとabortive spike（Na^+依存性）が起る。これらは有髄線維に伝達し得ないが，その末端絞輪膜興奮の引金になり，且つその符号化膜にgraded responseを起す。これが紡錘電位である。3）符号化膜でのイオン透過性：通常，符号化膜を介してK^+とCl^-の透過性が相当高いことが判った。これにより末端から受ける脱分極電流で符号化膜が陰極性抑圧に陥るのを防ぎ，符号化膜電位を保つのに役立っているものと推定している。

〔^3H〕- Triphenyl Methyl Phosphonium イオンを用いた微小細胞の膜電位の測定

吉岡　　亨（横浜市大・医）

微小電極を刺入出来ないような微小細胞の膜電位を正確に測定することは，音受容器の有毛細胞等の生理研究にとっても今後大いに役立つものと考える。この目的のために脂溶性イオンを放射化して用いることが最近行われるようになって来た。我々は微小細胞の例としてウニ精子をとり上げこれの膜電位を測定した。先ずTime studyを行い，〔^3H〕-TMPイオンが時間と共にどのように取り込まれてゆくかを観測した。約30分間で凡ね平衡に達する比較的遅い取り込みが見られた。次に外液のKイオン濃度を順次変えて，その影響を調べた。その結果静止電位は約-22mVで細胞内液中のKイオンの濃度は約250mMと推定された。ところで外液中のK濃度を順次濃くしてゆくと膜電位は浅くなるが，外液のKイオン濃度40mMで精子の動きは極端ににぶくなり80mMでは静止した。しかるに外液中からCaイオンを除去するとこのようなK効果は見られなかった。また外液Kイオン濃度を変えたときの細胞内pHの変化も同時に測定した。これによるとKイオン濃度40mMから細胞内pHは序々に酸性に向い，200mMでは約0.2unitだけ酸性側へずれた。このように外液Kイオンは膜電位形成にあずかると共に，プロトンチャネルを開けたり，鞭毛運動を停止させる効果があり，この効果はCaの存在下ではじめて有効であることが分かった。

聴側線系感覚上皮の細胞間結合について

嶌　　清（東京大・医科学研究所）

聴側線系感覚上皮の細胞間結合部には微細構造上幾つかの注目すべき特徴がみられる。上皮表面部 reticular lamina を形成するが，微細構造上は，細胞間げきを通じての物質通過を制限する閉鎖小帯と，細胞間を機械的に強力に結合する結合小帯から成り，前者は有毛細胞周辺に特によく発達し　支持細胞間のものは発達が弱い。後者は特に内柱細胞，内有毛細胞などでは細胞膜内粒子の四角配列を伴う特有な構造を示し，微小管の細胞膜への付着装置と考えられる。上皮深部では支持細胞間に広はんなギャップ結合がみられる。ギャップ結合部膜内粒子は直径約95Aで，密集する場合と散在する場合があるが何れの場合にも規則正しい六角配列をとらない。各膜内粒子は5～6個のサブユニットから成り中心部に20Aのくぼみをもっている。有毛細胞と支持細胞間にもギャップ結合が存在する（金魚球形嚢）。

結合斑は小形で数個−200個の膜内粒子から成り，各粒子の直径は約85Aである。通常の固定凍結標本では規則正しい六角配列を示す。光回折法を用いると支持細胞間のギャップ結合は円形のびまん性の像を示すのに対し，有毛細胞と支持細胞間のそれは明瞭な六角スポットを示す。このようなギャップ結合の存在は細胞間にイオンまたは他の物質による交通のある事を示し，支持細胞相互間のものと，有毛細胞と支持細胞間にみられるものとで構造に差がみられることは，両者間に調節機構などの面で差があることを暗示している。

聴器および側線器とイオン環境

柳沢慧二　　浅沼　厚　　塩沢光一（鶴見大・歯）

哺乳類の聴器である内耳蝸牛の内リンパ液が非常に高濃度に K^+ を含んでいること，そして，このイオンが音受容に不可欠であるということは知られて久しい。しかし，この K^+ の作用機序については，まだ定説が無い状態である。発生学的蝸牛と同一起原であると考えられる側線器についても，比較生理学的にそのイオン環境が注目される。この研究から，側線器の化学受容が見出され

た。また側線器の機械刺激受容性が環境中の K^+ によって改善されることを橋本らが報告している。Russell らは側線器のクプラが K^+ に富んだ微小環境を作っているとのべている。一方 Sand は Ca^{2+} が側線器の機械的刺激受容性を高めると報告している。Ca^{2+} の効果についてはわれわれも確認した。細胞内電位の ac成分が Ca^{2+} によって増大することを認めた。最近ネオマイシンの内耳毒性について，その作用機序がイノシトールリン脂質に対して働くというモデルが提出されている。この考えは側線器の化学受容と機械受容に対する Ca^{2+} の影響を説明するのに好都合である。化学受容は受容膜のタンパク質に刺激イオンが吸着することによって作用が発現すると考えられるし，機械受容を Ca^{2+} が改善する働きは，受容膜のリン脂質に Ca^{2+} がつくことにより膜の性質に変化がおこると考えられる。実験的にネオマイシンと Ca^{2+} の側線器機械受容におよぼす作用について調べた。

ザリガニ機械感覚毛の微細構造と機能

久田　光彦（北大・理）

甲殻類の平衡覚受容器を構成する感覚毛は，外骨格キチン質で形成された毛部に受容細胞が，同じくキチン質とみられる弦（chorda）によって連結され，弦に与えられた張力が受容細胞によって変換される構造を持つ。この形態は平衡覚受容器に限られず，体表にひろく分布する機械感覚毛に共通である。そこで平衡覚感覚毛と起原を同じくすると見られる第1触角基節前端に分布する感覚毛，受容細胞の微細構造を走査，透過両電顕によって調査した。その結果はこれら受容器を構成する感覚子は，これまで主として自己受容器である張弦器官（chordotonal organ）にのみ存在する感覚子であると考えられて来た scolopidial type であることが判明した。

すなわち感覚毛と感覚子を機械的に接続する弦は1～2μmの直径であり，数層の支持細胞によって円筒状にとりかこまれる。受容構造である scolopidium は長さ40μm，直径4μm ほどの紡錘形である。全体を高い電子密度の構造（scolopale）を持つ細胞が包み，その内部には3個の双極形受容細胞がある。これらの細胞は末梢に向って9＋0の繊毛様構造を伸ばし，その先端は直径を増して繊毛構造を失ない，微小管に富む膨大部となり，最先端がさらに太くな

って終る。細胞体に近ずくと繊毛のrootletが貫通する細胞突起部となり，この部分では3個の細胞間に多くの接着斑が見られる。

体表機械感覚毛の感覚子として節足動物でscolopidial typeであることが確認されたのはこれが始めてであり，従来別個の起原を持つと考えられて来た張弦器官との関係，感覚子分化の過程について再考慮が求められる。

平衡覚受容器感覚毛を含めてこれら感覚子の受容細胞の動作機構，その制御についてさらに調査中である。

内耳有毛細胞支配神経のHRPによる研究

谷口　郁雄（独協医大）

約30年前にRasmussenによって，オリーブ・蝸牛神経束（OCB）の中に蝸牛有毛細胞を支配する遠心性の神経線維が含まれていることが報告され，受容器と中枢との間にフィードバック・ループが存在することが認められた。Rasmussenによると，OCBは二種類の成分から成っている。一つは交叉性で主に反対側の上オリーブ複合体に始まる約400本の線維で，もう一つは非交叉性で同側の外側上オリーブ核あるいはその背側に始まる約100本の線維である。Rasmussenは神経の順向性の変性を利用して，これらの線維の起始部を同定した。最近になって，Warr（1975）はhorseradish peroxidase（HRP）の神経線維への逆行性の取込みを利用して，HRPをネコの蝸牛に注入してOCBの起始を同定した。Warrによると，HRPでラベルされた細胞は上オリーブ複合体全体で1700～1800個あり，そのうち約60%は同側の上オリーブ複合体に存在した。従ってWarrの結果はRasmussenの結果に比べて3倍以上の遠心性ニューロンが存在することを示している。

われわれはマウスの下丘あるいは蝸牛外リンパ中にHRPを注入したときにHRPでラベルされる求心性および遠心性ニューロンの蝸牛神経核および上オリーブ複合体に分布するパターンを比較した。下丘にHRPを注入すると主に同側の内，外側上オリーブ核および反対側の蝸牛神経核の特に背側核に多数の求心性の細胞がみつかった。蝸牛にHRPを注入した場合の特徴は，内側上オリーブ核にラベルされた遠心性の細胞はなく，両側の内，外および腹側台形体核に遠心性の細胞，さらに蝸牛神経核の腹側に求心性の細胞がラベルされたことであ

る。蝸牛神経核の求心性の細胞は小型で双極性であり，一次聴ニューロンに相当する。このことは求心性のニューロンも順向性にHRPを取込むことを示している。

蝸牛毛細胞の電位とイオン環境

田中　康夫（独協医大）

蝸牛において音刺激に対し細胞外で数mVのマイクロホン電位（CM）が記録されるが，この電位が毛細胞の音受容の機構にいかにかかわっているかまだ十分にわかっていない。モルモットで，内毛細胞内の電気的な反応は交流成分よりもむしろ直流成分の方が大きいことが報告されている（Russel and Sellick, 1977）。本研究では外毛細胞内の電位を記録し，さらに感覚毛の接しているイオン環境の音受容における役割を知ろうとするものである。

モルモットの蝸牛において，アルシアンブルーによる色素マーキングを行って今迄のところ14箇の外毛細胞の電位が同定された。細胞内直流電位は支持細胞の静止電位より小さかった。3k Hz 近辺の刺激に対する外毛細胞内電位の交流成分は平均3.8mVで位相は蓋膜下のものと 180 度反転していた。感覚毛側の細胞膜を横切る直流電位勾配が縮小するにしたがって交流成分は減少した。これらの成績からCMは外毛細胞にその発生源が存しており，基底板の中央階側への変位により減少することが考えられる。

毛細胞感覚毛側は内リンパの特異的な高Kイオン濃度環境にあり，このイオン環境はCM の感度維持に必要であることがわかっている。側線器ではCaイオンが機械的受容に関係していることが示唆されている（Sand, 1975）。蝸牛中央階にEDTA を注入してCa 欠乏状態を起させるとCMは減少した。 また中央階においてCaやその他の2価陽イオン濃度を高めてもCMはそれらの濃度にしたがって減少を示した。CMは外毛細胞の感覚毛側において発生し，内リンパの高Kイオン濃度を必要とする。微量のCaイオンはKイオンを必要とするような受容器膜機能を調節するものであろう。

マクロファージを中心とする免疫細胞の細胞生理に関する総合的研究　　**課　題　名**

（1980. 1. 30 ～ 31）

マクロファージの分離方法と分離マクロファージの貧食能

木下　喜博（大阪市大・医・生理）

Superoxide dismutase of human blood cells in nomal and pathological conditions　　小林　陽之助（広島大・医・小児）

Morphological studies on macrophage-growth and function

高山　寿雄（鳥取大・医・細菌）

マクロファージに作用するリンパ球産生物質

橋本　達一郎（筑波大・医・細菌）

生体防御とマクロファージ　　野本　亀久雄（九大・医・癌研免疫）

Electrical properties of macrophage (tentative title)
Gilberto Mendes de Oliveira-Castro
(Instituto de Bioflsica, Universidade Federal do Rio de Janeiro)

イオン電極応用による細胞膜能動輸送研究の開発

藤本　　守（大阪医大・生理）

Modulation of thymocyte and polymorphonucleal leucocyte membrane potential by concanavalin A

内海　耕造（高知医大・生物）

Endocytic activity and hyperpolarizing response in L-strain fibroblasts　　岡田　泰伸（京大・医・生理）

Calcium ion and intercellular communication of mouse macrophage　　オリ　マリア　　柴　芳樹　　菅野義信（広島大・歯・生理）

概　　要

内薗耕二所長の開会の挨拶に次いで第１番目に大阪市大医学部生理の木下喜博博士はマクロファージの分離方法について講演した。一般にマクロファージはリンパ球に接触し相互作用の結果外来異物に対する食作用の特異性や活動性

を獲得又は増張すると言われている。従ってマクロファージの性質を知るには先ず他の細胞に接触しない細胞を分離することが研究上非常に重要であり，そのうちに他細胞と接触させ獲得又は増強性質を分析することが研究上の鍵となる。アカシアゴム溶液で分離したマクロファージはほとんど純粋で他細胞に未接触のマクロファージも食作用のあることを示した。

広島大学の小児科小林陽之助博士は血液細胞中の過酸化ジスムターゼは重要な過酸化中毒を防ぐ酵素で60%銅の増量が赤血球中のこの酵素の働きを増加すると言う。

鳥取大学医学部細菌学教室の高山寿雄博士は骨髄細胞をSV40 ウイルスに感染させると変換マクロファージと非変換マクロファージの両者が得られる。変換細胞はSV40 に対する抗原を有しマクロファージの性質を失うが，非変換細胞には抗原はなくマクロファージに分化した性質を持つ。しかし継代培養を行うと変換細胞も分化の方向へと変化して行くことが半明した。

筑波大学医学部細菌橋本達一郎教授はマクロファージに強く影響するMIF，MAF，MCF の各要素とリンフォカインの関係を解説した。

リオデジャネイロ国立大学のオリベイラカストロ教授はマクロファージは自発性にも又電気刺激や機械的刺激に反応して過分極反応を示す。これは細胞内 Ca^{2+} 濃度の一過性上昇による K^{+} の透過性の上昇による膜電位の変動であることを明らかにした。

京都大学医学部生理岡田泰信博士はL細胞を用いて上記過分極反応をおこす細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は細胞外 Ca^{2+} の細胞内への透過によることを明らかにした。

1) Oliveira-Castro et al. Hyperpolarizations in macrophages. B. B. A. 552:331-340 (1979).
2) Kinoshita, Y. et al. Separation of small lymphocytes. Exptl. Cell Res. 86:136-142 (1974)
3) Hashimoto, T. et al. Production of antibody against MIF. Cell. Immunol. 48:258-266 (1979)
4) Takayama, T. Transformation of macrophage by SV 40. Microbiol. Immunol. in press (1980)
5) Okada, Y. et al. Oscillations of membrane potential. J. Membrane Biol. 47:357-376 (1979)

SIMPLE AND RAPID METHOD OF MACROHAGE SEPARATION BY DISCONTINUOUS DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION USING GUM ACACIA MEDIUM

抄　　録

Yoshihiro Kinoshita

Department of Physiology,
Osaka City University,
Medical School,
Asahi-Machi, Abeno-Ku, Osaka,
-545- Japan

1. Although many papers about roles of macrophages from immunological and cell-physiological viewpoints have been published, a conclusive evidence has not been obtained. One of the essential ways to clarify a true role of macrophages would be to use the cells separated in pure and physiological state as the experimental materials.

2. Among the separating procedures, density gradient centrifugation is believed to be better than the adhering method and its reason is discussed.

3. Gum acacia solution is assumed to be superior to bovine serum albumin and ficoll solutions because of its physico-chemical properties as the separating medium.

4. The peritoneal exudate cells stimulated with liquid paraffin are revealed to be more suitable than the untreated ones as separating materials. The cellular density of macrophages stimulated with liquid paraffin becomes lighter because of an ingestion of paraffin. And such macrophages are liable to be separated by density gradient centrifugation.

5. Following our method, macrophages are separated in almost pure state and good yield within a short time without apparent functional disorder so far from the standpoint of phagocytic activity.

6. It is presumed, therefore, that the macrophages separated into less dense fractions from the stimulated peritoneal cells are the most suitable material for investigating their roles in living body.

REFERENCE

1) W. E. Bennett and Z. A. Cohn :
The isolation and selected properties of blood monocytes. J, Exp. Med., 123, 145-160 (1966)

2) M. Zembala and G. L. Asherson :
The rapid purification of peritoneal exudate macrophages by ficoll (polysucrose) density gradient centrifugation. Immunilogy, 19, 677-681 (1970)

3) E. Kimura, T. Suzuki and Y. Kinoshita :
Separation of reticulocytes by means of multi-layer centrifugation. Nature, 188, 1201-1202 (1960)

4) Y. Kinoshita, S. Kimura, M. Fukamizu and T. Nagasawa :
Separation of two antigenically different subpopulations of small lymphocytes from rat thymus.
Exp. Cell Res., 86, 136-142 (1974)

5) R. Gallily and M. Feldman :
The role of macrophages in the induction of antibody in X-irradiated animals. Immunology, 12, 197-206 (1967)

6) Y. Kinoshita :
Separation of macrophages by density gradient centrifugation. Methods in Immunological Experiment A (Ed. by Jap. Soc. Immuno.), 467-478, in Japanese (1971)

SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY OF HUMAN BLOOD CELLS IN NORMAL AND PATHOLOGICAL CONDITIONS

Yohnosuke Kobayashi, Susumu O hata,
Kyoji Tanabe, Yoshikazu Nishi and
Tomofusa Usui.

Department of pediatrics
Hiroshima University School of Medicine
Kasumi 1-2-3, Hiroshima City, 734
JAPAN

Superoxide dismutase (SOD) catalyzes the dismutation of superoxide anion to less toxic hydrogen peroxide and molecular oxygen ($O_2^- + O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$) and thus serves to protect the oxygen-metabolizing cells against the potentilly toxic effects of superoxide. SOD and related subjects have recently attracted clinical and biochemical interest, especially in relation to bactericidal activity of the phagocytes, oxygen toxicity, etc. SOD activity was determined by the cytochrome c reduction inhibition method at pH 10.0 by the method described by McCord and Fridovich, calculated using a logit paper and expressed as units per cell number or hemoglobin (erythrocytes). SOD activity of each blood cell type in decreasing order was : T lymphocytes, non-T lymphocytes, granulocytes and erythrocytes. Higher SOD activity of lymphocytes was interpreted to be related in part to the longevity and diversity of functions of lymphocytes. Erythrocyte SOD activity was determined in various types of anemia and evaluated from an etiological point of view. In one patient with copper deficiency, not only SOD activity but also erythrocyte and plasma copper and ceruloplasmin were determined, and it was found that erythrocyte SOD activity resumed the normal level when erythrocyte copper level increased to 60% of the normal value on copper replacement therapy. [Erythrocyte SOD is

a cuprozinc enzyme and copper plays an integral role in its activity]

REFERENCES

1. Kobayashi, Y., et al. : Use of logit paper in determination of superoxide dismutase activity of human blood cells. J. Immunol. Methods, 24(1), 1978.
2. Kobayashi, Y., et al. : Superoxide dismutase activity of T lymphocytes and non-T lymphocytes. FEBS Lett. 98(2), 1979.
3. Okahata, S., et bl. : Erythrocyte superoxide dismutase activity in Fanconi's anemia. Clinical Science(In press)

MORPHOLOGICAL STUDIES ON MACRPHAGE-GROWTH AND -FUNCTION

Hisao Takayama

Department of Bacteriology
Tottori University Suhool of Medicine
86 Nishimachi, Yonago City, 683
Japan

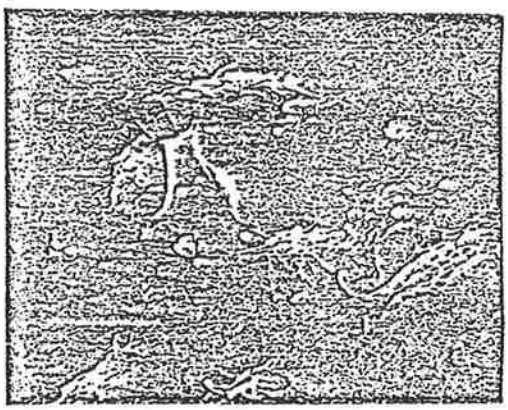
The cell lines obtained from mouse bone marrow cells which were infected by simian virus 40 exhibited reversible phenotypic transition between transfomed and untransfrmed (macrophage) states. These cells were converted to the untransformed state from the transformed state at a confluent phase of the cultures. Moreover, when macrophage -like cells in the untransformed state were sparsely replated and cultivated, they were re-converted to typicaley transformed cells. The cells in the transformed states showed expression of SV40 T antigen, initiation and maintenance of cell multiplication and loss of differentiated cell properties specific to macrophage. On the other hand the cells in the untransformed states showed diminution

of the SV40 T antigen, interruption of the cell multiplication and presentation of the differentiated cell properties. Furthermore, when these cells were passaged with bacteriological dishes, they very slowly proliferated (population doubling time, about 4 days) and usualy maintained their differentiated properties. However, when these cells were repeatedly passaged at their growing phases of the cultures with tissue culture dishes, they rapidly proliferated and lost differentiated properties throughout their culture phases. In conclusion, cell growth and cell function in the transformed cell line were controlled by cellular conditions derived from culture phases or culture passages. Perhaps, physiological changes, originated from substratum adhesiveness, cell shape, cell density or cell-to-cell communication, caused the regulation of SV40 gene function and cellular gene function.

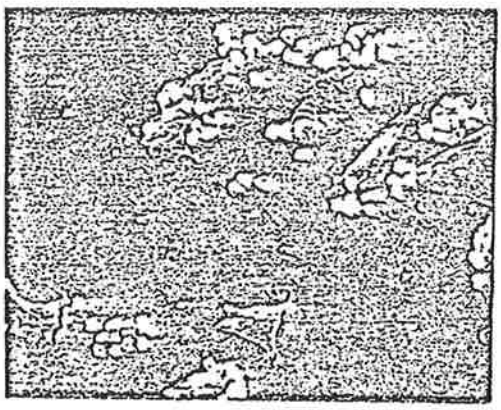
REFERENCE

1) H. Takayama:
Transformation of mouse peritoneal macrophage and bone marrow cells by simian virus 40. Microbiol. Immunol. (1980)(in press)

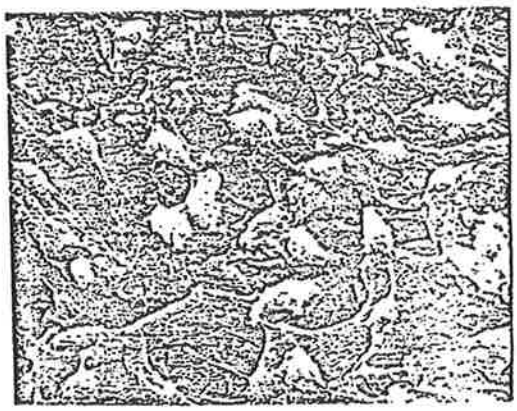
2) T. Katsumoto, H. Takayama and A. Takagi:
Properties of a transformed macrophage cell line by simian virus 40. Microbiol. Immunol. (1980)(in press)



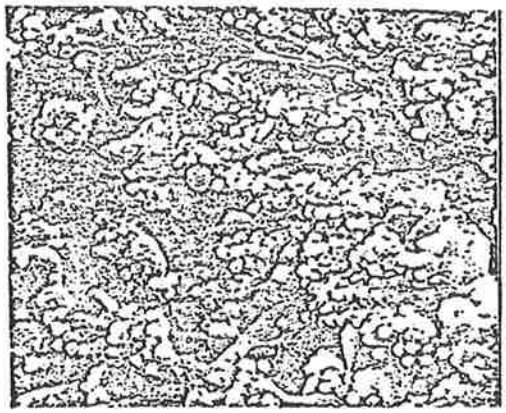
sparse RBC(−)



sparse RBC(+)



Confluent RBC(−)



Confluant RBC(+)

LYMPHOKINES WHICH AFFECT MACROPHAGES

Tatsuichiro Hashimoto and Kikuo Onozaki

Institute of Basic Medical Sciences
University of Tsukuba
Ibaraki-ken, 305, Japan

1. Lymphokines which affect maorophages
   Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF)
   Macrophage Activating Factor (MAF)
   Macrophage Chemotactic Factor (MCF)
2. Purification of MIF
   Partial purification
   Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)
   Anti-MIF affinity column chromatography
3. Characterization of MIF by isotope labelling
   Labelling with N-succinidyl-(2, 3-^{3}H) propionate
   Anti-MIF column chromatography
   SDS-PAGE
   M. W. : 35,000 I. P. : 5.0 - 5.5
4. MAF activity of purified MIF
   Glucose consumption

Glucosamine uptake

REFERENCE

1) Onozaki, K. Haga, K. Miura and T. Hashimoto: Partial purification of guinea pig MIF by affinity column chromatography using macrophages. Microbiol. Immunol., 23, 533-541, 1979.

2) Onozaki, K., S. Haga, K. Miura, M. Ichikawa and T. Hashimoto: Production of an antibody against guinea pig MIF. I. Specificity of the anti-MIF antibody, Cell. Immunol., 48, 258-266, 1979.

3) Onozaki, K., S. Hoga, K. Miura, Y. Homma and T. Hashimoto: Production of an antibody against guinea pig MIF. II. Analysis of the antibody-reacting material using radiolabelled lymphokines, Cell. Immunol., in press

Calcium dependent increase of the potassium permeability of the macrophage membrane

Gilberto M. Oliveira-Castro, Pedro M. Persechini and Elizabeth G. Aranjo
Instituto de Biofisica
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Activated mouse macrophages were studied in vitro using microelectrde techniques. The main objective of this study was to analyse the mechanism of the slow membrane hyperpolarization(SH).

Previous work, from our laboratory, revealed the following characterishics for the SH:(1)concomitant decrease of input resistance;(2)SH firing is spontaneous, but can be induced by mechanic electric stimuli;(3)Tetraethylammonium blocks SH responses;(4)Valinomycin induces permanent membrane hyperpolarization.

The SH amplitude decreases as a linear function of increasing external potassium concentration. The effect is

observed both for a cell population and for continuos records from the same cell. Injecting current to superimpose different membrane potentials, a reversal potential compatible with the potassium equilibrium potential, was found. A ten-fold increase in external potassium causes a decrease in the reversal potential of about 60 mV, which is close to the prediction for a potassium selective membrane:

Calcium ionophores induce longer or persistent membrane hyperpolarizations. The amplitudes of these SH also decreases approximately as the same linear function of the logarythm of external potassium. Verapamil blocks SH production.

Intracellular injection of calcium produces SH responses, while injection of K^+ or Cl^-, fails to elicit SH. The maximun amplitude of the calcium induced SH is also a logarythm function of external potassium. Sodium and chloride variations do not cause detectable changes in the SH response.

It is concluded that the ionic mechanism underling the SH is a calcium dependent potassium channel, similar to that described in other non immune cells.

IONIC REGULATION OF MEMBRANE TRANSPORT ACROSS THE RENAL TUBULAR CELLS.
A STUDY USING ION-SELECTIVE MICROELECTRODES.

Mamoru Fujimoto, kunihiko Kotera, Takahiro kubota and Yutaka Matsumura. Department of physiology, Osaka Medical College, Takatsuki City, Osaka

1) Intracellular ionic activities of K^+, Na^+, Cl^-, HCO_3^-, and H^+were directly measured with respective ion-selective microelectrodes in the proximal tubule of amphibian kiadneys.

Individual microelectrode had a douple- (or triple-) barreled tip of less than 0.6μm(O.D.):the one for the PD (membrane potential) barrel and the other the ion-selective barrel(s).

2) The intracellular Na^+ and Cl^- (also probably HCO_3^-) activities in the bullfrog proximal tubular cell showed twin-peaked distributions:one around 10 mEq/L H_2O and the other more than 20 mEq/L. The average values of a^i_k, a^i_{Na}, a^i_{Cl}, $a^i_{HCO_3}$, pH_i, and the membrane PD were 67, 17, 10, 13 mEq/L, 7.36 (with respect to pH_e=7.66, PCO_2=15 mmHg), and -68 mV. The membrane PD was significantly correleated with the transmembrane gradient of ak and pH, and inversely related with that of a^i_{Na}, but not with a^i_{Cl} or $a^i_{HCO_3}$.

3) Acute decrease of external pH or HCO_3^- in the peritubular perfusate caused an abrupt depolarization of the membrane PD. The relation between the degree of depolarization and pH_e was shown sigmoidal, suggesting some titrating behavior (pk=7.2) of ionic channels (predominantly of Na^+). Thus, the membrane PD had a pH-dependency in the early segment of proximal tubule.

4) Peritubular removal of Ca^{++} caused a depolarization in association with cell K^+ loss, and when Ca^{++} was restored, a hyper-polarization ensued later, whereas an application of high Ca^{++} (3 mM) from the peritubular surface caused a transient hyperpolarization with a gain of cell K^+ and a loss of cell Na^+. An introduction of Ca^{++} into the cell caused a depolarization concomitantly with a loss of cell K and gain of cell Na. Thus, the external Ca^{++} would be a modulator of ionic permeadility, decreasing the permeability ratio of Na^+ to K^+, but the intracellular Ca^{++} would be a suppressor of active Na^+ -K^+ exchange pump.

MODULATION OF MEMBRANE POTENTIAL OF POLYMRPHONUCLEAR LEUKOCYTES BY VARIOUS STIMURI

Kozo Utsumi, M. Miyahara, E. Okimasu
M. Kuroki* and Y. Kobatake*

Department of Medical Biology, Kochi Medical School and *Fuculty of Pharmacutical Science, Hokkaido University

Changes in the fluorescence intensity of a dye 3.3'-dipropyl-thiocarbocyanine iodide [dis-C_3-(5)] were monitorad in suspension of purified polymorphonuclear leukocytes (PMN) during exposure of various stimuli which modulate membrane dynamics.

The dye inhibited the electrontransport at rotenone sensitive site and uncoupled the phosphorylation at site I in rat liver mitochondria. But in the case of PMN, all of the metabolic changes induced by various stimuli were in progress in the presence of KCN or antimycin A, and it was shown that the dye could be used as a monitor of membrane potential of the cells.

The fluorescence intensity of the dye in the presence of valinomycin, an ionophore of potassium ion, wera a function of log K^+ concentration of incubation medium, and the difference of the fluorescence intensity was equivalent to the K^+ diffusion potential in the range of 1-150 mM of K^+. In this experiment the following three kinds of stimuli were used: concanavalin A and chemotactic peptide F-Met-Leu-Phe as membrane protein modifier, digitonine as modifier of membrane hydrophobic situation and Ca^{2+} -ionophore, A 23187, as ion permeability modulater. All of these stimuli induced a transitional increase in the fluorescence intensity (an increase followed by the decrease in fluorescence) concomitant with the release

of intracellular K^+, showing that these changes monitor the changes in membrane potentlal.

In these regards it will be discussed how these stimuli modulate membrane dynamics and concern with the metabolic stimulation in the cell.

REFERENCES

1) Kozo Utsumi et al: Effect of concanavalin A on membrane potential of polymorphonuclear leukocyte monitored by fluorescent dye.
Cell Struct. & Funct 2, 203-206 (1977)

2) Kozo Utsumi et al: Modulation of thymocyte membrane potential by concanavalin A. Physiol. Chem. & Physics 11, 363-369 (1979)

3) Eiji Okimasu, J. Akiyama, N. Shiraishi and Kozo Utsumi: The mechanism of inhibition on the endogenous respiration of Ehrlich ascites tumor cells by the cyanine dye, dis-C_3-(5).
Physiol. Chemi. & Physics 11, in press (1979)

ENDOCYTTC ACTIVITY AND HYPERPOLARIZING RESPONSE IN L-STRAIN FIBROBLASTS

Yasunobu Okada:
Department of Physiology, Kyoto University
Faculty of Medicine, Kyoto 606, Japan

The majority of fibroblastic L cells not only responds with a slow hyperpolarizing potential change to a mechanical or electrical stimulus but show spontaneous, repetitive hyperpolarizations (i.e., membrane potential oscillation)[1]. Ionic mechanism of the hyperpolarizing response in deduced from the elecurophysiological studies so far performed under a variety of conditions[2-4]; that is, an appropriate stimulus elicits Ca^{2+} influx through Ca^{2+} channels, and an increase in the intracellular Ca^{2+}

concentration thus induced triggers the membrane K^+ conductance increase[5].

Vigorous phagocytosis of cell debris or latex beads was observed in the majority of the cells under time-lapse cinematography or phase-contrast microscopy. Phagocytic L cells can exhibit hyperpolarizing membrane responses, while non-phagocytic L cells cannot. However, the application of latex beads to the cell surface did not induce hyperpolarizing responses. The addition of a high dose of Ca^{2+}, which induced membrane hyperpolarization, gave rise to remarkable stimulation of the uptake of particles, but Sr^{2+}, which also made the membrane hyperpolarized, did not affect the phagocytic activity. Verapamil, a Ca^{2+} channel blocker, inhibited both hyperpolarizing responses and ingestion of beads. It appears, from these results, that the Ca^{2+} entry on the hyperpolarizing response (but not the membrane potential level per se) is closely associated with the phagocytic activity.

Calcium ion and intercellular communication of mouse macrophage

Maria Ori, Yoshiki Shiba and Yoshinobu Kanno

Department of Physiology
Hiroshima University School of Dentistry
2-3 Kasumi 1 Chome, Hiroshima City
734 Japan

The interaction between cells is an important phenomenon for the immunological response. But electrical cell coupling between immune cells is not known as yet. The formation of electrotonic junctions between lymphocytes was observed by Oliveira-Castro. In this paper we examined

the interaction between macrophages and the effect of external calcium ion on the formation of the coupled junctions.

Macrophages were collected from peritoneal exudate of male mouse injected with thioglycollate. The cells were cultured in RPMI-1640 medium and MEM medium supplemented wish 10% calf serum. Concenrration of calcium ion was changed from 0mM to 10mM.

Electrical coupling was measured with two glass electrodes which were inserted into two adjacent cells. Current injection (6×10^{-9} A) and voltage recording were performed through the same electrode. After 3 days in culture many cells exhibited electrotonic coupling. When external calcium concentration was increased from 0mM to 4mM, the number of coupled cell pairs increased. But 10mM calcium decreased the occurence of coupled cells. These results suggest that mouse macrophages are capable of establishing cell coupling with each other in vitro and that formation of these coupled junctions is dependent upon the external calcium concentration. in L cells probably through the activation of actomyosin-like cytoskeletal systems.

Recently we found that several serum proteins (for example, low density lipoprotein and so on), which have been known to be taken up by receptormediated mechanism into the cell, elicit sustained membrane hyperpolarization followed by vigorous pinocytic uptake. There is, therfore, a possibility that the hyperpolarizing response is one kind of "receptor potential" related to receptor-mediated pinocytosis and a cell motility system.

1) Okada et al. (1977) J. Membrane Biol. 35, 319-335.
2) Okada et al. (1977) J. Membrane Biol. 35, 337-350.
3) Roy & Okada. (1978) J. Membrane Biol. 38, 347-357.

4) Okada et al. (1979) J. Membrane Biol. 47, 357-376.

5) Okada & Tsuchiya (1980) Biophysics (Seibutsu-Butsuri) 20(in press)
(in Japanese).

神経ペプチドの研究展開（1980. 2. 1）

課　題　名

小林　繁　新潟大医　解剖　「Segi's capの神経ペプチド産生細胞」

鬼頭　昭三　広島大医　三内　「神経ペプチドの光顕的および電顕的免疫組織化学」

金沢　一郎　筑波大臨床医　神経内　「大脳基底核におけるsubstancePJ

松尾　裕　東大医　三内　「壁在神経叢におけるペプチド」

堂本　時夫
沖　充　島根医大　解剖　「哺乳動物消化管に分布するsubstance P含有神経」

鈴木　利光　新潟大医　病理　「ヒト神経芽細胞腫のin vitro形態学と分化の誘導」

天野　武彦　三菱生命研　「培養神経細胞系のペプチド」

矢内原　昇　静岡薬大　「神経ペプチドとしてのVIP」

大塚　正徳　東京医歯大　薬理　「脊髄から放出されるsubstance Pの高速液体クロマトグラフィーによる同定」

加藤　譲
井村　裕夫　京大医　二内　「神経ペプチドによる下垂体ホルモン分泌調節」

兼子　俊男　山口大医　三内　「神経ペプチドとadenylate cyclase活性」

菅野　富夫　北大獣医　生理　「VIP放出とCCK放出の比較」

概　要

1931年，Von Euler と Gaddum による substance P の発見以来，50年を経た現在，とくにこの10年間にわたる神経ペプチドの著しい研究展開は驚くべきものであるが，これはTRH，LH-RH，ソフトスタチン，substance P，エンケファリンなど純粋な神経ペプチドが単離されたことにもとづいている。ペプチドの構造が決定されると提出された推定構造にもとづき化学合成が行われる。その結果，天然品に代わり，合成ペプチドを用いた広範な生化学的および生理的研究が展開されるようになった。さらに，これら神経ペプチドの単離，化学合成により高純度の合成ペプチドまたはその誘導体の入手が可能になると，抗血清の作製が試みられ，免疫学的方法により組織あるいは体液中の神経ペプチドの測定が可能になり，また，免疫組織化学的研究によりペプチド産生細胞が明らかにされるようになった。これら神経ペプチドに特異的なラジオイムノアッセイの確立は，すべての組織または体液中のペプチドは多少とも分子量の異なる多様な分子型として存在することを示した。一方，ペプチドホルモンの

生合成機構の研究発展にともない，細胞内で大分子型の前駆物質が生合成されたのち，細胞内たんぱく分解酵素により分解され，活性型のペプチドに変換されることが多くのホルモンについて明らかにされた。

近年，消化管に存在する各種ペプチドホルモンがつぎつぎに単離されたが，それらの中でVIP，CCKおよびグルカゴンの免疫活性が中枢に存在することが明らかにされ，またモチリンあるいはガストリンの免疫活性が下垂体抽出物に見いだされるにいたった。一方，脳由来の活性ペプチドであるエンケファリン，substance P，ニューロテンシン，ソマトスタチンあるいはTRHなどの免疫活性が胃腸膵で検出された。これら脳を消化管に共存するペプチド（brain-gut peptide）の生理的意義については，まだ不明の点が多いとはいえ，恐らく神経伝達物質，パラクリン系の局所ホルモンあるいは内分泌ホルモンとして作用していることが考えられる。これらのペプチドの多くは明らかに胃腸膵の神経細胞にも存在している。

本セミナーはこれら神経ペプチドに関する日本における研究現況をとらえるとともに新しく展開されつつある研究をさらに大きく発展させることを目指したものであり，研究者相互の情報交換の場としてきわめて意義あるものであった。

抄　　録　神経ペプチドとしてのVIP

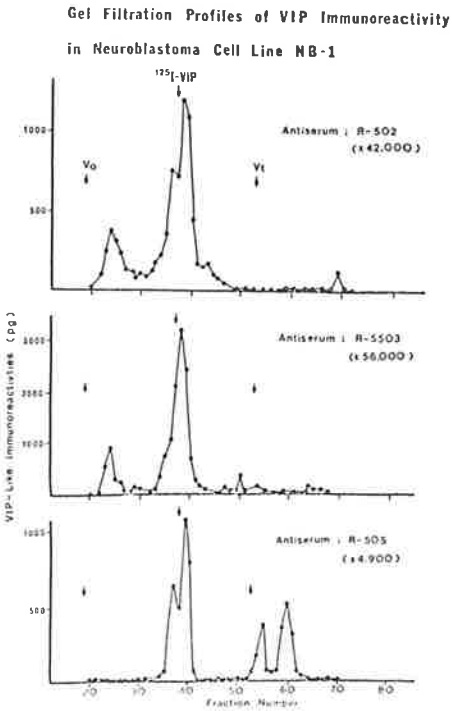
矢内原昇　　小林　繁　　佐藤晴子（生理研）
矢内原千鶴子　　坂上政則（静岡薬大）

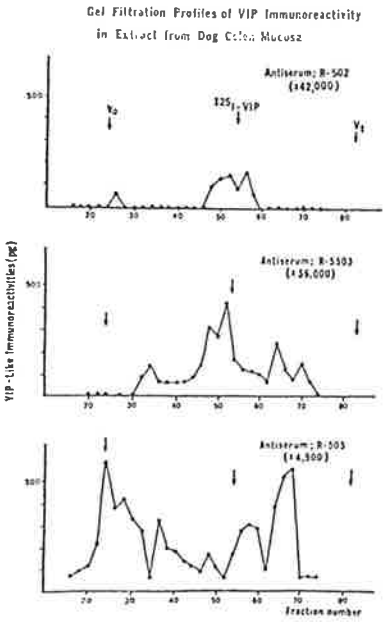
VIPはもともと腸管ホルモンの一つとしてブタ小腸より抽出されたものであり，中枢においてもその免疫活性が見い出され，脳－腸管ペプチドの一つとして注目されるようになった。本研究はこのVIP免疫活性をさらに分子レベルで詳細に検討することを目的とし，抗原認識部位がそれぞれ異なる3種の抗VIP血清を用いたRIAおよび免疫組織学的手法により，ヒト神経芽細胞腫の培養細胞NB-1ならびにイヌ腸管理組織抽出物中の免疫活性VIPの性状を検討した。

本研究で用いた抗血清はVIP分子全体を抗原認識部位とするR502，VIP_{7-28}を免疫抗原として作製し同様にVIP分子全体を認識するR5503およびVIP_{18-28}を免疫抗原として作製しVIPのC端18-28位を認識部位とするR505である。この3種の抗血清を用いたRIAによりヒト神経芽細胞腫培養細胞NB-1抽出物

のセファデックスG50によるゲル濾過分画を測定した結果，いずれの系においても28アミノ酸残基からなる合成ブタVIPに一致する分画が主として認められ，わずかではあるがR502およびR5503を用いた系では大分子分画の存在も検出された（図１）。またこの３種RIA系によりイヌ結腸粘膜及び筋層抽出物について同様にゲル濾過を行い，各分画を測定した結果，筋層における免疫活性は主として，28アミノ酸残基からなるVIPに一致する分画からなり，一方粘膜層にみられる免疫活性分画には多様な分子型の存在が認められ，むしろVIPそのものに一致する分画はほとんど検出されなかった(図２)。

図1.





これらの結果をR502を用いた免疫組織学的研究と考え合せ神経細胞に存在するVIP免疫活性は主として28アミノ酸残基からなるVIPであり，結腸粘膜の免疫活性はそれと全く異なる型であることが明らかになった。

なお，培養細胞NB-1中の他の神経ペプチドについてもRIAにより検討した。その結果，VIP：353.3±58.6（$\times 10^{-6}$ pg／cell）であったのに対し，substance P：490.0±60.8，ニューロテンシン：367.0±6.9，ソマトスタチン：343.3±20.8であり，これら神経ペプチドの存在が確認された。

瀬木の帽子 Segi's cap の神経ペプチド産生細胞

小林　繁（生理研）

胎生5カ月以後のヒト胎児十二指腸および上部空腸では，基底果粒細胞が繊毛先端部に集合して巨大な塊をなす。この細胞集団は瀬木三雄博士（元東北大学教授，現瑞穂短大学長，名古屋市瑞穂区陽明町在住）によって発見された詳細に記載されたが（解剖誌：8：276-286, 1935），その後，45年近く学会から注目されることがなかった。しかし最近私たちによって再発見され，"瀬木の帽子 segi's cap" という名称が提案された。
(Kobayashi, Iwanaga and Fujita: Arch. hiotol. jap:43/1:1980).

瀬木の帽子に含まれる基底果粒細胞の大部分が好銀性である。従ってGrimelius法を使って鍍銀すると帽子の部分が特異的に染まる。

Masson-Hampexl 法で帽子を鍍銀すると，半数以上の基底果粒細胞が染まる。これらは銀親和細胞であってscrotoninを産生する。

蛍光抗体間接法および酵素抗体間接法でmotilin-, somatostatin-, gastrin (cck-pz)-細胞が帽子の中に証明される。secretin 細胞およびGLI細胞は腸陰窩および繊毛の上皮組織の中に散在するが帽子の中には認められない。

瀬木の帽子の消失の時期は不明である。しかし生後2日目の無脳児の十二指腸にも，少数ではあるが明瞭な帽子の形成が認められたことから，新生児期にも一定期間は存在することが推定される。

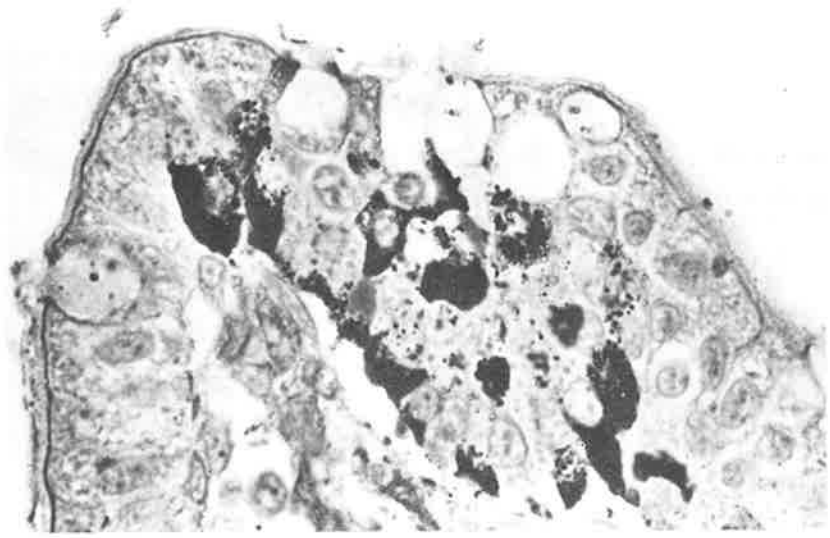


図1
瀬木の帽子の好銀細胞，6カ月ヒト胎児十二指腸，Grimelius法で鍍銀した。×1,100

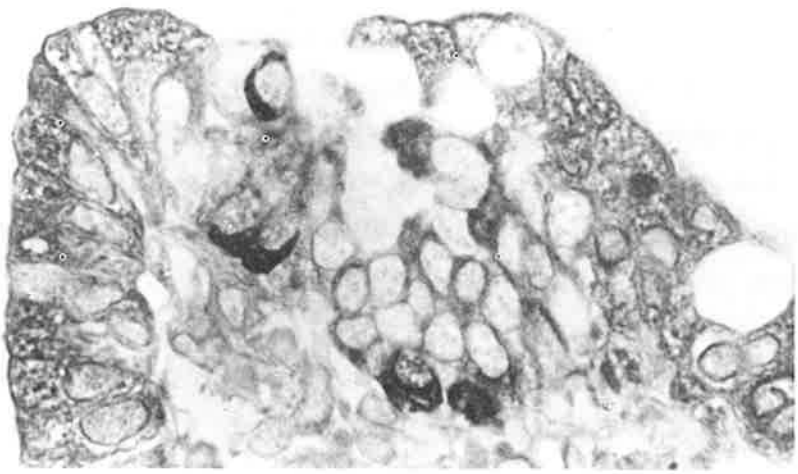


図2
瀬木の帽子の Somatostatin 産生細胞，6カ月ヒト胎児十二指腸，酵素抗体間接法。
×1,100

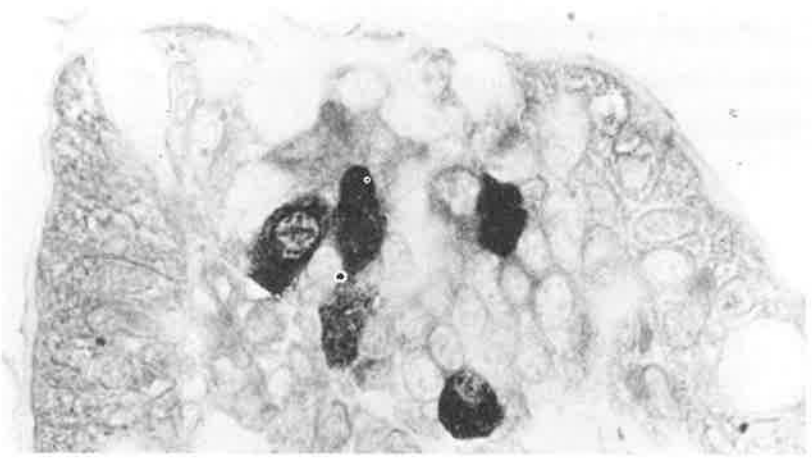


図3
瀬木の帽子の gastrin 産生細胞，6カ月ヒト胎児十二指腸酵素抗体間接法（R1301を600倍で使用）
×1,100

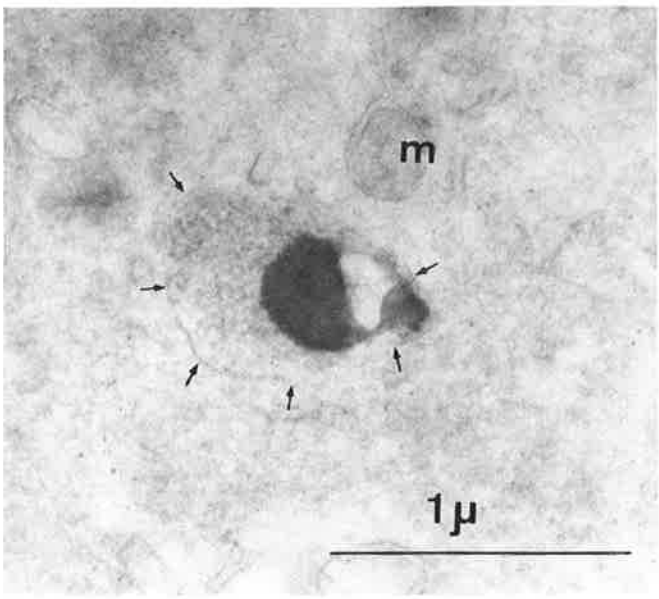
神経ペプチドの光顕的および電顕的免疫組織化学

鬼頭　昭三（広島大）

著者らは正常雄ラット中枢神経系の Substance P (SP)，Somatostatine (ST)，met，enkephaline (ME)，LH-RH，α-およびβ-endorphin(αE，βE)の各免疫活性の分布局在を蛍光抗体法間接法を用いて検索した。注目すべき成績は 1) SP，ST，ME 様免疫活性を脊髄後角，三叉神経脊髄路核，中脳中心灰白質，内側視床下部，central amygdaloid nucleus に神経終末様

構造として認めこれらペプチド相互関係が注目された。 2) ME様免疫活性を脊髄前角の小型の神経細胞に接して終末様構造を認めた。 3) 前頭葉大脳皮質にSP様免疫活性を， 4) ST様免疫活性を海馬，大脳皮質に， 5) αE様免疫活性を内側視床下部，正中隆起に神経終末様構造を認めた。 6) 神経ペプチド含有神経細胞は colchicine 処理ラットで観察し，Ventromedial hypothalamic nucleus にLH-RH 様免疫活性を，尾状核にαE様免疫活性を，弓状核にαE 様免疫活性を，視床下部を中心にSP およびME 様免疫活性のそれぞれ陽性細胞を確認した。

神経ペプチドのラットの神経細胞内局在については電顕的酵素抗体法により感覚神経節細胞について観察をおこなった。SP，ST およびβE 様の免疫活性は感覚神経節細胞の内部に一層の膜で作られた胞体の内部に不定形に存在していることを認めた。（図１）この胞体の大きさは200 nm から1μ におよび小型で紡錘型の細胞に高頻度に観察された。さらに幼若ラットの後根神経節細胞の dissociated cell culture をおこない５日後の細胞で SP，STおよびβEの免疫活性を認めた。



図：ラット三叉神経節細胞内のβE様免疫活性
矢印は胞体を形成する膜を示す。

大脳基底核における substance P について

金澤　一郎（筑波大）

Substance Pは，11個のアミノ酸より成るペプチドであり，40年以上前にウシ腸管から発見されていながらごく最近まで純化されなかったものである。ここ10年のsubstance Pに関する神経科学的な知見の進歩はめざましいものであるが，それはひとえにその構造が明らかになり合成品が手に入るようになったために他ならない。substance Pは少なくとも脊髄で興奮性神経伝達物質として働いていることは確実であると考えられている。そこでここでは，substance Pが大脳基底核でも伝達物質として働いていると考える証拠を，自らの研究成果によって提示することにする。

まず，substance Pに対する抗体を用いるRIAにてラット中枢神経系内での分布を調べたところ，このペプチドは極めて非均一的な分布をしており特に大脳基底核のうち黒質に集中的に存在することがわかった（表１）。しかもこの黒質の substance P は神経終末ボタンに局在していることが電顕レベルでの免疫組織学的検索によって明らかにされた。この黒質の substance Pはラット線条体を破壊することにより，破壊巣の大きさに比例して減少することも明らかになった。一方，ヒトの疾患で線条体に強い萎縮を認めるハンチントン舞踏病の黒質で substance P の濃度を測定したところ，著しい低下を示すことがわかった。以上のことから，substance Pは線条体－黒質系の線維に含まれる神経ペプチドであることが確定的になった。電気生理学的にはネコの線条体を刺激すると黒質で興奮性の電気活動も記録でき，これがsubstance Pの拮抗物質とされる Lioresal で遮断されたところから，substance Pはこの線条件－黒質系の興奮性伝達物質として働いているものと推定されている。

もう一つの大脳基底核の核である淡蒼球（特にその内節）にも substance Pが集中的に存在することが免疫組織化学的にわかったので，ラットを用いて破壊実験を行ったところ，線条体前方の内側に存在する神経細胞が淡蒼球内節に substance Pを含む線維を送っており，黒質への線条体前方の外側にある神経細胞から発していることが明らかになった。又線条体から淡蒼球外節へはsubstance Pを含む線維は到っていないことも同時にわかった。この線維結合様式は，すでに明らかになっている抑制性伝達物質アミノ酸であるGABAの

それとは明らかに異なっておりはなはだ興味深い（図１）。

ラット神経系における substance P の
部位別分布

カテゴリー	部位	substance P 濃度 (ng/g)*
知覚系	脊髄神経節	92± 10.4
	脊髄後角	1,443±215.0
	三叉神経核	1,871±205.0
	脊髄後索	174± 39.3
	後索核	227± 39.4
	視床中継核	30± 7.2
	大脳皮質(知覚領)	25± 3.2
運動系	内包	185± 28.7
	線条体	112± 30.9
	脊髄前角	181± 44.4
	尾状核	333± 37.5
	淡蒼球	449± 60.0
	黒質	2,325±142.5
	小脳	13± 5.5
その他	海馬	50± 5.4
	扁桃核	515±115.8
	視床下部(内側)	844± 85.6

* 平均 ±S. E. M(4)

表１

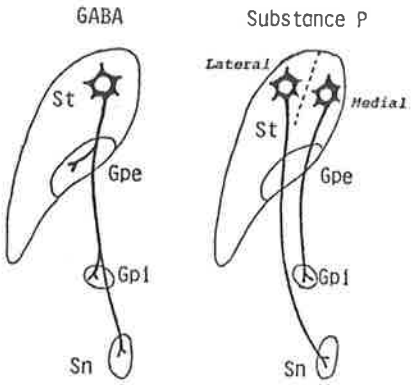


図１

St ：線条体
Gpe：淡蒼球外節
Gpi：淡蒼球内節
Sn ：黒質

壁在神経叢におけるペプタイド作働性神経の存在

松尾　裕（東大・医）

近年急速に発展した消化管ホルモンに関する研究により14種類の消化管ホルモンのうち８種類の活性ペプタイドが脳に共存しており，Brain gut peptide と呼ばれている。われわれはこれら８種類の活性ペプタイドの抗血清を用いて蛍光抗体法によって壁在神経細胞について活性ペプタイドの存在を検討し，さらに電子顕微鏡によって検討を行った。

第一表はわれわれの成績をまとめたもので消化管と中枢神経系に共通して存在するペプタイドホルモンのうち，壁在神経叢においては vasoactive intestinal polypeptide(VIP) substance P とエンケファリン分泌細胞が認められ，ソマトスタチン，ノイロテンシン，CCK－ガストリン，ボンベシン分泌細胞は，われわれが用いた抗血清では認めることはできなかった。そして壁在神経叢における神経内分泌細胞はVIP細胞がもっとも多く，次に substance P，エンケファリン細胞の順であり，VIPはアウゲルバッハ神経叢に多く，substance Pはマイスナー神経叢に多く認められた。一方，われわれは壁在神経叢を電子顕微鏡によって検討した結果，ペプタイド分泌顆粒をもった神経内分泌細胞を認めることが出来た。分泌顆粒は円形の有芯顆粒

（1500～2000 Å）であり，マイスナー神経叢のものの方がアウエルバッハ神経叢の顆粒に比べてやや大きく，電子密度が高く，両者の間に差異が認められた。また壁在神経叢のなかにコリン作働性神経末端やアドレナリン作働性神経末端とは異なる大有芯顆粒（1500 Å）を豊富にもったペプタイド作働性神経末端の存在を認めた。さらにペプタイド作働性神経末端のあるものは従来の神経節細胞とのあいだにシナップス膜の肥厚がみられた。すなわち，壁在神経叢においてはペプタイド含有神経細胞からの peptidergic nerve が一部神経節細胞に対して刺激伝達機構をもっていると考えることが出来る。

第1表　　消化管ホルモンと壁在神経叢

	消化管内分泌細胞	マイナスナー神経叢	アウエルバッハ神経叢	中枢神経
V I P	＋	＋	＋＋	＋
Substance P	＋	＋＋	＋	＋
エンケファリン	＋	?	＋	＋
ソマトスタチン	＋	－	－	＋
ノイロテンシン	＋	－	－	＋
CCK－ガストリン	＋	－	－	＋
ボンベシン	＋	－	－	＋

消化管と Substance P 陽性神経

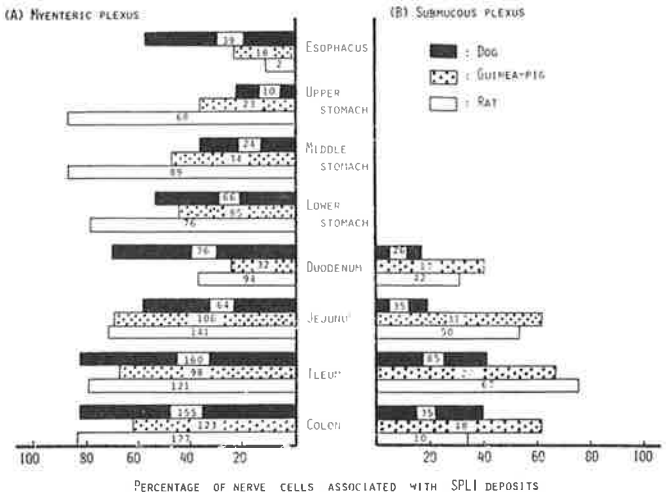
堂本時夫　　沖　　充（島根医大）

酵素抗体法（Sternberger の PAP 法）を用いて，ラット，イヌ等の消化管内の Substance P（SP）陽性神経線維の分布を明らかにし，また，それらの起始細胞が節状神経節と脊髄神経節に存在することを推定した：消化管の筋層間神経叢と粘膜下神経叢にはSP 反応産物を含む多数の神経末が神経細胞体の周囲に認められる。これらの神経細胞体を消化管の部位別に検索し，相対頻度を求めると図1のような分布を示した。ネコの迷走神経幹を節状神経節下部または横隔膜上部で結紮すると，結紮上部にSP が蓄積するが，同時に腸管では減少を示した。延髄にはSP 陽性神経線維が認められるがSP 陽性細胞は認められない。節状神経節では10%の神経細胞がSP 陽性を示した。また腹腔神経叢には，多数のSP 陽性神経線維が認められるが，SP 陽性細胞は認められな

い。脊髄神経節には5～10%のSP陽性神経細胞が認められる。（これらSP陽性神経の分布は図2に示した。）

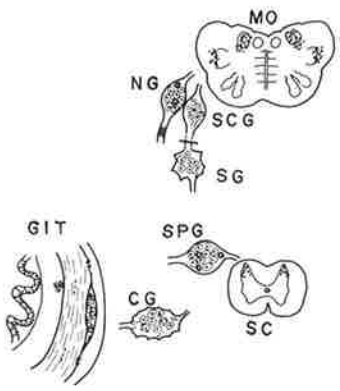
以上の知見から，消化管のSP陽性神経は，これらSP陽性神経細胞の末梢枝である可能性が強い。

図1



カラム内の数字は，SP神経終末像を伴う神経細胞の観察実数を示す。SPLI deposits：Substance P-like immunoreactive deposits

図2



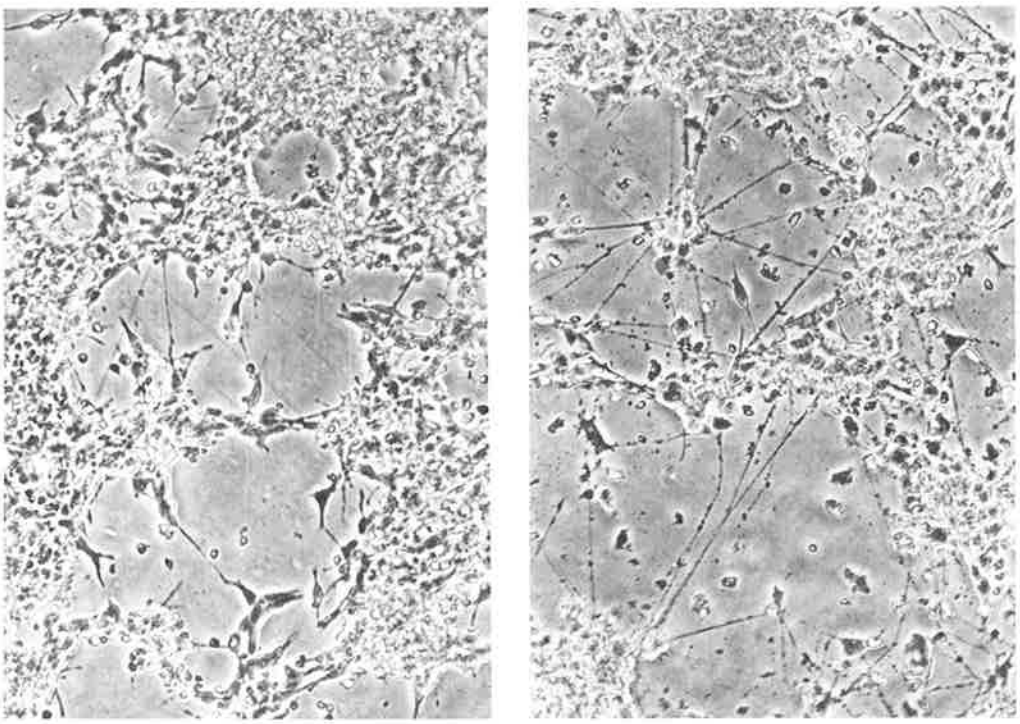
MO：延髄，SC：脊髄，GIT：消化管，NG：節状神経節，SG：星状神経節，SPG：脊髄神経節，CG：腹腔神経節，SCG：上頸神経節

ヒト神経芽腫細胞の in vitro 形態学と分化の誘導

鈴木　利光（新潟大・医）

副腎原発の小児神経芽腫由来株NB-1, Goto, YT-nuはいずれも附着性増殖を営み小突起を有する。平均倍加時間は前述の順にそれぞれ53. 60. 36時間，染色体モード数は45. 44. 49と近2倍体の構成を示す。超微形態上，NB-1細胞には神経芽細胞様の未分化な細胞と同時に神経節細胞様，あるいは直径200 mμ 大の神経分泌顆粒を有する旁神経節細胞様の細胞が混在する。一方，GOTO, YT-nu 細胞はおおむね神経芽細胞様の未分化な細胞のみから構成される。NB-1細胞にはtyrosine hydroxylase活性が，GOTO, YT-nu 細胞にには choline acetyltransferase 活性が証明されている（京都府立医大，今宿晋作博士）。これら3株の細胞はいずれもヌードマウスへの異種移植

が可能である。また，Nagai 株は成人の頸部神経根原発の神経芽腫に由来するが平均倍加時間 130 時間，染色モード80－83で，超微形態上外套細胞様あるいは感覚線毛を有する細胞などもみられ，上記３株とは明らかに異なる。培養神経芽腫細胞は But_2 cAMP に反応し，それぞれある程度の形態学的な分化傾向を示す。NB-1, YT-nu 細胞は神経節細胞と旁神経節細胞への分化が明瞭となり，Goto も神経節細胞への分化が明らかとなる。Nagai 細胞にも cAMP 処理によってはじめて少数の神経分泌顆粒を認めるようになる。以上，培養神経芽腫細胞の形態学的特徴と分化の傾向について報告した。



左は対照群，右は 1 mM/ml の But_2 cAMP を添加培養して14日目の NB-1 細胞。
CAMP 処理群には著明な神経突起の伸長が認められる。

培養神経細胞系のペプチド

天野　武彦（三菱化成生命研）

最近中枢神経系に腸管に存在するものと同じペプチド：P物質 VIP，CCK，Bombesin，Somatostatin，Neurotensin 等が見出され，その機能との

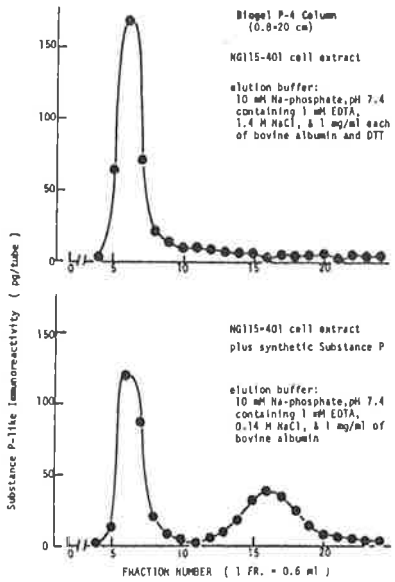


図　NG115-401 細胞抽出液に存在するSPLI のゲルロ過パターン。抽出液のみ(上)と標準 SP を加えたも(下)。標準SPは分画№16 にピークがある。

関係が注目されている。培養神経系は他の細胞成分を除いた純粋な神経系細胞をとり扱いうる点で生合成，レセプターの研究に多くの利点をもっている。我々はP物質（SP）をラヂオイムノアッセイ法で多くの作成した神経系細胞クローンでしらべ，さらにS.P.の細胞に対する反応をサィクリック AMP，サィクリック GMP の細胞内濃度変化を指標にして測定したのでその結果を報告する。

マウスニューロブラストーマ×ラットグリオーマハイブリッド細胞 NG115-401 が Substance P-like Immunoreactivity （SPLI）を産生していることを見出しその生産量は対数増殖期後期の細胞で 96.3 pg/mg protein であった。NG115-401 細胞の生産する SPLI はアミノ酸残基 11 個よりなるS.P.に比べてはるかに高分子でゲルロ過で分子量約 26,000と推定された。ラットフェオクロモサイトーマ由来の PC12 細胞は神経成長因子に依存した SPLI を生産した。

参考文献

1）天野武彦，畠中寛，根岸美智子（1979）日本組織培養学会第47回研究会抄録集 PP30
2）畠中寛，天野武彦（1979）第22回日本神経化学会抄録集 PP352

脊髄から放出される substance P の高速液体クロマトグラフィーによる同定

大塚正徳　　赤木宏行（東京医歯大・医）

Substance P（SP）が一次知覚ニューロンの興奮性伝達物質であることを示す重要な証拠の一つとして，immunoreactive SP の放出の証明がある。すなわち幼若ラットの摘出脊髄を灌流し，灌流液中の immunoreactive SP 量を radioimmunoassay によって定量すると，後根の刺激に応じて著しい増量が見られた（図１）。しかしここで radioimmunoassay に用いた SP 抗体は SP_{1-11} より短い C-terminal fragment にも交叉反応するので，放出された immunoreactive SP が SP_{1-11} よりも短い fragment である可能性

は否定できない。そこで以下の実験では高速液体クロマトグラフィーを用いて脊髄から放出されたimmunoreactive SPの同定を試みた。幼若ラット脊髄を摘出，半截した標本20個からK^+ 90mMでimmunoreactive SPを放出させた後，silica gel（Quso）に吸着させて分離し，acetone －酢酸－水－ Pyridine 混液で溶出，凍結乾燥後，ODS樹脂を充填したカラム（300×4㎜）および溶媒系にはacetonitrile －水－燐酸（pH 3.0）を用いて高速液体クロマトグラフィーにより展開した。この系ではSP_{1-11}，SP_{2-11}，SP_{3-11}，SP_{4-11}，SP_{5-11}，およびSP_{6-11}は完全に分離されて溶出した。脊髄から放出されたimmunoreactive SPは単一ピークとして溶出され，溶出位置は，SP_{1-11}と完全に一致した。

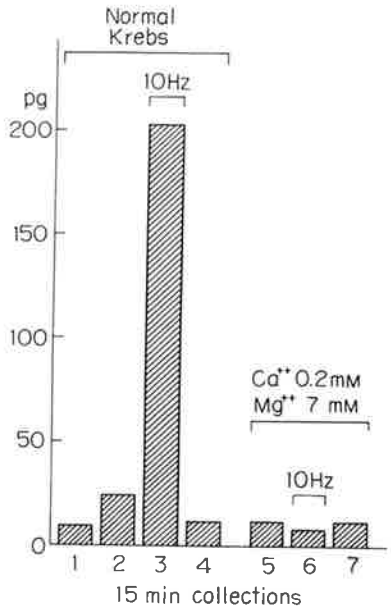


図1
ラット摘出脊髄灌流液中のimmnoreactive SP。最初にnormal krebs液で，次いで低Ca，高Mg液で灌流した。図中に示した時点で腰髄の後根を10Hzで刺激した（Otsuka & Konishi, 1976）。

神経ペプチドによる下垂体ホルモン分泌調節

加藤　譲　　井村裕夫（京都大・医）

中枢神経系に存在する各種の神経ペプチドは，脳内アミンとともに下垂体ホルモン分泌調節に重要な役割を有する。今回はプロラクチン（PRL）分泌とopioid peptidesおよびVIPの関係について検討を加えた。β-endorpin，α-endorphin，Met^5-enkephalinのラット脳室内投与は血漿PRL値を明

らかに増加させた。Met^5-enkephalinの誘導体であるFK33-824(DAla^2, MePhe^4, Met(o)-ol enkephalin)は，β-endorphinの約1400倍の強力なPRL分泌促進作用を示した。FK33-824の作用は静脈内投与によっても認められた。これらの作用はいずれもopiate receptor blockerであるnaloxone の投与によって抑制された。脳内アミンを減少させるreserpine前投与や，抗ドーパミン剤Pimozideの前投与は，血漿PRL値を上昇させたが，FK33-824に対する血漿PRLの増加反応を明らかに抑制した。VIPの脳室内および静脈内投与はいずれもラット血漿PRL値を増加させた。この作用はnaloxoneによって有意に抑制され，またL-dopaの投与によって完全に抑制された。単層培養したラット下垂体前葉細胞を用いるin vitroの系においては，β-endorphin，FK33-824，VIPはいずれも単独ではPRL分泌に影響を与えなかった。ドーパミンの添加はPRL分泌を明らかに抑制したが，この作用はVIPの同時添加によってのみ明らかに拮抗された。従ってopioid peptideは視床下部のドーパミン分泌を抑制することによって，またVIPは視床下部に使用するとともに，下垂体に直接作用してドーパミン作用に拮抗することによってPRL分泌を促進することが示唆される。

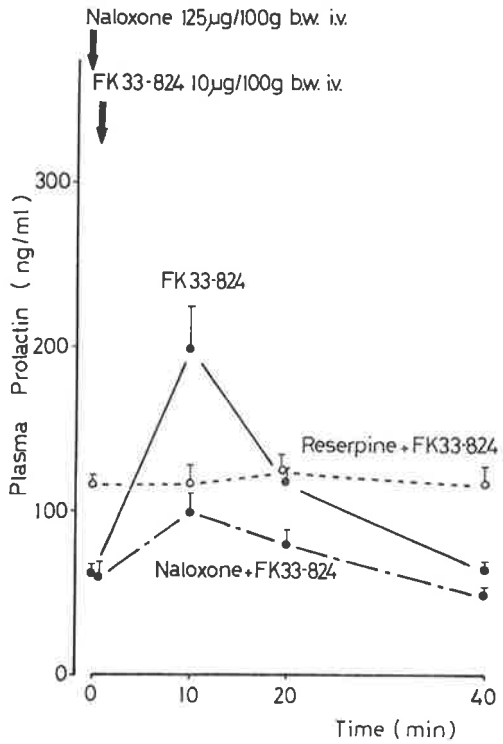


図　右心房内に慢性的にカテーテルを留置した無麻酔ラットにおけるFK33-824(10μg／100g体重)静脈内投与後の血漿PRLの変化。ならびにnaloxone(125μg／100g 体重，3分前静注)およびreserpine(1㎎／100g体重，17時間前腹腔内投与)を前投与した後に，FK33-824 を静脈内投与した場合の血漿PRLの変化。

神経ペプチドと adenylate cyclase 活性

兼子　俊男（山口大・医）

Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) は Bryant らにより，中枢神経系におけるその免疫活性の存在が報告されたが，その生理的意義は尚不明である。ラット中枢神経における VIP の作用を adenylate cyclase の活性化を指標として，in vitro で検討すると，下垂体前葉，視床下部，橋において VIP は有意の adenylate cyclase の活性化を示した。しかし VIP による下垂体前葉 (GH, TSH, LH, FSH, Rrolactin, ACIH)，視床下部 (TRH, LH-RH, Somatostatin) からの incubation medium への有意のホルモンの放出は認めることが出来なかった。一方同時に VIP が松果体の adenylate cyclase を活性化することを見出したが，この作用は両側上頸神経節切断 3 日後のラットの松果体においても認められることより，VIP の松果体にたいする作用は catecholamine とは独立した作用であることが明らかである。

松果体の器官培養において，VIP は Norepinephrine と同様に melatonin 生合成系の酵素の 1 つである Serotonin-N-acetyltransferase 活性を誘導した。すなわち松果体機能は，VIP (peptide) と amine の両者により，その機能が調節されていると考えられ，VIP の中枢神経系における一つの作用点は松果体を通しての生体リズムに関与する可能性が示唆された。

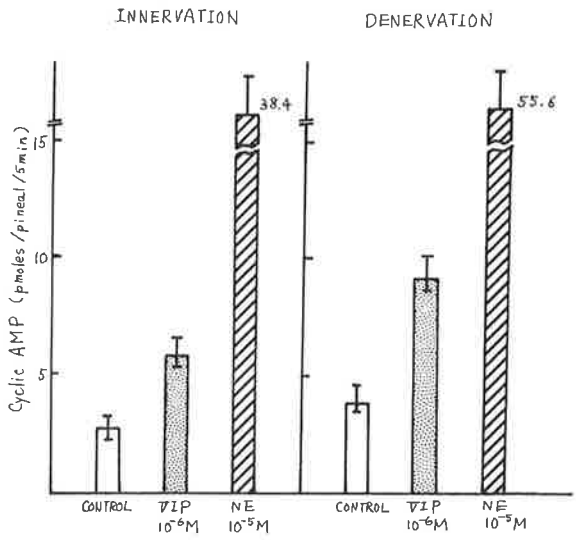


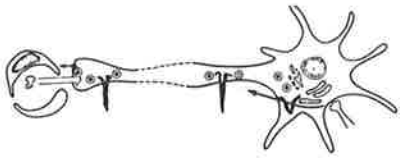
図　両側上頸神経節切除後 3 日のラット松果体にたいする VIP の adenylate cyclase の活性化能。神経節切断により松果体は刺激物質にたいし supersensitive になっている。

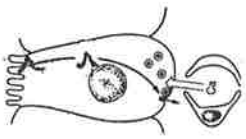
VIP放出とCCK放出の比較

菅野　富夫（北大・獣医）

ニューロンや神経分泌細胞の伝達物質候補やホルモンとしてのペプチドと，胃腸膵内分泌細胞のホルモンとしてのペプチドの共通性と特異性についての研究は最近ますます盛んになりつつある。これらペプチドの中でもVIP vasoactive intestinal polypeptideには特に関心がよせられてきている。それは，VIPがはじめ腸ホルモン候補と目されていたが最近の組織学，免疫学，生理学分野いずれの研究もVIPがニューロンの伝達物質候補とする考えに有利な結果を提示しているからである。そこでVIP放出と，典型的パラニューロンの分泌物質であるCCK cholecystokinin 放出とを比較することによって，ニューロンとパラニューロンの放出機序の共通性と特異性が明らかにされるものと考えた。

すでに，ラット視床下部スライス標本を高K液で刺激した後のVIP放出が外液Ca^{2+}を低くすると抑制されるという報告がある（Emsonら，1978）。我々もネコ摘出十二指腸標本から自発的に放出されるVIPが無Ca液で灌流すると完全に抑えられることを報告した（Kannoら，1979）。ネコ迷走神経に含まれる，高閾値VIP線維の電気刺激後のVIP放出はテトロドトキシン（TTX）によって阻止される（Fahrenkrugら，1980）。以上の結果から，ニューロンから自発性および刺激後に放出されるVIPは他のニューロンと同様に外液Ca依存性であり，TTX感受性Na spikeが軸索の興奮伝播に関与しているという機構が推定される。ラット摘出十二指腸粘膜面に合成トリプシンインヒビターを作用させると門脈内はCCKが放出されてくる。このCCK放出はTTXを粘膜面あるいは血管面に作用させても全く影響をうけない。血管灌流液中のCaを除くとCCK放出が止まる。トリプシンインヒビターの代りに高K液を十二指腸粘膜面に作用させてもCCK放出がみられる（以上Kannoら，1979, 1980）。これらの結果は，CCK細胞は粘膜面の受容部位が刺激されると緩除な脱分極が生じ，放出部位（血管面）からCa依存性にCCKを放出するという機構においてはニューロンと共通性があるといえる，しかし，受容部位と放出部位を連結する機構はTTX感受性Na spikeではないところにニューロンとの差異があることを示している。





	受容部位	伝達部位	放出部位
ニューロン 神経分泌細胞	Slow depolarization	Action potential	Ca-dependent exocytosis
パラ ニューロン	Slow depolarization	Slow depolarization	Ca-dependent exocytosis

課　題　名　生理学と数学的方法（1980. 2. 18 ～ 19）

概　　要　生理学研究所におけるこの種のシンポジウムは昨年に続いて二度目である。この領域の国際集会・学術雑誌等近年ますます盛んで，国内でもこの種の会合が通常的に開催されるのが望ましい。この意味で生理研において2年度に渡って表記のシンポジウムが認められたのはまことに喜ばしい。

以下，本年度の会合について報告する。

テーマ　「生理学と数学的方法」

日　時　　1980年2月18日(月)午後1時～5時

1980年2月19日(火)午前9時30分～午後4時

場　所　　国立生理学研究所　会議室

次の13の口演が行われた。

1. 膜電位方程式の数学的検討（京大・医・生理　　品川嘉也）

演者は昨年度にも当シンポジウムにて，同様の口演を行っているが，内容はその後のいちじるしい発展についての解説であった。すなわち，非平衡な状態における膜電位方程式の厳密解が与えられ，その性質が種々論じられた。平衡状態における解との比較もなされた。厳密解はHirotaの方法により$\psi' = \alpha + (b-a)\xi^2/(1-C^2\xi^2)$という形で得られた。

2. 生体膜ノイズと非線形ノイズのスペクトル（阪大・基礎工・生物工　佐藤俊輔）

熱運動に由来する熱雑音のスペクトル密度は周波数に依存しないことが知られていたが，最近になって細胞膜に発生する雑音がかなり広い帯城にわたって$1/f$特性を示すことが知られて来た。excess noiseと呼ばれるものである。演者はこの様な周波数依存性をもつ出力を示す非線形回路を工夫した。

3. 神経モデルについて（東大・工学部・計数工学　　南雲仁一）

Hodgkin-Huxleyまたは Caianielloの神経モデルの入力の，大きさに対する周波数応答を調べるとCantor関数となることが，Harmon，南雲，佐藤，吉田，長田などによって明らかにされた。実際の神経細胞においても，入力パルスの大きさ（高さ・幅など）と興奮確率の関係を精密に調べるとCantor性を示すことが予想される。

4. 腎における分泌再吸収のアロステリック理論による解析

（生理研・分子生理研究系　亘　弘）

腎は体液における種々の物質やイオンの濃度を一定に保つよう濾過・分泌・再吸収の三機能をもつ。後二者は能動輸送によって行われ，尿細管上皮細胞膜の receptor との結合が最初のステップである。分泌または再吸収のみが行われるP- アミノ馬尿酸とブドウ糖を例として，アロステリックモデルによる解析が行われた。グルコースの受容体について，4量体であることがわかり，3分子結合するまではR状態，4分子結合するとT状態に遷移することが判明した。

5. 逆拡散法による時系列解析 ── S基DNA合成速度変化のフローマイクロフルオロメトリーによる解析

（山口大・医・病理　高橋　学）

Flow cytometerは細胞をそのDNA量によって，通常30～40 channelsに区分して頻度分布f(j)を画くが，実際には染色の不均一性や測定誤差のためf(j)は真のDNA量のまわりに正規分布する。この正規分布に適当な仮定をおくと，測定値から真の頻度分布h(j)が得られる ── 逆拡散法。これをもとにしてDNA合成測度を計算することができる。Flow cytometry 導入以前の Call cycleの観察との比較，他の方法によるh(j)決定の問題点の検討もなされた。

6. 視覚認識と眼球運動の制御機構（基礎生物研・制御機構研究系

安井　湘三）

動く物体を追尾する眼球運動系はサーボ機構として興味深い。標的の方向角θと眼球回転ψとの差$\varepsilon = \theta - \psi$が誤差信号としてCNSに入力されるが，pursuitな追従眼球運動には慣性による予測がみられ，εよりもθそのものが入力信号としてより重要な役割を果している。CNSに再生機構：$\varepsilon + \psi \rightarrow \theta$が内在していることが示唆される。再生機構に関してはSherringtonの inflow 説よりも Helmholtz の Outflow 説が断然有利で後者に従って組み立てたモデルは種々の現象をよく説明した。定量的な解析によれば再生利得は約60%であった。

7. 中枢神経系における時系列からの情報抽出（名工大・情報工学

石井　直宏）

神経系の電気活動の時系列，神経インパルス列や脳波などから情報を取り出

し，神経系の機能や状態を推定することを目的として，以下の方法論が論じられた。(1)神経インパルス時系列の平滑化操作 ── なるべく少い加算回数で雑音成分を減少させる。(2)神経情報に含まれる位置および速度成分 ── 応答が両成分の合成ならば適当な方法で両者を分離できる。(3)非定常な脳波時系列からの情報の抽出 ── セグメンテーションを行い各セグメント毎にスペクトル解析する方法，カルマンフィルタによる方法など。

8. 更新過程とその生理学への応用（名大・医療短大・数学　伊藤　嘉房）

複数のencoding sites をもった求心性神経，dendrites や soma に複数のsynapse をもったneuron などにあっては，複数の更新過程が相互作用して出力となる。その出力も多くの場合，axon reflex などにより再び更新過程となる。これを適当な仮定のもとで解析分解すれば各 encoding site や synapseへの入力の性質を知ることができる。種々のcases における解析の方法が述べられた。最近，i.i.d. 成分に分解可能な更新過程がポアソン過程に限られることが判明したことも，合せて報告された。

9. Retino-tectal Conjunction の形成について

（京大・理・生物々理　　岡部　秀彦）

Retina と Tectum の間にどのような mechanismによってあの精妙な結合が作られるかは，興味をそそられる問題である。演者は，物質勾配説に基いて，結合の mechanism を考えた。モデルは optic fiber の先端の膜に存在し，[Ainside] と[Aoutside] の差に対して switchingできる allosteric enzyme である。計算の結果によれば20区間の一対一投射に，数百倍の濃度差を要するが，視覚学習による結合のrefinement を考えれば，発生の段階ではこれで十分のように思われた。このモデルがgrobal な gradient から各細胞にlocal なpolarity を誘導する手段を与えることも見出された。

10. 細胞分裂の数理的アプローチ ── 分裂装置形成方向の予言

（京大・理・数学　　土居　洋文）

演者は細胞の核の位置や分裂面を正確に予言する法則を固有方程式

$(\partial^2/\partial x^2 + \partial^2/\partial y^2)u = -\lambda u, \quad u = 0 \text{ on } \partial\Omega$

によって与えた。以下においてこの方程式のｉ番目の固有値に属する固有函数を第ｉモードとよぶ。結果は(1)分裂装置は第２モードの最大点 ── 最小点方向

に形成される。(2)休止期における核の位置は第1モードの最大点に一致する，などである。これらは細胞の形Ωが半円，扇形，三角形など種々の形をとる場合の等分裂に適用される。

11. 神経場の方程式とコラム構造の形成（東大・工・計数工学

甘利　俊一）

神経系では多くの部位で神経場の間に位相的結合がみられる。神経場が微小領域を単位としている場合には，各単位が位相結合の対象となる。昨年報告された神経系の自己組織理論を適用し，このような離散的位相結合形成についての数学的理論が詳細に議論された。神経場Yから同Xに可塑的シナプス結合があるものとすれば，

$$\tau' \frac{\partial u(x,t)}{\partial t} = -u + \int s(x,y)a(y-y')\,dy + \int w(x-x')\,1[u(x',t)]dx' - S_0(x) - h$$

がXの興奮を支配する方程式となる。これをシナプス荷重についての学習方程式と連立させ解の性質を調べたところ，入力の広がりa(y)が平均的に大きい場合，連続的な結合は不安定となり，微少領域に分割された離散的結合が形成されることが判明した。

12. 網膜細胞の受容野の解明について（基礎生物研・制御機構研究系

中　　研一）

Wienerの非線形理論の生理学への導入の口火を切った演者は，これ迄の歴史を振り返ったあと，現時点でこの方法に3つの問題があるとした。(1) Wiener核と Weber-Fechnerの法則，Michaelis-Menten の法則との関係，(2)パラメーター方式の解析法との関係，(3) Wiener式解析法の将来の発展。(1)については，特に高次核について今後に問題が残る。(2)については，折中モデルの有効性が考慮されるべきである。(3)については，安井による白色雑音の時空間への延長，Shapley による実用化などに将来の方向が示唆されている，とした。演者は，最後に，最近ようやく生理学者からの初期拒否反応がなくなり今後は安心してこの有効な方法も生理学に応用できるようになった，と締め括った。

13. 生体非線型システムのヴォルテラ表現とその実現

（豊橋技大・情報工学　臼井　支朗）

ボルテラ汎関数級数は非線形系の一般的記述法として意義のあるものであるが，核の決定法など実際に生体システムに応用するための具体的アルゴリズムに欠けていた。演者は以下のような方法で，実入出力データからボルテラシステムを実現できる具体的数値計算可能なアルゴリズムを導いた。すなわち，ボルテラ核を最小二乗法によりラゲール正規直交展開し，その係数をSmith などの直列展開アルゴリズムに乗せる。適当な例について低次の核を計算し，旨く推定されている事を示した。

抄　　録　膜電位方程式の数学的検討

品川　嘉也（京大・医）

膜電位式の解法としてこれまでよく使われて来たのは，局所的電気的中性の仮定と定電場の近似であるが，君塚[1]も指摘しているようにCoulomb の法則によれば，局所的電気的中性の条件では電場も電位も発生しないことになる。定電場の近似も，外部電場の存在と局所的電気的中性から導れるから，膜によって電場は発生しないと仮定するのと等価である。実際に，膜電位の基本方程式であるNernst－Planck－Poissonの微分方程式を厳密に解くと，定電場あるいは局所電気中性の仮定のもとでは膜は電場を発生しないことが証明される。[2)3)]

Coulomb の法則は，電場は荷電体によって発生すると述べている。これを一般的に表わすとPoisson方程式

$$\frac{d^2\psi}{d\xi^2}=-\theta-\sum_{k}^{n}\zeta_k\rho_k \qquad (1)$$

となる，ただし(1)式は無次元で書いてあり，$\psi=FV/RT$ は換算電位（Vが電位，F，R，Tは通常の熱力学的意味），ξ はDedye 単位で測った膜の法線方向の距離，θ は膜に固定された電荷，ρ_k は膜を透過するイオンの濃度で，何れも全イオン濃度に対する比で表わされる，ζ_k はイオン価である。(1)式右辺を0とおくと，いたるところ電気的中性を意味する，それを積分すると$\psi'=\alpha$（定電場の式）が得られるがαの値は境界条件によって外部から与えられ，膜自体は電位を発生しない。これが定電場の物理的意味であり，膜の分極によっ

て電位を生ずる細胞膜には定電場式は使えない。膜電位は(1)式とNernst－Planckの式

$$S_k = -\frac{d\rho_k}{d\xi} - \zeta_k \rho_k \frac{d\psi}{d\xi} \qquad (k = 1, 2, \cdots\cdots n) \qquad (2)$$

を連立させて解けばよい，S_kは無次元のイオン流束である。われわれはこの連立方程式の平衡時の解析解を求め，解の爆発が存在することを示した。[4] 非平衡のときも級数解[2)3)]により爆発解の存在が示される。今回はHirota[5]の有理関係数解の方法により

$$\psi' = \alpha + \frac{(b-a)\xi^2}{1-c^2\xi^2} \qquad (3)$$

の形の厳密解を得たので報告する。パラメータの物理的意味は代入によって容易に求められる。

(1) 君塚英夫　膜，4,347 (1979).
(2) Y. Shinagawa, J. theor. Biol. 83 in press (1980).
(3) Y. Shinagawa, J. theor. Biol. 81, 333 (1979).
(4) Y. Shinagawa, J. theor. Biol. 72, 603 (1978).
(5) R. Hirota, J. Phys. Soc. Japan, 46, 312 (1979).

生体膜ノイズと非線形ノイズのスペクトル

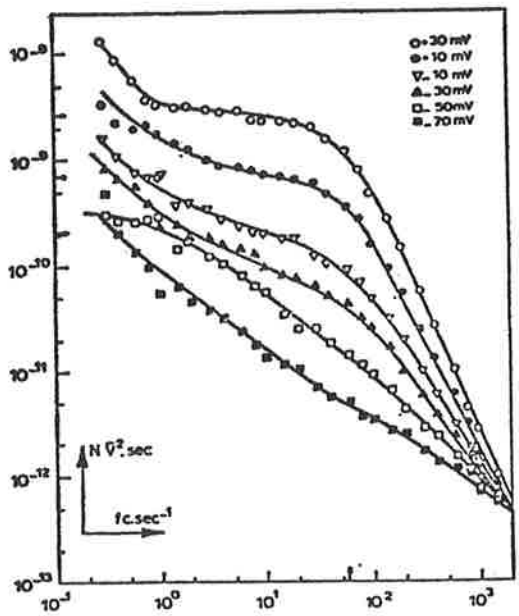
佐藤　俊輔（大阪大・基礎工）

Ⅰ．水中で花粉粒子がジグザグの運動をすることがBrown によって発見されたのは，1928年のことである。Einstein は，この現象が水の分子と花粉粒子とのランダムな衝突によっておこると解釈し，粒子の時刻tにおける変位の分散が，$x^{-2} = 2Dt$，$D = kT/6\pi a$に従うことを導いた。ここで，kはボルツマン定数，Tは絶対温度，ηは水の粘性係数，aは粒子の半径である。一方，微弱な光や音を光電管やマイクロホンを使って電流にかえて測定しようとするとき，その電流が測定回路を通る間に雑音が混入する。この雑音は主として入力抵抗の熱雑音であって光や音の信号の検出の限界はこれによって決ってしまう。熱雑音の大きさを分散σ^2で表わすことにすれば，$\sigma^2 = 2RkT$ となることが導かれる。ここでRは入力抵抗の値である。熱雑音は荷電粒子が導体内で熱運動

をすることにより生ずると考えられる。Nyquist は導体内における荷電粒子の熱運動を理論的に考察して，そのスペクトル密度が，S(f)＝4kTReZ に従うことを導いた。ここで ReZ は導体のインピーダンスの実数部分である。Einstein の公式や Nyquist の公式は粒子が熱平衡状態にあると仮定して導出される。そしてS(f) はReZ以外は周波数に依存しない。そこで物理学ではこの種のノイズをホワイトノイズと呼んでいる。

電気的測定技術が神経生理学に応用されるようになって新しい型のノイズが測定されるようになった。それは主として細胞膜において測定されるノイズである。例えばVerveen & Derksen はカエルの神経線維のランヴィエ節で電気的ノイズを測定しそれが熱的ノイズのレベルよりはるかに大きな値をとることを示した。従ってホワイトノイズとは全く異った過程が関与していると考えられる。Verveen はこの種のノイズ（＝熱的ノイズとは異ったメカニズムで発生し，それよりもはるかに大きなレベルをもつノイズ）を excess noise と呼んだ。excess noise のパワースペクトルをしらべてみると，かなり広い帯域にわたって $1/f$ 特性を示すものが多いことも分った（図１）。この種のノイズはその後自然界のいろいろなところで発見されるようになった。「$1/f$ 特性を示す excess noise の源は一体何か？」（Verveen & DeFelice [1]）．発生のメカニズムについてはいくつかの考え方が提案されている。それは[1]にまとめられているが，決定的な理論ではないようだ。

図１



Voltage noise spectra of a frog node of Ranvier at different levels of membrane potential. (From Siebenga *et al.*, 1973.)

II. この節では「excess noise の発生機構は？」を念頭におさながら非線形ノイズのパワースペクトルについて考えてみたい。ここでは非線形ノイズとして，相関関数が，$\alpha(\tau)=e^{-\lambda\tau}$ である定常ガウスノイズを記憶のない非線形素子に入力させたときの出力だけを考えることにする（図２）

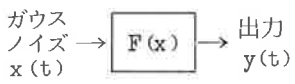


図２

Wienerの非線形ノイズの表現理論を応用すると，まず入力のガウス過程 x(t) は

$$x(t)=\int_{-\infty}^{t} g(t-s)\alpha\mathcal{G}(s),\ \int_{o}^{\infty} g^2(t)dt=1 \qquad (1)$$

とかける。ここで$\mathcal{G}(t)$はウィナー過程で，$g(t)$，$t\varepsilon[o,\infty]$は線形系のインパルス応答関数である。出力は

$$y(t)=F(x(t))=F\left(\int_{-\infty}^{t} g(t-s)\alpha\mathcal{G}(s)\right)$$

であるが，ウィナー過程の性質をつかって

$$y(t)=Fy(o)+\sum_{n=1}^{\infty} Cn\int_{-\infty}^{t}\cdots\int g(t-s_1)\cdots g(t-s_n)\,\alpha\mathcal{G}(s_1)\cdots\alpha\mathcal{G}(s_n) \qquad (2)$$

$$(S_1, S_2, \cdots S_n)\ :d:st.$$

と書ける［2］．ここで$\{Cn\}$は関数$F(x)$のHermite展開係数である。

$y(t)$の相関関数を$\gamma y(\tau)$とすると

$$\gamma y(\tau)=Fy(t)y(t+\tau)=\sum_{n=1}^{\infty} n!\,Cn(\gamma(\tau))^n \qquad (3)$$

が導かれる（この公式はVan Vleckが別の方法ですでに導いている［3］）

Wiener−Khinchineの公式から出力のパワースペクトル密度$S(\omega)=S(2\pi f)$は，

$$S(\omega)=\frac{1}{\pi}\sum_{n=1}^{\infty} n!\,C_n^2\frac{n\lambda}{\omega^2+(n\lambda)^2} \qquad (4)$$

となる。ただし，$\gamma(\tau)=e^{-\lambda|\tau|}$とした。

A. $F(x)=e^{ax}(a>o)$ ダイオード特性

$$\gamma y(\tau)=e^{a^2}\left(e^{a^2\gamma(\tau)}-1\right)$$

$$S(\omega)=\frac{e^{a^2}}{\pi}\sum_{n=1}^{\infty}\frac{a^{2n}}{n!}\frac{n\lambda}{\omega^2+(n\lambda)^2} \qquad (5)$$

B. $F(x)=x,\ x\geqslant o;\ o,\ x<o$　　閾特性

$$S(\omega)=\frac{1}{4\pi}\frac{\lambda}{\omega^2+\lambda^2}+\frac{1}{2\pi^2}\sum_{m=1}^{\infty}\frac{((2m-3)!!)^2}{(2m)!}\frac{2m\lambda}{\omega^2+(2m\lambda)} \qquad (6)$$

C. $F(x)=1\quad x\geqslant o;\ o,\ x<o$　　クリッパ

$$\gamma y(\tau)=\frac{1}{\pi}\ \text{anc sin}\ \gamma(\tau)$$

$$S(\omega)\ \frac{\lambda}{2\pi^2}\sum_{n=0}^{\infty}\frac{(2n-1)!!}{(2n)!!}\frac{1}{\omega^2+((2n+1)\lambda)^2} \qquad (7)$$

$\omega\gg\lambda$のとき，$S(\omega)\sim\omega^{-\frac{3}{2}}$であることが証明できる。

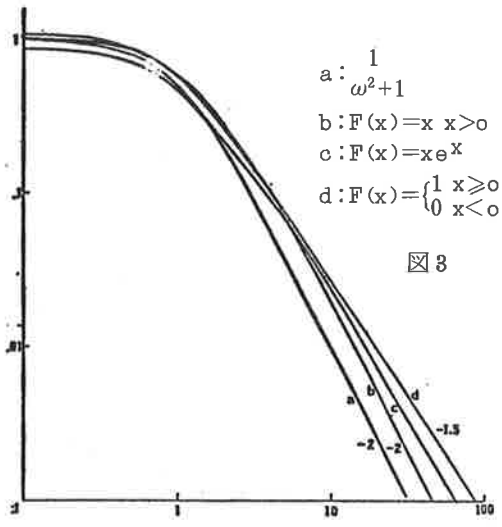


図3

D. $F(x)=\log x$ $x\geqslant 1$; o $x<o$, あるいは, $F(x)x^n e^{ax}$ $x\geqslant o$; o $x<o$, についても計算できるが省略する。

E. $F(x)=x^{\alpha}$, $x\geqslant o$; o $x<o$ ($o<\alpha<1$) についても計算できるが, 結果は (S(ω) の形は) 複雑である。この関数は $S(\omega)\sim\omega^{-1-\beta}\omega\gg\lambda$, $o<\beta<1$ を与えるようだ。

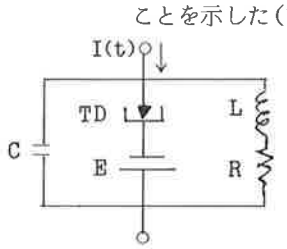
これらの非線形回路の出力のスペクトルを図3に示した。$\gamma(\tau)=e^{-\lambda(\tau)}$ (ガウス・マルコフノイズ) に対しての出力のスペクトルの限界は $f^{-\frac{3}{2}}$ であるように思われる。

[1] Verveen, A. A. et al: Progress in Biophy & Mol. Biol. 28 191-265, 1974.
[2] 磯部他：信学技報 MBE 79-46, 1979.
[3] Rice, S. O.: in Noise & stochastic Process (ed. Wax) Dover, 1954.

神経モデルについて

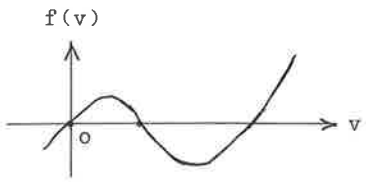
南雲 仁一 (東京大・工)

1. 数学的な神経モデルには二つの系統がある。そのひとつは Hodgkin-Huxley のモデル (1952) を源とするもので, 微分方程式で記述される。このモデルは, 本質的に実験式なので, 実験結果とは定量的によい一致を示すが, 数学的な見通しは良くない。そこで FitzHugh は, 実験と定性的な一致が見られる範囲内でも最も簡単な数学モデルとして, BVPモデルを提案した (1961)。いっぽう, 南雲・有本・吉沢は, トンネルダイオードを用いた単安定回路より成る神経モデルを提案し, 空間固定の場合にはこれはBVPモデルと等価であることを示した (1962)。図1参照。



$$\begin{cases} I(t)=\dfrac{dv}{dt}+f(v)+w \\ \dfrac{dw}{dt}=-\gamma w+bv \end{cases}$$

$\gamma\geqq o$, $b>o$



もうひとつの系統は，McCulloch-Pitts の神経モデル (1943) を源とする 2 値のモデルである。神経細胞は不応期をもつ閾素子とみなすことができる。Caianiello，De Luea は，不応性の影響が時間とともに指数的に減衰する形式を仮定し，離散時間を用いて神経細胞の刺激応答関係をつぎのようにモデル化した (1961, 1966)。

$$x_{n+1}=1[An-\alpha \sum_{r=0}^{n} b^{-r} x_{n-r}-\theta] \qquad (1)$$

ここに $1[x]=1(x\geq 0)$，$=0(x<0)$。x_n=時刻nにおける神経細胞の状態で，この系の出力。0は静止状態，1は興奮状態を表わす。An＝時刻nにおける入力刺激の大きさで，一定 (An＝A) とする。θ=閾値．$\alpha>0$．$b>1$.

2. Harmonは，神経モデルとしてトランジスタの単安定回路を提案した(1961)。このモデルはいうまでもなく第1の系統に属するものである。この回路に一定の大きさ（aとする）のパルス列を入力し，それに応ずる平均興奮率（Fとする）を測定すると，aとFとの関係は極めて複雑であって，図2のような“異常な”ものになる。

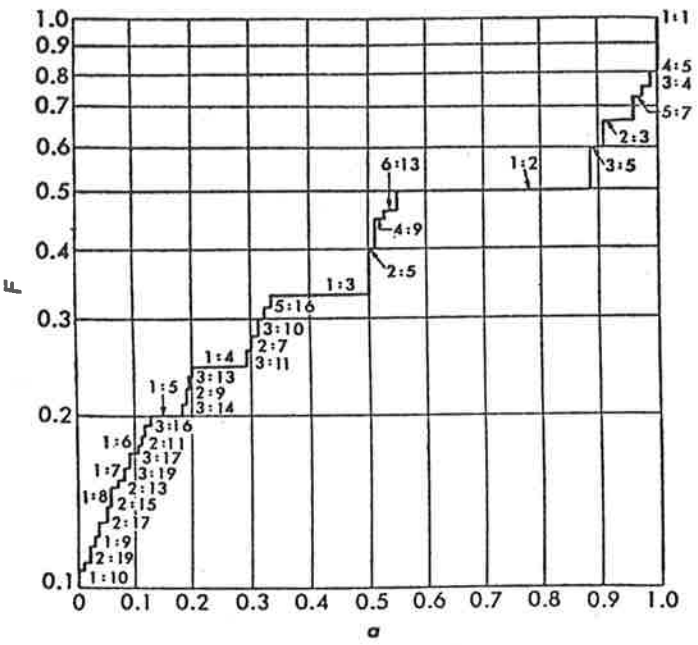


図2

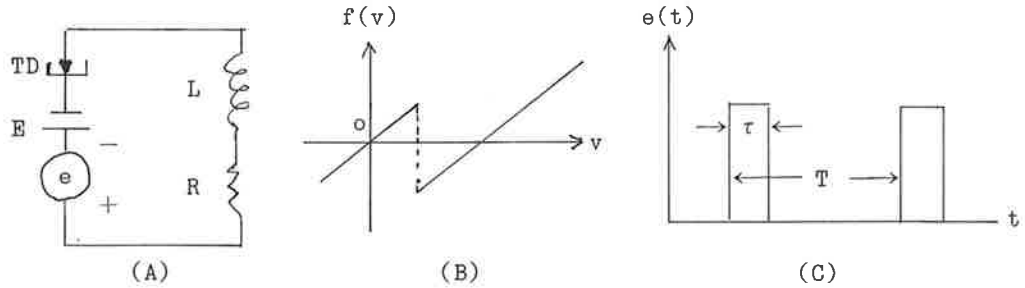
南雲，佐藤は，図2の関係を説明するために，Caianiello の神経モデル (1) から出発して，関数F (a) はCantor 関数（を拡散した関数）であることを示した (1972)。この結論はHarmon の実験結果を極めてよく説明するが，Harmon のモデルと Caianiello のモデルとの関係がいまひとつ明確でないのが弱点である。

なお，吉田は，{An} が周期2および3の周期関数の場合について同様な結論を導いた (1978)。増田は，F(a) が真の Cantor 関数になるような不応性について調べた (1975)。

3. 長田は，図1の神経モデルをさらに簡単化したモデル図3 (A) について，

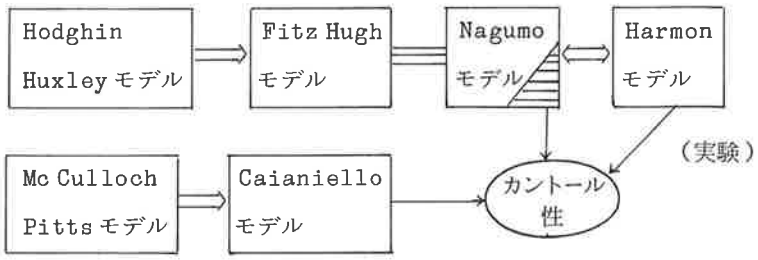
その刺激応答特性を調べた(1979)。ここでトンネルダイオードの特性は同図(B)とし，入力は同図(C)に示す電圧パルスとする。入力パルス幅と平均興奮率との関係は，やはり拡張されたCantor関数になることが示される。また，入力パルスの高さを変えたときにも同様な結論が得られる。

図3



4. 以上の諸結果をまとめると，図4のようになる。

実際の神経細胞においても，入力パルスの大きさ(高さ，幅など)とこれに応ずる平均興奮率との関係を精密に計測すれば，カントール性を示すことが予想される。



文　献

(1) Mc Culloch, W. S., Pitts, W.: Math. Biophys., 5, 115-133(1943).
(2) Hodgkin, A. L., Huxley, A. F.: J. Physiol., 117, 500-544(1952).
(3) Caianiello, E. R.: J. Theoret. Biol., 1, 204-235(1961).
(4) Fitz Hugh, R.: Biophys. J., 1, 445-466(1961).
(5) Harmon, L. D.: Kybernetik, 1, 89-101(1961).
(6) Nagumo, J., Arimoto, S., Yoshizawa, S.: Proc. Inst. Radio Engineers, 50, 2061-2070(1962).
(7) Caianiello, E. R., De Luca, A.: Kybernetik, 3, 33-40(1966).
(8) Nagumo, J., Sato, S: Kybernetik, 10, 155-164(1972).
(9) 増田　正：電子通信学会技術研究報告，NLP75-18(1975).
(10) 吉田利信：電子通信学会論文誌D，61, 276-281(1978).
(11) 長田弘康：電子通信学会技術研究報告，NLP79-14(1979).

亘　　弘（生理研）

腎は生体内種々の物質やイオン濃度を一定に保つように濾過・分泌および再吸収の機能を持つ（図１）。後二者は能動輸送で行われるが輸送される物質は尿細管上皮膜細胞上にある受容器と結合し，次いで上皮膜細胞にとりこまれる。分泌のみ行われるＰ－アミノ馬尿酸，再吸収のみ行われるブドー糖を例としてアロステリックのモデルを用いて解析を試みた。

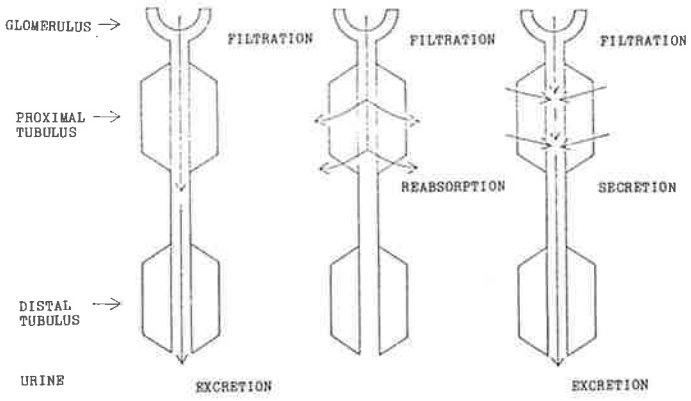


図１　腎の三大機能

腎に這入る動脈の血漿流量をRPF litre／min，物質の動脈血漿中濃度をQtaoal moles／litre，腎静脈血漿中濃度をPv moles／litre とし，尿量をV litre／min，尿中濃度をU moles／litre とするとき，尿への輸送量UV moles／min は

$$UV = RPF(Q_{total} - Pv) \qquad (1)$$

である。濾過の部分を除くため，濾過流量をGFR litre／min とし尿細胞での輸送量をT moles／min とすると，

$$T = (RPF - GFR)Q_{total} \qquad (2)$$

再吸収の場合，尿細管より再吸収されるが，(2)式でRPFを０とおく。TはQtotalが０のとき０で，∞のときTmに達するような関数を用いればよい。Qを遊離の濃度，Stotalを受容体の濃度，Nを最大結合数とすると

$$Q_{total} = Q + N \cdot S_{total} Y \qquad (3)$$

の関係があり，これの微分と式(2)とより次の関係が得られる。

$$\frac{T_m}{RPF - GFR} = \frac{1}{\left(\frac{dY}{dQ}\right)_{max}} + N \cdot S_{total} \left\{ = \frac{1}{\left(\frac{dy}{dQ_{total}}\right)_{max}} \right\} \qquad (4)$$

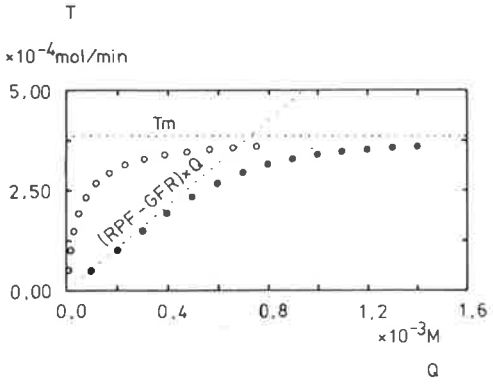


図2　パラアミノ馬尿酸の分泌
○はPittsのデーター
●は式(3)を用いて計算したもの
実線はシュミレートしたもの

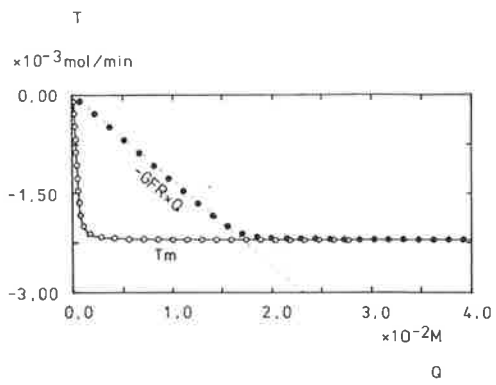


図3　グルコースの再吸収
○はPittsのデーター
●は式(3)を用いて計算したもの
実線はシュミレートしたもの

Pittsのデータを図2，3の白点としてPlotしたが，N・S totalを仮定し式(3)を用いて図2，3の黒点としてplotした。これは飽和度曲線となっている。アロステリックのモデルを用いて

$$\begin{array}{ll} \overset{K_R}{} & \overset{K_T}{} \\ R_0+Q=R_1 & T_0+Q=T_1 \\ R_1+Q=R_2 & T_1+Q=T_2 \\ \cdots\cdots\cdots\cdots & \cdots\cdots\cdots\cdots \\ R_{N-1}+Q=R_N & T_{N-1}+Q=T_N \end{array}$$

$$R_i \overset{L}{\rightleftarrows} T_i \quad (i=0,1,2,\cdots\cdots,N),$$

$$R_i \xrightarrow{K_3} R_0+iA\ (i=1,2,\cdots\cdots,N) \qquad T_i \xrightarrow{K_3} T_0+iA\ (i=1,2,\cdots\cdots,N)$$

のようなモデルを考える。$T_0=LR_0$，$R_i=R_0\binom{N}{i}\left(\frac{Q}{K_R}\right)^i$，$T_i=T_0\binom{N}{i}\left(\frac{Q}{K_T}\right)^i$ で，K_R，K_T は微視的な解離定数である。輸送量Tと最大輸送量Tmは

$$T=K_3\left(\sum_{i=1}^{N} iR_i+\sum_{i=1}^{N} iT_i\right) \qquad T_m=K_3N\left(\sum_{i=0}^{N} R_i+\sum_{i=0}^{N} T_i\right) \text{で} T=\frac{J}{I}\alpha T_m$$

$$=K_3NR_0J\alpha, \qquad =K_3NR_0I, \qquad \text{が得られる。}$$

ここに$c=K_R/K_T$，$\alpha=Q/K_R$　$I=L(1+c\alpha)^N+(1+\alpha)^N$．$J=Lc(1+c\alpha)^{N-1}+(1+\alpha)^{N-1}$．である。

図2,3の黒点の modified Hill plotを行った。その結果P－アミノ馬尿酸に対してHill定数1.0，解離定数5.61×10^{-5}Mが得られたが，グルコー

スに対しては2.42であった。

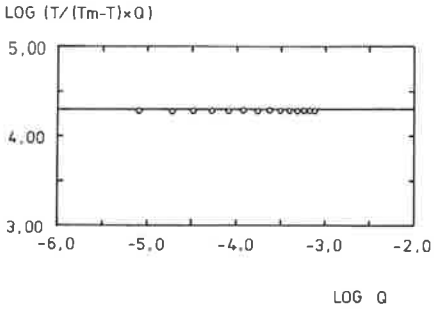


図4　パラアミノ馬尿酸飽和曲線の
modified Hill plot
●は図2の●をplotしたもの
実線はシュミレートしたもの

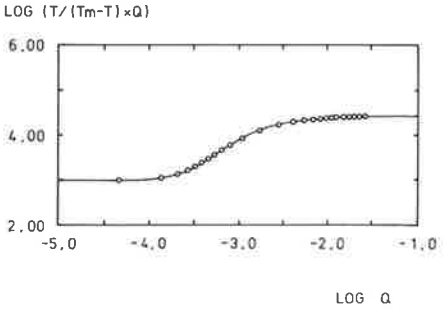


図5　グルコース
●は図3の●をplotしたもの
実線はシュミレートしたもの

グルコースのK_Tは図5の下の漸近線の値から1.05×10^{-3}Mが算出される。LとK_RについてはLとCとを求めるノモグラフ（Watari et al. 1980）を用いてそれぞれ3.0×10^{7}, 5, 0×10^{-6}が得られた。これらのアロステリック定数を用いてシュミレートしたものを図2, 4及び図3, 5に実線として示した。

グルコースの受容体は4量体であることがわかったがグルコースが3分結合するまではR状態であり4分子結合した時にT状態に遷移することが示された。

S期DNA合成速度のflow microfluorometryによる解析逆拡散法による解析

高橋　学（山口大・医）

Cell cycleの解析においては，細胞分裂から次の分裂に至る一周期をG1, S, G2, Mの4期に分け，各期の長さ（平均と分散）を求めることが基本的問題となっている。従来の解析法はautoradiographyの技術を基礎とし，DNA合成期（S期）に^{3}H-thymidineで標識された細胞のcell cycle進行を経時的に観測することにより得られるデータを用いたが，近年flow cytometryの技術が導入され，[(1)]細胞懸濁液中の各細胞のDNA量を電子器機の速度（<1msec/cell）で測定可能となったことに伴って，実験法が根本的に変わりつつあり，データとしては蛍光染色された核内DNAのfluorescence intensityの分布を主として用い，データ解析に際しては，DNA量の多い細胞ほどS期により深く進行している細胞とし，「量と時間を対応づける」立場

を取ることとなる。

本研究は数学的というよりは数値解析的であり，指数増殖の細胞集団を対象とし，上記データから，(1)G1, S, G2M の各期に分布する細胞数の比率，(2)S期の各DNA量に達した時点におけるDNA合成能を算出するアルゴリズムについて述べ，更に (3)Perturbed cell populationの解析について考察を加えたい。

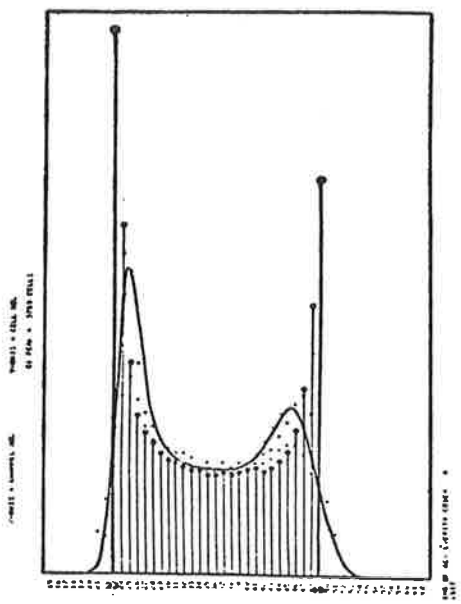
〔1〕 DNA分布の解析

Flow cytometer は細胞をそのDNA量（正確にはfluorescence intensity）によって通常30～40 channels に区分して頻度分布f(j) を画くが，分布曲線は左右端で際立って高いPeak を示す（Fig.1)。それはG1及びG2Mにおいて DNA量は一定値にとどまり，同一channelに多数の細胞が入ることになるからである。但し，染色の不均一性や測定誤差のためf(j)は真のDNA量のまわりに正規分布する。そのCV(coefficient of variation)は各channel i に共通と仮定して，DNA量の（真の）histogram h(i)を再構築する問題を扱う。f(j)は

$$f(j)=\sum_{i=1}^{k} p(i,j)h(i)$$

但し，$p(i,j)=\frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}}\exp[-\frac{1}{2\sigma^2}(j-i)^2]$

によってsimulate される。問題はiterative curve fitting により，実験的に与えられたfluorescence intensityの分布にf(j)が最も近くなる様なh(i) を求めることに帰着する。



従来の解析法は二種類に大別出来る。その一つはDean & Jett(1974)の方法であるが，[2] これはS期細胞のDNA分布は二次曲線で書き表わすことが出来ると前提している（従って，DNA合成速度変化

の様式を実験的に決めることは初めから放棄している）という難点があり，一方 Fried(1976)の方法においては，[3]各 channel の細胞数を自由に変えることが出来るが，h(i) が最適値に近づくと，突然発散を起すため，主観的判断に基づいて iteration を中断しなければならないという問題がある。彼は gradient method を使っており，最適化すべきパラメータの数が多い（channel 数と同じ）こともあって，Hessian matrix が0に近づくためと推定される。

DNA histogram の解析という特殊問題に関しては，orthognal search method が最も適当である。h(i) を実測値に近づけるが，CV が小さい限りにおいて，その近くの channel における f だけが影響を受けるので，一旦 f(i) が実験値に近づけば，以後 i 番目近くの h を変化させない限り h(i) をさわる必要はなく，最適化のサイクルは急速に進行する。h(i) 調製の具体的手法について述べ，また解析結果を示す。h(i)，$\sum_{i=2}^{k-1} h(i)$ 及び h(k) がそれぞれ G1, S, G2M 期の細胞数に相当する。

〔2〕 DNA 合成速度の計算

DNA histogram（横軸は DNA 量を示す channel number i，縦軸はその channel における細胞数 h(i)）から，各 channel i に属する subpopulation の DNA 合成能 λi を i 番目から（i＋1）番目の channel への遷移確率密度とする時（即ち，$\triangle t$ の間に h(i) 個の細胞のうち $\lambda i\, h(i) \triangle t$ が DNA 合成により（i+1）番目の channel に移行するものと仮定すると，充分大きな t に対して，下記の compartmeut 方程式が成立する。[4]

$$\frac{d}{dt} h_i(t) = \lambda_{i-1} h_{i-1}(t) - \lambda_i h_i(t) \qquad (i = 2, 3, \cdots\cdots, k)$$

但し，$\frac{d}{dt} h_1(t) = 2\lambda_k h_k(t) - \lambda_1 h_1(t)$

これに，$\alpha = \frac{1}{hi(t)} \frac{d}{dt} hi(t)$ と $r_i = \lambda i / \alpha$ を代入すると，

$$r_i = \left(\frac{hi-1}{hi}\right) r_{i-1} - 1 \qquad (i = 2, 3, \cdots\cdots, k)$$

但し，$r_1 = 2 \left(\frac{hk}{h1}\right) r_k - 1$

が得られる。α は相対成長速度，ri は channel i にのける相対的 DNA 合成能を表している。従って，指数増殖系において α，h_1，h_2 ……，h_k を算出すれば，それから，λ_1，λ_2 ……，λ_k が求められる。

$$\lambda_1 = \left(\frac{2}{h_1} \sum_{i=1}^{h} hi - 1\right)\alpha$$

$$\lambda i = \left(\frac{hi-1}{hi}\right)\lambda_{i-1} - \alpha \qquad (i = 2, 3, \cdots\cdots, k)$$

〔3〕 Perturbed cell populationの解析

上記の如く，λiが求められると，compartment 方程式を利用してPer-turbed cell populationの解析に途が拓かれることとなるが，指数増殖でない場合には状態遷移をPoisson 過程と見做し得ないという問題点を生じる。

〔4〕 文 献

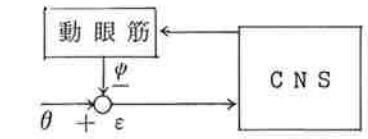
(1) Kamentsky, et al：Science 150, 630(1965).
(2) Dean & Jett：J. Cell Biol. 60, 523(1974).
(3) Fried：Comput. Biomed. Res. 9, 263(1976).
(4) Takahashi：J. Theoret. Biol. 18, 195(1968).

視覚認識と眼球運動の制御機構

安井　湘三（基礎生物研）

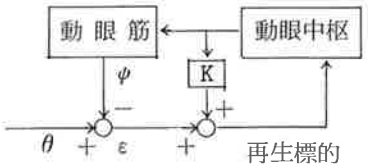
動く物体を追尾する眼球運動系は生体サーボ機構として興味深い。そのサイバネティックス的観点の土台を図1aに示す。標的の方向角θと眼救回転角φとの差ε＝θ－φは網膜中心窩からの「ずれ」となり，誤差信号としてCNSに伝達される。ε＝θ－φはレンズを介した幾可学的事実関係で，これで負帰還ループが閉じる格好となる。本題はブラックボックスCNSを理解することであり，数多くの実験やモデルが報告されて来た。本稿で要約する研究[1], [2]では，従来のmechanistic な制御工学的思考に心理物理学上の概念を結合した仮説を立て，それを支持する実験結果をヒトについて得た。なお追従眼球運動はSaccadic とpursuit の支配神経路を

図1a



網膜像

図1b



再生標的

異にする二成分を有すが，本研究は動きがスムーズで標的の速度に応答する pursuit 成分を対象とした。図1bに仮説を示す。網膜誤差信号εは動眼中枢へ直接には入力されないと先ず考える。この主な根拠は，1.強制的に変位した眼球を急に解放すると，静止標的の像は網膜上を大きく移動するのに，眼球はその慣性から予測される受動的回転運動に近く，εはあまり効いていない,(3) 2.ヒト追従眼球運動の周波数特性は標的の運動の規則性と共に顕著に向上し，正弦波等の場合は未来軌跡が予測されているような印象さえ受ける。(4)このような入力適応能力が，動作範囲が狭く非線型性やノイズのため不規則になり勝ちな誤差信号εに依存しているとは考え難い。これらの事実から，網膜誤差$\varepsilon = \theta - \psi$よりも標的運動$\theta$そのものが動眼中枢の入力信号としてより重要な役割を果していると思われる。これにはCNSで$\theta = \varepsilon + \psi$によって$\theta$を再生する機構を必要とするが，その存在は心理物理で示唆されている。例えば目を動かしても静止した物は静止して見える（網膜像は動いているにもかかわらず）。逆に，動く物を目で追うとき網膜像の動きは微小な揺れだが，標的は現実通り動いて見える。CNS再生式$\theta = \varepsilon + \psi$の$\psi$は動眼筋に実存する伸張受容器からの帰還信号で与えられるとするSherringtonが主張したinflow説と，Helmholtzがeffort of willと喩えた様に動眼指命が分枝してεに付加されるとするoutflow説とがある。図1bではoutflow方式を採り，指で目玉を受動的に動かす外界はグラグラ動いて見えるが，網膜残像の場合は静止したままである。従ってoutflow説に分がある。動眼中枢に送られるのは再生された標的運動と仮説を立てる。眼筋の動特性は無視可能で，その利得を1と正規化すれば，Kは分技の相対利得を表わす。もしK＝1ならば，分枝が形成する内側の正帰還CNSループと外側の負帰還網膜ループは完全に相殺され，全体は開ループ系となる。

本仮説のテストは前庭性眼振とフラッシュにより網膜中心窩に印加された残像を利用して行われた。被験者は暗室になっている回転椅子キャブに乗る。図2aはコントロール実験に対応し，結果は図3にあるトレースの初めの部分で示される。この場合，視覚刺激は皆無で眼球運動は半規管の正弦波刺激のみに因り，そのスムーズ成分を計算機でつなぎ合わせた軌跡も並示してある。図3の残りの部分を示す本実験は，仮説が正しければ図2bに対応する。残像が印加されると，被験者は残像の動く方向を3位置スイッチで報告しながら，残像の動きを目で追うように指示されている。まず機械的リセットの役目をする眼振の速い成分がほぼ消失する。3位置スイッチで示される残像の見かけの動きの方向は，outflow説の予測通り眼球運動の方向と一致している。眼球運動

スムーズ成分の振中はコントロールに比べて増大している。この傾向は他の前庭刺激周波数についても同様である（図４）。この相違は図２ｂで示すようにoutflow 分枝が関与する正帰還ループが加わったためと解釈される（網膜残光は常にε＝0であるから外側負帰還ループは開）。データを更に定量解析すると分枝利得Kは0.6前後と推定され,[1]正常条件下での標的運動のCNS再生はpursuit系に関する限り約60%で,系全体は負帰還がネットとして効くサーボ体制を保つ。このような部分再生はFilehne illusion, oculogyral illusion, Aubeit-Fleischl paradox等の現象を統一的に説明する。[1]

図２ａ

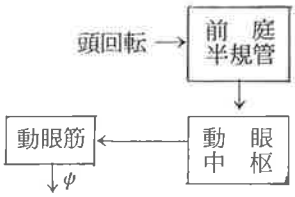
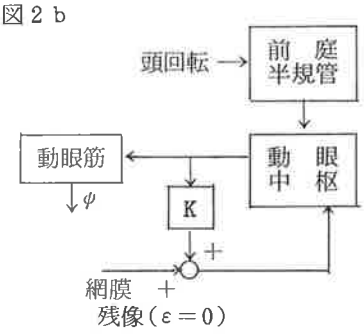


図２ｂ



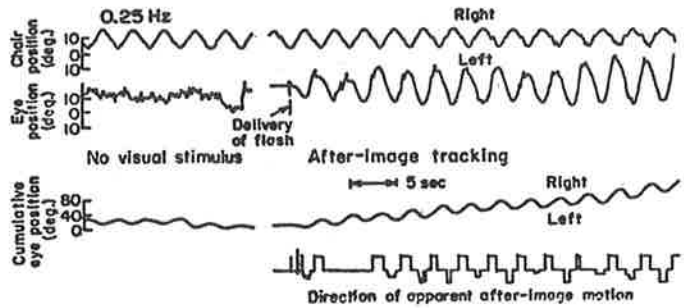


図３

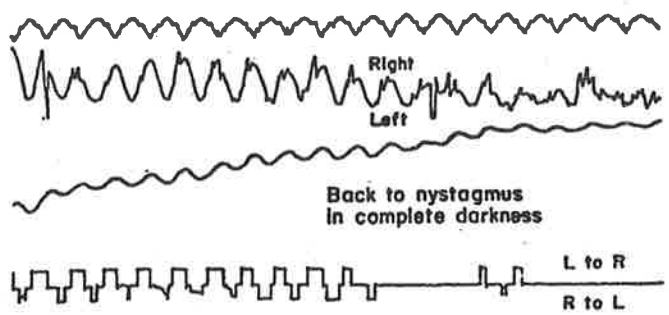
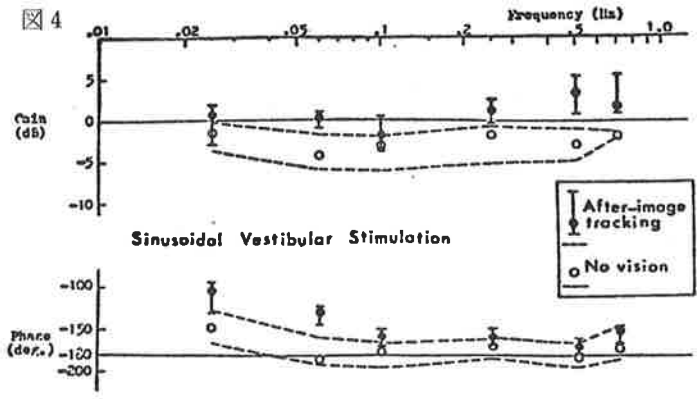


図４



文　献

1. Yasui, S. l Young, L. R., Scieuce, 109：906-907, 1975.
2. Yasui, S. & Young, L. R., Jn Eye Movements and Psychological Processes C Lawreuce Erlbauw Assoc ates), 33-37, 1976.
3. Childress, D. S. & Jones, R. W., J. Phys ol. (Londou), 188：273-284, 1967.
4. Young, L. R. & Stark, L., IEEE Trans HFE-4：38-51, 1963.

中枢神経系における時系列からの情報抽出

石井　直宏（名古屋工業大）

1. まえがき　　神経系の構成要素となる細胞の電気活動の時系列，すなわち神経インパルス時系列や細胞の集合電位として脳波の時系列がある。中枢神経系で，これらの時系列から情報を取り出すことによって，神経系の機能や状態を推定することを目的とする。

はじめに，外界からの正弦波状の刺激が位置および速度成分に分解できることから，神経系の応答としてのインパルス時系列に含まれる位置および速度の成分の割合いを定量的に評価する。次に脳波時系列から脳の状態を推定するため，時系列パラメータの抽出の方法を検討する。

2. （2.1）神経インパルス時系列の平滑化操作　　正弦波状の入力刺激に対し，系の応答としてt時刻のインパルス瞬時周波数をx_{t_1}とする。ただしt_1の1は第1回目の正弦波に対する応答を示す。同様に第M周期目の応答をx_{tM}とすると，Mが十分大きい時の加算平均値は

$$\lim_{M\to\infty}\frac{x_{t_1}+x_{t_2}+\cdots+x_{tM}}{M}=\tilde{x}_t \qquad (1)$$

いま，神経インパルス系列のt時刻の両側指数平滑化関数を次式で定義する。

$$St(x)=\frac{\alpha}{2}\sum_{n=0}^{\infty}\beta^n x_{t-n}+\frac{\alpha}{2}\sum_{n=0}^{\infty}\beta^n x_{t+n},\quad \text{ここで}\alpha=1-\beta \qquad (2)$$

St(x)はz変換により

$$St(z)=H(z)X(z)=\frac{\alpha}{2}\frac{1}{1-(\beta/z)}\quad\frac{\alpha}{2}\frac{1}{1-\beta z} \qquad (3)$$

と表わされ，平滑化関数の特性H(z)がz＝jwφ（φ：サンプリング時間）とおくことによって得られる。(3)式の特性はαの値にかかわらず，位相の遅れ，進みがなく，きわめてよいが，利得のαの小さい値に対し，わずかながら減少する。αの値が小さく，利得も(3)式で，心配な場合，

$$St(x)=\alpha\sum_{n=0}^{\infty}\beta^n x_{t-n}+\alpha\sum_{m=0}^{\infty}\beta^m x_{t+m}-(\alpha^2/2)\sum_{m=0}^{\infty}\sum_{n=0}^{\infty}\beta^{n+m}x_{t-n-m}$$

$$-(\alpha^2/2)\sum_{m=0}^{\infty}\sum_{n=0}^{\infty}\beta^{n+m}x_{t+n+m} \qquad (4)$$

で改良することが出来る。本節の目的は神経インパルス系列の応答の雑音分を

減少させ，かつ応答の加算回数を出来るだけ少なくし，(1)式に近づけるような平滑化のパラメータ α ($=1-\beta$) を算出することである。そのため平均二乗誤差 (MSE) を次のように定義する。$St(x)=\hat{x}_t$ とおけば，(2)式の $St(x)$ に対し，

$$MSE=\frac{1}{T}\sum_t(\tilde{x}_t-\hat{x}_t)^2\simeq E\left(\frac{x_{t1}+x_{t2}+\cdots+x_{tM}}{M}-\frac{\alpha}{2}\sum_{n=0}^{\infty}\beta^n x_{t-n-\tau}\right.$$

$$\left.-\frac{\alpha}{2}\sum_{n=0}^{\infty}\beta^n x_{t+n+\tau}\right)^2=\sigma_x^2+\frac{\alpha}{2}\frac{\sigma_x^2}{(1+\beta)}R_{xx}(k)\,\sigma_x^2+\frac{\alpha^2}{2}\sum_{k=1}^{\infty}(k+2\tau)\sigma_x^2 \quad (5)$$

さらに，

$$\frac{d(MSE)}{(\sigma_x^2)d\beta}\simeq\frac{1}{(1+\beta)^2}\left[-1+(1+\beta)^2\sum_{k=0}^{\infty}\beta^{k-1}\{(k+1)\beta-k\}R_{xx}(k+\tau)+\right.$$

$$\left.\sum_{k=1}^{\infty}\{k-2\beta-\beta^2k\}R_{xx}(k)\right] \quad (6)$$

ここで $R_{xx}(k)$ は神経インパルス系列の遅れKの自己相関関数，σ_x^2 は原点中心とする2次のモーメント。神経インパルス系列 $\{x_t\}$ から(1)式に出来るだけ近似するように(2)式の重み“α”を決定する。

$\frac{d(MSE)}{(\sigma_x^2)d\beta}=0$ より，(6)式の数値計算より α の値が求まる。一般にデータ長が短かければ，S/N 比が大きく，α の値は小さくなる。

(2.2) 神経情報に含まれる位置および速度成分　正弦波状の刺激に対して，生理学的な実験条件から，系の応答がほとんど位置および速度成分から成っている様な場合について各々の成分を抽出するための方法論を展開する。正弦波状の刺激を $\theta(t)$ とおけば，$d\theta(t)/dt$ は，その刺激の速度成分を表わす。$\theta(t)$ の方向性，すなわち左(右) から右(左) への方向に対し応答が強く，右(左) から左(右) へは少ないような場合。また上下方向の入力刺激も同様である。このような応答は眼球運動の際の小脳のプルキンエ細胞の発火様式などに見られる。たとえば，神経インパルス瞬時周波数 $IR(t)$ とおいたときに，ある方向について

$$\left.\begin{aligned}IR(t)&=K(\theta(t)-\theta_0)+R\left(\frac{d\theta(t)}{dt}\right)+\delta(t)\\ \text{他方向について}\ IR(t)&=K(\theta(t)-\theta_0)+\delta(t)\end{aligned}\right\} \quad (7)$$

ここでKとRは係数，$\delta(t)$ は背景活動

の式のモデル化が考えられる。$\theta(t)=a\sin(\omega t-\frac{\pi}{2})$ とすれば，正弦波状刺激の1周期の時間長は $T=2\pi/\omega$ である。神経インパルス系列の瞬時周波数の平滑操作後の値 $IR(t)$ と(7)式のモデル $\widehat{IR}(t)$ の差の平均二乗誤差 (MSE) は

$$MSE=\frac{1}{T}\int_0^T(IR(t)-\widehat{IR(t)})^2dt=\frac{1}{T}\int_0^{\pi/w}\{IR(t)-K(\theta(t)-\theta_0)-R\frac{d\theta(t)}{dt}$$

$$-\delta(t)\}^2dt+\frac{1}{T}\int_{\pi/w}^{2\pi/w}\{IR(t)-K(\theta(t)-\theta_0)-\delta(t)\}^2dt \qquad (8)$$

で与えられる。モデルの式(7)の係数KとRを求めるため，

$$\frac{d(MSE)}{\theta K}=\frac{2}{T}\int_0^{\pi/w}\left[\{IR(t)-K(\theta(t)-\theta_0)-R\frac{d\theta(t)}{dt}-\delta(t)\}(\theta(t)-\theta_0)\right]dt$$

$$+\int_{\pi/w}^{2\pi/w}\left[\{IR(t)-K(\theta(t)-\theta_0)-\delta(t)\}(\theta(t)-\theta_0)\right]dt=0 \qquad (9)$$

$$\frac{d(MSE)}{dR}=\frac{2}{T}\int_0^{\pi/w}\left[\{IR(t)-K(\theta(t)-\theta_0)-R\frac{d\theta(t)}{dt}-\delta(t)\}\frac{d\theta(t)}{dt}\right]dt=0$$

(9)式の連立方程式の解KとRは(10)式の相関関数を計算することによって求められる。

$$\frac{1}{T\cdot Var(\theta(t)}\int_0^{2\pi/w}\{IR(t)-E(IR(t)\}(\theta(t+\tau))dt=K\cos(\omega\tau)+\frac{R}{2}wain(\omega\tau) \qquad (10)$$

よって $K=\dfrac{1}{T\cdot Var(\theta(t))}\displaystyle\int_0^{2\pi/w}\{IR(t)-E(IR(t)\}(\theta(t))dt,$

$$R=\frac{2}{wT\cdot Var(\theta(t))}\int_0^{2\pi/w}\{IR(t))\}\cdot(\theta(t+\frac{\pi}{2\omega}))dt$$

このようにしてKとRが算出できれば，位置および速度成分に対する応答の寄与が求められる。

（2.3） 非定常な脳波時系列からの情報の抽出　脳波の時系列は非定常さがゆえに時間領域周波数領域の情報を取り出す必要がある。意識のレベルおよび睡眠段階を脳波時系列から判定する場合，2つの処理の方法論が考えられる。1つは非定常な全体の脳波時系列を各部分系列が定常時系列となるようにセグメンテーションを行う[2]。次に周波数領域での波形のスペクトルのパタンを抽出する。その後で時間領域の情報を入れて睡眠段階が判別できる[3]という方法である。また他の方法として，カルマン・フィルタ法によって非定常さの検出を行い，ある許容レベルを越したら，それ以前の脳波時系列の波形のスペクトル・パタンを算出しておく。分類については，前の方法と同じであるが，さらにカルマン・フィルタ法の有効性[2]は，脳波時系列の早い変動成分の変化を抽出することができる。

文　献

(1) N. Ishii, et al " Segmentation of non-stationary time senes ", Int. J. systemssci. 1979. 10. 8
(2) N. Ishii et al " Detection of abrupt change and trend in the time series ," Int. J. systemsci. 1980(in press)
(3) N. Ishii, et al " Computer Classification of the EEG duringsleep by kullback Information measure.

更新過程とその生理学への応用

伊藤　嘉房（名大・医療短大）

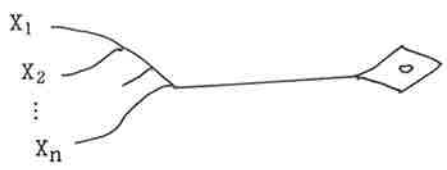
電球が切れたら，新らしいのと取り換える。これを操り返すとする。電球を大きなプールからrandomに取り出すものとすると，電球の更新という事象のintervalはお互いに独立で同じ分布をとる。このような事象の列を更新過程といい，点過程の一種である。自然界に比較的よくみられるもので，各事象が生ずるたびに過去が忘れ去られると，更新過程が発生する。自然発火しているNeuronが発生するimpulse trainは，多くの場合更新過程で近似される。（[11]など）。更新過程の一種にPoisson過程がある（ここでは定常過程のみを扱い，定常という文字は一切省く）。時間軸上の任意の区間に発生する事象の数がPoisson分布をとるような点過程である。この場合，各interval は指数分布をとり，お互い独立である。

二つ以上の点過程を重ね合せて，新らしい点過程を作ることができる。逆に一つの点過程を分解して，いくつかの点過程に分けることがでゆる。成分はお互いに独立でなくてもよい。あるいは同じ確率分布をもっていなくてもよい。成分が独立同分布であるという条件をつけると，任意の点過程がそのように分解できるとは限らない。

点過程の重ね合せや分解を，理論的に，あるいは実験的に，取り扱ったことがあるので二・三の事を紹介しておきたい[5]，[6]，[7]，[8]，[9]，[10]。

1. 相互作用する更新過程

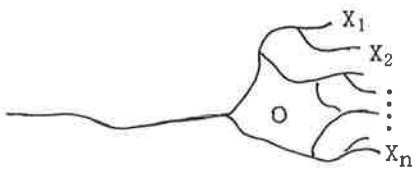
図のようなNeuronがあり，各分枝末端Xiがimpulseを発生するとする。



Xi 以外が silent ならば Xi は更新過程を発生するものとする。その密度函数を fi(t)とする。一般には軸索反射によって相互作用が生じ，この状態で Data が得られる。分枝は短かくて軸索反射の時間は無視できるとする。これは二カ所以上で発生する impulses の衝突を無視してよいことを意味する。他に干渉されない状態で，Xi の性質を知ろうとすれば，それを切り離そうとするのが普通であろう。手術の困難さは別問題としても，傷害流の影響など他の問題を生ずる。傷害の問題が解決しても，Xiが相互作用のもとで一定の平均頻度で作働している場合と，切り離されて他の平均頻度で作働している場合で，性質が異るかも知れない。一応各 impulse を発生場所によって区別できるとする。 i によって Xi で発生した impulse を表す。 fij(t) によって random に選んだ一つの interval が i-j interval でありその長さが t であるような確率を表す。すなわち $\int_0^\infty \sum_{ij} f_{ij}(t)dt=1$ である。{fij} は Data そのものである。次のような方法で {fi} についての情報が得られる［8］。

$$fi(t)=\varphi i(t)\exp\left(-\int_0^t \varphi j(s)ds\right),\quad \varphi j(t)=\sum_{i=1}^{n} f_{ij}(t)\Big/\int_0^\infty \sum_{ij} fij(t)ds.$$

2. 時々相互作用する更新過程



図のように樹状突起の n 個所で更新過程を発生するが，Soma には伝り難いとする。しかし時には 1 つの impulse が Soma に侵入し，この場合には逆行性の伝導によりすべてが同時に更新されるとする。Xi はすべて同じ性質をもつが数は不明，その密度函数 f(t) も不明とする。同時更新と局所発火は区別して観測されるとする。局所発火が発生場所により区別される必要はない。このような状況下で n と f(t) を求めることができる［5］［6］。種々の方法があるが 1 例をあげておく。同時更新のあとしばらくは更新過程の重ね合せを観測することになる。その第 1 interval の結合密度函数を $F_2(t_1,t_2)$ とする。n がわかっているとすると $F_1(t)$ より f(t) が求まる。これを用いて第 1 と第 2 interval の結合密度函数 $f_2(t_1,t_2)$ が求まる（F(t) が指数函数でなければ）。

$$f(t)=\frac{1}{n}F(t)\left(\int_t^{\infty}F(s)ds\right)^{\frac{1}{n}-1} \qquad F(t)=\int_t^{\infty}f(s)ds$$

$$f_2(t_1,t_2)=nf(t_1)f(t_2)F(t_1+t_2)^{n-1}+n(n-1)f(t_1)F(t_2)$$

$$f(t_1+t_2)F(t_1+t_2)^{n-2}$$

n を調節して f_2 が F_2 に一致するようにすればnが求まる。同時に f(t) も求まる。

3. 独立な点過程の重ね合せと分解

二・三の結果だけあげておく，i) 更新過程の重ね合せを観測して成分の数とその分布を知る方法を最初に考えたのは Ambartzumian(1962)[1] である。彼はそういう事が可能となるための充分条件を与えた。のちに「重ね合せが Poisson 過程」が必要充分条件とわかった[9]。ii) 更新過程が独立同分布の更新過程に分解されるならば Poisson 過程であることを Störmer(1969)[12] が最初に証明した。その後二・三の人が異る方法でこれを証明した[2]，[3]，[9]。iii) 更新過程が独立な成分に分解されるならば Poisson 過程だろうか。これには反例が発見された[3]。iv) 更新過程が独立同分布の点過程に分解されるならばPoisson 過程だろうか。これは長い間点過程論における予想問題だったが，先ず，密度函数が連続であるとの条件のもとで，無限分解可能ならPoisson 過程であることが証明された[4]。v) 密度函数についての条件をもう少しゆるめても，独立同分布な成分に分解可能（有限分解可能）とするだけで更新過程はPoisson 過程でなければならないことが最近わかった[10]。

[1] Ambartzumian, R.V.(1965) Two inverse problems concerning the superposition of recurrent point processes. J. Appl. 2, 449-454.
[2] Cinlar, E.(1972) Superposition of point processes. In Stochastic Point Processes, ed. P. A. W. Lewis. Wiley-Interscience, New York, 549-606.
[3] Daley, D. J. (1973)Poisson and alternating renewal processes with superposition a renewal qrocess. Math. Nachr. 57, 359-369.
[4] Haberland, E. (1975) Infinitely divisible stationary recurrent point processes. Math. Nachr. 70, 259-264.
[5] Ito, Y., Mita, K. and Ito, F.(1970) Physiological estimation of ramification number in the muscle spindle terminal of

frog. J. Physiol. Soc. Jap. 32, 286-287.
[6] Ito, Y. (1976) Existence of multiple abortive spke gpke generators and their independence in frog spindle terminal. Proc. Jap. Acad. 52, 248-251.
[7] Ito, Y. (1977) Superposition of distinguishable point processes. J. Appl. Prob. 14, 200-204.
[8] 伊藤嘉房，伊藤文雄，藤境規明（1977）複数の符号化素子をもつカエル筋紡錘求心線維末端について，日本生理誌．39, 376.
[9] Ito, Y. (1978) Superposition and decomposition of stationary point processes. J. Appl. Prob. 15, 481-493.
[10] Ito, Y. (1980) Renewal processes decomposable into i. i. d. components. Adv. Appl. Prob. 12, (to appear).
[11] Katsuki, K., Yoshino, S. and Chen, J. (1950) Action currents of the single lateral-line nerve fiber of fish. 1. On the spontaneous discharge. Jap. J. Physiol. 1, 88-99.
[12] Störmer, H (1969) Zur Uberlagerung von Erneuerungsprozessen. Z. Wahrsheinlichkeitsh. 13, 9-29.

性比と集団の安定性

新田克己　　寺本　英（京都大・理）

通常の生物集団は有性生殖を営んでいるが，これまでの個体群生態学のモデルでは，総個体数もしくはメスの個体数のみに注目したものが多く，メス・オス間の相互作用を explicit にとり入れた理論はほとんど見られない。オス・メスの性比に関しては，ダーウィンが「人類の由来」の中で，性淘汰が起きる条件として，性比の１：１からのかたよりを挙げているが，集団遺伝学的には，R. A. フィッシが，通常の繁殖様式の中では性比を１：１にするような遺伝子が最終的に固定されることを示し，“フィッシャーの原理”と呼ばれている。

実際の生物集団について性比を調べてみると，大部分の生物では１：１に近い値をもっているが，10%程度のずれを示すものも少くない。さらに，ある種の昆虫などでは，１：１から大きくずれたものが多い。このような性比のアンバランスは，その種がもつ社会構造や繁殖様式の違いによると考えられる。したがって性比の決定の問題を遺伝的にのみとらえるのでは不十分で，生態学的な取扱いが必要であると思われる。ここでは，簡単なオス・メス集団のモデル

を考え，それをもとに，性比と個体群の安定性との関係について考察を加える。

1. モデル

オスおよびメスの個体数をそれぞれM,Fとする。繁殖様式としては以下のようなものを考える。まず，メスは交尾後一定期間τ_0経って子供を産む。オスとの出会いがランダムであるとすると，交尾相手を見つけるまでの平均待ち時間は$\langle\tau'\rangle = \alpha/M$ となり，平均出産間隔は$\langle\tau\rangle = \langle\tau'\rangle + \tau_0$ である。 1回あたりの平均産仔数をmとすると，メス1匹につき，単位時間あたりの平均出生率は$\frac{m}{\langle\tau\rangle} = \frac{m/\tau_0}{\alpha/\tau_0+M}M \equiv \frac{b}{a+M}M$ となる。また，一次性比をpとすると，産まれる子供のうち$m_1 = pm$はオスで，$m_2 = (1-p)m$はメスである。これを用いると，MとFの時間変化は次の方程式で記述される。

$$\begin{aligned}\frac{dM}{dt} &= \left[\frac{b_1 F}{a+M} - d_1 - C_1(M+r_1F)\right] M \\ \frac{dF}{dt} &= \left[\frac{b_2 M}{a+M} - d_2 - C_2(r_2M+F)\right] F\end{aligned} \qquad (1)$$

diは死亡率，ci，riは競争の強さを表す係数である。$\frac{M}{a} \equiv x$，$\frac{F}{a} \equiv y$ とすると，(1)は

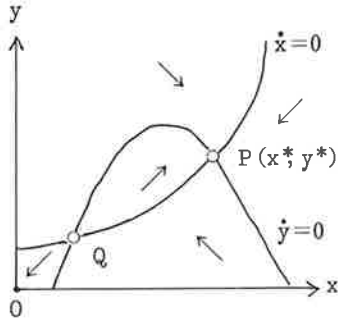
$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= d_1\left[\frac{\nu_1 y}{1+x} - \{1+\mu_1(x+r_1 y)\}\right] x \\ \frac{dy}{dt} &= d_2\left[\frac{\nu_2 x}{1+x} - \{1+\mu_2(r_2 x+y)\}\right] y\end{aligned} \qquad (2)$$

となる。ここで$\nu_i = b_i/d_i$，$\mu_i = ac_i/d_i$，また$\nu_1 = p\nu$，$\nu_2 = (1-p)\nu$ である。この方程式の定常解の性質と安定性の条件を調べよう。

2. 定常個体群

(2)の右辺を0とおくと，x－y平面内で二つの曲線isocline が描けるが，図1のように二点で交わるとき，点P(x*, y*)と原点Oが安定平衡点，Qが不安定平衡点となる。すなわち，初期個体群が原点の近くにあるときは絶滅が起るが，ある程度原点から離れた点から出発すれば点Pで表される定常状態に落ちつく。次に，いくつかの場合について，安定平衡点Pが存在するための条件を調べよう。

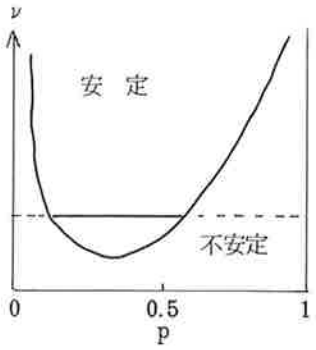
図1



(i) $\mu_1 = \mu_2 = \mu$，$r_1 = r_2 = 1$（競争に関して，オス・メスに差がない場合）

このときの安定性の条件は，$\nu>(\sqrt{p}+\sqrt{\mu})^2/p(1-P)$ となり（図２），一次性比pが0.5より小さいほうが安定になり易いことがわかる。

図２



（ii） $r_1=r_2=0$（オス・メス間には競争がない場合）

このときは，安定平衡点が存在するためのνの範囲は（j）の場合よりも広くなり，また定常状態での個体数 $n^*=x^*+y^*$ は大きくなる。

（iii） $\mu_1=0$，$\mu_2=\mu$，$r_1=r_2=0$（メス同しのみ競争をする場合）

安定条件は，$\nu>\{p+2\sqrt{p(1-p)\mu}\}/p(1-p)$ となり，(j)より安定になり易い。

（iv） $\mu_1=\mu$，$\mu_2=0$，$r_1=r_2=0$（オス同しのみ競争をする場合）

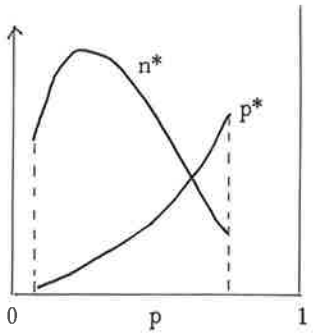
このときは，原点０以外に安定平衡点は存在せず，個体群は，初期状態によって，絶滅するかまたは爆発してしまうかのどちらかである。

以上より，個体群の安定化には，メス同しの競争が必要であることがわかる。

3. 個体群の定常状態と一次性比の関係

定常状態での個体数 n^* およびその時の集団の性比 $p^*=x^*/n^*$ は，一次性比Pに大き依存している。その一例を図３に示した。これによると，n^* が最大になるpの値は0.2～0.3であり，pがこの値からずれると n^* は大きく減少する。また，定常個体群での性比 p^* については，$\mu_1\geqq\mu_2$ であれば $p^*\leqq p$ となり，$\mu_1<\mu_2$ のときは $p^*>p$ となる。

図３



4. 一夫一婦

次に一夫一婦制をとる個体群について考えてみよう。この場合個体群のdinamicsを表す方程式は，(2)の $\frac{\nu_i xy}{1+x}$ を $\nu_i\tilde{x}\equiv\nu_i[(min(x,y)]$ でおきかえたものとなる。すなわち，個体数が過剰な性のアブレ効果がはいる。安定性の条件は $min(\nu_1,\nu_2)>1$ で，$r_1=r_2=1$ の場合を考えると，

$p_c\equiv\frac{\mu_1\nu-(\mu_1-\mu_2)}{(\mu_1+\mu_2)\nu}$ として，(i) $p\leqq p_c$ ならば，$p^*\leqq 0.5, n^*=(p\nu-1)/\mu_1$

(ii) $p>p_c$ ならば，$p^*>0.5, n^*=\{(1-p)\nu-1\}/\mu_2$

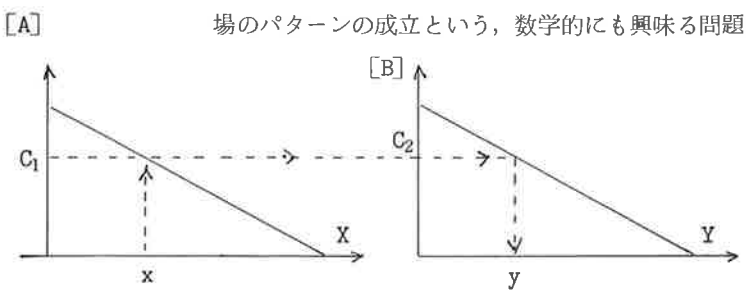
となる。これより，$p=p_c$ のとき，$p^*=0.5$ となり，n^* は最大値 $\frac{\nu-2}{\mu_1+\mu_2}$ をとることがわかる。すなわち，一夫一婦制の場合，定常状態での性比が１：１

になるように子供を産むときに総個体数を最も大きくすることができるという結果になる。

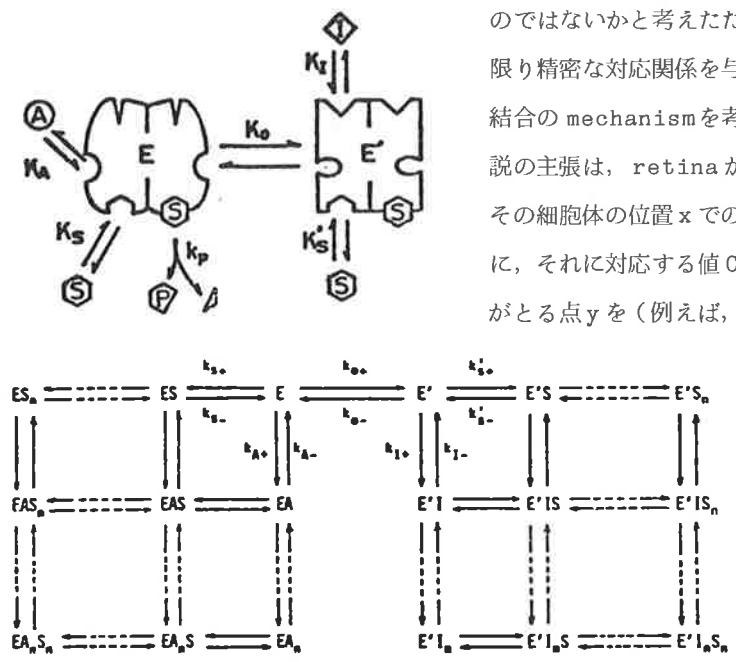
Retino-tectal Conjunction の形成について

岡部　秀彦（京大・理）

Retina と tectum の間にどのような mechanism によってあの精妙な結合が作られたかは，神経系を研究するものにとっても，発生学者にとっても，等しく興味をそそられる問題であろう。この現象を説明しようとする重要な試みの中に，物質勾配説がある。このモデルにおいて，反応・拡散方程式による場のパターンの成立という，数学的にも興味る問題に対しては多くの関心が持たれたが，実際の結合形成の分子論的な mechanism は多少等閑にされていた。



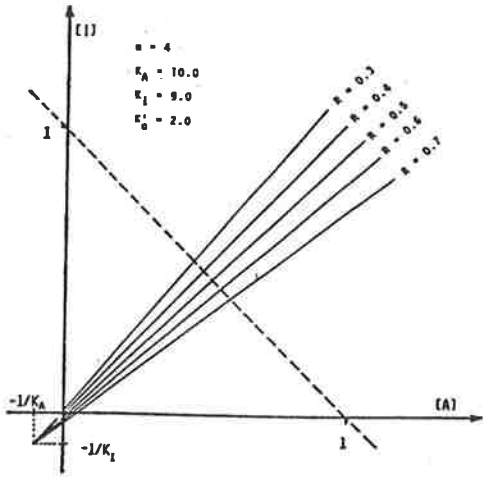
我々はこの点に疑念を持ち，物質勾配説は total としてはあまり良くないのではないかと考えたため（公平を期して）出来る限り精密な対応関係を与える物質勾配説に基づく結合の mechanism を考えることにした。物質勾配説の主張は，retina から出た。fiber の先端はその細胞体の位置 x での勾配物質 A の濃度 C_1 をもとに，それに対応する値 C_2 を tectum の勾配物質 B がとる点 y を（例えば，random movement によって）探しあて，結合するというものである。C_1 と C_2 の関係は単調関数であり，$C_2 \fallingdotseq f(C_1)$ となるか否かを検出する mechanism を考えればよいのである。



and $EAiSj+1 \xrightarrow{kp} EAiSj+p$ for $o \leq i \leq n$ $o \leq j \leq n-1$

$K_O = k_{O+} / k_{O-}$ ・$K_A = k_{A+} / k_{A-}$ ・$K_S = k_{S+} / k_{S-}$ ・$K_I = k_{I+} / k_{I-}$ ・$K'_S = k'_{S+} / k'_{S-}$

我々のモデルは，activatorとinhibitorとを持ち，(M. W. C.式の) concerted transitionを行う複数のsubunitから成る，allosteric enzymeである。反応式を右に示す。生産Pの生産速度v_pは，nをsubunit数，E_oを酵素総濃度として，



$$v_p = \frac{n \cdot k_P \cdot E_0 \cdot K_S \cdot [S] \cdot (1+K_A \cdot [A])^n \cdot (1+K_S \cdot [S])^{n-1}}{(1+K_A \cdot [A])^n \cdot (1+K_S \cdot [S])^n + (1+K_I \cdot [I])^n \cdot (1+K'_S \cdot [S])^n}$$

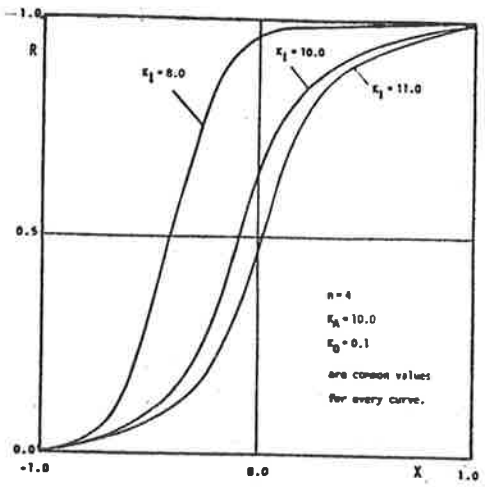
最大生産速度v_{max}に対する比では，

$$R = \frac{v_P}{v_{max}} = \frac{(1+K_A \cdot [A])^n}{(1+K_A \cdot [A])^n + K_0 \cdot (1+K_I \cdot [I])^n}$$

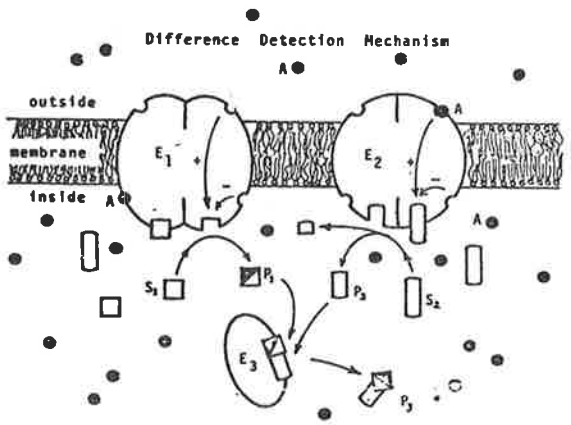
となる。

但し，$v_{max} = \dfrac{n \cdot k_P \cdot E_0 \cdot K_S \cdot [S]}{1+K_S \cdot [S]}$，

$$K'_0 = K_0 \cdot \left(\frac{1+K'_S \cdot [S]}{1+K_S \cdot [S]} \right).$$



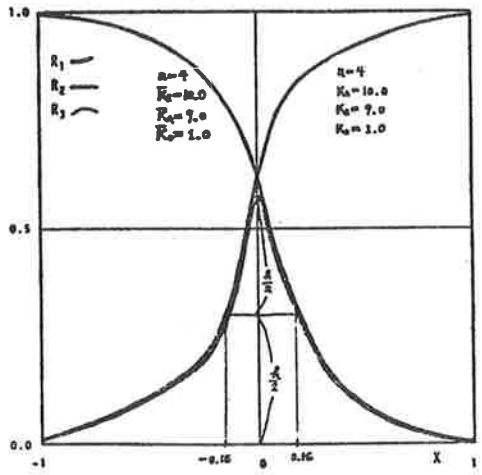
[A] [I]平面上でのRの等高線は厳密に，一点で交わる直線群で(右上の図) [A]+[I]=Cなる断面でX=([A]−[I])/Cを変数として表示すると，Cが十分大きければ右図のような一定の曲線に近づく。この事は，v_pが階段状にswitchingされ，しかもその特性は[A]，[I] の夫々の絶対値ではほとんど左右されず，相対濃度比Xに対して作用する。



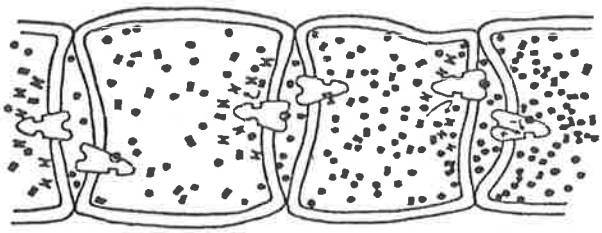
R = 0.5となる点は変曲点に極めて近いので，この時の値をX*，[A]* [I]* etc.とすると，

$$\frac{[I]^*}{C}=\frac{1-X^*}{2}=\frac{K_A+(1-K_0'^{\frac{1}{n}})/C}{K_A+K_I\cdot K_0'^{\frac{1}{n}}}\xrightarrow[C\to\infty]{}\frac{K_A}{K_A+K_I\cdot K_0'^{\frac{1}{n}}}$$

$$\left.\frac{\partial R}{\partial X}\right|_{X=X^*}=\frac{n}{8}\cdot\frac{K_A\cdot K_I+(K_A+K_I)/C}{(\frac{1}{C}+K_A\cdot\frac{[A]^*}{C})\cdot(\frac{1}{C}+K_I\cdot\frac{[I]^*}{C})}\xrightarrow[C\to\infty]{}\frac{n}{8}\cdot\frac{C}{[A]^*}\cdot\gtrsim\frac{n}{2}$$ となる。



このような酵素がoptic fiber の先端の膜に存在していたとすれば，もはやAとIが異なる物質である必要はなく，各酵素は，[Ainside]と[Aoutside]の差に対して，switchingできる。E_1によるP_1の生産は[Ain]≲[Aout]を，P_2は[Aout]≲[Ain]を夫々示すので，両者からの合成物P_3が生産されることは，[Ain]≒[Aout]を示すことになる。定量的に示せば右図のようになり，この例では，(結合を作る反応系のthresholdが，安全性・安定性を考慮して，$\frac{h}{2}$の所にあるとして)前ページ最下図から計算して，$0.9\ C_2<C_1<1.1\ C_2$の時，結合が形成されることになる。gradientが主にactive transport で作られるなら，濃度は指数曲線となり，形成される結合のひろがりは一定となる。20区間の一対一投射には，数百倍の濃度差を要することになる。視覚学習による結合のrefinement を考えれば，発生の段階ではこれで十分かも知れない。我々はまた，このモデルがglobal なgradientから各細胞にlocal なpolarity を誘導する手段を与えることを見出した。(逆の“積分過程”は難しくない。)これも(特に発生学において)重要な問題と思われる。(左図参照)。



Gradient of O
Polarity of I

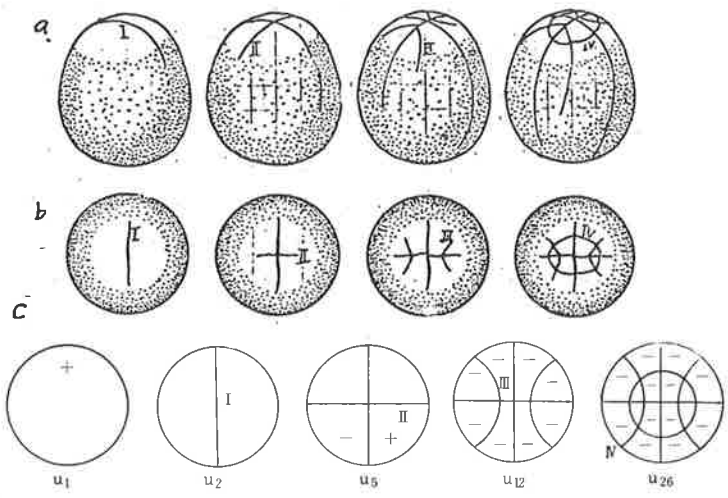
細胞分裂の数理的アプローチ ── 分裂装置形成方向の予言 ──

土居　洋文（京大・理）

細胞が分裂するとき，その分裂面は『何によって決まる』のだろうか？あるいは『どのようにして決まる』のだろうか？。こういう問いかけに対して『分裂装置が決める』という答が返ってくる。なぜなら『分裂面は分裂装置に垂直に入る』からである。しかし，分裂面は分裂装置に垂直に入る事を幾何学的に考えるなら，分裂面の決定は分裂装置形成の方向を決めるものが決定する，すなわち紡錘体極の場所を決定するもの，あるいは紡錘体の軸方向を決めるものが決定すると言ってよい。それではこれらの場所や方向を決めるものは何なのであろうか。細胞分裂（卵割）に対していくつかの古典的法則がある。Sachs－(1)卵は等しい部分に割れる傾向がある，(2)ある分裂面は一つ前の分裂面に直角になる傾向がある。Hertwig－(1)割球の核の位置はその中央にある傾向がある，(2)紡錘体の形成方向は原形質の中で最もゆとりのある方向と一致し，分裂面はその方向に垂直になる。したがってその次の分裂面は一つ前の分裂面に垂直になる。しかし著者は核の位置や分裂面をもっと正確に予言する法則を，固有方程式 $(\partial^2/\partial x^2+\partial^2/\partial y^2)u=\lambda\cdot u\ (u=0 \text{ on } \partial\Omega)$，ここで$\partial\Omega$は2次元的な図形$\Omega$の境界）によって提出する。

図1 aはAmiaとよばれる魚類の一種の卵割パターン，また図1 bは盤割の標準的なパターンをしめしてある（なおWilson, The Cell in Development and Heredity, 1928, pp. 983, Fig. 460も参照のこと）。図1 cは上の方程式においてΩが円に近い楕円の場合の固有解のいくつかをしめしてある。これらのパターンが，線の入り方の順番もこめて非常に似ていることに驚く。そこでΩが細胞の形であるとして，平べったい個々の細胞について上の方程式を解いてみ

図1



た。解法は差分法により京大大型計算機センターで行った。平らな細胞は，受精ウニ卵をstreak stageで押しつぶし（30μm），平らな割球を用いた，これは東大酒井研で行った。

この方程式のｉ番目の固有値に属する固有函数を第ｉモードとよぶことにする。図２は２細胞期にある細胞の第１モード(a, b)と第２モード(c, d)をしめしたものである（ａ，ｃは符号，ｂ，ｄは絶対値，ただし規格化されている）。第一モードは１個の山からなり，第二モードは１個の山（“＋”の領域）と１個の谷（“－”の領域）とからなる。第三モードは３種類に分けられて，第一種は半円状の細胞の第三モードで，節線は一本であるが，“＋”の領域には２個の頂上がある。第二種は四分円あるいは三角形状の細胞の第三モードで節線山，谷およびそれらの頂上，谷底はそれぞれ一つずつである。第三種は長方形状の細胞の第三モードで，２個の山にはさまれて一個の谷がある，したがって節線を２本もつ。（それぞれ順に図３のａ，ｂ，ｃ；Ｐ，P_1，P_2，Ｍはそれぞれ頂上あるいは谷底をしめす。）

図２

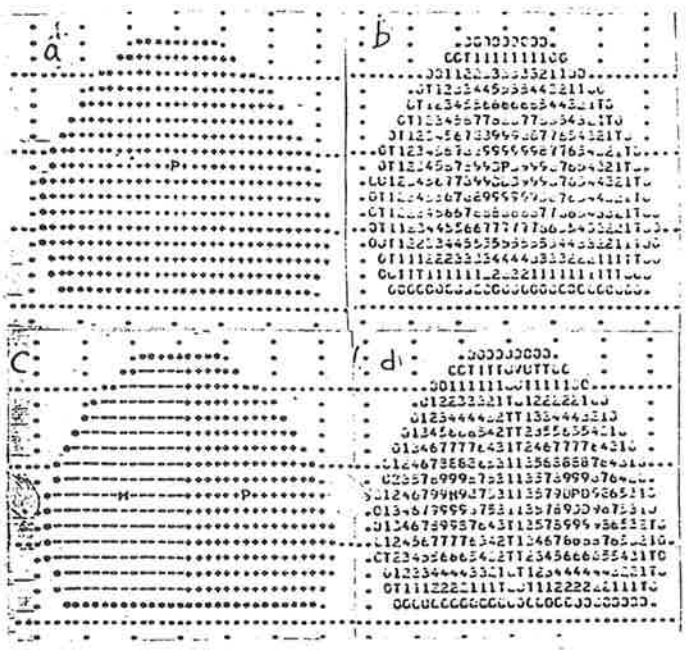
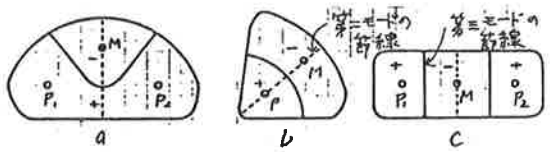


図３



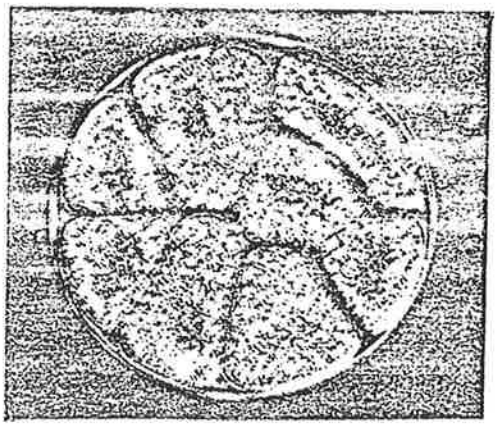
結果は

1）ほとんどの平らに押しつぶされた割球は第二モードの最大点 － 最小点方向に分裂装置を形成し，第二モードの節線にそって分裂する。

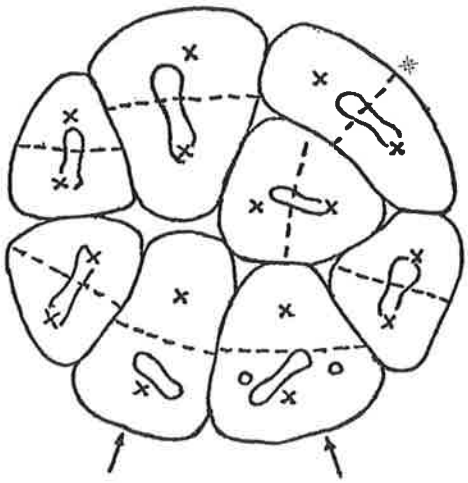
2）第二種の細胞（四分円状あるいは三角形状の細胞）は第三モードの最大点 － 最小点方向に分裂装置を形成し，第三モードの節線にそって分裂することもある。（図4b,⇦）

3）正常胚では４回目の分裂のとき不等不裂をする割球があるが，それと同様の現象が平らにされた胚にもおこる。これら不等分裂をする細胞の分裂装置の

図4



平らにされたある胚の8-細胞期



※この細胞と内側の細胞は，三回目の分裂のとき，第三モードの節線にそって分裂した。

軸は第二モードの最大点 － 最小点方向にも第三モードのそれにも一致しない。（図4 a，b；×は第二モードの最大および最小点，---は第二モードの節線，○は第三モードの最大，最小点，←は不等分裂をする細胞をしめす）

4） 休止期の核の位置は第一モードの最大点の場所に一致するのであるが，結果4)は多くの平らな培養細胞についても成りたつ。また第一モードの最大点は microtubule organising cenrer と一致することがある。

神経場の方程式とコラム構造の形成

甘利　俊一（東大・工）

1. はじめに

神経系では多くの部位で神経場の間に位相関係を保存した連続的結合がみられる。しかし，より精密に調べてみると，神経場は必らずしも一様の構造を持たず，微小領域に分割されていることが多い（たとえば大脳皮質のコラム構造）。このとき，神経場どうしの結合は，微小領域を単位として行われる。ここでは，昨年報告した神経系の自己組織理論を適用して，神経場の連続写像と離散構造形成の機構についての数学的可能性をより詳細に議論する。

まず始めに，数学的解析が可能な単純な自己組織神経場のモデルを示し，そ

の動作を場の方程式と学習方程式の組で表わす。次いで，この方程式を妥当な仮定のもとで数学的に解析し，平衡状態の解とその安定性とを調べる。この結果，ある条件のもとで連続的な解が不安定になり，この結果場が微小離散領域に必然的に分割されることを示す。計算機シミュレーションの結果と若干の考察を最後に記す。神経回路網の数学的取り扱かい全般については文献[1)]を，また，自己組織神経場の詳細については文献[2,3)]を参照されたい。

2. 神経場の結合のモデル

二つの神経場Yと Xとがあって，YからXへ可塑的なシナプス結合があるものとする。Y，Xは共に空間的に一次元の広がりを持つものとし，Yのy点の神経細胞からの軸索がXのx点に入力するときのシナプスの強さをs(x，y)とする。また，場Xの各点は，一定強度a_0の信号を出す抑制性神経集団からの抑制信号を受けるものとし，点xの神経細胞の受ける抑制信号のシナプス荷重 $-s_0(x)$とする。s(x，y)および$s_0(x)$は可塑的で時間と共に変化する。また，場Xは固定強度の相互抑制組合を有していて，その結合荷重関数をw(x)とする。

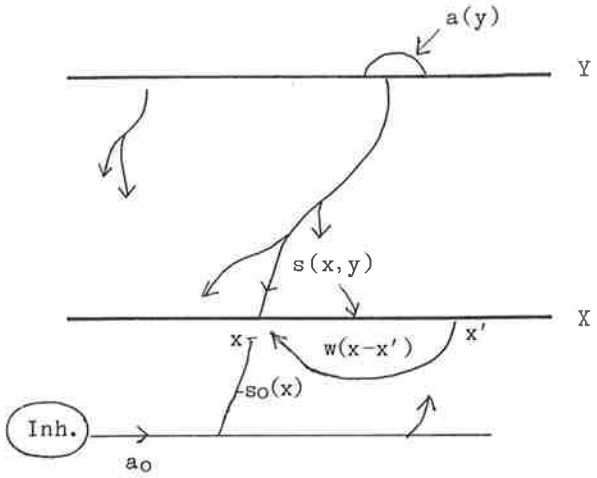


図1　神経場結合のモデル

場Yの各点に，局在的な入力刺激が次々と到来するものとし，点y'を中心とする刺激の分布をa(y-y')とする。このとき，場Xに生ずる興奮を考えよう。点xの神経細胞の平均膜電位をu(x，t)とするとき，場Xの興奮を支配する方程式は

$$\tau' \frac{\partial u(x,t)}{\partial t} = -u + \int s(x,y)a(y-y')dy + \int w(x-x')1[u(x',t)]dx' - s_0(x) - h \quad (1)$$

である。ここに，$1[u(x',t)]$は点x'にある神経細胞の出力信号の強さを表わし，ここで簡単のためuの正負に応じて1，0の二値をとることにする。この方程式は，短かい時定数で，安定な平衡状態に収束する。安定平衡状態は，刺激入力の中心の場所y'とその時の可塑シナプスの状態s(x，y)，$s_0(x)$に依存する。これを

$$\bar{u}(x;y',\ s,\ s_0)$$

と書くことにする。

場の結合を表わす $s(x, y)$ と $s_0(x)$ とは，この過程を通じて少しずつ変化する。神経細胞のシナプスの増加法則として，Hebb 流のものを採用し，さらに刺激の到来する場所 y' についての積分をとると，

$$\tau \frac{\partial s(xy, t)}{\partial t} = -s + c\int a(y-y') \times 1[u(x;y;s,s_0)]dy' \qquad (2)$$

$$\tau \frac{\partial s_0(x,t)}{\partial t} = -s_0 + c'a_0\int 1[\bar{u}(x;y',\ s,\ s_0)]dy' \qquad (3)$$

が得られる。

3. 方程式の平衡解とその安定性

非線形偏微積分方程式(1)，(2)，(3)の平衡解とその安定性を論じるために，より直観的な受容野関数 $r_1(x, t)$ と $r_2(x, t)$ を導入する。これらは $s(x, y, t)$ と $s_0(x, t)$ とに依存して定まるもので，区間 $[r_1, r_2]$ が点 x にある神経細胞の受容野を表わす。すなわち，刺激 y' が $r_1 \leqq y' \leqq r_2$ の位置に到来したとき，このときにのみ点 x にある神経細胞は(1)式の力学系の平衡状態で興奮する。シナプス荷重が変化すると，それにつれて受容野関数も変化するので，学習方程式(2)，(3)から受容野関数の変化を記述する方程式を導くことができる。この詳細は文献[2),3)]にゆずることにするが，場の方程式の平衡解とその安定性に関して次の定理を得る。

定理1. Yから Xへの一様連続写像を表わす解

$$r_1(x) = x, \quad r_2(x) = x + r_0$$

は場の平衡解である。ここに r_0 は

$$K(r_0) + W(r_0) - h = 0$$

の解であり，受容野の大きさを表わす。ここで，XとYの長さを同一とし，$W(x)$ は $w(x)$ の原始関数，$K(x)$ は $k(x)$ の原始関数で，$k(x)$ は刺激の

の大きさより

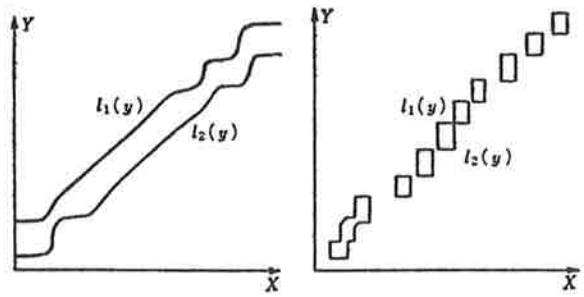
$$k(x) = c\int a(z+x)a(z)dz - c'a_0$$

で与えられる。

定理2. 連続な受容野関数を与える平衡解は，$k(r_0) < 0$ のときは安定，$k(r_0) > 0$ のときは不安定である。

簡単にいうと，刺激 $a(y)$ の広がりが受容野の大きさにより平均的に大きい場合，連続的な結合は不安定である。この場合，場Y，Xは共に微少領域に分

割され，領域毎の対応がつくようになる。計算機シミュレーションの結果を以下に示す。a）では連続的な対応が，b）では微少領域の対応が形成されている。



(a) 滑らかな写像　　(b) コラム状の写像

1） 甘利，神経回路網の数理，産業図書
2） S. Amari, Topographic organization of nerve fields, Bull. Math. Biol. (1980)
3） A. Takeuchi, S. Amari, Formation of topographic maps……, Biol. Cybern. (1979)

網膜細胞の受容野の解明について

中　　研一（基礎生物研）

脊椎動物網膜は，光入力を捕えてそのエネルギーを視神経繊維によって中枢に伝達される信号に変換する機能を持っている。この網膜の研究には，光化学から心理物理学に至るまでの広い多枝の分野にわたっているが，網膜を非常に複雑な感覚情報処理機と考えて，その中で行われている情報処理過程を定量的（数学的）に規定するのもその一つである。データーの定量化そのものは，視覚研究では古くより行われ，最も良く知られているのは，入力 － 出力関係を反応の（又は入力の）大きさのみにより規定するWeber-Fechner の法則であり，これに続くMichaelis-Meten の式も広く用いられている。これらは，パラメーター方式の解析法の最も簡単な例である。これを複雑にするとFuortes-Hodgkin 方式の受容器電位を近似するモデル，又はRushton-Marmarelis方式のＳ-平面（水平細胞の作るラミナ）での電流分布を近似するモデルとなる。もちろんこの方式を進めて網膜全体のモデルを作ることは，十分なパラメ

ーターされ得られれば，可能であろう。

これまでにも非常に粗い取り扱いではあるが，この様なモデルを作ることは試みられた。しかしパラメーターの数が多くなればなるほど，近似しようとする過程が複雑になればなるほど，この方式によるモデルは数学者のモデルとなり生理学者のモデルから遠のいて行くのは当然である。しかし，この様なモデルも，AI の領域では，十分に意義のあるものとなる。

これに対して，網膜内の情報処理過程を非パラメーター方式によって解析することも出来る。この方式の最も先鋭的なものがWienerにより理論付けられ Panos Marmarelis により実用化された白色雑音解析である。この分野での我々の初期の論文は網膜の機能についての解析と言うより，この方法の実用性を多くの人に認識させるに有用なPATHFINDER であった。その結果1970年中期よりこの分野での理論的，実験的な結果の発表が飛躍的に増大した。理論の面では，安井，Klein，V. Marmarelis 等により，Wiener核とVolterra核等の関係が研究され，実用の面では，H. Krausz がポアソン，V. Marmarelis がターナリ・J. Victor がサイン波の和による雑音を導入した。

理論上，実用上に多くの問題があるにせよ，Wiener-Marmarelis 法は，非パラメーター解析法としては最も有数なものであろう。網膜研究の分野にこの手法を応用するにあたって，3つの問題がある；それは，1) Wiener 核とWeber-Fechner 及び；Michaelis-Menten法則との関係，2) Wiener核とパラメーター解析法との関係及び，3) Wiener 解析法の将来の発展である。第一の問題は我々を長く悩ませて来た問題であるが，光入力を用いた場合網膜細胞からのWiener 核は，入力の平均照度，Ib，付近の交流又は動的感度に相当する。Michaelis-Menten(M-M) 式は，その性質から系の直流又は静的感度であり，M-M式に従う系，なまずでは受容器及び水平細胞では第一次Wiener 核は，M-M式のIb付近の接線である。(これは，M-M 式に従う系は線型に近いことにもよる)。Weber-Fechner 式は，Ibでの閾値でありIb付近の動的感度である。Weber-Fechmer 式にあてはまる細胞では，第一次Wiener核の大きさは上式に，大体一致する。これまでの解析では，線型項しか考えていないが，これからの解析には高次項及び時間的変化も考慮すべきであろう。第2の問題は，パラメーター解析法と非パラメーター解析を折中することであり，我々のグループでの1970年代初期の目標の一つであったが，袋谷と原，両氏が最初に受容器と水平細胞の相互作用について，この折中モデルを作るのに成功している。H. Krusz は最近の論文で両氏の方法をさらに進め，受容器と水平細胞2

層の結合したモデルを作っている。このモデルによってKraszは平面上で固定した入力に対する水平細胞の反応から，その細胞の安井氏の提案した平面上一次元の白色雑音入力からの第一次相関を予測するのに成功している。網膜の様に複雑な系のモデル化はこの折中法が最も有効であろう。第3の問題は，いくつかの方面が考えられる。安井氏の提案している白色雑音の時空間への延長も一つの大問題であり，非線型項を用いて，2つの点の信号伝達様式をいくつかの過程に分解することも有力な手法となるであろう。これはShapley らにより実用化されているが，電流注入による2細胞の信号伝達様式の解析に特に適していると思われる。

Marmarelis と著者が，白色雑音解析を始めて10年になるが，ようやく生理学者からの初期拒否反応がなくなり，我々も，この方法に対する過信から脱し，この方法を有効に用いて，生理学を始めることが出来る時期に入った様に思われる。

生体非線形システムのボルテラ表現とその実現

臼井　支朗（豊橋技術科学大）

はじめに　線形システムにおける伝達関数が物理現象との対応がつき易く，その構造に関する情報を提供する一方，ボルテラ汎関数級数は非線形系の一般的記述法としての意義はあるものの，核の測定法や生体システム等への応用に必要な具体的解析アルゴリズムに関する一般的な手法は知られていない。わずかに乗算器やベキ乗要素を含むシステムなど，ボルテラ核の多次元ラプラス変換が有理関数で与えられる場合についての展開法はあるが実データに応用するにはまだ問題があった。ここではボルテラ核を最小二乗法によりラゲール正規直交展開し，その係数をSmith[1]等の直列展開アルゴリズムへ導入することにより実入出力データからシステムを実現できる数値計算可能なアルゴリズムを導く。

m次直列システム　以下に扱うシステムは，安定で最小移相推移の有限次有理伝達関数$G_0, G_1, G_2, \cdots\cdots, G_q$をもつ$(q+1)$個の線形要素と$P_1, P_2, \cdots\cdots P_q$，$(\prod_{i=1}^{q} P_i = m)$のベキ乗要素が交互に接続されたm次直列システムを考える。m次直列システムはボルテラ汎関数級数ではそのm次項のみで与えられ，その入

出力関係はｍ次同次ボルテラ汎関数で記述される。すなわち

$$y(t)=Gm[x;t]=\int d\tau_1\int d\tau_2\cdots\cdots\int d\tau m\ km(\tau_1,\tau_2,\cdots\cdots\tau m)\prod_{i=1}^{m}x(t-\tau i)\quad(1)$$

ボルテラ核hmが適当な正則条件を満たすとき，そのｍ次元フーリェ変換対が存在し，y(t)はつぎのように表現される。

$$y(t)=\int d\omega_1\int d\omega_2\cdots\cdots\int d\omega n\ \ Hm(j\omega_1,\ j\omega_2\cdots\cdots j\omega m)\prod_{i=1}^{m}\{X(j\omega i)e^{j\omega it}\},$$

$$(X(j\omega)=\int d\tau x(t)e^{-j\omega t})\qquad(2)$$

一方，上記ｍ次システムのボルテラ核のフーリェ変換Hmはつぎのようになる。

$$Hm(S_1,S_2,\cdots\cdots Sm)=\{\prod_{l=1}^{m}Go(Sl)\}\{\prod_{l=1}^{m/p_1}G_1(\sum_{k=1}^{p_1}S_{(l-1)p_1+k})\}\{\prod_{l=1}^{m/p_1p_2}G_2(\sum_{k=1}^{p_1p_2}S_{(l-1)p_1p_2+k})\}\{\prod_{l=1}^{m/p_1p_2p_3}G_3(\sum_{k=1}^{p_1p_2p_3}S_{(l-1)p_1p_2p_3+k})\}\cdots\cdots\{\prod_{l=1}^{pq}Gq\text{-}1(\sum_{k=1}^{m/pq}S_{(l-1)m/q-k})\}\{Gq(\sum_{k=1}^{m}Sk)\}\qquad(3)$$

$$(Si=j\omega i,\ i=1,2,\cdots\cdots m)$$

直列展開アルゴリズム　Smith等[1]は，Hm(S₁, S₂,……, Sm)とGi(S)，Ci＝0.1……q）が式(3)の関係にあるときHm(S₁, S₂,……, Sm)が変数S₁, S₂,……, Smに関する有理分数関係で与えられる場合に，逆にHmのみからGi(S)とPiを求めるアルゴリズムを示した。いま，ボルテラ校の測定がラゲール正規直交関数系を用いてなされる場合には，このアルゴリズムを適当に修正することにより測定された係数のみで直列展開が可能になる。詳細は省き以下その手順を示す。

〈手順Ⅰ〉ラゲール正規直交関数φn(t)のはじめのｒ個を用い最小二乗法等によりｍ次ボルテラ校の展開係数Cmを入出力データから推定する[2]。すなわち，

$$h_m(\tau_1,\tau_2\cdots\cdots\tau m)=\sum_{1\le n_1\le n_2\cdots\le n_m\le r}\hat{C}^{m}_{n_1n_2\cdots\cdots n_m}\prod_{k=1}^{m}\varphi_{n_k}(\tau_k)\qquad(4)$$

の係数$\hat{C}^{m}_{n_1n_2\cdots\cdots n_m}$（$1\le n_1\le n_2\le\cdots\cdots\le n_m\le r$）を測定する。

〈手順Ⅱ〉ラゲール正規直交関数のフーリェ変換

$$\phi_n(jw)=\frac{\sqrt{a}(j\omega-a/2)^{n-1}}{(j\omega+a/2)^{n}},\ (n=1,2,\cdots\cdots r)\qquad(5)$$

を用いて次式の$\sigma K_{bi}(j\omega)$を適当な周波数範囲$[\omega l,\omega h]$にわたって計算する。

$$\sigma K_{bi}(j\omega)=(\sqrt{a})^{(m-bi)}\sum_{1\le n_1\le n_2\le\cdots\cdots\le n_m\le r}\hat{C}^{m}_{n_1n_2\cdots\cdots n_m}\prod_{k=1}^{bi}\phi_{nk}(j\omega),$$

$$(i=1,2,\cdots\cdots,\ v)\qquad(6)$$

ただし$b_0, b_1,\cdots\cdots, b_v$はｍの因数を小さいものから順に並べたもので$b_0=1$，

$b_v = m$, $bi < bj$, $(i<j)$ である。ここでまず

$\hat{G}o(j\omega) = \sigma Kbo(j\omega)$ と決定される。 (7)

また $N = 1$, $Io = o$, $Po = 1$ とおく。

〈手順Ⅲ〉次式を計算する。

$$ {}_N K_{bi}(j\omega) = {}_{N-1}K_{bi}(j\omega) / \{ {}_{N-1}K_{b_{IN-1}}(j\omega) \}^{[bi/p_{N-1}]}, \ (i = I_{N-1}+1, \ I_{N-1}+2, \cdots\cdots, v) \quad (8) $$

〈手順Ⅳ〉適当なしきい値を定め，${}_N K_{bi}(j\omega)$ が周波数範囲 $[\omega 1, \omega h]$ で定数かどうかの判定をする。${}_N K_{bi}(j\omega)$ が定数とみなすことができない最小の i を I_N とすると P_N および $G_N(j\omega)$ が次式のように決定された。

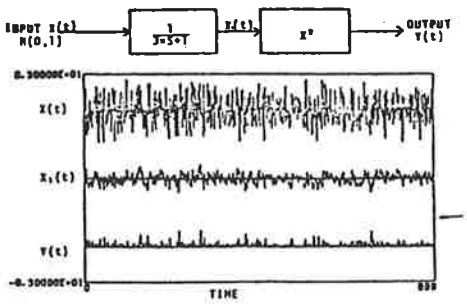
$$ P_N = b_{IN} / b_{IN-1}, \ \hat{G}_N(j\omega) = {}_N K_{b_{IN-1}}(j\omega)\big|_{\omega_1 = w/b_{IN}} \quad (9) $$

〈手順Ⅴ〉I_N が v に等しいかどうかを判定し，等しくなければ手順Ⅲへ，等しければ展開終る。

数値計算例(3)

図1のシステムの入出力データ x(t)，y(t) から上記のアルゴリズムに従って展開する。

Ⅰ　r = 4 とし，2次の同次ボルテラ汎関数モデルを最適であると推定し，係数 C^2 を測定した。



第1図　シミュレーションモデル

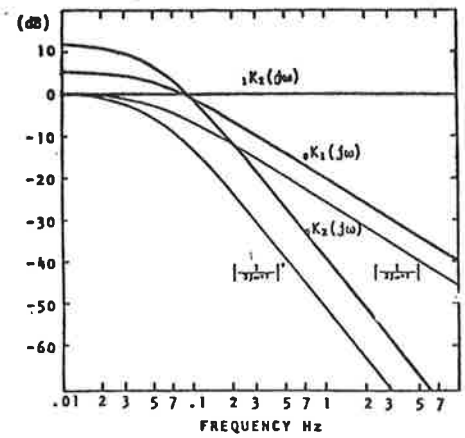
Ⅱ　2の因数は1と2であるから $b_0 = 1, b_1 = 2$ となる。

Ⅲ　${}_0K_1(j\omega)$, ${}_0K_2(j\omega)$ を係数 $\hat{C}^2$ を用い式(6)より計算。式(7)より，まず $G_0(j\omega)$ の推定値 $\hat{G}_0(j\omega)$ が ${}_0K_1(j\omega)$ である。

Ⅳ　${}_1K_2(j\omega) = {}_0K_2(j\omega) / \{ {}_0K_2(j\omega) \}^2$ を計算。

Ⅴ　${}_1K_2(j\omega)$ は，ほぼ定数と判明し，$P_1 = 2$ として展開終る。

図2にそれぞれの特性を示す。$G_0(j\omega)$ は $1/|3j\omega+1|$ とその形においてよく一致しており，正しく推定されていることがわかる。



第2図　各変数の周波数特性

むすび

網膜内細胞反応など実システムへの応用は今後の課題である。

（参考文献）
1) Snith, Rngh：IEEE. Vol. AC-19, №6 (1974)
2) 臼井 他 ： 信学技研 MBE 78-64 (1978)
3) 村瀬 他 ： 信学技研 MBE 78-65 (1978)

医学生物学における超高圧電子顕微鏡のあり方 （1980. 3. 12～13）

課　題　名

医学生物学における超高圧電子顕微鏡にかける夢

1. 〔同一切片対応法〕と細胞内封入体の観察　名市大医　解剖　渡　仲三
2. 細胞化学への応用を中心として　京大医　解剖　小川和朗
3. 内耳の微細構造における観察から　東北大医　耳鼻　高坂知節
4. 筋細胞の超高圧電子顕微鏡観察　東大医　解剖　石川春律
5. 九大超高圧電顕使用の経験から　九大医　解剖　山元寅男
6. Environmental cell法について　日大　文理　深見　章
7. Environmental cell 法の応用を中心として
   東大　教養生物　村上　悟
8. 医学生物学における超高圧電顕利用の反省　東大医科研　浜　清
9. 医学生物学用としての超高圧電子顕微鏡の将来への展望

総　合　討　論　司　会　名大工　丸勢　進

討論参加者　名大工　井村　徹　名大理　神谷芳弘
名大医医真菌　田中健治　阪大工　橋本初次郎
名大工　日比野倫夫　名大工　美浜和弘
東北大科研　矢田慶治　名大医病理　星野宗光
生理研　入沢　宏，亘　宏，山岸俊一，金子章道，
有井達夫　および参加者全員

概　要

既に超高圧電顕に関する研究会が昭和52年度に行なわれ，超高圧電顕の当時の状況について理解を深め，又医学生物学試料への有効性を確認している。

今回の研究会の特色は，生理学研究所に昭和55年度及び56年度の予定で超高圧電子顕微鏡を設置する計画が具体化した段階で医学・生物学分野において超高圧電顕の占める位置について考え，これに何を期待し，どう実現するかについて理工学分野の専門家を交えて具体的に討論した点にある。一日目には，主に医学・生物学分野の講演を「超高圧電顕にかける夢」という主題のもとに行い超高圧電顕に期待する事項が幅広く取り上げられた。特に，厚い試料の観察への有効性，これを生かしたステレオ観察，薄い生物試料における高分解能観察，Environmental cell の問題，及び照射損傷の問題等についての反省及び期待が述べられた。二日目には，前日の医学・生物学分野における期待を可能とするために必要な機種の型式，機能および付属装置等についてを，丸

勢教授（名大工）を司会として，医学・理工学分野の専門家が一体となって約3時間の討論を行い，医学・生物学用の超高圧電顕のイメージを具体化させた。

抄　　録　医学・生物学用の超高圧電子顕微鏡にかける夢〔同一切片対応法〕と細胞内封入体の観察

渡　　仲三（名古屋市立大）

超高圧電子顕微鏡の特徴には，(1)透過能の増大，(2)分解能の向上，(3)試料損傷の減少などがあることは周知の事実である。そして，それらの特徴をうまく利用して，医学・生物学分野においても最近多くの研究がもたらされている。今回は，われわれが開発した「同一切片対応法」という同一の厚切切片を光顕，透過電顕，さらに走査電顕で観察し，異った2つ，あるいは3つの像を対比する方法を紹介すると共に，超高圧電顕の将来の展望についてもふれて見たいと思う。われわれの「同一切片対応法」は次の如く行なう。すなわち，プラスチックに包埋した組織をまず厚切（0.5～1μm）して光顕染色を行なって光顕で観察し，必要な視野をくまなく写真撮影する。次いで，同一切片を電子染色して超高圧電顕で観察し，写真撮影を行なう。さらに，この切片を走査電顕用ホルダーに接着して，軽く，イオン・エッチングおよびイオン・コーティングして走査電顕で観察し，写真撮影を行なう。そして，これら3種の写真を対比して，光顕のカラーで染色された細胞成分は透過電顕ではどのような超微形態的構造をなしているか，さらに走査電顕ではどのような立体構造を呈するかを比較検討するのである。このようにしてわれわれは，ヘビ膵島におけるB細胞のインスリン結晶顆粒が立体的に菱形十二面体を呈することや，アフリカ・ツメガエルの皮膚顆粒腺の分泌顆粒が紡錘形を呈すること，さらにヘビ副腎の細胞種，ラット下垂体の細胞種の同定など行なった。

今後，われわれの「同一切片対応法」を他の組織に応用すれば，さらに多くの新知見が得られるものと思うし，また，新しい分野としては，複雑な形態をなした細胞の全体像を連続切片で観察する場合，普通の透過電顕に比べ，切片の厚さを10倍としてもその枚数を10分の1に節約することが出来，極めて有用である。組織の固定，脱水，包埋法の改良なども，超高圧電顕をさらに普及するための今後の重要な研究課題であろう。

(1) Watari, N. : In : Endocrine Gut and Pancreas (ed. by T. Fujita), Elsevier Scientific Publish. Co,. Amsterdam, P. 179-184, 1977.
(2) Watari, N., Y. Hotta and Y. Mabuchi: Arch. histol. jap., 40 (Suppl.): 81-85, 1977.
(3) Hotta, Y., N. Watari and Y. Mabuchi: J. Clin. Electron Microsc., 10 (5-6): 475-476, 1977.
(4) Watari, N., Y. Hotta, Y. Mabuchi and Ch. Morita: Proc. Fifth Int. Conf. on High Voltage E. M., Kyoto, P. 343-346, 1977.
(5) Watari, N., Y. Hotta and Y. Mabuchi: Ninth Internat. Congr. on Electron Microsc., Toronto, Vol. II, P. 82-83, 1978.
(6) Hotta, Y., N. Watari and Y. Mabuchi: J. Clin. Electron Microsc., 11 (5-6): 678-679, 1978.

医学生物学の超高圧電子顕微鏡にかける夢
2. 細胞化学への応用を中心として

小川　和朗（京都大・医）

細胞化学的な反応を施した試料を超高圧電顕で観察することの有用性は，オルガネラないし微細構造を特異的に染出しうる細胞化学的反応を用いると，オルガネラないし微細構造全体に高電子密度の反応産物が沈着するために，オルガネラないし微細構造全体の三次元的立体像を把握するのに極めて理想的である点にある。以下，この線にそって，我々の研究室で検討しているいろいろな例と将来に対する希望を述べる。

イ．酸性ホスファターゼ活性とゴルジ装置およびライソゾーム

酸性ホスファターゼ活性を鉛法で検出するとゴルジ装置の一部（GERLを含む）とライソゾーム系に属する構造が染出されるので，ゴルジ装置とGERLの関係およびグルカゴンあるいはサイクリックAMP投与によるオートファジイの際に見られる肝細胞内のライソゾームの動態（lysosomal wrapping）を追究している。

ロ．アデニールシクラーゼ活性とギャップ結合の微細構造

DMSOを用いたアデニールシクラーゼ活性（鉛法）の検出法を心筋に応用したところ，ギャップ結合の細胞質側に陽性に出ることが判ったので，ギャ

ップ結合のサブユニットの立体的構造と活性の局在の関係をさらに詳細に追究中である。

なお，ギャップ結合にはCa－アデノシントリホスファターゼ 活性も陽性であり，興味深い。

ハ．赤血球膜内粒子の構造と機能

赤血球ゴースト膜をSH基検出のための塩化第二水銀で修飾， あるいはゴースト膜のアセチルコリンエステラーゼ活性をフェロシアン化銅法で検出した後，フリーズレプリカ像を作成し，赤血球膜内粒子の構成と機能を追究しているが，この分野での超高圧電顕の応用を検討中である。

ニ．そ の 他

①ペロキシダーゼ注入後DAB法によりペロキシダーゼを追跡し， とり込みの際の細胞膜の動態，②フェロシアン化銅法によりコハク酸脱水素酵素活性を検出し，ミトコンドリアの内部，③鉛法によりチアミンピロホスファターゼ活性を検出しゴルジ装置，④鉛法によりグルコース－6－ ホスファターゼ活性を検出し小胞体と核膜，⑤DAB法によりペロキシゾーム，などの立体像ないしオルガネラ相互の関係を，いろいろな条件下で，観察することが可能である。

「医学生物学用の超高圧電子顕微鏡にかける夢」
内耳の微細構造における観察から

高坂　知節（東北大・医）

内耳の超微細構造学的研究は，医学生物学に電子顕微鏡が導入されたのとほとんど時期を同じくして始められたので，その歴史は既に30年を経過している。この間に，光学顕微鏡の時代に確立された微細構造に加えて数々の細胞レベルの新知見が報告されてきた。そのうちの主なものとして聴覚に関与する蝸牛内の感覚細胞（円柱形の外有毛細胞とフラスコ形の内有毛細胞）の神経終末に関するものがある。紙面の都合でここでは外有毛細胞について述べるが，哺乳動物の蝸牛では，①求心性神経（cochlear or efferent nerve）②遠心性神経（cholinergic or efferent nerve）の2種の神経が各々の終末を送っている。求心性終末は，小粒でシナプスでの平均径は約900nm 位といわれている。その終末は比較的明るく，30～80nmの様々なvesicleを含

み感覚細胞とは約18nm位のsynaptic gapを形成している。一方，遠心性終末は，一般的に大形で，シナプス部位で1800～3500nmの径をもち，その中には多数のシナプス小胞を含み感覚細胞とは約23nm位のgapを形成する。ところで，この様な形態的特徴をもつ神経終末がどのような組合せでひとつの外有毛細胞に分布しているのかという点については未だ十分に明らかにされていない。そこでモルモットの外有毛細胞神経終末部を水平に切り，その連続切片を高圧電顕下に観察することにした。切片の厚さは500nmとし，VECOの50メッシュを用いて切片の損失を極力少くするようにした。染色には，4%酢酸ウランアルコール液と2.6%酢酸鉛を用いた。モルモット蝸牛第3回転の第1列外有毛細胞10コを連続切片に作成し高圧電顕下に観察したのをまとめたのがこの表で，細胞によって遠心終末の多いものや両者同数のものそして逆に求心終末の少し多いものがあることがわかった。10コの細胞の終末を加算すると遠心終末89コ，求心終末87コとなり，モルモット蝸牛の第3回転第1列外有毛細胞は，遠心・求心終末のほぼ同数支配からなっていることがわかった。

Ratio of efferent to afferent endings in a hair cell
(quinea pig cochlea, third turn)

	#4	#5	#7	#9	#10	#15	#16	#99	#115	#119	total
efferent	13	10	7	7	7	6	11	7	10	11	89
afferent	9	9	7	9	7	6	9	7	11	13	87

筋細胞の超高圧電子顕微鏡観察

石川　春律（東京大・医）

超高圧電子顕微鏡を細胞生物学へ応用するにあたり，われわれは，(1)電子線の大きな透過能，(2)高い分解能，および(3)少ない試料損傷という利点を期待する。通常，これらの利点が組み合わさって，光学顕微鏡で取り扱うような厚い試料の観察が可能になっている。厚い試料の観察はとくに立体的形態分析に有利である。観察対象とする構造のコントラストが十分であり，重なり合いによる像障害がなければ，その立体対写真から容易かつ正確に三次元の情報を得ることができる。また，得られたイメージから立体模型をつくることができる。厚い切片の連続切片法によりさらに三次元情報は増大する。厚い生物試料

には大別して，切片試料と全載試料とがある。いずれも，観察目的や対象に合わせて，試料作製や観察方法を工法する必要があり，この工夫によってはじめて，超高圧電子顕微鏡の応用が有効になることが多い。われわれは，超高圧電子顕微鏡を筋や神経の形態学的研究に応用しているが，ここでは，その応用例を示しながら，応用上の考え方に触れてみたい。筋細胞について，厚い切片の超高圧電子顕微鏡観察が最も有効であったのは膜系の立体的分析においてであった。この場合，横細管系や筋小胞体を特別な方法で選択的に染め出し，1～3μm厚さの切片を後染色を施さず観察するわけで，対象とする構造だけを立体的に追跡できる。また，同時に，その構造の全般的な分布や発達程度の把握にも役立つ。次に，別の応用として，通常の後染色を施して，重なり合い効果を積極的に利用できる場合がある。筋原線維のような規則的な構造体については同種の亜構造を重ね合わせることにより，コントラストを増強することができる。さらに後染色を施した通常の厚い切片でも，有益な情報が得られる場合が少なくない。超高圧電子顕微鏡がもつ利点を生かして，ほかにいろいろな応用がなされているが，今後，装置面の改良と相まって，新しい応用面が開かれることが期待される。

九大超高圧電顕使用経験から

山元　寅男（九大・医）

九州大学に，学内共同利用のための超高圧（1200ＫＶ）電子顕微鏡が設置されて満3年が経過した。この間，生物系の研究者の利用は1％にも満たない状況である。その理由は，超高圧電顕を用いての細胞や組織の超微形態研究の方法が十分に確立されていないことによるものと思われる。樹脂包埋法を主とする細胞組織の微細構造研究において，超高圧電顕のもつ利点といえば，比較的厚い切片を用いてのステレオ観察であろう。それは，この電顕のもつ特徴ではあるが，細胞1個の厚さを電子線が透過できるわけではなく，この点で，立体観察にも限界があると云えよう。高価な1000ＫＶの超高圧電顕でなくても，200ＫＶの電顕を用いて，同様の成果を得ることはかなりの可能性がある。我々が超高圧電顕を用いて，魚類鰓に分布するクロライド細胞の内膜系の観察において感じることは，この細胞の膜系のような複雑なものでは，超高圧電顕により

得られる情報は，切片が厚ければ厚い程，複雑に重なり合って，解析が困難になるばかりである。したがって，今一つ工夫が必要であることを痛感している。次に，学内共同利用であり，我々の考えを十分実験するだけの時間的な配分を得られないことも，生物系研究者の，生物学への応用の開発がおくれる原因でもあるように思われる。

今後の超高圧電顕にかける形態学者の夢としては，情報を得られるぎりぎりの厚さの切片から，超微形態に関する情報をコンピューター処理し，三次元の画像として得ることができれば，これまでにない立体観察の成果を挙げ得るのではなかろうか。特に，細胞の全周に，何個のギャップ結合があるか，さらに，細胞内膜系相互間の連結の状況はどうか，抑制性シナプスと興奮性シナプスの数は，その比率は，など，手にとるようにわかるようになるのでは，これらも決して夢には終らないことを願う次第である。

Environmental cell 法について

深見　章（日大・文理）

1. 歴史的経過

生物試料を電子顕微鏡観察するとき真空排気に伴う試料の脱水による変形と，電子線照射による試料の損傷とが起ることは，電子顕微鏡の揺籃時代から指摘されていた。[1]水を含んだ試料を電子顕微鏡内に入れ乾燥させずに観察するための装置と方法の研究の歴史も古くRuska[2]の時代から研究されはじめた。いくたの試行錯誤の経験をへて今日にいたったのであるが，その間に超高圧電子顕微鏡を使用し，生きている微生物をしかるべき倍率で観察できたという報告もあったが（1960）[3]，この実験の観察条件，例えば試料に対する照射電子線量あるいは記録用写真感光材料などの実験結果から著者の言う〃生きている〃事実を解析するためのデータが記載されていないためその信憑性はまったく不明である。このように〃生きている〃状態の観察は電子顕微鏡の歴史上一つの大きなトピックであることは否めない事実である。その後，放射線生物学の分野で得られた各種のデータによれば，[4][5]電子線照射に強いといわれる芽胞を例にとると，かなり高い生存率を期待するときは試料に対して 1×10^{-6} coulomb／cm^2 以下の照射線量で観察しなければならないと結論できる。この

値を電子顕微鏡内での①視野探し，②電子線露出の所要電子線量を大ざっぱに推算してみると，現像可能な有意のネガフィルムを作るには，せいぜい1,000倍程度の倍率しか期待できないことになる。ただしこの値は最高感度の写真感光材料を用いたときのものである。従って微生物等を生・死のレベルで取り扱うことには問題が多すぎる。ことによると光学顕微鏡の倍率程度の仕事しかできないかも知れない。いま仮りに，電子線による試料損傷を細胞の生死というレベルでなく，構造を作っている物質の損傷というレベルで考えるならば，多くの実験結果から見て電子線照射量を前述の値の100～1,000倍まで増したとしても，形態観察に関する限りでは試料損傷は軽微のようである。[6] この照射量から倍率を推算すると，3万倍前後の水を含んだ多くの生物試料の電子顕微鏡像が得られることになり，Environmental cell を使う意味が明らかになる。筆者らのグループの観察の目標は，水を含む生体構造の機能を保持した状態での動的観察である。今一つの Environmental cell 法の電子顕微鏡への応用は，水を含んだ状態での分子結晶の電子回折法による解析である。これについては米国の Parsons のグループにより，100 KV および 1,000 KV の電子顕微鏡によるウェットな状態の酵素あるいは phospholipid bilayer の観察が成功裡になされている。[7) 8)]

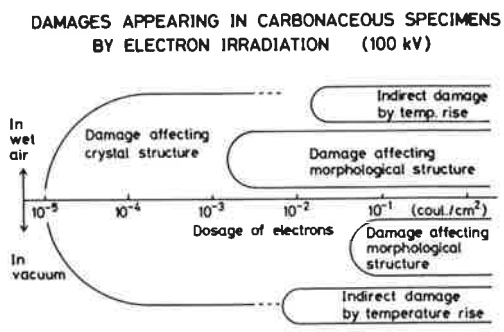
2. Environmental cell の構成

紙面の都合により記述を省略する。文献[9) 10)]を参照願いたい。

3. Environmental cell 法による生物試料観察上の各種の問題点

(1) 電子線照射による試料の損傷

右図に損傷の発生する電子線照射量ならびに各種の損傷の発生限界電子線量および観察する試料の環境について in wet air と in vacuum とについて図式化して表示してある。10^{-5} coulomb/cm^2 以上の照射量が試料に与えられると，試料はそれが in wet air, in vacuum の別なく結晶の場合には結晶構造が乱れる，非結晶の場合にも構成要素である高分子の側鎖の切断，結合などが発生する。試料を仮りに人体に例えれば，骨骼構造に異常を



生じる。in vacuum で観察するとき（ in wet でもほぼ似た挙動を示すが）10^{-2} coulomb／cm^2 程度の照射量によって試料の温度上昇に伴う損傷が現われ，10^{-1} coulomb／cm^2 以上になるとこの現象が顕著になる。他方 in wet の場合は電子線とガス分子との相互作用に基因すると考えられる損傷が 10^{-3} coulomb／cm^2 以上の照射量で発生する。これは前の例で述べると，皮膚，筋肉等に発生する形態学的な損傷であり，in wet と in vacuum とではこの損傷の有無が異なるだけである。前節(1)に述べたように，in wetの場合でも 10^{-3} coulomb／cm^2 以下のごく弱い電子線量で照射観察することにより，生体構造の機能を保持した状態での形態学的な動的観察が可能となる。ただし骨格に相当する高分子の配列にはかなりの損傷が与えられていることは忘れてはならない。超高圧（ 1,000 KV ）と普通の場合（ 100 KV ）とを比較すると，形態学的な損傷の発生は約 1／10 になるといわれている。その点では超高圧側に大きなメリットがある。ただし感光材料の写真黒化効率は逆に超高圧側で数分の一に低下する。従ってオーバーオールでは超高圧側のメリットはさほど現われない。

(2) 試料のコントラスト

コントラストを議論するときは，(1)試料自身を処理する増コントラスト法と，(2)電子顕微鏡側での増コントラスト法とに分けて考察する必要がある。environmental cell 法の目的の一つは生体試料を nonfixation，non-staining で観察することにあることは云うまでもない。そのためには，加速電圧は逆に低下させることの効果もある。今後の増コントラスト法としては STEM の活用が期待できる。暗視野法の応用の他に像の energyfiltration を行い弾性散乱電子を主体的に結像に使うことなど，今後の問題であろう。

(1) アルデンネ：アルデンネ超電子顕微鏡（文部省専問学務高訳）丸善刊，p－376（1942）
(2) E. Ruska：Kolloidzeitschrift, 100 212 (1942)
(3) Dupouy, G., Perrier, F., Durrieu, L. : C. R. Acad. Sci., Paris, 251 2836 (1960)
(4) Siegel, G., : Proc. 7th Int. Congress, Electron Microscopy, Grenoble, 2 221 (1970)
(5) Nagata, F., Fukai, K. : 9th Int. Congress Crystallography Proc. 200 (1972)
(6) 深見　章，村上　悟：電子顕微鏡，9　4（ 1974 ）
(7) Matricardi, V. R., Moretz, R. C., Parsons, D. F. : Science 177 268 (1972)

(8) Hui, S. W., Parsons, D. F., Comden. M.: Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A. 71 5068 (1978)
(9) Fukami, A., Murakami, S.: J. Electron Microsc., 28 S-41, (1979)
(10) 深見 章：日本大学文理学部自然科学研究所 研究紀要No. 11 51. (1979)

Environmental cell法の応用

村上 悟（東京大・教養）

Environmental cell (ECと略記する)は，水を含んだ空気，O_2，N_2，CO_2，He など種々の気体を試料のまわりに供給しながらその微細構造を観察するために作られた特殊な小さな試料室であり，医学生物学の研究では種々の生体構造を水を含んだ状態で観察するのに用いることができる。[1,2]したがって試料の構造と機能に対する電子線と増コントラスト処理の損傷作用が排除できるなら，細胞や細胞小器官の運動，生体膜の動態，生体高分子（集合体）の機能や活性に伴う構造変化，in vitroでの構造形成などを直接観察する方法として多くの可能性を持っている。[3] ECのそのような特徴と可能性を実現するためには試料温度の精密な調節機構，液体灌流機構，光照射機構などを備えたECを開発しなければならない。また，EC への気体の供給を止め排気することによって，さらに水蒸気を含む気体を再供給することによって，試料の含水状態，脱水状態，再加水状態での構造とその変化を直接，連続的に観察することができる。[4] 観察しようとする構造が結晶性のものであれば，種々の実験条件下で電子回折法を有効な手法として用いることができる。このような構造の動的状態の観察は，生物試料の場合，EC法でのみ実現可能な研究課題であり，真空下で観察する通常の電子顕微鏡法では行えない。

これまでに開発されているEC には隔膜を持つ閉鎖型のものと差動排気機構を持つ開放型のものがあり，[5]どちらも電子顕微鏡像の観察と電子回折による構造解析に用いることができる。われわれが用いているECは隔膜型であり，それを 100KV電子顕微鏡に組込み，ウィルス，ファージ，生体膜，パラミオシンなど数 100Å 以下の薄い試料を用いて実験をすすめてきた。[3]適当な方法で十分なコントラストが与えられれば，生物試料でも 30Å の分解能が得られている。[4]

超高圧電子顕微鏡では電子の透過力が大きいから，薄い試料であれば試料損傷の軽減と高分解能が期待される。これまで超高圧電子顕微鏡に組込んだEC

を用いて遊離細胞や培養細胞をそのまま生きた状態で観察しようとする試みがなされているが，そのような厚い試料では内部とまわりにある厚い水の層による電子の散乱と複雑な内部構造の積重なりのため光学顕微鏡を越える分解能は得られず，電子線照射と温度上昇による試料損傷もはげしく，思わしい結果が得られていない。[6] 厚い試料の構造を観察する場合，ステレオ観察法は有用な手法であり，超薄切片ではよい結果が得られているが，EC 法による構造の動的観察には用いることができない。生物試料には結晶性の構造はそれほど多くはないが，脂質分子膜，酵素蛋白質結晶，生体膜，細胞壁などの構造解析には電子回折法（微小制限視野回折，小角電子線散乱法）を用いることができる。[7] 超高圧電子顕微鏡の開発の初期から，生きた細胞の観察が一つの目標とされてきたが，厚い試料よりはむしろ薄い試料を用いて高分解能における動的観察を目指すべきであろう。細胞外に単離した細胞器官，生体膜，生体高分子集合体が水を含んだ状態で，何らかの機能を保持しているならば，完全な状態ではないにしても生きている状態を示していると考えてよいであろう。

超高圧電子顕微鏡の場合も 100 KV の場合と同じように，試料損傷の軽減，最小電子線による観察と記録，コントラスト付加法（生体試料の構造と機能に損傷を与えない増コントラスト法）など，今後解決しなければならない多くの問題がある。〔試料の電子線による損傷〕：ポリエチレンラテックス粒子や収縮性蛋白質パラミオシンの結晶を用いたわれわれの実験結果では，電子線照射による試料の損傷が可視的な構造変化として認められるようになるためには $10^{-3} \sim 10^{-2}$ amp／cm² 以上の照射が必要であった。[1,2] したがって $10^{-4} \sim 10^{-3}$ coulomb／cm² 以下の弱い電子線照射で観察すれば，分子レベルでの損傷はあるとしても，電子顕微鏡で観察できる微細構造にそれほど顕著な損傷は認められず，動的観察を行うことができる。[4][8] カタラーゼやヘモグロビンのような酵素蛋白質の結晶では，含水状態であれば数 Å 以下の分解能で高次の回折まで得られるが，脱水によって消失する。この場合，電子線照射量が $10^{-4} \sim 10^{-5}$ coulomb／cm² であれば目立った損傷（回折像の消失）は認められない。しかし，いずれにしても電子線の総照射量は通常の電子顕微鏡観察よりはずっと少なくなければならない。イメージインテンシファイヤーや TV モニターシステムは極低電子線量での視野探しと低倍率での観察には有効であるが，高分解能の観察には制約がある。〔コントラスト付加法〕：オスミック酸，酢酸ウラン，鉛化合物などは生体の機能に阻害作用を持つから EC 法での動的観察には好ましい増コントラスト剤ではない。グルコースは試料の水を保持するのに有効で

あるが，生体膜のような薄い試料が薄いグルコース液層に覆われているとき，それだけでも可成り十分なコントラストが得られる。[8]重い原子による置換や化学修飾，電子線を散乱させるマーカーの結合などもコントラスト付加法として検討する必要がある。走査透過型電子顕微鏡（STEM）による暗視野観察は100 KVの場合，数100Å以下の薄い試料で有用であった。超高圧ではより厚い試料の暗視野コントラスト法が有用かもしれない。また，非弾性散乱電子が像とコントラストの形成にどのように寄与しているかを実験的に理解することは，無固定・無染色の生体試料をEC法で観察する際のコントラスト付加法の開発に役立つであろう。

1) 深見章，村上悟：電子顕微鏡 9，4～19（1974）.
2) 深見章：日本大学文理学部自然科学研究所「研究紀要」第11号．51～69（1976） 3) Fukami, A. & Murakami, S. : J. Electron microsc., 28, Suppl. S-41～S48（1979） 村上悟：代謝．16：1～4（1979）.
4) Fukami, A. : Proc. 6th Eur. Congr. E. M., Jerusalen 2, 63～68（1976） 5) Parsons, D. F. : Science, 186, 407－414（1974）
6) Parsons, D. F., Matricardi, V. R., Subjeck, J., Uydess, I. & Wrag, G. : Biodrim. Biopligs. Acta, 290, 110－124（1972）, Parsons, D. F., Uydess, I. & Matricardi, V. R. : J. Microscopy, 100, 153－167（1974） 7) Hui, S. W. & Parsons, D. F. : Adu. Tech. Biol. E. M. Ⅱ, ed. J. K. Koehler, 213－255, Springerverl.（1978）
8) Murakami, S., Fukushima, K. & Fukami, A. : 1×Iut. Congr. E. M., Toront Ⅱ, 54－55（1978）

医生物分野における超高圧電顕応用の反省

浜　　清（東京大・医科学研究所）

超高圧電顕（HVEM）の長所としては，電子線の透過能の増大，従って厚い試料観察が可能となる事，電子照射による試料損傷が小さい事，分解能が上ることなどがあげられる。現在迄の世界各国におけるHVEMの生物試料への応用の実例をみると殆んど第1の長所を利用した厚い試料の観察に限られており，私自身の実験もその範ちゅうを出ない。ECを利用した観察の場合にも細胞観察の試み，或は溶液中のサンプルの観察に固就したため多くの成果をあげる事ができなかった。今後の生物HVEMの方向としては厚い試料観察の他に，中等

度に厚い試料あるいは薄い試料での高分解能，低損傷をフルに生かした観察の方向に重点がおかれるべきだと考える。この分野では特にECを利用した，含水状態での生体高分子の観察などが可能であるし，そのためにはコントラストをつける方法，記録法，画像処理法，などについて工夫がなされるべきであると考える。又，高加速電圧のみが上述の長所を得る唯一の方法でない事も注意すべきである。SEM法も厚い試料の観察に有効な手段であり，収差による像質の低下は色収差計数および球面収差係数の小さなレンズを用いる事により或る程度緩和できる。又，電子線による試料損傷は低ドーシスの観察法を工夫する事によって或る程度まぬがれる事が出来る。

高加速電圧では当然コントラストの低下を来すので或る厚さの試料に対してはそれに適当な加速電圧がある。このような条件をうまく組み合せてHVEMを生物試料観察に積極的に利用して行くことが望ましい。

課　題　名　シンクロトロン放射光の生理学への応用（1980. 3. 18～19）

膜のX線回折　阪大　基礎工　三井利夫**

チャンネル蛋白の構造　阪大　教養　高木雅行**

筋肉のX線回折　東北大　医　松原一郎**

シンクロトロン放射光の時間分割蛍光法への応用の可能性

名大　理　御橋広真**

骨格筋収縮時の動的X線回折　帝京大　医　杉　晴夫**

シンクロトロン放射光を用いたX線結晶構造解析の将来性

名大　理　坂部知平**

参加者

高エネルギー研　高良和武**　東大医　江橋節郎**　東大理　安楽泰宏**

東大理　中村春木**　横浜市大医　吉岡　享**　金大医　本陣良平**

生理研　亘　弘　生理研　山岸俊一　阪大基礎工　猪子洋二**

阪大基礎工　川口　健**　阪大基礎工　難波啓一**

九大理　大和田　勝久**

および参加者全員　（順　不　同）

抄　録　細胞内組織のX線的研究とシンクロトロン放射

三井　利夫（大阪大・基礎工）

まず序論的なことを話すようにとのことなので，表題のようなことを述べ，ついで生体膜の通常のX線源を用いての研究を紹介する。

細胞内組織のX線による研究では次のことが基本的に重要である。

(1)　X線結晶学等に比べ，構造に関する確かな情報の量は少く，総合的に情報量を多くする努力が必要（例えば異常分散の利用など）。

(2)　実験データに内包される構造上の情報をできるだけ多く引き出す方法，つまり解析法にまだ未開の点が多く，その開発が必要。

(3)　特に生理学との関連では構造の時間的変化を追うことが望まれる。

構造研究については，電子顕微鏡が有力な方法であるが，試料作製中の構造

変化に危惧の念がつきまとい，また動的な研究は困難である。X線的方法はこれと相補的であり，現在次のような研究法がある。

(a) X線小角・中角散乱法のような回折学的方法。

(b) 軟X線顕微法。これはリソグラフィ法と走査型電顕を組み合わせる方法である。（分子研のシンクロトロンを用いての実験も行われる？）

(c) EXAFS法。これはX線領域の分光学であるが，スペクトルが分子内の回折現象と関係しており，構造上の知見を与える。

フォトン・ファクトリーでの生物研究をめざす生物・回折の研究者のグループがあり，その中に小角・中角散乱用回折計の設計のためのワーキング・グループがある。メンバーは植木龍夫（阪大），橋爪弘雄（東大），若林克三（阪大），若林健之（東大），柊弓紘（京大）である。回折計としては筋肉の動的構造解析用と，酵素反応・高分子溶液用の2つの設計が進んでいる。

生体膜用の回折計は次期計画に入っているが，さしあたっては上記2つの回折計を利用して研究が行われよう。生体膜のX線回折法による研究例として，サルモネラ菌の外膜，大腸菌の細胞膜，好塩菌H. halobiumの紫膜，光合成膜などの研究を紹介する。

チャネル蛋白の構造

高木　雅行（阪大・教養）

生体膜の大切な機能の1つは，袋状に閉じてモノを通さないこと（分画機能）である—が，それも，Carrier などを用いてモノを選別しつつ吸排する機能が伴わなければ意味がない—これに加えて，生体膜には，有事に，ミリ秒単位で反応できる刺戟受容・情報伝達機能（興奮）がある……ということは周知の通りである。

この興奮の分子機作に関して—受容細胞や神経繊維の細胞膜には，刺戟や電位変化を受けた際，たとえばNa^{+}やCa^{++}を急に（ミリ秒単位で）しかも一過性に透過させる受容チャネル蛋白が在って，これが脂質二分子層膜を貫通している，とされている。

受受容チャネル蛋白に要求される特性としては，まず脂質二分子層膜に入り込み貫通することができる分子構造をもっていること，イオンチャネルをもっていること，そして刺戟受容に際してのみイオンチャネルを開閉すること，などである。このような蛋白質の，ダイナミックな構造変化に基づいた生理機能の解明が，シンクロトロン放射光による研究の主要テーマの１つであろうと予想されるので，受容チャネル蛋白の分子構造に関するいくつかの仮説と，実体のある研究対象として活タコの網膜を用いた実験はどうかという提案をしてみたい。

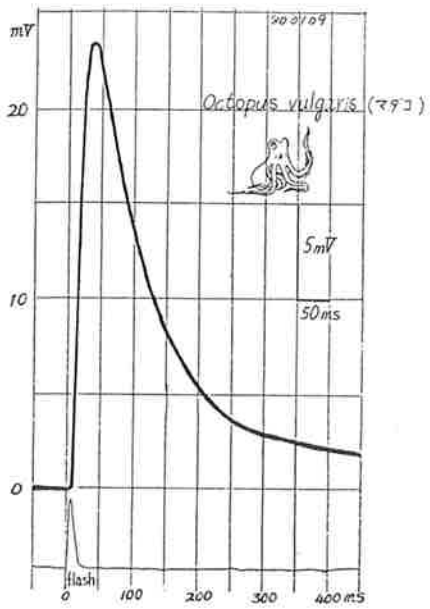
チャネル蛋白が膜に入り込んで貫通するには，脂質二分層の厚さ（ 5nm ）を越す分子長，脂質に接する分子表面の親油性，そしてできれば両端が親水性という特性が要求される。蛋白質のペプチド鎖には各アミノ酸ごとに，親水基 $>C=O$ と $H-N<$ が突出しているので脂質層には溶け込めない。が，α－helix（ bacterio－rhodopsin[1] ），β－barrel（ immunoglobin，super－oxide，dismutase[2] ），β－helix（ gramicidin A，[3] glycophorin[4] ）をつくって，上下あるいは左右のペプチド鎖間に水素結合（ $>C=O\cdots H-N<$ ）をすべてのアミノ酸について成り立たせると，電気的に満足して親水性を示さなくなるから脂質層にもぐり込める（ 親水性残基が分子表面に出ることがなければ）。イオンチャネルは，α－helix の束（ たば ）のすき間，β－barrel の内側，β－helix の内側に親水性残基を露出させると形成されうる。チャネルの開閉は外部刺戟に感応してその分子構造を変えるとか（ gramicidin A[5] ），栓蛋白質が抜けるとか（ glycophorin[6] ）……。

以上のようなさまざまな想像や推測に一応は準拠して，受容チャネル蛋白のダイナミックな構造変化の実態を追跡するにつけて，タコ網膜の視細胞感桿を用いたシンクロトロン放射光による研究はどうであろうか。

活タコ網膜の利点のいくつかを以下に列挙する。

1. 脊椎動物の網膜に較べて，研究対象部分を実験表面に出しやすい。

2. 他の受容チャネル蛋白質（ Ach－receptor，Na^+－channel，…… ）に較べて膜における濃度と，その膜の密度が桁ちがいに高く，かつベクトル刺戟が可能である。



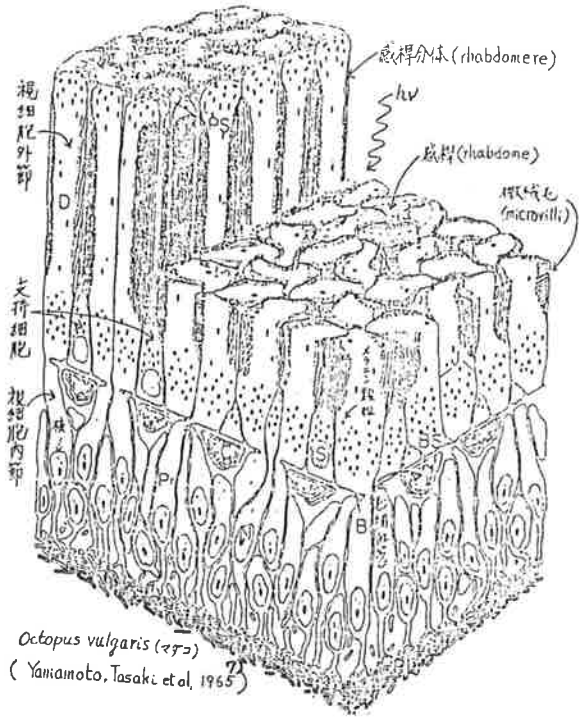
3. 脊椎動物のロドプシンは光吸収によりレチナールを放してしまうので，再生能率が低く，強光照射をくり返すわけにはゆかないが，無脊椎動物の場合はロドプシンはレチナールを放さず光再生するのでくり返し反応できる。

4. 膜部分を容易に分画して，vesicle状にしたり，油／水界面に吸着して研究できる[8]が，活タコ網膜のように，くり返しチャネルの開閉を行わせることができない。活タコ網膜だと O_2 の存在下に100回以上，10時間以上もくり返し反応する。

5. 神経の Na^+ -channelの開閉のように数ミリ秒でresponseが終わるのではなく，視細胞のそれは数100ミリ秒に及ぶので解析が行いやすい。

6. 無脊椎動物のうちあまり小型でなく，年中，活の状態で，どこででも手に入るのはタコだけである。

以上に関連して，microvilli membrane fragmentを油／水界面に吸着させた場合と，網膜をそのまま用いた場合の研究結果を報告する。



1. Henderson, R. and N. T. Unwin (1975) Nature 257, 28.
2. Mathews, B. W. (1976) Annu. Rev. Phys. chem.

27, 493.
3. Urry, D. W. (1971) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 672.
4. Kennedy, S. J., et al (1977) Biophys. J. 17, 87a.
5. Urry, D. W. (1972) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 1610.
6. Tosteson, M. T., D. C. Tosteson (1977) Biophys. J. 17, 86a.
7. Yamamoto, T., et al (1965) J. Cell Biol. 25, 345
8. Takagi, M. (1980) Photochem. Photobiol. in press.

筋肉のX線回折

松原　一郎（東北大・医）

筋生理学と高速X線回折　　筋収縮のメカニズムを解明するには，収縮に伴う分子形態の変化を知る必要がある。つまり，ミオシン分子とアクチン分子が反応して収縮力を発生するさい，両者がどのような形態変化を起こすかを調べなければならない。現在のところ，このような観察を可能にする唯一の手段はX線回折法である。

分子形態の変化を捉えるには，分子の動きに見合った速度でX線回折像を記録する必要がある。最近，X線類の高輝度化と記録器の高速化によって，数ミリセカンドの時間分割で分子像を追跡できるようになった。この高速X線回折によって得られる知見は，筋収縮のメカニズムの解明に大きく寄与しつつある。

筋肉から記録される回折波を二つに分類することができる。ひとつは筋肉の長軸と直角な方向に生じる一群の反射で，赤道反射と呼ばれる。他は筋肉の長軸に沿って生じる一群の反射で，子午反射と呼ばれる。ここでは，それぞれの反射群から得られる知見と，その限界について述べる。

赤道反射　　サルコメアの内部で太いフィラメントと細いフィラメントが一定の横間隔を保って配列していて，その配列によるプラッグ反射が赤道反射である。赤道反射に基いて解析を行うと，サルコメアの横断面の電子密度分布（正確には横断面への投影図）が求められる。いままで高速記録された赤道反射は低次の二本の反射，つまり1,0反射と1,1反射に限られている。そのため低い分解能でしか電子密度分布が得られない。じっさいの分布図には，二種類のフィラメントの断面が認められるが，個々の分子に相当する構造は見られない。筋肉を刺激すると太いフィラメントの直径が減少し，細いフィラメントの

直径が増加する。これは，太いフィラメントに沿って配列していたミオシン分子の頭部が，収縮にさいして細いフィラメントのアクチンに向って移動するため，太いフィラメントの見かけの質量が減り，細いフィラメントのそれが増えることによって起こる変化であろうと解釈されている。われわれは，この変化を分子動態のおおまかな指標に用い，次のことを見出した。 (1) 分子変化の開始時は，張力の発生開始時と一致する。 (2) 単一パルスで筋肉を刺激したときの「単収縮」と，反復パルスで刺激したときの「強縮」を比較すると，単収縮では最大収縮張力が小さいにもかかわらず，最大分子変化は強縮と同じ程度に起こる。 (3) 反復パルスを中断したとき，筋肉の張力と硬さは速かに静止時の値に戻るが，分子像は数秒遅れて元に戻る。

最後の結果は，二本の赤道反射がミオシンとアクチンの結合解離を正確には反映しないことを示す（少くとも，結合解離に応じて瞬間的には変化しない）。この限界を克服するには，上記の分解能を改善する必要がある。

子午反射　太いフィラメント内部のミオシン分子の周期的重合や，細いフィラメント内部のアクチン分子の重合によって，筋肉の長軸方向に子午反射と層線が生じる。ミオシン分子の頭部は，静止時には太いフィラメントの周囲にらせん状に配列しているが，収縮にさいしてフィラメントから放射する方向，または軸の周囲方向に動く。その運動の詳細に関して次の結果を得た。

(1) 近くにアクチンがないとミオシン頭部は動かない。 (2) 収縮にさいしてミオシン分子の重合様式が変化する。 (3) 二種類のフィラメントが相互に滑り合っていないとき，ミオシン頭部はミオシン固有の周期に従ってフィラメントの軸方向に配列しており，軸方向に大きな首振り運動を繰り返している形跡はない。 (4) 二種類のフィラメントが滑り合っているとき，ミオシン頭部が軸方向に動く。

これまでの方法による研究の限界は，アクチンの分子変化が捉えられていないことである。ここでは，上記の子午反射の結果に基き，収縮のメカニズムに関するいろいろな分子模型の適否を検討する。

検討の結果を次のように要約できる。 (1) ミオシン頭部がミオシン固有の重合周期を保ったままアクチンと反応するためには，細いフィラメント内部でのアクチンの位置に可変性がなければならない。 (2) 現在用いられている分子模型では，収縮中にフィラメントが滑り合っていない時でも，ミオシン頭部がフィラメントの軸方向に首振り運動をしている。上記の結果は，この首振り運動の存在に関して否定的である。もし首振り運動があったとしても，その角

度変化がごく僅かであるか，又は各瞬間に大多数のミオシン頭部が一定の角度をとっていると考えないと，子午反射の強度変化を説明できない。

シンクロトロン放射光の時間分割蛍光法への応用の可能性

御橋　廣眞（名大・理）

蛍光現象の観測技術に，ここ10年ばかりの間で，(i)ナノセカンド（10^{-9}秒）のフラッシュランプによる励起法と(ii)シングルフォトン計数法による時間分割測定が導入され確立されたため，蛍光の発光過程と蛍光の異方性の減衰過程が直接観測されるようになった。この方法を生物系に応用しタンパク質分子内あるいは分子間の種々の反応機構を10^{-10}～10^{-6}秒オーダーの動的現象として把えることが盛んになってきている。

ここでは，まずパルス蛍光法の基本原理を概観し，次に現在普及している装置の特性と限界について述べ，励起光としてシンクロトロンの放射光（SOR）を用いた場合の利点について検討してみる。

1. 時間分割蛍光法の生物系への応用

時間分割蛍光法によってえられるパラメーターは，基本的には蛍光寿命，蛍光異方性と回転緩和時間の三つである。生物系に応用するにあたっては，固有の蛍光分子（タンパク質ではトリプトファン・ケロシンなど，または，固有のリガンドなど）の発光を測定するか，あるいは，分子の反応性を利用して化学的に蛍光分子をラベルする。後者の方法は特定の分子または部位を選択的にラベルできるので応用は広い。特に適当な波長に発光帯をもつ分子(D)と吸収帯をもつ分子(A)を選択的にラベルしD→A間の励起エネルギー移動による蛍光寿命の変化を測定すれば，二つの分子（または部位）の間の空間的配置（距離と方向）について動的な知見がえられ，特に生物系への応用として将来性の高い方法と考えられている。

2. 時間分割蛍光法の原理と制限

まず，蛍光分子の励起 to から発光 ti までの時間差，ti−to，を正確に測定することが基本である。

蛍光分子の発光は確率的な現象であるから，発光の減衰曲線 n（t）をえるためには，励起・発光・測定のサイクルを通常，数十万回繰り返してそれぞれ

のti-toを対応するMCAのチャンネルに積算してn(t)を求めねばならない。通常の測定では数kHzの周期でフラッシュランプを放電させるが，二光子現象を除外するためにカウント数を抑えるから，一つの減衰曲線をうるのに数時間を要する。蛍光の異方性の測定では，その二，三倍の測定時間が必要になる。すなわち，フラッシュランプ法の第1のしかも最大のlimitationはその所要時間である。シンクロトロン(SOR)放射光は数MHzの周期でえられるので測定時間が僅か10分程度に短縮される。第2のlimitationは励起波長の制限である。フラッシュランプにN_2ガス(または空気)を用いると紫外部領域に輝線スペクトルがえられる(337nm，358nmなど)。しかし，この波長領域で励起される蛍光分子は極く限られる。SORでは可視光一紫外一X線領域と連続なスペクトルがしかも高い強度でえられる。連続スペクトルをえるために現状ではH_2ガス中の放電を用いているが，実際には種々の困難がつきまとう。今後，盛んになると思われる励起エネルギー移動法では励起波長の制限さえ取除かれれば，励起エネルギーの供与分子と受容分子の選択の範囲がうんと広くなる。第3のlimitationはフラッシュランプの強度の時間分布が2～5 nsecの時間幅をもっているために，MCAに貯えられたカウント数の分布n(t)は真の蛍光強度の減衰曲線S(t)とコンボリューションの関係をもっていることからくる。

$$n(t) = g(t) * S(t)$$

ここでg(t)はフラッシュランプの時間幅および光電子増倍管と電子回路の応答関数に依存する。したがってフラッシュランプの幅が狭ければ狭いほど解析の精度が上がり，しかも，より速い反応が測定できることになる。実際には，g(t)を別途に測定し，S(t)の予想曲線(理論曲線)とのコンボ

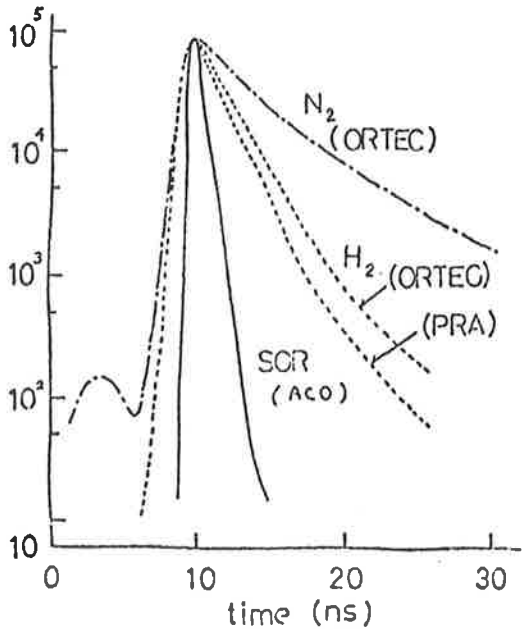


図1. フラッシュランプの波形とSOR(ACO)のパルスの波形との比較。
SOR(SPEAR)のパルスもほぼ同様のものが報告されている。

リューションを行い観測されたn(t)とのfittingの良さを比較する操作が必要になっている。g(t)の幅が大きい程解析の任意性が大きい。SOR の時間幅は，理想に近い程に狭い（図1）。

ここでは，ACO（Orsay）の最近のデーターとSPEAR（Stanford）の報告などを見ながら上記の三点について検討したい。

1. Ph. Wahl in “New Techniques in Biophysics and Cell Biology”（1975）
Pain, H. et Smith, B. Edts. vol. 2. 233.
2. J. C. Brochon et al（1979）“Rapport d'Activite'”
de L. U. R. E.（Orsay）
3. B. Alpert et al（1979）Photochem. and Photobiol. 30, 479－481.
4. I. Munro et al（1979）Proc. N. A. S.（USA）'76, 56－60.

骨格筋収縮時の動的X線回析

杉　晴夫（帝京大・医）

骨格筋の収縮は二種のフィラメント間の滑りによっておこるが，フィラメント間の滑りをおこす機構はクロスブリッジの運動によると一般に考えられているが依然として不明である。この原因は生きた筋肉を用いる生理学的実験の知見と，抽出した収縮性蛋白の溶液反応を調べる生化学的知見が直ちに結びつかないことにある。高速X線回折は生きた筋肉の収縮時に筋フィラメントの構造変化に関する知見を得ることができる貴重な方法である。筆者は1977 年以来東大工学部の橋爪講師，雨宮氏とともにカエル骨格筋収縮時の赤道反射に関する研究をおこなっている。以下はその結果の概要である。

1. 強縮中の筋を伸長したさいの赤道反射強度比の変化～等尺性強縮張力のピークにおいて筋をゆるやかに伸長すると，伸長完了後張力は筋節長に比して高い値にとどまる。このさい赤道反射強度比（$I_{1.0}/I_{1.1}$）は伸長の前後で変化しない。この結果は伸長後の張力増大が個々のクロスブリッジの発生する力の増大によることを示唆する。

2. 等張性短縮時の赤道反射強度比の変化～軽い荷重（0.03 Po）下に短縮中の筋肉の赤道反射強度比の経過の動的X線回折（時間分解能 20 msec）をおこなった。$I_{1.0}/I_{1.1}$の値は短縮開始とともに減少して一定値（0.8～1.0）

に達し，弛緩の開始までこの値を維持する。この値は等尺性単収縮時に達する値（ 0.5 ）よりも大きく，軽い荷重下の短縮に関与するクロスブリッジの数は等尺性収縮時よりも少いことを示唆する。なお中程度の荷重（ 0.3Po ）での短縮時の値（ 0.5 ）は等尺性条件下と同じであった。

3. 慣性の大きな荷重にたいする短縮時の赤道反射強度比変化～慣性の大きな荷重にたいして筋肉が短縮するさいには等張性条件が成立せず，筋の張力は荷重が最大に加速される以前に上昇してピークに達し，短縮持続期間中に急激に減少してゆく。このさいの強度比変化は張力の変化とほぼmirror imageをなし，強度比が筋肉の張力発生と密接に関係することを示している。

4. 急速開放時の赤道反射強度比変化～等尺性単収縮時に筋肉の長さを急激に減少させる（急速開放）と張力は急激に減少しついで再び上昇してゆく。張力をちょうどゼロにおとすような長さ変化で急速開放をおこない，この前後における赤道反射強度比の変化を時間分解能 10 msec で調べたところ， 強度比変化にはほとんど変化のないことがわかった。滑り模型によれば張力の再上昇に先行して結合クロスブリッジ数の減少が期待されるので，この結果は滑り模型と合わない。この実験はさらに継続中である。

シンクロトロン放射光を用いた巨大分子X線結晶構造解析の将来

坂部　知平（名古屋大・理）

X線結晶構造解析のうち特に巨大分子の解析の飛躍的な発展は強力なX線源やX線検出器系などの開発並びにコンピューターの進歩に負うところが大きい。

シンクロトロン放射光（SOR）は強度が従来のX線光源に比較して桁違いに強いこと及び波長が連続的であることから，魅力的な光源として蛋白質結晶構造の解析を行っている人々にも注目されている。その理由は第1に光源が強力であるため結晶からの反射強度が十分得られず解析が不可能であるとされていた微小結晶しか得られない蛋白質の構造解析が可能になり，さらに集収できるデータの範囲が従来より大巾に高角度まで広がること，つまり高分解能の解析が可能になること。第2にデータ集収にかかる時間が今までの 1／50 ～ 1／100 程度軽減され，しかも結晶のX線による損傷がみかけ上 1／2 から 1／4 に減少すること。第3には波長が連続的に分布していることから波長を変化させて異

常分散を測定できるようになるため1種類の重原子を含む結晶を用いて構造が解ける（細谷の方法[1]）可能性が増すことなどである。 これらのことを考慮するとSOR の利用にともない解析される蛋白質の種類や数は大巾に増加ししかも解析の精度も一段と高くなることが予想される。

次に，私達のグループで行われているG-アクチン・DNaseI複合体結晶の解析をブタ2亜鉛インスリン結晶構造の精密化の研究結果を紹介し，SOR を利用した場合どのような発展が予想されるかを述べる。

1. G-アクチン・DNaseI複合体の結晶構造解析

アクチンの3次元構造を明らかにすることは筋肉収縮や細胞運動のメカニズムを分子レベルで理解するために必須である。しかしながらG-アクチンの結晶は非常に小さくそのためその構造を得ることは現在のところむずかしい。そこで比較的大きな結晶が得られるプロフィルアクチンとG-アクチン・DNaseI複合体[4]などについて構造研究が進められている。 我々のグループでは粘菌変形体G-アクチン・DNaseI複合体とニワトリ砂ぎもG-アクチン・DNaseI複合体結晶が調製[5]され，後者については重原子誘導体としてG-アクチンのpCMB誘導体とDNaseI との複合体が調製された。両者の結晶学データ並びに回折パターンは非常によく似ていることから両結晶の間で同型がかなりよく成立していることが示唆された。しかしながら，これらの結晶の反射能はあまり良好ではなく，5 Å以上の分解能の領域では反射強度は著しく弱くしかもX線による損傷を受け易い。分解能5 Åの解析では分子の形がわかるにすぎないのでSOR を使いより高分解能のデータを集収し原子レベルの解析を行いたいと考えている。さらにこの結晶は表1に示されたように格子定数が比較的大きく，集収すべき反射の数も多いことから，データ集収にかかる時間も大巾に短縮されるものと予想される。

2. ブタ2亜鉛インスリン結晶構造の精密化

インスリンはホルモンでありしかも糖尿病の特効薬であるところから膵臓内分泌研究は長年インスリンを中心に進められておりその構造研究もその中で大きな役割を果してきた。この結晶は蛋白質結晶の内では特別反射能が高いので我々はすでに蛋白質結晶解析において現在最高の分解能である1.2 Åまでのデータを封入管式X線管球（最大出力1.2 kW）を用いて集めることができた。このように高分解能のデータを用いて結晶構造を精密化するといくつかの新しい知見（表2）が得られた。そのうち生理学的に最も重要なものは蛋白質をとりまく水の構造であると考えられる。将来は温度変化や溶媒

の変化が水の構造に及ぼす効果を調べる予定である。なおSOR を用いてより高分解能のデータを集めるためにモノクロメータと特殊カメラの作製を進めている。

表1. Chicken gizzard G-actin・DNase I complex

M.W. G-actin 43,000・DNase I 31,000. Complex 74,000

Crystal size 0.5 ×0.1×0.05 mm^3

Cell dimensin a=42.0 Å, b=225.3 Å, c=77.4 Å, $\alpha=\beta=\gamma=90°$

分解能	独立な反射数	測定すべき最低の反射数	情報
5 Å	3, 071	$3071\times2^a\times3^b\fallingdotseq19{,}000$	分子の形
3 Å	14, 221	$14221\times2^a\times3^b\fallingdotseq86{,}000$	主鎖がみえる

a) フリーデル対　　b) 結晶の種類

表2. 精密解析により得られた新しい知見

結　　果	新しい知見例
1. 大部分の原子座標が誤差 0.1 Å以下になった。	• 2次構造中の細かい変化
2. 90％以上のインスリン分子の水素原子が確認された。	• 側鎖の解離状態（H:S） • 水素を含めた疎水基間の相互作用 • 水素結合
3. 異方性温度因子が精密化された。	• 分子全体並びに局部的なゆらぎ，各原子のゆらぎの方向と大きさ
4. 大部分の水の位置が決定された。	• 蛋白と水との相互作用

引用文献

1) 細谷資明ら　応用物理 47 708 (1978).
2) Oriel, C. et al. FEBS Letters 73 89(1977).
3) Carlssm, L., et al. J. Mol. Biol. 105 358(1976).
森川利信 (MRC. Cambridge)
4) Mannberz, H. G. et al. FEBS Letters 60 34(1975).
5) Sugino, H. et al. J. Biochem 86 257(1979).
6) 江馬武博，近藤博司ら　日本生物物理学会　第17回年会予稿集　270(1979)
7) 坂部知平，坂部貴和子，佐々木教祐，蛋白質，核酸，酸素 24 582(1979).

昭和55年度
研究会

課題名

Learning and Plasticity (1980. 4. 26)

Eric R. Kandel*(Columbia Univ.)

Neuronal Plasticity in the Mammalian Central Nervous System.

Nakaakira Tsukahara (Department of Biophysical Engineering, Faculty of Engineering Science, Osaka University, & National Institute for Physiological Sciences)

Cell Biological Approaches to the study of Learning.

Eric R. Kandel (Division of Neurobiology & Behavior, Department of physiology, Columbia University, New York)

General Discussion (Kisou Kubota, Institute for Primate Research, Kyoto University)

概要

「学習」は神経科学の中心課題であると同時に，精神医学の重要課題でもあるが，その機構を理解するには，その基礎をなす神経回路を同定し，変化の起る部位を決定する必要がある。

我々 (Kandelら) は「学習」を研究するのに充分な程度高度な知能を有し，かつ比較的単純な神経回路をもつAplysiaを用い，その〃えら引込め反射〃の慣れ (habituation) と感作 (sensitization) の神経機構の研究をおこなった。その結果慣れはこの反射に関与する運動ニューロンや介在ニューロンと接続する感覚ニューロンのシナプスから放出される伝達物質の減少によることを見出した。

伝達物質の放出は，シナプス前終末の Ca^{++} に依存することが知られているが，我々はこの慣れの起るシナプスでシナプス後電位の減少と平行して，終末に流入するCa－電流が減少することを見出した。我々は慣れの性質をさらに探索するために，これと鏡像関係にある感作の研究におこなった。

上記の慣れを起したシナプスでは結合枝の刺激によって促通が起こり，伝達物質の放出量の増加が起る。 結合枝は腹部神経節へ信号を伝えているが，神経節にセロトニンを与えるとシナプス伝達の促通が見られ，感覚ニューロンにサイクリックAMP注入してもシナプス前促通が起った。 これらは感覚神経線維の活動電位の持続を増加させる，即ちシナプス前線維の膜に流入する Ca^{++} 電流の持続を増加させることによると考えられる。

Ca－電流持続の増加のメカニズムとして①Kー電流の減少のを介する間接的な現象か②Ca－電流自体が変化したのかの2つの可能性が考えられるが，TEA，4ーアミノピリジンの投与及びCa^{++}のBa^{++}による置換によってすべてのKーチャンネルを遮断すると，セロトニン投与や感覚入力刺激ではもはや内向き電流を増加させないことから，①の可能性が強いと考えられる。

Ca－電流の修飾はこのような短期可塑性の基礎であるばかりではなく，シナプス結合の発生に関係し，長期学習の基礎となる長期可塑性の機構としても有力な候補ではないかと考えられる。　　—E. R. Kandel—

本研究会では，Kandel教授の発表の他に，当研究所の塚原仲晃教授が，猫の中脳赤核細胞におけるシナプス結合の可塑性に関する研究に関する発表をおこない，①成熟猫の赤核細胞では対側の中位核破壊によって同側の大脳感覚運動領からの投射に側枝発芽が起ること，②仔猫ではより著明な可塑性が見られ，同側の大脳皮質の破壊によって，対側の大脳皮質や中位核から新しいシナプス結合が形成されること，③発芽は必ずしも脳の一部を破壊しなくても起ること，④猫で古典的条件付に成功し，それが赤核を介して起っているらしいことなどを発表し，高等動物で，行動レベルでの可塑性のニューロンレベルでの基礎過程の解明に向って研究が進んでいることが示された。

課　題　名　**神経生理学で独創的研究を生むための諸条件の研究**
（1980. 5. 17.～ 5. 18）

久保田　競　（京大・霊長研）　　岩村　吉晃　（東邦大・医）
御子柴克彦　（慶応大・医）　　篠原　義一　（東京医歯大・医）
金子　章道，塚原　仲晃，外山　敬介，大塚　輝彌，村上富士夫，田内　雅規
（生理研）

概　　要

日本人の研究には　独創性のあるものは　少ないとは　たえず　言われる批判である。　70年代の　後半になって　創造性の議論が　とくに　活発になってきたように　思える。　日本の科学と技術のレベルが　欧米並になったとの　自負心が　この傾向を　助長している。
日本人の　生理学の研究にも　このことが　一般論としてあてはまる。

そこで　創造的な　生理学の研究とは　どんなものか　どのように行うべきかについて　考える　研究会を企画した。　勿論一回の会合で　結論は　でるものではなく，　1～3年毎に　会をひらき　息永く　考えつづけて　いけばわれわれの研究に影響するような　結論と効果が　えられると　思われる。

第一回の会では　創造性とは何か，なぜ　日本人の研究に創造性がないかについて　考えを出し合った。　成程と　思われる意見がでて，　結局　独創性のなさは　日本人の文化の問題のように思われた。
次回には　日本の生理学者の　独創的な研究の具体例をとりあげ，　それらがどうして生れたかを　吟味したい。

以下　独創性のない理由として考えられたものを列挙する。

1. 日本は　問題を解くのは得意であるが　問題をつくるのは下手である。
2. 筋の通った討論をしない。討論しなくても　お互いが理解しあえる。論争を好まない。
3. 自己主張をしない。我慢することを教えられている。すぐあきらめる。
4. 研究の失敗に対して寛容でない。
5. 休暇をとらないで　よく働く。従って　落ちついて考えることをしない。
6. 科学と哲学の伝統が　うけつがれていない。

7. 専門領域が　せまい。

8. 知的好奇心をみたすために　研究を行っている人が少ない。

9. 研究の成果に対する　Reward（研究費，給料）が　少ない。

10. 科学研究のやり方の訓練が　制度として　行われていない。

課　題　名　**生理学研究の基本課題（1980. 5. 31～6. 1）**

「生理学研究の現状をどう考えるか」

Subcellular levelから　曽我美　勝（岐阜大）　志賀　健（愛媛大）
杉山博之（生理研）　平野　寛（杏林大）

Cellular levelから　宮本博司（近畿大）　山岸俊一（生理研）
北里　宏（滋賀医大）　菅野義信（広島大）
今永一成（福岡大）　品川嘉也

Organ levelから
筋生理学・日本の現状　酒井敏夫（慈恵医大）
消化機能の種属差と個体差　菅野富夫（北大）
Organ physiologyの立場　星　猛（東大）

Individual, Species levelから　緒方道彦（九大）

「今後の課題」

概　　要　「人体の生命活動の総合的な解明を究極の目標（生理研要覧）」とする生理研において，生理学研究の現状を把握し将来の潮流を探る試みとしての企画であった。分子レベルから生態レベルに至るまで，様々な研究領域と方法論の参加者による討議は，6時間程度の睡眠中断を狭んで24時間，食事中もやむことなく続けられた。

まずは「自己紹介を兼ねた研究紹介」に始まり，個別領域の話題を論じ翌日「今後の課題」に及ぶ予定であったが，24時間で整然とした結論が出るという雰囲気にはなり得なかった。現代生理学の研究傾向として，可及的Simpleな実験条件に基づくClearcutな成果が評価されている。人間のWholenessからは程遠いあちらこちらで研究している以上，相互のOrientationを理解するだけでも時間が必要ということである。発表内容を詳述すれば一巻の生理学テキストが出来そうなので省略。

参加者の感想の中に，「色々なレベルの話，人と動物のギャップなど考え方の上で大変参考になり有益であった」とされたり，「学会では得られない大きいものを得た気持ち」とあったのが，本研究会の成果ということであろうか。

同じ生理学と称しても，方法や材料が多様化・分極化している現状を改めて認識させられた。一方では然し個別の実験データの考察に当って，他領域との積極的な交流の有効性も痛感されていた。そのためには領域相互の適確な位置

づけ，いわば鳥瞰図が必要となる。それに基づく研究者間の有議的な協力体制をどう再構成してゆくのか。相互に自閉的となりがちな研究展開も問題である。その視点から，次の世代の生理学研究者のトレーニングをどうしたらよいかということも論議された。研究の進展は分化を促すとしても，生命現象に関する化学にとって統合は宿命である。人間の生命活動のすべてが，個体化レベルの生体要素の論理を単純に組合せて解明されるとは考えられない。生理研究極の目標は遥か彼方にある。慌てることもないが，時には日本の何処かでperspectiveを論じintegrateされた生理学の未来像を探ることもあってよいだろう。

血漿アルブミン分子の構造転移とMOLECULAR AGEING

抄　　録

曽我美　勝（岐阜大・医）

血漿アルブミン分子は，N-F転移（pH 3.75 − 4.50，0.10MKCl），N-B転移（pH 7.0 − 8.0，0.194MKCl，2.0mM$CaCl_2$），N-A異性化反応（分子内SH S-S交換反応）と呼ばれる3種類の構造転移を示す。N-F 転移は次式で示され，この反応のpH 域における電気泳動測定により，N，F型の2個のピークを観測し得る。pH 4.5 ではN型の単一ピーク，pH 3.75ではF型の単一ピークが観測される。N-F転移反応の緩和時間は1秒以下であるが，例えばPH 4.1に於ける電気泳動測定に於て，数時間以上にわたって，明確にN，F型の2個のピークを観測し得る。この結果は1秒以下の緩和時間より考えて，理論的に矛盾した現象である。

$$N + nH^{+} \rightleftharpoons F \qquad (1)$$

筆者は血漿アルブミンはSTABILITYの異なる分子集団よりなり（MICROHETEROGENEITY），個々の分子は非常に協同現象的な構造転移を示し，これらの因子が電気泳動測定に於て，N，F型に対応した2個のピークを示す機構であることを見出した。

MICROHETEROGENEITY発現機構の研究中，pH 7以上に於て，血漿アルブミンは分子内SH S-S交換反応を示すことが発見された（N-A 異性化反応，A：AGED FORM）。この反応は蛋白質のアミノ酸配列（一次構造）が決まると，立体構造が一義的に決定されると云うAnfinsenの理論に反する現象である。このN-A異性化反応の見掛けの平衡定数のpH-profile

$$N \rightleftharpoons A + rH^{+} \qquad (2)$$

はpH 7より大きくなり，pH 8でほぼ一定になり，その中点pHは，血液pHに大体一致している。この反応は MOLECULAR AGEING とも呼ばれる。N，A型のα-helix含量には，大きな差はないが,A型の分子容はN型の約1.25倍である。またA型は血中に約12%存在している。血漿アルブミンは可逆的にN型よりA型に変化し，A型が容易に酵素分解され血中より消失する。

$$N \rightleftharpoons A + rH^{+} \rightarrow \text{DEGRADATION} \quad (3)$$

赤血球機能 ──綜合と分化──

志賀　健（愛媛大・医）

赤血球の機能としては(1)酸素の運搬（量と速度），(2)血管内での流体力学的な挙動（粘度と変形態）および(3)寿命・代謝活性に関すること，を綜合的に考える必要がある。これらは互いに密接に絡み合っており，割り切ることはできない。とはいえ，現象論に止まりたくない場合には，分子レベルまで立ち入った研究も行った上で，細胞レベルに立ち帰って綜合的考察を行なわねばならない。今後の研究では，この様なレベル間にまたがる綜合化も重要だと考える。

（例1） 体内で老化した赤血球は細胞レベルでみると，上の3つの機能すべてが損なわれている。そこで今少し細胞下レベルの分析を進めると，老化にともなう脂質量の減少，膜流動性の変化，解糖系活性低下などが明白となり，細胞レベルの機能低下の主因とその相互関係をスキーム化できた。[T. Shiga et al., B. B. A., 553, 84－95（1979）]

（例2） 膜コレステロール量が増すと，酸素放出速度が遅延し，粘度上昇と変形能低下が起る。この現象も，実験条件を精密に設定する事により，分子レベルで解釈できる様な実験ができる。主因として膜脂質相変化にともなうリン脂質アシル鎖の運動制限があり，これが膜を「かたく」する一方，酸素の膜内拡散速度を低下させていることを立証できた。

[T. Shiga et al., Biorheology, 16, 363－369（1979）]

生理学研究への細胞培養法の適用：その一例

杉山　博之（生理研）

近年，細胞培養法は技術・装置の面で著しく発達，普及し，もはやかつての如く限られた分野にのみ用いられる特殊な方法ではなくなった。誰でもが，極く日常的な方法として，普通の研究室の片隅で手軽に行える方法になりつつあると言えよう。生理学の分野においても勿論，事情は同じであって，ますます多くの研究が細胞培養法を用いるようになって来ている。この方法には，

1）　基本的要素のみを残して，比較的均一な細胞集団にまで系を単純化できる。

2）　細胞を取りまく環境をかなりの程度任意に制御できる。

というような一般的利点がある。

この方法を用いた研究の一例として，培養系における神経筋接合の研究について紹介した。培養系における神経筋接合は，電気生理学的に見てin vivoのそれと非常によく似た性質を示し，神経筋接合の有効なモデルであると考えられる。そこでの神経細胞と筋細胞との相互作用のメカニズムを調べる上で，培養法の有用さが期待できる。特に，栄養性因子trophic factorを介しての相互作用を調べる上で，細胞培養法が大きな威力を発揮できるのではないかと期待される。

細胞膜研究への細胞化学的アプローチ　── 形態学の立場より ──

平野　　寛（杏林大・医）

免疫細胞化学的手技により，細胞の認識や分化，悪性化の過程等で重要な役割を果すといわれている生体膜糖蛋白や膜に関与する蛋白分子の存在様式をin situで検出し，分子レベルでの膜構造を形態学に基盤をおいた電顕的細胞化学の観点より機能との関連において解明を図ることが可能である。

ヒト赤血球膜のM-N式血液型抗原は主シアロ糖蛋白（PAS1蛋白）に存在するが，その分布をフェリチン標識法を用いて電顕的に観察すると，M抗原とN

抗原の分布の様態は異なっており，その差異は透過像のみならず走査型電顕による立体観察によっても確認される。M-N抗原の担体であるPAS-1蛋白分子の分布及びその移動もフェリチン法により電顕的に観察された。赤血球ゴースト膜に抗スペクトリン抗体を作用させると，M-N活性電顕像が変動し，且膜内粒子も凝集しクラスターをなすことから，細胞膜を構成する内在性及び表在性蛋白分子との間に相互作用のあることが電顕的にも示唆される。

各種レクチンは赤血球膜上で異なる糖鎖或いは糖蛋白と特異的に結合し，それぞれ特有の分布パターンを示す。培養細胞や組織細胞の細胞表面においても特異性の異なるレクチンの分布は異なり，赤血球膜の場合と基本的に同様な傾向を呈する。組織を形成する細胞では細胞の方向性と関連する。例えば小腸粘膜上皮細胞では，いずれのレクチンでも結合部位の数や分布が細胞の頂部，側壁部，基底部の表面で異なっている。甲状腺小胞上皮細胞では，機能亢進状態とレクチン結合部位の増加との間に関連がある。ホヤ初期胚やサル精細胞などでは分化，成熟の過程に応じて，腎尿細管上皮細胞では悪性化に伴い，また筋ジストロフィー鶏赤血球細胞では発症に応じて，一部のレクチンの結合様式に変動がみられる。一方，コンカナバリンAの作用により，ニワトリ赤血球細胞膜の流動性上昇が，電子スピン共鳴法（ESR）を用いて確認される。並行して燐酸化やメチル化等膜代謝も賦活化される。それに伴い膜内粒子分布パターンも変動する。

抗PAS-1陽性反応は，BpHやヒマ凝集素による前処理では著しい影響を受けるが，band 3 蛋白と選択的に結合するCon Aでは変化せず，内在性蛋白分子相互の位置関係を示唆する電顕所見が得られた。

真核細胞では，レクチン等の作用により著しい形態変化をきたす。それに伴い膜流動性や膜代謝過程が変化することは十分にあり得よう。ただしそうした生化学的変化を可視化する細胞化学的手技は未だ確立されていない。しかし形態学に基盤を置いた電顕的細胞化学の方法により，膜高分子の存在様式を in situ で検出し，細胞膜の動的構造を機能との関連において分子レベルで解明を図る道が開けてきたといえよう。

培養細胞を用いたカチオンの膜輸送の研究

宮本　博司（近畿大・医）

furosemide感受性のefflux を除き， HeLa S3 細胞の細胞膜イオン輸送機構はK^+とRb^+を全く識別しない。このためK^+のanalogとして，膜輸送の研究にRb^+を用いることができる。ouabain感受性のRb^+ influx（以下単にRb^+能動輸送とする）は細胞内ATPレベルが正常値より低いときには，そのレベルに比例する。ATPが呼吸系， 解糖系のいずれによって生成されようが，結果は同じである。ATPレベルが正常値（の2倍）以上になってもRb^+能動輸送は増加しない。人工的な電子運送体のphenazine methosulfate（PMS）は，このRb^+能動輸送を促進する作用があり，この作用は細胞内ATPレベルとは無関係である。また細胞内Na^+はPMSによって変化しない。呼吸系に対する主要な電子供与体であるNADHがPMS によって著しく減少することから，PMSは主としてNADHから電子を受けとることがわかる。呼吸阻害剤のNaCN，rotenoneはPMSによるRb^+ 能動輸送の促進作用をさらに強め，また外液をアルカリ性にしても同様な効果が示される。なおPMS を経由する電子の移動率はアルカリ溶液中で増加する。以上の結果から，PMS によるRb$^+$能動輸送の促進は，PMSを運送体としてNADHから細胞膜へ供与される電子によってひきおこされると推定することができる。PMSはRb^+の最大輸送率（ Jmax ）を増加させるが，外液のRb^+に関するKmやouabain結合には影響しない。従ってPMSはK^+ポンプそれ自体を変化させることによってRb^+能動輸送を促進するのではなく， むしろそのポンプに関係のある未知の調節系をenergizeする結果， 促進作用があらわれるのではないかという考えが提唱される。なおPMSの促進作用がquinacrine，triiodothyronineによって阻害されないことから細胞膜の電子受容体は，膜に存在するNADH脱水素酵素以外の物質であると考えられる。

興奮性細胞への生理的アプローチ

山岸　俊一（生理研）

細胞の生理現象に対する研究法としては，これまで20年以上にわたり細胞内電極を用いた，いわゆる電気生理学的手法が通常の手段であった。私がこれまで，膜興奮の研究を進めてきた手法は，主として電気生理的方法であり，これに光顕レベル，電顕レベルでの形態学的知見を対応させてきたといえる。この進めかたで心筋細胞については，ウサギ洞結節ペースメーカーからの心筋内興奮伝播の様式とその組織学的裏づけ洞結節細胞のＴＴＸ耐性，温度特性などの知見と報告した。ザリガニ巨大神経線維を用いた仕事では，Caイオンはじめ，Na，Kイオンや陰イオンの組合わせによってあらわれる膜電位特性を個々のイオンの選択透過性への分解を試み，その上で複数のイオンによる膜への相互作用の結果として，生理的膜電位変化があらわれることを表現した。第3に，灌流イカ巨大神経線維では膜をはさむ溶液系を極力単純化して膜現象を物理化学的に表現を試みる方向へ進んだ。現段階では，膜内外 Cl_2 イオンのみの，準興奮反応の表現，というあたりまで進行した。研究の流れとしては，もっとも単純な溶液系で生理的反応を獲得する，という方向へ進んできた様である。

この先は，分子の挙動に裏打ちされた生理現象の表現という基本過程を意識しながら，もう一面で，細胞の生活ないし形成という，もっとも生物らしい表現をもつ，細胞生理学的アプローチを試みたいという期待をつないでいる。

膵β細胞の電気現象におよぼすNaとCaの効果

北里　　宏，西尾　恭介（滋賀医科大）

膵β細胞は，細胞外液中にglucoseが存在するとき，比較的持続の長い脱分極を周期的に起す。この自発的脱分極の上にspikeが発生する。外液中のglucose濃度を高めると，自発的脱分極間の間隔が短縮すると共にこの脱分極の持続時間は延長し，その上に発生するspikeの数も増加する。細胞外glucoseに対するβ細胞の電気的反応がglucoseとNaとの共輸送と何らか

の形で関係しているのではないかと考え，まず細胞外Na 濃度を変える実験から始め以下の結果を得た。

細胞外Naを取り去ると，静止電位は一過性に過分極方向へ移動した後，脱分極方向へ移動する。この脱分極と共にspike generating potentialの発生頻度は増大する。細胞外にNaが存在するとき，Caを取り去ることによっても静止電位は脱分極方向に移動する。しかし，この場合spike generating potentialの大きさは小さくなり，やがて発生しなくなる。Ca-free Krebs溶液中では活動電位は正常Krebs溶液中より低いlevelから発生するので，spikeの振巾は大きくなるが頻度は減少する。NaもCaも取り去るとspikeは発生しない。

細胞外液にazideを与えると，静止電位は直ちに過分極方向へ移動し，その後徐々に脱分極方向へ向う。azideを与えておきCaを取り去ると静止電位は脱分極方向へ移動するが，Naを取り去っても脱分極は認められなかった。

以上の実験結果は，静止時にはNaがCa channelを細胞外側入口においてblockしているが，Na-free溶液中ではこのchannelがCaを通すようになり大量のCa が流入することを示しているように思われる。流入したCaの量が多くても，細胞内小器官が流入して来るCaを次々と取りこむならば，細胞内Ca濃度は上昇せず，従ってPkの上昇は起らずに電荷が流入した効果のみが見られるのであろう。

細胞の分化、細胞の機能と細胞間連絡

菅野　義信（広島大・歯）

充分，分化した上皮系細胞で最初に発見された電気的細胞間連絡はフリーズフラクチャー法を頂点とする電顕による細胞膜接合部の微細構造が明らかにされ，ギャップ結合構造に対応することが確立した。ギャップ結合は膜を貫らぬく蛋白質粒子が，他の細胞の同様に膜を貫らぬく蛋白質粒子と互いに結合し，粒子の中央部に小孔が開通した構造として理解されている。従って結合粒子の存在しない細胞膜部位には細胞間隔が存在する。

電気的測定による細胞間連絡の消失として，ギャップ結合構造がほとんど変化しない場合と僅かに2枚の細胞膜が接近して細胞間隔が縮少する一過性減少

又は消失の場合(1)，ギャップ結合構造は完全に離断消失するが，個々の細胞の細胞膜としては機能を充分維持している場合(2)，ギャップ結合の消失に加え個々の細胞膜の機能をも維持できぬ，云わば膜機能を完全に失った場合(3)の3つが存在する。

一方初期分裂卵の割球細胞の如く極めて分化の程度の低い細胞ではギャップ結合は一般的には形成方向が強いが，外的条件によっては電気的測定で見る限り消失方向にも向うことがある。一概に分化の程度によると規定はできないが，細胞によっては細胞間連絡の形成・消失は極めて流動的なものである。

今や免疫細胞の中心に位置するマクロファージは腹水中より採取して，1～3日間の短時日培養すると大きさを増大し，細胞内に電極を挿入することが可能となる。マクロファージは自発的に膜の反応部位に近い細胞内に Ca^{2+} 濃度の増大によるKコンダクタンスを増大して過分極反応を惹起する。

互いに接解したマクロファージは細胞間連絡を形成し，細胞間連絡が大きい場合には細胞内へ与えた通電電流のみならず，自発的過分極反応も電気緊張電位として隣接細胞からも記録できる。マクロファージの免疫機能を説明するのに都合良い現象である。

細胞間連絡をかく容易に形成するマクロファージもコルヒチン存在下では細胞間連絡形成は全く抑制される。一方細胞間連絡形成時の細胞外の Ca^{2+} の濃度は細胞間連絡の形成に微妙に影響する。現在の所外液中の Ca^{2+} が4mM 程度が形成過程にも，形成後の安定性にも一番良い濃度である。10 mMでは形成過程には促進的に働くが形成後の安定性には効果がなく，安定性には血漿中と同様の2～4 mMの濃度が最上に見える。

やや未分化の確立した培養FL 上皮細胞を集合させると3時間程度で細胞間連絡が完成する。一般的に細胞膜の流動性やチャネルに影響を与える薬物は形成過程では影響を及ぼすが一度形成安定した細胞間連絡には効果が少ない。

細胞間連絡の形成過程，形成後の安定性等前記(1)の場合の細胞間連絡の動態は細胞の分化や細胞の機能と何等かの関係があると考えられる。

生理学における非線型問題

品川　嘉也（京大・医）

物理学の教科書と生理学の教科書に現われる数式の根本的な違いは，前者の

方程式がほとんど全部線型であるのに対して，生理学の方程式は非線型であることである。例えば生理学で最もよく知られた方程式はHodgkin－Huxleyの方程式であるが，これが典型的な非線型方程式であることはよく知られている。非線型微分方程式の解の特徴は閾値の存在と解の爆発に代表される。閾値はパラメータのある値を境に解の性質が質的にも完全に異なる場合をさし，解の爆発は有限のパラメータ値および従属変数値に対して無限大の解を生じる場合をさすが，これらは生理学的現象の特性でもある。すなわち非線型方程式は，これらの生理現象を表現するコトバとして，線型方程式よりはるかに優れている。

実は，生理現象に限らず，自然現象の多くは非線型特性を持っている。従来の物理学が線型方程式で間に合って来たのは，平衡か平衡に近い系を扱って来たためとも云える。生物は本質的に平衡から遠く隔った系であり，非線型性が本質的な役割を演じている。この意味で非線型非平衡の熱力学が生理学に及ぼす影響が注目される。

イオンの膜透過がNernst－Planck－Poissonの連立微分方程式で表わされることはふるくから知られているが，Poisson 方程式の非線型性のためこれまで厳密解は極めて特殊な場合についてのみ知られているに過ぎなかった。われわれは[1]級数解の方法により一般の場合について厳密解が得られることを示し，従来の定電場近似，局所電気的中性の近似，Hendersonの近似およびMauroの近似が一次近似および二次近似に相当するがすべて不合理な仮定に立っていることを数学的に証明することができた。[2] われわれの厳密解は爆発解の存在を示して居り，膜のsurface bowndary で大きなpotential barrierが生じることを示している。これは生理現象の最も基本的な系過程についても非線型性が重要な意味を持っていることを示していると考えられる。

1) Y, Shinagawa (1979) J. theor. Biol. 81, 333
2) Y, Shinagawa (1980) J. theor. Biol. 83, 359

筋生理学・日本の現状

酒井　敏夫（慈恵医大）

Ⅰ．筋生理学

生理学の体系の中で，骨格筋，心筋及び平滑筋を取扱うとすれば筋生理学という表題は一応は正しい。しかし，生理学が生命科学を目ざしている以上，筋生理学は生物科学の一分科にすぎない。筋肉の収縮に関しての研究は，生理学以外の専門領域の研究者によって行われる事が多くなっている。

Ⅱ．Conference of the Chemistry of Muscular Contraction（1957）からOJI International Seminar, Regulatory Mechanism of Muscle Contraction（1979）に至る日本の筋研究

第二次世界大戦終了後，A. St. Györgyの“筋収縮の化学”（第1版。1947）ほど日本の生物科学の分野に大きな刺激を与えたものはないといわれる。1，2の生理学者を除いて戦後に育った研究者はすべてといって良い位この本の洗礼を受けたといっても過言ではない。

1957年，生物科学関係で戦後始めての国際会議“酵素化学シンポジウム”が開かれ，熊谷洋教授の努力でその衛星会議として“筋収縮の化学”が持たれた。日本側の出席者はすべて海外を知らない，英語の話し方聞き方も知らない状態であった。この国際会議を開かされる力となったのは，名取教授が1952年から始めていた“筋生理の集い”と熊谷先生が主催した文部省科学研究費による綜合研究“筋化学班”であった。この国際会議を契機として，日本の若手筋研究者が続々，海外留学の旅に立った。江橋節郎教授もこの中の一人であった。

それより20年，その当時の若手は，夫々の研究の指導者になった。わが国，筋肉研究の分野を総覧すると次の様なウィットな表現がささやかれている。殿村工場，大沢牧場，江橋精肉店と，この外名取親分の一家と。これらの研究グループに属さない一人狼で自主独立の研究者も忘れてはならないであろう。これらのさまざまな研究集団の研究は，世界の他の国では見られないユニークさを有し，お互いに少しづつの接触を保ちながら独自の歩みを行い，綜合するとすばらしい統一性が見られるという。

1979年，20年前に日本を訪れた米国研究者及び世界を代表するA. F. Huxley

及びH. Huxley等，世界第一線の筋研究者が富士河口湖畔に集合した。OJI International Seminarの副題にはKumagai-Natori Symposiumと銘うたれていた。日本側は70名が参加。その研究レベルの高さを外国勢に示した。

Ⅲ．筋研究のレベルは分子の世界で

筋研究は，分化されその代表的テーマには①滑り説の分子論　②筋小胞体のCa遊離機序　③調節タンパク質　④内部支持タンパク質などがあり，すべてが分子レベルのアプローチとなっている。王子セミナーに於いてもアクチン・フィラメントの上をトロポミオシンがどの様な移動をするか白熱の議論があった。また，筋収縮の研究の中で最もその解明が遅れている平滑筋のアプローチは目をみはるものがあり，ミオシン側調節（カルモデュリン説）か，トロポニン・トロポミオシン系によるカルシウム調節（ライオトニン説）かの論争は大きな問題点でもある。

Ⅳ．筋ジストロフィーの研究

筋ジストロフィー症の研究は最近まで，臨床病態および疫学的研究が中心であった。厚生省助成金による“筋ジストロフィー症の病態究明に関する研究班”が沖中教授の下で発足，難病究明への飛躍的道が開かれつつある。この中で江橋教授の基礎研究班には多くの基礎研究者が参加“筋ジストロフィー症の基礎的研究”が編成され，その活動が行われている。この研究班は筋の分化を始めとして発生生物学的研究が行われ，疾患モデル動物の開発にも意が注がれている。本症は筋細胞の肥大，伸・成長の障害が特徴ずけられてはいるものの，発症の機序に関しては全く不明である。

Ⅴ．「人間」－ヒトの健康における体力科学的筋肉研究

ヒトにおける骨格筋は体重の35％を占め，生活に大きな比重を有している。日常の生活からスポーツに至るヒトの健康と常にかゝわり合いを持っているのが骨格筋心筋といえる。成体の運動では，その筋活動は神経性調節を無視することは出来ず，分子科学としての筋研究よりも複雑性と，ヒトという対象がその研究を困難にしている。わが国では人命という点で被検者の制

限が厳しい。

瞬発力の増強（無酸素的活動），持久力の増進（有酸素的活動）など多くの研究がなされつつあるが，研究者数に欠けるところがあり，限られた医学者及び体育学専攻者により支えられている。この点，研究者養成のシステムに就いての配慮が必要である。

消化機能の種属差と個体差

菅野　富夫（北大・獣医）

消化機能のうち，私がとりあつかっている膵外分泌機能を中心に考察する。

膵外分泌腺の消化酵素放出をひきおこす生理的刺激はコレシストキニン・パンクレオザイミン（CCK-PZ）とアセチルコリン（ACh）である。腸管粘膜には，生理的活性のほぼ等しいCCK-PZ_{33}と CCK-PZ_{39} があり， その他にもCCK-PZ_8 などがある。これらブタ由来CCK-PZ族とAChで各種の脊椎動物の膵外分泌腺を刺激してみると，大略どの動物でも分泌反応をひきおこし，個体差も少ない。さらにカエル皮膚由来のセルレインの作用はCCK-PZ よりも強い。

ところが，vasoactive intestinal polypeptide（VIP）の膵外分泌腺にたいする作用には大きな種属差がある。ブタとネコで最も強い作用があらわれ，ラットでは1／60以下の活性を示すにとどまり，イヌでは中間にある。最近，VIPは迷走神経に含まれる高閾値VIP作動神経の化学的伝達物質であろうとする証拠がFahlenkrugらによって示されている。

AChのそのものの作用には種属差や個体差が少ないのにたいして，迷走神経電気刺激の効果には大きな種属差と個体差があらわれる。ラットでは迷走神経の効果が弱く，ブタでは強い。ブタでもその効果には個体差が非常に大きく，同様の条件で刺激しても効果には約10倍の差がある。Vegaら（1977）の研究によると，霊長類の迷走神経刺激の膵外分泌腺に及ぼす効果には種差のみならず個体差が大きく，現われるという。

我々にはできるかぎり均一の実験系をつかい推計学的に有意な結果を出そう

と努めている。しかし，ヒトの生理学への応用を考えれば，比較生理学にとどまらず個体差の生理学という領域が開拓されなければないのではなかろうか。

課　題　名　ショウジョウバエの中枢神経の研究（1980. 6. 5 ～ 6. 6）

池田　和夫　（City of Hope National Medical Center）

Invertebrate Neurobiology（1980. 8. 7～8. 8）　　課　題　名

Toshio Narahashi**(Northwestern Univ.)
Graham Hoyle**(Univ.of Oregon)
J.J. Callec**(Universite de Rennes)

"Chemical probes and nerve membrane ionic channels"
Prof. Toshio Narahashi(Dept. of Pharmacology, Northwestern University.)
"Structure and function in the locust nervous system"
Prof. Graham Hoyle(Dept. of Biology, University of Oregon.)
"Recent advances in studies of GABA as a central inhibitory transmitter in insects"
Dr. J.J. Callec(Laboratoire de Physiologie Animale, Universite de Rennes.)

概　　要

第16回　国際昆虫学会が1980年8月3日～9日の期間，京都の国際会議場で開かれ，生理学関係の著名な研究者が多数来日された。この機会を活かし，3名の演者による，勝木保次機構長招へいセミナーが開催される運びとなった。

楢橋はテトロドトキシンの発見以後の種々の薬剤や天然毒による興奮性膜のイオンチャネルに対する作用について概説し，最近の研究成果であるPancuranium(Pan.)や，殺虫剤として知られるPyrethroidなどのNaチャネルに対する作用について評述した。これらの薬物は活動電位の下降相を延長させるがPan.の場合Na電流の下降相の延長はNa電流の不活性化によるのではなく脱分極によって活性化されたNaチャネルの膜電位依存性の，チャネルの閉塞によることを結論した。又Pyrethroidの場合Naチャネルの密度を変えることによってチャネルの開閉を極端におくらせ，これがNa電流の延長Repetitive after-dischargeを引起すことを示した。

Hoyleはバッタの神経系，特に胸部神経節に焦点を合せ，微小電極とコバルト或いは蛍光染色を開いて個々の神経細胞の性質とその相互関係を脚の動きとの関連において評述した。彼の研究はこれまでも行動のパターンが個々のニューロンのレベルで如何に有機的に系統立てられているかと言う点に向けられ

て来た様に思われるが今度のセミナーでもバッタの学習が個々の神経細胞のK一透過性の変化によって説明し得ることを見事に示した。

Callec は“Synaptic transmission in the central nervous system of insects”（Insect Neursbiology, 1974）の著者としてこの分野の研究を強力におし進めている研究者である。今度のセミナーでは昆虫の中枢神経シナプスでの抑制性伝達物質としてのGABAの作用について，他のアミノ酸であるTaurine と比較しながら評述した。

抄　　録　Chemical Probes and Nerve Membrane Ionic Channels

Toshio Narahashi
Department of Pharmacology
Northwestern University Medical School
303 E. Chicago Avenue
Chicago, Illinois 60611, U.S.A.

A variety of chemical and natural toxins have been used as probes for the study of ionic channels of excitable membranes since the discovery of the tetrodotoxin's highly selective and potent action in blocking sodium channels. Such chemical probes may be classified into several groups according to the type of action. Sodium channel blockers include tetrodotoxin, saxitoxin, local anesthetics, pancuronium, paragracine, and N-alkylguanidines; potassium channel blockers are tetraethylammonium, cesium and aminopyridines; sodium channel openers/modulators are represented by batrachotoxin, grayanotoxins, veratridine, aconitine and pyrethroids and sodium channel inhibitors are represented by pronase and N-bromoacetamide. These chemicals have proved extremely useful for characterization of the channel gating mechanisms. In this talk, I wish to discuss the results of some of our recent studies.

Pancuronium, a muscle relaxant, modifies the falling phase of the action potential when applied internally to the squid giant axon. The observed acceleration of the fallimg phase of the sodium current is not due to a change in sodium inactivation, but due to the pancuronium's ability to occlude the channel in a voltage dependent manner as soon as it opens upon depolarization. Similar sodium channel block was observed with certain N-alkyl-guanidines such as N-octylguanidine, but the detailed kinetics are different. Paragracine, a toxin isolated from a coelenterate, also blocks the sodium channel from inside, but in a manner different upon membrane current. The insecticide pyrethroids modify a population of sodium channels to give rise to extremely slow opening and closing. This leads to a prolonged sodium current which in turn induces repetitive after-discharges. The pyreth-roids are highly stereospecific in exerting these actions, and therefore will become powerful tools in dissecting the topography and function of sodium channels.

STRUCTURE AND FUNCTION IN THE LOCUST NERVOUS SYSTEM.
Graham Hoyle. Department of Biology, University of Oregon, Eugene, Oregon 97403. U. S. A.

This talk will review current knowledge of the cellular neuronal anatomy of the locust nervous system, and the physiological properties of the different types of neurons. There are four principal classes: motor neurons, spiking interneurons, nonspiking interneurons and spiking neurosecretory neurons. The properties of representative examples will be described. The ways in which some serially homologous motor neurons have changed to meet differing functional needs will be described. Plasticity in properties of a tonic motorneuron will be

described, and it will be shown how changes are linked to input to permit simple forms of learning.

RECENT ADVANCES IN STUDIES OF GABA AS A CENTRAL INHIBITORY TRANSMITTER IN INSECTS.

CALLEC, J.J., HUE, B.[+] and PELHATE, M.[+]

Laboratoire de Physiologie Animale, Universite de RENNES - FRANCE.

[+]Laboratoire de Physiologie, Faculte de Medecine - ANGERS - FRANCE.

It is well accepted that γ-aminobutyric acid (GABA) is a transmitter involved in inhibitory synapses of vertebrates and invertebrates. GABA as a putative central neurotransmitter in insects was expected about ten years ago. This was supported by electrophysiological work on cell bodies and neuropilar region of the sixth abdominal ganglion of the American cockroach. Moreover, GABA is present in this ganglion, as also its synthesizing enzyme, glutamic acid decarboxylase.

The aim of more recent investigations was to analyse in further details the pre - and postsynaptic effects of GABA compared to another amino-acid: taurine, the pharmacokinetics of drug receptor interactions at the postsynaptic level and the indirect evidence for a GABA uptake mechanism.

1 - Pre- and postsynaptic effects of GABA and Taurine: we have evidence for two sites of action, the presynaptic terminals are depolarized which may be relevant to a presynaptic inhibition while the postsynaptic membrane is hyperpolarized which mimics the evoked-IPSP. These two phenomena are essentially chloride-dependent.

2 - Postsynaptic drug-receptor interactions: dose-

conductance relationship for both amino-acids are satisfactory interpreted according to a high cooperativity model, where two molecules bind to the receptor site. Taurine appears as a partial agonist for GABA receptors.

3 - Indirect evidence for a GABA uptake mechanism: a metabolically dependent high affinity GABA uptake into glial cells is proposed and discussed. This is based on action of temperature, Na^+ pump inhibitor such as ouabain, Na^+ free-salines and GABA blockers of neuronal or glial uptake carriers.

課　題　名　**自発性興奮理象への生理学的・生化学的アプローチ（1980.8.25）**

線維芽系及び上皮系培養細胞の膜電位振動を担うK^+チャンネルの性質

矢田　俊彦　　岡田　泰伸（京大，医）

心筋—非心筋融合細胞の自動拍動

五島喜与太（名大，理）

ゆらぎと自発性興奮

小畠陽之助（北大，薬）

初期胚の心細胞における自発興奮能の発現とその分化—活動電位の光学的測定によるアプローチ

神野耕太郎（東医歯大）

磁気共鳴法による興奮現象の解析

亘　　弘（生 理 研）

マウス膵β細胞の電気現象

西尾　恭介　　北里　　宏（滋賀医大）

灌流心で見られる生化学的周期反応と不整拍動との相関

匂坂　勝弘　　田村　守　　山崎　勇夫（北大，応研）

総合討論

抄　　録　**線維芽系及び上皮系培養細胞の膜電位振動を担うK^+ channel の性質**

矢田　俊彦　　岡田　泰伸（京都大・医）

培養線維芽細胞（L cell）に微小電極を刺入して膜電位を測定すると，約−15mVの静止膜電位と約−40mVの過分極膜電位の間で，自発的な膜電位振動—振動数約4回／分ーが見られる。また，この細胞は，電気的・機械的刺激に対して，約−40mVの一過性の過分極膜応答を示す。これらの過分極時において膜抵抗は著しく減少する。最近，培養上皮細胞（Intestine40Z）においても膜電位振動・過分極膜応答が見いだされ，その静止膜電位は約−13mV，過分極膜電位は約−70mV，振動数は4〜20回／分である。これらの過分極のイオン機構を検討し，両細胞系に共通な以下の性質を見いだしている。

細胞外液のK^+濃度を上げると，過分極膜電位は$[K^+]_0$に対しlog-linearに変化（脱分極）する。current-clamp を行って膜電位振動の逆転電位を求めると約−100mV であり，$[K^+]_0$を変えると逆転電位はK^+に対するNernstの式に従って変化する。それゆえ，過分極はK^+の透過性の増大に起

因している。次に，細胞外液から Ca^{++} を除くと，全ての過分極変化は消失する。細胞内へ Ca^{++} injection すると持続性の過分極が得られる。Ca^{++}-activated K^{+}channelのinhibitorであるquinine，quinidine は過分極変化を完全に抑える。以上の結果より，過分極変化は，細胞内 Ca^{++} 濃度の上昇によってもたらされた K^{+}透過性の増大，すなわち，Ca^{++}-activated K^{+} channelの開口によると結論される。

この様な膜電位振動・過分極膜応答は，適当な条件下では多くの細胞系で広く見られる現象であるので，今後，それらの生理学的役割を検討してゆきたい。

心筋一非心筋融合細胞の自動拍動

五島喜与太（名古屋大学・理）

培養下のマウス心筋細胞は，ＨＶＪ（センダイウイルス）によって互いに融合し多核の巨大心筋細胞を形成した。この巨大心筋細胞の性質について，次の結果を得た。(1)ＨＶＪ処理によって融合し巨大心筋細胞を形成する全過程を通して，自動拍動を停止することはなかった。(2)拍動数分布，外液 K^{+}，Ca^{2+} の影響等の拍動に関する巨大心筋細胞の性質は，融合前の細胞と変わらなかった。Ouabain による不整脈もみられた。(3)もとの細胞と同様，巨大心筋細胞にも整然としたmyofibrilの配列がみられた。

次に心筋細胞とそれ以外の細胞との融合について次の問題を検討した。(1)心筋細胞とそれ以外の細胞とは互いに融合するか？ (2)融合するならば，自動的な拍動はみられるか？ という二つの問題を検討し，次の結果を得た。(1)心筋細胞とそれ以外の細胞とは互いに融合する。(2)融合細胞の中で心筋細胞の占める割合が高ければ自動拍動はみられるが，非心筋細胞の割合が増えるにつれて，自動拍動は消失した。自動拍動を示さない融合細胞に電気刺激（フィールド刺激を与えても拍動は生じなかった。

Goshima,K., Masuda,A., Matsui,Y. & Yoshino,S.
Beating of multinucleated giant myocardial cells in culture
Exp. Cell Res., 120, 285-293 1979

ゆらぎと自発性興奮

小畠陽之助（北海道大・薬）

イカ巨大神経内部を希薄なCsFやNaF 溶液で灌流して，先端が約 1μm の微細電極で細胞膜外面を探索すると，各所に単位応答をしている場所を見出すことができる。[1] 単位応答とは，大きさや持続時間が定まった電位変化で，脂質2層膜に微量のアラメシチンを入れた系[2]や，ミリポアー人工脂質膜系で観測されたものと類似した応答である。[3] この応答は，静止状態でも prolong した興奮状態においても観測できるが，内外液の塩組成によって大きさ，数，持続時間は大きく異なる。液組成を変えて，単位応答がお互いにcoupleするようになると細胞電位は次第にゆらぎが大きくなり，かつ同調して，最後には自発興奮をおこす。[4] 細胞内K^+濃度が高い自然状態で単位応答が観測できないのは，空間定数が小さいばかりでなく応答持続時間が短かく，かつ多数の活性点が相互に無関係に興奮しているためである。従って，外から内に向けてパルス電流を流し興奮点の位相を整えると減衰振動が観測できる。この減衰振動は，外液中のCa^{2+}濃度を下げるか，1価イオン濃度を高くして自発放電の臨界点に近付けると，減衰度が長くなり非減衰振動を経て繰り返し自発興奮に導かれる。[1,4] これらの現象は外向き電流で興奮し，内向き電流で静止状態になる様な活性点が膜面に多数点在する不均一な膜が，電流により長距離相互作用によってcoupleしているモデルを想起させる。単位応答や電位ゆらぎは，電流によるcouplingの結果を示す。 このようなモデルを数式化すると，興奮前の巨視的ゆらぎや同調振動，繰り返し興奮等も統一的に説明できる。[5,6,7]

興奮性膜の特徴は，膜構造の単なる相転移現象でなく，エネルギー消費を絶えず伴う非線形非平衡系における定常状態間の転移と考えるべきであろう。[3] 自発性興奮はその一環としてのlimit cycleの発現と考えられる。

References

1) I.Inoue, I.Tasaki & Y.Kobatake; Biophys. Chem. 2, 116 (1974)

2) S.B.Hladki & D.A.Haydor; Nature, 225, 451(1970)

3) Y,Kobatake; Adv. Chem. Phys. Vol. XXIX, ed. G.Nicolis & R.Lefever, p.319(1975)

4) Y.Kobatake, I.Inoue & T.Ueda; Adv. in Biophys. Vol.7, ed. M.Kotani, p.43(1975)

5) Y.Aizawa & Y.Kobatake; J. Stat. Phys. 15, 129(1976)
6) Y.Aizawa, Y.Shimatani & Y.Kobatake; Prog. Theor. Phys. 53. 305(1975)
7) Y.Aizawa & Y.Kobatake; Bull. Math. Biol. 38, 351(1976)

発生初期胚の心細胞における自発興奮能の発現とその分化

── 活動電位の光学的測定によるアプローチ ──

神野耕太郎（東京医科歯科大・医）

心臓原基の形成→心臓原基の融合→プリミチヴな管状心の形成→心拍動の開始という，cardiogenesis の初期過程で，心細胞はひじょうに小さく，かつ脆弱なため，微小電極を刺入しての通常の電気生理学的方法が適用できない。したがって，このような方法論的制約のため，心臓形成の初期過程における機能形成，分化，発達については全く未知であった。そこで，われわれは，これに「膜電位の光学的測定方法」を導入することによって，ニワトリの初期胚（７－９体節期）の心細胞から自発的活動電位を記録することに成功し，次のようなことを明らかにすることができた。

1. ７－８体節期において，心細胞に電気的自発興奮能が形成されている。
2. ７体節期で電気的自発興奮能の形成にともない，自発活動のリズムも形成される。
3. ８体節期の終りから９体節期のはじめにかけて，活動電位の形には，cardiac type の活動電位と pacemaker type の活動電位の分化が見られる。
4. ９体節期のはじめになるとペースメーカーの部位は局在するようになり，それは，９体節期から１１体節期にかけて，心房部から静脈洞部位へ移行する。
5. ９体節期の中ごろ，興奮－収縮連関は完成され，最初の心拍動が開始する。

発表論文

1. Hirota, A., Fujii, S., Kamino, K. Optical monitoring of spontaneous activity of 8-somite embryonic chick heart. Jap. J. Physiol. 29 (1979) 635-639.
2. Fujii, S., Hirota. A., Kamino, K. Optical signals from early embryonic chick heart stained with potential sensitive dyes: Evidence for electrical activity. J. Physiol. (Lond.) 503-518.

3. Fujii, S., Hirota, A., Kamino K. Optical recording of development of electrical activity in embryonic chick heart during early phases of cardiogenesis. J. Physiol. (Lond.) in press.
4. Fujii, S., Hirota, A., Kamino K. Optical indications of pacemaker potential and rhythm-generation in early embryonic chick heart. J. Physiol. (Lond.) in press.

自発性興奮現象への生理学的，生化学的アプローチ
膵β細胞膜電位に及ぼす細胞内 Ca の影響，及び Ca と Na との干渉

西尾　恭介　　北里　　宏　　村山　公一（滋賀医大）

〈目的〉膵β細胞は glucose が存在すると spike burst が繰返し発生する。この細胞の ion 透過性及 spike に対する〔Ca〕i の影響を調べた。次いで膜電位に及ぼす細胞外 Na と Ca の Ca-pathway に対する competition についても検討した。

〈結果及び結論〉A. mitochondria の電子伝達系を block すると mitochondria から cytosol へ Ca^{2+} が放出されるので，膵β細胞の〔Ca〕i を増大させる為に blocker を用いた。1) 灌流液を脱酸素すると膜電位は過分極方向へ移動する。　2) 灌流液中に 5mM Na azide を加えると電気的活動は直ちに消失し，膜電位は過分極方向へ移動する。

3) 細胞外液を Ca-free にすると膜電位は脱分極方向へ移動する。　4) 次いで Ca-free の状態に対して 5mM Na azide を加えると膜電位は一過性に過分極する。　5) $[Ca]_0$ を 25mM(control)から 5mM，10mM と増大させると slow depolarization は過分極方向へ移動する。　6) 灌流液中に 10μg/ml A・23187 を加えると膜電位は過分極方向へ移動する。以上の事実は〔Ca〕i が増大すると膜は過分極し，〔Ca〕i が減少すると脱分極する事を示している。膜電位に於るこれ等の変化は，" intracellular Ca induced Pk increase "によって説明し得る。　B. 1) 灌流液中の Na を Tris で完全に置換すると，mitochondria が active な場合膜電位は一過性の過分極の後，脱分極方向へ移動する。　2) 灌流液中に 5mM Na azide を加え mitochondria を block すると Na を Tris で完全に置換しても，膜電位は過分極方向に移動したままで脱分極方向へ移動しない。以上の事実は ⓐ Na に

よって競合的にblockされているCa-pathwayがNaの除去によってunblockされ，内向きのCa-currentがunblockされたCa-pathwayを通ってcytosolに流入する。 ⓑ mitochondriaが正常な場合はcytosolのCa^{2+}がmitochondriaによって取込まれ，Ca^{2+}の流入が増大しても〔Ca〕iは増大せずPkはactivateされない。 ⓒ よってCa^{2+}の電荷のみが流入した事になるので膜電位は脱分極方向へ向う。以上で説明される。

1) マウス膵β細胞の電気現象・西尾・北里・村山・佐藤
日本生理誌・41巻(2) P45 1979
2) 膵β細胞の電気活動に及ぼす脱酸素の効果・西尾・北里・村山・丸中
日本生物物理学会予稿集（第17回年会） P112 1979
3) 膵β細胞の電気活動に及ぼす脱酸素の効果・西尾・北里・村山・丸中
日本生理誌・42巻(3) P57 1980
4) マウス膵β細胞膜電位におよぼす細胞外Naと Caの効果
西尾・北里・村山・丸中 日本生理誌・42巻(5)P106 1980
5) The possible competition between Na and Ca at the outer entrace of Ca pathway in pancreatic beta cells. Proc. of the International Union of Physiol. Science, Vol, KIV P613: Nishio, K.Kitasato, H., 他

灌流心で見られる周期的生化学反応と不整拍動との相関

田村　守（北海道大・応用電気研究所）

分光測定法の利点は，対象とする組織，あるいは臓器に損傷を与えることなく，そこで行われている生化学的，生理学的諸過程を速い応答速度で追跡できることにある。又測定波長を任意に選ぶことにより生体内代謝変動を選択的に解析できる利点をもつ。これらの長所をもつ分光学的測定法の生体への応用を，特にラット剔出灌流心臓で行った。特に細胞内酸素濃度をミオグロビンの光吸収変化から定量化した。

クレブス液によるラット灌流心は，～3時間にわたり，120－150／minで拍動し，左心室，心電図等も良好である。灌流液のK^{+}を12mMまで上げると，不整拍動が観測される。この不整拍動はランダムに生じるのではなく，心拍動期と心停止期が30秒～1分の周期で交互に規則正しく現れる。心停止期において，心電図からはP－波と考えられる波形が規則正しく出現していること，

更に停止期に電気刺激により左室筋は正常に収縮－弛緩を繰り返す事，等によりこの周期的な現象は，刺激伝導系に起因していると考えられる。高K^+液の注入により，ミオグロビンの酸素化の程度は，～４０％程脱酸素化され，細胞内酸素分圧が低下していることを示している。この時，灌流出液の乳酸生成量を求めてみると，好気条件下であるにもかかわらず明らかな上昇が見られる。この乳酸生成が何に起因するのか現在検討中であるが，解糖系の酵素の一つであるグリセロアルデヒド－３－リン酸脱水素酵素がK^+，Ca^{++}によって調節されるとの報告もあり，今後解糖系との関連を調べたい。

1） Tamura, M., Oshino, N., Chance, B., and Silver, I.
Optical Measurements of Intracellular Oxygen Concentration of Perfused Rat Heart.
Arch. Biochem. Biophys. 191, 8-12 (1978)

2） Tamura, M., Araki, R., Ishikawa, T., Sagisaka, K., and Yamazaki, I.
Direct Observation of the Reduction of Met- and Ferryl-myoglobins in the Perfused Rat Heart.
J. Biochem. 88' 1211-1213 (1980)

3） 田村　守，荒木隆一郎，匂坂勝弘，山崎勇夫．
心臓の周期性とメタボリズム。　臨床科学　16，1240-1247 (1980)

大脳運動野の構造と機能（１９８０．８．２７）　　課　題　名

浅沼　宏（Rockefeller Univ）

課　題　名　化学受容膜における興奮の基礎過程（1980. 10. 3～10. 4）

神経終末部膜の電位発生機序とニューロトキシンの作用

川合　述史（東京都神経研）

伝達物質としてのグルタミン酸

竹内　昭　小野寺加代子　川越　礼子（順天堂大・医）

交感神経節細胞のpeptide receptorとその機能

西彰　五郎（久留米大・医）

Early synaptic transmission at the nerve muscle contact in Xenopus cultures　城所　良明（Salk Institute）

培養毛様体神経節ニューロンの栄養因子とシナプス結合について

三木　直正（金沢大・がん研）

培養骨格筋細胞AChRの生化学的及び蛍光顕微分光学的観察

杉山　博之（生理研）

嗅上皮組織及び組織画分へのアミノ酸結合　鈴木　教世（北大・理）

ムスカリン性アセチルコリン受容体の可溶化の試み

芳賀　達也（浜松医大）

ラット脳シナプス膜の蛋白質　阿部　輝雄（新潟大・脳研）

カルシウム調節蛋白質の軸索内輸送　黒川　正則（東大・脳研）

ラット舌上皮のサッカリン結合蛋白質

佐藤　昌康　島崎久仁子（東京都神経研）

樹状突起の形態分化　浜　清（東大・医科研）

概　　要　神経接合部やシナプスにおける興奮伝達，伝達物質及びそれを受容する膜のタンパク質に関する研究，味覚，膜覚受容タンパク質の分離，同定に関する研究等について，１１名の参加者が以下の報告を行った。この会には米国のソーク研究所の城所研究員も参加し，培養細胞を用いて神経筋接合形成の機序を明らかにする研究の発表を行った。

神経終末部膜の電位発生機序とニューロトキシンの作用　　抄　　録

川合　述史（東京都神経研）

イセエビ，歩脚の神経筋標本を用い，単一神経軸索に徴小電極を刺入する方をによって以下の結果を得た。

(I) 興奮性神経の，神経終末部近傍により細胞内記録を行い，抑制性神経を刺激すると数ｍＶの過分極電位が発生し，これは刺激の頻度を増すと増大した。外液中から塩素イオンを除くとこの過分極電位は消失，または脱分極電位に変った。GABA を加える事により抑制性神経刺激と同様の変化が，軸索内電位に見られた。以上の結果から，シナプス前抑制に際して，興奮性神経終末部に生ずる電位変化は過分極であり，おそらくGABA を介しての塩素イオンコンダクタンスの増大によって起ると考えられる。

(II) スズメバチ（Vespa mandavinia）毒腺から，シナプス前性の阻害作用をもつ新しい神経毒を分離しその作用をしらべた。Sephadex G-50，C-M Sephadex および Hydroxylapatite セラムクロマトグラフィーによる精製を行い，分子量約21,000-22,000のポリペプタイドを得，Mandavatoxin（MDTX）を名付けた。MDTX はイセエビの神経筋伝達を阻害するが，シナプス後膜の，膜電位，膜コンダクタンスは殆んど変らず，作用はシナプス前性と考えられた。軸索内記録でMDTX の作用を見ると，活動電位の減少はMaximum rate of riseの低下と膜抵抗の減少を伴っている事が分った。無ナトリウム液ではMDTX の作用が消失することから，MDTX はprimaryにはNa電流を減少させて，活動電位のブロックをひき起す作用のある事が分った。（共同研究者，阿部　　岳，丹羽昭子）

伝達物質としてのグルタミン酸

竹内　　昭・小野寺加代子・川越　礼子（順天堂大・医）

グルタミン酸は中枢神経系における興奮性伝達物質の最も有力な候補であるが，伝達物質としての地位はまだ確立していない。ザリガニ神経筋接合部はそ

の性質が中枢シナプスに類似し，且構造が比較的簡単なので，これを用いてグルタミン酸の伝達物質としての可能性を論ずる。

L－グルタミン酸の作用と伝達物質とは次のような点でよい一致を示す。a）グルタミン酸受容器はsubsynaptic membraneに高濃度に存在する（Takeuchi & Takeuchi，1964；Onodera & Takeuchi，1980），b）グルタミン酸の作用は関連物質の中で特に強い（Takeuchi & Takeuchi，1964；Takeuchi．1976），c）薬理作用が両者で一致する（Takeuchi & Takeuchi，1964；Onodera & Takeuchi，1980），d）グルタミン酸の時間経過がe.p.s.p.と一致する（Crawford & McBurney，1975；Onodera & Takeuchi，1980），e）イオン機序が両者で一致する（Onodera & Takeuchi，1975，1976）

また，グルタミン酸の遊離をGC-MSを用いて測定すると，静止時のグルタミン酸量は20 pmoleで，10 Hz刺激により約10pmole，20Hzで約20pmoleの有意の増加がみられる。低Ca液中で神経刺激による遊離量は有意に低下する（Takeuchi，Onodera & Kawagoe，1980）これらの事実はグルタミン酸が伝達物質として働いていることを強く示唆する。

交感神経節細胞のpeptide receptorとその機能

西　彰五郎（久留米大・医）

脊椎動物の交感神経節とくに腰部および腸間膜神経節細胞には，興奮伝達に与るシナプス後要素としてnicotinicおよびmuscarinic receptorsのみならずpeptide receptorが賦与されている。ウシガエルでは第Ⅶ～Ⅷ脊髄神経経由のC節前線維に含有されたLuteinizing hormone-releasing hormone（LHRH）が神経衝撃によって発射されると，腰部交感神経節のBおよびCニューロンに“分”のOrderで持続する興奮性シナプス後電位（Late slow Epsp）を生じ，その結果節後線維に遅発性後発射あるいは閾下の興奮性準位の上昇をきたす。このpeptide receptorはLHRHのみでなく，Substance P，eledoisin様peptideおよびphysalaeminによっても活性化されるが，LHRHに最も感受性が高く，同物質によるtachyphylaxisは他の3者に比して著明に少い。

Late slow EPSPあるいはLHRHによって発生する脱分極は電位発生機序の上から2つのタイプに分けられる。そのうちI型は K^+ 透過性の減少，II型は Na^+ と K^+ 透過性上昇によって発生する。おそらくLHRH receptorに2種あり活性化されたときそれぞれに特有なイオン透過性変化を生じるものと考えられる。両種のreceptorsは同一細胞に共存することが多く，通常I型のレスポンスが優勢で，II型は膜電位を過分極位に固定するとunmaskされる。興味深いことにcatecholaminesやmethylxanthinesの細胞外投与あるいはcyclic AMPの細胞内注入によって，late slow EPSPおよびLHRH脱分極は著明に増大延長する。しかしcyclic AMPの注入のみによってはlate slow EPSPに類した脱分極を生じないので，このnucleotideはLHRH作用時における2nd messengerと云うより，むしろ促進性のmodulatorとして働くと考えられる。一方，cyclic GMPはlate slow EPSPあるいはLHRH脱分極電位に認むべき影響を与えない。

神経筋接合形成の機序　細胞培養によるアプローチ

城所　良明（ソーク研究所）

神経筋接合部の形成初期におけるシナプス伝達の変化を細胞培養法をもちいてアプローチした。神経と筋細胞はアフリカ産ツメガエルの胚から得た。発生初期の骨格筋は神経が接触する前からアセチルコリン受容体をもち，成長している神経の尖端，すなわち成長錘が筋に接触したとたんにシナップス電位が発生した。この時期におけるシナップス電位はその振巾が大きく変動し，量子分析により量子的に発生していることがわかった。神経筋接合部の形成がさらに進むとアセチルコリン受容体が神経の接触部に集まってき，それにともなってシナップス電位の振巾は増大した。振巾の増大程度（約5倍）はシナップス後膜のアセチルコリン受容体の密度の増大だけで説明できると思われる。このアセチルコリン受容体集合の分子的な機構はわかっていないが，いくつかの可能性は除外することができる。アセチルコリン受容体の特異的阻害剤であるヘビ毒のブンガロトキシンを作用させておいてもこの受容体集合現象はおこるから，アセチルコリンが受容体についておこる変化が原因ではない。微小シナップス電位をおさえる高マグネシウム存在下でも受容体集合はおこるから，微小電位

発生時にアセチルコリンと同時に放出される何らかの物質によるものでもない。この分子的発現機序の解明にはもう少し時間を要するように思われる。

培養毛様体神経節ニューロンの栄養因子とシナプス結合について

三木　直正（金沢大・がん研）

ニワトリ胚の毛様体神経節（ＣＧ）は副交感神経系に属し，２種類のニューロンを含んでいる。一つは小型の無髄性の choroid cells で，他は大型の有髄性の ciliary cells である。孵卵８日目までに存在したＣＧ中のニューロン（約 6,500）は，孵卵１４日目までに約半数が死滅する。これらのニューロンの死滅と共に，ＣＧニューロンと未梢筋組織の間にシナプスの選択がおこり，機能的なシナプスが形成される。また同時期に，眼球を取り除いておくと，すべてのＣＧニューロンは死滅してしまう。これらのことより，未梢筋組織に栄養因子が存在しており，ＣＧニューロンの分化に影響を与えていることが考えられている。副交感神経節に働く因子の実体は明らかではない。今回，ニワトリ筋胃中にＣＧニューロンの神経突起をひきおこす因子が多く含まれていることを見出したので，その諸性質について報告する。

実験方法：孵卵８日目のニワトリ胚よりのＣＧをトリプシン処理により単離ニューロンとし，これをポリオルニチン塗布培養皿にうえ，10％ CO_2 存在下，37℃ で培養を行った。培養液は Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM）＋５％胎児牛血清を用いた。因子を添加後１６時間目に，突起を持っているニューロンの割合を調べた。

結果：ＣＧニューロンを，培養液のみで培養した場合，ニューロンはほとんど死滅してしまった。神経突起をもつニューロンも全然存在しなかった。ニワトリ胚の大脳，心臓，骨格筋，虹彩筋細胞の培養から得た conditioned medium（CM）を加えると，ニューロンから著明な神経突起の伸展がみられた。グリオーマ（C6BU-1），ニューロブラストーマ（N18TG-2），雑種細胞（NG108-15）のＣＭ中に因子活性は存在しなかった。成体ニワトリ組織を PBS(-)で抽出したところ，筋胃に強い因子活性が存在した。この因子を部分精製して諸性質を調べた。熱処理（80℃，５分間）やトリプシン処理で失活した。蔗糖密度勾配遠心法と Sephacryl-200 カラムで解析したところ，因子の大きさは，

１１.８Ｓ以上で，分子量２０－３０万程度と考えられた。孵卵１０日目までの胚から得たＣＧニューロンはこの因子に対して強く反応したが，１４日目のCGニューロンは反応しなかった。また筋胃中の因子量も，孵卵のageにより変化し，１３日目頃に最大活性を示した。

考察：ニワトリ筋胃中の因子を精製しているが，活性測定法に問題があり，現在ニューロブラストーマ細胞を用いての因子活性測定法を開発中である。この因子に対するＣＧニューロンの最大反応を示す時期，および，筋胃中の因子量が最大となる時期が，in ovoにおけるＣＧニューロンが機能的シナプスを形成する時期と一致しているのは何か生理的意味を持っているのかも知れない。現在，培養系での神経一筋シナプス形成におよぼすこの因子の働きについて検討している。

培養骨格筋細胞 AchR の生化学的及び螢光顕微分光学的観察

杉山　博之（生理研）

骨格筋細胞膜上のアセチルコリン受容体分子（AchR）は，神経筋接合の形成，成熟にともなって分布の局在化，分子形態の変化が起る。すなわち，AchR は接合部に集中局在化するとともに，そこに局在化したAchR はそれ以外の部分の分子より酸性度の強い（等電点の低い）分子になっていることが知られている。

この局在化と分子的分化（等電点の減少）の制御機構を調べることを目的として，培養骨格筋細胞のAchR を生化学的及び顕微鏡的に観察した。具体的には，放射性同位元素または蛍光色素でラベルしたα－neurotoxins（α－BungarotoxinまたはErabutoxin b）を合成，精製し，そのtoxin を結合させたAchR を放射能または蛍光を手がかりに検出・分析した。

結果として，現在までのところ次のような知見を得た。

1. 鶏胚および新生ラット由来の筋細胞膜上に，明瞭なAchR 集中領域（"hot spots"）が確認された。また，分散的に分布するAchR についても蛍光顕微分光学的方法によって，半ば定量的にその存在を確認した。
2. ラット筋細胞の場合，従来言われて来たhot spot の他に，細胞核周辺の表面膜部分に極めて強い蛍光が観察された。この蛍光はクラーレ等で予め

AchR 部位をブロックした後で蛍光 toxin を加えた時には見られないことから，AchR がいわゆる hot spot よりも遙かに広い範囲にわたって高い密度で分布する領域があることを示唆するものと考えられる。

3. 等電点電気泳動法による生化学的な分析の結果，ラットおよびマウスの培養筋肉細胞は神経の存在しない条件下で培養しても，酸性型の（神経筋接合部に特異的な型の）AchR を合成することが示唆された。

4. 鶏胚由来の筋細胞について同様の分析をしたところ，酸性型の AchR に対応するものは検出されなかった。このことは，鶏とラット・マウスについては種差があって，鶏の場合，骨格筋 AchR は神経筋接合部においてもそれ以外の部位においても，分子的に差はないのではないか，少くとも我々の用いた方法で検出できるような差はないのではないか，という可能性を強く示唆するものと考えられる。

嗅上皮組織及び組織画分へのアミノ酸結合

鈴木　教世（北海道大・理）

嗅覚の初期過程が嗅刺激分子の嗅受容器膜上に分布する嗅受容体への結合であろうとの考えに基づき，カワヤツメを材料として電気生理学的手法で有効な刺激であることが確められているアミノ酸（L-Arg，L-Pro，L-Leu）の放射性物質（^{14}C，^{3}H）を使って，生の嗅上皮組織及びそれより得た画分について，アミノ酸の結合様式を調べ，嗅受容器応答の電気生理学手法による結果と比較した。

生の嗅上皮組織は脳や肝臓に較べこれらのアミノ酸との結合能が高く①3種のアミノ酸の中でL-Arg に対する結合が最も大きい②結合の時間経過（0℃）は1時間で飽和の約85％であった③外部イオンの中で Ca^{2+} は低濃度域で結合に影響を与えるが Na^{+} や K^{+} は影響を与えない④結合に於いてL-Arg－L-Leu 間で競合が見られるがL-Arg－L-Pro，L-Leu－L-Pro 間では見られない。

嗅上皮組織より得た細胞膜片を含むと考えられる画分が最も結合能が高いが，①結合の時間経過（0℃）は生の組織のそれと大差ないが，温度を上げると（20℃）速くなる②結合は可逆的で③中性附近で最大となり④Scatchard プロットで

は曲線となり3種のアミノ酸につき2つずつの解離恒数と結合サイト数が得られ⑤解離恒数の比較では3種のアミノ酸で大差は見られないが結合サイト数ではL-Arg≫L-Pro＞L-Leuの順となった⑤画分は冷凍保存，熱処理に不安定で，結合は画分に含まれる蛋白量に依存する。

以上の結果を電気生理学的手法で得られた嗅受容器の応答特性と比較するとⓐ3種のアミノ酸の結合度の順位　ⓑ3種のアミノ酸間の結合における競合ⓒ結合の可逆性　ⓓ結合に対する外部イオンの影響などで一致していることが判った。

ムスカリン性アセチルコリン受容体の可溶化の試み

芳賀　達也（浜松医科大）

1. リゾフォスファチジルコリン（ＬＰＣ）により，ブタ脳尾状核より^{3}H-キヌクリジニルベンジレート（^{3}H-QNB）結合活性を160,000×g，1時間遠心の上清に回収した。この結合部位は，ムスカリン性薬物に対する特異性，pH，イオン濃度に対する依存性などから，膜の^{3}H-QNB結合部位，すなわちムスカリン性アセチルコリン受容体（m AchR）の可溶化されたものと考えられる。

2. ＬＰＣで可溶化される^{3}H-QNB結合部位の膜の結合部位に対する割合は，脳の部位によって多少異なるが，およそ３０％である。m AchRはアゴニストに対する親和性の異なる3種の状態で存在するといわれているが，脳各部位での各状態の割合とＬＰＣで可溶化される^{3}H-QNB結合部位の割合の比較より，アゴニストに親和性の高いH状態にあるmAchRが選択的に可溶化された可能性が考えられる。

3. ＬＰＣで可溶化された^{3}H-QNB結合活性は，蛇毒ホスホリパーゼA_2処理で失活した。活性に必要なリン脂質があり，可溶化後もm AchRに結合しているものと考えられる。

4. ^{3}H-QNBを膜に結合させた後，ルブロールＰＸで可溶化し，m AchR-^{3}H-QNB複合体の分子サイズを，ゲル ろ過，H_2OとD_2O中の庶糖密度勾配遠心法で算出した。蛋白質部分の分子量は86,000と算出され，Birdsallらが共有結合性の^{3}H-PrBCMを用いてＳＤＳ中の電気泳動で得た値83,000と良く一致した。このことはm AchRの少なくとも一部は，単量体として存在することを示唆している。

アストログリアにおける１０nmフィラメント

月田承一郎　石川　春律（東大・医）
黒川　正則（東大・医・脳研）

ニューロンにおける10 nmフィラメント（ニューロフィラメント）が3種類のポリペプチド（分子量200K，160K，68K)から構成されていることは，軸索内輸送の研究，[1)2)] および分離されたニューロフィラメントの分析[3)4)]によって確定された。アストログリアの10nmフィラメントはニューロフィラメントとならんで，神経系における10nmフィラメントの重要な構成員である。その分子構成がニューロフィラメントと同一であるという最近の報告[5)]には，種々の疑問点がある。我々は視神経のアストログリアから分離した純粋な10 nm フィラメントについて，一次元電気泳動，一次元ペプチドマップの分析，およびフィラメントの再構成実験をおこない，これが５５Ｋおよび４５Ｋの２種類のポリペプチドから構成されること，したがってニューロフィラメントのペプチド構成とはまったく異なることを明らかにした。[6)]

1) Hoffman P.N. and Lasek R.J. (1975) J. Cell Biol. 66, 351-366
2) Mori H., Komiya Y. and Kurokawa M. (1979) J. Cell Boil. 82, 174-184
3) Mori H. and Kurokawa M. (1979) Cell Struc. Funct. 4, 163-167
4) Mori H. and Kurokawa M. (1980) Biomed. Res. 1, 24-31
5) Goldman J.E., Schaumburg H.H. and Norton W.T. (1978) J. Cell Biol. 78, 426-440
6) Tsukita S., Ishikawa H. and Kurokawa M. (1980) J. Cell Biol. (in press)

ラット舌上皮のサッカリン結合蛋白質

佐藤　昌康　島崎久仁子（東京都神経科学総合研究所）

味蕾を含むラット舌上皮中に，甘味物質と特異的に結合する蛋白質が存在するかどうかを調べるために，舌上皮ホモジェネートの0.1 M燐酸緩衝液抽出及びTriton X-100 処理後の硫安分画について，^{35}S- サッカリンとの結合を

平衡透析法を用いてしらべた。その結果では，1） 緩衝液抽出の４０－６０％飽和硫安分画が^{35}Ｓ－サッカリンと特異的結合を示し，しかもその結合量は他の分画に比べて最も大きい。2） またこの分画と^{35}Ｓ－サッカリンとの結合は，ショ糖，ブドウ糖の存在によって阻害される。3） これに反して筋肉より得られた同様の分画と^{35}Ｓ－サッカリンとの結合ははるかに小さく，糖によって阻害されない。以上の結果から，舌上皮の緩衝液抽出の４０－６０％飽和硫安分画中の，サッカリンと特異的に結合する蛋白質が，甘味受容タンパク質であると考えられる。DEAE-Sephadex A50 カラムにかけ，さらに部分精製を試みた結果，サッカリンと結合するタンパクは0.1M NaCl で溶出してくる分画中に含まれ，カラムにかける前の約３倍の比活性を持つ分画が得られることがわかった。

樹状突起の形態分化 特に“Ruffed cell”の樹状突起の三次元構造について

浜　　清　　小坂　俊夫（東京大学医科学研究所）

吾々は魚類嗅覚系の微細構造を研究する過程で，硬骨魚類嗅球に存在するきわめて特異な軸索初節部をもつニューロンを見出し，“Ruffed cell”と名づけた。この細胞の初節部は多数の小突起をもち主として顆粒細胞樹状突起との間にレシプロカルシナプスを含む多数のシナプスを形成している。

この細胞の樹状突起の三次元構造を，ゴルヂ光顕法，超高圧電顕立体観察法，超薄連続切片再構築法などにより検討したところ，ここにも極めて特異な形態を見出した。

Ruffed cell（Ｒ－細胞）の樹状突起終末部は varix 状を呈するがしばしば扁平となり，グリヤ細胞突起のように他の神経要素の間にはいりこみきわめて複雑な形をとる。僧帽細胞樹状突起に密接しながら併行することが多いが，僧帽細胞との間にはシナプスをつくらない。また糸球体層中で嗅神経終末部に近接するが，ここでもシナプスをつくらない。樹状突起全体としてみた場合にもごく小数のシナプスが主として顆粒細胞との間にみられるだけである。したがってＲ－細胞の樹状突起は殆んど興奮性のシナプス入力を受けない特異な樹状突起であることが分った。

この細胞が受けている主なシナプスは前述の，初節部における顆粒細胞から

の抑制シナプスのみということになる。このような点を考え合せると，R－細胞の樹状突起はC．Nicholsonが示唆しているように，他の神経要素，この場合には嗅神経終末部および僧帽細胞樹状突起の活動によって生じる微小環境の電気的あるいはイオン組成的な変化に対する受容器のはたらきをすることが想像される。

筋肉部膜の活性化に関する生理学的研究（1980.10.3～10.4）　　課　題　名

温血動物心筋の Ca^{2+} －transient

栗原　敏　酒井　敏夫（慈恵医大）

心筋のカフェイン拘縮

遠藤　実　八木　忍　角田康典
石塚　徹　堀内桂輔（東北大・医）

心筋の興奮収縮連関におよぼす La^{3+} の効果

河田　溥　波多江純真（福岡大・医）

平滑筋の細胞外カルシウムによる収縮とカルシウムポンプ

砂野　哲（札幌医大）

モルモット小腸平滑筋細胞膜画分　薮　英世　山本勝裕（札幌医大）

イヌ冠状動脈平滑筋の興奮収縮連関

杉　晴夫　鈴木秀直　田中秀洋(帝京大・医)

血管平滑筋のE－C coupling　栗山　熙（九大・医）

Arsenazo－Ⅲによる Ca^{2+} 濃度の測定　松村幹郎　越智和典（川崎医大）

カエル骨格筋のsarcomere lengthとlight refration intensityの関係　大羽　利治　堀田　健（名古屋市大・医）

叩打による筋隆起（idiomuscular contraction）の機序について

水沢英洋　高木昭夫　杉田秀夫（国立武蔵療養所神経センター）

カエル骨格筋におけるカリウム拘縮の不活性化過程

高氏　昌　筒浦理正（札幌医大）

静止筋の弾性要素　馬詰良樹　春日規克（慈恵医大）

筋産生測定用の鍍銀法による熱伝堆

山田和廣　米谷快男児　小林孝和（大分医大）

分離筋小胞体に及ぼす局所麻酔薬テトラカインの作用

小川靖男（順天大・医）　江橋節郎（東大・医）

分離筋小胞体に及ぼすプロカインの作用　西島博明（慈恵医大）

抄　　録　温血動物心筋の Ca^{++} - transient

栗原　敏　酒井　敏夫（慈恵医大）

温血動物心筋のE－C Coupling において，細胞内 Ca^{++} の増減が重要な役割を果たしていることが知られている。心筋細胞内 Ca^{++} の調節機構は複雑で，筋小胞体による Ca^{++} の遊離取り込み，Na－Ca exchange による調節，Ca-pump による調節等が考えられているが，収縮－弛緩時に細胞内 Ca^{++} がどの様な経過で変化するのかを知ることは，心筋のE－C Coupling を理解するうえで重要なことである。最近細胞内の Ca^{++} を測定する目的で２・３の方法が開発された。第一の方法はCa-electrode を用いた方法であるが，この方法は時間的分解能が悪く，速い現象を追跡出来ないという欠点がある。第二の方法は金属指示薬を用いて，Ca^{++} と結合した際の，吸光度を測定しようというものである。この方法は，時間的分解能は優れているが，溶液のＰＨ変化に敏感であったり，筋が収縮する時の動きにより吸光度測定が影響を受ける欠点がある。第三の方法はCa-sensitive photoproteinと呼ばれ，Ca^{++} と反応すると発光するタンパク質である（エクオリン）。エクオリンは，クラゲから抽出され，分子量２万といわれており，Ca^{++} と結合すると465nm にピークがある発光を示す。Ca^{++} と発光の間には両対数プロットで，Ｓ字状を示す関係がある。この関係はＰＨの変化，イオン強度の変化，一価陽イオンの種類等にほとんど影響されず，発光であるために筋収縮時の動きによる影響が少ないと考えられる。

実験試料としてはネコ，ラットの右室乳頭筋及び肉柱を用い，エクオリンを微小電極に充填して，圧注入を行った。注入時には，膜電位を指標として細胞破壊がおこらない様に注意した。発光は光電倍増管により測定し，雑音消去のためシグナルアベレージを行った。エクオリン注入後，長さ－張力関係，刺激頻度の効果を観察した。

ラット心筋では，刺激時点から測定したtime to peak lightは約３０msec，光の消長のhalf timeは約２０msec，であり，time to peak tensionは約１２０msec，収縮高½における持続時間は約１００msec であ

った。一方，ネコ心筋ではtime to peakは約４０msec，光の消長のhalf timeは約５０msecであり，time to peak tensionと収縮高½における持続時間は共に約３６０msecであった。両者において光の時間経過は収縮の時間経過を比較的よく説明していた。しかし，収縮の立上り速度は，光の減衰速度と密接な関係があり，光の立上り速度とは余り関係はみられなかった。両者の心筋において，光が９０%減少した点で，張力は頂点に達っするが，このことは，光の減少過程は，Ca^{++}がトロポニンに結合することを示唆しているのではないかと考えられる。

筋長をLmaxの８０%からLmaxまで変化させると，ラット心筋では光のピークは不変であったが，光の消長の時間経過が，筋長が長いほど速かった。ネコでは，光の時間経過と共に光のピークも筋長に対応して変化した。これらの結果は筋長変化が心筋のactivationにも影響することを示唆している。

心筋の興奮収縮連関におよぼすLa^{3+}の効果

波多江純真　　河田　　溥（福岡大・医）

諸言：心筋のE-C couplingにおいては外液Ca^{2+}イオンが最も重要な働きをしている。このCaの特異的なblockerとして，温血心筋にしばしば応用されているLa^{3+}の効果をカエル心筋についてしらべた。

実験方法：切り出したウシガエル心室筋小条片を用い，微小電極法による膜電位と収縮張力の測定を行った。あわせてneuraminidase処理をほどこした実験を行った。

実験結果ならびに考察：200μM La^{3+}を２０分間作用させると単収縮の強い抑制効果が現れた。その後正常Ringer液で洗い，収縮が十分回復したのち再び同じ濃度のLa^{3+}を作用させると収縮抑制のtime courseが変化する。図１は３例の平均についてグラフに示したものである。黒丸が第１回目，白丸が２回目を示す。灌流第１回目の速い相のτ_1が2.86分であるのに対し，第２回目のτ_1は4.17分と遅くなった。遅い相のτ_2にも軽度の増大がみられた。このような変化は第３回の灌流においてさらに顕著となった。このことはいったんLa^{3+}がLa sensitive siteに結合すると正常Ringer液で灌流してもLa^{3+}を完全に除去できないこと，それが主として第１相に起こることを示唆する。

La^{3+}が単に細胞外からの Ca 供給源を抑制するのみならず，効果が細胞の中にもおよんでいる可能性，すなわち細胞内外の Ca 出納のバランスがくずれている可能性もあるので，La^{3+}作用の後効果と関連づけて階段現象のパターンをしらべた。図2Aは正常Ringer液中での5分間休止後の positive staircaseを示す。上段は収縮，下段は dp/dt を示す。Bは200μM La 20分間作用後，正常Ringer液で収縮力が十分回復した後におけるstaircaseを示す。positive staircase のパターンは消失し，むしろnegative staircaseの傾向を示した。この変化は外液のCa濃度を4mM(C)，6mM(D)に増大させたときの変化にきわめて類似していることから，B.C.D の諸条件下では細胞内の Ca 含有量が増していると思われる。収縮力がCa influxとefflux のバランスで決まるとするならば，Bの場合Ca influxが変化していないと仮定すると，Ca efflux が抑制されていることが示唆される。比較のため，2mM Ni^{2+}液を灌流した標本について同様な実験を行ったところ，正常Ringer液中でのstaircaseと全く同じパターンを示したことから，Ni^{2+}には後効果がないことがわかった。

さらにCa efflux に対するLa^{3+}の効果をカリウム拘縮についてしらべた。図3Aは正常Ringer液灌流時，5分間の休止をおいて14mM Na^{+} − 100mM K^{+}を含む拘縮液を5分間与えたときのK拘縮，Bは200μM La作用により収縮が十分抑制された時点でのK拘縮を示す。対照に比べ，はるかに大きなK拘縮の発現がみられた。これらの所見ならびにneuraminidase を用いて細胞膜のCa結合部位の切断を試みた実験から，Laは細胞膜外側のCa^{2+}を減少させるが，内側のCa^{2+}をかえって高めている可能性が考えられる。これはNa-dependentなCa efflux が抑制された結果であると考えられる。このような効果が細胞膜外からのLa^{3+}の効果によるものか，もしくは細胞内に流入して効いたのかについて今後さらに検討を加えたい。

図1

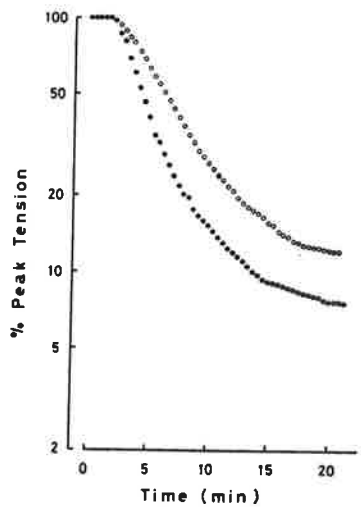


図2

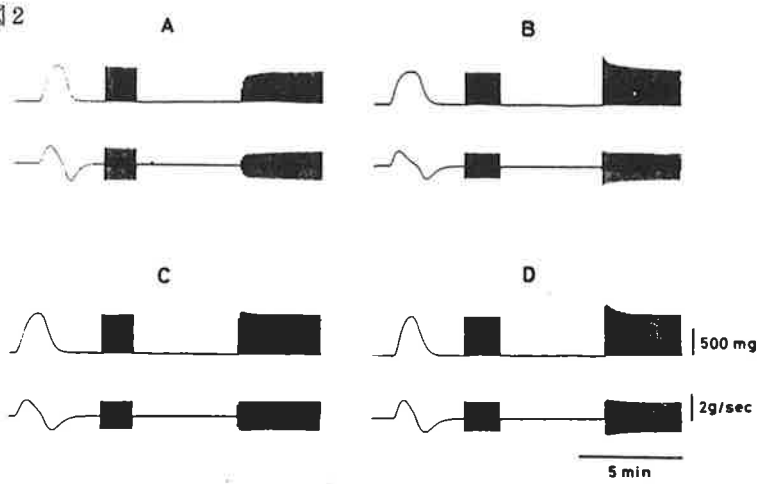
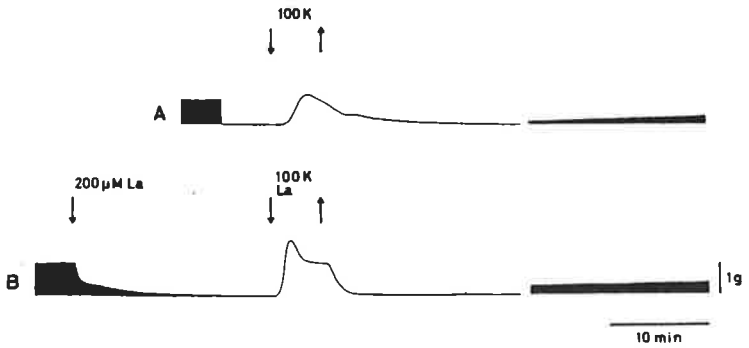


図3



平滑筋の細胞外カルシウムによる収縮とカルシウムポンプ

砂野　哲（札幌医科大）

平滑筋の収縮の多くは細胞外Caに依存性が高く，細胞外Caの流入によって起こされると考えられている。細胞内に流入したCaは収縮を起こした後，細胞膜のCa-pump機構によって細胞外にくみ出される可能性が示されて来た。さらに最近になって，このCaのくみ出しが低温で抑制されることが示された。本実験では各種収縮後の弛緩が，流入Caのくみ出しによってもたらされると

の観点より，収縮，弛緩に対する温度の影響を再検討した。

モルモット精管平滑筋では電気刺激に反応して攣縮様収縮を示すが，外液温度を下げると，収縮，弛緩両速度ともに低下した。収縮高３５℃から２５℃までは温度の低下とともに増大し，それ以下では減少した。収縮の最大速度のQ_{10}は３５℃と２５℃の間で1.7，それ以下で5.3であった。弛緩の最大速度のQ_{10}は３５℃と２５℃の間で1.9，それ以下では１３.７であった。Time to peak tensionは３５℃と２５℃の間で－2.4，それ以下では－5.0，また，half relaxation timeのQ_{10}は３５℃と２５℃の間で－3.1，それ以下では－5.7であった。

K拘縮でみるとTime to peak tension, half relaxation timeのいずれも低温で延長し，35℃と5℃で比較すると前者は6±1.2secから14.5±6.5secに，後者は10±1.6secから375±10.5secになった。Phasic contractionの大きさは10℃までは増大し，それ以下で低下して来たが，５℃でも35℃の場合より大きかった。Tonic contractionの大きさも，温度の低下とともに増大する傾向があり，最大収縮高は20℃と15℃の間でみられた。

Tonic contractionの経過中に温度を下げると，張力の増大がみられた。この張力の発生も１５℃～２０℃の間で最大になり，その後は張力が低下して来る傾向があった。急速冷却を行うと急速な一過性収縮がみられ，その後はtonic contractionに移行した。これらの収縮は脱分極筋においてのみ観察され，細胞外Ca依存性であった。細胞外Ca除去，あるいはVerapamil処理では低温による収縮がみられなくなった。一方，細胞外Ca濃度上昇では低温による著明な収縮増強効果がみられ，その収縮高はCa濃度１０mMでcontrol(Ca, 2mM)の約４倍に達した。

以上より，細胞外より流入するCaのくみ出しが，収縮，弛緩をコントロールしていて，そのうちの何れが変化しても収縮の大きさが変わることが示された。K拘縮のtonic contractionはこの両者の平衡関係で成立していて，低温は後者を抑制して張力の増強をもたらすと考えられる。

モルモット小腸平滑筋細胞膜画分

薮　英世　　山本勝裕　　太田　勲
小坂　功　　小原一男（札幌医科大）

臓器差による多様性を含めても，なお一般に温血動物の平滑筋における細胞内の Ca イオン緩衝系（ Ca イオンを低下させる反応系）は骨格筋のそれに較べはるかに多岐且複雑である。平滑筋についての生理学的，薬理学的研究から，細胞内で小胞体系が Ca^{++} 濃度調節に関与する可能性が示され，これについて構造的，生化学的な研究が多くなされている。一方，細胞膜上にはスパイク発生時，あるいは持続的な脱分極による Ca^{++} の細胞内への流入（収縮），また Caポンプ，Na-Ca 交換反応による Ca^{++} の細胞外への loss （弛緩）などの諸機能が局在し，また存在することが期待されているが，それらの実態についてはなお不明な点が多い。かかる観点より平滑筋の収縮ー弛緩サイクルを Ca^{++} 動態と関連づけて理解する目的に対して，平滑筋分離細胞膜の biochemistry は有力な手段となる筈である。著者らはここ数年モルモット回腸平滑筋の細胞膜の分離，精製を試み，その画分の Ca^{++} とり込み能，結合量などを調べている。細胞膜画（ＰＭ）の調整：平滑筋片を0.２５Ｍマニトール抽出液中でホモジナイズし，庶糖密度勾配法（ＳＤＧ）によりＰＭを分離した。ＰＭ純度の吟味：ＳＤＧで３３％層に浮遊平衡した画分にはミトコンドリヤの混入は極めて少なくミクロソームは，抽出過程中のある操作でかなり低下させることができた。一方ＰＭの種々の指標酵素活性はＳＤＧの層のうち３３％層に最大活性を示し，特にウアバイン感受性 Na^{+}，K^{+}ATPase は，３３％層にホモジネート中の活性の約２０倍ほど濃縮され，ＰＭは細胞膜をかなり豊富に含むものと考えた。すなわちＳＤＧに供する試料をポリトロンでサスペンドする場合，その時間を延長することにより漸次ミクロソームの指標酵素活性のピークを３３％より高濃度側にシフトさせることができた。この場合ＰＭのそれは３３％に留まったままである。ＰＭの Ca 結合および Ca とり込み：1) PMは Ca^{++} 結合能（$10^{-5}_{H}Ca^{++}$中で約 2μmoles/g Prot/30min ）を有し，少なくとも high および low 2種の結合部位を示す。この Ca^{++} 結合は trypsin，phospholipase C，neuraminidase により影響されない。2) PMは Mg^{++}，ATP存在下に Ca^{++} をとり込む（10^{-6}_{M} Ca^{++}中で12μmoles/g Prot/30min ）。別途調整したミクロソームも同種の活性（10^{-6}_{M} Ca^{++}中で20μmoles/g Prot/30min）

を示す。4m MK_2 -oxalateはミクロソームのCa^{++}とり込みを３～４倍促進するが，ＰＭに対しては余り作用を示さない。3）ＰＭのCa^{++}とり込みはtrypsin，phospholipase C処理により低下し，neuraminidase により促進した。分離，精製の段階および各指標酵素活性の現れ方からＰＭは，おそらくinside out の vesicle を形成していると予想され，上述の Ca 結合能，Ca^{++} とり込み能共に細胞内Ca^{++}の緩衝機構として作用する可能性を考察した。追加：ＰＭ分離，精製の困難さから，分離のためのStarting materialを分離単一平滑筋細胞サスペンジョンとする試みを考えている。現在それを百瀬五味の方法に準じて調整している。得られた分離単一細胞は，1）ACh，histamineで，またK^{+}液中で添加Caにより，それぞれ濃度依存性に短縮する。2）走査型電顕で構造変化を見ると，短縮時には表面に無数の小型の突起が生じ，弛緩すると消失した。3）これをクロールテトラサイクリンで処理し蛍光強度を測定しつつhistamine を添加すると急激な強度低下が起った。などの性質を示した。

ネコ外眼筋の光回折像

松村　幹郎　　越智　和典（川崎医大）

哺乳動物の外眼筋には，いわゆるtwitch fiber の他に，Kuffler and Vaughan Williams型の遅筋線維multiply innervated slow fiber が含まれていることが知られている。これら２種の筋線維の光回折像の特徴を調べるとともに，筋内に占めるslow fiber の割合を求めようとした。

ネコ外眼筋を剔出し，眼球後引筋，外直筋，下斜筋を分離し，等張 KCl 溶液中にて拘縮を起こさせた後５０％グリセロール（4mM EGTA を含む）中にうつし，−20℃に3−14 日間保存して得たグリセリン処理筋を用いた。この試料から長さ約6㎜ の単一筋線維を作製し，弛緩溶液にうつして筋長を自由に変えられるよう筋槽内に配置し，その筋槽は３次元微動調節台の上においた。He−Ne レーザー（波長６３２.８nm）を筋線維の長軸と直角方向に照射し，その回折像をアクリル板上にあらわし，３５㎜フィルム（Fuji SS，またはKodak Tri X）に撮影した。時には円柱レンズを用いて回折線を強めて観察した。ピンホールは用いなかった。さらに，フィルム上に撮影された０次，１次，２次

の回折線の最高値，回折線の幅，それらの回折線の間隔をデンシトメータにより測定した。

レーザー光と筋槽の底面ならびに筋線維長軸とのなす角度を変えて，最も明瞭な回折線を示す状態を求めて観察するとき，速筋線維のみより成るとされている眼球後引筋の回折線もカエル縫工筋の示す回折線より散慢である。すなわち，縫工筋では1次の回折線が明瞭であり通常4次ないし5次の回折線を認めるのに対して，眼球後引筋では1次の像はうすくて幅が広くせいぜい3次までの回折線を示す。外直筋や下斜筋の中には直径10μm（グリセリン処理後）で結合組織に富む筋線維があって，これらは遅筋線維と推定されるが，このような線維の多くは1次の回折線もやっと認めることができるにすぎない。しかし，直径の大きさや結合組織の多寡と回折線の鮮明さとは必ずしも一致しない。1次回折線の鮮明さを，デンシトメータ測定値における1次回折線の高さと幅との比，および1次回折線の高さと0次回折線のそれとの比を以てあらわすと，回折線の鮮明さは，カエル縫工筋＞ネコ腸腰筋＞眼球後引筋＞外直筋や下斜筋の速筋線維＞外直筋や下斜筋の遅筋線維の順であった。多重神経支配を受ける筋線維はfibrilが不明瞭であり，Z板が広く不規則である，などの微小構造が知られており，これらのことが回折線を不鮮明にしていると考えられる。このような不鮮明な回折線を示す筋線維の数は外直筋または下斜筋においては，筋全体の30－35%を占める。

叩打による特異性筋隆起（idiomuscular contraction）の機序について

水沢英洋　　高木昭夫　　杉田秀夫
（国立武蔵療養所神経センター）

1. はじめに

筋を叩打したときに生ずる持続的局所収縮は，特異性筋隆起（idiomuskuläre Wülstbildung，idiomuscular contraction）と呼ばれ，1846年Schiffが動物の死筋で見い出したものである。臨床的には，mounding 現象あるいはmyoedemaとして知られ，甲状腺機能低下症あるいは結核悪液質などの慢性消耗性疾患で出現しやすいといわれている。しかし，この現象は健常人にも認められるものである。Mounding現象は通常の同心型針電極による筋電図では，活動電位を伴わない（electrically silent）収縮として注目

されている。

我々はこのmounding現象の機序を解析する目的で，以下の実験を行った。

2. 方　法

ウィスター系雄ラット（300g前後）のヒラメ筋（soleus）と長指伸筋（EDL）を使用し，Krebs-Ringer液中で回転落下槌によりmoundingを生ぜしめ，対照の収縮とした。次に外液を，KCl-Ringer(K^+= 122.6mmol/l)，G-0.1，G-2(EGTA 0.1及び2mmol/lを含む弛緩液)，D_2O-Ringer(H_2Oを全てD_2Oで置換)，Dantrolene Na(100μmol/l)，Glycerol(400mmol/l)，Mn-Ringer(10mmol/l)，Brij 58(0.5%)の各種溶液で置換し，興奮収縮連関を種々の段階でブロックした状態での，moundingの出現の有無とその程度を対照と比較検討した。

張力測定には，日本光電FDピックアップSB-1-TH張力トランスデューサーを用い，レクチコーダー(RJG-4022)で記録した。

3. 結　果

1) KCl-Ringer，G-2あるいはG-0.1溶液中で表面膜が完全に脱分極した状態でもmounding現象は対照と同等に発現した。

2) D_2O，Dantrolene Na，Glycerol，Mn等により，T小管あるいはT小管ー筋小胞体連結をブロックした状態でもmounding現象は充分に発現した。

3) 表面活性剤であるBrij58を用いて筋小胞体を含めた内部膜系の全てを破壊すると，mounding現象は生じなかった。

4. 考　察

上記の実験結果より，mounding現象の出現には筋小胞体が関与することは明瞭である。即ち，筋の叩打により筋小胞体からCaイオンの放出が生じ，局所的収縮を招来していると考えられる。Ca放出の機序として，小胞体の破壊のためのみか，あるいは他の機序の関与があるのかは今後追求の予定である。

カエル骨格筋におけるカリウム拘縮の不活性化過程

高氏　昌　　筒浦理正（札幌医科大）

骨格筋の興奮収縮連関の不活性化過程（inactivation process）に関す

る研究は，Hodgkin and Horowicz(1960）以来2～3の研究グループにより行われてきたが，その本質については現在なお不明である。われわれはここ数年来，このinactivationの機構解明のために，カエル筋から分離した単一筋線維を用いて，カリウム拘縮（K拘縮）のinactivation processに関し，諸種条件下に検討を加えてきた。最近の実験成績も含め，主な成績を述べる。

1) Frankenhaeuser and Länngergren(1967）の方法に従い，〔Cl〕=一定（120mM）かつ低濃度K^+下のconditioningにより生じたinactivationを，190mM K^+による拘縮を用いてtestした場合，test K拘縮のpeak tensionは抑制される。この抑制（inactivation）の時間経過は2相性を示し，第1相（inactivation 1）と第2相（inactivation 2）に区別される。

2) Inactivation 1の程度は，conditioningのためのK^+濃度ならびに時間の増加とともに増大し，また発現速度は外液のCa^{++}濃度の増減によりそれぞれ抑制ならびに増加される。またこのinactivationの時間経過はexponentialでありsteady state levelに達する。これらの点はinactivation 1の性質がNa-conductanceのinactivationのそれにanalogicalであることを示す。一方inactivation 2は，fully inactivated stateに達する点でinactivation 1と異なる。

3) Inactivation 1および2の進行速度はdantroleneやprocaineで増大されるが，これら薬物による促進効果はinactivation 1よりも2において著しい。また興味ある成績として，低温によりinactivation 1の発現速度を抑制されるのに対し，inactivation 2のそれはむしろかなり増大されることが認められた。以上（1), 2)および3)）より，inactivation 1および2の発現機序は異なる様に思われる。

4) K拘縮のinactivationのtestには一般に190mM K^+による拘縮が好んで用いられている。25mM K^+，120mM Clにより発現するinactivation 1および2を，3.5および5mM caffeineを用いてtestすると，caffeine拘縮のpeak tensionが著明に抑制されることが示された。この抑制の程度は，caffeine濃度が低い程大であり，またconditioningの時間に依存して増加し，fully inactivated stateに達した後でも時間とともに増大した。一方190mM K^+（95mM K_2SO_4）による拘縮のspontaneous relaxationが完了した時点（拘縮開始後8sec），すなわち，190mM K^+

により発現したfully inactivated stateでは，5mM caffeineによる拘縮の抑制は認められず，さらにこの190mMK^+によるfull inactivationの状態を30分間持続してもcaffeine の拘縮は抑制されなかった。また，25mM KClならびに190mMK^+によるfully inactivated state からの回復の時間経過は，前者でのろく，後者では速やかであった。これらの成績は，25mMK^+によるfully inactivated stateのfiberの性質と190mMK^+によるそれとは明らかに異なることを示唆する。この差の理由については，Cl^- の存在の有無が一部関係する様に思われる。

静止筋の弾性要素
ーSkinned fiber のイオン強度と光回折像ー

馬詰　良樹　　春日　規克（慈恵医大）

静止筋の弾性要素は主に筋形質膜及び，筋形質内の弾性要素によるものと考えられる。筋形質内の弾性要素の本態は，最近丸山等によって分離されたコネクチンと思われる。コネクチンフィラメントは，Z－Z及び，M－M間にあり，長軸方向の弾性を維持している。最近名取等（1980）により，太いフィラメントとZ膜を結合する弾性フィラメントの存在が示唆された。そこで我々は太いフィラメントを高イオン強度下で徐々に解離させ，その経過中の弾性変化を観察し形質内弾性要素の局在を論じた。

レーザー光回折線の強度Inは以下によって与えられる（藤目）。

$Fn=f_I+(-1)^n f_A$，　$f_R=(n_I 2\alpha)\cdot S(\pi\frac{2\alpha}{L}n)+(n_z\Delta)\cdot S(\pi\frac{\Delta}{L}n)$

$f_A=(n_A b)\cdot S(\pi\frac{b}{L}n)+(n_M\delta)\cdot S(\pi\frac{\delta}{L}n)+(n_M\delta)\cdot S(\pi\frac{\delta}{L}n)$，ここで

$S(x)=(\sin x)/x$，　$In=Fn^2$，また，各散乱体の中心からの位置のばらつきδxを考えると，$Fn=fne^{\langle\delta x_I^2\rangle}+(-1)^n\cdot f_A e^{-\langle\delta x_I^2\rangle}$，である。ここで，$N_I$，$N_A$，$N_Z$，$N_M$はそれぞれ，I，A，Z，M帯のdensityを示し，2a，b，Δ，δはI，A，Z，M帯の長軸方向への長さを，Lは筋節長を示す。

今，静止筋ではLと$\langle\delta x^2\rangle$は，一定であると仮定できる。また，高イオン強度下ではA-bandが選択的に解離すると思われるから，N_I，N_Z，N_M，2a，Δ，δは一定と思われる。従って，高イオン強度下の光回折線強度の変化は，

N_A 及びbの変化を示していると考えられる。以上の仮定をもとに，我々は高イオン強度下の1次回折線強度をA帯の形態変化の指標とした。

形質膜剝離標本を浸漬した溶液のKCl濃度を0.2M（$\Gamma/2=0.25$ M）に上昇させると，1次光回折線強度I_1は徐々に減少し始めたさらは，イオン強度を上昇させると，I_1は0となり再び増加した。2次光回折線強度I_2は，イオン強度上昇に共ない単純に減少した。これは上記f_Aが一方向に減少したことを示す。

次に高イオン強度下でI_1が減少した後，低イオン強度にもどすことによりI_1はある程度もとにもどった。これはミオシンがまだフィラメント間にあり，完全に溶出していないことを示す。

SDSアクリルアミドゲル電気泳動によると，0.24，0.3M，KCl中に10分間浸漬した標本内には相当量のミオシンが存在し，0.6M，KCl 10分浸漬標本では，ほとんどミオシン帯は観察されなかった。電子顕微鏡観察によると，0.25 KCl中での標本のA帯は両側から溶出している如き像を示した。

以上より，1次光回折線の強度減少はA-bandが溶出したことによると結論づけられる。A-band溶出の閾イオン強度は，ATP(+)の条件で0.2±0.02M，ATP(−)では0.27±0.05Mであった。また，A bandの溶出閾付近で静止張力が減少し始めることは，AとZ-bandを連結する弾性体の存在を示唆した。

鍍銀法を用いた微小熱電堆の作製と筋熱産生の研究

山田　和廣　　米谷快男児（大分医科大・医）
小林　孝和（帝京大・医）

A.V.Hillが神経および筋肉の熱産生の測定に用いたHill-Downing型の熱電堆は，その出力の増幅にガルバノメータを使用する。しかし今日ではよいガルバノメータの入手は困難となったために，高感度熱電素子の開発が望まれている。一方鍍銀法を用いてより多数の熱電対によって構成される熱電堆を作ろうとする試みは，Hill自身（1968）によって示唆されている。われわれはRicchivtiら（1965）の方法にしたがい，鍍銀法を用いて筋熱産生を測定するための微小熱電堆を作製した。とくに熱電堆の熱容量をできるだけ小さくし，熱産生測定の時間的分解能を向上させることを主要な目的とした。

微小熱電堆作製法の概要。直径25μmのコンスタンタン線を，二本の，陽極

処理をほどこしたアルミニウム製のマンドレルに巻き，らせんの適当部分をワックスで覆って銀メッキを行う。次いでらせんを圧縮し，さらにプレス機を用いて12−13μm まで圧しつぶす。あらかじめマンドレルに切ってあるねじ山のために，各々の熱電対は等間隔に並んで熱電堆が構成される。この両面に，カプトン（ポリメイド）／テフロン膜を融着させて絶縁する。

熱電堆の性能。この熱電堆の1㎜の長さ当り9本の熱電対が並んで居り，その出力は325μV／℃／㎜熱電堆であった。出力の増幅には0～100Hzのバンド幅をもつAncom社製15C−3a型チョッパーアンプを用い，200Hzのマクティブフィルタを用いてチョッパ雑音を除いた。0℃附近における筋節長での2秒間の強縮による熱産生記録の信号対雑音比は100：1以上であった。この熱電堆の構成物質の量から計算される熱電堆の熱容量は，㎠当り22×10^{-4} cal. deg^{-1} でありequivalent half thicknessは12μmと概算される。したがって，0℃附近における筋の熱産生について，およそ15 msecと概算される。したがって，0℃附近における筋の熱産生について，15 msec の時間的遅れをもって，その時間的経過を測定することができる。

文　献

Hill, A.V. (1965) Trails and Trials in Physiology, Edward Arnold, London.

Ricchiuti, N.V. & Mommaerts, W.F.H.M. (1965) Technique for myothermic measurements, Physilogist, Washington, 8, 259.

分離筋小胞体に及ぼすprocaineの作用

西島　博明（慈恵医大）

Schuller(1925)等が骨格筋のcaffeine拘縮をprocaineが抑制する事を報告して以来，このcaffeine−procaine antagonismはFord and Podolsky(1972), Endo and Throm(1975)さらにSakai等(1980)の研究から筋内部膜でのCa^{2+} −uptake release 能に作用点を持つ事が明らかとなっている。Weber(1968)は分離筋小胞体（FSR）を用いcaffeineによるFSRからのCa−releaseをprocaineが抑制する事を報告している。しかし，このCa^{2+}−release抑制の原因は，Ca^{2+} −uptake 能の促進である

か，Ca^{2+}-releaseの抑制の結果であるかは不明である。Ford and Podolsky(1972)は蛙 skinned fiberの実験でprocaineはSRのCa^{2+}-uptakeには変化を与えないとしている。本実験では，これらの実験報告を基としてRat下肢速筋からの分離筋小胞体膜(FSR)を使用し，Ca^{2+}-uptake，release 能に対するprocaine(0.5～5mM)の作用を検討した。

分離直後のFSRのCa^{2+}-uptake能は低濃度procaine(0.5～3mM) では明らかに促進する。特に高活性のCa^{2+}-uptake能を有するFSR では著明であった。このprocaineによるCa^{2+}-uptake 能の促進はCa^{2+}-uptakeのinitial phaseに於てのみ示され，最大Ca^{2+}-uptake量はcontrol FSRのそれと同様であった。又最大量を示す時間が速くなった。著者はSRのATPase 活性に依存しないで結合するCa^{2+}量はATP依存結合Ca^{2+}量の約10％(外液Ca量100μM)程度である。結合Ca^{2+}量とCa^{2+}結合rateはATP依存性Ca^{2+}量とCa^{2+}結合rateと平衡関係を有している事が判っている。このATP非依存性Ca結合量は0.5～3mM procaine で著明に増大する事がわかった。次に，Ca^{2+}が最大にuptakeしたFSRのcaffeine によるCa^{2+}-releaseはprocaine で抑制される事が判った。これはWeber (1968)の報告にも有る様に，procaine とcaffeine の濃度関係によるとされている。著者は低濃度(0.5 ～ 3mM)procaine処理FSRのATP非依存性結合Ca ionは1.0mM caffeine処理によるCa ion の遊離を抑制する。しかし，Control FSRのCa結合量より低くはならなかった。また，ATP依存性結合Ca^{2+}量は前述条件下では全く遊離する事はなかった。一方，処理caffeine濃度を5mMとするとATP依存性結合Ca^{2+}の遊離が認められた。この条件下でのprocaine処理FSRではATP非依存性Ca^{2+}の遊離はcontrol FSR の結合Ca量より低い値にまで遊離した。この事から著者は低濃度procaineはFSR膜に於るCa結合siteに於るATP非依存性でのCa結合力を増大させるものと考えている。

課　題　名　生理学研究に用いる実験動物及び施設の諸問題（1980. 10. 13 ～ 10. 14）

内薗　耕二（生理研所長）
輿水　　馨（東　大　医）
尾崎　　毅（網走保健所）

抄　　録　生理学研究所と動物実験施設

内薗　耕二（生理研）

当研究所は創立の最終段階近くまで人体生理学研究所（仮称）とされていた。人体という文字が消えたのは当時人体実験問題が社会問題としてやかましくジャーナリズムに取上げていたからである。当研究所は終局的には人間の生理学の研究を指向している筈である。これが当地に在る他の２研究所と基本的に異った設立の理念である。

人体の生理機能の研究に自由自在に人体が利用できればこれにこしたことはない。しかし現実の問題として人体が研究材料となるのは臨床医学の一部分または体育生理学の極めて限られたフィールドに過ぎない。人体の機能をうかがい知るための間接的な方法として実験動物を用いることは，今日では自明のこととなっている。

今日生理学の研究では各種の動物が用いられる。下等な生物から高等哺乳動物に至るまで各種の動物が目的に応じて選ばれている。

生理学は病理学や臨床医学と違って，正常で健康な動物を必要とする。時には無菌動物や純系の動物の求められることもある。ここ１０数年この方，わが国の主だった大学において近代化した動物実験センターが設立され，医学研究の成果の信頼度が格段に向上したといわれる。

動物実験施設では研究者の必要とする各種の動物が常に健康な状態で飼育されていなくてはならない。外部から搬入される動物は検疫を受けた上しばらく飼育され，異常のないことが確められた上で実験に供されることとなる。

動物実験施設の他の施設と異る特質は年間連続運営されなければならないということである。近代的動物実験施設では温湿度が年間を通じて一定していることが要求される。建物や内部の設備の管理に特別の努力が要求されるゆえんである。

生理学上の成功例をかえり見て気がつくことは，研究者がいかに目的にふさ

わしい動物の選定にラッキーであったかということである。例としてHodgkin，Huxleyのイカの巨大神経の研究がある。Alexandrowitz の記載したこの動物の巨大神経をいち早く実験室にもちこむことに成功したことが，彼等のその後の研究の輝かしい進展のきっかけとなった。当研究所の実験施設で各種の水棲動物が飼育されているのもこのような考え方にもとずいているものと思われる。

実験動物と飼育施設

輿水　馨（東京大・医）

医学の研究において，実験動物が利用される範囲，ならびにその果たす役割は年と共に広く，かつ重要なものとなりつつある。実験動物学という新しい学問領域が生まれ，動物実験施設という独立した機構が要望される所以でもあろうか。このような背景において設置された医学部附属動物実験施設とは次のような性格をもつと云える。すなわち，医学教育に必要な精度の高い動物実験を行うための共同利用施設であり，あわせて実験動物に関する教育及び研究を行うことを目的とする。この目的を達成するために施設は良質な実験動物の供給と科学的・道徳的な飼育管理を行う。

実験動物とは，研究（検定・診断・製造・教育を含む）に重要であるとして飼いならされ，合目的に育成・繁殖・生産された動物と定義することができる。しかし，実際に実験に使われる動物は，ここに定義した動物以外に家畜（イヌ，ネコ，ヤギ，ヒツジ，ブタなど）および野生動物（サル類など）があり，これら3群を総称して実験用動物と呼ぶ。適正な実験動物を得るためには，動物の個体が遺伝学的にも微生物学的にも統御され，また動物をとりまく種々の環境要因が統御されなければならない。

とくに動物実験施設の場においては，必ずしも微生物学的に統御された動物が搬入されるとは限らない。実験動物が伝染病に罹患すると，繁殖効率が悪くなり，実験の結果を誤らせ，ヒトへ病気を伝播させる危険がある。そこで，施設への動物搬入時に行う検収・検疫業務が施設における業務の中で最も重要な意義を持つことになる。

今回，過去6年間にわたり東大医学部附属動物実験施設に搬入され，検疫検

査をうけた各種実験動物すなわちイヌ3,２６５頭，ネコ３０８匹，カニクイザル５７匹，チンパンジー５９匹，アカゲザル6匹，ニホンザル3匹，ウサギ4,１１１羽，ハムスター４８２匹，マウス２００,４７３匹，モルモット2,067匹，ラット２２,３９３匹などのうち主な疾病と微原体の検出状況について述べる。しかし実験動物の疾病は必ずしも悪い面のみをもつとは限らず，ヒトの難病病や，原因不明疾患症候群に似た特性を示す動物が，偶発的にあるいは計画的に開発，改良されている。これらの動物を疾患モデル実験動物と呼ぶ。

野生動物や家畜を計画的に繁殖，生産し実験動物として使えるような研究が進められている。これを実験動物の開発ならびに純化と呼ぶ。

我国の実験動物の事情

尾崎　　毅（網走保健所）

実験や研究に用いられる動物には，ウサギ，ラット，マウスなど実験や研究を目的に開発されたいわゆる実験動物の他，産業的に飼養されている家畜などの産業動物や，自然界に生息する野生動物など，研究の目的や実験の内容に応じじて様々なものがある。

産業動物においては，高度経済成長による産業構造の変化にともなって，飼養形態にも大きな変化がおこり，また飼養頭数の消長も動物によって際立ったものがみられる。これらの産業動物は「採算性」の枠の中で飼育せざるを得ないため，いきおい密飼いとなり，各種の疾病，特に感染病が多発する傾向にある。また伝染病の発生を予防する目的で抗生物質その他の薬物が飼料に混入されて使用されることも多く，実験動物へ転用する場合に問題を残している。また，経済性を失なった家畜（ヒツジ，ヤギなど）の場合は，ほとんど愛玩用，或いは観光用として命脈を保つに至っており，将来の供給源に不安をかかえている。

一方，人間の生活環境の整備と，産業廃棄物による環境汚染によって野生動物の棲息条件は悪化の一途をたどり，棲息数，地域ともに激減している。一部の野生動物では，産業的な飼育や増殖の試みが行なわれているが，大部分の野生動物は，年々捕獲が困難になっており，これらの動物を安定的に確保するためには，自然環境の保全の他，人工的な飼育条件での増殖・保存，或いは実験

動物化の試みが検討されねばならない。

ところで，実験動物を専門に扱う実験動物産業といわれる業界は，近年急成長をとげつつあるが，特殊な目的を持ったユーザーが相手であるだけに市場は限られており，大手数社を除けば零細なところが多い。需要の多い数種の実験動物を除けば，研究の多様化，精密化に応じた実験動物への要求を満足するには限度があり，新たな実験動物の開発の問題も含め，今後なお研究者自身による総合的な実験動物の供給体制を考えていく必要がある。

課　題　名　The Functional Properties of the Visual Neurons of the Posterior Parietal Cortex(1980. 10. 22)

V.B. Mountcastle**(Johns Hopkins Univ.)

課　題　名　Mechanical Changes in the Nerve Membrane During Action Potentials(1980. 11. 11)

田崎　一二*（N．I．H．）

概　　要

神経線維の興奮に伴って，機械的にも膜の体積に変化が起るのではないか，という考えは，以前からLoebやHöberなどにより考えられ，もっとも詳しくTeorell により取り扱われた。実験的には，繰り返し刺激を与えた時に遅い体積変化が見られることが，Kornacovaら('47)，D．K．Hill('50)，Bryant & Tobias('55)らにより報告された。活動電位に対応するような速い変化が存在することもKayushinら('55)，Frank('58)，Lettuinら('62)によって報告されたが，追試が否定的であるので認められていない。B．C．Hillら('77)はザリガニの巨大線維が興奮にさいして収縮することを報告している。我々は，カニの神経およびイカの巨大線維において，興奮にさいし神経線維の大きさが変化することを，光学的方法およびMechanoelectric transducer を用いて見出した。光学的方法において主として用いられたのは，Fotonic sensorと呼ばれる検出器である。これは，一種の光ファイバーで光を導入するグループと検出するグループが根本では2群に分かれているが尖端では全くまざりあっている。根本の一方の群に光を与え，他の群から光を検出すると，尖端に反射する平面がある時のみ光が検出できる。しかし，平面があまりに近いと，光ファイバーから出てきた光が他のファイバーに入らないので検出される光の強度は減少する。これによって，平面までの距離を知ることが出来る。この方法で得られた興奮に伴って起る直径の変化は，カニの神経で，１０－２０nmていどの直径の増加であった。また，Gulton Bender といわれるセラミック製のMechanoelectric transducer を用いると，興奮に伴って50μgていどの圧の増加が見られた。この現象は，イカの巨大線

維でも検出できた。細胞内灌流を行っても，外液にウアベインを加えてシェワン細胞に影響を与えても変化がみとめられたが，変化は普通膨張，収縮の2相性であった。

課　題　名　ミジンコにおける偏光受容（1980. 11. 12～11. 13）

Talbot H. Waterman**(Yale Univ)

（水溶性）複合脂質と細胞機能（1980. 11. 14～11. 15）　　課　題　名

イノシトールリン脂質の作るイオンチヤネル　　曽我部正博(阪大・人間科学）

化学受容膜に於けるポリフォスフォイノシチド　　林　文夫（神戸大・教養）

光受容に於けるＴＰＩの役割　　吉岡　　亨（横浜市大・医）

音受容に於けるＴＰＩの役割　　柳沢　慧二（鶴見大・歯）

ＴＰＩの構造と機能　　林　　浩平（群大・医）

複合脂質の物性　　岩柳　茂夫（群大・工）

CaによるTPIの相転移と膜興奮　　滝沢　俊治（群大・教養）

ホルモン受容体に於けるイノシトールリン脂質の役割

竹縄　忠臣（筑波大・基礎医系）

生体受容機構とイノシトールリン脂質　　西塚　泰美（神戸大・医）

細胞表面とガングリオシド　　飯田　静夫（東京医歯大・医）

ガングリオシドの構造と機能　ー最近の話題を中心としてー

岩森　正男（東大・医科研）

ガングリオシドに関するコメント　　林　　浩平（群大・医）

イノシトールリン脂質の作るイオンチャンネル　　抄　　録

曽我部正博（大阪大・人間科学）
林　　文夫（神戸大・教養）

３つの燐酸基を有するトリホスホイノシチド（ＴＰＩ）は，Ca^{++} に強い親和性を持ち，AcChoや電気刺激で燐代謝が賦活されてCa^{++}を遊離することなどから，従来より興奮膜のイオン透過性に関連することが予想されていた。我々

はこの仮説を直接検証する意図で人工脂質二層膜(BLM)とTPIの相互作用を調べた。その結果，TPIはBLMのイオン透過性に顕著な効果を与えなかったが，TPIの過酸化産物であるlyso TPI(LTPI)はBLMに著しい一価カチオンコンダクタンスを誘起した。このコンダクタンス(G)はLTPIが膜の両側に存在するときのみ発生するので，LTPIはいわゆるhalf poreを膜の両面で形成し，それが合体して1つのチャネルを形成することが想像される。このGの重要な特徴として，Ca^{++}による著しい抑制効果が挙げられる。その機構としては，表面電位の減少とチャネルのブロッキング(ゲーティング)の二通り考えられるが，中性キャリアを用いた表面電位の測定とモデル解析により後者のメカニズムが主要であることが判明した。

さて，LTPIがチャネルを形成することを直接検証し，Ca^{++}が個々のチャネルをどのように(gradedかall or noneか)抑制するのかを調べるには，数個のチャネルからなるBLMを形成して，直接個々のチャネルの挙動を観測する必要がある。それを行った結果，LTPIは，6pS(500mM KCl)のコンダクタンスをもつチャネルをつくり，それは典型的な開閉の二状態間を時間的にゆらいでいることが分かった。またCa^{++}は，単一チャネルのGは変えずに，開状態の持続時間を短縮することによって，膜コンダクタンスを抑制することも判明した。ある種の燐脂質が，イオンチャネルを形成することを，単一チャネルレベルで直接証明したのは，この例が初めてである。最近我々は，AcCho受容膜中のLTPI量が，アゴニスト存在下で著明に増大することを見い出している。これらの事実により，従来から神経応答の最も大きな謎であった伝達物質受容に伴う膜イオン透過性の変化にLTPIが直接関与するという仮説が考えられよう。

化学受容に於けるポリホスホイノシチド

林　文夫　尼川　大作(神戸大・教養)
曽我部　正博(大阪大・人間科学)

神経組織やシナプトゾーム標品に於てアセルリコリンやカテコールアミン等化学伝達物質の添加によってポリホスホイノシチドの代謝回転に大きな変化がおこることが知られており，化学伝達に於けるポリホスホイノシチドの寄与が長年示唆されてきた。

こうした化学伝達物質のリン脂質代謝への作用の生理学的意味を明らかにするためには，より単純な系を用いた解析が必要である。報告者等は，アセチルコリン受容体膜中でのポリホスホイノシチドの存在及びその挙動を検討した。受容体膜はシビレエイ電気器官よりKlymkowsky 等の方法で調製し，さらにアルカリ処理をおこない，受容体が膜タンパク質の約２０％を占める程度にまで精製した。精製過程での高濃度NaCl，EDTA，EGTA処理，そしてアルカリ処理による膜タンパク質の可溶化操作にもかかわらず，トリホスホイノシチドへのＡＴＰのγ位由来の^{32}Ｐとり込み（０℃，３０秒）がみられ，アセチルコリン受容体タンパク質近傍に膜内在性タンパク質としてダイホスホイノシチドキナーゼが存在することが示唆された。この^{32}Ｐとり込みは，KCl中でのみみられ，NaCl中ではほとんどみられなかった。さらに，NaCl中では，アセチルコリン類働体であるカルバミルコリン（10^{-6} M）添加に伴って，トリホスホイノシチド過酸化物とみられる物質に顕著な^{32}Ｐとり込みがみられた。これは，伝達物質受容に伴って受容体近傍のりン脂質不飽和脂肪酸部位に急激な脂質過酸化現象が生起すること，ひいては，受容体膜の膜構造に大きな揺動が惹起されることを示唆している。

受光容におけるＴＰＩの役割

吉岡　亨（横浜市大・医）

光受容に於ける初期過程は，現在の所HaginsのCaイオン説及びYoshizawaらによるCGMP説等，これといった極め手が見出されないまま華やかな論争がくり広げられている。我々はイカの視細胞（microvilli）をイカ網膜より単離し，このmembrane phosphorylationを〔$\gamma-^{32}$P〕ATPのとり込みを用いて観察した。実験は単離したmicrovilliと，〔$\gamma-^{32}$P〕ATPを混合，incubateし，これに光を照射した場合，CaイオノフォアA23187を加えた場合（暗黒中），及び暗黒中の３つの場合を比較した。とり込み反応はタンパク質を分析する場合はTCAで，また脂質の分析の場合はホルムアルデヒドを用いて停止した。この結果タンパク質ではロドプシン，レチノクロムの２つのバンドに著しい放射活性を認め，その何れもが光照射，及びイオノフォア処理により著明に増加することを見出した。次に脂質成分については同様な処理に

よって数ある膜脂質中，ポリホスホイノシチドと呼ばれるＴＰＩとＤＰＩにのみ ^{32}Ｐのとり込みが見られた。このような効果は外液に Ca イオンを増加させることにより促進された。従ってポリホスホイノシチドのリン酸化は，タンパク質リン酸にさきがけて起こり，しかも両者の間には平行関係が存在することが分かった。このことは以下のような２つの点で重要である。即ち従来はタンパク質リン酸化と生理反応との間に因果関係が想定されていたが，ポリホスホイノシチドのリン酸化もそれに劣らず重要なのではないかという点，また，ポリホスホイノシチドのリン酸化がタンパク質のリン酸化よりも早い時期にはじまるということは，何かしらあるプロテインキナーゼの活性化に役立っているのではないかとも考えられる。リゾＴＰＩのリン酸化なども認められることから若しかしたら，より直接的な膜電位の変化への貢献も考えられる。

音受容に於けるＴＰＩの役割

柳沢慧二　　塩沢光一　　浅沼　厚（鶴見大・歯）

アミノグリコシド系薬物の内耳毒性発現のメカニズムについて，Schacht は生化学的にアプローチして，イノシトールリン脂質の代謝過程，特にＴＰＩの関与について一つの仮説を提出した。われわれは比較生理学的に側線器の受容細胞について，Ca^{2+}，ネオマイシン，４ＡＰなどの作用を観察し，ＴＰＩの関与について考察した。

側線器の機械的刺激に対する応答は，受容細胞表面に接している環境液中の Ca^{2+} 濃度によって著しく変化し，振動刺激に対する側線神経応答の同期性は Ca^{2+} が濃くなるほど大になる。環境液中にネオマイシンを加えると同期性は失なわれ，Ca^{2+} を加えると回復してくる。このことから，Ca^{2+} とネオマイシンが同一部位に作用していることが考えられる。Schacht はＴＰＩの Ca^{2+} 親和性が大であること，その代謝回転に対するネオマイシンの作用などから，ＴＰＩに注目しているがわれわれはこの考えをすすめて，受容細胞表面で TPI が Ca^{2+} やネオマイシンと結合する部位ではないかと考えている。ネオマイシンなどのもう一つの副作用として呼吸筋マヒが報告されている。神経筋接合部の前シナプス部位で，ネオマイシンやストレプトマイシンと４ＡＰが同一受容部位で拮抗的に働いているという報告もある。４ＡＰが側線器の表面でどのよ

うに働くかみると，４ＡＰのみではポジティブな効果はなかったが，ネオマイシンによる同期性の消失を４ＡＰによって防ぐことが出来，このとき４ＡＰの量が増加すればこの効果は大となった。これらネオマイシンや４ＡＰが受容細胞のシナプスに直接作用しているのでないこともたしかめた。さらに側線器のシナプス部における４ＡＰとネオマイシンの作用を他の方法で調べた。これらの結果から，受容細胞やシナプス部でCa^{2+}によって調節される機能にTPIが関与していると考えられる。

ＴＰＩの構造と機能

林　　浩平（群馬大・医）

一般に脂質は水－メタノール（上層）およびクロロホルム（下層）によって作られる２相溶媒系で下層に分配されるが，ＴＰＩはすべて上層に分配される。Ca^{2+}を加えると，TPI-Ca^{2+}はすべて下層に移行する。Ca^{2+}の結合によって親水性から疎水性へこれ程大きく変化する物質は，ＴＰＩ以外には生体内に見出すことができない。

血清アルブミンによって増大されたＡＮＳ（アニリノナフタレンスルホン酸）蛍光はＴＰＩの添加で著しく抑制され，テトラサイクリン－Ca^{2+}（またはmg^{2+}）蛍光は，各種脂質の中でＴＰＩおよびガングリオシドだけによって著しく増大される。神経線維をこれらの蛍光色素に浸して刺戟すると，動作電流に一致した蛍光増大がみられることが報告されているが，上記の結果は，ＴＰＩ，ガングリオシドのような水溶性脂質がこの蛍光増大現象に直接関係していることを示唆している。

ＴＰＩのモノエステルリン酸は他のリン脂質のディエステルリン酸と異り，水中の脂質２分子層（ラメラ）中でも運動性をもつことが^{31}P-NMRによって明らかであるが，これはＴＰＩのモノエステルリン酸の機能の重要性を示している。Ｘ線回折によってＴＰＩラメラには大量の水がとり込まれるが，無水または微量の水のもとではラメラ周期がＴＰＩ分子の長さの２倍よりも短かくなる（約65Å）。Ca^{2+}と結合すると多量の結合水が自由化されることが吸熱反応から推定されるが，Ca^{2+}と結合した状態でも水中ではラメラであることが電子顕微鏡によって確められている。

これらのＴＰＩの特性からＴＰＩが直接興奮性膜の透過性に関与する可能性を３通りのモデルとして提出し，これとＴＰＩの物理化学的性質の関係について述べる。

複合脂質の物性　ー ＴＰＩの水溶性に関連して ー

岩柳　茂夫（群馬大・工）

生体由来の複合脂質ＲＸのうちＴＰＩとガングリオシドとが水溶性であるのは，２本の炭化水素鎖Ｒの著しい疎水性を打ち消して余りある親水性がこれらの脂質の極性基Ｘにあるからである。“疎水度”は炭化水素鎖の長さと二重結合の数によって決まる。他方さまざまな極性基の相対的な“親水度”は，Ｘを水から適当な極性溶媒に移すに必要な自由エネルギーで測ることができる訳であるが，これまでそのような測定はあまりなかった。最近Proctor Gamble社のR.G. Laughlinは，Ｒを一定にして多数の界面活性剤ＲＸの“液晶性”などからＸの親水度を評価することを試みた。特に，(1) 酸性脂質のように正味の電荷があれば常に親水性は大きく，(2) zwitter ionのものがそれぞれにつぎ，(3) 糖のように多数の-OH基を持つことも親水性を大きくする，などの結論は，われわれにも関係深い。

生体関連複合脂質の親水性に関してわれわれの経験した事実は，次のとおりである。

（Ⅰ） 臨界ミセル濃度（ｃｍｃ）は，脂質の親水性が大きければ大きいと一応予想される。界面の活性剤に用いられる通常の方法の測定範囲内の大きなｃｍｃは，生体由来の多くの脂質のうちＴＰＩ，ガングリオシド，lyso型のものの他（ＰＳ以外の）酸性のものに見られた。

（Ⅱ） 脂質の層状構造（Ｌα あるいは，neat相）の繰返し単位の厚さｄ（＝脂質２分子層＋水層）をＸ線小角散乱法で測定するとき，水を加えるにしたがってｄは大きくなって行くが，ある水含量に達っするとそれ以上水を加えてもｄは増大しなくなり，系は２相になる。ＴＰＩでは，この最大水和はＣ＝0.3（脂質1grに2.3grの水に相当）で起る。カルジオリピン以外ではこの値は1gr以下である。ここでＣは脂質の重量分率。

（Ⅲ） 脂質ー水系の氷の融解現象を示差走査熱量計（ＤＳＣ）で観測してみる

と，ＰＣ，ＴＰＩ，ＰＳで著しい差異がある。後２者で融解の吸熱ピークは単一でない。見かけの融解のエンタルピーから算出される“unfrozen water”の分量は上記の順に大きく，これは親水性の指標とはなりそうにない。

トリホスホイノシチドの相転移と膜興奮

滝沢　俊治（群馬大・教養）

神経膜に多い水溶性リン脂質トリホスホイノシチド（ＴＰＩ）はCa^{2+}と結合することによって水への溶解性を大きく変えるなど，田崎の提唱するCa説が要求する性質をもったリン脂質である。事実，リゾＴＰＩによるモデル膜は大きな　価イオン透過能を有し，そのイオン透過能はCa^{2+}の存在により低下することが，林らにより見出されている。本研究においてはＴＰＩへのCa^{2+}の結合熱の測定を行ない，ＴＰＩの膜興奮現象への関与の可能性を検討した。混合熱の測定には応用電気製の微少熱量計の熱流検出素子をメルコア社製のサーモモジュールに交換した高感度微少熱量計をもちいた。またＴＰＩへのCa^{2+}の結合反応におけるエントロピー変化を評価するためにカルシウム電極をもちいて反応の平衡定数を求めた。ＴＰＩへのCa^{2+}の結合は吸熱反応であり，同じく酸性リン脂質のボスファチジルセリンへのCa^{2+}の結合が発熱反応であるのと対照的である。そこでこの吸熱反応の起源を調べるため，ＴＰＩから脂肪酸残基をはずした試料を作り，それとCa^{2+}との結合熱の測定を行った結果，それは発熱反応であることが判った。したがってＴＰＩとCa^{2+}との結合反応におけるエンタルピーの増大はＴＰＩの脂肪酸部位に由来するものと考えられる。一方カルシェウム電極を用いたTPI-Ca^{2+}結合の平衡定数から結合のエントロピーは$+70Cal-deg^{-1}\ mol^{-1}$と見積られた。以上のような熱力学的パラメーターからみて，ＴＰＩ水溶液系ではＴＰＩの炭化水素鎖の囲りに疎水性水和した水分子が存在し，ＴＰＩの極性基にCa^{2+}が結合することによってその水分子が放出されるものと考えられる。示差走査熱量測定により，ＴＰＩ水溶液の熱分析を行った結果，室温域に吸熱変化が見出された。この転移熱はＴＰＩへのCa^{2+}の結合反応のエンタルピーにほぼ等しいことも，上記のメカニズムをうらずける結果であると考えられる。これらのことからみてＴＰＩはイオンチャンネルを形成しうる性質をもつ分子といえる。

ホルモン受容体に於けるイノシトールリン脂質の役割

竹縄　忠臣（筑波大）

acetylcholine, α-adrenergic agentの様なchemical tranomitterやCAMPを2nd messengerとしない各種ホルモンや刺激が標的臓器でのphosphatidylinositol(PI)のturn overを亢進することはよく知られている。この際のホルモン作用発現のfirst stepはPIのdiacyl giycerolとinositol phos phate への分解である。又この結果代償的にＰＩ合成が促進され，PI turnoverの亢進が生ずる(1)。そのためPI levelは通常一定に保たれている。しかし代償性合成が分解に追いつかない場合，ＰＩのdeplctionを生じる(1)。PI level及びturnoverは直接ＰＩ合成及び分解酵素によって調節されている。ＰＩ合成酵素としてdenovoＰＩ合成の最終段階を司どるCDP-DG:inositol traneferaseとinositol exchange enzがある。CDP-DG:inositol transfereseはmicrosoneに存在し Mg^{2+} or Mn^{2+} を活性に要求し，CDP-DG ＋ inositol ⟶ PI－CMP の反応を解媒する(2)。inositol exchange enzはmicrosomeに存在し Mn^{2+} 要求性でPI bound inositolとfree inositolとの交換反応を司どる（3,4）。一方ＰＩをＤＧへ分解するphospholipase Cはcytosolに存在し，Ca^{2+} dependentにＰＩを分解する(5)。これらＰＩ合成及び分解を司どる酵素は，ホルモン刺激，Ca^{2+}, polyunsaturated fatty acidにより強く調節される。CDP-DG:inositol transferaseは Ca^{2+}, polyunsaturated fatty and により阻害され（6,7），ホルモン刺激も抑制的に働く。一方PI specific phospholipase Cは活性にかなり高濃度の Ca^{2+} を要求するがpolyunsaturated fatty acid 添加により Ca^{2+} 濃度を低下させることができる(7)。又PIへのKm valve 90μMであるがpolyunsaturated fatty acid 添加でKm valveは30μMへ減少した。又酸性リン脂質であるPA，PS及びlyso PCは本酵素活性を強く抑制する。この様にホルモン作用に於けるPI turnover亢進は Ca^{2+}, polyunsaturated fatty acidが重要な役割を果たしていることを明らかとした。

1. Egawa, K. and Takenawa, T. Biochem. J. in press (1980)
2. Takenawa, T. and Egawa, K. J. Biol. Chem. 252, 5419-5423, (1977)

3. Takenawa, T. et al Arch. Biochem. Biophys. 182, 244-250,(1977)
4. Takenawa, T. and Egawa, K. Arch. Biochem. Biophys. 202, 601-607, (1980)
5. Takenawa, T. and Nagai, Y. submitted for publication
6. Egawa, K. and Takenawa, T. Molecular Cellular Endocrinol. in press
7. Takenawa, T. and Nagai, Y. submitted for publication

生体受容機構とイノシトール燐脂質

西塚　泰美（神戸大・医，基礎生物学研究所）

種々のホルモンやカテコラミン（β作用）等，生理活性物質の作用に際して，cyclic AMP がきわめて重要な役割を果していることはすでに周知であるが，今日ではそれ以外にも数多くのホルモンやアセチルコリン，カテコラミン（α作用）等の外界刺激がカルシウムを介して多彩な生理機能をあらわしていると推定されている。また，これらの種々ホルモンや生理活性物質の作用に際しては，標的細胞のイノシトール燐脂質が速やかに代謝回転をうける事実は古くから指摘されているが，今日までその意義は不明のままである　我々は数年来，蛋白質燐酸化反応を介する生体機能の制御機序に関して解折を行ってきたが，今回イノシトール燐脂質の代謝回転が直接共役する生体膜の新しい受容機構を見出した。この機構はcyclic AMP 系と対応する第２の外界情報の受容伝達系をなすものであって，標的細胞に作用した生理活性物質がイノシトール燐脂質を選択的に加水分解し，ここに生成する不飽和脂肪酸を含有する微量のジグリセリドがcyclic AMP に対応する２次伝達物質として作用し，カルシウムとセリン燐脂質の存在下に特定の蛋白質燐酸化酵素を特異的に活性化させている。この種の蛋白質燐酸化酵素は脳神経系をはじめ多くの組織に広く存在しており，生体の多彩な機能を制御する活性を有しているため，イノシトール燐脂質の代謝回転はこの一群の生理活性物質の作用発現の引き金として決定的な重要性を担っていると推定される。今回の研究会においては，この種の生体情報の受容伝達機構の酵素化学的基盤について報告し，併せてこの機構が，実際に生体内において作動しているとの実験的根拠を血小板のトロンビンによる凝集反応，セロトニン放出反応をモデルとして提示したい。

細胞表面とガングリオシド

飯田　静夫（東京医科歯科大）

糖脂質は他の複合糖質と同様に特に細胞表面に局在しており，細胞の表面でおこるいろいろな生物現象に関連しているのではないかと考えられている。

動物に多いスフィンゴ糖脂質は脂質部分のセミラドに結合した糖鎖部分の構造のちがいによって分類され，現在では約１００種類が知られている。これら糖脂質の分布パターンが動物の種属，臓器に特異的であることが報告されており，また糖脂質はＡＢＯ血液型やForssman などの抗原物質であり， 細胞のマーカーとしての役割を果していることは明らかである。しかし糖脂質がこの他種々の生理活性物質に対する受容体（結合部位）としての機能をもつことを示す実験が有名なコレラ菌毒素をはじめとして，細菌毒素，ホルモン，インターフェロン，リンホカイン，その他の場合について報告されている。また細胞間の相互作用にも関係しているという報告もある。ここでは in vitro での神経筋接合の形成に及ぼす糖脂質の影響の例を招介する。鶏胚から得た骨格筋細胞と脊髄小片の混合培養系で筋細胞から自発性終板電位が記録されるか否かで神経筋接合の形成を判定した。ガングリオシドなどの糖脂質を培養系に加えると接合の形成は低濃度では促進，高濃度では抑制された。外部から加えたガングリオシドは細胞にとり込まれ，神経と筋の接触直後に作用していることが明らかにされた。ＧＭ，ガングリオシドと特異的に結合するコレラ菌毒素を加えると接合の形成は抑制される。これらの結果は糖脂質が in vitro での神経筋接合の形成に影響することを示している。

こうした実験は現在盛んに行われているが細胞の認識の問題は非常に複雑で，情報伝達の機構， in vivo と in vitro のちがいなどについて知ることの少い現状では，糖脂質が細胞のマーカーとしての機能以外に何らかの機能を持つか否かについて知るためにはより多くの研究が必要である。

ガングリオシドの構造と機能　— 最近の話題を中心として —

岩森　正男（東京大・医科学研究所）

シアル酸含有スフィンゴ糖脂質と定義されるガングリオシドは，その基本糖鎖構造から５種に分類される。すなわち，神経系の主要糖鎖であるGanglio-senes，非神経系に多いLacto-series，およびHemato-series，そして確認されている分子種がそれぞれ１種類しかないGM4とGlobo-seriesである。これらはシアル酸の結合位置と糖鎖構造の多様性により非常に多くの分子種を構築している。ガングリオオシドの大部分は生体膜二重層の外層に分布し，直接細胞の外環境と接していて，細胞の発生，分化，腫瘍化という複雑な生命現象の一翼を担っていると考えられ，機能分子としての研究が近年ますます増加してきた。この場合，ガングリオ分子種の膜特異性が大きな問題となる。ガングリオシロマッピング法は，生体膜のガングリオシド分子種を精度よく解析するために考案された分析法であるが，この方法を応用することにより，新しい構造を有する分子種の確認や，組成の膜特異的分布の解析が行われた。特に，免疫系組織におけるガングリオシドの糖鎖特異的分布が注目される。さらにこの知見をふまえて，抗糖脂質糖鎖抗体を用いた免疫的手法による分析により，動物種による糖鎖構造の多様性さらにはナチュラルキラー細胞におけるＧＡＩの分布などが確認された。Ｔ細胞サブセットを認識するモノクロナル抗体の半分は糖脂質抗体であると言われるごとく，糖脂質糖鎖の免疫原性は非常に強く，ガングリオシドならびに関連糖脂質の免疫系との結びつきが示唆される。ヒトの場合，自己免疫疾患や膠原病で高頻度に糖脂質と反応する液性抗体が検出されるのも疾病の機構と糖鎖認識が何らかの関係を持つことを予想させる。さらに白血病細胞にも諸種脂質が含有され，ヒトの疾患の発症と生体防御機構との関係および治療においても，新たな見地から問題を投げかけている。また，ガングリオシドを治療薬として用いる動きについても言及する。

ガングリオシドに関するコメント

林　浩平（群馬大・医）

興奮性膜の透過性に関与する分子としては，Ca^{2+}への親和性が高く，Ca^{2+}が結合することによって親水性が疎水性に大きく変化することが第一の必要条件と考えられる。ガングリオシドもＴＰＩと同様に親水性が強く，Ca^{2+}への親和性も高い。

クロロホルム（下層）および水ーメタノール（上層）の２相溶媒系でガングリオシドー塩基性タン白質複合体は，両者の比率を僅か変えることによって，親和性から疎水性へ大きくその性質を変え，更にCa^{2+}がこの変化に大きく影響する。ガングリオシドータン白質複合体もＴＰＩの場合と同様に，Ca^{2+}と複合体を作って２相溶媒系では界面に析出する。このようなことからガングリオシドもＴＰＩと同様に膜の透過性に直接関与する可能性が考えられるが，Ca^{2+}との結合様式がＴＰＩの場合のイオン結合とは全く異ることが注目される。

ガングリオシドとCa^{2+}の結合は負電荷をもつシアル酸の数とは無関係なモル比１：１のキレート結合であるため，Ca^{2+}の結合量はＴＰＩの場合よりも少ない。ＴＰＩおよびＴＰＩと等モルのガングリオシド混合液のCa^{2+}結合量は全く等しいことから，ＴＰＩにイオン結合したCa^{2+}にガングリオシドがキレート結合していることが考えられる。すなわち，ガングリオシドは遊離Ca^{2+}と結合するだけでなく，他の物質にイオン結合しているCa^{2+}にも結合する可能性を示すもので，生体内におけるガングリオシドとCa^{2+}の相互作用は，ＴＰＩその他のCa^{2+}に親和性をもつ物質の場合とは異ると考えられる。

課　題　名

生理学研究所の研究体制に関する打合せ（1980. 11. 20～11. 21）

橋本　虎六＊（食品，薬品安全センター）

課　題　名　Cardiac Nerve and Cardiac Cellular Function
(1980. 11. 21～11. 22)

Optical multi-recording from excited heart muscle using a voltage sensitive dye. T. Sawanoboli & K. Kamino(Tokyo Med. & Dent. Univ.)

Inhibition of ouabain induced arrhythmias of ouabain sensitive myocardial cells by contact with ouabain-resistant cells in culture and its ionic mechansm. K. Goshima (Nagoya Univ.)

Action of α- and β-agonists on the bullfrog atrium. M. Goto, M. Urata & A. Yatani (Kyushu Univ.)

The antagonistic actions of adrenaline and acetylcholine on membrane currents in guinea-pig papillary muscle. R. Ochi (Juntendo Univ.)

Estimation of ACh contents in the skeletal muscle and heart of the frog.
I. Seyama & K. Ueda (Hiroshima Univ.)

Noise and relaxation analysis on the ACh-indnced K current (1).
W. Trautwein (Univ. of Saarland) & A. Noma (Seiriken Institute)

Noise and relaxation analysis on the ACh-induced K current (2).
A. Noma (Seiriken Institute) & W. Trautwein (Univ. of Saarland)

Ca^{++}-dependent oscillation of membrane potentials in dog ventricular muscle fibers.
M. Hiraoka (Tokyo Med. & Dent. Univ.)

Caffeine contracture in cardiac muscle.
M. Endo & T. Kitazawa (Tohoku Univ.)

Overdrive hyperpolarization in the bullfrog atrium
T. Fujino & M. Goto (Kyushu Univ.)

Effects of pH on the canine sinus node. H. Sato, K. Hashimoto & S. Imai (Niigata Univ.)

Interaction between electrogenic sodium pump and Na-Ca exchange system in rabbit A-V node cells.
Y. Kurachi & H. Irisawa (Seiriken Institute)

General Discussion

OPTICAL MULTI-RECORDING FROM EXCITED HEART MUSCLE USING A VOLTAGE SENSITIVE DYE 抄 録

T. Sawanobori and K. Kamino *

Department of Cardiovascular Diseases
Medical Research Institute
*Department of Physiology, Faculty of Medicine
Tokyo Medical and Dental University

It is now possible to measure optically changes in the electrical membrane potential. This technique is based on the observation that changes in the potential across membranes stained with voltage sensitive dyes are accompanied by changes in their optical properties. An important advantage of an optical method for recording action potentials is that many cells or portions of the preparation can be monitored simultaneously. Optical multi-recording of neural activity in invertebrate ganglia and application for this method to early embryonic chick heart are reported. In the present work, we examined the possibility of simultaneous multi-recording of action potential in cardiac preparation from the bullfrog atrium. The absorption signals of a merocyanine-rhodanine dye in response to action potential were measured on the bullfrog atrium equilibrated in Ca^{2+}-free solution to suppress contractions. Simultaneous recording of optical signals and membrane potential showed the same time course within 15 to 30 minutes after exposure to Ca^{2+}-free solution. The action spectrum of this dye exhibited a triphasic pattern with a decrease in absorption

at 750 nm, an increase from 720 to 700, a decrease from 670 to 680 nm, an increase from 660 to 640 nm and a decrease from 620 to 500 nm. The maximum absorption change was recorded with a 700 nm interference filter. Using five or eight photodetectors we have been able to simultaneously monitored the action potential from five or eight different regions of the preparation. The average values (0.25 m/sec, n = 5) of the conduction velocity assessed by simultaneous optical multi-recording were all but equal to those (0.29 m/sec, n = 5) obtained with electrical signals. The sequence of excitation waves in response to the frequency of stimulation was monitored. Thus, the optical method can validly be used to analyse arrhythmia-related mechanism.

INHIBITION OF OUABAIN-INDUCED ARRHYTHMIAS OF OUABAIN-SENSITIVE MYOCARDIAL CELLS (QUAIL) BY CONTACT WITH OUABAIN-RESISTANT CELLS (MOUSE) AND ITS MECHANISM

K. Goshima and S. Wakabayashi

Institute of Molecular Biology, Faculty of Science, Nagoya University, Chikusaku, Nagoya, 464 Japan

1) Addition of ouabain caused gradual increase in the intracellular Na content of cultured quail and mouse heart cells, and arrhythmias appeared to develop when the Na content exceeded about 1.5 times the normal level. The ouabain concentrations necessary for induction of increase in Na content and genesis of arrhythmias were high for mouse heart cells and low for quail heart cells.

2) When quail heart cells in contact with mouse heart cells formed confluent mosaic cell-sheets, these sheets became progressively more resistant to ouabain-induced arrhythmias with increase in the proportion of mouse cells.

3) Ouabain-induced increase in the Na content of the mosaic cell sheets

was less than expected from the increases in sheets entirely composed of each cell-type.

4) Contact of quail heart cells with ouabain-resistant non-excitable cells (3T3-A31 cells) which are able to form functional contact with heart cells inhibited the ouabain-induced arrhythmias of the quail heart cells.

5) These observations suggest that the mechanism of prevention of ouabain-induced arrhythmias of ouabain-sensitive heart cells by contact with ouabain-resistant cells is as follows: When a suitable concentration of ouabain is added to mosaic cell sheets, the ouabain inhibits the Na pump of only the ouabain-sensitive heart cells, thus the Na content of the cells increases. Tha Na ions are then transmitted to neighbouring ouabain-resistant cells, through low-resistant junctions, and pumped out through the functional pump of these ouabain-resistant cells.

ACTION OF α- AND β-AGONISTS ON THE BULLFROG ATRIUM

M. Goto, M. Urata and A. Yatani

Department of Physiology,
Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka, 812 Japan

A number of studies have indicated that adrenergic amines have α- and β-agonistic effects on myocardium. The fundamental mechanism mediating cardiac responses to α-agonists, however, remains a topic of dispute with contradictory experimental results. We studied the action of α- and β-agonists on the membrane potential, current and tension components of the atrial muscle of summer bullfrog, under voltage clamped and unclamped conditions.

Isoproterenol ($10^{-9} \sim 10^{-4}$M) as well as adrenaline ($10^{-7} \sim 10^{-4}$M) produced dose-dependent positive inotropic effects, while methoxamine ($10^{-8} \sim 10^{-4}$M) and phenylephrine ($10^{-8} \sim 10^{-4}$M) with propranolol (10^{-6}M) elicited negative inotropic effects. The positive inotropic

effect was accompanied with a hyperpolarization and an increase of overshoot and plateau level of action potential, and the negative inotropic effect, with reverse changes. Under voltage clamp, adrenaline and isoproterenol produced marked enhancement of slow inward current (I_s), delayed outward current (I_x), and I_s-dependent tension as expected, while I_s-independent tonic tension was inhibited. Background current (I_b) and anomalous rectification (I_{k_1}) were almost unaltered. Contrarily, Methoxamine and phenylephrine with propranolol depressed all of these currents except I_b. Electrogenic Na-K pump was inhibited by methoxamine while it was enhanced by isoproterenol. Thus, semi-steady I-V curve tended to be shifted downwards by methoxamine and upwards by isoproterenol. These effects of α-agonists appeared more markedly when isoproterenol was present.

From these observations it will be concluded that in the bullfrog atrium α-agonist produces β-blocker like actions and elicites an inhibitory action on the Na-K pump.

THE ANTAGONISTIC ACTIONS OF ADRENALINE AND ACETYLCHOLINE ON MEMBRANE CURRENTS IN GUINEA-PIG PAPILLARY MUSCLE

R. Ochi

Department of Physiology, School of Medicine, Juntendo University, Tokyo, 113 Japan

The effects of vagal transmitter acetylcholine(ACh) and sympathetic transmitter adrenaline on the membrane currents of guinea-pig papillary muscle were studied by a single sucrose gap voltage clamp method. The slow inward current(i_s) was depressed

by ACh with little change in its time course of inactivation. The peak amplitude of i_s was diminished in a proportionate manner in the current-voltage relationship, and the maximal amplitude was depressed to 57.1 ± 12.3% (mean ± S.D., n=40) by 2μM ACh. The time-dependent outward current(i_K) during the depolarization pulse was also diminished by ACh and similar depression of i_K by ACh was obtained in the presence of 2 mM Co^{2+}. The time-independent inward rectifying outward current was not affected by ACh. The depressive actions of 2μM ACh on i_s and i_K were almost completely removed by the addition of 1μM atropine.

i_s was depressed to 82% by 10^{-7}M ACh but 46% i_s still remained in the presence of 10^{-4}M ACh. $5x10^{-7}$M adrenaline increased i_s to 240% and these augmented i_s were diminished to 80% by the addition of 10^{-4}M ACh. Thus ACh-induced decrease of i_s was greater in amplitude in the presence of adrenaline. When 2μM adrenaline was applied together with 0.2mM gentamicin (Ca channel blocker), i_s with similar amplitude and time course of the control in normal Tyrode was obtained. These i_s were more powerfully inhibited by ACh than in normal Tyrode. The amplitude of i_s was diminished from 83.7 ± 20.4%(n=7) to 22.2 ± 7.3% by 2μM ACh. i_K could be increased by adrenaline even when i_s increase was blocked by gentamicin.

ACh inhibited i_s and i_K antagonistically to adrenaline in mammalian ventricular muscle. The inhibitory action of ACh on i_s was greater in efficiency in the presence of adrenaline, which could be responsible for the accentuated sympathetic-vagal antagonism in the regulation of myocardial contractility.

NOISE AND RELAXATION ANALYSIS ON THE ACH-INDUCED K CURRENT

W.Trautwein (Univ. of Saarland)
A.Noma (National Inst. for Physiology)

The kinetic behaviour of the acetylcholine-induced potassium channel and the single-channel conductance were studied. A conventional two micro-electrode voltage-clamp technique was used. The preparation was a flat piece of the rabbit sino-atrial node of about 200 um in both width and length. ACh was applied by superfusing a given concentration or ionophoretically.

The membrane current on voltage jumps was recorded. The drug-operated current was measured as the difference between the control and the current in the presence of ACh, assuming that ACh did only induced a specific potassium channel. In fact, the reversal potential of the current recorded at different Ko behaved like a K electrode. Neither the slow inward current nor the time-dependent K current (delayed rectification) were affected by ACh in the concentration used. On depolarization the ACh-induced current decreased from an initial peak to a steady-state amplitude. On hyperpolarizing jumps the current increased from initial small amplitude to a larger steady-state value. The time course of these changes was exponential with time constants between 100-200 msec. The time-dependent changes of the ACh-induced current were observed at different Ko between 3 and 20 mM, indicating that they cannot be explained by accumulation or depletion of K in the cleft space. The changes in the ACh-induced current were interpreted as a

relaxation phenomenon due to the voltage dependence of the opening and closing rate constants of the potaswium channel.

The analysis of the current fluctuations confirmed the kinetic behaviour of the ACh-induced channel. In the presence of ACh their variance increased proportionally to the mean amplitude of the ACh-indued current. The power density spectrum of the ACh-induced fluctuations was well fitted by a single Lorentz curve. The time constant measured from the corner frequency was about 200 msec. The single channel conductance obtained from the noise measurements was about 4 pS. Estimation of the number of ACh channels per unit surface membrane was about 1/um2. As compared to the nicotinic receptor in the end-plate the muscarinic receptor is characterized by a slow kinetic behaviour and smaller single channel conductance.

Ca^{++}-DEPENDENT OSCILLATION OF MEMBRANE POTENTIALS IN DOG VENTRICULAR MUSCLE FIBERS

M. Hiraoka

Department of Cardiovascular Diseases
Medical Research Institute
Tokyo Medical and Dental University
Tokyo 113, Japan

We have recently shown that oscillatory after-potentials (OAPs) could be observed in dog ventricular muscle fibers at normal resting potential levels (more negative than -70 mV). The OAPs were seen when the preparations were superfused with the K^{+}-free, high-Ca^{++} solution (Ca^{++} = 3.6 - 7.2 mM). The mechanism of the OAPs has not

been fully understood, but the Ca^{++} movement in or across the membrane was suggested to play an important role. To clarify the generation mechanism of the OAPs further, the membrane potential and the isometric tension were recorded simultaneously with dog ventricular trabeculae or papillary muscles. When the muscle fibers developed the OAPs, aftercontractions (ACs) of small amplitudes were always observed with having the similar peak timings of the OAPs. The amplitude of the ACs showed the similar dependence, to that of the OAPs, both on the basic cycle length of the applied impulses and on the numbers of the preceding impulses. The OAPs and ACs were augumented by the premature stimulations, and the twitch contraction increased its amplitude at the shorter coupling intervals than the basic cycle length. The amplitudes of the OAPs and of the ACs increased in the higher $(Ca^{++})_o$, in the reduced $(Na^{+})_o$ and by the application of isoproterenol. Verapamil (2 or 5 mg/L) reduced the amplitudes of the OAPs and of the ACs, but could not cause a complete abolition of them. An addition of external K^{+} (2.7 or 4 mM) produced a complete elimination of both activities. These results indicate that a regenerative release of Ca^{++} from the internal store may be operative in these conditions, which may, in turn, cause membrane potential changes.

CAFFEINE CONTRACTURE IN CARDIAC MUSCLE

M. Endo and T. Kitazawa

Department of Pharmacology,
Tohoku University School of Medicine,
Sendai 980, Japan

Unlike skeletal muscle, cardiac muscle responds to a high concentration of caffeine with no or only small contracture in normal external solution. It is well known, however, that when Na ions are removed from the external solution, caffeine becomes effective in inducing contracture of cardiac muscle. This inhibitory effect of Na ion on caffeine contracture of cardiac muscle was further studied.

Thin fiber bundles, about 100 μm in diameter, were dissected from Xenopus atrial or ventricular traveculae or papillary muscles of guinea pig, tied with fine silk thread and suspended in a trough, through which solutions could be perfused rapidly. Isometric tension was recorded with a strain gauge transducer. To avoid possible contribution of Ca ions entering from the external medium to induction of contracture, caffeine was usually applied in Ca-free solutions containing 1 mM EGTA.

Characteristics of caffeine contractures of bundles of Xenopus atria appeared to be different from those of Xenopus ventricles or guinea pig papillary muscles in the following respects. (1) A high concentration of caffeine caused a substantial tension development in Na-containing media in the former but only a small tension, if any, in the latter. (2) After an application of caffeine in the presence of Na, much amount of Ca appeared to remain in cardiac cells of the latter preparations but not of the former. (3) In the presence of 10-20 mM Mn ions, which are known to inhibit Na-Ca exchange effectively, dose-response relationships of caffeine contracture in Na and

Li solutions were rather similar in the former but still widely apart in the latter. These results suggest that inhibitory effects of Na ions on caffeine contracture in Xenopus atria might be explained by the Na-Ca exchange system, but in Xenopus ventricles or guinea pig papillary muscles some other mechanisms might play an important part. These conclusions, however, are still tentative, since, while we noted that poor preparations tend to produce larger caffeine contractures in Na solution, there is no guarantee at the moment for the fact that the quality of preparations is the same in different kinds of preparations.

OVERDRIVE HYPERPOLARIZATION IN THE BULLFROG ATRIUM

T. Fujino and M. Goto

Department of Physiology,
Faculty of Medicine,
Kyushu University, Fukuoka 812, Japan

In myocardium high-rate stimulation commonly causes biphasic changes of the basal membrane potential. The phenomenon consists of an initial depolarization (ID) at the onset of rapid stimulation, followed by a late repolarization (LR). When the stimulation is abruptly ceased, a postdrive hyperpolarization (PH) ensues, and then the membrane potential decays gradually back to the control level. These membrane potential changes are thought to be mainly due to ionic accumulation or depletion in the extracellular space and electrogenic sodium pump, although other mechanisms are involved

depending on kinds of myocardial tissues.

We investigated the effects of high-rate stimulation (1 - 1.8 Hz) on the membrane potential of the bullfrog atrium with conventional double sucrose-gap method and compared the effects in normal solution with those in Ca-free Ringer solution. LR and PH were markedly depressed in ouabain (10^{-6}M) and K-free Ringer solution, and completely eliminated by Na-free condition. The time course of the membrane potential changes was successfully analysed into apparently distinct exponential components during and after overdrive, each of which may correspond to K-accumulation, K-depletion, Na-pump activation and deactivation. Ca-free condition markedly enhanced the amplitude of membrane potential changes (ID, LR and PH), but did not appreciably alter the tmie constant of each exponential component. The enhanced amplitude in Ca-free solution can be explained either by 1) decreased G_k, 2) prolonged action potential, 3) increased intracellular Na or combination of these factors. Thus, the effects of overdrive in Ca-deficient condition appeared to reflect more specifically the electrogenic Na-K pump than in normal Ringer solution.

EFFECTS OF pH ON THE CANINE SINUS NODE

H. Satoh, K. Hashimoto and S. Imai

Department of Pharmacology, Niigata University School of Medicine, Niigata, 951, Japan

It is well known that changes of pH alter cardiac functions. In acidosis or hypoxia, cardiac functions are

suppressed. Since there are few reports on the effects of pH on the canine sinus node, we observed the effects of various pH (6.0, 6.5, 7.0, 7.4, 8.0, 8.5 and 9.0) on the isolated canine sinus node and atrial muscle.

We used isolated right atrial preparations which were obtained from mongrel dogs weighing 2-5 kg and perfused with oxygenated Tyrode's solution through the dorsal right atrial artery at a rate of 3 ml/min. First, the preparations were perfused by normal solution (pH 7.4), and then the solution was chagned to one with a different pH. The preparations were maintained at 36 $\pm$ 1 °C. Action potentials of the sinus nodal area, with a slow rate of rise at phase 0 and diastolic depolarization, were recorded using the conventional microelectrode technique.

Low pH perfusate prolonged the cycle length and depressed the atrial contraction. These effects occurred slowly and it took 3-5 min to reach its maximum change. Alkaline solutions caused the opposite changes. Both in low and high pH solutions, the changes in cycle length was not stronger than those in atrial contraction.

For the configuration of action potentials of the sinus nodal cells, acid solutions caused reduction of the amplitude of action potential and the rate of rise of phase 4 depolarization, and prolonged the duration of action potential. It seemed that the prolongation of cycle length was caused by both the decrease in the rate of rise of phase 4 depolarization and the prolongation of the duration of action potential. Alkaline solutions caused the reverse changes; increased the rate of rise of phase 4 depolarization

and the amplitude of action potential, and shortened the duration of action potential.

Interaction between electrogenic sodium pump and Na-Ca exchange system in rabbit A-V node cells

Y.Kurachi and H.Irisawa

Electrogenic sodium pump activity is the essential mechanism to maintain intracellular Na concentration constant. Ample evidences of this mechanism have been presented in various cardiac tissues.

In A-V node cells, short period of K free perfusion elicited transient hyperpolarization of the membrane when the perfusate was switched to K containing solution This K induced transient hyperpolarization was confirmed as electrogenic Na extrusion of loaded Na ion during K free perfusion.

When the preparation was perfused by K free solution more than 7 minutes, the membrane hyperpolarized spontaneously within K free solution. This spontaneous hyperpolarization depended on extracellular Ca and was accompanied with increase of the tonic tension and the membrane slope conductance. We considered this phenomenon was caused by the interaction between Na pump and Na-Ca exchange system in A-V node cells.

Using this phenomenon as an indicator, we examined the changes of the effectiveness of Na-Ca exchange system during K free perfusion. From this experiment we concluded the important role of Na pump to maintain Na-Ca exchange system effective.

課　題　名　**分子運動を指標とする研究方法の生理学への応用（1980. 11. 28～11. 29）**

Potential Sensitive Dye　　神野耕太郎（東京医歯大・医・生理）

ナノ秒蛍光法による生体膜の動的性状　　池上　明（理研）

蛍光偏光解消法による蛋白質，蛋白質ー表面活性剤複合体の動的構造
曽我美　勝　　長岡　俊治（岐大・医・生理）

レーザーラマン分光による神経膜の解析
大畑　進　　会沢　勝夫（東京医大・生理）

細胞および細胞顆粒の誘電分散　　入交　昭彦（高知医大・生理）

Saturation Transfer ESRによる膜分子の動的挙動の解析
下山雄平（函館工専）　亘　弘（生理研）

生体膜における蛋白質と脂質の相互作用　　大西俊一（京大・理・生物物理）

赤血球機能と膜のかたさ　　志賀　健　　前田　信治（愛媛大・医・生理）

^{2}HNMR による生体膜の研究　　斉藤　肇（がんセンター研究所）

ミオシンの ^{1}HNMR　　赤坂　和之（京大・理・化学）

核磁気共鳴法による細胞内分子拡散係数の測定　　吉崎和男（京府医大・生理）

総合討論　　（司　会）井上　章　　中馬　一郎

抄　　録　**Potential - Sensitive Dyes**

神野耕太郎（東京医歯大・医）

膜電位の光学的測定は，膜電位の変化にともなう，外来性（extrinsic）の吸光とか蛍光の変化を基盤としている。ポテンシアル・プローブとしては色素が用いられるが，それは，次のように二つに分類される。

(1)　fast-response dyes：

メロシアニン・オキサゾロン系，メロシアニン・ローダニン系色素で，膜電位変化に対する応答時間が２０μ秒～５μ秒でかなり短かく，活動電位のような速い変化をモニターするのに適している。

(2) slow-response dyes：

シアニン系，オキソノール系の色素がこれに属し，これらの応答時間は比較的長く，ゆっくりした膜電位変化を測定するのに適している。したがって，主として，細胞や細胞内顆粒などのサスペンション系で用いられる。

このような，ポテンシアル・プローブを用いての，膜電位の光学的測定の特徴的な面は，次のように要約できる。

(a) 微小電極が刺入できないほど小さい細胞や細胞内器官の膜電位の測定が可能であること。

(b) ひじょうに多数個の細胞とか，多数ケ所の異なった部位からの活動電位や膜電位変化が同時記録できる。

したがって，この方法は，通常の電気生理学方法の適用限界を補なう方法として，広く用いられるようになってきた。

発表論文

1. Hirota, A., Fujii, S. & Kamino, K. Jpn. J. Physiol. 29, 635-639 (1979)
2. Kamino, K. Top. Gen. Physiol. Biophys. 45-51(1980)
3. Fujii, S., Hirota, A. & Kamino, K. J. Physiol. (Lond.) 304, 503-518 (1980)
4. Fujii, S., Hirota, A. & Kamjno, K. J. Phytiol. (Lond.) 311, 1-14 (1981)
5. Fujii, S., Hirota, A. & Kamino, K. J. Physiol. (Lond.) in press (1981)
6. Kamino, K. Hirota, A. & Hujii,S. Nature (Lond.) in press (1981)
7. Gupta, R. K. et al. J. Membrane Biol. in press (1981)

ナノ秒螢光法による生体膜の動的性状

池上　　明（理化学研究所）

生体膜を構成している脂質の運動状態を研究する方法の一つとして，ナノ秒

蛍光偏光解消法がある。これは，偏光した励起光により照射される蛍光の偏光度の時間変化から蛍光の寿命程度の時間内に分子がどれぐらい回転できるかを求める方法である。

ここではまず，測定の原理と装置について概観し，膜の様に非等方的な系での分子の回転運動を解析するのに有効なwobbling-in-cone modelを説明する。この解析により注目している色素分子の回転拡散定数と回転運動できる角度範囲が求まる。そして，具体的研究例として，種々の生体膜，再構成膜，脂質二層膜に入れた蛍光色素1,6 -diphnyl-1,3,5 -hexutriene(DPH)の回転拡散運動について報告する。即ちＤＰＨの運動は脂質の炭化水素鎖の運動を反映するが，この運動に対する相転移，不飽和脂肪酸，コレステロール，及び蛋白質の効果を議論する。

又，光プロトンポンプの機能で知られる紫膜中のレチナールの位置，方向を蛍光のエネルギー移動の測定から解析した例についても述べる。

螢光偏光解消法による蛋白質，蛋白質ー表面活性剤複合体の動的構造

曽我美　勝　　長岡俊治（岐阜大・医）

定常，時間分解偏光解消測定法を用い，牛血漿アルブミン（ＢＰＡ）のTRP-134，TRP-212の動き[(1)]，ＳＨ基をDansylaziridime でラベルした蛋白質（DNS-AZ-Prot）のＳ-Ｓ結合を還元し，これら還元蛋白質とドデシル硫酸ソーダ（ＳＤＳ）の複合体（結合SDS：1.4g/g of Prot）の動的構造について測定した。[(2)]

ＢＰＡは酸性側（pH3.75－4.5）において，Ｎ－Ｆ転移（$N+nH^{+} \rightleftharpoons F$，N：N型，F：Ｆ型）と呼ばれる構造転移をする。蛍光色素，ＡＮＳとの複合体（$BPA-ANS_{1.0}$）の蛍光偏光解消測定，蛍光寿命測定より分子全体の回転緩和時間(ρ)はＮ型，Ｆ型でそれぞれ107，126nsec であった。ＴＲＰ蛍光偏光解消，蛍光寿命測定より，ＴＲＰ側鎖の回転緩和時間を求めた。Ｎ型，Ｆ型のρはそれぞれ78，168 nsec であった。Ｎ型のρはMunro 等（1979）の60 nsec にほぼ等しく，分子全体の回転緩和時間より小さく，ＴＲＰ側鎖，ＴＲＰ近傍の局所的な動きを示している。Ｆ型ではＴＲＰ蛍光より求めたρは分子全体の値に近い。これはＦ型でＴＲＰ側鎖が不動化されることを示してお

り，ＴＲＰの円二色性吸収の変化に対応している。[3]

Ｓ－Ｓ結合を還元したDNS-AZ-Prot とSDS 複合体の回転緩和時間は分子量に関係なく（BPA：6.6×10^4，Ovoalbumin：4.3×10^4，β-lactoglobulim：1.84×10^4），約40 nsec であった。この結果はTanford等（1970），Wright等（1975），Rowe等（1975）により提案されたRIGID ELLIPSOID MODEL に反して，SDS複合体がFLEXIBLE DOMAIN を持つことを示唆している。筆者等の結果は白浜等のNECKLACE MODEL に近い。

1) M. Sogami et al Fluorescence Polarization studies on the Conformational Transition of Bovine Plasma Albumin Biochem. Biophys. Acta, 393, 1975 446-469

2) 曽我美　勝等　蛍光偏光解消測定による蛋白質ー界面活性剤複合体の動的構造　日本生物物理学会　第18回 1980　講演要旨集　P.179

3) 曽我美　勝等　Biochem.Biophys.Acta（投稿中）

レーザーラマン分光による神経膜の解析

会沢勝夫　大畑　進（東京医大）

Raman spectraによって，cray fish abdominal nerve cord membraneのK^+depolarizationに伴うphospholipidの動態を測定した。phospholipidのhead regionにあるpole siteのO⁼P⁼O-基のstretching vibrationは，K^+depolarizationによりasymmetric modeからsymmetric modeに変った。この時head regionの長軸にそったO－P－O基は，symmetric stretching vibrationを増した。この振動により隣接するC-Oの振動も増強され，又C-Cのskeletal stretching vibrationに帰属する910, 925, 945cm^{-1}のlinesも増強された。これら炭素原子に付随した水素原子のmodeはCH_2の wagging vibration に帰属する1420cm^{-1}の増強から，長軸にそった方向の動きを示していた。この様な一連の動きに伴ってhead regionのもう一つのpole siteであるcholine group のN^+-CH_3 symmetric deformationに帰属するlineは1342cm^{-1}から1355cm^{-1}にshiftし，同時に$N(-C)_3$のasymmetric stretching vibrationに帰属するlineは878cm^{-1}から888cm^{-1}にshiftし，両linesは共に増強された。以上のごとくK^+depolarizationに伴うphosphate groupの動きは，choline groupに伝わり，その結果choline group

はanhydrous stateからhydrate stateへと状態変化する事がRaman lineの測定より明確となった。

細胞および細胞顆粒の誘電分散

入交昭彦　浅見耕司（高知医大）

細胞や単離した細胞小器官のサスペンションについて複素誘電率（あるいはインピーダンス）を測定すると，それは測定に用いた交流の周波数とともに大きく変化する。この現象はいわゆる「誘電分散」の一種であり，このような誘電挙動の解析によって，細胞や単離小胞の限界膜およびその内部に含まれる液相などの電気的性質 ── 誘電率εと導電率κ ──を非破壊的に知ることができる。通常の遊離細胞や有膜オルガネラの場合，分散の出現する周波数域は0.1～100MHzのいわゆるラジオ波領域であり，膜の破壊によって分散が消失することから，この分散の生因は「限界膜」構造に求めることができる。そこで最も簡単なモデルとして細胞を一重の球殻（single-shell model）で代表させ，あるいはリンパ球の如く巨大な核をもつ細胞に対しては更に核膜を念頭においた二重球殻（double-shell model）モデルの誘電理論式を導き，実測の誘電挙動を説明しうるモデル各相のパラメータの組をコンピュータ解析によって求める方式を提出した。この方法を用いて，リンフォーマ細胞，クロマフィン顆粒，赤血球および大腸菌などの解析をおこない，細胞生理学的に興味ある知見を得た。

(1) Irimajiri, A., et al, Passive Electrical Properties of Cultured Murine Lymphoblast(L5178Y) with Reference to Its Cytoplasmic Membrane, Nuclear Envelope and Intracelluar Phases.
J. Membrane Biol. 38: 209-232 (1978)

(2) Irimajiri, A., et al. A Dielectric Theory of "Multi-Stratified Shell" Model with Its Application to a Lymphoma Cell.
J. Theoret. Biol. 78: 251-269 (1979)

(3) Irimajiri, A., et al. A Dielectric Modeling of Cells and Organelles
"Topics in General Physiology and Biophysics"
喜多見書房：22-35 (1980)

(4) Asami, K., et al. Dielectric Analysis of E.coli Suspensions in the Light of the Theory of Interfacial Polarization.
Biophys. J. 31: 215-228 (1980)

(5) Asami, K., et al. Dielectric Approach to Suspensions of Ellipsoidal Particles Covered with a Shell in Particular Reference to Biological Cells.
Jap. J. Appl. Phys. 19: 359-365 (1980)

Saturation Transfer ESR による膜分子の動的挙動の解析

下山　雄平（函館高専）
亘　　弘（生 理 研）

飽和移動ESR(Saturation Transfer ESR:ST-ESR)法はナイトロオキサイドをスピンラベルとして，生体分子の動的挙動の解析に広く応用されている。通常のESR法によるスピンラベルの分子運動の測定範囲は 10^{-7}～10^{-11} secで，比較的速い運動に限られている。一方，生体膜における膜分子や膜内在蛋白質の分子運動の時定数（相関時間）は 10^{-7} secよりも遅い範囲にあり，通常ESR測定では粉末スペクトルとして観測される。ST-ESR法は，この測定範囲を 10^{-3}～10^{-7} secに拡大した。粉末スペクトルは，様々な向きに配向しているスピン束（スピンパケット）の包絡線である。強力なマイクロ波を照射すると，共鳴条件を満足するスピン束は飽和し，共鳴線は減少する。分子運動によって，ラベルの配向が変化すると，このスピン束は別の共鳴磁場に移動し，スピン－格子緩和時間（T_1）で共鳴線の強度は回復する。このようなスペクトルの拡散（Spectral Diffusion）を測定することにより，分子運動の相関時間が決定されるのである。

本研究では，主に共鳴吸収の二次高調波の90°位相おくれ成分を用いて，積層配向膜における脂質分子の分子運動の解析を行った。合成燐脂質のDPL膜中のスピンラベルの回転相関時間（τ_2）は，ゲル相では 10^{-4} sec，又液晶相で

は10^{-6}～10^{-9} secであることが，変曲点近傍のシグナル比より求められた。相転移点をはさんでτ_2が10^3 倍変化することが明らかとなった。分子運動の異方性については，スペクトルのシミュレーションによる解析が必要で，現在進行中である。

生体膜における蛋白質と脂質の相互作用

大西　俊一（京都大・理）

細胞膜における内在性タンパク質と裏打ち構造体の相互作用を研究するために，タンパク質の回転運動をスピンラベルの飽和移動ESR分光により，タンパク質の並進運動を蛍光ラベルによる蛍光過色回復により測定し，裏打ち構造体結合の影響を調べた。試料は赤血球を用い，とくに抽出精製したバンド3をジミリストイルホスファチジルコリンの二分子層膜に再構成した系を中心に研究した。この膜の中でバンド3の回転運動は，比較的ゆるやかな温度依存性を示し，リン脂質の相転移点23℃ の近くで多少不連続な変化をする。回転相関時間は，4℃から37℃ の間で260μsから65μs に変る。アンキリン・スペクトリン・アクチン・バンド4.1の裏打ちタンパク質を結合させると，回転運動は遅くなり，相関時間は340μsから180μsに変化した。いっぽう，バンド3の並進運動は，30℃で拡散定数8×10^{-9} cm^2 S^{-1}であるが，裏打ちタンパク質を結合させるとやはり遅くなり5.5×10^{-9} cm^2 S^{-1}になった。これらのデータから，バンド3と裏打ち構造体の相互作用を考察した。

赤血球機能と膜のかたさ—生体内加令赤血球の膜流動性

志賀　健　　前田信治　　須田武雄
昆　和典　　関谷美鈴（愛媛大・医）

スピンラベル分子を生体膜に導入しその分子運動を電子スピン共鳴装置で観察することにより分子周辺の情報を得ることができる。そこで，生体内循環中に加令した赤血球をDextran T－40 密度勾配遠心法により分離し，膜に取り込ませた脂肪酸スピンラベル分子の運動をみることにより加令にともなう赤

血球膜流動性の変化を観察した。

加令と共に膜内ラベル分子の動きは明らかに悪くなり，膜はその流動性を減じて“かたく”なっていることがわかった。この原因を探る目的で赤血球各種成分の分析と共に他の赤血球機能への影響も調べた。加令と共に ①膜内コレステロール・リン脂質の等比率的減少，②膜タンパクおよび血色素含量の不変性，③ATP量の減少とADP，AMP量の増加，④2,3 − DPG 量の減少がみられた。機能的には，変形能の低下と酸素運搬機能の減少が観察された。これらの結果から，加令赤血球においては ①膜の脂質ータンパク質比の低下による分子構築の変化，②脂質ータンパク質相互作用の変化，③ATP量の減少がひきおこす種々の機能失調，などにより膜流動性は低下し，さらには変形能を低下させる要因にもなっていると考えられる。

^{2}HNMRによる生体膜の研究ーサポニン，ポリエン抗生物質とコレステロールの相互作用

斉藤　　肇（国立がんセンター研）

サポニンやポリエン抗生物質は，生体膜中のコレステロールと特異的に結合して，生体膜に損揚を与える薬物として知られている。生体膜中でのこれらの複合体の生成，および二重層構造への影響を知るために，〔26, 26, 26, 27, 27, 27−$^2H_6$〕コレステロール（chol−d_6）を合成し，卵黄レシチンやDPPC，DMPC多重膜でのサポニン，ポリエン抗生物質による^{2}HNMR変化を追跡した。Chol−d_6の^{2}H 核四重極分裂の大きさは，サポニンやポリエン抗生物質のコレステロールに対する比で大きく変化した。ジギトニン／コレステロール比が1.0のとき，核四重極分裂は1ケタ以上増大し，コンプレックス生成に察しコレステロールの側鎖がのびきった状態で安定化に寄与する。一方，安定なコンプレックス生成の前段階として，コレステロールの側鎖が脂質との相互作用から解放され，配向状態が逆に大巾に乱されたものも同時に存在し得ることがわかった。ポリエン抗生物質とコレステロールのコンプレックスは，ジギトニンにくらべ不安定で後者の分率が著しく大きい。なお，種々のポリエン抗生物質とコレステロールとの相互作用の違いに関する知見も得られた。

ミオシンの ^1H NMR

赤坂　一之（京都大・理）

生理現象そのものまたはその基となるmolecular eventを研究しようとする場合，生体高分子間の相互作用を研究の対象としなければならないことが多い。そのような例として (1)ミオシンーアクチン相互作用，(2)Tobaus Mosaic Virus Coat ProteinとRNAとの相互作用，(3)ProteinaseとProteinase inhibitorとの相互作用などがある。これらの系にNMR，特に^1H NMRの方法を適用しようとする場合，従来の低分子タンパク質やペプチドに対して用いてきた方法だけではだめであり，大まかであっても分子運動を指標とするような手法を用いなければならない。

そのための方法としては従来の線幅（またはT_2）を測定する方法の他に，演者が提案している“選択的スピン拡散”の方法がある。[1] この方法は，タンパク質の^1H NMRスペクトルにおいて“個体様”のスピンダイナミックスを示す“core”領域と“液体様”のスピンダイナミックスを分離測定することができる。ミオシン分子もこの方法によってかたい部分とやわらかい部分が存在し，且つミオシンフラグメントのNMR測定によって，やわらかい部分がアクチンとの結合部位近辺に存在することが判明し，且つその部分がアクチンとの相互作用に重要な役割を担っている可能性が示された。[1,2]

文　献

1）Akasaka et al., FEBS Lett., 96, 287-290 (1978)
2）Highsmith et al., Biochemisty 18, 4238-4244 (1979)

核磁気共鳴法による細胞内分子拡散係数の測定

吉崎　和男（京都府立医科大）

従来，細胞内分子の拡散係数の測定は，放射性同位元素を含む化合物を注入し，その化合物の一定時間後の移動距離から求められた。この方法ではgiant

axon などの特殊な巨大細胞に限られた。また筋肉では skinned fiber を流動パラフィンでおおった測定があるが，この場合，細胞膜除去に伴う細胞構築の破壊を免れ得なかった。

一方，核磁気共鳴法は細胞内化合物が非破壊的に測定できる特徴をもつが，さらにパルス磁場勾配法の採用により，高分解能スペクトルを与える化合物の細胞内での拡散係数が非破壊的に測定できるようになった。

今回，カエル筋肉を主な測定対象とし，その細胞内での水分子や燐化合物の拡散係数をパルス磁場勾配核磁気共鳴法で測定した。その結果，これらの分子は細胞内では水溶液中に比べ，½〜⅓に減少していることが明らかとなった。さらにＡＴＰよりもクレアチン燐酸の方が拡散が速く，したがってクレアチン燐酸は細胞内でのエネルギー貯蔵庫としてだけでなく，エネルギー輸送にも役立っていると考えられる。

課　題　名　Receptor Protein in Vertebrate Olfaction(1980.12.18～12.19)

Steven Price*(Virginia Commonwealth Univ.)

概　　要　Steven Price 教授は甘味受容タンパクの先駆的研究を手がけて来た研究者であるが，現在は嗅覚受容タンパクの抽出と同定に関する研究で数々の成果を挙げている。本セミナーではその成果の一端について，講演をして頂いた。

ニューロンおよびパラニューロンにおける神経ペプチドの分泌に関する解析

課題名

（1980. 12. 17）

消化系と神経系とに共通のペプチド群－VIP,CCK およびボンベシンを中心に

菅野　富夫（北大・獣医・生理）

ニューロンとパラニューロンのVIP－免疫組織学的研究

藤田　恒夫（新潟大・医・解剖）

ネコのVIP-immunoreactive cellについて

山田　純三（帯広畜産大・家畜解剖）

ニューロンからパラニューロンへの移行型　小林　繁（山梨医大・解剖）

glicentin について　矢内原千鶴子（静岡薬大・生物薬品化学）

ヒト神経芽細胞腫培養細胞のＶＩＰ産生能とその促進

鈴木　利光（生理研・細胞内代謝）

神経ペプチドの生合成に関する考察　矢内原　昇（生理研・細胞内代謝）

概要

脳と腸管に共存する一連のペプチド群は脳－腸管ペプチドとよばれ，それらの多くは神経ペプチドとして機能していることがわかってきた。通常，ニューロンと扱われないが構造的にも代謝過程においても，また発生学的にもニューロンに似た細胞をパラニューロンとよび，下垂体前葉，松果体，副腎髄質，膵島，消化管の内分泌細胞がこれに属している。脳－腸管ペプチドの多くは明らかにこれらの細胞に存在し，外からの刺激に反応して放出される。

ニューロンおよびパラニューロンにおけるこれら神経ペプチドの分泌に関する最近の知見について，生理学，免疫組織化学，細胞生理学，生化学の立場から報告があり，長時間の討論により神経ペプチドの分泌機序の解明への相互理解が深まったのみならず，今後の研究展開における研究者相互の連携の必要性が求められた。

課　題　名　自律神経中枢機構の研究会（1981. 3. 6～3. 7）

入内島十郎	Transposition Responseの血管拡張
宮川　清	血圧振動の本質とその時のエネルギー代謝
二宮　石雄	慢性動物における心博数の変動性について
熊沢　孝朗	筋ポリモーダル受容器による呼吸循環系への反射性修飾
川上　正澄	ゴナドトロピン分泌調節に関与する三つの神経性機構について
広重　力	ホルモン概日リズムのアルトラジアン化－自発行動量との位相関係
新島　旭	体液性環境と自律神経活動
木村　裕	視床下部化学感受性ニューロンとＮＡ系
水村　和枝	「西ドイツ留学の体験談」と「筋から視床への投射」
富田　忠雄	平滑筋に対するカテコールアミンの作用
入沢　宏	心ペースペーカー細胞におけるアドレナリン及びアセチルコリンの作用機序
野間　昭典	
栗山　熙	血管系への自律神経支配とその末梢性制御機構
三浦　光彦	ＨＲＰ法と自律神経中枢
水野　昇	内臓性入力の中継核としての結合腕傍核
入来　正躬	（代理：板東武彦）眼の焦点調節系について－副交感神経性調節
佐藤　昭夫	副腎カテコールアミン分泌の反射性神経調節

概　　要

生理学研究所で行なわれる「自律神経中枢機構」に関する研究会も今年で第3回目を迎えた。3月6日午後1時より研究会を開始し，夜7時迄活発な討論を続けた。その後，皆で夕食を共にしながら，夜１１時頃まで研究の話を楽しんだ。その夜は山手ロッジに宿泊した。翌朝9時より再び研究会を開始し，昼食をはさんで，午後3時過ぎに無事閉会した。

本研究会では，自律神経系の中枢機構について，種々の自律機能の研究に関与する研究者が今後の研究の展開にも焦点を当てながら討論したことを特徴とする。研究会で取り上げられた話題とその演者名は下記のごとくである。

1. 内藤耕二；序　2. 入内島十郎；Transposition Responseの血管拡張　3. 宮川　清；血圧振動の本質とその時のエネルギー代謝　4. 二宮石雄；慢性動物における心拍数の変動性について　5. 熊沢孝朗；筋ポリモーダル受容器による呼吸循環系への反射性修飾　6. 川上正澄；ゴナドトロピン分

泌調節に関与する三つの神経性機構について　7. 広重　力；ホルモン概日リズムのアルトラジアン化・自発行動量との位相関係　8. 新島　旭；体液性環境と自律神経活動　9. 大村　裕；視床下部化学感受性ニューロンとＮＡ系　１０. 水村　和枝；「西ドイツ留学の体験談」と「筋から視床への投射」　１１. 富田　忠雄；平滑筋に対するカテコールアミンの作用　１２. 入沢　宏，野間昭典；心ペースメーカー細胞におけるアドレナリン及びアセチルコリンの作用機序　１３. 栗山　熙（代理：鈴木）；血管系への自律神経支配とその末梢性制御機構　１４. 三浦光彦；ＨＲＰ法と自律神経中枢　１５. 水野　昇；内臓性入力の中継核としての結合腕傍核　１６. 入来正躬（代理：板東）；眼の焦点調節系について－副交感神経性調節　１７. 佐藤昭夫；副腎カテコールアミン分泌の反射性神経調節

平滑筋に対するカテコールアミンの作用　　抄　　録

富田　忠雄（名古屋大・医）

モルモットの結腸紐の平滑筋に対してカテコールアミンはα受容体を介して強い抑制性の作用をもっている。今までの研究により，この抑制は主にＫイオンの透過性が増加するための過分極によっておこり，またこの過分極にはCaイオンの存在が必要であることが分かってきた。本研究ではアドレナリンのα作用に対するCaの関与を調べるため，β遮断剤（プロプラノロール，10^{-6}Ｍ）の存在下で，アドレナリンの作用に対しての外液Caの除去および再投与の効果，さらにCaの作用に影響を及ぼす薬物の効果についての実験を行った。

外液からCaを除いておいて（Caのキレート剤としてEGTA 0.5mMを含む）アドレナリン（10^{-6}Ｍ）を作用させると，Ca除去後１０分以上たっても一過性（約１分間）の反応が明らかに観察できる。しかし，アドレナリン存在下でCaを除くと約２分以内でアドレナリンによる過分極および膜抵抗の減少は消失してしまう。Caを再び加えると約１分以内でアドレナリンの反応は回復する。すなわち，アドレナリン存在下でCaを与えると膜抵抗の減少を伴った過分極がみられ，アドレナリンが存在しないときCaの再投与で膜抵抗が増加するのと逆の作用が現れる。

１～3mMのマンガン（Mn）イオンを与えるとCaの存在下であってもアド

レナリンの作用は一過性となり， Ca を含まない外液中での反応と同じような効果がみられる。すなわち，アドレナリンの作用には初期の一過性の反応とそれに続く持続性の反応とが存在し，一過性の反応は Ca 除去や Mn に対して抵抗性を示すと考えられる。

Caの透過性を抑えるとされているベラパミールやその誘導体であるD-600も高濃度（10^{-5}－10^{-4} M）でアドレナリンの作用を減少させるが，この場合には初期の一過性の反応と持続的な反応との差がみられない。また，プロカイン（１～5mM），キニーネ（10^{-4} M）もＤ－600などとほぼ同じ作用を示す。

アドレナリンによるＫイオンの透過性の増加に Ca イオンがどのように関与しているか詳しいことは不明であるが，今までの研究結果と上に述べた結果から， Ca は細胞膜の内側から働いてＫの透過性を増し，アドレナリンは細胞膜を介しての Ca 輸送系を活性化し， Mn はこの輸送系の担体との結合部で Ca と拮抗し，D－600 プロカインあるいはキニーネはこの担体の動きを抑える可能性が推察される。アドレナリンの持続的な作用にはこの輸送系による Ca の供給が必要であり，外液の Ca を除いても，一過性の反応には担体と結合した Ca が利用され得ると考えられる。

赤血球や分泌腺などの他の組織においてキニーネは Ca によるＫの透過性を特異的に遮断するとの意見もあるが，本実験からは単に Ca の輸送系を抑えるため，二次的に Ca の効果を消失させる可能性が示唆されるので，キニーネの作用機序の解釈には注意する必要があると思われる。

ＨＲＰ法と自律神経中枢

三浦　光彦（群馬大・医）

ＨＲＰ法を用いて自律神経系の中枢を探索する上に，種々な問題点がある。これは自律系に限らず他の体性系・統合系についてもいえる問題でもある。今回はその一例について報告する。

循環調節神経である頸動脈神経に含まれる遠心性線維の起始ニューロンがどこにあるか調べる実験で経験した例である。頸動脈神経の切断中枢端からHRP を２時間のうちに取込ませ，１－２日後にHRP 陽性細胞を神経節，延髄内に求めた。この場合，HRP1㎎以上を与えると，数種の神経核にHRP陽性細胞をみた。HRP0.5㎎

以下では，神経節内の求心性の感覚ニューロンは陽性だったが，延髄の運動神経核では全く陰性だった。つまり，ＨＲＰは確かに神経線維から取込まれるに十分な有効量を与えられているから，延髄での陰性結果は信頼できる。そうすると，ＨＲＰ１㎎以上を使って，遠心性線維の起始ニューロンを証明したという，De Groat(1979)及びBerger(1980)の成績は疑わしくなる。この事実から，末梢神経にＨＲＰを与えて，中枢に起始ニューロンを求める実験ではその手技と結果の判定には慎重さが必要であることがわかる。ＨＲＰ１㎎以上の投与で出現したＨＲＰ陽性細胞は頸動脈周囲の筋組織にＨＲＰが漏れ，そこから吸収されたことがわかった。最近，ＨＲＰ法では色素源としてＴＭＢのような鋭敏な薬剤を使うようになったため，false positiveの結果を出しやすい。従って，結果の読みに際して，今後更に慎重にならざるを得ない。

血圧振動の本質とそのエネルギー代謝

金井浩三　　宮川　清（信州大・医）

側圧負荷法により家兎の体血圧に周期１５～３０秒，波高数拾㎜Ｈｇの振動現象があらわれる。この血圧振動状態で動物は数時間以上生存しうる。このとき心臓は振動の峯，谷双方で血液の補給を受けており，脳とその他の臓器は対立的立場にある。即ち脳は峯で血液の補給を受け，そのとき，他の臓器の血管床は血圧上昇に動員されていて，血液の補給を受けていない。谷では，この関係が逆転する。尚，脳のうちでも延髄血流量は，対照時０.３３± ０.１２ｍｌ／ｍｉｎ／ｇであったが血圧振動時，０.２３±０.０６ｍｌ／ｍｉｎ／ｇで，明らかに有意の差がみられ，３０％の減少であった。また，この血圧振動という，いま一つの生存状態がそんなに異常なものでないことは，酸素の消費量が，対照時１３.９８±６.２２ｍｌ／ｍｉｎ／㎏，血圧振動時１７.０１±１３.９３ｍｌ／ｍｉｎ／㎏であり，有意の差を示さなかったことから云える。

この振動の発生機序は次のように要約できる。「延髄の循環中枢あるいはその近傍に，複数の安定軌道をもつ非線形振動子がミクロ，即ちニューロンレベルで出現し，この非線形振動子が，相反する原理にもとづいて作られた，二つのマクロな力によって駆動され，このような血圧振動が起る」と。そして非線形振動の一つの現われとして血圧振動の周期について，１３個体から４７８２

波の振動の周期ヒストグラムを作ると，１６.５秒と２５秒の二ケ所に鋭いピークを形成した。つぎにこの血圧振動のエネルギー源は何かということである。延髄の循環中枢の血液，需要供給のバランスが平常の７０％，虚血側に偏位しており，これに基づくポテンシャルエネルギーが，この振動の原動力となっていると考えられる。これにより，血圧の上昇，行き過ぎ現象が付加され，ついで低酸素状態からの回復と同時に圧受容器からの強力な抑制作用が働き，振動が起っているものと考えられる。延髄にあると想定される非線形振動子は，ニューロン活動として次のようにとらえられている。延髄網様体から３３６例のユニット放電を導出，そのうち６９例を血管運動性と同定し，交感神経放電との頻度変化の相関性から二種に分類した。即ち，交感神経放電と同様の変化を示す４６例を第Ⅱ型，これと相反性を示す２３例を第Ⅰ型とした。さらにComputer(DEC 11/60）により体血圧，交感神経放電，そしてユニット放電との相互相関係数を求めた。体血圧と交感神経放電の間では，血圧振動時，周期２３秒の場合，$\tau = -6$秒の時，0.７５で高い相関を示した。ユニット放電と交感神経放電間では，第Ⅱ型の場合，無負荷時最高0.９２，第Ⅰ型では最高0.７２と有意の相関を示した。血圧振動時には各々，最高0.７８，0.６５で有意の相関を示した。第Ⅱ型のニューロンは延髄の虚血により興奮し，通常はTonic に働いており，第Ⅰ型のそれは，血管壁圧受容器からのインパルスと密接に関連し第Ⅱの活動を抑制していると考えられる。非線形振動子に関連したニューロン活動と云えば，第Ⅰ型のものと考えられる。従って脳の虚血によりミクロ即ちニューロンレベルで，この非線形振動子が出現，マクロの状態でフィードバック現象が加わり，Synergeticsな現象として血圧振動が起ったものと考えられる。

筋ポリモーダル受容器による呼吸循環系への反射性修飾

熊澤　孝朗（名古屋大・医）

最も原始的な神経系のはたらきは，ナメクジウオにみられる侵害逃避反射であるうず巻反射といわれる。この侵害受容反射を基盤にして神経系の進化が展開したことから，身体機能の基本的な調節系の一つである自律機能調節においても，侵害受容系とのかかわりは極めて大であると推定される。しかし，従来

の自律機能調節の研究においては，侵害受容系の性質についての情報の不足が障碍となったこともあって，この問題はむしろ消極的に取り扱われてきた傾向にあったといえよう。

侵害的熱刺激，化学的刺激，機械的刺激のいずれにも応ずるポリモーダル受容器は，皮膚，骨格筋，および内臓からの降下臓器である睾丸からの細径線維受容器の大部分を占める。この受容器のはたらきは，侵害受容器として2次痛に関与すること，自律機能の反射性修飾に関与することが想定される。単一放電記録で調べてきたこの受容器の受容特性を基に，呼吸，循環系に対するポリモーダル受容器からの入力による反射性修飾作用機序を調べるのが本研究の目的である。

クロラローゼ，ウレタン麻酔下，人工呼吸下，両側迷走神経，頸動脈神経切断のイヌで，横隔神経放電，血圧，心拍数を記録し，腓腹筋への化学物質動注，または筋神経求心性電気刺激作用を調べた。呼吸出力としては，横隔神経放電積分ピーク値を1回呼吸時間で除した商の1分間の平均値を用いた。

1) 4.5％NaCl，1μg/mlブラディキニン，60mM KCl 動注による呼吸出力増加の大きさは，以前調べた，同一方法によるそれぞれの物質動注に対するC－ポリモーダル受容器の放電数増加と相対的に類似する。 2) 1.8，2.7，3.6，4.5％NaCl動注により，刺激中に生ずる呼吸促進は，濃度に応じて増大する。刺激終了後数分間の呼吸出力は，刺激前とくらべ，低濃度では増大を維持するが，高濃度ではむしろ減少する。筋神経刺激による呼吸反応の刺激強度－反応関係においても，同様な傾向が認められる。 3) この刺激終了後の呼吸出力減少は，オピエイト拮抗剤であるナロキソン，α－アドレナリン性薬であるクロニジンにより，減少，または消失し，これら神経体液性機序の関与した抑制現象であると想定される。 4) 血圧（心拍数は，多くの場合，血圧と平行した変化を示す）は，筋刺激により，降圧－昇圧反応を示すが，ナロキソンは，この反応を昇圧側へ偏位させる。クロニジンは，刺激終了後も続く昇圧の期期を延長する傾向が認められ，この作用はヨヒンビンで拮抗される。

以上から， 1) 筋のポリモーダル受容器からの入力は，呼吸，循環系の反射性修飾に関与する。 2) その刺激強度により，刺激終了後も持続する促進と抑制作用を及ぼす。 3) このうち刺激終了後持続する抑制過程には，内因性オピエイト，α－アドレナリン性機序の関与が示唆される。 4) 内因性鎮痛現象にも類似の機序が予想されており，自律系と侵害受容系の関連という観点から興味深いと思われる。

筋から視床への投射

水村　和枝（名古屋大）

筋からの細径求心線維には，機械的・化学的刺激および侵害的熱刺激のいずれにも応じるpolymodel receptor，それとおそらく同一であると思われる発痛物質に応じるChemonoriceptorがあることが報告されている。これらの受容器はその適刺激が侵害的または発痛性のものであることから痛み情報の伝達に関与していると考えられているが，また，自律系諸機能の修飾に大きな役割を担っている。この受容器の上位レベルへの投射についてはまだほとんどわかっておらず，本実験ではこの受容器の視床への投射を調べた。

チオペンタールで浅く麻酔したネコを用い，不動化人工呼吸下で実験を行った。動物は定位脳固定装置に固定し，座標前方8.5～10.5，側方6.5～8.5においてガラス微小電極を用いて細胞外記録を行った。記録部位または電極軌跡の終点で通電し，pontamin sky blueを流してマーキングし，記録部位の同定に供した。刺激には細径線維をほぼ特異的に刺激することのあきらかなK^+(320mEq，0.3㎖)，bradykinin(10^{-4}，0.3㎖)の腓腹筋への動注を用いた。また，筋・腱の機械的刺激も試みた。108ユニットについて詳細に検討し，うち25ユニットが筋・腱からのインプットをもち，その7例では皮膚からのインプットは証明されなかったが，残り18例では皮膚からのインプットも合せもつことが判明した。K^+に対しては，一次ニューロンの反応に酷似した短潜時（平均約4秒）短持続の大きな反応を示した。bradykininに応じたニューロンは非常に少なく（3例），応じた場合にもその反応は非常に小さく，潜時・持続ともに長く，一次ニューロンの反応とよく似ていた。筋・腱の機械的刺激には比較的なれの速い反応を示した。筋神経の電気刺激の閾値はⅢ群（Aδ）線維の範囲にあり，Ⅳ群（C）線維からのインプットは証明できなかった。また筋の伸展，サクシニールコリンの動注はともに無効であり，これらのニューロンへのⅠ，Ⅱ群線維からのインプットはないと思われる。

皮膚からのインプットをもつ例では受容野は多くの場合，記録側と反対側の後肢の一部に限局していたが4例では両側にまたがった大きなものであった。強いpinchingばかりでなく，弱い触刺激も有効であり，多くのユニットはpinchingに対しては大きなdynamic responseとそれに続くやや小さいtonic responeを示した。このtonic responseは弱いくりかえし触刺

激への反応とあまり差がなく，いわゆる“wide dynamic range”の反応を示したものは少なかった。このように皮膚・筋・腱の強い機械的刺激に対する反応の順応がはやいのが視床腹外側部ニューロンの特長であり，視床内側部ニューロンの反応とは異っている点である。

筋腱からのインプットをもつニューロンはＶＰＬの辺縁部，VPL-VLの移行部に局在していた。

腹側ノルアドレナリン束の視床下部外側野への入力様式

大村　裕（九州大・医）

ウレタン麻酔下のラットの腹側ノルアドレナリン（V-NA）束を電気刺激し，視床下部外側野（LHA）ニューロンの反応を細胞外および細胞内誘導で調べた。記録した総計２８７個のニューロンのうち，５０％が抑制だけ（I type），３０％が興奮につづく抑制（E-I type），１３％が逆行性に興奮をおこし（A type），７％のニューロンには反応がみられなかった。反応の潜伏時間は，I typeニューロンが5.6±3.7 msec，E-I typeが7.8±3.9 msec，A typeが6.8±4.8 msec であった。また，多連微小電極法でブドウ糖，ノルアドレナリン（NA），NAのα およびβブロック剤を投与した。７６個のニューロンのうち２５個（３０％）がブドウ糖感受性ニューロンであり，このニューロンはV-NA 束刺激で特異的に抑制された。また，ほとんど全てのニューロンが NA投与で自発放電が抑制された。V-NA 束刺激および NA 投与によるニューロン活動の抑制はαブロック剤の投与で消失した。細胞内誘導で調べると，I typeニューロンの抑制は IPSPによるものであり，IPSP の潜伏時間は刺激強度を変化させても一定であり，単シナプス性であった。一方，E-I type ニューロンの興奮につづく抑制はIPSP につづくEPSP によるものであった。最初の EPSPの潜伏時間は，刺激強度を大きくすると短くなり，多シナプス性であった。以上の実験結果からV-NA 束は単シナプス性にLHAニューロンの約５０％を抑制しており，ブドウ糖感受性ニューロンに対しては抑制だけであり，この抑制は NA のα受容器を介するものであることが結論できる。LHAのブドウ糖感受性ニューロンは摂食行動に重要な役割を果たしていると考えられており，このニューロンに対して V-NA束が抑制性の影響を与えている

という実験結果は，V-NA 束破壊によっておこる多食と肥満の発生機序を推察させる。V-NA 束の起始細胞がどのような入力を受けるかについては現在明らかではない。しかし， Meyers らはラットの十二指腸にブドウ糖を注入するとLHA の NA 濃度が増加することを報告している。また，清水らは，ラットの門脈にブドウ糖を注入すると LHA のブドウ糖感受性ニューロンの自発放電頻度が減少することを明らかにした。以上のことから，腹部消化管の受容器からの入力が V-NA 束の起始細胞を興奮させ，それが LHA 内のNAの放出を促進し，LHA ニューロンを抑制することが推測される。したがって， V-NA 束は満腹による摂食行動の停止を伝える系のひとつであろう。

眼の焦点調節系について—副交感神経性調節

入来正躬　　板東武彦（山梨医科大）

眼の焦点調節は自律神経系である副交感神経によって支配されているが，随意的に焦点調節を行うことも可能であり，その中枢神経機構は興味深い。ここでは，眼の焦点調節の中枢神経機構についての最近の研究について報告を行った。報告の内容は次の 3 点である。 (1) 焦点調節系の運動ニューロンである中脳の副交感動眼ニューロンの分布とその生理学的性質について， (2) 焦点調節を支配すると考えられる大脳視覚連合領細胞の分布とその生理学的性質について， (3) 大脳視覚連合領細胞の出力経路と小脳について。

1. 運動ニューロンについての研究

近方への焦点調節は内眼筋の 1 つである毛様筋の収縮により行われる。毛様筋は毛様神経節を介して中脳の副交感動眼ニューロンにより一元的に支配されている。副交感動眼ニューロンについての生理学的研究は報告がなく，形態学的にも議論が分れている。我々は高速オプトメータを用いて焦点調節応答を持続的にモニターしつつ，ネコ中脳で焦点調節系を支配する運動ニューロンを同定し，その生理学的性質を研究した。焦点調節系の運動ニューロンと同定されたユニットは中脳被蓋内側部，中心灰白質，動眼神経核背側部の正中線から 1 ㎜以内の領域に見出された。これらの細胞の発火様式は，特別に開発した計算機データ処理プログラムを用いて解析した。

2. 大脳視覚連合領についての研究

ネコの大脳視覚領・視覚連合領で微小刺激法を用いて広範なマッピングを行い，焦点調節応答を誘発する大脳領域の検索を行った。次にこの結果に基づき，大脳上シルヴィウス回を中心とした領域でユニット記録を行い，クレア・ビショップ領域の中～後部，及びこれに隣接する内側シルヴィウス回で，焦点調節応答に相関をもち，且つ応答に先行して発火する細胞を見出した。これらの細胞の発火様式を解析すると共に，これらの細胞が焦点調節に際して果す役割について，若干の考察を行った。

3. 焦点調節を支配する大脳領域と小脳との関連について

小脳核の一部が焦点調節に関与することはすでに報告ずみであるので，大脳視覚連合領からの出力が小脳を経由して中脳の運動ニューロンに伝えられるか否かについて検討した。小脳の出力を可逆的に遮断するため，小脳脚を微小プローブを用いて可逆的に冷却した。大脳刺激によって得られる焦点調節応答は小脳出力を遮断しても変化せず，大脳細胞は小脳を経由せずに運動ニューロンに出力していると考えられる。

以上の研究は大阪大学の塚原仲晃，佃　健次，山本亘彦，前田　純との共同研究である。

モルモット腸間膜血管の自律神経支配

栗山　熙（九州大・医）

血管系の自律神経支配はアドレナリン作動性血管収縮作用と，コリン作動性血管拡張作用をひきおこすことが知られている。我々はモルモット腸間膜動脈及び静脈における自律神経支配様式について電気生理学的方法を用いて調べ，更に神経一筋の興奮伝達様式の動脈と静脈による差異についても調べた。腸間膜動脈平滑筋は静止膜電位約 −70mV でケーブル様性質を有した。平滑筋細胞からは微小興奮性接合部電位（m・e・j・p）が記録でき，その頻度及び振幅は skew curveを示したことから，腸間膜動脈血管壁に分布する神経はdiffuse innervation type であると推察された。血管壁に分布する神経を電気刺激すると興奮性接合部電位（e.j.P.）が発生し，くり返し刺激でe.j.p.の促通現象や抑制現象がみられた。アセチルコリン（ACh）(10^{-10} −10^{-7} M）投与で e.j.p. の大きさは減少した。このとき平滑筋膜の膜電位，膜抵抗ともに

変化せず，また血管壁に分布している神経の興奮伝導速度，興奮する神経数などにも変化はみられなかった。この ACh の作用は atropine 投与により消失した。これらの結果から，ACh は神経終末のムスカリン様受容器を介して伝達物質の放出を抑制する作用を有することが考えられた。

腸間膜静脈平滑筋は膜電位約 −64mV で m.e.j,p. の発生はみられず，自発活動も示さなかった。神経のくり返し電気刺激で平滑筋細胞のゆるやかな脱分極がみられたが，単一刺激ではこのような膜電位の変化はおこらなかった。このゆるやかな脱分極は神経刺激回数や刺激頻度の増加に伴って増加し，一定値（約 5mV 脱分極）に達した。高頻度で神経を刺激すると活動電位や slow wave が発生したが，ゆるやかな脱分極の大きさはこれらの発生と関係なくほぼ一定値を示した。これら神経刺激によって発生する膜電位変化はテトロドトキシンやフェントールアミン投与によって完全に消失した。灌流液中に投与したノルアドレナリン（NA）でも神経刺激で発生させた膜活動と同様の反応を示した。すなわち，低濃度 NA（10^{-6} M 以下）では膜の脱分極はおこらず，10^{-6} M NA で数 mV の脱分極，3×10^{-6} -5×10^{-6} M NA で slow wave の発生，10^{-5} M 以上の NA で活動電位の発生がおこり，筋膜は一定の脱分極値を示した。これらの外から与えた NA の反応はフェントールアミン投与で完全に消失した。外から与えた NA により引きおこされる脱分極の大きさから，血管壁に分布する神経の電気刺激により放出される伝達物質の濃度を，拡散の式を用いて推定し，神経末端より放出される NA の量は 1 回の神経刺激で約 10^{-5} M 程度であろうと計算された。

以上のように，腸間膜動脈と静脈では支配様式が異なり，動脈では 1)神経筋間隙がせまい， 2)神経支配が密， 3)Diffuse innervation type である， 4)Multi-innervation type であることが考えられた。一方腸間膜静脈では 1)神経筋間隙が広く，放出された伝達物質はかなりの距離を拡散していって平滑筋細胞に到達する。 2)神経支配は粗である，ことが考えられた。

副腎カテコールアミン分泌の反射性神経調節

佐藤　昭夫（東京都老人研）

循環機能とか消化機能などを含む多くの自律機能の調節は，主として自律神経とホルモンによって協調的に調節されている。その中枢性調節機序は自発性及び反射性調節に二大別される。現在，自発性調節の研究には困難が多いが，反射性調節については研究が進められつつある。

自律機能の反射性調節に対する末梢からの入力としては，圧受容器のような内臓からの情報と皮膚の受容器のような体性求心性情報が特に重要である。体性求心性情報の自律機能に及ぼす反射性効果については，ごく最近研究が開始されたばかりと言える。その少数の研究の中には，例えば皮膚刺激によって誘発される心臓機能或いは胃腸管の運動機能の反射性変化等の研究が含まれているが，ホルモン分泌機構についての詳細な研究は見当たらない。

そこで今回，皮膚からの求心性情報が副腎髄質のカテコールアミン分泌に及ぼす反射性効果について研究した。

麻酔ラットの侵害性皮膚刺激によって，交感神経副腎枝の遠心性放電活動は反射性に高進し，それに伴ない副腎髄質細胞からのエピネフリン分泌機能も高進する事実が見出された。

性腺刺激ホルモンの分泌調節における脳内カテコールアミン神経系の役割

川上　正澄（横浜市立大・医）

脳内カテコールアミンが性腺刺激ホルモン分泌調節において中脳神経機構がどのように前脳神経系に連鎖しているか明らかでない。そこで，前情前期のLH，FSH，PRL 放出における中脳上行性神経路の役割について調べた。

発情前期（P）ラットの外側視床下部前野（ALH）ならびに同中野の両側性神経切断を11:00－13:30に行なうと，排卵およびLH，FSH，PRLのsurgeが阻止されたが，前脳外側部での神経切断は無効であった。 ALH 切断はBroca対角帯の電気化学刺激による排卵に影響を与えなかった。 ALH 切断の5～6時間後には視索前野のノルエピネフリン減少と視床下部ドーパミン増加とがみ

られた。 ALH 切断を施したPラット脳室内へノルエピネフリンを注入すると排卵が高率に誘起されたが，ドーパミンの注入は無効であった。さらに，Pの 11:00 - 13:30 延髄腹外側部 （VLMO）の両側性電気凝固破壊を行うと，排卵および LH，FSH，PRL surgeが阻止されたが，延髄背内側部 （DMMO）の破壊は無効であった。Pの 11:00 - 13:30 に diethyldithiocarbamate を VLMO，DMMO のそれぞれに留置すると，破壊実験と同様の結果が得られた。卵巣摘除，estradiol 前処置ラット VLMO への estradiol，Progesterone の留置は LH，FSH，PRL の分泌へ影響を与えなかった。ネンブタール麻酔ラットの VLMO を電気化学的に刺激しても，排卵および LH，FSH surge はみられなかった。

以上の実験結果より，発情前期の性腺刺激ホルモン放出には，外側視床下部を通って前脳ー視床下部へ入力する上行性ノルアドレナリン神経路が必要であり，これは延髄腹外側部に由来することが示唆された。

心ペースメーカー細胞におけるアドレナリン及びアセチルコリンの作用機序

入沢 宏　　野間昭典（生理研）

家兎洞房結節より約 200μm の標本を作成し，二重微小電極法による膜電位固定実験を行い，アセチルコリンとアドレナリン作用下の膜電流について解析した。アセチルコリンを作用させた際膜電流は外向きに移動するが，緩徐内向き電流，カリウム電流には著変を認めなかった。そこでアセチルコリン作用前後に記録した電流の差について調べるとこの差電流は外液カリウム濃度 2.7 mM では −100 mV位で逆転する所見が得られ，アセチルコリンで活性化される電流は選択性のよいカリウム電流であることがわかった。このアセチルコリンで誘発されるカリウム電流についてそのキネティックスを測定すると脱分極でコンダクタンスが減少する事がわかった。その時定数は約 100msec 前後であり，活動電位の再分極相を引き起すカリウム電流とはまったく異なったイオンチャンネルであることがわかった。前者のカリウム電流はアセチルコリンとの反応によって始めて活性化される点からいわゆる薬物依存チャンネルに分類でき後者の通常のカリウムチャンネルが膜電位依存チャンネルに分類されるのに対応している。

アドレナリン作用下ではアセチルコリンの場合と異なり，それ特有のチャンネルを活性化させるのではなく，通常活動電位発生に関与しているイオンチャンネルを増大させている事がわかった。即ち緩徐内向き電流は1.3倍に，カリウム電流は1.2倍に増大した。これ等の変化はイオンチャンネル数が実効的に増加していると解釈され，電流変化の速度や電位依存性には著変を認める事ができなかった。

以上の変化を心ペースメーカー細胞のコンピューターモデルに組み込むとアセチルコリン及びアドレナリンの作用を再現することができた。アドレナリン作用下での膜電流変化の中で緩徐内向き電流の増大がアドレナリンによる正の変時作用に最も大きな寄与をしている事がわかった。この事実はペースメーカー電位発生に緩徐内向き電流が重要な役割を持つとする仮説を強く支持するものである。

体液性環境と自律神経活動

新島　旭（新潟大・医）

自律神経活動は末梢からの求心性入力ーその一部は体液性環境の変動により修飾されるーおよび自律神経ニューロン自体の化学感受性により変動する。各種化学物質の肝求心性神経活動，遠心性自律神経活動に及ぼす影響および迷走神経を通る経路について調べた。

1. 肝求心性神経活動に及ぼす化学物質の効果：迷走神経肝臓枝から求心性活動を記録しつつ各種化学物質の効果を観察した。 a)灌流実験；生理的濃度の範囲内でβ・D・グルコースの門脈内投与はα・D・グルコースより，より強力に求心性活動を抑制する。インスリン40μU～400μU/mℓの門脈内注入で求心性活動の増強を観察した。 b) In situ 実験；セロトニン，およびCCK－PZ／ng 以上の門脈内投与により長く続く求心性神経活動の抑制をおこす。満腹感あるいは摂食行動の抑制に役割を演じている成能性がある。アドレナリンは肝求心性神経活動の抑制をおこすが，これは肝からのグルコース放出の促進によることが観察された。

2. 自律神経活動に及ぼす各種化学物質の効果： a)ペンタガストリン10ng以上の静脈内注入により1～数分間続く迷走神経胃枝の遠心性神経活動の増強を観察した。胃腸などへの迷走神経枝は切断してあるので，反射性の効果より

も中枢性の効果が考えられる。 b)迷走神経および内臓神経膵臓枝から遠心性の神経活動を同時記録しつつ，グルコースを静注（150㎎/㎏）すると迷走神経枝では神経活動の増強，内臓神経枝では抑制がみられる。いずれも神経性にインスリン分泌増強の効果をもつ反応である。 VMH 破壊では迷走神経枝の活動促進，内臓神経枝活動の低下，ＬＨ破壊では両枝とも活動の低下がみられた。前者により VMH 破壊による高インスリン血症発生が神経性におこりうることが説明できる。 c)迷走神経肝臓枝から遠心性神経活動を記録しつつ，各種の糖液を注入した場合，Ｌ・グルコース，Ｄ・マンノースは無効であるがＤ・グルコース 200㎎/㎏の注入により遠心性活動の促進がみられた。この神経の刺激により肝グリコゲン合成の促進がみられるので，血糖上昇により神経性の肝グリコゲン合成を促進する系の存在することを示唆する。

3. 内臓支配神経の迷走神経を通る経路：右および左頸部迷走神経を切断し，その末梢側に 5V．1ms．の電気刺激を与え，胃腹側枝・背側枝・腹腔枝・肝臓枝より活動電位を５０回加算記録した。この実験により下図の如き結果を得た。

	右頸部迷走神経		左頸部迷走神経
肝臓	右	＜	左
胃前壁	右	＜	左
胃後壁	右	＞	左
膵臓．腸管	右	＞	左

Transposition Response の血管拡張

入内島十郎（広島大・医）

Transposition Response(TR) とはラットを住み馴れた箱から新しい箱に移したときに見られる循環反応であり，心拍数，心拍出量の増加，総末梢抵抗の減少を特徴とし，血圧はほとんど変化しないisopressor respone である（Iriuchijima et al. Jap. J. Physiol. 30:887, 1980）。総末梢抵抗が減少することは広汎な血管拡張が起こることを意味する。この血管拡張の本体が何であるかについて，以下の実験を行った。

ラットにpropranolol 1㎎/㎏ を腹腔内に注射し，β-blockを行うと，ＴＲはisopressor responseから pressor responseに変化した。心

拍数，心拍出量の増加が消失し，血圧は上昇，総末梢抵抗も増加するようになった。このことはTRにβ- adrenergic の血管拡張が含まれていることを示す。同じことが BBB を通りにくい β－blocker である carteolol でも起こるから，propranolol の CNS に対する作用によって上記の現象が起こるとは考えにくい。atropine を与えたのちも TR の際に総末梢抵抗が増加するから，血管拡張はコリン作動性の拡張線維によるものではない。

両側の副腎を切除したのちも TR はほぼ原形通りに起こった。したがって，TR の血管拡張は副腎から放出されるアドレナリンのみによって起こるのではない。

末梢血流用の電磁流量計プローブを上腸間膜動脈に慢性的にとりつけて，TR の際の血流変化を観察すると，TR の最中に上腸間膜動脈の血流はいちじるしく減少した。すなわち血管拡張が起こる場所は内臓血管領域ではない。TR は心拍出量が増加する反応であるのにこのように血流が減少する部分があるのであるから，血管拡張が起こる場所ではそれがかなり顕著に起こっていることになる。

腹部大動脈の下端にプローブを取り付け，下¼身の血流を測定すると，TRの際，血流はいちじるしく増加した。両側の腰部交感神経の切除後も血流の増加は起こったが，前よりも徐々であった。

これらの実験結果は，TRの際の血管拡張は骨格筋において顕著に起こり，その早い部分は交感神経線維が，遅い部分は副腎からのアドレナリンが受持っていることを示すように思われる。しかし麻酔下のラットの腰部交感神経の電気刺激によって，α－block の後も，腸骨動脈の血流の増加は見られなかった。したがってβアドレナリン作動性血管拡張線維がラットに存在するか否かについてはなお検討を要する。

内臓性入力の中継核としての結合腕傍核

水野　昇　　野村　嶬（京都大・医）

結合腕傍核は，近年ラットにおいて，味覚路の中継核として注目されるようになった。すなわち，ラットにおいては，孤束核の吻側部に入る味覚情報はついで同側の結合腕傍核で中継されてのち視床味覚領（後内側腹核小細胞部）に達するのであって，孤束核より直接に視床に達する味覚路神経線維は存在しな

いという。われわれはネコとウサギについて HRP 法およびオートラジオグラフィ法を用いて同様の事実を確めた。しかし，その際，結合腕傍核から上行する神経線維群は視床のほか，視床下部・扁桃核（とくに中心核）・視束前域・ブローカ対角帯核・無名質・分界条床核など，前脳基底部のいわゆる自律神経中枢や辺縁系の諸核にもむしろ，より多数広範囲に分布することが明らかとなった。また，同時に，結合腕傍核へ神経線維を送る孤束核ニューロンは，孤束核の吻側部だけではなくて，孤束核のほとんど全域にわたって分布することも確められた。したがって，結合腕傍核には，孤束核吻側部から到達する味覚情報を視床味覚野に中継するニューロンのほか，孤束核から上行するいわゆる一般内臓性求心情報をさらに前脳基底部のいわゆる自律神経中枢や辺縁系の諸核に中継するニューロンが存在すると考えられる。

結合腕傍核は，結合腕の背外方に位置する外側核，結合腕の腹内方の内側核，および結合腕の腹外方に存在するいわゆる Kölliker－Fuse 核に大別できるが，視床に神経線維を送るニューロンは主として外側核の背内部，扁桃核に神経線維を送るニューロンは主として外側核の腹外部と Kölliker－Fuse，分界条床核に神経線維を送るニューロンは主として外側核の中央部に分布する。内側核には上記いづれの部位に神経線維を送るニューロンも存在するが，扁桃核に線維を送るニューロンはその他のニューロンに比べて一般により大きい細胞体を有する。また，視床下部に到達する結合腕傍核ニューロンの軸索は，主として視床下部外側部と脳室周囲部に多数分布し，視床下部内側部に分布するものは比較的少ない。

結合腕傍核と孤束核との間のより詳細な局在的連絡関係，辺縁系への入力系を構成するニューロン連鎖と自律神経中枢への入力系のそれとの関係，前脳基底部の諸核より結合腕傍核を経由して下行してくる多数の下行性神経線維系の起始・経過・終止，などについてはなお今後に残された問題が多い。

ホルモン概日リズムのアルトラジアン化ー自発行動量との位相関係

広重　力（北海道大・医）

本研究は同一個体ラットより自発行動量と血漿コルチコステロン値を同時に，しかも経時的に連続記録し，両者の概日リズム性ならびに互いの位相関係をあ

きらかにすることを目的として行われた。

ウイスター成熟雄ラットの自発行動量はAnimex typeSで連続記録し，血漿コルチコステロンは尾静脈採血法により2時おき，あるいは4時間おきに30 $\mu\ell$ ずつ採血し，血漿 10$\mu\ell$ を用いてMurphyの蛋白競合結合法で測定した。

実験成績： (1) 明暗交代下および連続明（LL）下での位相関係。標準の明暗交体（LD）下でみられる自発行動量と血漿コルチコステロンの概日リズムの位相角差は，LL 下12日目でもよく保持されていた。 (2) 長期 LL 下でのアルトラジアン化。LL(200ルックス）に3カ月以上曝露すると，自発行動も血漿ホルモンもともに概日リズム性を失いアルトラジアン(ultradian)化する。すなわち，自発行動量は2～3時間の周期で約1時間持続する burst 活動を示す。そこで行動量とホルモンの位相関係をあきらかにするために，4匹のラットでランダム採血法を用いて検討したところ，自発行動量の burst の休止期にすでに血漿コルチコステロンは上昇しはじめ，burst 活動の開始とともに低下しはじめることがわかった。 (3) 視交叉上核（SCN）破壊後のアルトラジアン変動。89匹の成熟雄ラットのSCNを電気凝固によって限局的に破壊した。術後1カ月で自発行動量記録を視覚的にモニターして，概日リズムを失った32匹を用いて以下の解析を行った。SCN破壊の程度は最後に組織学的に確認した。その結果次のことがあきらかとなった，(a) DD下でフリーランはみられず，また LD への同調もみとめられなかった。(b) 自発行動量を，原理の異なる2つの解析法，すなわち最小自乗パワースペクトル分析法とペリオドグラム分析法を用いて解析したところ，1～2時間の周期をもつアルトラジアン成分が優位であった。さらにその倍数成分もみとめられた。(c) 右心房にカテーテルを慢性的に挿入し，行動量の記録と平行して15分ごとの頻回採血を行った。その結果，血漿コルチコステロン値の変動もほぼ1～2時間の周期をもつアルトラジアン成分（拍動性分泌）から成ること，さらにこのアルトラジアン成分は行動量の burst 発現に同期していることがわかった。

結論：以上の成績から，自発行動量と血漿コルチコステロン値の変動は，概日リズムレベルのみならず，アルトラジアンレベルでも互いに一定の位相角差を保持していることがあきらかとなった。これがいかなる機構に由来するかは今後に残された課題である。

慢性動物における心拍数の変動性について

二宮石雄　　林　孝和（国立循環器病センター研究所）

日常，心拍数は種々の原因により著明な増減を示しているが，同時に又呼吸性並びに日内変動を示す周期リズムを有している。この様な心拍数の変動が自由行動下の動物でどの程度おこっており，１日当りの平均心拍数とどの様な関係を有しているかについては全く知られていない。そこで，正常家兎を用いて自然生活に近い状態下で24時間以上の心電図記録によって拍動毎心拍数の解析を行った。

体重2.8～4.2㎏の成熟家兎で行った心電記録から１日平均毎分心拍数（HRd）は２３３±４を示し，この値は麻酔下の実験の値よりも低いことが判明した。１日平均毎分心拍数の変動は家兎間で異なり，又実験日によっても異なったが，この変動を正規化した変動係数との関係をみると頻脈で小さく，徐脈で大きいことがわかった。

心拍周期の分布パターンを２４時間当りの心拍数約３０数万拍動について調べた結果，その分布曲線（ヒストグラム）は主として３型に分類され，正規分布型を示すもの，徐脈側に最頻値が存在するBrady type，頻脈側に最頻値が存在するTachycardia typeがみられた。この様な型は，各個体で個有のものであった。しかし，このパターンが各種自律神経遮断剤の投与により変動したことから，日常生活における自律神経系の心拍数に及ぼす影響は単に平均心拍数を増減するのみでなく，拍動毎の変動並びにその分布パターンの決定に及んでいることを示している。

生理学における数学的方法（1981. 3. 16. ～ 3. 17）　　課　題　名

生物の分散行動　京大・理・生物々理　寺本　英

卵割パターンとグラム理論　京大・理・生物々理　土居　洋文

血流の理論モデル　清恵会医療専門学院　岩田　和朗

血液－間質液間水分移動のdynamics　京府医大・生理　磯貝　芳徳
三木　健寿

膜透過と細胞容積変化　京大・医・生理　品川　嘉也

モデル規範適応システム ―― 生体システム同定の可能性 ――
カリフォルニア大・バークレー・工・機械工学　富塚誠義

ヘモグロビン・一酸化炭素結合過程における中間状態　生理研　亘　弘

数学的ニューロンモデルによるEPSPの解析　京大・医・生理　小島比呂志

点過程の超汎関数　名大・医療短大　伊藤　嘉房

インパルス系列を入力とする系の同定とシナプス的相互作用の解析について
阪大・基礎工・生物工学　佐藤　俊輔

Eyring絶対反応速度論にもとずくCa－Channelの生物物理モデルの１例
基生研　安井　湘三

神経回路網の非線形解析　基生研　中　研一
日本医大・生理　桜永　昌弘

フィルタリングによる誘発波信号の抽出　名工大・情報工学　石井　直宏

受容野のパターンフィードバックによる逐次決定法
東大・工・計数工学　甘利　俊一

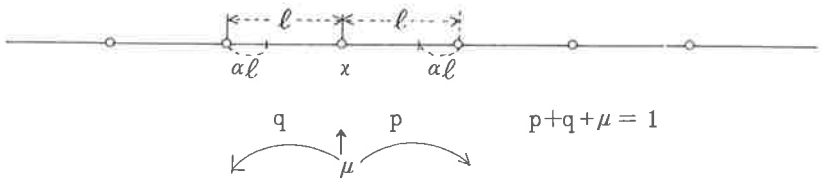
抄　　録　　生物の拡散行動

寺本　　英（京大・理）

拡散方程式の基礎はブラウン粒子の運動を記述する理論としてEinstein（１９０５）およびSmoluchowski（１９０６）によって確立された。その後Suedberg(１９１６) およびWestgren（１９１６）が，顕微鏡下のある限定された領域内に見出されるブラウン粒子の数の変化を統計的に調べ，それを Einstein の理論と比較解析することによって，その理論が，Boltzmann 定数を驚くべき精度で与えるということがわかり，拡散方程式の基礎とその物理的裏付けが完全に確立した。この場合理論の基礎は力学，熱力学に加えて確率論を基礎にして第一原理から導かれ得たのである。

生物界での分散現象でも，バクテリア・花粉・胞子などの分散現象は気体乱流分散として物理的拡散として解析できるし，大洋でのプランクトン，卵・精子の分散なども，しかりである。しかし動物の分散行動となるとその種により多様であり極めて複雑な行動パターンをとる。しかし，比較的簡単な昆虫などの分散行動では物理的拡散と似た行動パターンをとる場合が少なくない。これらの行動パターンを簡単なものからより複雑なものへと一歩づつ追し進めて解析することによって動物の行動要因の本質を明らかにして行くことは行動学的・生態学的また生理学的側面からいっても重要な課題であるといってよい。

動物の分散行動を記述する理論は物理的な第一原理のみから導くことは勿論不可能なことである。そこで，まず観測データに示される特徴を基礎におくことと，思考モデルの試行を押し進めてゆくこと以外にはない。そこでまず Okubo による一般化されたランダム・ウォークの分類を紹介する。



τ時間毎の距離ℓのステップのランダムウォークを考えると，ℓ，τ⟶0の極限で　　$\ell^2(1-\mu)/2\tau \longrightarrow D_0(1-\mu)=D$ ，$\ell(p-q)/\tau \longrightarrow u$

として通常の拡散方程式

$$\frac{\partial p}{\partial t}=-\frac{\partial}{\partial x}(up)+\frac{\partial}{\partial x}\left(D\frac{\partial p}{\partial x}\right)$$

$$= D\frac{\partial^2 p}{\partial x^2} - u\frac{\partial p}{\partial x} \qquad (I)$$

が得られるが，p，qが行く先の手前 $\alpha\ell$（$0 < \alpha < 1$）の点の状態の関数として与えられる場合

$$p(x+(1-\alpha)\ell, t) + q(x-(1-\alpha)\ell, t) + r(x, t) = 1$$

で

この場合 $D(x,t)$，$u(x,t)$ は x と t の関数となり，連続の極限で

$$\frac{\partial p}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x}\left[\left\{u+(1-2\alpha)\frac{\partial D}{\partial x}\right\}p\right] + \frac{\partial}{\partial x}\left(D\frac{\partial p}{\partial x}\right)$$

が得られる。特殊の場合として

ⅰ）$\alpha = 1/2$　Fick の拡散となり(I)式となり，Okubo はこれを中立方，この行動をする動物をStranovich animal とよんでいる。

ⅱ）$\alpha = 0$　$\partial D/\partial x = U\ell$ とおくと

$$\frac{\partial p}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x}\{(u+u\ell)p\} + \frac{\partial}{\partial x}\left(D\frac{\partial p}{\partial x}\right)$$

$$= -\frac{\partial}{\partial x}(up) + \frac{\partial}{\partial x}\left(D^2\frac{\partial p/D}{\partial x}\right) \qquad (II)$$

となり，吸引形あるいは Skellam animal とよぶ

ⅲ）$\alpha = 1$

$$\frac{\partial p}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x}\{(u-u\ell)p\} + \frac{\partial}{\partial x}\left(D\frac{\partial p}{\partial x}\right)$$

$$= -\frac{\partial}{\partial x}(up) + \frac{\partial^2}{\partial x^2}(Dp) \qquad (III)$$

となり，反発形および Ito animal とよぶ。

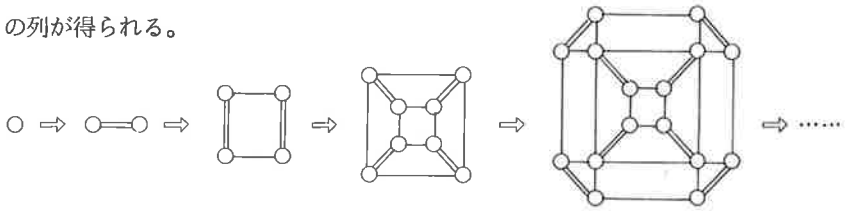
さて，一方で観察事実にもとづいた理論の組立てが必要である。これは幸にして森下の極めて精細な実験データがあり，このデータにもとづいた特性を数理モデル化することによって，理論の基礎づけが可能になった。その結果は上記の（Ⅲ）に対応した行動パターンになっていることが示された。これについて簡単に紹介する。詳しくは下記文献を参照されたい。

Shigesada N. and Teramoto E., Japanese J. Ecol. 28. 1 (1978)
Shigesada N., Kawasaki, K. and Teramoto E., J. Theor. Biol. 79, 83 (1979)
Shigesada N. J. Math Biol. 9, 85 (1980)
Teramoto E. and Shigesada N., Proceedings of Symposium of Math. Biol. Southern Illinois University at Carbondale (1980)

卵割パターンとグラフ理論

土居　洋文（京大・理）

一個の胚において，各細胞をnode，細胞の隣接関係をedgeで表現すれば一個のグラフが得られる。例えばウニ卵割パターンについては次のようなグラフの列が得られる。



このようにグラフを順次生成していくシステムを著者は定義した（行列を用いたグラフ生成システム）。その概略を例により説明する。（グラフは無向グラフである）

例　$\Sigma_V = \{A, B\}$……nodeにつけるラベルの集合

$\Sigma_E = \{a, b\}$……edgeにつけるラベルの集合

node substitution rubs　$A \to \begin{bmatrix} A & a \\ & B \end{bmatrix}$，$B \to \begin{bmatrix} B & b \\ & A \end{bmatrix}$

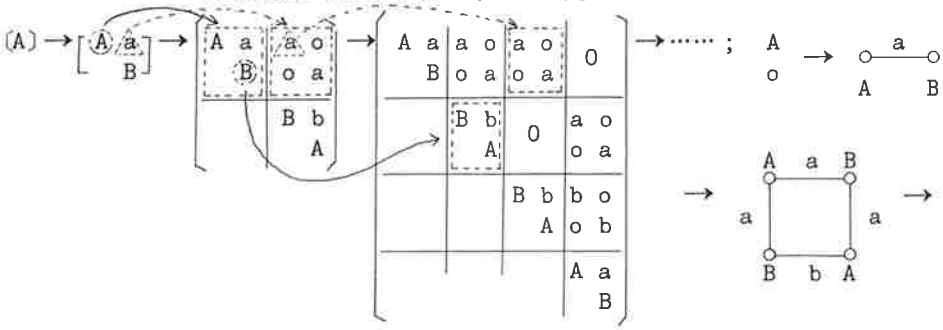
edge renewal rules

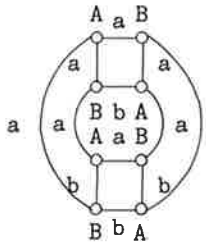
$(a,A,A) \to \begin{bmatrix} b & o \\ o & o \end{bmatrix}$，$(b,A,A) \to \begin{bmatrix} a & o \\ o & o \end{bmatrix}$，$(a,A,B) \to \begin{bmatrix} a & o \\ o & a \end{bmatrix}$

$(b,A,B) \to \begin{bmatrix} b & o \\ o & b \end{bmatrix}$，$(a,B,B) \to \begin{bmatrix} o & o \\ o & b \end{bmatrix}$，$(b,B,B) \to \begin{bmatrix} o & o \\ o & a \end{bmatrix}$

$(o,A,A) \to \begin{bmatrix} o & o \\ o & o \end{bmatrix}$，$(o,A,B) \to \begin{bmatrix} o & o \\ o & o \end{bmatrix}$，$(o,B,B) \to \begin{bmatrix} o & o \\ o & o \end{bmatrix}$

これらのrulesをもとに，ラベルAのついたnode一個だけからなるグラフから出発してグラフを生成していく。





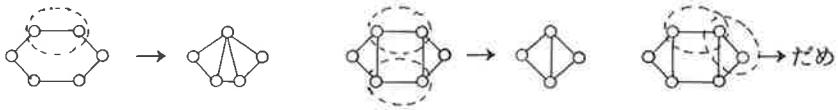
a → …… ○→□ はnode substitution rule を適用

△⇢□ はedge renewal rule を適用

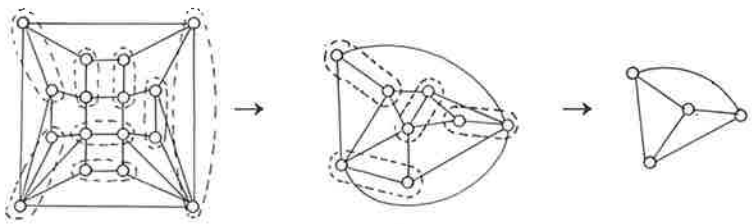
著者はホヤ卵割パターンについてこの行列を用いたグラフ生成システムで表現する事を試みた。

今まで，いくつかのグラフ生成システムが提出されているが，その多くの本質はあるnodeに一つのグラフを代入するnode substitution rulesと，nodeに代入した後 edgesを引きなおすedge renewal rulesにあると言える。edge renewal rulesはある2つの nodesとその間にあるedgeに関する情報からきまり，グラフの他の部分にはよらない。この事をこの意味でcontext freeと呼ぶ。ところでE.B.Wilsonは数多くの分離割球の実験を通して『細胞自身の内部に，各細胞に特徴的で複雑な分化を決め，かつそれらが胚の他の部分と全くかかわりなく行う卵割の型とリズムを決めるいっさいの要因がある』と結論している。細胞自身の内部に，卵割の型，リズム，分化を決める要因がある，とは細胞の分裂様式および分化能の分離を決めるのはその細胞自身であることを言っている。これはグラフ生成システムにおいてnode substitution rulesに対応する。また，胚の他の部分と全くかかわりなく行うとは，上の意味でのcontext freeの事である。すなわち卵割パターンというのはグラフ生成システムと同じ原理にしたがっているのである。

あるグラフの部分 "○—○" を重なることなく適当に選んでグラフを縮小させることを考える。例えば



今nodeが 2^N 個あるグラフにおいて部分グラフ "○—○" を重なることなく 2^{N-1} 個選んでグラフを縮小させる。例えば，



node数 $=2^4$　　node数 $=2^3$　　node数 $=2^2$

問題　node 数が 2^N 個のグラフT(terminal)から出発してこの縮小操作をくり返し，グラフA(axion)  に到達できるpathはいくつあるか。

予想　ホヤ卵割における64細胞期のグラフから出発してこの縮小操作をくり返してグラフ  に到達できるpathはonly oneである。

pathがonly oneであることはterminal の形能によって卵割のし方，cell lineage tree pattern，分化能の分離のし方も完全に決められてしまうという重要な問題をあらわしている。卵割パターンのプログラムは卵形成時に母性情報によって決められるのだが，そのプログラムは，terminalの形能 — 幾何的な — の制約をうけているのである。

血流の理論モデル

岩田　和朗（清恵会医療専門学院）

生体に近い血流を人工的に作ることは非常に難しい。理由として心臓内の血流のように生体での血流状態がよくわかっていないこと，また生体が構造的にも機能的にも非常に複雑なことがあげられる。たとえば三層構造をなしている心筋は内層と外層では収縮率が異なっており，また場所によって収縮の時間的ずれがある。心臓内部には多数の肉柱が茂り血流に大きな影響を与えている。血管をとり上げても何層からかできておりHooke の法則に従うような簡単なものではなく，また神経・ホルモンの影響によって血管壁の弾性は変化する。血液内にはフィブリノーゲンのような高分子物質が含まれており，また変形しやすい赤血球等の血球がはいっている。このため血液はニュートン液体ではなくヒトの場合 Casson の式に従うといわれている。この複雑ななかでも昔から脈管内の血液の運動については研究されていた。Hagen－Poiseuilleの法則，Young もしくはW.Weberによる動脈中の波の伝播速度の導出などである。ここでもこの脈管系を取り上げ，その中の代表的な2つの理論モデルを述べ今後の展望を論じたい。

1.　流体力学と血管壁の弾性論に基くもの

W.Weber などの理論よりはるかに進んだ理論を展開したWitzigの理論を

示す。このモデルは無限に長い弾性管内の波の伝播についてであり，後の発展もこの理論が基本になっている。流体の運動はNavier－Stokesの法則に従い，弾性管はLambの導いた運動方程式に従うものとする。弾性管は無限に長いので反射波はなく，非圧縮性のニュートン流体を仮定している。管軸をZ軸とする円柱座標（γ，θ，Z）をとり流体の運動を軸対称とする。Navier－Stokesの方程式は次のようになる：

$$\frac{\partial u}{\partial t}+v\frac{\partial u}{\partial \gamma}+u\frac{\partial u}{\partial z}=-\frac{1}{\rho}\frac{\partial P}{\partial z}+\nu\left(\frac{\partial^2 u}{\partial \gamma^2}+\frac{1}{\gamma}\frac{\partial u}{\partial \gamma}+\frac{\partial^2 u}{\partial z^2}\right) \tag{1}$$

$$\frac{\partial v}{\partial t}+v\frac{\partial v}{\partial r}+v\frac{\partial v}{\partial z}=-\frac{1}{\rho}\frac{\partial P}{\partial r}+\nu\left(\frac{\partial^2 P}{\partial r^2}+\frac{1}{r}\frac{\partial v}{\partial r}+\frac{\partial^2 v}{\partial z^2}-\frac{v}{r^2}\right) \tag{2}$$

ここに，uは速度のZ成分，vは速度のr成分，Pは圧力，ρは流体の密度，$\nu=\eta/\rho$は運動粘度，ηは粘度である。連続の方程式は

$$\frac{\partial v}{\partial r}+\frac{v}{r}+\frac{\partial u}{\partial z}=0 \tag{3}$$

あるいは

$$\frac{1}{r}\frac{\partial}{\partial r}(rv)=-\frac{\partial u}{\partial z} \tag{3}'$$

流体の速度小さいものとして，(1)，(2)の左辺第2項と第3項とを無視し，またu，v，Pは$\exp\{i\omega(t-z/c)\}$の周期解とし変数分離法で解いた。

ここで$|\nu\omega|\ll|C^2|$，また波長をλとすると$|r|\ll|\lambda|$が成り立つならばu，v，Pは次のようになる。

$$u=\left\{-\frac{Aw}{c}+C\sqrt{\frac{iw}{\nu}}\,Jo\left(ir\sqrt{\frac{iw}{\nu}}\right)\right\}\exp\{iw(t-z/c)\} \tag{4}$$

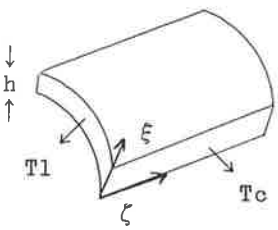
$$v=-\left\{\frac{iAw^2r}{2C^2}-\frac{Cw}{c}J_1\left(ir\sqrt{\frac{iw}{\nu}}\right)\right\}\exp\{iw(t-z/c)\} \tag{5}$$

$$P=-Aw\rho\,\exp\{iw(t-z/c)\} \tag{6}$$

ここでJ_0，J_1はそれぞれ1次および2次の第1種ベッセル関数で，A，Cは積分定数である。次に管壁の運動方程式としてはLambが得た式を用いる。

$$\rho_w\frac{\partial^2\zeta}{\partial t^2}=\frac{E}{1-\sigma^2}\left(\frac{\partial^2\zeta}{\partial z^2}+\frac{\sigma}{r'}\frac{\partial\zeta}{\partial z}\right) \tag{7}$$

$$\rho_w\frac{\partial^2\zeta}{\partial t^2}=\frac{P-P_2}{h}-\frac{E}{1-\sigma^2}\left(\frac{\sigma}{r'}\frac{\partial\zeta}{\partial z}+\frac{\zeta}{r'^2}\right) \tag{8}$$



ここで，ζ，ξはz方向，r方向の変位，ρ_wは壁の密度Eはヤング率，σはPoisson比である。hは壁の厚さ，r'は平衡半径を表わす。

境界条件は

$$r = r' + \xi \text{ で } \quad u = \frac{\partial \zeta}{\partial t} \quad , \quad v = \frac{\partial \xi}{\partial t} \qquad (9)$$

これは管壁上で流体のスリップがないことを示す。いま$\zeta = B \exp\{iw(t-z/c)\}$, $\xi = D \exp\{iw(t-z/c)\}$とおいて，これらと(4)〜(6)を(7)〜(9)に入れると，A B，C，Dの一次同次方程式が得られる。u,v……が0以外の解を持つことから波の速度Cに対する第一近似式$C = K\sqrt{Eh/2\rho r'}$を得る。これが完全流体の場合W.Weberと一致する。この理論はこれまでにもいろいろ改良されたけれどもまだ発展の余地がある。大動脈におけるテーパーの影響，大動脈弓で曲がっている場合の血流，心臓の拍動が正弦的でないなどである。またこのモデルは境界領域が変動するので他の分野への応用も興味深い。

第2は粘弾性管内の血流の力学系を電気的な等価回路に置き変える方法がある。集中定数モデル，線形分布モデル，非線形分布モデルなどである。この方法は1回拍出量を計算するのを目的としている。また循環によるエネルギー損失なども計算できる。このモデルは適当な等価回路を考えることによって，大動脈のテーパーの影響，分岐がある場合などに応用できると予想される。

脈管系の理論的モデルから研究を始め，最終的には生体に近い血流状態を作りだしたいと考えている。そして人工弁や動物弁の良し悪しを調べたり，RI等の検査の信頼性をチェックしたりまた方向によっては人工心臓にもなる可能性がある。

参 考 文 献

1) 岡　小天：レオロジー，物理科学選書7. 裳華房 . 1976.
2) R. H. Cox：J. Biomechanics 2. 251 (1969)
3) J. R. Wormersley：Phil. Mag. 46, 199 (1955)
4) R. Skalak：Cardiovascular Fluid Dynamics (ed. D. H. Bergel), vol. 2 Academic Press, London,1972

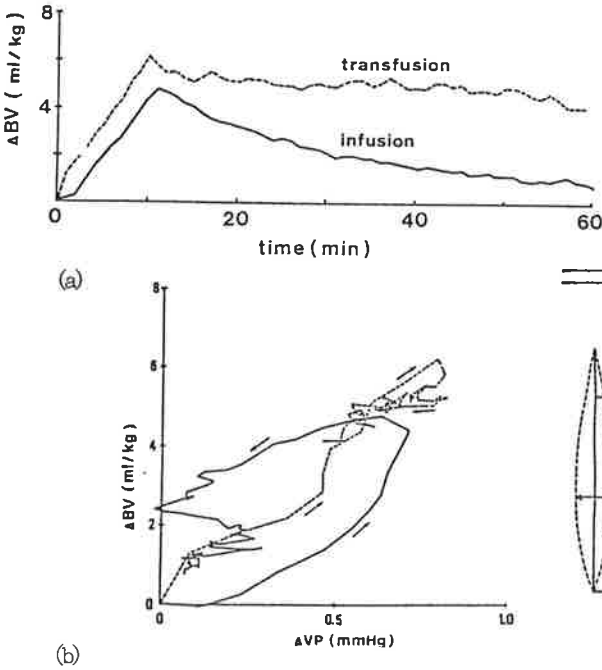
血液一間質液間水分移動のダイナミックス

磯貝　芳徳　　能勢　　博　　三木　健寿
森本　武利　　（京都府立医科大）

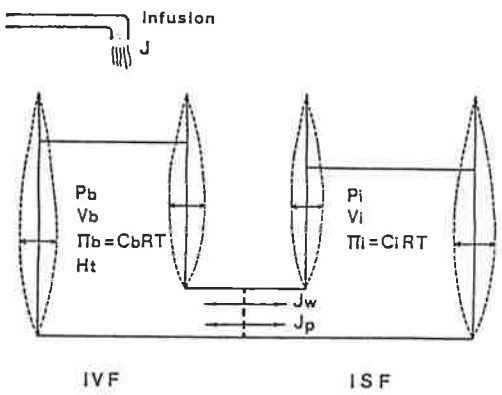
脈管内への輸液あるいは輸血は，血圧および血液の膠質浸透圧の変化を惹起し，ひいては毛細血管における水分の有効濾過圧の平衡を崩して血液－間質液間に水分移動を起こす。この輸液あるいは輸血に伴う水分移動の時間挙動をモデル化し，連立微分方程式として表現するのに成功したので報告する。

これまで我々は犬を用いた循環血液量，血液膠質浸透圧，動脈圧および静脈圧の連続測定法の開発，さらにこの測定法を用いた一連の実験結果について報告してきた。図－1にこれら実験結果中最も特徴的な事柄を図示する。図－1(a)は時間0より10分間，一定の速度で輸液（infusion）あるいは輸血（transfusion）を行った場合の循環血液量の時間変動の様子を示す。図－1(b)には同じ条件下で循環血液量と中心静脈圧が相関して変動する様子（P－V図）を示す。両図から読み取られる特徴的な点としては：　1)輸液あるいは輸血後の循環血液量の緩和過程に輸液と輸血の場合で大きな差異がみられる，2)輸液の場合に，循環血液量と中心静脈圧の変動にヒステリシスが見られる，などを挙げる事ができる。

上記特徴点1)は血液－間質液間の水分移動に膠質浸透圧が重要な役割を演じていることを示唆しており（脈管内へ負荷した輸液および輸血液体の膠質浸透過はそれぞれ0と16



図－1



図－2

mmHg である），特徴点2)は血管壁の力学的性質として弾性のみならず粘性をも考慮しなければならない事を示唆している（Delayed compliance）。これらの点を勘案した系のモデルを図－2に示す。系は血液側（IVF）と間質液側（ISF）の2つのcompartmentよりなり，両compartment間には血管壁を通しての水分移動（Jw）と，この水の流れに乗った蛋白質の流れ（Jp）がある。各 compartment を特徴づける変数として静水圧（P），体積（V）および膠質浸透圧（π）を考える。これに加えて血液側ではヘマトクリニット値（Ht）をも変数と考える。さらに血液側には外部よりの輸液あるいは輸血に伴う体積流（J）を考える。外部より注入する液体の膠質浸透圧，ヘマトクリニット値も大切な因子である。

このモデルの数式化に当り次の点を考裏した。1)血液側と間質液側の静水圧差と膠質浸透圧差によって濾過が生じる（Starlingの仮説）。2)delayed compliance の表現に粘弾性理論の Maxwell要素を援用する。 3)水分移動に伴う蛋白質移動を反射係数の形で組み込む。こうして得た連立微分方程式を右に示す。

$$J_w = k\{(P_b - \Pi_b) - (P_i - \Pi_i)\}$$

$$J_p = (1 - \sigma)\, J_w\, D$$

$$V_b = V_{RC} + V_P$$

$$\frac{d}{dt}V_{RC} = H(t) \times J$$

$$\frac{d}{dt}V_P = -J_w + J\{1 - H(t)\}$$

$$\frac{d}{dt}V_i = J_w$$

$$\frac{dP_b}{dt} = \frac{1}{C_b}\frac{dV_b}{dt} - \eta_b P_b$$

$$\frac{dP_i}{dt} = \frac{1}{C_i}\frac{dV_i}{dt} - \eta_i P_i$$

$$\frac{d\Pi_b}{dt} = -\frac{RT}{V_p}\left\{J_p - J(1-H)\frac{\Pi_0}{RT}\right\} - \frac{\Pi_b}{V_p}\frac{dV_P}{dt}$$

$$\frac{d\Pi_i}{dt} = \frac{RT}{V_i} J_p - \frac{\Pi_i}{V_i}\frac{dV_i}{dt}$$

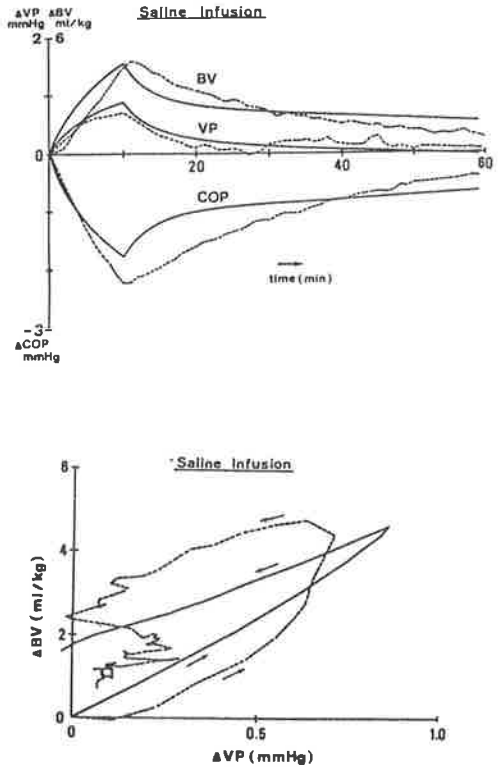
, where

$$D = \begin{cases} C_b = {}_b/RT & : \text{when } J_w \geq 0 \\ C_i = {}_i/RT & : \text{when } J_w < 0 \end{cases}$$

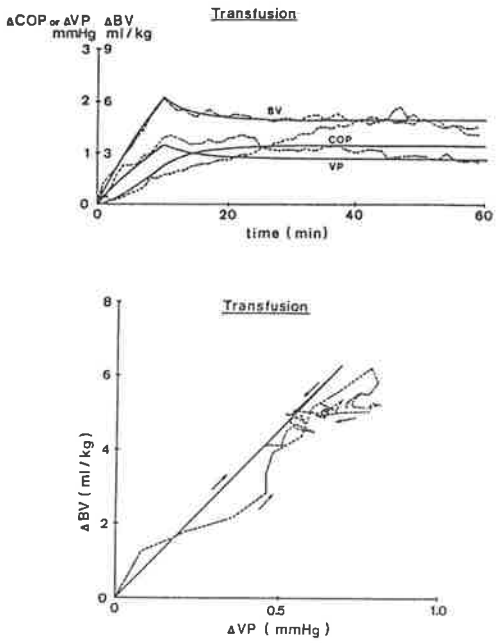
$H(t)$: Ht of infusion fluid

Π_0 : COP of infusion fluid

図－3および図－4にはそれぞれ輸液と輸血の場合の循環血液量，静脈圧，膠質浸透圧の時間変動およびP－V図のsimulationの結果（実線）と実験値（破線）を示す。実験と理論の対応は比較的良く，特に上記の2つの特徴点は理論曲線に充分表わされており，我々のモデルおよび方程式の妥当性を示すものと考えられる。



図－3



図－4

膜透過と細胞容積変化

品川　嘉也（京大・医）

はじめに

細胞内に物質が透過して入るとき，必ず水の透過を伴う。従って，細胞容積の変化を伴なう。細胞膜の透過により物質が排出されるときも同様である。故に，細胞内の物質の濃度を測定するだけでは膜透過は求められず，細胞容積を同時に測定しなければならない。しかし，細胞容積の変化を求める実験は一般に困難であり，実験結果の理論的解析も充分でない。われわれは赤血球を用いて細胞容積の変化と膜透過の関係を実験的に追求している。

ここでは非電解質の膜透過と細胞容積の一般的理論と数学的形式を概観して

みたい。

1. 非電解質の膜透過の一般式

$$\left.\begin{aligned} Jv &= Lp(\triangle IP - \triangle\pi) - \sigma Lp\triangle\pi s \\ Js &= \overline{Cs}(1-\sigma)Jv + w\triangle\pi s \end{aligned}\right\}$$

Jv：体積流　　Js：溶質流
IP：静水圧　　π：浸透圧
Lp：濾過係数　　σ：反撥係数

w：溶質透過率，πs：溶質Sによる浸透圧，$\overline{Cs}$：溶質の平均濃度

この式の導出については不可逆過程の熱力学からKatschalsky & Curran,[1] 井上・品川[2]に詳しい。

細胞内部への透過を考えるので，以下では次の記号を用いる。溶質Sの細胞外液での濃度 Ce，同細胞内液での濃度 Ci $=S/V$，Vは細胞内容積，$t=0$ における細胞容積 Vo，細胞外液における非透過溶質の全浸透圧濃度 CM，細胞内液の非透過溶質の濃度 Cx $=X/V$ 。

2. 力学平衡 $\triangle IP = 0$ と浸透圧平衡 $\triangle\pi = 0$ が共に成り立つとみなせるとき

$Jv = -\sigma Lp\triangle\pi s$，$Js = \{w - \sigma Lp\overline{Cs}(1-\sigma)\}\triangle\pi s$，$P = w - \sigma Lp\overline{Cs}(1-\sigma)$

と書き透過係数と呼ぶ（通常定数とみなされる），これから

$$\left.\begin{aligned} \frac{dv}{dt} &= Lp\sigma\left(\frac{S}{v} - Ce\right) \\ \frac{ds}{dt} &= P\left(Ce - \frac{S}{v}\right) \end{aligned}\right\}$$

$\triangle\pi = 0$ から，$\triangle\pi = \sigma Ce + CM = \sigma\frac{S}{v} - \frac{x}{v} = 0$，$V = \frac{\sigma S + x}{\sigma Ce + CM}$ を代入して

$$\frac{dV}{dt} = Lp\left(CM - \frac{X}{V}\right),\quad \frac{dS'}{dt} = P\,\frac{CeX - CMS}{X + \sigma S}$$

$$\sigma S + x\left(1 + \frac{\sigma Ce}{CM}\right)\ln|CMS - CeX| = -PCMt + const.$$

$CM = 0$ のときは $\frac{1}{2}\sigma S^2 + XS = PCeXt + const$，Sが小さいとき $S \sim PCet$

$$V + \frac{X}{CM}\ln|CMV - X| = LpCMt + const$$

$CM = 0$ のとき $\frac{1}{2}V^2 = -LpXt + const$

3. 担体輸送，能動輸送モデル

$$Js = P\left(\frac{Ce}{K + Ce} - \frac{s/v}{K + s/v}\right)$$

Sen, A.K. & Widdas, W.F. (1962) J. Physiol, 160, 392 はこの式で V= const とみなして積分している，これは明らかに誤り，2からVはSの一

次関数，それを代入して

$$Js=P\frac{Ce}{K+Ce}\Big/\left(1+\sigma S\frac{K+Ce}{KX}\right),\ 解\ \frac{1}{2}\sigma S^2\frac{K+Ce}{RX}+S=P\frac{Ce}{K+Ce}t+const$$

能動輸送モデル $Js=P\left(\frac{Ce^m}{K_1+Ce^m}-\frac{Ci^r}{K_2+Ci^r}\right)$，$m=n=1,\ \frac{Ci}{Ce}=\frac{K_2}{K_1}$

$m \neq n$ のモデルはこれまで報告されていないと思われる。

4. 力学・浸透圧平衡 $\triangle IP-\triangle\pi=0$

$Jv=Lp\sigma\left(\frac{S}{V}-Ce\right)$，$Js=P\left(Ce-\frac{S}{V}\right)$ は2の場合と同じ

$\frac{dV}{dS}=-Lp\sigma/p$，$V=V_0-\frac{Lp\sigma}{p}S$ となりSの一次式であることも同じで

あるが係数の意味が異る（2,4は同時には成り立たない），

$$\frac{dV}{dt}=\frac{p}{V}\left\{V_0-V\left(1+\frac{Lp\sigma Ce}{P}\right)\right\}$$

5. 力学平衡 $\triangle IP=0$

$$Jv=Lp\left(\frac{\sigma S+X}{V}-\sigma Ce+CM\right),\quad Js=P\left(Ce-\frac{S}{V}\right)+\overline{Cs}(1-\sigma)Jv$$

Johnson & Wilson[3]は変数変換により

$$\left.\begin{aligned}\upsilon\frac{d\upsilon}{d\tau}&=1-\upsilon\ 1a(s-\upsilon)\\ \upsilon\frac{ds}{at}&=b(\upsilon-s)+c\upsilon\frac{d\upsilon}{dt}\end{aligned}\right\}$$

aが小さいとして，aのベキに展開（漸近転開）

註1. 静水圧△IPがかっているため体積変化の起きない系

$$Jv^2 0,\ \frac{\sigma S+X}{V}-\sigma Ce-CM=\triangle IP,\quad \therefore Js=\frac{P}{\sigma}\left(\frac{X}{V}-CM-\triangle IP\right)$$

Jsは浸透圧差と静水圧差で決ってしまう。

註2. 細胞内濃度で表示されているとき，

$$Js=\frac{d}{dt}(CiV)=Ci\frac{dV}{dt}+V\frac{dCi}{dt}$$

文　献

1) Katschalsky, A. & Curran, P.F,(1965)"Nonequilibrium Thermodynamics in Biophysies" Harvard Univ,Press

2) 井上章・品川嘉也編(1969)" 能動輸送 " 南江堂

3) Johnson,J.A, & Wilson, T.A. (1967) J. theor Biol,17, 304

細胞動態解析に於けるMaturity Modelの導入の試み

柳沢　正史　　轟　　健（筑波大）

1. はじめに

細胞動態解析（cell-cycle analysis）のため細胞周期モデルとして従来，Harm[1]，Kim[2]らによる離散時間matrix modelや，Takahashi[3]らのPoisson過程 modelが提案されている。これらはいずれも細胞周期をcompartmentに分割して扱うものであったが，我々は細胞周期上にmaturityという連続量を導入してSmduchowski型の微分積分方程式による記述を行なったので報告する。

2. 細胞周期とmaturityの概念

癌細胞や培養細胞，あるいは未分化な組織細胞は一定の条件が満たされる限り，定常的指数関数増殖を続ける。一世代間は DNA 合成とその分裂に着目してG_1，S，G_2，M期に分けられている。しかし増殖細胞は DNA 合成だけではなく， RNA や DNA 合成に必要な酵素などを合成して次の分裂に向かって成熟してゆく。そこで分裂直後から次の分裂直前までの期間に0から1にわたる連続した実数を対応させて細胞周期を把握し，その量を仮にmaturityと名付けた。個々の細胞の maturity は細胞周期が進むにつれ0から1まで漸増し，分裂に至って1から0へ飛躍して次の世代となる。

3. modelの記述

我々はmaturity modelの基本形を考えるにあたって細胞周期に関し次のような仮説を置いた。　ⅰ)独立・ランダム性　　ⅱ)無履歴（Markov）性

ⅲ)周期の不可逆性（maturity標本関数が非減少）

我々の model の対象は増殖細胞集団であるからこれらの仮定は一応 reasonable であると考えた。さて，modelingの目標は細胞集団の中で時刻tに maturity xを持つ細胞の数密度 c(t,x)を記述することである。解は初期値 c(o,x)とパラメーターとして細胞集団の平均世代時間 $\overline{Tg}$，及びそのばらつき C.V.$= \sigma Tg/\overline{Tg}$ とを与えることにより得られる。

maturity分布 c(t,Tg)は，一種の拡散過程で記述されると考えられるが，標本関数が非減少であるという要請からそれを通常の拡散方程式で表現することはできない。そこで$\varphi(\xi)\triangle t$が微少時間 $\triangle t$の間にmaturityがξだけ変化する確率密度を与えるような$\varphi(\xi)$を考える。するとmaturityが1から0

になるとき（分裂）細胞数が2倍になることを考慮して

$$\frac{\partial}{\partial t}C(t,x)=-C(t,x)\int_0^1 \psi(\xi)d\xi+\int_0^x C(t,\xi)\psi(x-\xi)d\xi+$$
$$2\int_x^1 C(t,\xi)\psi(1+x-\xi)d\xi \qquad (1)$$

という Smolchowski 型の方程式が導かれる。 ここで $\psi(\xi)$ の形が問題となるが我々は最も一般的な片側分布として指数分布：

$$\psi(\xi)=\begin{cases}\frac{\beta}{\alpha}e^{-\frac{\xi}{\alpha}} & (\xi\geqq 0)\\ 0 & (\xi<0)\end{cases} \qquad (2)$$

を選んだ。$\psi(\xi)$ をこのように決めてやれば maturity が $\triangle x$ だけ進むのに要する時間 T の密度関数 $f\triangle x(T)$ は Laplace 変換で求まり，

$$f\triangle x(T)=\beta e^{-(\beta T+\frac{\triangle x}{\alpha})}\ Io\left(2\sqrt{\beta T\cdot\frac{\triangle x}{\alpha}}\right) \qquad (3)$$

で与えられる。（Io は 0 次変形 Bessel 関係） その平均及び変動係数は

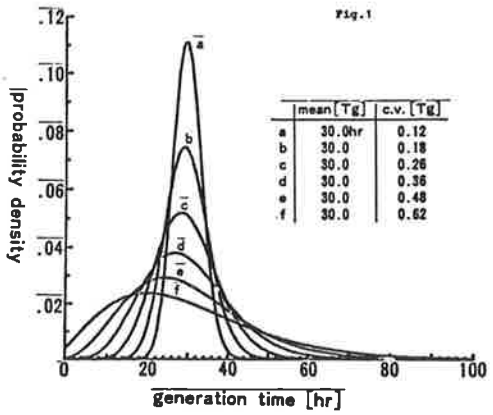
$$\begin{cases}\overline{T}=(\alpha+\triangle x)/\alpha\beta\\ CoVo=\sqrt{1+\left(\frac{\triangle x}{\alpha t\triangle x}\right)^2}\end{cases} \qquad (4)$$

となる。（fig·1） ここで $\triangle x=1$ とおけば T=Tg すなわち世代時間となっている。

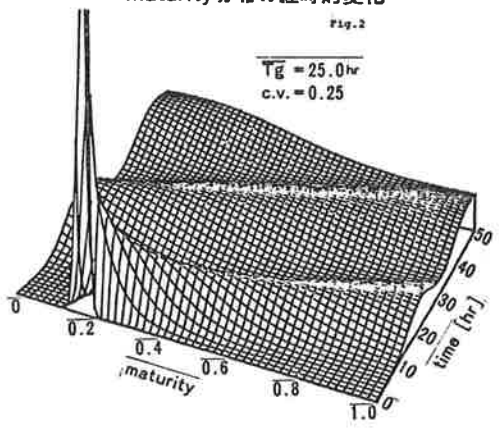
4. 今後の方針・まとめ

この model による maturity 分布及び DNA 量分布の simulation 結果の例を fig.2, fig.3 に示す。（DNA 量分布への変換は maturity－DNA の写像関係から求まる。） この様な DNA 等の分布は flow cytometry と呼ばれる手法によって実際に測定可能であり，この model を用いて fitting を行なえば細胞周期パラメータを推定できる。また細胞死や周期特異性の薬剤，あるいは contact inhibition の効果等を model に組み込むことは容易で，現在これらの定量的解析を行うための実験系を整備中である。

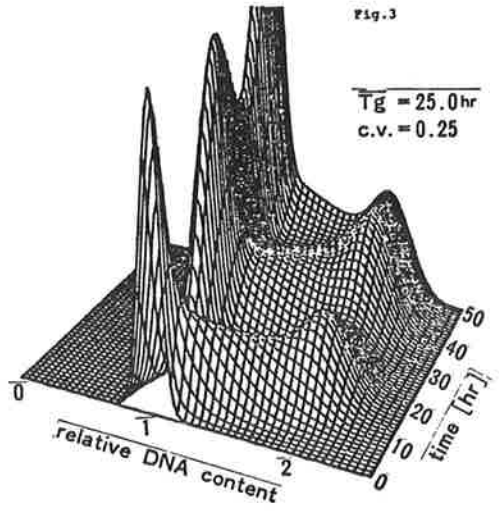
細胞世代時間の確率密度



Maturity分布の経時的変化



DNA量分布の経時的変化



5. 文 献

1) Hahn, G. M. Math. Biosci. 6: 295, 1970
2) Kim, M., et. al. IEEE trans, Biomed. Eng. 21: 397, 1974
3) Takahashi, M. J. Theoret. Biol. 18: 195, 1968

ヘモグロビン一酸化炭素結合過程における中間状態

亘　　弘（生理研）

Monod-Wyman-Changeaux によって配位子のある場合ヘモグロビンは“R”状態，配位子のない場合は“T”状態をとることが示された。したがって配位子の結合あるいは離脱によってアロステリック転移がおこるがこの反応の研究はヘモグロビンの酸素平衡状態にとって重要である。Gibson によって一酸化炭素ヘモグロビンは容易に光解離することが見出されたが，これが非常に速いことに着目して配位子が一酸化炭素の場合のアロステリック転位反応の研究に利用されるようになった。つまり光解離によって配位子の結合しない“R”状態を作り，これが一旦“T”に転移した後一酸化炭素を結合しつつ“R”に変化して行く経過を研究しようとするものである。

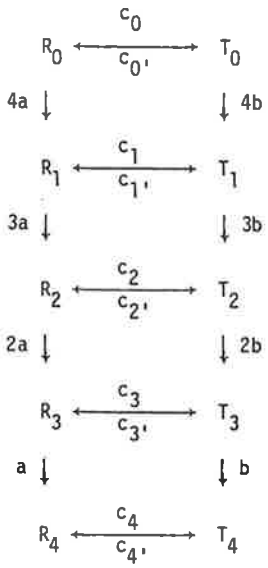


図1. Momod-Wyman-Changeaux のモデル。To 状態に一酸化炭素は結合し始め，4箇結合して R_4 となる。しかし光照射の場合には R 0 より R_4 となる。
Ci，Ci'(i＝ 0,1,2,3,4)は転移の反応速度。

半値巾20μsec のキセノンランプ（20J）を用いて一酸化炭素ヘモグロビンの光解離をおこさせ，その後緩和過程は特定の波長における吸光度の時間変化を観測した。この時間変化は10bits，2K words のトランシェントメモリー（岩通 DM501)を介して計算機（Hitac 20）にとり込む。種々の波長においても実験を繰り返して光解離後からの図3のような時間分解スペクトルを得た。

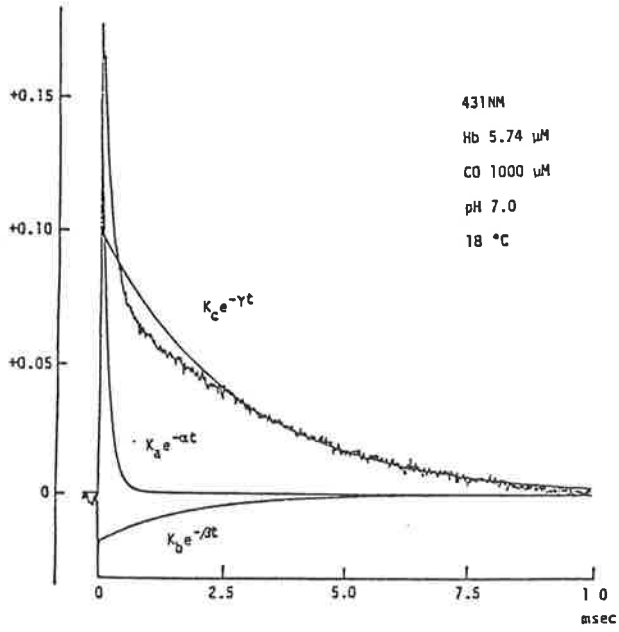


図2. 一酸化炭素ヘモグロビン光解離後の吸光度変化。図中の実線は三つの緩和に分解したものを示した。

431nm での吸光度時間変化を図2に示した。明らかに3つの緩和（α=2789 $sec,^{-1}$ $\beta = 392$ sec^{-1} および $\gamma = 163$ sec^{-1}）が認められるが，α と γ はマイナス方向で α，β はプラス方向の緩和である。 420nm では α と γ はプラス方向の，β はマイナス方向の緩和となっていることは図3の時間分解スペクトルによって明らかである。また図3に見られるように100μsec 以降の

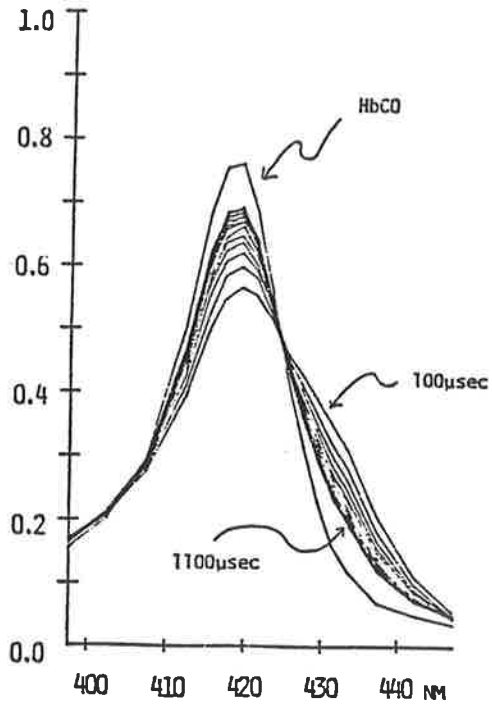


図3. 一酸化炭素ヘモグロビン光解離後の時間分解スペクトル。100μsec 以降 50μsec毎のスペクトルを表示。
実験条件は図1と同一。

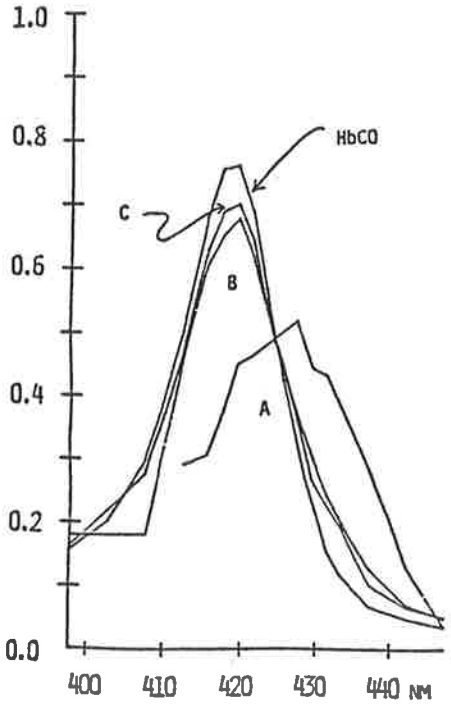


図4. 中間状態A，BおよびCのスペクトル。本文中の式によって A_A，B_B および A_C を求め絶対スペクトルにして表示。

isosbestic point は1つしか見出せない。これらのことは2つの中間状態を含む逐次反応によって解析できることを示唆している。この二つの中間状態をBおよびCとしたとき，Ri(i＝1, 2, 3)とTi(i＝0, 1, 2, 3, 4) のうちいずれか二つの状態に対応すべきものであると考えられるが，

$$A \xrightarrow{\alpha} B \xrightarrow{\beta} C \xrightarrow{\gamma} D$$

のような反応を考える。このモデルは

$$\frac{dC_a}{dt} = -\alpha C_a$$

$$\frac{dC_b}{dt} = \alpha C_a - \beta C_b$$

$$\frac{dC_c}{dt} = \beta C_b - \gamma C_c$$

$$\frac{dC_d}{dt} = \gamma C_c$$

のような微分方程式となり，これを解くと

$$C_a = C_{ao}\, e^{-\alpha t}$$

$$C_b = -\frac{\alpha}{\alpha-\beta} C_{ao}\, e^{-\alpha t} + \left(\frac{\alpha}{\alpha-\beta} C_{ao} + C_{bo} \right) e^{-\beta t}$$

$$C_c = \frac{\alpha}{\alpha-\beta}\frac{\beta}{\alpha-\gamma} C_{ao} e^{-\alpha t} - \left(\frac{\alpha}{\alpha-\beta}\frac{\beta}{\beta-\gamma} C_{ao} + \frac{\beta}{\beta-\gamma} C_{bo} \right) e^{-\beta t} + \left(\frac{\alpha}{\alpha-\gamma}\frac{\beta}{\beta-\gamma} C_{ao} + \frac{\beta}{\beta-\gamma} C_{bo} + C_{co} \right) e^{-\gamma t}$$

$$C_d = 1 - C_a - C_b - C_c$$

ここにDの吸収に対してA，B，Cの差の吸光度Aは

$$\Delta A = C_a \Delta A_a + C_b \Delta A_b + C_c \Delta A_c$$

であって上の解を代入すると

$$\Delta A = K_a e^{-\alpha t} + K_b' e^{-\beta t} + K_c e^{-\gamma t}$$

である。ここに

$$K_a = \left\{ \Delta A_a - \frac{\alpha}{\alpha-\beta}\Delta A_b + \frac{\alpha}{\alpha-\beta}\frac{\beta}{\beta-\gamma}\Delta A_c \right\} \left(C_{ao} \right)$$

$$K_b = \left\{ \Delta A_b - \frac{\beta}{\beta-\gamma}\Delta A_c \right\} \left(\frac{\alpha}{\alpha-\beta} C_{ao} + C_{bo} \right)$$

$$K_c = \left\{ \Delta A_c \right\} \left(\frac{\alpha}{\alpha-\gamma}\frac{\beta}{\beta-\gamma} C_{ao} + \frac{\beta}{\beta-\gamma} C_{bo} + C_{co} \right)$$

であってCao＋Cbo＋Cco＝1の条件では

$$\Delta A_a = \frac{K_a}{C_{ao}} + \frac{\alpha}{\alpha-\beta}\frac{K_b}{\frac{\alpha}{\alpha-\beta} C_{ao} + C_{bo}} + \frac{\alpha}{\alpha-\gamma}\frac{\beta}{\beta-\gamma}\frac{K_c}{\frac{\alpha}{\alpha-\gamma}\frac{\beta}{\beta-\gamma} C_{ao} + \frac{\beta}{\beta-\gamma} C_{bo} + C_{ao}}$$

$$\Delta A_b = \frac{K_b}{\frac{\alpha}{\alpha-\beta} C_{ao} + C_{bo}} + \frac{\beta}{\beta-\gamma}\frac{K_c}{\frac{\alpha}{\alpha-\beta}\frac{\beta}{\beta-\gamma} C_{ao} + \frac{\beta}{\beta-\gamma} C_{bo} + C_{co}}$$

$$\Delta A_c = \frac{K_c}{\frac{\alpha}{\alpha-\gamma}\frac{\beta}{\beta-\gamma} C_{ao} + \frac{\beta}{\beta-\gamma} C_{bo} + C_{co}}$$

図4に見られるように注目すべきことはBとCのスペクトルがヘモグロビンに一酸化炭素が3箇結合したものにほぼ等しい。ということはBとCの中間状態がそれぞれ R_3，T_3 に対応しているものと考えられ，アロステリック転移は $T_3 \longrightarrow R_3$ で行われたと推定できる。一方，Aのスペクトルは還元ヘモグロビンのそれに近いが，Ro か To かの判定は未だ不可能である。

このように中間状態が完全に配位していないヘモグロビンとして考えなくてはならないことが明らかになった。つまりヘモグロビンのような多量体の中間状態には一つの電子状態が対応すべきものであるとの考え方のみでなく，異った電子状態の混合したものを考える必要があるということである。

数学的ニューロンモデルによるＥＰＳＰの解析

小島比呂志（京大・医）

種々の神経細胞においてその神経細胞における情報の処理については，興奮性シナプス及び抑制性シナプス入力に対しての細胞内の電位の変化，すなわち，閾値以下ではEPSP,IPSP等として，又，神経筋接合部においてはEPP等として多くの生理学的な実験が行われてきた。この様な神経細胞内の電位変化は細胞膜のコンダクタンス変化の結果現われると考えられており，それらの神経細胞における入出力関係は，簡単なモデルをたてることによってその現象をシュミレートすることが可能であり，一部においてRall らによって生理学的に有為な結果をひき出すための試みがなされてきた。

一方，この様なモデルは，神経生理学に対してもつその重要性のほかに，そのモデルとしての興味が含まれており，さらにこれらのモデルの基礎となる数学的な形式にも種々の問題が含まれていると考えられる。

今回，神経細胞をsoma と dendrite に相当する２つのcompartmentよりなると仮定し，EPSP のみの入力をもつ場合の単純な神経細胞のモデルを考えた。さらにその数学的な形式に少々興味を覚えたため，従来，Rall らにより試みられてきた矩形波入力，exponential 型入力とは別に，周期関数である正弦波関数をその入力として用い，係数励振型といわれる微分方程式にその形式をかえFACOM-M-200（京大大型計算機センター）を用い，ルングクッタジル法によって解を数値的に求めてみたので簡単に報告する。

The two compartments model is expressed as follows.

compartment 1

$$g(v_2-v_1)+I_{m1}=C_M\,dv_1(t)/dt+G_r(v_1(t)-E_r)+G_e^{(1)}(v_1(t)-E_e)$$

compartment 2

$$g(v_1-v_2)+I_{m2}=C_M\,dv_2(t)/dt+G_r(v_2(t)-E_r)+G_e^{(2)}(v_2(t)-E_e)$$

g;the conductance between adjacent compartments

C_M;membrane capacitance

$V_1(t)$, $v_2(t)$;membrane potential

G_r;resting conductance

G_e;conductance of synaptic excitation

E_r;resting emf

E_e;emf of synaptic excitation

These equations are transformed into following expression.

$$\begin{matrix} v_1 \\ v_2 \end{matrix} = \begin{matrix} f_1 \\ f_2 \end{matrix} + \begin{matrix} \mu_{11} & \mu_{12} \\ \mu_{21} & \mu_{22} \end{matrix} \begin{matrix} v_1 \\ v_2 \end{matrix}$$

f_2, μ_{22} : input

v_1, v_2 : output

点過程の非線形超汎関数

伊藤　嘉房（名大・医療短大）

ホワイトノイズは超関数なので，それをそのまま巾乗するわけには行かない。ホワイトノイズを$x(t)$で表した場合，$x(t)^m$に意味を持たせるのはかなり困難である。だから$x(t)$の多項式や指数関数を定義するのは殆んど不可能にみえる。しかし飛田はホワイトノイズは超関数のうちでも比較的性質のよいものであることに注目し，適当なくみ込みをほどこせば$x(t)$の多項式や指数関数が数学的に厳密に定義されることを示した[1]。しかしそれらは普通の汎関数ではないので，（ホワイトノイズの）超汎関数と呼ばれている。飛田のアイデアに見習って定義されたポアソンノイズの非線形超汎関数を紹介するのが本稿の目的である。順序として，飛田のアイデアの本質的な部分を直感に訴えて説明したあとポアソンノイズの超汎関数について簡単に述べる。

一般にホワイトノイズの非線形汎関数といわれているのはホワイトノイズの自乗可積分な汎関数のなす空間（L^2）の元である。最も簡単で典型的な非線形汎関数を例としてとりあげる：

(1) $W_2(h_2, x) = \iint h_2(t_1, t_2)\, x(t_1)\, x(t_2)\, dt_1\, dt_2$

これは $h_2 \in L^2(R^2)$ ならば（L^2）の元であり，逆も正しい[2),3),4)]。ところが世の中には h_2 が殆んど対角線の近くに集っている実例があるとのことである。それでも $h_2 \in L^2(R^2)$ なら問題は無いが，h_2 が本当に対角線の上にのってしまうとそれは最早 $L^2(R^2)$ の元ではなく事情は一変する。(1)式は変じて

(2) $W_2(f, x) = \int f(t)\, x(t)^2\, dt$

となる筈であるが，ホワイトノイズの自乗が被積分関数の中に現われて，(2)式はこのままの形では無意味となる。この式は明らかに発散してしまう。ところが $x(t)^2$ からその平均値 $E(x(t)^2) = 1/dt$ をあらかじめ引き去って得られる。

(3) $\widetilde{W}_2(f,x) = \int f(t)\left[x(t)^2 - \frac{1}{dt}\right] dt$

を数学的に厳密に定義することは可能なのである。しかしこれは (L^2) の元ではなく，それより広い空間 $(L^2)^\sim$ の元として理解される。このように発散する量から発散する量を引き去って，その差が意味を持つようにする手続きは「くり込み」と呼ばれる。くり込みを駆使して $x(t)$ の非線形演算を次々に定義して行くのが飛田のアイデアである。スペースの都合で，全く直感的な説明しかできないのは残念であるが，この点についての数学的な話しは文献を参照されたい。[1)]

ポワソンノイズの非線形超汎関数に話題を移すが，いぜんとして直感的説明を続ける。話題が変ったので今后は $x(t)$ はポアソンノイズを表し，(L^2) は自乗可積分なポアソンノイズの非線形汎関数を表す。ポアソンノイズはポアソン過程 3 微分なので $\triangle P/\triangle t$（$P(t)$ によりポアソン過程を表す）を $x(t)$ の近似とみることができる。しかし

(4) $\Sigma a_k \left(\frac{\triangle_k P}{\triangle_k t}\right)^2$ ， a_k は $f(t)$ を階段関数化したときの係数，

を

(5) $P_2(f,x) = \int f(t)\ x(t)^2\ dt$

の近似とみることはできない。(4)は (L^2) に属するが，(5)はホワイトノイズの場合と同様発散してしまう。(4)において分割を細わくして行くと極限値は (L^2) からはみ出すのみでなく発散してしまってどうにも執えどころの無いものとなってしまう。しかしここでも $x(t)^2$ から適当な発散量を引き去ることにより、くり込みをほどこせば数学的に定義可能な超汎関数が得られる。すなわち，この場合

(6) $\widetilde{P}_2(f,x) = \int f(t)\ x(t)\left[x(t) - \frac{1}{dt}\right] dt$

が厳密に定義される。[5)] これは

(7) $\Sigma a_k \left(\frac{\triangle_k P}{\triangle_k t}\right)\left[\frac{\triangle_k P}{\triangle_k t} - \frac{1}{\triangle_k t}\right]$

のある意味での極限値である。

本質的には全く同様なトリックを用いてホワイトノイズやポアソンノイズの任意の多項式や指数関数を定義することができる。ホワイトノイズについては

文献が多くさんあるので省略しポアソンノイズについての結果のみを示しておく。[1) 6)など]

ⅰ) 高次の巾乗にくり込みをほどこす。

(8) $\int f(t)\,x(t)\{x(t)-\frac{1}{dt}\}\cdots\{x(t)-\frac{n}{dt}\}\,dt$

が得られる。

ⅱ) 指数関数 $\exp(i\lambda x(t))$ にくり込みがほどこされると

(9) $\{(1+\frac{i\lambda}{dt})^{dt}\}^{x(t)}$

となる。若干，くり込みのトリックが読み取り難いものとなっているが $e^{i\lambda}$ の代りに1に充分近い量 $\varepsilon^{i\lambda}=(1+\frac{i\lambda}{dt})^{dt}$ が用いられて発散が防止されているのである。

1) T. Hida, Analysis of Brownian functionals, Carleton Math. Lec. Note. no.13, 1978.
2) N. Wiener, Nonlinear problems in rondom theory. Tech press of MIT, 1958.
3) T. Hida, Stationary stochastic processes, Princeton Univ.Press, 1970.
4) T. Hida, Brounian motion, Sprimger-Verlag, 1980.
5) Y. Ito, On a generalization of non-linear Poisson functionals, Math, Rep. Toyama Unin. Vol 3 (1980), 111-122.
6) T. Hida, Role of exponential functions in the analysis of generalzed Brownian functionals. Proc. 5th seminor on the stability and uniformity of stochastic models in Moscow 1981.

インパルス系列を入力とする系の解析

佐藤　俊輔（大阪大・基礎工）

【はじめに】　神経系における情報のコード化に関して総括的な報告[1)]が提出されてから十余年になる。この報告書では，神経系特に単一および少数ニウロン群における情報の変換について様々な方面から検討された。神経系における情報の担い手の1つは神経インパルス系列であることは周知だが，インパルス列のどこに情報がうめこまれるかについては多様性がある。たとえば，ある時間区間のインパルス系列の最初のスパイクが次段のニウロンの発火のトリガー

の役目をはたすものであったり，インパルス系列の頻度，バックグランド周波数からの周波数の増減など，いろいろな情報のコーディング様式が発見されている。

神経系に加えられた刺激をインパルス系列にコード化する，またはコード化された系列からそこに含まれている情報を解読する仕組を知ることは，神経系の機能の解明の1つの手がかりになる。

単一ニウロンあるいは少数ニウロン群のインパルス系列変換についてはその後も詳しくしらべられ，またそれを説明するモデルがつくられてきた[2)]。これらの研究は，神経系の情報伝達様式を直接的には言及していないが，変換について述べることは当然インパルス系列を表現する何らかの量ないしはパラメータを扱うわけで，著者達はその意味で間接的に担い手というものを意識していることになる。

神経系で観測されるインパルス系列をみると確率的構造をもつものが多い。また変換器としてのニウロン自身，無数のシナプス結合部を経由して入力を受けとるので絶えず確率的ゆらぎをしている。この場合ニウロンはある確率点過程を別の点過程へ変換する確率系としてとらえることができる。我々は注目するニウロンへの個々の入力線維を伝わるインパルス系列をすべて重ね合せ（pooling）。入力インパルス系列の空間的構造は無視して，1入力－1出力系としてそれを統計的立場から扱うことにする。すなわち入出力系列を観測することによりニウロンがどんな特徴をもつ系かしらべる。またインパルス系列入力に対して，ニウロンのシナプス後電位を測定するならば，両者からシナプスの特性を知ることもできる。後者をシナプス的作用をする系と呼ぶことにする。

【系の解析】　点過程を入出力とする確率的系φの同定を考える。点過程を$D(t:\omega)$，$M(t:\omega)$，……で表わす。また実数値をとる確率過程を$X(t:\omega)$，$Y(t:\omega)$，……で表わす。時間区間$\triangle=(t_1, t_2)$における過程の増分を$M(\triangle)$，$X(\triangle)$などで表わす。特に，$dM(t)=M[(t, t+\triangle t)]$，……などとする。点過程については$dt \to 0$のとき，$dM(t)=1$または0である。

系φに点過程 $D(t:\omega)$ が入力したときの出力を$M(t:\omega)$ とする。Dが定常のとき，(D,M) が定常ならば系φは時間不変であるという。以後系は時間不変であるとする。我々はある適当な入力点過程のクラス$\mathcal{D}$が与えられたとき，$\mathcal{D}$に属する任意のDに対してどんな出力過程が得られるかに興味がある。あるいは，DとMの観測から，φの表現を求めたい。後者はφの同定ともいえる。

点過程を特徴づける量は，Palm 関数などいくつか知られているが，我々は

まず最も単純な次の量に注目する：

$$\mu_D(t:\omega)=\lim_{h\to 0}\frac{1}{h}\ \mathrm{Prob}\{\text{M point in } (t,t+h)\,|\,D(\cdot:\omega)\} \quad (1)$$

これは入力 $D\in\mathcal{D}$ が与えられたという条件のもとでの出力点過程 M の密度を与えている。Brillinger[3]は，D(・)の点同志が，出力 M に相互作用をしながら影響する場合も考慮して次の表現を考えた：

$$\mu_D(t:\omega)=ko+\sum_{n=1}^{N}\int_{-\infty}^{\infty}\cdots\int kn(t-t_1,\cdots,t-tn)dD'(t_1)\cdots dD'(tn) \quad (2)$$

$$t_1,\cdots,tn:\text{distinct},\ kn\in L^2(R^n),$$

$$dD'(t)=dD(t)-p_D dt$$

ここで，$p_D dt=E\{dD(t:\omega)\}$. $kn(t_1,\cdots,tn)=0\quad {}^{\forall}t:<0$ ならば系は因果的と呼ばれる。もし関数列 {kn} が分れば，$\mathcal{D}$ の入力に対し出力 M をある程度特徴づけることになる。またDとMから {kn} を決定することができるなら系 ψ のある意味での同定になる。Brillinger は，系が線形（N＝1）の場合に，2次までの積密度や相互積密度をつかって，ko，k_1 を推定する方法を与えた。この方向でのニウロンの入出力関係の解析には，Brillinger,[4] Bryant[5]などがある。系が線形でない場合には入力 D の高次の積密度を必要とするので {kn} を推定することは非常に困難になる。もし D をポアソン過程（直交増分過程）とすれば高次の積密度がすべてゼロになる。(3)では，これを利用して N＝2 の場合，ko，k_1，k_2 が推定できることが示されている。従って点過程を入力とする系では同定のためには，入力としてポアソン過程を用いるべきだと述べている。

ポアソン過程 $D(t:\omega)$ を入力として系をテストする方法は，シナプス的作用をする系，すなわち一般の定常確率過程 $Y(t:\omega)$ を出力する（決定的）系にただちに応用できる。これは，$Y(t:\omega)$ を Brown 運動の直交汎関数展開と並列する。Charlier展開の方法であり，[6),7),8)] 70年代になってニウロンの入出力関係の同定にさかんに応用されるようになった。[9] {kn} による系の表現の不都合な点は，よく知られているように，例えば閾特性，ヒステリシス特性など，系の他の慣用的な表現と直接的に対応がつかないことである。我々はこの対応づけが可能かどうか検討している。

【文　献】

1) Perkel, D.H et al:Neural Coding, NRP, 6, №3(1968)
2) Sampath, G etal Lectuve Note in Biomath. 16,Spring-V.(1977)
3) Brillinger,D.R.:Ann, Prob 3 pp909-929, 1975

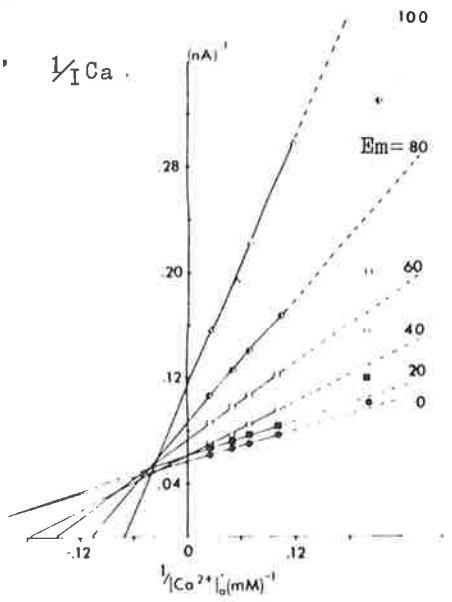
4) Brillinger, D.R. et al.:Biol Cyb. 22, PP213-228. 1976
5) Bryant, Jr., H.L. et al:J. Neurophys. 36, PP205-225,1973
6) T. Hida:Stationary Stochastic Processes, Princeton Univ. P. (1970)
7) Ogura, H:IEEE Trans. IT-18, pp473-480, 1972
8) Segall, A et al:IEEE Trans. IT-22 pp287-298, 1976
9) 中　研一：生物物理　20 pp215-226, 1980

Eyring 絶対反応速度論にもとずく Ca チャンネル生物物理モデルの１例

安井　湘三（基礎生物学研究所）

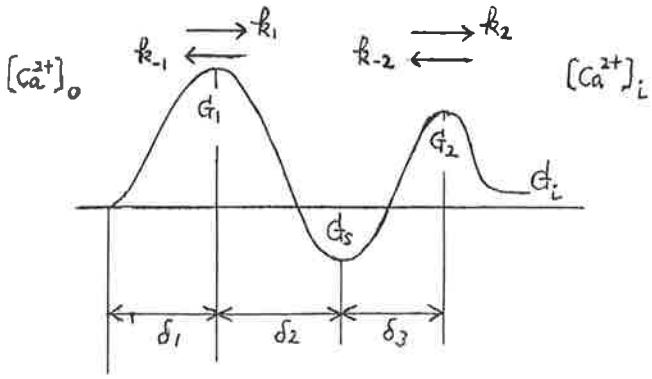
細胞内灌流可能吸引電極法による赤池らの結果によれば，Helix aspersa 細胞体の内向きI_{Ca}は活性，不活性化の過程を示すが Na や K チャンネルと対比して次の特徴がある（ゲート全開に近い 0 ≦固定膜電位 Em ≦ 100mV におけるピーク値を対象として；I_{Sr}，I_{Ba}についても傾向は同様）：(i)$[Ca^{2+}]_0$増加に伴なう飽和傾向が顕著，(ii) Q_{10} ～2.2 と高い，(iii) $\gamma_{Ca} \approx 10^{-13}$ S のオーダで２桁低い。(i)は「独立の仮定」を破るもので I_{Ca}-$[Ca]_0$ は Goldman-Hodgekin-Katz の flux 式から大きくはずれ図１に示す直線性から判定されるように Michaslis-Menten 型となる。これと(ii)の高 Q_{10} からこのチャンネルは“物理的”(e.g., 拡散，静電作用）より“化学的”色彩が濃い。そして(iii)も合わせると Ca^{2+} の水和エネルギに勝る強い対 Ca^{2+} 親和力を持つ膜物質結合部の存在が示唆される。一般に数Åのイオンが同程度直径の Pore を通過し，かつ透過中イオンの瞬時総数は静電的理由から多くて数個という常識から，離散的原子スケールの場で連続性を前提とした Nernst-Plank 式に立脚した議

図－1



論には危険があることが認識されつつある。また「独立の仮定」が不成立の状況下ではN－Pアプローチはもともと妥当性を欠く。Eyringの絶対反応速度論の応用では，以上を理論上の障害としない。そこで図2に示す2-peak，1-wellの最も簡単な固有（$E_m=0$でチャンネル内に透過イオンが既存しないときの）自由エネルギを透過イオンがチャンネル沿いに「感じる」と想定し，本Caチャンネルについて何が言えるかを検討した。レベルG_1，G_2の山は膜外から見れば水と脂質の誘電率差で生じるBorn energyの差に起因するbarrierあるいはdehydration energy barrierと解釈可能である。G_sの谷は結合部位に相当する。これら山と谷の位置はチャンネル全長を1としとした正規化パラメータδiで表わす。エネルギの下り坂はspontaneousであるが，上り方向はbarrierとなりレベル差がそれを克服するのに必要な活性化エネルギ$\triangle G$であり，対応する速度定数は$k=kT/h\ \exp(-\triangle G/kT)$となる。自由エネルギに$E_m$の貢献も加えて各山越えのイオン電流をこうして求め，微視的平衡条件の下で連立して解くと内きネット電流

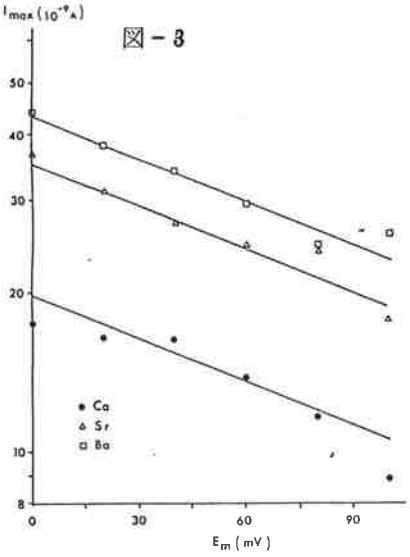
図－2



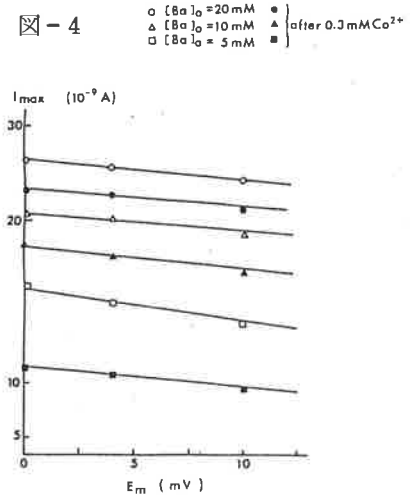
が求まる：チャンネル内許容透過イオンは瞬時的には最大1個で膜全体でM個のチャンネルがあるとし（ノイズ解析より$M\approx 10^5$コ～10^6コ），Aを2価陽イオンとすれば，$I_A=I_{max}\dfrac{[A]'_0}{[A]'_0+K_m}$……(1)* ここで$I_{max}=2Mek_2=2Me(kT/h)\exp\{(-G_2+G_s-2e\delta_3 E_m)/(kT)\}$……(2)　K_m＝（複雑につき省略，但しG_1，G_2，G_s，δ_1，δ_2，δ_3，E_m，T，$[A]_i\approx 10^{-6}$Mの関数）……(3)。　従って$I_A-[A]'_0$はE_m依存のI_{max}とK_mをもつM－M型となり図1と符合する。図1で縦軸との交点から$1/I_{max}$を読んで図3の$I_{max}-E_m$のデータを得る。片対数プロットだから，(2)式の予測通りに右下りの直線傾向となる。(2)式によれば結合部位と山G_2の距離δ_3が傾斜を決める。I_Aは$B_a>S_r>C_a$であるが，傾斜は同程度，従って共通に$\delta_3=0.10$と出た。さらに抗Ca剤Co^{2+}を加えても傾斜はほぼ不変である（図4）。また図5で縦軸

との交点が一致し，拮抗阻害を意味する。Cs^+, Na^+も同様な阻害効果を呈した。以上からこれら無機阻害剤も同一結合部 Gs までは透過するが，結合と水和のエネルギ差がより大なので結合子を横取りして居すわり I_A をブロックすると解釈される。さらに式(2)から，結合を離れて細胞内に抜け出るときの山越えが rate limiting となり，このbarrier の固有高さは $G_2 - Gs \equiv \Delta Gs_2$ である。δ_3 が求まったので ΔGs_2 も図3から計算出来て，Ca^{2+}の場合は 22℃で 12K cal M^{-1}, Ba^{2+}, Sr^{2+}では当然ながら若干低い。Ca^{2+} やアルカリ金属イオンではこの ΔGs_2 も莫大なのかも知れない。ΔGs_2 値は(2)式と cooling 実験で独立にチェック出来る。14℃～ 22℃ の $I_{max} - 1/T$ の傾斜から Ca^{2+} の活性化エンタルピ $\Delta Hs_2 \approx$ 13K cal M^{-1} ，同エントロピ変化分による補正のために常識値 $\Delta Ss_2 \approx 5$ cal deg^{-1} M^{-1} を仮定すれば $\Delta Gs_2 = \Delta Hs_2 - T\Delta Ss_2 \approx$ 12K cal M^{-1} となり先の値と矛盾しない。次に Km - Em も図1のようなプロットの横軸との交点 -1/Km より求め，先の I_{max} - Em データをも総動員して式(2), (3)を介して未知量 G_1, G_2, G_s, δ_1, δ_2の決定を強引に試みた。Fit はユニークではなく2通りの組合わせを得た。一つは結合部位を細胞外方向の入口からチャンネル全長の 4/10，他は 9/10 に位置づける。4/10 ケースの結果ををを表1に示す。9/10 ケースでは各レベルが 0～5 kT の範囲でより低くなる。エネルギは細胞外 Bulk を基準としたので，Gs の深さはチャンネル構造に無関係な intrinsic な親和性の尺度となる。△H に換算すると全ケースで -3～-6K cal M^{-1} にあり，Ca EGTA や Ca EDTAの -8.4，-5.8 K cal M^{-1} より若干浅い。最後に 3Å直径均質な pore に1個の2価イオンを入れて行くのに必要な静電エネルギは 64kT と計算され，表1の G_1 ， G_2 がず

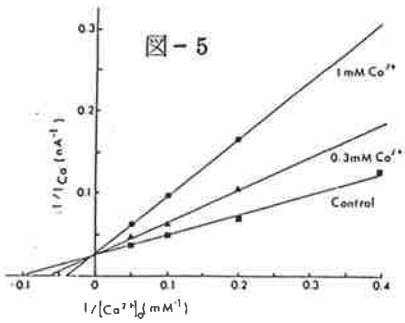
図－3



図－4



図－5



っと低いのは負帯電の結合子のクーロン引力に因ると思われる。逆に上の64kTという大きな値は透過イオンの瞬時最大許容数が1という本モデルの仮定がover simplificationでないことを支持する。

表1

	δ_1	δ_2	δ_3	G_1/kT	G_2/kT	Gs/kT
Ca	.18	.22	.10	15.6	12.8	−6.3
Ba	.20	.19	.10	15.6	12.9	−5.5
Sr	.20	.20	.10	15.9	10.3	−8.2

(1) Akaike, Lee, Brown;JGP 71(5):509-532(1978)
(2) Akaike, Fishman, Lee, More, Brown;Nature, 274:379-382(1978)
(3) Brown, Yasui, Akaike;submitted.
*$[A]'_0 \equiv [A]_0 - [A]_i \exp(2eEm/kT)$; "有効濃度"

神経回路網の非線形解析

中　研一（基生研）
桜永　昌徳（日本医大）

神経細胞の信号処理を考えをとき，各細胞間の入出力特性を調べ細胞間の信号のフィルター特性を求めることは最も直接的な手段である。この際に，ある神経細胞への適切なすべての入力パターンを我々があらかじめ知るということは大変に困難なことである。また，神経細胞はスパイク電位の発生等に端的にみられるように，様々な非線形性を示す系として知られている。このようなことから，生理学で従来用いられてきた入出力特性は限定された場合にとどまることが多く，特に系の動特性を知るには不十分なものであった。

このような神経系の問題を解決するために，この10年間Wienerの非線形解析が網膜視覚系を中心として行なわれ，網膜をシステム論的に取り扱かえる足場が築かれてきた。その間に，網膜の特徴をいかして，2入力の白色雑音あるいは，時空間白色雑音といった多次元の入力を用いて系を解析する方法が発展し，複雑な入出力応答を求めることが可能になっている。一方，網膜のある細胞内に白色雑音電流を注入し，その応答を他の細胞から得ることにより系の特性が調べられる。この場合，入力は細胞内の点源とみなし得るので，なるべく少ない細胞系のみを刺激することが可能であり，系をかなり単純化し得ると期待される。本研究会では，この後者の場合の解析についてのみ報告する。

実験では，アメリカナマズの網膜を用い，その水平細胞内に，白色雑音電流を注入し，その応答を他の細胞，（H，B，N，C，G）内から記録するその入出力A／D変換されて，ディスクメモリに保存され，VAX11/780を用いて，直接法により入出力の相関が取られ1次および2次のWiener核が計算される。この解析により，以下に述べられるような結果が得られる。

まず，水平細胞間の信号伝達は非線計性が現われず，線形成分のみによっている。また，1次核は遅れをともなわないもので，これは他の細胞間のものと著しく異なっている。このことは，水平細胞間が抵抗成分のみによって接続されたS－空間を形成するとしたこれまでの考え方に一致するものである。

次に，水平細胞→双極細胞（BA,BB）は，顕著な2次非線形成分を示さず，ほぼ線形な信号変換を行なっている。BAからの1次成分は，ゆるやかな立ち上がりおよび立ち下がりを示し，高周波数成分が信号伝達に際し消失することを示唆している。また，BAおよびBBのWiener核の極性は，互いに鏡像関係にあり，水平細胞からBAおよびBBへの信号伝達がそれぞれ符号反転および非反転として作動することを示している。このような，水平細胞間あるいは双極細胞への信号伝達から，水平細胞の信号が興奮性でも抑制性でもない中性の信号として機能していると結論される。

上記以外の信号伝達（H→NA，NB，C，GA，GB）は，明確な2次の非線形成分をもっている。なかでも，C型細胞の応答は，線形成分はむしろ小さく，強い非線形性を示す。また，G型細胞の非線形成分もかなり大きく，その極性はGA型およびGB型で同一である。これに対し，N型細胞の2次非線形成分は幾分小さくなっている。

以上に要約したように，我々は現在1次および2次のWiener核を求めることによって，入出力を得た神経細胞対を明確に分類できるようになった。そこで，非線形成分の顕著に現われる系において，得られた2次の積分核が細胞内電位のどの相に対応するのかを明確にして，さらにこのような応答がどのような数学的モデルによって実現しうるかを決定することが，今後の重要な問題と考えられる。

フィルタリングによる誘発波信号の抽出

石井　直宏（名古屋工業大）

1. まえがき

誘発脳波時系列から真の信号を抽出するため通常加算平均法がよく使われている。しかし加算回数を多く必要とし，さらに SN 比を改善する目的でいくつかの情報論的手法が提案されている。その主なものにウィーナ・フィルター法がある。さらに非定常時系列を扱う再帰型フィルタがある。本研究では，これらのフィルタの効果を調べるため，雑音成分の定常および非定常背景脳波を考えた条件のもとで，シミュレーションによるフィルタリングの比較・検討したものである。

2. 本文

外部からの刺激による誘発脳波を $x(t)$ とし，真の信号 $s(t)$，さらに雑音 $n(t)$ を重畳させた時，$x(t)$ は

$$x(t)=s(t)+n(t) \qquad (1)$$

で表わされる。信号 $s(t)$ を抽出するため，線形フィルタの重み $g(\tau)$ を決定したい。このためフィルタ出力は(2)式で与えられる。

$$y(t)=\int_0^{\infty} g(\tau)\,x(t-\tau)\,d\tau \qquad (2)$$

問題は $y(t)$ と $s(t)$ の平均二乗誤差を最小とするような，すなわち(3)式となる

$$\underset{\{g(\tau)\}}{\mathrm{Min}} \quad Et\left[|y(t)-s(t)|^2\right] \qquad (3)$$

$g(\tau)$ を推定したい。ここで Et は時間平均，このための必要十分条件は，(4)式のウィーナ・ホップ積分方程式を満足する $g(\tau)$ を求めることである。

$$\int_0^{\infty} g(\sigma)\,\phi_{xx}(\tau-\sigma)\,d\sigma=\phi_{xs}(\tau) \qquad (4)$$

ここで ϕ_{xx} は $x(t)$ の自己相関関数，$\phi_{xs}(\tau)$ は $x(t)$ と $s(t)$ の相互相関関数である。(2)式および(4)式の各々のフーリェ変換を行うと

$$Y(\omega)=G(\omega)\times(\omega) \quad \text{および}$$

$$G(\omega)\cdot\Phi_{xx}(\omega)=\Phi_{xs}(\omega)$$

となる。$s(t)$ と $n(t)$ の相関がないとすると

$$Y(\omega)=\frac{\Phi_{ss}(\omega)}{\Phi_{ss}(\omega)+\Phi_{nn}(\omega)}\times(\omega) \qquad (5)$$

となる。ここでウィーナ・フィルタはシステム関数でとらえ

$$H(\omega)=\frac{\Phi ss(\omega)}{\Phi ss(\omega)+\Phi nn(\omega)} \qquad (5)$$

で表わされる。ここで Walter および Nogawa のフィルタ法および Doyle のフィルタ法を検討する。観測する時系列の時間領域での N 回の加算平均後 ($\overline{x(t)}$) のパワ・スペクトルの値は

$$\Phi\bar{x}\bar{x}(\omega)=\Phi ss(\omega)+\frac{1}{N}\Phi nn(\omega)$$

で与えられる。ここで上に述べた関係式より

$$\Phi ss(\omega)=\frac{N}{N-1}\Phi\bar{x}\bar{x}(\omega)-\frac{1}{N-1}\Phi xx(\omega)$$

$$\Phi nn(\omega)=\overline{\Phi xx(\omega)}-\Phi ss(\omega) \qquad (6)$$

が得られる。(5)式の分母の $\Phi nn(\omega)$ は N 回の加算平均の後では $\Phi'nn=(1/N)\Phi nn$ により

$$H(\omega)=\frac{\frac{N}{N-1}\Phi\bar{x}\bar{x}(\omega)-\frac{1}{N-1}\overline{\Phi xx(\omega)}}{\Phi xx(\omega)} \qquad (7)$$

を得る。これを Doyle のフィルタと呼ぶ。一方

$\Phi nn(\omega)=\overline{\Phi xx(\omega)}-\Phi ss(\omega)$ より

$$H(\omega)=\frac{\frac{1}{N-1}\Phi\bar{x}\bar{x}(\omega)-\frac{1}{N-1}\overline{\Phi xx(\omega)}}{\overline{\Phi xx(\omega)}} \qquad (8)$$

を得る。これを Walter と Nogawa のフィルタと呼ぶ。(7)式は加算平均後の SN 比を改善するためのフィルタであり，(8)式は各々の誘発波へ適用されるフィルタである。

次に信号および雑音の非定常時系列へ拡張したカルマン・フィルタの一種の再帰型フィルタがある。信号となる誘発波は(9)式の計算で進められる。時刻を離散的にとるため，時刻 t＝k での信号を Sk とおくと，再帰的形式で

$$\hat{S}_{k+1}=\hat{S}_k+K_{k+1}(S_k-\hat{S}_k)$$

$$K_{k+1}=V_k(V_k+Q)^{-1}$$

$$V_k=P(P+Q/k)\,Q/k \qquad (9)$$

ここで P は S(t) の共分散行列の初期値，Q は n(t) の共分散行列の初期値である。$\hat{S}k$ は信号 Sk の t＝k での推定値を表わす。さて本研究では以下の条件でのシミュレーションを行った。

(a)誘発波……正弦波（loHz） 1 周期分で S(t)＝Ksin(ωs+Qs)，K は振

幅で0.3 3，$\omega s/2\pi = 10$Hz，Qs は位相でfixedかrandomをとる。

⑹背景脳波$_1$……非定常雑音（正弦波指数減衰）で，刺激時点 to で正弦波指数減衰をする。すなわち t＜to のとき Ksin(ωnt＋Qi)

t ＜ toのとき KSin(ωnt＋Qi)

t ≧ toのとき Kexp(-Kot)Sin(ωnt ＋ Qi)

$\omega n/2\pi = 9$Hz，K＝0.33，Ko＝0.008とした。

ここでの非定常背景雑音の条件は刺激によるαブロッキング現象を想定している。

⑹背景脳波$_2$……定常白色雑音　図1に⑷＋⑹＋⑹を示す。

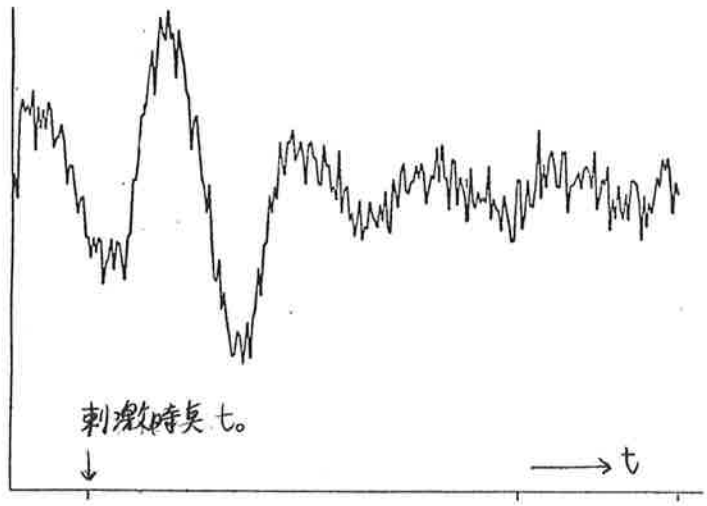


図1　誘発波＋背景非定常雑音＋背景定常雑音

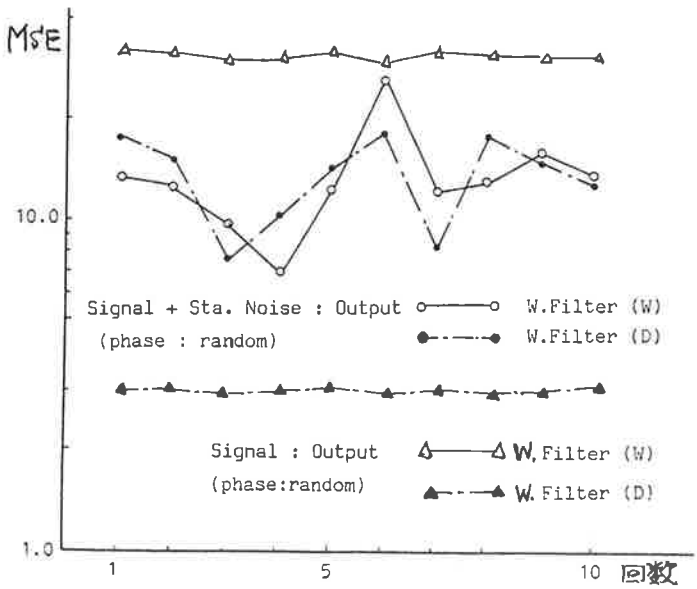


図2　Walterフィルタと Doyle フィルタの比較

図2には(7)式と(8)式を比較するため，誘発波と雑音の各々の組み合せた条件でのシミュレーションであり，たて軸が$MSE=\frac{1}{N}\sum_{t=1}^{W}(S(t)-\hat{S}(t))^2$を示す。横軸が各刺激番号を示す。定常雑音により両フィルタともほぼ同じMSEの値を示す。

次に誘発波の位相 Qs を固定した場合の加算平均(Averaging)，ウィーナ・フィルタ(Walter法)再帰フィルタ(Recursive filter)の3つの方法についてMSE値で比較した。入力条件として誘発波，背景非定常雑音および定常白色雑音を重畳した場合の結果を図3に示す。再帰フィルタのすぐれていることを示す。さらに誘発波の位相 Qs をライダムに変動させた場合の入力条件

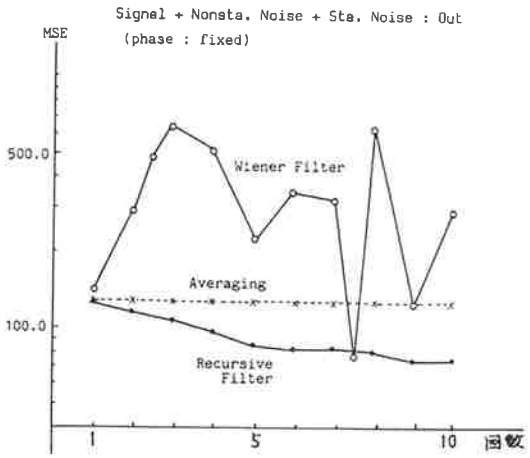


図3　誘発波＋背景非定常雑音＋定常白色雑音
(位想 Qs 固定)

でかつ図3と同じ場合，図4となる。加算平均法が非定常背景雑音等に強いこ

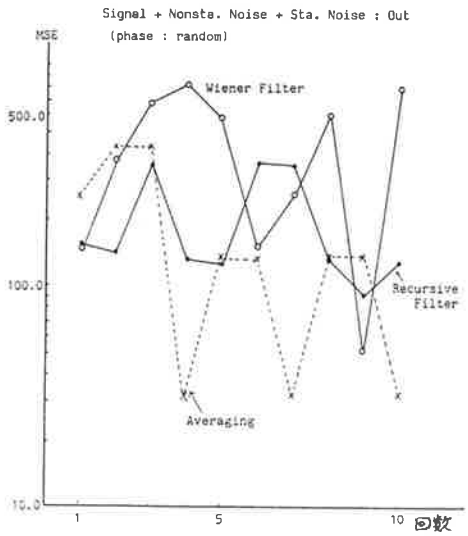


図4　図3と同じ条件
(但し　位想 Qs :ランダム)

とを示唆している。実際の誘発脳波は，図3と図4の条件の混合した場合と想定される。

受容野のパターンフィードバックによる逐次決定法

甘利　俊一（東大・工）

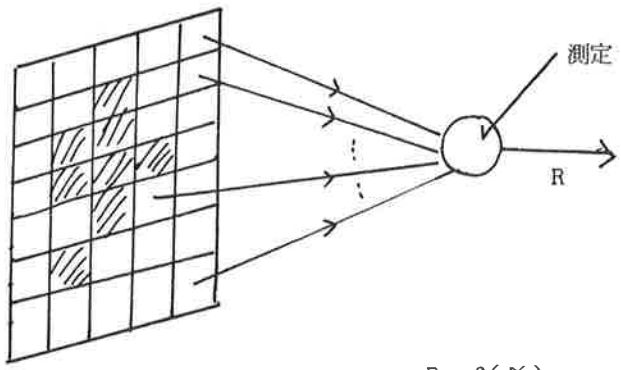
1. はじめに

最近 Harth らは[1)〜3)] Alopex(algoritim of pattern extraction)なる手法を提唱し，これを用いて視覚系の神経細胞の受容野をパターンフィードバックによって逐次的に決定している。この方法は，神経回路網の学習理論[4) 5)]と同様の方法で数学的に解析できることがわかったので，その結果を述べる。これにより， Alopex 過程の長所と欠点が明らかになる。

2. Alopex による受容野の決定

図1に示すように，視野（または対応する網膜面）を離散化して，第i番目のマス目に与えられた光の強さを x_i としよう。このとき，視野に提示された光パターンはベクトル　$\mathcal{X}=(x_1, x_2, \cdots\cdots, x_n)$ で示される。光パターン $\mathcal{X}$ が与えられたときの，ある神経細胞の反応の強さ（パルス頻度）をRとすると，Rは

(1)　$R=f(\mathcal{X})$



$R=f(\mathcal{X})$

反応

$\mathcal{X}=(x_1, x_2, \cdots\cdots, x_n)$

パターン

図1

のように書ける。とくにfが線形関数で

$$R=f(\mathcal{X})=\sum_{i=1}^{n} W_i\ x_i$$

のように書けるとき， $W_i \neq 0$ であるようなマス目を，この神経細胞の受容野

という。また，ベクトル $\mathbf{w}=(w_1, w_2, \cdots, w_n)$ を受容野ベクトルという。

Alopex 過程は次のように進行する。時間 t で持っているパターンを x_t とする。このとき，$\mathbf{n}_t=(n_{t1}, n_{t2}, \cdots, n_{tn})$ を各成分独立な白色雑音とし，x_t に雑音を加えたパターンを

(2) $\mathbf{y}_t = x_t + \mathbf{n}_t$

とし，この雑音を付加したパターン y_t を視野に提示する。このパターンに対する神経細胞の反応

(3) $R_t = f(\mathbf{y}_t)$

を測定し，時間 t＋1 におけるパターン x_{t+1} を，α を定数として

(4) $x_{t+1}=(1-\alpha)x_t + \alpha(R_t - R_{t-1})(\mathbf{y}_t - \mathbf{y}_{t-1})$

によって決定する。この過程を繰り返すと，パターン列 $x_1, x_2, x_3, \cdots\cdots$ は受容野ベルトル $\mathbf{w}$ の定数倍に収束することが，実験により確かめられた。[3)]

3. 平均化方程式と平衡状態

Alopex 過程を記述する方程式は雑音過程 $\mathbf{n}_t$ に依存するランダム方程式である。そこで，(4)の右辺第2項を $\mathbf{n}_t$ についてアンサンブル平均した決定論的方程式

(5) $x_{t+1}=(1-\alpha)x_t + \alpha\overline{(R_t-R_{t-1})(\mathbf{y}_t-\mathbf{y}_{t-1})}$

を考えると，神経回路網の解析のときに述べた論拠がこの場合にも成立し，現実の x_t は(5)の解できわめて良く近似できる。これを平均化方程式という。

平均化方程式(5)の平衡状態を x_0 とおくと，x_0 は

(6) $x_0=\overline{(R_t - R_{t-1})(\mathbf{n}_t - \mathbf{n}_{t-1})}$

を満たす。とくに，雑音は定常独立過程で

$$\overline{\mathbf{n}_t\ \mathbf{n}_{t-1}}=0$$

であることを考慮すると，

$$x_0=\overline{2\,f(x_0+\mathbf{n})\,\mathbf{n}}$$

が得られる。これを解くことによって，平衡状態 x_0 が求まる。

4. 平衡状態の安定論

平均化方程式(5)の平衡状態 x_0 のまわりでの変分方程式は

$$\delta x_{t+1}=(1-\alpha)\delta x_t + A\delta x_t + A\delta x_{t-1}$$

となる。ここに A は

$$A=\overline{\frac{\partial f(x_0+\mathbf{n})}{\partial x}\mathbf{n}}$$

という行列である。この二階の線形差分方程式は，明らかに，Ⅱを n×n 単位

行列として，2n×2n 行列

$$S=\begin{bmatrix}(1-\alpha)\mathrm{I}+A & A\\ \mathrm{I} & 0\end{bmatrix}$$

の固有値の絶対値がすべて1より小さければ安定である。

5. 線形の場合

反応を表わすfが線形 $f = {}^{t}w\cdot x$ の場合

$$\overline{{}^{t}n\,n} = \sigma^2\mathrm{I}$$

として

$$\overline{f(x+{}^{t}n)\,{}^{t}n} = \sigma^2\,{}^{t}w$$

となるから，平衡状態 x_0 は

$$x_0 = 2\sigma^2\,{}^{t}w$$

である。このとき，Aは0行列となるからSの固有値の絶対値は（$\alpha<1$ なら）1より小さく，x_0 は安定である。したがってAlopex過程で，受容野ベクトルが得られる。

6. 非線形の場合

$$f(x)=\sum {}^{1}w_i x_i + \sum\frac{1}{2}\,{}^{2}w_{ij}x_i x_j + \cdots$$

と展開できる場合は，平衡状態 x_0 は

$$x_{0i} = 2\sigma^2\left[{}^{1}w_i+\zeta\,{}^{2}w_{ij}\,{}^{1}w_j + \cdots\right]$$

のように展開できる。しかし，この方法は非線形の場合には，あまり強力とはいえない。

7. 参考文献

1) E. Harth, Biol. Cybern., 22(1976), p.169-180

2) E. Harth, E. Tzanakou, Vision Res. 14(1974), p.576-582

3) E. Tzanakou et al., Biol. Cybern.,35(1979), p.161-174

4) 甘利俊一，神経回路網の数理・産業図書，1978

5) S. Amari, Bull. Math. Biol., 42(1980), p.339-364

神経生理学の進歩（1981. 3. 23 ～ 3. 26）　　課　題　名

問田　直幹（九大）

生物科学総合研究機構研究会

課　題　名　生物科学の歩み（1981. 3. 19）

出席者

内薗　耕二（生理研）
桑原萬壽太郎（基生研）
冨田　恒男（慶応大）
名取　礼二（東京慈恵医大）
岡　　小天（循環器病センター）
柴田　俊一（京大原子炉）
柴田　承二（明治薬科大）
中馬　一郎（大阪大医）
石塚　直隆（名大）
吉村　寿人（神戸女子大）
川上　正澄（横浜市大医）
青木　　健（東北大歯）
飯島　宗一（名大医）
岩間　吉也（大阪大医）
村田　計一（東京医歯大難研）
柳沢　慧二（鶴見大歯）
橋本　葉子（東京女子医大）
久野　　洋（慶応大工）
青木　　清（上智大生命研）
上田　一夫（東大理）
酒田　彦一（　〃　）
吉田　正夫（岡山大理）
山口　恒夫（　〃　）
木村　英一（大阪市大）
田崎　京二（東北大医）
塚田　裕三（慶応大医）
浜　　清（東大医科研）
高木　貞敬（群馬大医）
福田　邦三（東大）
長島　長節（　〃　）
伊藤　正男（東大医）
井上　　章（京大）
相馬　駛量（岡崎市民病院）
高島　常二（愛知病院）
冨田　　稔（冨田病院）
竹内　　宏（岐阜大医）
久田　光彦（北大理）
丸山　工作（千葉大理）
渋谷　達明（筑波大）
原　　富之（大阪大理）
吉沢　　透（京大理）
江口　英輔（横浜市大文理）
久保田　競（京大霊長研）
団　　勝磨
赤堀　四郎

挨拶　　桑原萬壽太郎（基礎生物学研究所）

マイクロフォン電位の成因について　　勝木　保次（生物科学総合研究機構）

細胞分裂と私　　団　　勝磨（東京都立大学名誉教授）

私の研究遍歴 — 聴覚から視覚へ —　　冨田　恒男（慶応義塾大学名誉教授）

筋生理の思い出　　名取　礼二（東京慈恵会医科大学）

原形質流動のしくみ　　神谷　宣郎（基礎生物学研究所）

挨拶　　内薗　耕二（生理学研究所）

総合討論

司会　　内薗　耕二

生理学研究所年報　第２巻

印　　刷　昭和５６年８月２０日
発　　行　昭和５６年８月２５日

編集者代表　金　子　章　道

発 行 者　岡崎国立共同研究機構
生　理　学　研　究　所

〒444　岡崎市明大寺町字西郷中３８
代表電話：岡　崎〈0564〉５２－９７７０