

岡崎国立共同研究機構

生理学研究所年報

第 3 卷



1982

巻 頭 言

研究所創設5年目に当り、研究所年報

第3巻を送る

昭和52年の創設から数えて本年で当研究所は早くも5ケ年の春秋を送り迎えた。5年前から夢に描きつづけてきた研究所の建築も今や大方完成の域に近づきつゝある。生理学専門の研究所としては、内外のいずれの研究所に比して見おとりしないものとなった。しかし一方では研究者、技術者の定員の充足率は60%程度で、充足率100%の時代を迎える日は必ずしも近くないように思われる。先進諸国では競って政府は身軽になろうとしている。我が国でも公務員の定数削減が行われている。

従って公務員の身分をもった研究者や技術者が予定のペースで充足されることは期待されない。

我々はしかし建築の完成や定員充足の日まで、じんぜんと徒らに待つものではない。すでに発足当時の昭和52年から、萌芽的姿勢の研究は着々といわれていたのである。当研究所の研究者は創設途上の悪環境を意に介せず、着々と研究の基礎づくりに励んできたのであった。

定員の絶対数は比較的少数とはいえ、共同研究者、受託大学院生その他を合せると、ほぼ100名の研究者、技術者が常時当研究所に滞在していることになる。

さて、研究所における研究はいかにあるべきであろうか。創設計画の極く初期の頃から、関係者のコンセンサスとして認められていたことは、生理学研究所では他の国公立の大学等で実現困難な研究に挑戦するということであった。先づ大学では教育という重大な本来の目的がある。次の時代の文化の担い手を養成するという社会的な重責が先づ第一に大学に課せられている。……………従って大学においては本来教育が主であって、研究は教育のための二義的なものとされることがすらあった。

否、人によっては教育という労働への代償として研究の自由があたえられているとする考え方すら存在しているのである。研究所にお

ける研究は大学のもつ教育の重責から解放された研究者に、十分な研究を行わせることを第一義にしている。研究所の存在理由はこの外の何ものでもない。

研究所における研究は何よりも萌芽的なものでなくてはならない。完全な自由のもとに行う前人未踏の文化の創生につながるものでなくてはならない。単なる技術の導入や、本邦初演的追試研究では意味がない。

明治以来 100 年を経て、日本は今や欧米諸国と肩をならべる文化国家に成長した。産業においては欧米の心胆を寒からしめるていの発展がもたらされた。民間企業における存立を常にかけた努力の精進のためのものであろう。

国家の強い庇護のもとにある国立研究所に職を奉ずるものとして、産業界の発展に比しておくれをとる現状を認識して、自戒のかてとしたい。

昭和 57 年 5 月 12 日

所長 内 蘭 耕 二

主 な 職 員（昭和56年度）

所 長 内 蘭 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
助 手 福 島 義 博

機能協同研究部門

教 授 渡 辺 昭
助 教 授 寺 川 進
助 手 中 山 孝
" 星 野 稔

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 伸 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
客員助教授 宮 田 雄 平

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
" 亀 山 正 樹

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

超高压電子顕微鏡室

助 教 授 有 井 達 夫

組織培養標本室

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

池 田 明 聡

山 崎 由美子

山 下 幸 子

千 馬 真理子

小 滝 る り

勝 丸 博 信

前 橋 寛

細 野 道

畑 口 吉 弘

小 原 正 裕

永 田 治

伊 藤 昭 光

津 島 由 彦

稲 田 和 久

大 庭 明 生

加 藤 勝 巳

非 常 動 講 師

坂 口 博 信

特 定 領 域
奨 励 研 究 員

藤 田 省 三

特別協力研究員

Wolfgang Osterrieder

松 田 博 子

中 国 政 府 派 遣
進 修 生

楊 雄 里

文 部 省
外 国 人 研 究 員

Andrew T. Ishida

Martin Morad

学 術 振 興 会
外 国 人 研 究 員

L. E. Lipetz

S. N. Ayrapetyan

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	58
生理機能研究施設	67
動物実験施設	70
研 究 員	72
技 術 課	76

研 究 活 動

論 文	77
学 会 報 告	98

共 同 研 究 報 告

昭和 56 年度	108
----------------	-----

研 究 会 報 告

昭和 56 年度	145
----------------	-----

部 門 別 研 究 の 概 要

分子生理研究系

本研究系では生理機能の分子レベルでの解明を目的としている。本研究系は超微小形態生理部門と細胞内代謝研究部門より構成されている。

研究の概要

《超微小形態生理部門》

本部門での活動は分子集合による生理機能発現機構の研究と脳内活性物質に関する研究を行っている。前者はフラビン酵素であるD-アミノ酸々々化酵素の研究および生体内の燐化合物の消長と生理機能との関連を検索することによって行われるものである。D-アミノ酸々々化酵素の研究についてはD-アミノ酸々々化酵素とは異った分子種であるQuasi-D-アミノ酸々々化酵素を見出したことおよびこの酵素のアミノ酸組成の検討を行ったところ、分離精製の段階で生じたものでなく、アイソザイムとして存在することを明らかにしたものであって、本部門の報告にのべる。このようなアイソザイムの発見によって酵素基質複合体の研究には異なる形の酵素が得られたので研究の進展が期待される。生体内燐化合物の消長と生理機能との関連については、共同研究の「核磁気共鳴による細胞内分子の動態の研究」および「 ^{31}P -NMRによる筋収縮エネルギー利用の研究」においても報告する。

広径試料管を用いた ^{31}P -NMRによる生体組織燐化合物の観察

研究課題

亘 弘, 志賀 潔, 二科 安三

まえおき

生体の組織は種々の機能を持ち、これの集合した器官では独立した生理機能を示す。この生理機能にはエネルギー消費をとまっているが、器官でのエネルギー修復機構が問題となる。たとえば筋の収縮はATPの分解によって力学的エネルギーを得ているがその補給の問題、また消化管や腎における大量の水の吸収や分泌はイオンの能動輸送により浸透圧差が作られる結果として起る水の移動現象であるが消費したATPの再成の問題がある。個々の生理現象にとりなうATPの利用については生化学的によく研究されているけれども、器官として見たときのエネルギー代謝の知見は欠けている。このため無侵襲計測に

よる燐化合物の動態が知らねばならないが、これには ^{31}P -NMRの適用が考えられる。問題点として、Ⅰ) 生体中の燐化合物は細胞膜を構成する燐脂質とエネルギー代謝に関係するATP, ADP, クレアチン燐酸, 糖, 燐化合物, NAD^+ , NADH などがある。前者は運動性が悪く緩和時間が短いので両者の分離は可能である。Ⅱ) 生体組織中のエネルギー代謝に関係する燐化合物の濃度は骨格筋を除き数 mM であり組織での反応は時間分解測定によらねばならないが、測定にあたっては量的に多くすると共に感度も高くしなければならない。Ⅲ) 組織や器官では酸素の供給がないと活動を停止するので動静脈へのinfusionや組織の場合perfusionを行う必要がある。

研究結果

Brucker WM-360wbを使用した。30mmφの広径試料管の使用できるプローブを装着した。これは ^1H のdecouplingも温度制御も不可能である。90°パルスの測定にあたって、パルス巾を200 μsec まではFIDは大きくなるがこれ以上は飽和する傾向にある。0.1Mのスピンニングをした時、燐酸緩衝液の線巾は1~2Hzが得られ、測定可能な容量は35mlである。イヌ顎下腺は鼓索神経刺激(Ach投与)により大量に唾液分泌を起す(0.6ml/分/g腺重量)。これに伴い腺の代謝量も増加し、熱測定法から静止時、約8mW/gのものが分泌時、約60mW/gにまで上昇する。また分泌時には酸素消費、二酸化炭素産生も7~8倍増加し、産熱増加と対応する。唾液分泌の本態はイオン能動輸送に伴う浸透流と考えられ、分泌時7~8倍にも増加した代謝エネルギーは主にイオン能動輸送系にATPの形で供給されNa-K ATPaseなどで消費されると予想される。イヌはチオペンタールによる静脈麻酔下で両側の顎下腺(それぞれ約6g)を灌流できるように手術した。灌流液はPVP(ポリビニールピロリドン)5%を膠質浸透圧維持のため添加したKrebs Henseleit Ringer(Na^+ : 151, K^+ 4.3, Ca^{++} 2.5, Mg^{++} 1.0, Cl^- 136.3, HCO_3^- 25, H_2PO_4^- 1.0, glucose 5mM, pH7.5, PVP 5%)を95% O_2 , 5% CO_2 の混合ガスを飽和させて用いた。刺激にはAchを 10^{-6} M加えたKH Ringerを流した。灌流は定流ポンプを使用し、約1ml/分/gの流送を用いた。分泌唾液は道管に挿入したカニューレを介して分泌を確認した(図1)。灌流は30mmφの試料管内で行い、静脈側よりの流出灌流液は吸引により外部へ排除するようにしてある。

先ずRinger液のみを試料管に灌流させて無機燐の測定を行ったが、1,000回約20分の積算で5.1ppmの信号を得たが、このRinger液のpHは7.6で

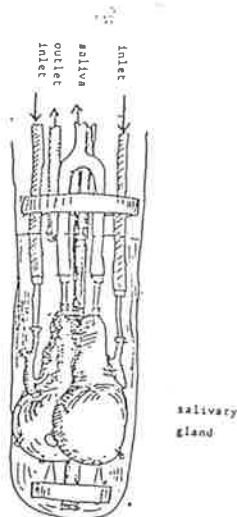


図1. 大唾液腺のNMR
試料管 (30mmφ)
への装着図

あった。次に一箇の唾
液腺 (顎下腺) の灌流
を行いつつ測定 (1,000

回, 20 分) したのが

図2である。この結果

クレアチン磷酸と思わ

れる吸収を0 ppm と

したとき, 6.5, 6.0,

4.7, 3.0, 0, -3,

-8, -10, -17ppm の部位に吸収が認められた。4.7ppmのものは無機磷

であり, 第1と第2磷酸イオンのpKを6.85 とするとき, pHが6.85 とし

て計算される。この値は低いのでpKについての検討を要する。6.5と6.0ppm

のものは糖磷化合物の fructose-1, 6-diphosphateであろう。

3 ppmのものは Glycerol phosphoryl choline あるいは

Glycerol phosphoryl ethanolamineである。ATPの α , γ ,

β 位の磷はそれぞれ-3, -8, -17ppmであり, ADPの α , β 位のもの,

-3, -8 ppmである。また NAD^+ , NADH の磷は-8 ppmの吸収に含ま

れる。-10ppmのものは NADH^+ , NADPH のものであろう。このように

組織の ^{31}P -NMR測定で NADP^+ , NADPH の検出が可能になったもので,

さらにS/Nの向上があれば代謝の研究に貢献するものと思われる。

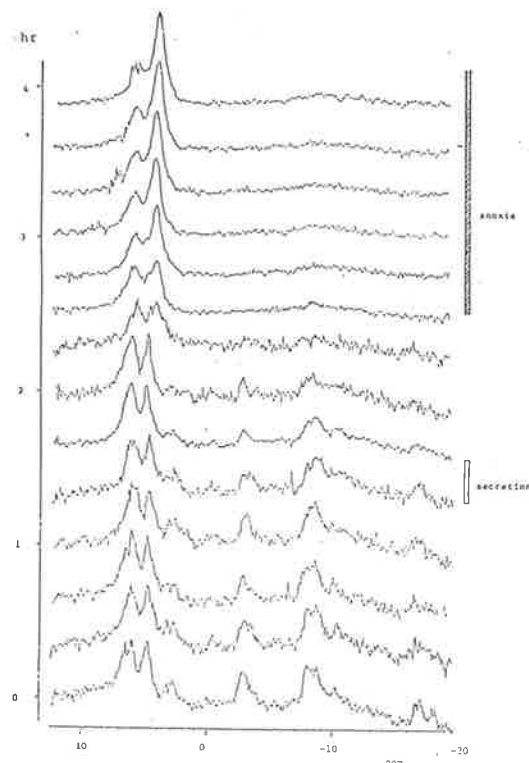


図2. 唾液腺 (10g) の ^{31}P -NMR スペクトル
灌流開始後 20 分ごとのスペクトルを示す。
アセチルコリンを投与したスペクトルは
secretion で示してある。また灌流
停止は anoxia で表してある。スペクト
ルの同定は本文中に示す。

アセチルコリンを加えた Ringer で灌流すると無機リンの吸収が上昇し、ATP の吸収および ADP の吸収が低下した。また糖リン化合物がやや増加した。唾液分泌は導管破損で外部に唾液を導けず確認できなかった。アセチルコリンぬきの Ringer で再び灌流を行ったが ATP, APP とともに元のレベルにまでは回復しなかった。また 4.5 ppm に別の吸収があらわれるが、これは無機リンのものである。このことは唾液腺中で部位の異ったところに別の pH のあることが示される。イヌ顎下腺の分泌時、酸素消費量は高く Ringer に飽和した。O₂ のみでは不足気味である。代謝量が 7~8 倍になる分泌時には cell 内の ATP および CP は消費され、無機リンの増加があったのは O₂ が不足気味であったことと、解糖ではそれを代償できなかったことを示唆している。灌流液を停止すると ATP, ADP, NAD⁺, NADH, NADPH の吸収は全く見られなくなる。これらのものが分解されるのは細胞が全く破壊されていることを示すものと思われる。なお 3 ppm の信号はアセチルコリン投与後消失する。外分泌腺でアセチルコリンの投与が膜の磷脂質の turn over を促進するという報告は外分泌が Exocytosis の存在から理解できるが、Glycerol phosphoryl choline や Glycerol phosphoryl ethanolamine の消失が膜と関連するか否かは検討課題であろう。

これは大阪医科大学、村上政隆、今井雄介、京都府立医科大学、瀬尾芳輝との共同研究によって行ったものである。

研究課題 D-アミノ酸酸化酵素における分子多様性について

志賀 潔, 二科 安三, 亘 弘

研究目的 D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) は約 50 年前に Krebs により発見されたフラビン酵素でありその生理作用としては thiagolidine-2-Carboxylic acid (これは生体にあつては cysteamine と glyoxalate の反応生成物として得られる) の酸化反応を触媒するものと考えられている。

DAO 自身の生理作用の研究とは別に本酵素はフラビン酵素一般、特に oxidase 酵素の代表例として、反応機構等の研究のためにもっとも頻繁に用いられてきた酵素として有名である。

最近我々は本酵素の精製過程で明らかに DAO とは異った分子種であるが機能的には極めて類似した新しいフラビン酵素 (Q-DAO) を発見した。量的

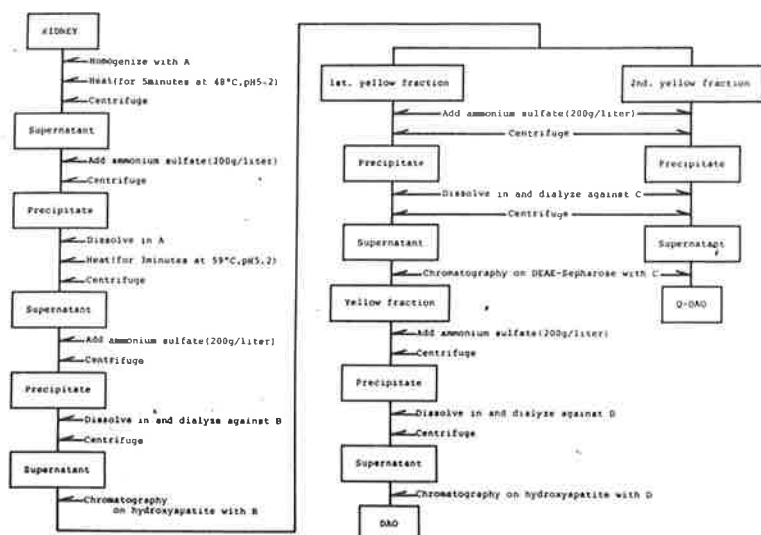
にはQ-DAOはDAOの半分程度も存在するので、Q-DAO も又DAO と共にフラビン酵素の機能と構造の研究のためのよい材料となるものと考えられる。今回我々は豚腎を用いてDAOとQ-DAO を分離精製する方法を確立し、得られた両酵素のアミノ酸組成を比較検討した。

(1) DAOとQ-DAOの精製

研究経過・結果

図1には両酵素の精製過程が示されている。図中Aは1/60M ピロリン酸緩

(図1 DAOとQ-DAOの精製過程)



衝液 (pH 8.3, 3 g/liter の安息香酸ナトリウムを含む) を、B は 0.02 M 磷酸緩衝液 (pH 6.7, 3 g/liter の安息香酸ナトリウムを含む) を、C は 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0, 125 mM KCl と 300 μ M 安息香酸ナトリウムを含む) を示す。

(2) DAOとQ-DAOのアミノ酸組成の比較

酵素-安息香酸複合体を 110°C で 6 N HCl を用いて加水分解し、日立 855 アミノ酸分析器によりアミノ酸組成を決定した。酵素-安息香酸複合体の濃度は分光的に $\epsilon_{463\text{nm}} = 11,300\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ の分子吸光係数を用いて決定した。Cysteine 量は 8 M 尿素存在下で DTNB による滴定により決定し、tryptophane 含量はアボ蛋白を用いて MCD 法により求めた。その時蛋白量は Lowry 法により算出している。表 1 には両酵素のアミノ酸組成が示されている。

両酵素のアミノ酸組成は極めて類似しているが、methionine と pro-

line の含量は明らかに互いに異っている。即、DAO においては 1 分子当

(表 1, アミノ酸組成)

Hydrolysis		Amino Acid																	
(hours)		Lys	His	Arg	Trp	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe
Q-DAO	24	11.6	7.7	21.6		31.9	20.5	11.5	36.1	20.3	33.5	17.8	4.6	23.0	4.2	15.3	32.9	13.9	15.3
	24	11.6	7.7	21.8		32.2	20.8	11.7	36.5	19.8	33.6	17.9		23.0	4.0	15.5	33.0	14.0	15.3
	48	11.7	8.0	21.9		32.1	20.2	10.7	36.6	20.1	33.9	18.0	4.9	24.9	4.0	17.7	33.4	14.1	15.3
	48	11.6	8.0	22.1		32.1	20.2	10.7	36.6	19.4	33.9	18.0		24.9	4.0	17.8	33.4	14.1	15.4
	72	10.9	8.0	22.2		30.1	18.2	9.1	34.6	18.7	32.3	17.0		24.8	4.0	18.8	32.9	14.1	15.1
	Average or extrapolated	11.5	7.9	21.9	6.8	31.7	22.1	13.2	36.1	19.7	33.4	17.7	4.8	24.9	4.0	18.1	33.1	14.0	15.3
	** ±	0.4	0.2	0.3	0.6	1.1	0.0	0.0	1.1	0.8	0.8	0.5	1.9	0.9	0.1	0.1	1.5	0.3	0.1
DAO	24	11.5	7.7	21.9		31.7	21.3	11.7	36.3	22.7	35.0	17.9	4.6	23.6	5.0	16.0	34.5	13.6	15.2
	24	11.5	7.7	21.8		31.9	21.6	11.9	36.6	21.9	35.2	18.0		23.8	5.1	16.0	34.5	13.6	15.2
	48	11.3	7.7	21.1		30.9	20.2	10.5	35.6	21.6	34.3	17.6	5.1	24.1	4.9	17.4	33.8	13.5	14.7
	48	11.3	7.7	21.3		31.2	20.3	10.6	35.9	22.2	34.6	17.6		24.3	4.9	17.5	34.1	13.6	14.8
	72	11.1	7.7	21.1		31.4	19.9	9.9	35.5	22.2	34.3	17.3		24.6	4.9	17.8	33.5	13.5	15.0
	Average or extrapolated	11.3	7.7	21.4	7.2	31.4	22.2	12.8	36.0	22.1	34.7	17.7	4.9	24.3	5.0	17.6	34.1	13.6	15.0
	** ±	0.2	0.0	0.5	0.1	0.5	0.0	0.0	0.6	0.5	0.5	0.3	3.1	1.2	0.6	0.1	0.5	0.5	0.1

り 5 分子の methionine, 22 分子の proline が含まれているのに対し, Q-DAO においてはそれぞれ 4 分子と 20 分子となっている。

又 N 末端アミノ酸残基は両酵素とも methionine, C 末端残基は leucine であった。

考

察

これらの結果を用いて以下の理由により Q-DAO は DAO の N あるいは C 末端近傍の加水分解により得られるものではない事, 即 Q-DAO と DAO は自然に存在するアイソザイムである事が結論された。

(1) DAO において N 末端の methionine と次の methionine の間には約 80 個のアミノ酸が存在している事が知られている。加水分解により DAO の二番目の methionine が Q-DAO の N 端アミノ酸となっていると考えるには両者の分子量の差 (約 1,000 程度) が小さすぎるし, 又アミノ酸組成も類似しすぎている。

(2) DAO の C 端アミノ酸からの配列は -Ser-His-Leu である事が知られている。両酵素とも C 端は leucine でありかつ histidine および serine の個数は同じである。従って C 末端近傍での加水分解により DAO が Q-DAO に変換したとは考えられない。

脳内活性物質の抽出・精製及び合成

研究課題

東 晃史

脳の有する高次の中枢機能については電気生理学的側面からのアプローチが着実に成果を積み重ねている点において現代の研究の主流であるといつて過言ではない。一方これに比して物質レベルに照準を定めてスタートする研究は、歴史的にいくつかの金字塔を構築してはいるものの、未だ生命科学の歴史にさん然と輝く高名な科学者によって予言されている数々の可能性の中のほんの一握りの部分を実証したにすぎない。その意味では物質レベルからの研究はほとんど未開拓の状況にあると言ってもさしつかえないであろう。

研究目的

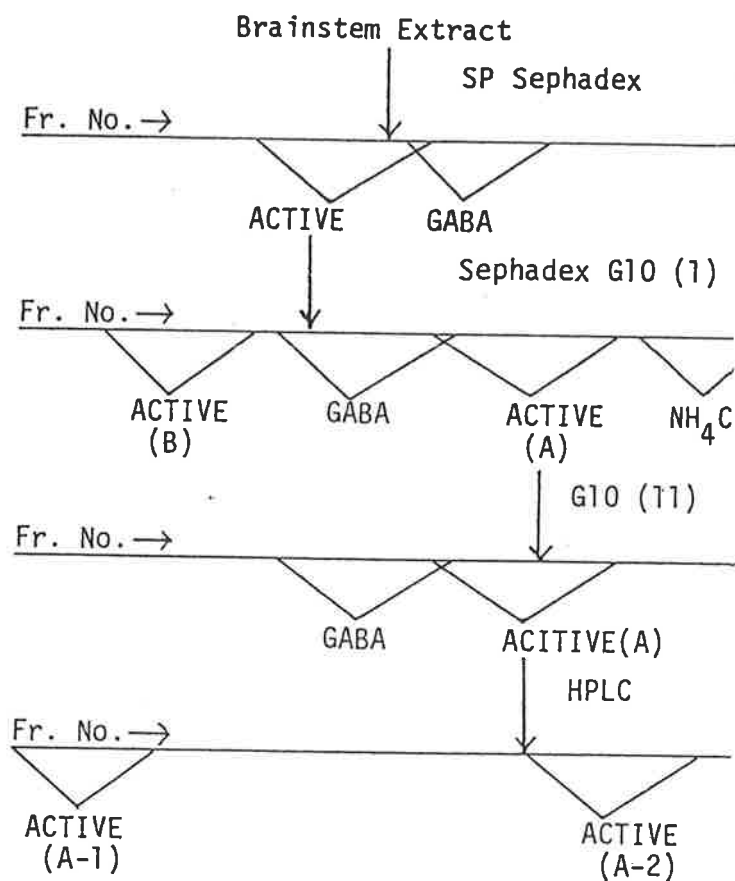
本研究は脳の高次中枢神経機能に関連する物質、すなわち脳内活性物質について理工学的・生態学的立場から総合的に解明することを目的としている。本研究は多年にわたり脳内活性物質の1つとして存在が予想されている徐波睡眠促進物質について基礎的研究を積み上げ、その物質の単離と構造決定をめざし、さらに合成手段により大量の活性物質を得ることによって睡眠現象全般の生理学的機序を解明することを当面の具体的目標としている。

図1はラットの脳幹抽出物の精製過程における活性フラクションの相対的溶出位置を示している。粗抽出物の作成・精製の条件・生物検定等の研究の方法に関しては生理学研究年報第1巻(1980年)に詳説されている。現状においても大きな変更はない。粗抽出物のSP Sephadex 処理によりGABAの直前に活性フラクションが溶出され、Sephadex G10 処理により、GABAの前後に2つの活性フラクションAおよびBが溶出される。活性フラクションAに関してはHPLC 処理によりさらにA-1およびA-2の2カ所に活性が認められる。活性フラクションA-1には徐波成分(SWS)のみならずREM睡眠も誘発する傾向がみられるのに対し、A-2フラクションはSWSのみを誘発する傾向がある。しかしながらA-1およびA-2の両フラクションに関して未だ分子構造は決定されていない。一方活性フラクションBはSephadex G10 処理レベルでSWSおよびREM睡眠の両現象に対して誘発効果を有することが確認されているが、現状では未だ粗抽出物のレベルに近い。

研究経過

本研究では過去8年間活性フラクションAに対して精力的に生物検定が行われてきたため、粗抽出物の残存量が少なく今後の研究発展の展望は悲観的であるが、逆に活性フラクションBは現状まで蓄積されてきた粗抽出物が豊富にあ

ることと、活性フラクションAを探索する過程で試行錯誤的に蓄積されてきた多様な生物検定の手法が類型化され整理され、状況に応じて使い分けることが可能になったことにより、今後急速な展開が期待される。



《細胞内代謝部門》

ヒト神経芽細胞腫培養細胞系におけるVIPの生合成とその放出

矢内原 昇, 鈴木 利光, 佐藤 晴子, 星野 稔

生理活性ペプチドに関する免疫化学的, 生化学的研究の発展にともない数多くのペプチドが脳と腸管にともに存在することが示され, これらは脳-腸管ペプチドと呼ばれるようになった。Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) もその一つである。28 アミノ酸残基よりなる本ペプチドは血流増加, 血圧低下など血管系に対する作用の他, 平滑筋弛緩, 膵液分泌促進などの作用を有し, 最初 Said, Mutt¹⁾ によりブタ十二指腸から単離されたが, その後, 消化管の神経線維²⁾のみならず脳, 唾液腺, 性尿管その他の神経組織にも広く分布していることが明らかにされ, 現在では神経ペプチドとして有力な神経伝達物質候補の一つとなっている。ペプチドホルモンは細胞内において大分子型不活性前駆体のプロセッシングにより生成, 放出されることが知られているが, 脳-腸管ペプチドの生合成機構に関してはいまだ十分な知見は得られていない。先に, われわれはヒト神経芽細胞腫培養細胞NB-1にVIP免疫活性を認め, このVIP免疫活性が, VIP-28のみならず大分子型成分も含むことを明らかにした。³⁾ さらに dibutyril cAMP [(But)₂ cAMP] の添加により免疫活性が顕著に増加することを示した。これらの知見は本培養系がVIP生合成過程の解明のためのモデル実験系としてもちい得ることを示唆するものであった。本年度は本研究室において継代培養した, 先のNB-1と同系のヒト神経芽細胞腫培養細胞NB-OK-1をもちい, VIPの生成と放出につき免疫化学的検討をおこなった。⁴⁾

ヒト神経芽細胞腫培養細胞NB-OK-1は10%牛胎児血清を含むRPMI-1640培地をもちい, 5% CO₂ 含有湿度100%空气中37℃で培養した。細胞中VIP免疫活性の抽出には熱0.1 M酢酸をもちいた。VIP特異ラジオイムノアッセイは家兔抗合成VIP血清R 502をもちい2抗体法によりおこなった。⁵⁾ 細胞抽出物のゲル濾過は3 M酢酸を溶出液とする。Sephadex G50(superfine)カラムでおこなった。免疫組織化学実験では細胞をBouin液で固定し70%

実験材料および
方 法

アルコールで洗浄，風乾後，間接免疫蛍光法により染色した。

Table 1. Immunohistochemical Detection of Peptide Immunoreactivities in NB-OK-1 Cells

Peptide	Antiserum used	Immunogen	Cells stained
VIP	R501	Synthetic VIP (porcine)	+
	R502	Synthetic VIP (porcine)	+
Neurotensin	R3502	Synthetic neurotensin	—
Substance P	R2404	Synthetic substance P	—
Motilin	MBR-02	Synthetic motilin	—
	R1104	Synthetic motilin	—
	R1105	Synthetic motilin	—
Gastrin	R1301	Synthetic gastrin (human)	—
Somatostatin	MI-S	Synthetic somatostatin	—
Glucagon	MI-G	Natural glucagon	—
ACTH	MI-A	Synthetic ACTH (1-24)	—
β -Endorphin	MI-E	Synthetic β -endorphin (human)	—
PP	MI-P	Natural PP (porcine)	—

実験結果

NB-OK-1 培養細胞につき各種神経ペプチド抗血清をもちい免疫組織化学的に検討した結果，表 1 に示すごとく V I P を除き他は全て陽性細胞を認めなかった。(But)₂cAMP の添加により細胞は軸索突起の伸展，細胞体，核の肥大等の形態学的変化を示したのみならず，V I P 陽性細胞の含有率が増

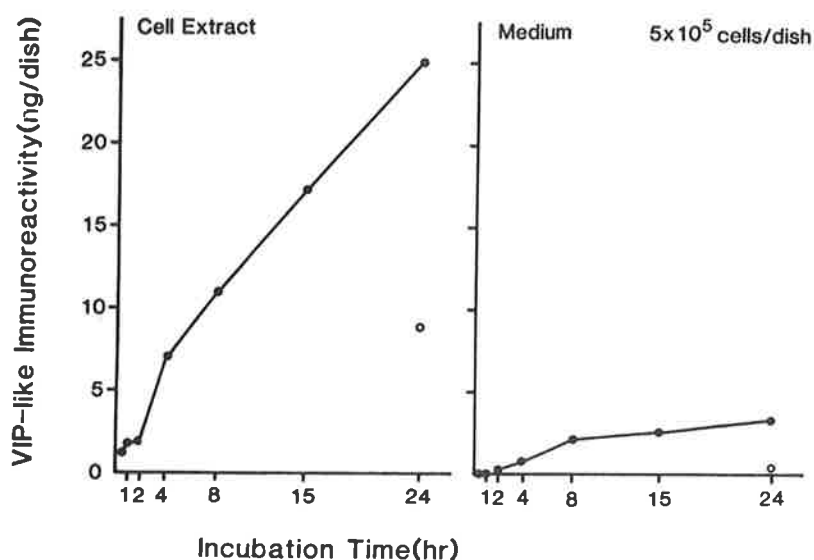


Fig.1. Time-dependent increase of VIP-like immunoreactivity in NB-OK-1 human neuroblastoma cell extracts and the cultured media: cells cultured in the absence (○) or presence (—●) of 1 mM (But)₂cAMP

加した。すなわち培地中に1mM (But)₂cAMPを添加することにより72時間後、含有率は無添加対照群0.7%に対し、18.6%となった。なお、この(But)₂cAMP添加による陽性細胞の増加はcycloheximideの共存により抑制された。

細胞抽出物ならびに培地中のVIP免疫活性も(But)₂cAMP添加により著しく増加した。1mM(But)₂cAMP添加による抽出物および培地中VIP免疫活性の経時的な増加を図1に示したが、対照群に比しその差は顕著であった。一方、1mM dibutyryl cGMPはVIP免疫活性の増加に対し有意な促進効果を示さなかった。

NB-OK-1細胞中VIP免疫活性成分の存在様式をゲル濾過によって検討した結果、VIP-28(図2-a, C)の他に2つの大分子型免疫活性成分(AおよびB)が確認された。さらに、これら3成分は1mM(But)₂cAMP

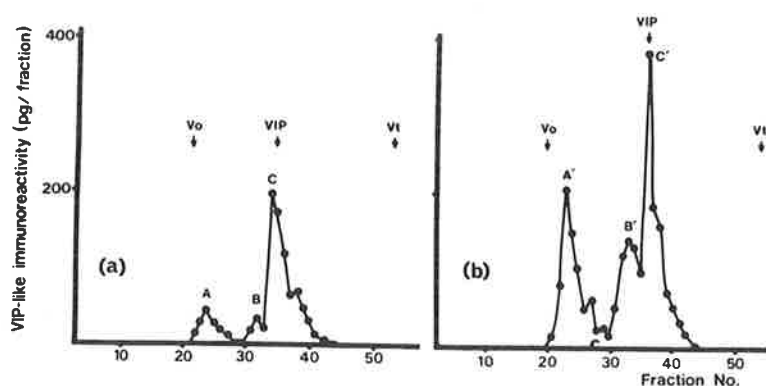


Fig. 2. Gel filtration profiles of VIP-like immunoreactivity in extra of human neuroblastoma NB-OK-1 cells cultured in the absence (a) presence (b) of (But)₂cAMP

Table 2. Increase in Three Components of VIP-immunoreactivity in NB-OK-1 Cells by Addition of (But)₂cAMP

Peak	Integrated VIP-immunoreactivity (pg eq)	Increase (fold)
A	90.8	7.85
A'	713.0	
B	40.0	12.9
B'	515.5	
C	435.0	2.20
C'	958.0	
A+B+C	565.8	3.86
A'+B'+C'	2,186.5	

添加によりいずれも増加(図2-b, $\dot{A}$, $\dot{B}$ および $\dot{C}$)したが, 大分子型成分AおよびBのそれぞれ $\dot{A}$ および $\dot{B}$ の増加がVIP-28成分Cの $\dot{C}$ へのそれに比し大であった(表2)。この結果は(But)₂cAMPがNB-OK-1細胞内の大分子型VIPの産生をより強く促進することを示すものであった。

一方, ヒト神経芽細胞腫培養細胞NB-1をもちい〔³⁵S〕-Met 取り込み実験より, VIP免疫活性成分の生合成過程を検討した結果, VIP-28はMr 17,500の前駆体から生成されることを明らかにした⁶⁾またNB-1細胞から分離したpoly(A)含有RNAをもちいVIP mRNAの翻訳生成物を検索し, それがMr 20,000のたんぱく質であることを示した。

結 論 本研究においてヒト神経芽細胞腫培養細胞NB-OK-1が多くの神経ペプチドのうちVIPのみを特異的に産生し, (But)₂cAMPは, 本培養細胞の形態学的分化を促進するのみならず, VIPの産生, 放出を著しく増大させることを免疫化学的手法により初めて明らかにした。また, このVIP免疫活性成分が, VIP-28のみならず2種の大分子型成分を含み, (But)₂cAMPはこれら大分子型成分の生成に, より強い促進効果を示すことを明らかにした。同系の培養細胞NB-1の実験結果と合わせ, VIPが大分子型前駆体のプロセッシングにより生成されることが明らかとなった。さらに本培養系NB-OK-1において(But)₂cAMP刺激により大分子型VIPの生成が著しく増大したことから, 現在本培養細胞をもちい, ヒトVIP前駆体の単離とその化学構造の解明を目的として研究を進めている。

- 文 献**
- 1) Said, I., and Mutt, V., Science 169:1217, 1970.
 - 2) Yanaihara, C., Sakagami, M., Mochizuki, T., Sato, H., Yanaihara, N., Iwanaga, T., Fujii, S., and Fujita, T., Biomed. Res. 1:449, 1980.
 - 3) Yanaihara, N., Kobayashi, S., Sato, H., Yanaihara, C., Sakagami, M., Sakura, N., Hashimoto, T., Ishikawa, S., Iwanaga, T., and Fujita, T., Endocrinol. Japon. (Suppl. 1)37, 1980.
 - 4) Yanaihara, N., Suzuki, T., Sato, H., Hoshino, M., Okaru, Y., and Yanaihara, C., Biomed. Res. 2:728, 1981.

- 5) Yanaihara, N., Sakagami, M., Sato, H., Yamamoto, K., Hashimoto, T., Yanaihara, C., Ito, Z., Yamaguchi, K., and Abe, K., *Gastroenterology* 72:808, 1977.
- 6) Obata, K., Itho, N., Okamoto, H., Yanaihara, C., Yanaihara, N., and Suzuki, T., *FEBS Lett.* 136:123, 1981.

ラット膵灌流におけるアルギニン刺激放出グルカゴン様免疫活性の分子型について

神村 匡, 矢内原 昇

膵グルカゴンは大分子型前駆体であるプログルカゴンのプロセッシングにより生成するものと推定される。免疫組織化学的研究および特異的ラジオイムノアッセイ (RIA) により、膵には膵グルカゴン型とグリセンチン型免疫活性が共存することがわかり、膵グルカゴンと腸管グルカゴンの一つであるグリセンチンは共通の前駆体から生成することが示唆された。^{1~3)}

本研究はラット膵灌流標本を用い、アルギニン刺激放出グルカゴン様免疫活性の分子型を詳細に検討し、グルカゴンの生合成過程について情報を得ることを目的としている。

RIA系：グルカゴン様免疫活性は3種類の特異性が異なる抗血清を用いるRIA系によって測定した。用いた抗血清は膵グルカゴンに特異的なグルカゴンC末端特異抗血清OAL-123、膵および腸管グルカゴンに反応するグルカゴンN末端特異抗血清GA10、ならびにグリセンチンC末端に特異的な抗血清R-4804である。抗血清R-4804は膵グルカゴンとは殆んど反応しないことが知られている。⁴⁾

研究 方 法

膵灌流：自由摂食のウィスター系雄性ラット (250-350g) を用い、Grodsky⁵⁾の方法に準じ、ペントバルビタール60mg/kgを腹腔内注射し、麻酔後、膵を摘出し灌流標本とした。灌流液は2mMグルコースと4%デキストランT70を含むKrebs Ringer bicarbonate緩衝液 (pH8.0) を用い、95%O₂、5%CO₂の混合ガスに通気させ、最終的にはpH7.4に調製した。標本が安定するまで約15分灌流した。アルギニン刺激の場合はアルギニン塩酸塩を上記緩衝液に溶解し、インヒュージョンポンプにて流量0.12ml/minとして側注した。アルギニンは最終濃度10mMとなるように調整した。膵を灌

流した液はアプロチニン 1,000 単位をあらかじめ添加した試験管に1分ごとに採取し、測定まで -20°C で保存した。検体は3等分し、各々3種類の抗血清を用いるRIA系にて測定した。

ゲル濾過：腭灌流液は後述するごとく、それぞれPhase IとPhase IIにわけて採取し、凍結乾燥後、0.01 N塩酸に溶解、最終濃度 50%アルコールになるようにアルコールを添加し、大部分のデキストランを除去したのち上澄をとり、再び凍結乾燥し、ゲル濾過用検体とした。これを3 M酢酸に溶解し、Sephadex G50 (superfine: $1 \times 100\text{ cm}$) のカラムに添加、ゲル濾過を行なった。溶出液として3 M酢酸を用い、溶出液の免疫活性は灌流液と同じく上述3種類のRIA系により測定した。

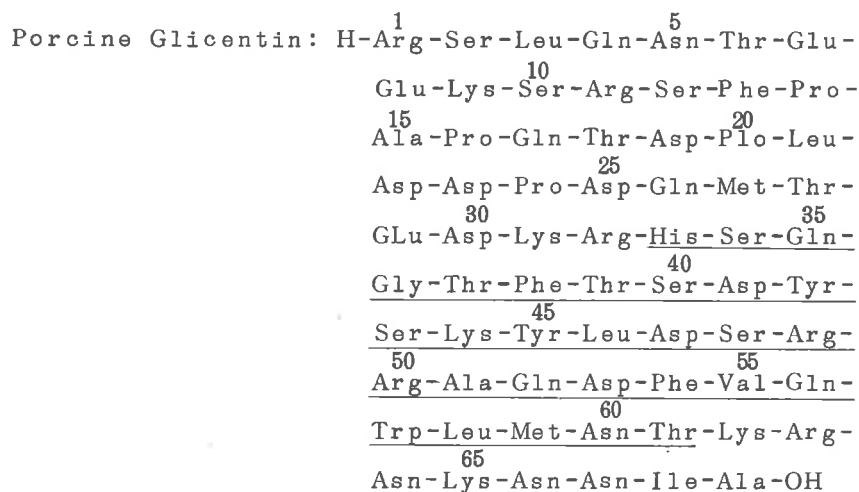
結 果 腭灌流における放出免疫活性：本研究の3種類のRIA系のいずれにおいても、類似の免疫活性放出パターンが認められ、刺激直後の鋭敏なグルカゴン放出期 (Phase I) と、それに続く持続放出期 (Phase II) を認めた。

Phase I およびPhase IIのゲル濾過：抗血清 OAL 123 または GA 10 を用いたRIA系では、それぞれグルカゴンに相当する位置に単一ピークとして免疫活性が検出されたが、両ピークの大きさが異なり、GA 10 RIA系では、OAL 123 RIA系で測定される腭グルカゴン以外にもグルカゴン様免疫活性を示す物質の存在が示唆された。R 4804 RIA系では腭グルカゴンが測定されないにも拘らず、腭グルカゴンに相当する位置にピークが認められたほかに、グリセンチンC末端ヘキサペプチドまたはそれに関連すると考えられる低分子量免疫活性が検出された。Phase IIの免疫活性溶出パターンもPhase Iのそれに類似的であったが、Phase Iに比し、グリセンチンC末端フラグメント関連ペプチドが多量検出されたのが特徴であった。

考 察 本研究により、腭灌流液中にはプログルカゴン様の大分子型前駆体は検出されなかったが、グルカゴンのほかに、それより低分子量画分であるグリセンチンC末端ヘキサペプチド関連ペプチド、および腭グルカゴンの17, 18位のArg-Arg配列が開裂して生成したと考えられるフラグメントの存在が確認され、これらがグルカゴンとともに放出されることが明らかになった。また、その放出パターンはR 4804 RIA系での測定結果でわかるように、腭グルカゴンの放出様式と同じく二相性であった。

すなわち、本研究結果はプログルカゴンがグリセンチンと共通またはきわめ

て類似した構造であり，豚A細胞ではプログルカゴンのプロセッシングにより，そのC末端部ではグルカゴンとC末端ヘキサペプチドが主として生成し，放出されることを示唆した。さらにこれらの知見を証明するため，放出されたペプチドの単離を進めている。



(下線部はグルカゴン配列に相当する。)

- 1) Thim, L., and Moody, A. J. Regulatory Peptides 2; 139, 1981. 文 献
- 2) Ravazzola, M., and Orci, L., Diabetes 29; 156, 1980.
- 3) Moody, A. J., Holst, J. J., Thim, L., and Jensen, S. L.
 Nature 289; 514, 1981.
- 4) Yanaihara, N. Biomed. Res. 1; 105, 1980.
- 5) Grodsky, G. M., and Fanska, R. E. In Methods in
 Enzymology (ed. Hardman, J. G., and O'Malley, B. W.)
 Academic Press, New York, 39; 364, 1975.

細胞器官研究系

《生体膜研究部門》

概 要 本研究部門の研究目標は広義の膜興奮を担う興奮チャネルの実体像を解明することにある。昭和56年度は、イカ巨大神経、ザリガニ巨大神経、培養神経細胞、骨格筋アセチルコリンリセプターを対象とし、生理的、生化学的、形態学的研究を進めてきた。

研 究 課 題 細胞内Caイオンによる膜電位・膜電流変化の解析

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Caイオンの存在は膜構造の安定化と興奮発現のための必須条件となっている。一方、細胞内Caイオンについては、イカ巨大神経線維を用いた実験でみる限り、0.1mM～10mM Ca投与により、膜抵抗が減少すると共に、投与後1～2分以内では膜興奮閾値の著しい減少やCa投与そのものによる膜興奮の発生など、細胞外Ca効果とはいわば正反対の膜不安定化作用の知見を得ている。本研究では細胞内Ca投与時の膜電流変化をくわしく測定し、興奮チャネルに対するCaイオンの基本作用を明らかにすることを試みた。

結果および考察 ヤリイカ巨大神経線維を約6cmの長さで切り出し、ローラー法により細胞質を押し出したのち灌流チャンバーにのせ左右の切口より灌流液流入用および流出用ガラスピペットを挿入し、更に記録用ガラス電極と通電用白金電極を挿入した。外液は人工海水とし、内液は25mM～250mMK-glutamateを基準液とし、これに0.1～30mM Caを加えてCa作用を検討した。膜電位固定実験に際しては25秒間以内にV-I関係を記録するシステムとし、一過性変化を解析した。

25mM K-glutamate灌流条件下で細胞内に0.1～3mM Caを加えると、静止膜電位は目立つ変化を示さないが、電流刺激による活動電位発生の閾膜電位はCa添加10～30秒後に著しい低下を示し、その値は最大変化-19mVに及びわずか4mVの脱分極で活動電位の発生をみている。活動電位の大きさは時間とともに減少するが、活動電位durationは一過性に2～3倍増

大する傾向を示した。Ca 投与時間が長びくと、静止膜抵抗は減少の一途をたどり、活動電位の大きさも衰退傾向を示す。このように膜は一過性に、非常に興奮しやすい時期を経たのち、興奮能力そのものを失ってしまう時間経過をたどる。

膜電位固定法により細胞内Ca 投与時の膜電流変化を検討した結果、Na チャネルの活動を示唆する内向き電流は1mM Ca 投与1分後に、10mV 低い電位から流れ始め、 $-30 \sim -10$ mV の範囲で標準の内向き電流値を上廻っている(図1)。以上の結果は細胞内Ca が、低い膜電位でNa チャネルの開状態を実現する基本作用をもつことを示している。一方、内向きピーク電流値の低下はNa チャネル全開状態には抑制がかかっていること、外向き電流値の減少はKチャネルのイオン透過能を50%抑制することを示唆している。

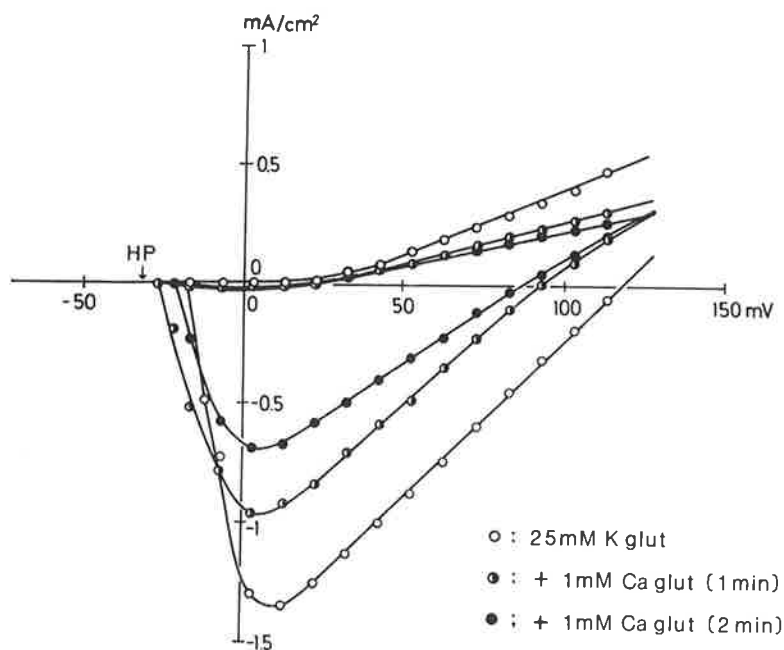


図1. 細胞内Ca イオン1mM投与1分後および2分後の内向き電流ピーク値および外向き電流値の変化。

カチオン化フェリチンによるNaチャネル不活性化の時定数の延長

古家喜四夫, 山岸 俊一

研 究 課 題

カチオン化フェリチン(CF)はヤリイカ巨大神経線維膜の内表面に結合し活動電位の持続時間の延長を引き起こす。(同年報第2巻P 141)この作用機

研 究 目 的

序を電位固定法で明らかにする。

方 法 ヤリイカ巨大神経線維はローラー法を用いて灌流し、その後 pronase を作用させて膜内表面を露出させた。内液は 250 mM KF + 6.8 ~ 13.6 mM NaCl + 10 mM TEA, pH 7.4 に 0.015 ~ 1 mg/ml の CF を加え、外液は人工海水 (450 mM NaCl + 100 mM CaCl_2 , pH 8.0) を用いた。

結果及び考察 図 1 に示すように CF を細胞内から作用させると、内向き電流のピークのわずかな減少とその持続時間の大幅な延長がみられる。この効果はシュワン細胞で被覆された外側から作用させた場合や細胞質が厚く残っていて膜内表面が露出していない場合にはみられなかった。また CF を洗い流しても結合した CF ははずれず効果は持続した。TTX 10^{-6} M を含んだ外液中での外向き電流は CF 添加によってもまったく変化がみられなかった。以上のことから膜内表面に結合した CF は K チャネルには作用せず、Na チャネルにのみ作用し、その不活性化の過程を遅らせる働きをしていることがわかった。図 2 に内向き電流の片対数プロットを示す。CF の結合した Na チャネルの不活性化の時定数 (τ_s) は約 26 ms であり通常の場合 ($\tau_o = 1.1 \text{ ms}$) の約 24 倍である。この τ_s は灌流の時間、CF の濃度に依らず一定であり CF は Na チャネルとある一定の仕方では結合していると考えられる。

図 1

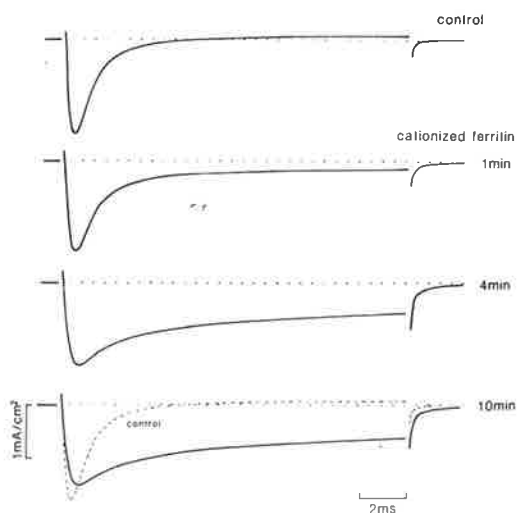


図 1. -60 mV から 0 mV に膜電位固定した時の膜電流 01min, 4min, 10min は 250 mM KF + 6.8 mM NaCl + 10 mM TEA (control) に 0.5 mg/ml の CF を加えた後の時間経過。

図 2. 図 1 と同様の膜電流の片対数プロット、縦軸はみやすくするため認意にずらしてある。10 ms ~ 15 ms の電流部分から直線が引け、その傾きから CF の結合した Na チャネルの不活性化の時定数 τ_s は約 26 ms となる。

図 3. 図 2 の直線 (I_s) を差し引いた残りの膜電流 (I_f) の片対数プロット。即ち $I = I_s + I_f = I_s^0 e^{-\frac{t}{\tau_s}} + I_f^0 e^{-\frac{t}{\tau_f}}$ とあらわされる。

図 2

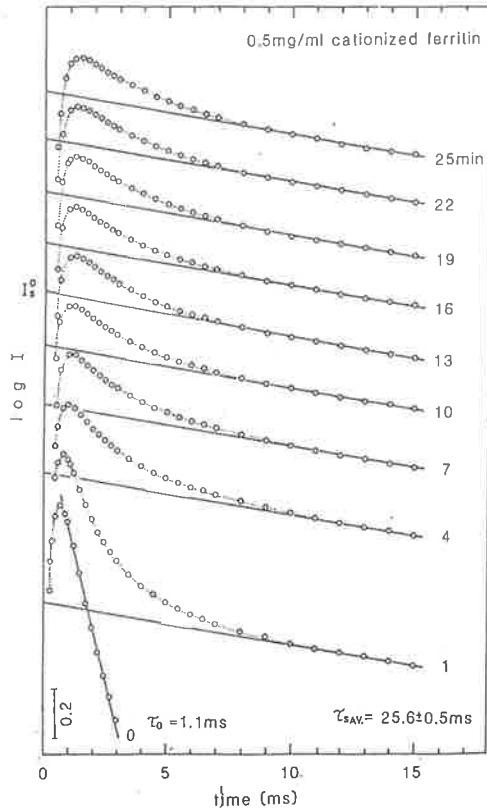
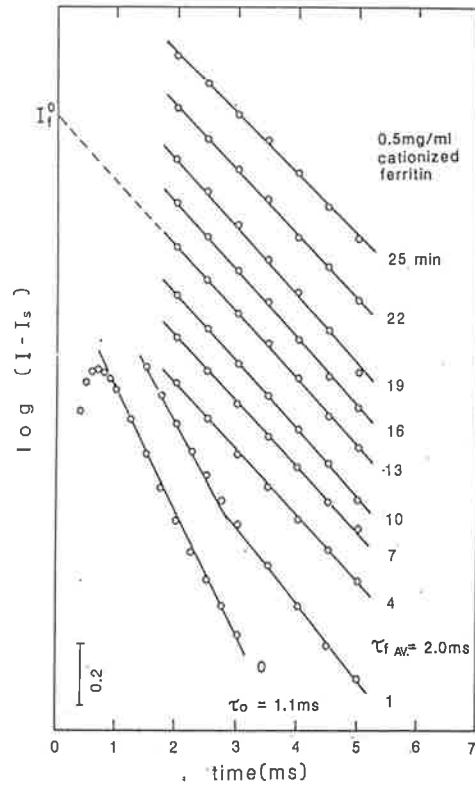


図 3



高浸透圧溶液中でのイカ巨大神経膜興奮の解析

研究課題

久木田文夫, 山岸俊一

興奮現象の従来の解析では細胞内灌流法を用い細胞内外溶液の電解質の濃度を変化させ、電気的な応答の変化を調べることが通例である。細胞内灌流法をさらに押し進めると、水のように非常に膜を透過し易い物質の濃度（つまり浸透圧）を変化させたり、溶液のバルクの性質を変化させるような、多量の非電解質を加えた条件下で実験を行なうことができる。このような実験により、今までとは質的に異なった興奮性膜の性質を調べることができる。

研究目的

ヤリイカ (*Doryteuthis bleekeri*) 巨大神経線維の細胞内灌流標本を用い、細胞内外に体液と同じ浸透圧の溶液を灌流する。次に電解質濃度を一定に保ちながら非電解質を加え浸透圧を上げ、細胞内外溶液の浸透圧を一致させた条件下ないしは細胞膜を隔てて一定の浸透圧差を与えた条件下で電気生理学的測定を行なう。

研究方法

研究結果 及び考察

細胞内に等張溶液を灌流し、細胞外液に尿素を加えて浸透圧を上げると細胞膜を通して細胞内から細胞外へ水の流れが起こる。この条件下で神経興奮を起こすと、活動電位のピークは殆んど変化せず、大きな後過分極が現われる。膜電位固定法で調べると、定常的な外向き電流が流れる際のKコンダクタンス及び、 E_k の値が大きくなるため、K電流は著しく増大する。外向きのK電流より求めたKコンダクタンスが最大値をもつような比較的長い脱分極を与えた後膜電位を過分極方向に変化させた際に現われる内向きのtail電流は著しく減少する。これらの結果より、外向きの水の流れがKイオンの移動を妨げるためにKチャネルは著しい整流性をもつことが明らかになった。

細胞内外に浸透圧差を与えないような条件下で溶液の浸透圧を上げると、非電解質を多量に加えたために増加する溶液の粘性の効果を調べることができる。粘性の効果はNaチャネル及びKチャネルに非特異的であり、開閉過程の時間経過を緩やかにする。

浸透圧差を与えない条件下で極端に高張な溶液（約50 vol%のグリセリン溶液）で細胞内外を灌流すると、 -20°C ぐらいの低温でも電気生理学的測定を行なうことができる。その結果、NaチャネルとKチャネルの開閉機構は異なる温度依存性をもつこと、 -20°C までの低温では興奮性の諸定数は転移様の急激な変化を示さず連続的に変化することが明らかになった。高張溶液中での興奮は高い Q_{10} 値をもち、低温での興奮は通常の千倍程度緩やかな時間経過で起こることが明らかになった。

研究課題

培養骨格筋細胞アセチルコリン受容体の細胞内前駆体

杉山 博之, 山下 幸子

研究目的

骨格筋培養細胞の表面には、等電点を異にする2種類のアセチルコリン受容体分子が見い出されることを我々は報告した。この両タイプの受容体分子が相互にどのように関連しているのか、どのような経路で合成されるのかを調べる目的で、細胞内の α -ブングアロトキシン結合成分の諸性質を検討し、前駆体としての可能性・役割等について考察した。

研究結果・考察

主として新生ラット後肢より得た骨格筋培養細胞を用いて、以下のような結果を得た。

- (1) 細胞表面受容体が分子サイズとしては沈降係数9Sの一種類であるのに対

し、細胞内 α -ブングロトキシン結合成分には沈降係数 9 S, 5 S, 3 S の
 少なくとも 3 種類のものが見い出される。

- (2) このうち、細胞内 9 S 成分は表面受容体の直接の前駆体と考えられるが、

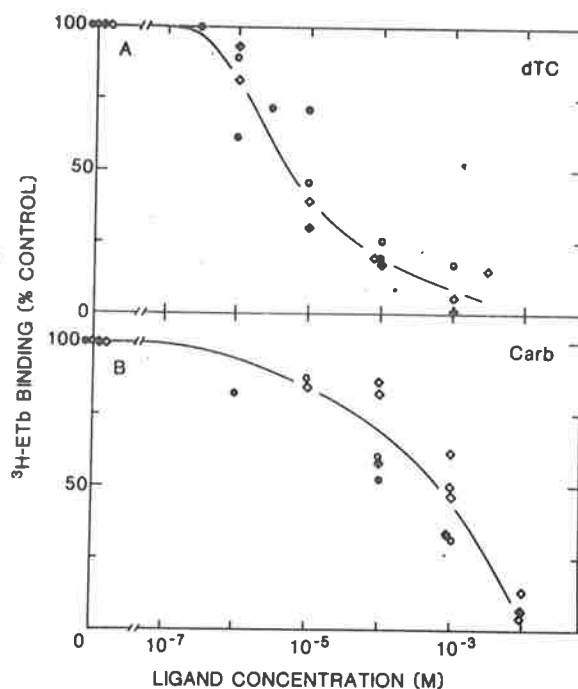
等電点的には一種
 類のものしか見い
 出せない。表面受
 容体は等電点的に
 は 2 種類あるが、
 代謝速度はほぼ均
 一であることを考
 えると、この細胞
 内 9 S 成分は 2 種
 類の表面受容体の
 共通の前駆体であ
 る可能性が強い。

- (3) 細胞内 5 S およ

び 3 S 成分のコリ
 ン作動性薬物に対
 する親和性を調べ
 たところ、右図に
 示されるようにこ
 れらの成分の d-
 ツボクラリン (d
 TC) やカルバミ

ルコリン (Carb) に対する親和性は、細胞内 9 S 成分や表面受容体のそれ
 とほぼ同程度であった。このことは、これらの成分がアセチルコリン受容体
 と密接に関連した成分であることを示す。

- (4) 細胞内 9 S 成分を新たな細胞材料とともにホモジェナイズ、保温、抽出等
 の操作を加えても、5 S や 3 S への転換は見い出されなかった。このことは、
 細胞内 5 S 成分、3 S 成分が、抽出分析等の過程で分解修飾等の作用を受け
 て生じた人為的産物ではなく、本来細胞内に自然に存在する成分であることを
 示唆する。



骨格筋培養細胞表面アセチルコリン受容体および
 細胞内前駆体の薬物親和性。

dTC および Carb の結合を ^3H 標識 α -トキシン
 ($^3\text{H-ETb}$) の結合に対する拮抗能で表わした。

● 表面受容体；◆ 細胞内 9 S 成分；○, ◇

細胞内 5 S および 3 S 成分。

以上の結果は次のように解釈される。骨格筋のアセチルコリン受容体分子は、アセチルコリン結合部位を含む小分子量ユニット（8 S および 5 S 成分）として合成され、これに他のユニットが結合して 9 S の前駆体となるのであろう。この前駆体は表面膜に組込まれる段階以降に何らかの post-translational な修飾を受けて、等電点の異なる 2 つのタイプへと分化すると考えられる。

《 機能協関部門 》

本部門では、膜の興奮現象の分子的基础を明らかにする目的で研究を行った。一方では、電気生理学的手法により、極度に単純化されたイオン環境下でも興奮が発生しうることを示し、また、興奮に伴う膜を通じての水の移動を検出した。他方では、電気生理学的手法と光学的手法をくみあわせることにより、興奮に伴って膜に旋光性変化が発生することを示した。同時に、チャネル蛋白の大量採取を目標として、そのための予備実験をすすめた。

膜の興奮に伴う旋光性の変化

渡辺 昭

研究課題

膜の興奮現象は、膜に存在するチャネル高分子が、刺激作用によりそのコンフォメーションを変化させることにより発生する、という学説が広く唱えられている。このような変化を実際に検出する目的で以下の実験を行った。

研究目的

材料には、イセエビ歩脚の長節の神経またはヤリイカの巨大線維を用いた。神経は、フルオレッセンイソシアナート (FITC) または、ダイブロモマキニロフルオレッセン (DBMF) で約 30 分間染色した。白金線電極により細胞内または細胞外の活動電位を記録して光学的変化と比較した。

研究方法・結果

光源には 250 W のハロゲンランプを用い、干渉フィルターにより準単色光を得た。ポラロイドフィルムにより偏光子および検光子を作り、その間の光路に神経を置いた。偏光子・神経・検光子を通過した光は、シリコンフォトダイオードの検出器で受けて電氣的シグナルに変えた。電氣的シグナルの交流分は増巾したのち平均加算解析装置に入力させて S/N の改善をはかった。図 1 にシステムの構成を示す。偏光子・検光子の方位角は、右位置 (偏光子の透過軸は神経に対し反時計まわりに 45° 、検光子の透過軸は神経に平行) および左位置 (検光子・偏光子の方位角を交換する) の 2 つを選び、これを交互に用いてそれぞれの位置で神経を刺激して得られた透過光の強度変化を記録した。偏光の理論によると、複屈折のシグナルはこの 2 つの位置で同じ大きさとなるべきであるので、この 2 つの位置でのシグナルの差をとるとき、複屈折のシグナル

の混入を除くことができる。同時に、旋光性変化に関係のない光のシグナル（例えば、散乱、吸収、蛍光などのシグナル）もこの操作で消失する。実際には、神経線維を通過した光のシグナルは実験時間とともに変化するので、まず右位置で神経線維に一定数の刺戟を与えて反応を反応加算解析装置に蓄積し、次に左位置で同様の操作を行い、更に右位置で同様の操作を行って、第1と第3の記録の平均と第2の記録との差を求めて旋光のシグナルを得た。

図2に、エビの神経をDBMFで染色したのち、刺激を与えてえられた透過光変化の記録を示す。偏光子と検光子の位置は、トレースごとに、左位置、右位置、左位置、右位置と変化させた。図から明らかなように、偏光子、検光子の位置によって透過光の時間経過は異なる。これらの記録の差をとると、興奮によって、神経線維は右旋性が促進されることがわかる。同様の現象は、神経線維をFITCで染色した場合にも観察された。

図3に、FITCで染色したヤリイカの巨大線維からえられた結果を示す。記録は、偏光子・検光子を左位置において得た透過光変化のシグナルから、右位置において得た透過光変化のシグナルを引いたものであって、上向きの変化は左旋性の促進を示す。Aの記録は、510nmの光でえられ、Cの記録は、470nmの光でえられた。B、Dはそれぞれの記録のさいの活動電位である。波長によって旋光性変化のシグナルが反転するのが見られる。

考 察 エビの神経を用いた実験では、非常によいS/Nでシグナルをうることができるが、波長によるシグナルの反転は確認できなかった。この原因の一つには、エビの神経の持つ強い光散乱作用があるものと思われる。イカの巨大線維は、これに比しよい透明度を持つため、障害は少いが、S/Nは低い。しかし、この材料で見られたシグナルの波長による反転は、静止時と興奮時における旋光分散曲線の差によるものと考えられる。また、旋光のシグナルが活動電位の初期に見られることは、このシグナルが、電位依存性でなく、分子形態の変化と関係づけられていることを暗示する。これらの実験結果は、膜における興奮現象が、膜高分子のコンフォメーション変化に由来するという仮説を支持するものと考えられる。

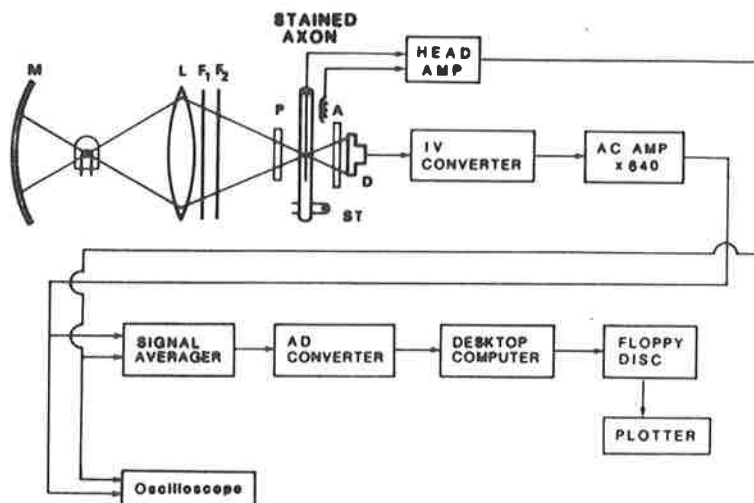


図1. 実験装置の概要。イカ巨大線維を用いた場合を模式的に示す。M, 凹面鏡。L, レンズ。F₁, 熱線防止フィルター。F₂, 干渉フィルター。P, 偏光子。A, 検光子。D, 光検出器。

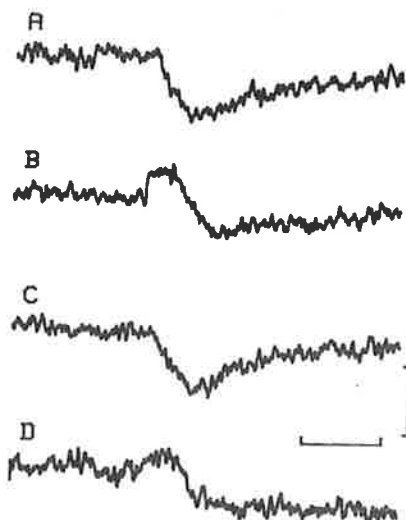


図2. DBMF で染色したエビ歩脚神経線維の透過光変化のシグナル。横軸は時間（較正は 10 ms）。縦軸は光強度の変化（較正は 5×10^{-6} , 上向きは光強度の上昇）。各トレースは 128 回の刺激によるシグナルの平均で, 較正は 1 回のシグナルとその時の直流分との比を与える。偏光子と検光子の方位角は, A: 左位置, B: 右位置, C: 左位置, D: 右位置, 入射光の波長は 510 nm, 19°C。

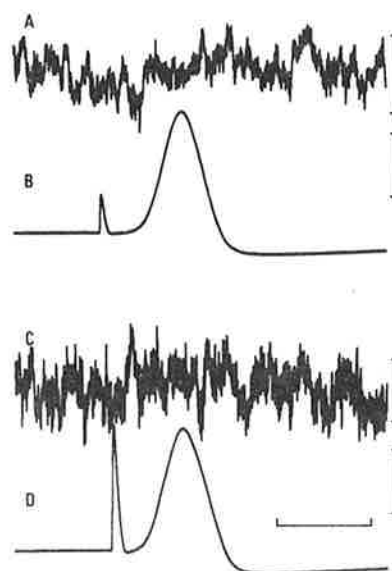


図3. FITC で染色したイカ巨大線維の旋光性変化のシグナル。A および C は, 検光子・偏光子を左位置においた時の透過光変化のシグナルから, 右位置に置いた時の透過性変化のシグナルを引いたもので, 上向きのフレは左旋性の増加を示す。B および D は, A および C の記録と同時に記録した細胞内活動電位, A B および C D のデータは別の線維からえられた。入射光の波長は, A: 510 nm, C: 470 nm, 較正は, D C 分の 5×10^{-7} の光シグナルと, 50 mV とを示し, 時間の較正は 1 ms を示す。

研究課題 一価カチオンによる単イオン性興奮

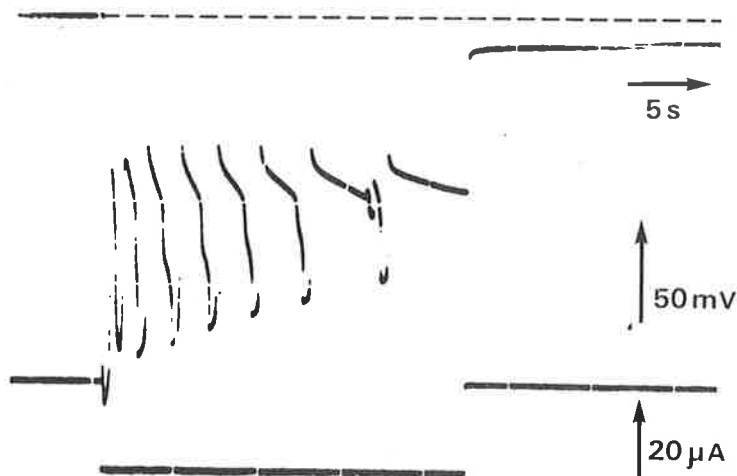
寺川 進

研究目的 細胞内外に同一種、同一濃度の一種類の塩しか存在しないような、最も単純なイオン条件下でもイカの巨大神経線維は興奮性を維持する。このことはCoやMnのような二価カチオンの塩を用いて実験的に示された (Terakawa, 1981, J. Membrane Biol. 63:51-59) が、本研究では、同じことが一価カチオンの塩を用いても成り立つことを示した。

研究方法・結果 イカの巨大神経線維に細胞内灌流を施す。細胞内外とも少量の一価カチオンの塩を加えた12%グリセロール液で40分以上灌流する。その後、軸索内においた白金線により高抵抗を介して膜に内向き電流を流し、膜電位の応答を0.6 MKCl寒天をつめたガラス細管電極によって誘導する。溶液中の塩として、NaCl, KCl, NaEDTA, KEDTAなどを1~2mMの濃度で用いると、膜電位はほぼ0となり、内向き電流を流したときに図1に示すような応答が得られる。電圧固定法で調べると、興奮膜特有のN字型のI-V特性が明らかであった。一価カチオン塩として1mMのTEA・Clを用いたとき、及び、全く塩を加えないときには図のような振動型の応答を得ることはできなかった。イオンの分布は細胞内外とも同じであるのに、外向き電流を流した場合には“逆向き”の応答は得られなかった。細胞内にはCo塩を、細胞外にK塩をおき、一価、二価のイオンの分布を正常時の逆にしても逆向きの応答は得られなかった。

図1. 矩形状に内向き電流(下の記録)

を流したときの膜電位の応答(上の記録)。点線は膜電位0のレベル。溶液は細胞内外とも2mMのKEDTAのみを含む。



従来、Caはイカの巨大神経の興奮に不可欠とされていたが、単純なイオン環境では、Caも必須でないことがわかった。イオン種としてはより正常に近いKやNaを用いても単イオン性興奮を起せるということは、イカの神経がTeorellのガラス膜による興奮モデルにより近づいたことを意味する。しかし、“逆向き”の応答が得られないので、神経膜独特の非対称性が興奮発生に重要であることがうかがわれる。細胞内圧は非対称性の原因になり得るので、今後は、これを考慮に入れて研究を進める必要がある。

考 察

活動電位に伴う細胞内圧の変化

研 究 課 題

寺川 進

興奮現象の分子的機構を知るためには電気的測定だけでは不十分である。新しい測定法を開発し、新しい情報を得ることが理解を進める助けになる。本研究では、細胞内圧という量が興奮性研究に新情報をもたらすことを示した。

研 究 目 的

イカの巨大神経線維において細胞内灌流を行い、蛋白分解酵素を用いて軸索原形質を十分取り除く。次に、灌流液導入側のコックを閉じて、流れを止める。この状態で、内径500 μm の導出側ガラス管の断端には、細胞内に通ずる溶液の液面が形成される。この液面の動きを、オプティカルファイバーを利用した非接触式変位計によって測定した。実際の動きは非常に小さいので、加算平均法によりノイズを減らした。

研究方法・結果

細胞外電極によって巨大線維を刺激すると、活動電位の発生にやや遅れて、細胞内圧の増大とそれに続く減少を示すような液面の動きがみとめられる(図1)。この変化の大きさは、液面の変位量で表わすと、およそ10~40 $\text{\AA}$ のものである。オプティカルファイバーに入射する光を遮ったり、オプティカルファイバーの先端を液面に接触させると変化は検出されないで、電気的誘導によるアーチファクトではないことがわかる。閾値直下の刺激では変化は得られず、閾値上の刺激であれば刺激の強さに関係なく同じ大きさの変化が得られる。繰り返し刺激によって変化分が重畳することはない。テトラエチルアンモニウムによって活動電位の持続を長くさせると、細胞内圧上昇の相が長く持続するようになる。検出された変化分が、活動電位の時間経過に比べて遅いのは、神経線維内での圧波の伝播速度が遅いため(実測2~3 m/sec)であると考えられる。

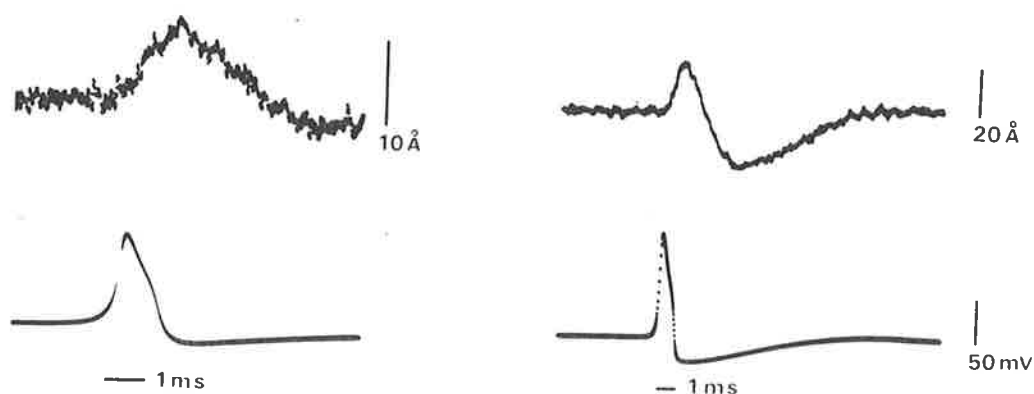


図 1. 細胞内圧の変化（上の記録）とそれに対応する活動電位（下の記録）。細胞内圧の記録の上向きは圧の上昇を示す。単位は，導出側ガラス管断端の液面の変位量でオングストローム。活動電位は，白金線により細胞内誘導されたもの。較正は右と左に共通である。

察 **察** この現象は Tasaki と Iwasa によって見出された神経線維の直径の変化とおそらく同期しておこるものであろう。そうだとすると，膜の脱分極により，細胞内圧の増大と直径の増加が同時におこることになる。これは，脱分極に際して，細胞外の水が細胞内に流入することを意味している。

研 究 課 題 神経毒の化学修飾

中山 孝

研 究 目 的 Na⁺チャンネルを興奮膜より単離し，その性質を明らかにするためには生化学的な示標が必要とされる。電気生理による実験結果から，フグ毒のテトロドトキシンやサソリ毒素がNa⁺チャンネルに特異的に結合して作用することが明らかにされており，この神経毒を化学修飾することによりNa⁺チャンネルの検索をおこなう。

研究方法・結果 テトロドトキシン（TTX）をNaIO₄により酸化し，C₆にケト基をもつnor-テトロドトキシン（nor-TTX）を合成する。nor-TTXの精製は，図1に示したように逆相の高速液体クロマトグラフィーによっておこなう。このカラム・システムにより未反応のTTXとnor-TTXを完全にしかも迅速に分離することができた。このようにして精製したnor-TTXは求核基と容易に反応することができる。一例として図2にリジンとnor-TTXの

反応物の高速液体クロマトグラフィーによる精製を示した。以上のようにTTX誘導体の合成および精製法を確立することができた。またこれら誘導体は、生理学的にTTXと同じ作用を保持しており、Na⁺チャネルの検索に有効であることがわかった。

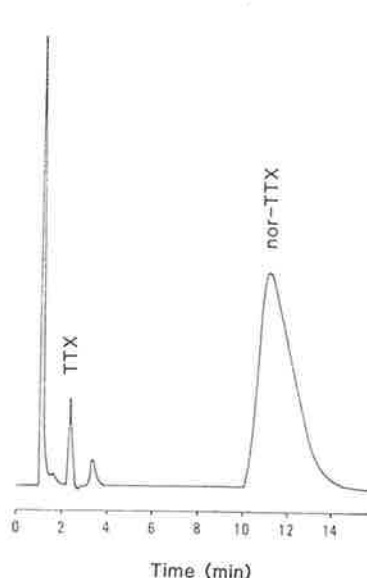


図1. 逆相高速液体クロマトグラフィーによる、TTXとnor-TTXの分離。230 nmの波長で検出。

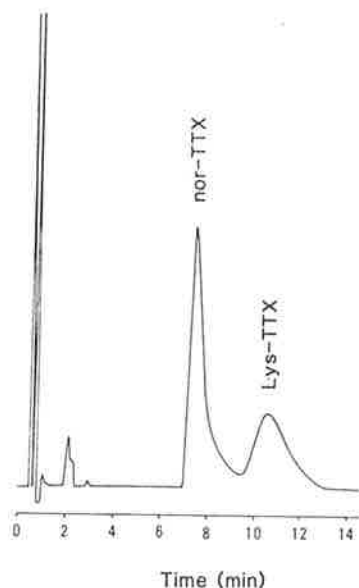


図2. イオン交換高速液体クロマトグラフィーによる、nor-TTXとLys-TTXの分離。

《 能動輸送部門 》

概 要 本研究部門は、細胞膜を介して細胞内外のカチオンを能動輸送するメカニズムの研究をおこなっている。主としてポンプ酵素の反応論とそれを分子機構に結びつける事をその目的としている。又系統発生、個体発生に於て未分化のカチオンポンプの有無を調べ、ポンプ機構の調節と関連して赤血球の形態変化、変形性と裏打ち構造の関係する機構の研究を行っている。

研 究 課 題 (Na^+ , K^+) ATPase のリン酸化中間体の安定化
 福島 義博, 中尾 真

概 要 Na^+ と K^+ の能動輸送をおこなうポンプ酵素の作用メカニズムは、ATP による酵素のリン酸化とその加水分解、および脱リン酸化後の調節部位へのATPの結合に伴っておこるポンプ酵素のコンフォメーション変化として理解されている。それぞれのコンフォメーションによって Na^+ と K^+ に対する親和性が著しく異っており、細胞内条件下では酵素は Na^+ と結合し K^+ を遊離する。細胞外条件下では反対に酵素は Na^+ を遊離し K^+ を結合する。しかしこれまでの研究ではリン酸化酵素はすべて変性酵素として分離されている。上述した我々の現段階での理解が正しいものであるためには、ネイティブなリン酸化酵素を調べる必要がある。これまで反応中間体として一時的に經由するリン酸化酵素を分離または安定化することは困難であった。そのため非リン酸化状態でのコンフォメーション変化に比較してリン酸化酵素のコンフォメーション変化の研究はおくれている。しかも Na^+ の細胞外への遊離という生理的課程は、リン酸化状態でおこると考えられている。

研究方法・結果 (Na^+ , K^+) ATPase のリン酸化中間体は結合Mgを持っていることによって活性を保っている(1)。Mg との結合はNa をまだ放していないリン酸化酵素の方が、Na を遊離してしまったものよりも強い(2)。従って、リン酸結合を安定化するためには、リン酸化酵素との結合がMgよりも弱い Ca^{2+} を使い、しかも Na^+ を高くしてやるのがよいと考えられた。酵素はブタ腎髄質からDOC処理によって得たものを使った。この条件下ではリン酸化はきわめてゆ

っくり進行する(3)。

CaCl₂ 1mMとNaCl 960mM存在下で酵素に10 μ M〔 γ -³²P〕ATPを加えてリン酸化反応を開始する。200秒後に過剰のCDTA 20mMを加えてリン酸化を停止する。その後いろいろの時間で酸を加えて酵素に結合している³²Pの量を測定した。CDTA添加時のリン酸化酵素量を100として各時間の値を表に示す。コントロールとして、CDTAの代りに非放射性の過剰のATP 0.5 mMを加えた。この場合はリン酸化酵素は結合Caを保持しておりすみやかに分解してしまった。

CDTAまたは非放射性 ATP添加後の時間(分)	リン酸化の最大レベルとの割合(%)			
	非放射性ATP添加		CDTA添加	
	100		100	
0	a)	b)	a)	b)
5	0	0	98	94
10			96	92
20			96	85
60			89	62
120	0		81	55
300			77	41

a) 0℃

b) 27℃

CDTA存在下でのこのようなリン酸結合の安定化は、ネイティブな酵素のまま分析をするのに十分のものと考えられる。また(Na⁺, K⁺)ATPaseのリン酸化反応の ΔS° と ΔH° が筋肉収縮ATPaseの酸不安定リン酸化中間体形成のそれらパラメーターときわめて近い値を示すことから、ポンプ酵素のリン酸化中間体を変性による人工産物とみなす議論がある(4)。この疑問に答える手段としてネイティブな安定化リン酸化酵素を使うことができる。

考 察

- (1) Fukushima, Y., and Post, R. L. (1978) J. Biol. Chem. 253, 6853-6862.
- (2) Fukushima, Y., and Nakao, M. (1980) J. Biol. Chem. 255, 7813-7819.
- (3) Fukushima, Y., and Nakao, M. (1981) J. Biol. Chem. 256, 9136-9143.
- (4) Fukushima, Y., and Tonomura, Y. (1975) J. Biochem. 78, 1113-1121.

研究課題 下等動物の未知のATPaseと $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPaseの存在についての検討
 福島 義博, 中尾 真

概要 動物の生理機能は細胞あるいは分子機械のレベルにおいては、下等なものからヒトにいたるまで、基本的には同じ機構であると一般に考えられている。この考え方が、ナトリウム・ポンプについても成りたつのなら、系統分類学で下等とされている海産もしくは淡水産動物の細胞膜にも $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPaseが存在するだろう。何故なら細胞容積の保持や栄養有機物のとり込みなどの細胞膜の機能は $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPaseによって作られる細胞内外の Na^+ と K^+ の濃度差によることが高等動物では知られているからである(1)。このような比較によって細胞膜の進化を酵素化学的に調べる端緒としたい。

研究方法・結果 動物個体全体または可能な場合はある器官からミクロソーム画分を取った。 Na^+ と K^+ で活性化されウバインで阻害されるものを $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPaseとみなし、検出されたもの(+)とされなかったもの(-)を下の表に示す。腔腸動物

動物または器官	$(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPase	ミクロソームには,
海綿	—	$(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPaseは検出されなかったが、 Na^+ と K^+ を区別せず、一見イオン強度によって活性化されるATPaseがあった。この活性
イソギンチャク	—	
アンドククラゲのかさ	—	
ヒドラ	—	
広東住血吸虫	+	
ヒトデの精子	+	
ヒトデの卵	—	
アカウニ腸管	+	
バフンウニ腸管	+	

はウバイン非感受性であるが、 2MNaI 処理に抵抗性であり、 $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPaseと類似の性質も一部持っているようである。これと全く同様のATPase活性が市販のパン酵母(日本製粉株)ミクロソーム中にも見出された。

考察 ある活性が検出されなかった時、それが存在しないのかまたはその酵素含有量が少いのかを決定することはきわめてむずかしい。従ってこのような不純なミクロソーム画分から $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ ATPaseの有無を調べるためにはさらに工夫を要する。しかしとにかく動物においても酵母や高等植物の根(2, 3)にあるATPaseと似たものがあることに興味を持たれる。

(1) Bonting, S. L. (1970) In Membranes and Ion Transport

- (ed. E. E. Bittar) pp. 257-363. Wiley Interscience, London.
- (2) Dame, J. B., and Scarborough, G. A. (1981) J. Biol. Chem. 256, 10724-10730.
- (3) McMurchie, E. J., and Pomeroy, M. K. (1981) Plant Physiol. 68, 620-630.

(Na⁺, K⁺)ATPaseの反応機構の解析

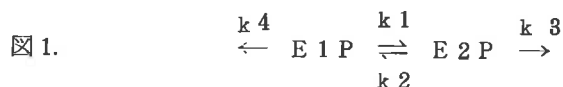
研究課題

原 諭吉, 中尾 真, 福島 義博

(Na⁺, K⁺)ATPase は少なくとも2種のリン酸化中間体(E1P, E2P) 概 要
を経て反応が進行する事が知られており, E1P→E2Pの変換に伴って3個
のNa⁺が細胞外へ正の協同性をもって放出される事が予想されている。(Y.
Hara, M. Nakao (1981) J. B. 90, 923-931)。従ってこれらの中
間体のレベル, 及び中間体の生成・分解に関わる反応速度を調べる事は, Na⁺
ポンプ機構の解明の為に必要である。

従来E1PとE2Pレベルの測定は, E1PがADPでE2PがKClによ
ってすみやかに脱リン酸化される性質を利用して行われていた。しかしADP
やKClが作用する反応段階が脱リン酸化段階のみとは限らないこと, および
E1P⇌E2P間の移行の速度が脱リン酸化速度と較べ非常に小さいとは限ら
ないことなどから, 従来の方法ではE1PとE2Pレベルを正確に測定できな
い可能性があった。我々は実測した脱リン酸に反応の時間経過に予想しうるモ
デル(中間体数が2~4)から導かれる式をあてはめ各ステップの速度恒数及
び中間体レベルを推察する試みを行っている。その第一歩として中間体数が2
の場合について行った。

研究方法・結果



ブタ腎のDOC酵素を0.2~0.5 M NaCl, 5mM MgCl₂, 20μM[γ-
-P³²]ATP存在下でリン酸化し, リン酸化レベルが定常状態に達したとこ
ろで終濃度10mM CDTAを加え, リン酸化反応を止め, それ以後のリン酸化
レベルの減少を80秒まで5-10秒おきに測定した。この測定値に図1のモ

デルから導かれる式をあてはめ、非線形関数の最少二乗法アルゴリズム (P. R. Beviton, Data Reduction and Error Analysis for the Physical Science, McRow-Hill, pp. 204~246) により, k_1 , k_2 , k_3 , k_4 , E 1 P レベル及び E 2 P レベルを求めた。

研 究 課 題 上皮細胞の輸送機構成分の単離と生合成—腎臓細胞膜の単離

太田 英彦

概 要 腎臓、小腸等の上皮細胞は、管腔側、隣接細胞側及び反管腔側の三種の細胞膜をもっている。これらの細胞膜の成分は、上皮細胞を横切って移動する物質の輸送にあずかる種々のポンプ機構を含む。一例として腎臓の尿細管上皮細胞をとれば、管腔側からのグルコースの再吸収は、管腔側細胞膜に存在する Na^+ 依存性のポンプにより行なわれ、この過程を駆動する Na^+ の濃度勾配は、反管腔側に存在する Na^+ , K^+ -ATPase により形成されていると考えられる。他方、上皮細胞のこれらの細胞膜は、その成分について著しく異なることが知られている。従って、機能的に間接的な共役をしているこれらの細胞膜の成分が、代謝回転 (生合成と生分解) の面でどの様な連関をもつのかを明らかにする必要がある。

研究方法・結果 近位尿細管上皮細胞の管腔側細胞膜は、アルカリ性フォスファターゼをもつこと、反管腔側細胞膜は Na^+ , K^+ -ATPase をもつことが指標とされる。腎臓細胞の小胞体はグルコース-6-フォスファターゼ活性が高い。これらを指標としてマウス腎臓を細胞分画し、ショ糖密度勾配遠心法又はパーコール密度勾配遠心法により細分画することにより、約 30 の細分画を得た。これらの各分画毎の酵素活性を測定した結果、(1)管腔側細胞膜は、核分画及びミトコンドリア分画の比重の大きい細分画に主として回収される。(2)反管腔側細胞膜は、核分画及びミトコンドリア分画の中等度の比重をもつ細分画に分布する。(3)小胞体膜、及びゴルジ複合体膜は、夫々ミクロソーム分画及びミトコンドリア分画の比重の軽い細分画に回収される。(4) Na^+ , K^+ -ATPase やミトコンドリアの F1 ATPase とは異なる、比活性の高い ATPase が低比重分画に見出される。(5) SDS-PAGE による分析により各分画に特徴的なパターンが見出される。ことに Na^+ , K^+ -ATPase 活性の高い分画では、 Na^+ , K^+ -ATPase の α -サブユニットと分子量の一致する蛋白質バンドが主成分の一

つであった。

腎臓の管腔側及び反管腔側細胞膜を、遠心法により同時に単離した報告は少ないが、以上の結果はこれが可能であることを示している。画分間の相互混入をさらに低下させる改良を加えて、 Na^+ , K^+ -ATPaseの α -サブユニットを含む膜蛋白質の代謝回転を、アイソトープ二重標識法等を用いてしらべることが今後可能になった。結果(4)に記したATPaseは既に報告されているものより著しく比活性が高く、腎臓の能動輸送系とどのような関係があるのか、興味深い。

考 察

赤血球の表面積と形態変化

研 究 課 題

神部 芳則, 佐藤 真悟, 中尾 順子, 中尾 真

生体膜輸送、及びその調節の基礎的分子状態を知るために最も簡単なモデルとして赤血球膜のATPによる表面積変化と形状変化の機構を研究中である。本年度は $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$ 及びクロプロマジンによる形態変化の機構としてアンキリンと呼ばれるタンパクが必須である事を実証した。

概 要

人のACD保存血を遠心により0.9%NaClで3回洗い10mM Tris HCl 20倍量で溶血し15,000g 20分遠沈し、同じ液で2回洗ってゴーストを得た。ベーリンガー社の結晶トリプシンをタンパク量として $\frac{1}{100}$ 量添加し(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 0℃で、作用させた後、大豆アンチトリプシンをトリプシンの4倍量添加し反応をとめ、その前後に懸濁標品として2mM $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$ 又はクロプロマジンによる形態変化を観察した。又SDSポリアクリルアミド電気泳動のSDSPAGEを行い、Coomassie Blueの染色パターンをデンストメトリーを行ってタンパク量の変動をみた。

方 法

第1表

		SDSPAGE タンパクのパターン				
		0''	5''	10''	20''	40''
スペクトリン	band 1	100	100	100	100	100
	band 2	100	100	100	100	90
アンキリン	band 2.1	100	80	40	5	0
	band 3	100	100	100	95	90
	band 4.1	100	100	100	100	100

結 果

この様な条件下では、バンド 2.1 (アンキリン) のみが減少し 20 秒後にはほぼ完全に消失してしまうが他のバンドは第 1 表にみられる様に、そのまま残って居り、わずかに Band 3 が 40% 以降少しづつ減少をはじめるのにすぎない。アクチンその他のバンドも変化しない。この様な条件下で得られたゴーストに 0.5 mM クロロプロマジン を添加すると、未処理のゴーストは形を変じ、金米糖から円盤にかわるが、トリプシンで処理したゴーストは形態変化をする数が減少し、その数は第 2 表にみられる様にアンキリン残存量に平行している。クロロプロマジンの代わりに 2mM Mg·ATP, 又は HEPES (pH 7.4) 10mM を添加し 15 分 37℃ に加温すると同様に金米糖から円盤への形状変化を示すがこれもアンキリン残存量とよく平行する。

第 2 表

時間 ※	0 秒	5	10	20
アンキリン量バンド (2.1)	100 %	80	40	5
クロロプロマジンによる変形	95	85	20	5
Mg·ATP による変形	80	70	30	3
HEPES による変形	90	80	25	10

※ トリプシンを作用させた時間 0℃

トリプシン作用後のゴーストにはクロロプロマジン添加後数分で小さい小胞がきれてはなれる。又 1mM NEM で前処理するとクロロプロマジン, ATP, HEPES による形態変化は全く阻害される。

考 察

ゴーストのクロロプロマジン, HEPES, Mg·ATP による形状の変化は無傷赤血球の ATP による形状変化に対応する。アンキリンはスペクトリン, アクチン裏打ち構造を脂質 2 分子層に接着する部位と想像されているが、形状変化等にかかわっているとの直接の証明は欠けていた。本実験はまさにそれを示すものである。又ゴーストの変形性もアンキリンの残存量に依存しているという予備の結果が得られた。これらは裏打ち構造が直接膜の機能に関係している事を示した最初の例である。

生 体 情 報 研 究 系

《 神 経 情 報 》

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) われわれの開発したキンギョの *in vivo* 標本を用いて赤錐体と緑錐体の間の *interaction* を定量的に解析した, (2) 細胞内染色法及び電子顕微鏡による微細形態の観察によって, カメ網膜の神経回路を明らかにした。これらの研究によって色覚受容機構に対する理解が深まった。

概 要

脊椎動物網膜外網状層における色覚情報処理：水平細胞の応答でみた赤錐体と緑錐体との相互干渉

研 究 課 題

金子 章道, 田内 雅規, 楊 雄里

網膜の視細胞は水平細胞と順方向性シナプス結合を持つだけでなく, 逆方向性シナプスにより, 水平細胞からのフィードバック信号を受ける。これまでの形態学的知見に基き, コイやキンギョの網膜においては, 4 種類の水平細胞が杆体視細胞や赤, 緑, 青錐体視細胞と異なる結合様式を持つものと考えられている(1)。このように網膜外網状層(外シナプス層)における神経連絡は極めて複雑であり, その解析は十分に行われていない。われわれは L 型外水平細胞の色光応答特性を解析し, この細胞へ収斂する視細胞の種類を同定すると共に, 異なる種類の視細胞から収斂する信号の間に干渉作用が存在することを昨年報告したが, 今回これを更に検討した(2)。

Flaxedil により非動作したキンギョ (*Carassius auratus*) に人工呼吸を施し, 片眼のみを空中に露出して実験槽内に固定した。露出した眼球の前眼部及び水晶体を除去し, ここから微小電極を刺入して L 型水平細胞の細胞内記録を行った。

従来, L 型外水平細胞は赤錐体からの入力のみを受けると考えられて来たが, 今回の実験によってわれわれは緑錐体からの入力も存在することを示した。その根拠は次の通りである。

(I) L 型外水平細胞は短波長刺激 ($\leq 550\text{nm}$) と長波長刺激 ($\geq 604\text{nm}$) に対し, 異なる応答波形を示した。

(Ⅱ) 異なる2つの波長の光からなる“混色刺激”に対するL型外水平細胞の応答は、もし両方の波長が550nmより小さければ単一変数の原理によって予測できた。しかしながら、一方の波長が550nmより大きくなると、予測と実際の応答は一致しなかった。

(Ⅲ) 応答の初期相(光刺激開始時から100ms以内)で測定した単色光刺激に対する応答振幅と刺激光強度との関係($V - \log I$ 曲線)は互いにほぼ平行しており、また分光感度曲線は赤錐体のそれに極めて近かった。一方、応答のピーク付近で測定した $V - \log I$ 曲線の傾きは刺激の波長に依存し、655nmより長波長側では傾きが緩やかであった。この時点における分光感度曲線は赤錐体と緑錐体の分光感度の中間であった。

赤錐体と緑錐体が同時に興奮するような光刺激条件(“混色刺激”)で得られるL型外水平細胞の応答は各々の錐体を単独に刺激した際に得られる応答の和よりも大きく2種の錐体からの入力干渉し合って応答を増強させる機構が

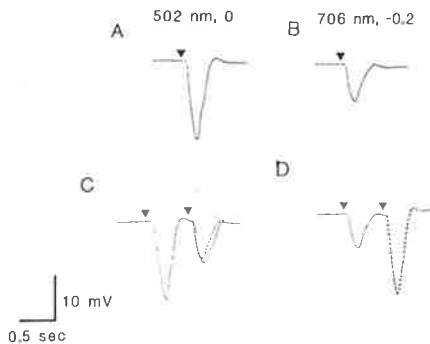
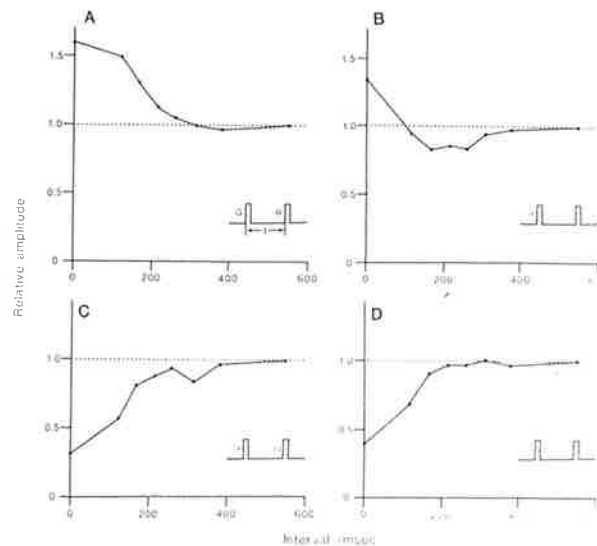


図-1. 二発刺激の実験からみたL型外水平細胞における応答増強効果。A: 波長502nm, 強度0 log 単位の刺激光(持続時間50msec)に対する応答, B: 706nm, -0.2 log 単位の光に対する応答, C: 上記二つの刺激を550msecの間隔で与えた場合の応答(実線)。点線は比較のため応答Bを706nm光に対する応答の上に重ねて示したものの, D: Cと同じ時間間隔で706nmと502nmの刺激順序を逆にしたもの。点線は比較のため応答Aを502nm光に対する応答に重ねたもの。▼は刺激を与えた時刻を示す。

働くことが示唆された。この応答増強効果について、それが赤錐体から緑錐体に働くものであるのか、もしくはその逆であるか、または相互に増強し合うものであるかという疑問、即ちその方向性を検討するために以下のような実験を行った。その結果を図-1に示す。図1A, Bはそれぞれ、502nmと706nmの刺激(持続50msec)を単独に与えた場合の応答, Cは502nmと706nmの刺激を550msecの間隔で与えた場合の応答を示す。706nmの刺激に対する応答は対照(706nmの刺激を単独に与えた場合の応答, 同図B; これを同図Cには点線で再現した)に比べ、振幅が増大している。この応答増強効果は先に与える502nmの光の強度を変えても見られた。注目すべきことは、この例において、先に与えた502nmの刺激に対する応答は、706nmの刺激を与える以前に終了し、膜電位は刺激開始前のレベルに戻っていることである。即ち、応答増強効果は、細膜の膜電位レベルとは直接関係していないと思われる。刺激の順序を逆にして706nmの刺激を先に与え

図-2. 応答の増強効果と二つのフラッシュの時間間隔の関係。横軸はフラッシュの時間間隔 (msec)。縦軸はテスト刺激に対する応答振幅の対照に対する比。
 A : 502nm 光を条件刺激, 706nm 光をテスト刺激とした場合, B : 706nm 光を条件刺激, 502nm 光をテスト刺激とした場合, C : 条件刺激, テスト刺激共に 502nm 光の場合, D : 条件刺激, テスト刺激共に 706nm 光の場合。フラッシュの持続時間は何れの例においても 10msec。



た場合には, 502nm のテスト刺激に対する応答に増強効果は見られなかった (図-1 D)。

次に, この応答増強効果の時間経過を知るために, 条件刺激 (第一のフラッシュ) とテスト刺激 (第二のフラッシュ) の時間間隔を変えて与え, その効果を観察した。図-2 はこのようにして求めた増強効果の時間経過を示すもので, 横軸は二つのフラッシュの時間間隔, 縦軸は応答増強率, 即ち, 条件刺激存在時のテスト光に対する応答と単独に与えられた同じ刺激に対する応答との比を示す。図 2 A に明らかなように 502nm を条件刺激, 706nm をテスト刺激として用いた場合, 増強効果は時間間隔がゼロ, 即ち二つの刺激を同時に与えた時最大で約 160 % に達し, 以降時間間隔の増大と共に減少した。一方 706nm

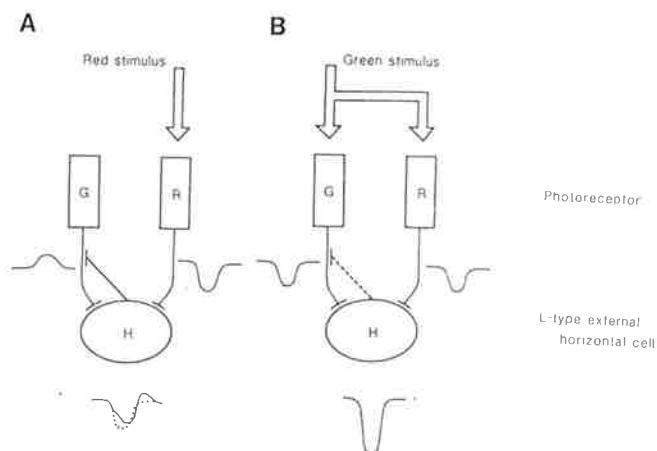


図-3. L 型外水平細胞における応答の増強効果を説明する視細胞 (赤錐体と緑錐体) と L 型外水平細胞間神経回路モデルとその動作様式。 A : 赤色光刺激を与えた場合, B : 緑色光刺激を与えた場合。

を条件刺激, 502nmをテスト刺激とすると(図2B)二つの刺激が完全に重なる場合を除き増強効果は認められなかった。また条件とテスト刺激が同一波長の場合には増強効果は全くみられなかった。

図3はこれらの実験結果を説明するための神経回路のモデルである。赤錐体及び緑錐体は直接, L型外水平細胞と順方向性の興奮性シナプスで結ばれ, 一方, L型外水平細胞から緑錐体へは極性反転型のフィードバックシナプスが存在するものと考えられる。但しこのフィードバックシナプスは緑錐体が過分極すると作用しなくなるものとする(3)。赤色光を照射するとL型外水平細胞は過分極し, この変化はフィードバックシナプスを介して緑錐体に遅れを持った脱分極を起こす。これを受けて, L型外水平細胞は脱分極し, 2つの成分が打ち消すことになる。一方, 短波長光を与えた場合には, フィードバックシナプスが動作しなくなるから, 見かけ上応答の増強が起こるものと考えられる。

色覚情報が視覚経路のごく早いステージで高度な処理を受けていることは二重反対色型の双極細胞(4)の存在からも伺われたが, 今回の研究はこの見解を支持するものである。

1. Stell, W. K. & Lightfoot, D. O., Color-specific interconnections of cones and horizontal cells in the retina of the goldfish. *J. Comp. Neurol.*, 159(1975) 473-502.
2. Yang, X. L., Tauchi, M. & Kaneko, A., Quantitative analysis of photoreceptor inputs to external horizontal cells in the goldfish retina. *Jpn. J. Physiol.* (in press).
3. Gerschenfeld, H. M. & Piccolino, M., Sustained feedback effects of L-horizontal cells on turtle cones. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 206(1980) 465-480.
4. Kaneko, A. & Tachibana, M., Retinal bipolar cells with double colour-opponent receptive fields. *Nature*, 293(1981) 220-222.

亀網膜 L 型水平細胞の杆体入力の同定

研 究 課 題

大塚 輝彌

脊椎動物の網膜は明所で働く錐体と暗所で働く杆体の 2 種の感度の異なる視細胞によって外界の広範囲な光量の変化に適応する機能を有している。これらの錐体と杆体とから二重の入力を受ける 2 次ニューロンが光刺激に対してどのように応答し、刺激光量の変化に追従するのかを調べることは網膜における明暗情報の成立過程を解明する上で重要な問題である。

カメ網膜の 2 次ニューロンである L 型 (luminosity) 水平細胞は電気生理学的解析によって主に赤錐体から入力を受けていることが知られているが、最近ゴルジ法を用いた光顕下での観察から L 型水平細胞の軸索終末部の樹状突起は杆体と赤錐体終末に終端していると報告された。

そこで杆体と錐体が二重に収束していると考えられる軸索終末部の応答に杆体がどのように影響しているかを調べるため実験を行った。さらに HRP 細胞内注入によって杆体とのシナプス結合を形態学的に検索した。

暗順応したクサガメから両眼を剔出し、暗黒下で赤外スコープを用いて眼球杯標本を作製した。HRP 5% 溶液を詰めた微小電極を L 型水平細胞に刺入して光応答を記録し分光感度を求めた後、電気泳動的に HRP を細胞内注入した。数個の水平細胞にこれを行った後、網膜を色素上皮から剥離し、DAB 法で発色した。電極の刺入部位が L 型水平細胞のどの部位であるかを判定するため発色した細胞を光顕下で観察した。細胞体部と軸索終末部は形態学的特徴から判別できた。網膜はさらに脱水、包埋し光顕用 (1 μ m) 及び電顕用 (0.1 μ m) 連続切片を作製し杆体とのシナプス結合を検索した。

方 法

視細胞終末の種類の形態学的な同定は、脱水前の標本に見られる視細胞内節の有色油滴を写真に記録し、脱水・包埋後同じ視細胞の光顕切片及び電顕切片像を得、これら 3 者の写真を重ね合わせて行った。

L 型水平細胞の軸索終末部から杆体由来の応答を記録するため 2 つの実験を行った。

結果 及び 考察

(1) 差分光感度：暗順応した網膜から水平細胞の応答を記録した後 400 nm から 20 nm 毎に 720 nm まで等光子数の単色光刺激を網膜全面に照射した。ある定めた電位 (5mV) の応答振幅が現われるのに必要な光強度の逆数を各単色

光毎に求めて暗順応網膜における分光感度曲線（図1の黒丸）を得た。分光感度の極大は620nmであった。さらに白色背景光（ $0.15 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ）を照射して網膜を明順応させ同じ方法で明順応下における分光感度を求めた（図1の白丸）。感度の極大はやはり620nmにあるが暗順応に比べて約1/10の感度の低下が見られる。2つの感度曲線の差をとり、差分分光感度（図1の三角）を全ての波長で比較した結果、暗順応した網膜では緑色光に対して感度の増強が見られた。同じ白色背景光によって杆体の応答が抑制され、かつ緑錐体の感度が赤錐体と同じであることから、この暗順応網膜における緑色光の感度増強は杆体由来であると考えられる。また、杆体の分光感度（図1の破線）の極大は520nmにあり、差分分光感度の極大500nmとほぼ一致していた。

(2) 単色光フラッシュ刺激に対する応答：微小な杆体由来の応答は強い光強度の照射によって引起される錐体由来の大きな応答振幅の中に隠れるため、低い光強度の単色光刺激を用いて杆体由来の応答を記録する実験を行った。図2は緑色（520nm）と赤色（680nm）のフラッシュ光（20msec）に対する応答である。軸索終末部は低い光強度の緑色光に対して約1秒に及ぶ緩慢な過分極性応答を示し、赤色光に対しては急速な時間経過の過分極性応答を示した。光強度を10倍上げると緑色光に対しては振幅の増大は見られず応答が延長するのみであったが、赤色光に対しては振幅が約8倍増大した。このように緩慢な時間経過を示す応答は(a) 緑色光の (b) 低い光強度（ $< 0.028 \text{ photons}/\mu\text{m}^2\text{-flash}$ ）で現われ (c) 光強度の増大に伴って振幅が増大せず応答時間が延長する。一方、急速な時間経過を示す応答は(a) 赤色光の (b) 高い光強度（ $> 0.28 \text{ photons}/\mu\text{m}^2\text{-flash}$ ）で現われ (c) 光強度の増大に伴って振幅が増大するが応答時間の延長は顕著ではない。

これらの応答の特徴と杆体及び赤錐体の応答を比較した結果、緑色光に対する緩慢な過分極性応答は杆体由来であり、赤色光に対する急速な過分極性応答は錐体（主に赤錐体）由来であると結論された。

電気生理学的方法によって杆体とL型水平細胞軸索終末部との機能的結合が明らかになったが、さらに両者のシナプス結合を形態学的に調べた（本年報P. 125参照）。2例の軸索終末部の所見ではシナプス結合が見られた視細胞（平均24コ）の70%は赤感受性錐体であり杆体は10%であることから、図1の分光感度曲線に見られるように主なる入力は赤感受性錐体であることが理解される。一方、杆体由来の応答が微小である理由としては錐体と杆体のシナプス結合に形態的差異は認められなかったことから、結合する杆体の数が少ないこ

とによると考えられる。

図 1. 杆体とL型水平細胞軸索終末部の分光感度。

破線は杆体の分光感度。

黒丸・白丸は各々暗順応及び明順応した網膜から得たL型水平細胞軸索終末部の分光感度。

明順応は白色背景光 ($0.15 \mu\text{m} \text{ cm}^2$) を照射した。

三角は暗順応分光感度から明順応分光感度を差引いた差分光感度。

縦軸は用いた光強度の逆数対数値。

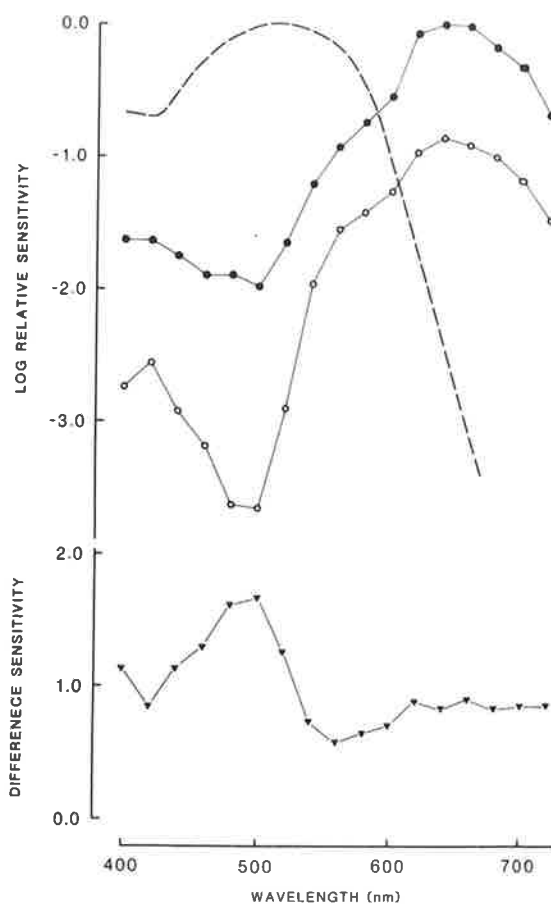
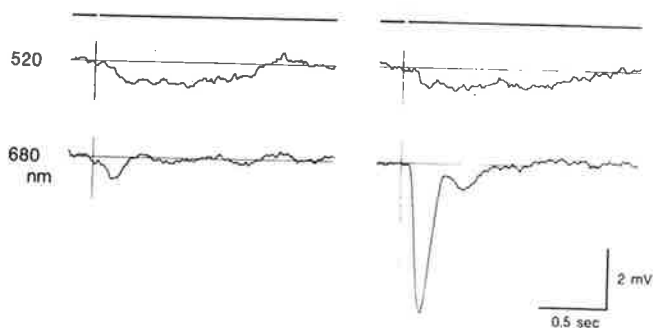


図 2. L型水平細胞軸索終末部の単色光刺激に対する応答。

上部の数字はNDフィルターのO. D. 値。O. D. 0は $280 \text{ photons}/\mu\text{m}^2 - \text{flash}$ 。

フラッシュ光は20 msec (上部の横棒)。使用した単色光の波長は左端に示した。



《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わせ、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 1) 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,および超高压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い,またニューロパイル内におけるシナプス結合に参加する細胞の同定を行う。研究材料としては硬骨魚類嗅球およびラット海馬を用いる。

2) 混合シナプスの解析のためミミズ巨大神経セプタムの連続切片を用い,化学シナプス,ギャップ結合を含む各種結合部分化の立体的な計測を行う。

3) 超高压電顕の完成が間近いので培養細胞について,全細胞観察,その可能性の実験的根拠の検討および細胞表面情報との組み合わせの試みなど,生物試料の超高压電顕観察のための予備実験を行った。

研究結果 1) キンギョ嗅球の構成細胞であるエリマキ細胞,僧帽細胞についての三次元観察の結果,エリマキ細胞樹状突起は僧帽細胞樹状突起と密接し,糸球体層内に分布する。突起先端部はグリア細胞様に扁平となり他の神経細胞要素の間に介在する。きわめて少数のシナプスが顆粒細胞との間に認められるが,僧帽細胞および嗅神経終末部との間にはシナプスをつくらない。この結果エリマキ細胞は細胞体表面,軸索初節部のエリマキ様部をも含め,有意な興奮性入力を持たない細胞であることが推察された。(業績5)

2) ミミズ巨大神経セプタム上のシナプスの連続切片法による立体解析は,目下進行中であるが,中心巨大神経と側巨大神経との間で,ギャップ結合と化学シナプスの存在頻度およびその立体的ひろがりにより有意な差があることが確かめられた。

3) 培養細胞の観察については、3編の論文として発表された。

a) 培養細胞の薄くひろがった $0.5\mu\text{m}$ 位の厚さの部分までは、特に色収差の小さなレンズを用いれば 200KV で充分観察されることが明らかとなった。それ以上の厚さの部分については 500KV あるいはそれ以上の加速電圧を必要とすることも明らかにされた。(業績2)

b) 培養細胞の臨界点乾燥標本について、STEM像とSEM像のシグナルを加えあるいは引き去ることにより、細胞内微細構造と細胞表面像との関連を明らかにする試みについて或る程度の成果が得られた。(業績3)

この方法は将来超高压電顕による培養細胞の観察に、有効に利用されることが期待できる。

c) 吾々は培養繊維芽細胞について細胞のドメインと厚さの関係を、全細胞観察および薄切標本像から測定し、サイトコルテックス(CC。この部は細胞骨格のみからなる)約 $0.1\mu\text{m}$ 。ペリエンドプラスム(PE。この部は細胞骨格の他に小胞体を含む)約 $0.5\mu\text{m}$ 。エンドプラスム(ED。小胞体の他にミトコンドリアを含む)約 $1.2\mu\text{m}$ 。ペリヌクレアルゾーン(PN) $2\mu\text{m}$ 以上を得た。一方、各ドメインについての電子のエネルギーロスを測定した。その結果エポンに換算した厚さとして、CC(約 $0.05\mu\text{m}$)、PE(約 $0.14\mu\text{m}$)、ED(約 $0.32\mu\text{m}$)、PN(約 $0.54\mu\text{m}$)を得た。この事は各ドメインがほぼ一定の厚さを持っており、構成細胞要素に差はあっても、電子光学的にはほぼ同じデンシティー物質から成り立っていること、および臨界点乾燥法で作製した培養細胞標本は、エポン包埋試料の約27%の電子密度を持つことを示す。

部門定員の充実により今後の研究活動が期待される。

《 高次神経機構研究部門 》

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・解読し、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 末梢神経交叉縫合猫の赤核細胞におけるシナプス形成の研究

村上富士夫, 勝丸 博信, 塚原 伸晃

研 究 目 的 前肢の flexor nerve と extensor nerve を交叉縫合したのち 2
 ケ月以上経過した猫の赤核細胞では、大脳脚や大脳感覚運動野の刺激によって
 発生する単シナプス性 EPSP の立上り時間の短縮が起ることが、塚原ら及び
 藤戸らによる電気生理学的研究によって報告されている^{1), 2)}。この変化は
 交叉縫合の結果、大脳からの投射に変化が生じ、正常の投射部位（赤核細胞の
 遠位樹状突起）より細胞体部に近い樹状突起上に新しいシナプスが形成された
 ことによることが示唆されている。本研究はこれを電子顕微鏡を用いたシナプ
 スの定量的解析によって確かめることを目的としておこなった。

研 究 方 法 材料としては5匹の成熟猫を用いた。前肢の屈筋と伸筋を交叉縫合して3ケ
 月以上経過後、前肢の支配に関与する赤核脊髄路細胞をHRPの細胞内注入に
 よって染色した。大脳から赤核へ投射するシナプスを電子顕微鏡下で同定する
 ため、HRP注入の2～4日前に感覚運動領の破壊をおこなった。注入終了後
 脳を灌流固定し、Vibratomeを用いて赤核を切出した後、DAB（3-3'-
 diaminobenzidine tetrahydrochloride）によって反応さ
 せ、脱水後樹脂包埋をおこなった。

研 究 結 果 我々は5匹の末梢神経交叉縫合猫を用い、HRPの注入によって染色された
 10個の細胞を中心とする一定の領域、即ち $1.2 \times 10^7 \mu\text{m}^2$ の観察をおこな
 い、そこで見出された234個の変性終末が結合する樹状突起の太さの測定を電
 子顕微鏡写真の解析によっておこなった。図1は変性終末の結合する樹状突起

の断面の直径（短径）を横軸にとり，その太さの樹状突起と，結合するシナプス終末の数を縦軸として示したものである。左側が末梢神経交叉縫合猫での測定結果であるが，右側に正常猫で測定した同様の分布を示してある。このグラフに示されるように末梢神経交叉縫合猫では，正常猫では殆んど大脳からの投射が見られない直径 10μ 以上の太い樹状突起や細胞体部に多くの変性終末が観察された。また分布の中心が，より太い樹状突起へ移動する傾向が見出された。

同様な変化は赤核の細胞体部やその近傍にシナプスを作る小脳中位核の破壊によっても見出された³⁾。

我々は末梢神経交叉縫合猫で観察された変化が，中間に中位核から赤核への投射の脱落という過程を介して起るのかどうかということを確認するため，赤核細胞の細胞体部の周長に対する軸索終末が覆う長さの割合，即ち bouton covering ratio を測定したが，この値に正常猫で得られた値との差異は見出されなかった。

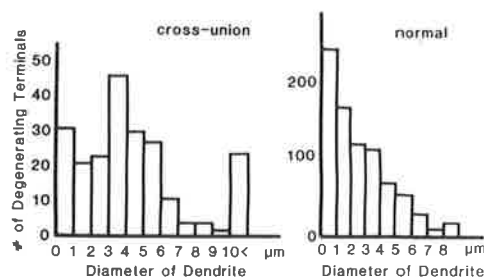


図1. 樹状突起の直径（横軸）とその太さの樹状突起や細胞体部に結合する変性終末の数（縦軸）との関係。左側の図は末梢神経交叉縫合猫，右側の図は正常猫の赤核でのもの。

以上のように電気生理学的研究とは独立におこなった解剖学的な研究によっても，前肢の屈筋と伸筋の交叉縫合の結果，大脳感覚運動領から赤核細胞の，正常投射部位より細胞体部に近い樹状突起上や細胞体部に新しいシナプスが形成されることが示された。成熟哺乳動物の中樞神経系でも新しいシナプスの形成が起り得るということは現在では既に確立された事実と言える。しかし，シナプスの形成を示した研究の大部分は脳の一部に損傷を与えることによって結果を得ており，一部にこのようなシナプス形成は脳の変性やそれによって生ずる脱支配の結果として生ずるのだという考えがある。しかし今回の我々の研究及び塚原・藤戸らによる電気生理学的研究はシナプス発芽に必ずしも変性を必要としないことを示しており，今後の高等動物の中樞神経系のシナプス発芽の機序や意義の解明に重要な役割を果たすものと考えられる。

考 察

- 1) Tsukahara, N., Fujito, Y., Oda, Y. and Maeda, J. (1982)
Formation of functional synapses in the adult
cat red nucleus from the cerebrum following

参 考 文 献

- cross-innervation of forelimb flexor and extensor nerves. I. Appearance of new synaptic potentials. *Exp. Brain Res.*, 45, 1-12.
- 2) Fujito, Y., Tsukahara, N., Oda, Y. and Yoshida, M. (1982) Formation of functional synapses in the adult cat red nucleus from the cerebrum following cross-innervation of forelimb flexor and extensor nerves. II. Analysis of newly appeared synaptic potentials. *Exp. Brain Res.*, 45, 13-18.
- 3) Murakami, F., Katsumaru, H., Saito, K. and Tsukahara, N. (1982) A quantitative study of synaptic reorganization in red nucleus neurons after lesion of the nucleus interpositus of the cat: an electron microscopic study involving intracellular injection of horseradish peroxidase. *Brain Res.*, 242.

研究課題 神経細胞の棘状突起に存在するアクチンの研究

勝丸 博信, 村上富士夫, 塚原 伸晃

研究目的 神経細胞は、樹状突起及び細胞体部において、他の神経細胞からの入力を受けているが、さらに、樹状突起から出る小突起上の棘 (Spine) にもシナプス入力を受けている。マウスを、生後 22~25 日間、暗所で飼育すると、大脳視覚領の錐体細胞の棘の数が減少するということが報告されている。¹⁾ また、このような棘の可塑的な変化が、学習や記憶に関係があることも示唆されている。棘が実際にその形を変化させるためには、それを行わせる細胞内の動力源のメカニズムとして、収縮性蛋白質を含む繊維系の存在が予想される。

我々は、このような観点に立ち、まず、収縮性蛋白質の一つであるアクチンの棘における存在を証明するために研究を行った。

研究方法 目的とする蛋白質—アクチン—を同定するために、2つの方法を用いた。まず第一は、2種類の抗体を使った、免疫組織学的方法である。灌流によって前固定したネコ脳から、赤核を含む領域を切り出し、厚さ約 50 μm の切片

を作る。アクチンに対するウサギ抗体（一次抗体）を反応させたのち、フェリチンで標識した、ウサギ抗体に対するヤギ抗体（二次抗体）を反応させる。切片をオスミウム酸により後固定した後、電子顕微鏡観察用試料を作製する。

第二番目の方法は、ウサギ骨格筋ミオシンの断片であるHMM（重メロミオシン）を結合させる方法である。ネコを、10%グリセリンを含む溶液で灌流したのち、上と同様に、0.5—1.0mmの厚さの切片にする。この切片をさらにグリセリン処理したのち、HMMを約1mg/mlの濃度で反応させる。対照として、HMM反応後、 Mg^{++} とATPを含む溶液で処理する。グルタルアルデヒドを含む液で、前固定したのち、上と同様に後固定、電子顕微鏡観察用試料を作製する。

これらの試料は、超薄切片にしたのち、電子染色をほどこし、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

抗体を反応させた試料では、樹状突起から出ている棘状の突起の中に、フェリチン粒子が付いた繊維状構造がみられた。神経細胞の微細構造は、抗体を反応させない試料のものとはほぼ同様に保持されていた。ここでみられた棘状の突起は、ミトコンドリアやリボソームを欠くこと、及びその形から、従来、棘（Spine）と呼ばれているものであると考える。

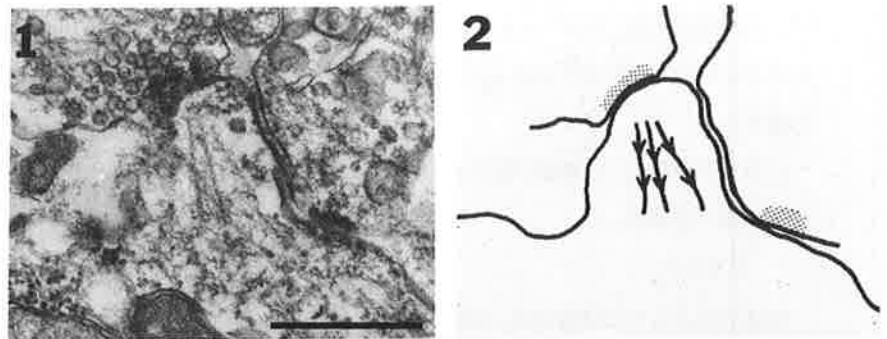
HMMを反応させた試料では、グリセリン処理のために、細胞の微細構造は損傷をうけるが、上記と同様な特徴を持つ棘状突起がみられた。図1にみられるように、そのような突起の中には、矢じり構造を有する細い繊維が、先端部から、樹状突起の中心に向かって、同じ方向に並んで存在していた（図1,2）。 Mg^{++} とATPを含む溶液で処理した試料では、このような矢じり構造はみられなかったことから、これらの繊維はアクチンであると言える。

以上の結果から、赤核神経細胞の棘の中にアクチンが存在することが証明された。さらに、小腸上皮細胞の絨毛突起（microvilli）において、報告されている²⁾のと同様の方向性を持つことから、神経細胞の棘の中のアクチンは、小腸絨毛突起のそれと同じように、突起の収縮に機能することが示唆される。神経細胞の棘の変形には、アクチン—ミオシン収縮系が働いていることは、充分考えられることであり、本研究では、少なくともその主役であるアクチンが、その機能を果たすのに有効な状態で存在することが証明された。

研究結果と考察

the visual cortex and light deprivation in the mouse. Exp. Brain Res. 3, 337-352.

- 2) Mooseker M. S. and Tilney L. G. (1975) Organization of an actin filament-membrane complex: Filament polarity and membrane attachment in the microvilli of intestinal epithelial cells. J. Cell Biol. 67, 725-743.



HMMを反応させた神経細胞の棘の電子顕微鏡写真(図1)とそのトレース(図2)。影をつけた部分はシナプス肥厚を模式的に表わす。バーは $0.5\mu\text{m}$ 。

研究課題 感覚機構の研究

坂口 博信, 窪田 道典, 塚原 伸晃

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。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電気生理学的、形態学的に研究されてきたが、それに関与している物質を明らかにする試みはなされていない。その第一ステップとして、脳切片を用い、赤核細胞への入力繊維の神経伝達物質の解明を旨としている。

研究方法 赤核領域の脳切片(厚さ $0.5 - 0.8\text{mm}$)は、4~8週間の仔猫を麻酔し、図1のように、まずカミソリ刃で中脳の部分を切り出し、次に horizontal な面に切って作製した。 $95\%\text{O}_2$ と $5\%\text{CO}_2$ の混合ガスで飽和したクレブス・リンガー液中で1時

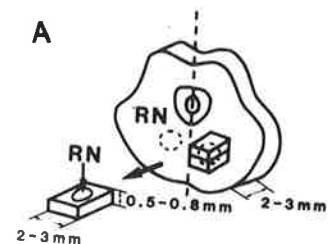


図1. 赤核領域の脳切片の作製法 RN: 赤核領域

間インキュベートした後、記録槽の中に置き、低倍のビノキュラー顕微鏡を用いて、少々赤味がかって見える円形の赤核領域に、2M-K-citrate 微少電極（5—10M）を刺入し、細胞内記録を行った。図2は記録槽の模式図を示す。脳切片はシリコン板の上に針で固定し、ポンプを用いてクレブス・リンガー液を1ml/min の速度で灌流した。記録槽の温度は33℃に保った。

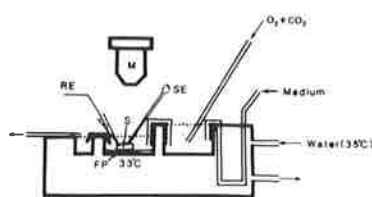


図2. 記録槽の模式図
S：脳切片 RE：記録電極
SE：刺激電極 M：顕微鏡
FP：シリコン板

赤核領域の脳切片からは、良い状態では10時間以上電気的なレスポンスが観察される。細胞内記録を行なうとEPSP及びIPSPが観察され（静止電位（40～70mV）、記録は良い状態で30分以上安定に持続する。図3は、細胞内記録によって観察された代表的なレスポンスをあらわしている。Aは立ち上がり時間の速いEPSP（1.1msec）であり、Bは立ち上がり時間の遅いEPSP（3.3msec）である。又、CはEPSPの後にIPSPが観察される。in vivoでの研究により赤核ニューロンは脳運動領より単シナプス性興奮入力（遅い立ち上がりのEPSP）及び多シナプス性抑制入力を、小脳中位核より単シナプス性興奮入力（速い立ち上がりのEPSP）を受けており、in vitroで記録された2つのEPSP及びIPSPはこれらに対応すると思われる。

これらの電位に対するCa依存性を調べた。図4は、細胞外電位とEPSPについて、Ca-freeな液で灌流した時のレスポンスの消失をあらわしている。この時、元の液にもどしてやるとレスポンスの回復がみられた。この結果はCa-freeの状態にするとシナプス伝達が阻害できることを意味している。

脳切片を用いたin vitroの系は十分in vivoの系を反映していると思われる。

研究経過

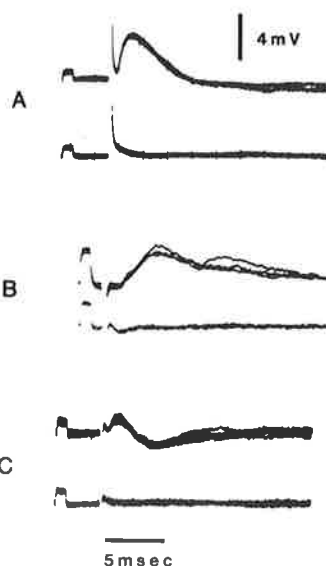


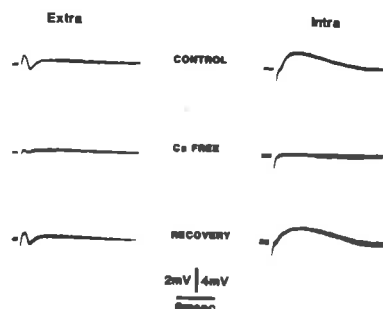
図3. 細胞内記録によって観察される代表的なレスポンス。

現在, この *in vitro* の系を用いて薬理的研究を行っている。

(今年度年報, 高次神経機構研究部門,

窪田, 坂口を参照)

図4. 細胞外電位と細胞内電位の
Ca 依存性



研究課題 脳切片を用いた猫の赤核細胞に対する薬物の作用

窪田 道典, 坂口 博信, 塚原 仲晃

研究目的 猫の赤核細胞は, 電気生理学的及び解剖学的研究によって主な入力は同定されているが, それらの神経伝達物質に関しては未だ十分な情報は得られていない。そこで, この研究では赤核細胞への入力線維の伝達物質を同定する目的で, 赤核細胞に対する種々の薬物の作用を調べた。

研究方法 上記の目的に対して, 生体に比べて細胞外液の組成を容易に変えられるなどの利点を持つ脳切片を用い, 灌流によって薬物を与えた。方法の詳細な点は, 本年報の坂口・窪田の項を参照されたい。

研究結果 4 mM のガンマアミノ酪酸を灌流した時の赤核細胞の細胞内記録を図1に示す。Aは1nA, 15 msecの過分極性電流を流して膜コンダクタンスを調べたもので, Bは膜電位の記録を示す。Bの下向きの線は, 膜コンダクタンスの指標である。Aの1, 2, 3はそれぞれBの1, 2, 3の時間に対応し, 薬物を灌流する前, 灌流中,

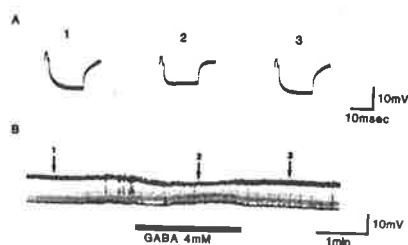


図1. 赤核細胞に対するガンマアミノ酪酸の作用。

灌流後の時間である。Bから分かるように4 mMのガンマアミノ酪酸を作用させると, 膜電位は4 mV程過分極し, その時Aの2で示されているように膜コンダクタンスは増大した。ガンマアミノ酪酸を除くと, Bで示されているよう

に膜電位は再び脱分極し静止電位に戻った。この時Aの3で示されているように膜コンダクタンスも減少して元に戻った。この細胞の静止電位は、 -57 mV であった。

次に、 4 mM のL-グルタミン酸を灌流した時の記録を図2に示

す。これは図1の細胞と同じ細胞である。図1と同様に、Aは 1 nA 、

15 msec の過分極性電流を流し

て膜コンダクタンスを調べたもの

で、Bは膜電位の記録を示す。Bから分かるように 4 mM のL-グルタミン酸を作用させると、膜電位は 40 mV 程脱分極し、それと共にAの2で示されているように膜コンダクタンスは増大した。L-グルタミン酸を除くと、Bで示されているように膜電位は徐々に静止電位にまで戻り、この時Aの3で示されているように膜コンダクタンスも元に戻った。

その他、L-アスパラギン酸、アセチルコリン、ドーパミン、ノルアドレナリンを灌流によって与えた。その結果を表1にまとめて示す。L-アスパラギン酸は、 10^{-3} M のオーダーでL-グルタミン酸とはほぼ同様の作用を持ち、膜電位を脱分極させ、膜コンダクタンスを増大させた。アセチルコリン、ドーパミン、ノルアドレナリンは、それぞれ 10^{-3} M 、 10^{-3} M 、 10^{-4} M のオーダーで作用を示さなかった。

表 1

Actions of substances on red nucleus neurones

substance	Concentration	Membrane potential	Membrane conductance
γ -Aminobutyric acid	10^{-3} M	$\downarrow$	$\uparrow$
L-Glutamic acid	10^{-3} M	$\uparrow$	$\uparrow$
L-Aspartic acid	10^{-3} M	$\uparrow$	$\uparrow$
Acetylcholine	10^{-3} M	(-)	(-)
Dopamine	10^{-3} M	(-)	(-)
L-Noradrenaline	10^{-3} M	(-)	(-)

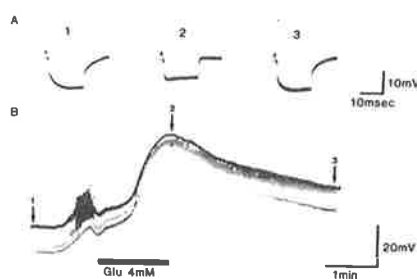


図2. 赤核細胞に対するL-グルタミン酸の作用。

考

察

赤核細胞は小脳核及び大脳より興奮性入力を、介在神経より抑制性入力を受けている。小脳核からの伝達物質に関してアセチルコリンを候補としている人もいるが、我々の実験では作用を示さなかったことから、アセチルコリンは小脳核からの伝達物質ではないと考えられる。大脳からの伝達物質に関してはL-グルタミン酸あるいはL-アスパラギン酸が、介在神経の伝達物質に関してはガンマアミノ酪酸が候補とされている。赤核細胞に対してもL-グルタミン酸及びL-アスパラギン酸は興奮性の作用を及ぼし、ガンマアミノ酪酸は抑制性の作用を及ぼした。しかし、これらの物質のさらに詳細な作用と共に、他の物質の作用も調べる必要があるであろう。

《 情報記憶研究部門 》

発生と分化の過程では、中枢神経細胞の性質は経時的に変化し、また成熟した生体においても、神経細胞の性質と機能は、状態に応じて変化する。本部門の研究は、中枢神経機能の長期状態変化に伴う可塑性を細胞レベルにおいて分析し、神経細胞の正常の性質を維持する栄養因子の作用機構の検討を目的とする。この目的のために、幼若ラットの脊髄を標本として用いる。この標本は、次の5つの利点を有する。(1) 脊髄単シナプス反射の変化を指標として、その変化の場がシナプス前か、シナプス後かを決定することが可能である。(2) 単シナプス反射弓の後シナプス神経細胞（脊髄運動ニューロン）と前シナプス神経細胞（後根神経節細胞）は共に細胞内電位記録によって分析することが可能である。(3) 発生分化に伴う変化を胎児期から、生後2週間にわたって観察することが可能である。(4) 反射経路の入力の活動性を、慢性刺激あるいはテトロドトキシン適用によって、実験的に長期にわたって変化させることが可能である。(5) 脊髄を摘出して灌流液下において細胞内電位を記録し、神経細胞の性質の変化のイオン機構を分析することが可能である。

研究目的

I) 研究方法 生後1-10日のラットの脊髄あるいは、後根神経節を摘出し、灌流液下において、脊髄運動ニューロン及び後根神経節細胞から細胞内電位を記録した。

研究方法

II) 研究経過 正常のラットにおいて、脊髄運動ニューロンの活動電位には従来から知られているNa⁺性成分の他にCa²⁺性成分が存在することを観察した（共同研究報告参照）。後根神経節細胞は、他の哺乳動物において報告されているように、過分極電流に対して時間依存性の整流現象が見られた。この整流現象は、従来、過分極によるNa⁺透過性の活性化の可能性が考えられていた。しかし、Na⁺透過性をテトロドトキシンによって阻止しても、整流現象は影響を受けないことが明らかとなった。

本年度は、部門発足に伴い、実験備品の購入と研究室の設営が主となり、研究は、計画した実験の実施の可能性の検討と、正常ラットの神経細胞の電気生理学的性質に関する若干の新知見を得たのみであった。

脊髄運動神経細胞における軸索反応のイオン機構

久野 宗, 宮田 雄平, 高橋 智幸, 八尾 寛, 原田 嘉夫

概 要 脊髄運動神経細胞の軸索を切断すると、運動ニューロンの細胞体に種々の電気生理学的変化が、数日から数週間以内に出現することが知られている。特に興味のある現象は、運動ニューロン細胞体における活動電位の振巾の増大と、正常時には見られない樹状突起の活動電位の出現である。これらの現象は、軸索切断によって、運動神経細胞体の興奮に参与するイオン機構が変化することを示唆する。従来の実験は、主として猫の脊髄運動ニューロンにおいて行われていたために、イオン機構の分析が不可能であった。本研究は、幼若ラットの脊髄を摘出し、灌流液下において運動ニューロンから細胞内電位を記録し、正常時と、軸索切断後の活動電位のイオン機構を比較することを目的とする。本年度は、部門発足に伴う研究室の設営もあり、研究目的を完成することはできなかったが、正常ラットの運動ニューロンの活動電位のイオン機構に関して、下記の新しい知見が得られた。

- 結 果**
- (1) 他の哺乳動物に報告されていると同様に、ラットの運動ニューロンの活動電位は、それに続く後脱分極と後分極によって特徴づけられる。
 - (2) 後脱分極と後分極は、共に、外液のCa濃度に依存し、外液にCoあるいはMnを加えると消失した。
 - (3) 細胞内通電によって誘発した運動ニューロンの活動電位は、テトロドトキシンの作用によって消失するが、この条件下で、脱分極をさらに増大すると時間経過の長いスパイクが発生した。
 - (4) 上記の時間経過の長いスパイクは外液中のCa濃度に依存し、CoあるいはMnによって消失した。
 - (5) テトラエチルアンモニウム(TEA)を作用させて、電圧依存性のK透過性を阻止すると、運動ニューロンの活動電位の期間が延長した。延長した活動電位は、CoあるいはMnの適用によって、TEA存在下においても、ほぼ正常の活動電位の期間にまで短縮した。したがって、TEAによって延長した活動電位は、Na性活動電位に続く、Ca性活動電位の出現によるものと推論される。
 - (6) TEA存在下において出現したCa性活動電位のピークは、正常時の後脱分極のピークと時間的に一致した。

(7) 種々のCa濃度において、後脱分極の振巾と、後過分極の振巾あるいはその期間の間には相関関係が認められた。

(8) 後過分極は、膜電位と、外液中のK濃度に依存した。

以上の結果から次の結論が得られた。幼若ラット脊髄運動ニューロンの活動電位は、Na依存性とCa依存性の二相が存在し、Ca性成分は、正常下では、電圧依存性のK透過性によって振巾が減少し、後脱分極として見られる。それに続く後過分極は、Ca依存性のK透過性の上昇に由来する。

Harada, Y. & Takahashi, T. (1981). Calcium spike in the mammalian spinal motoneuron. Proc. Japan Acad. 57: 394-397. 文 献

生 体 調 節 研 究 系

《 高次神経調節研究部門 》

概 要 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，各部門は互いに連携を保ちつつ生体における諸機能の調節統御機構を定量的に理解する方向に研究をすすめている。

高次神経調節部門では，脳より心臓に対して自律神経が最も密に分布している洞房結節と房室結節および新しく遊離心室細胞をつかって研究を行い，心臓における調節機構を解明しようとする。

研 究 方 法 微小洞房結節標本と微小房室結節標本は，今ではconventional preparationとして多くの研究室でつかわれた。今年度はコラゲナーゼ処理による単一細胞の研究が多いにすすんできた。標本の作成は，Taniguchi et al.(1981)及びTrautwein et al.(1982)に報告されたほか細胞内灌流法が開発されCa 電流の解析がすすんだ。

研 究 結 果 房室結節のNa-Kポンプについて二篇報告された。これは先に洞房結節において，野間，入沢が報告したものを更に房室結節において詳細に検討したもので，ストロファンチジン（ 10^{-5} M）の投与によりK欠液後にK再投与しておこる過分極が消失したこと，50mMKを投与すると過分極はKの逆転電位を遥かに超える電位まで負となること，一価の陽イオンのポンプK siteへの親和性は $Tl > Rb \approx K > NH_4 \approx Cs > Li$ の順であること，K再投与によっておこる外向き流と外液〔K〕濃度との間にはミカエリスメンテン形の関係があること等を明らかにし，房室結節の膜電位形成にNaポンプが持つ役割を示唆した。（倉智，野間，入沢，Pflüger's Arch 391, 261-266: 81）。つづいてコラゲナーゼ処理房室結節細胞群を用いた。これは3乃至5箇からなり立つ細胞群で正常の房室結節標本と同様な生理的性質を示し，クレフトがなくなおかつ細胞内注入が可能である。この標本を用いNa-Kポンプを立証するためNaの細胞内注入を試みた。結果，Naによる過分極は随伴する陰イオンによって効果が異なりNaIの注入によって過分極は全くあらわれないがNa glutamate, Na acetate等では過分極がおこる。すなわち陰イオンによるポンプ電流の短絡効果が著明であることがわかった。

房室結節のイオン流については、洞房結節と同様二重微小電極法で研究を行われ、この細胞が遅い内向き流 (isi), 外向き流 (ik), ih 電流の三電流系からなり立っていることを明らかにした。遅い内向き流についてそのキネティックを測定その不活性化定数, 活性化定数を決定し洞房結節活動電位のモデル再構成実験もつづけた。(野間, 国分, 入沢, 1981, Jpn. J. Physiol)。

その結果, 多細胞系において遅い内向き流を測定する場合に種々の問題点がおこってくるため, 単一細胞系においてこの問題を解決する必要に迫られた。

遅い内向き流は Na free 下でも, Ca free 下でも存在する。この遅い内向き流の性質については未だ多くのことが残されたままであるが, 多細胞標本を用いる困難性のためにこの問題は未解決となっている。房室結節細胞には過分極側で活性化するイオン流 (ih) が認められたがこの電流系をもたない細胞でありながら自発興奮をつづける細胞もあるので, ih は反復興奮には本質的に重要でないという考えを強めた。

本年度は部門全員が単一遊離細胞の研究を行った。先づ一個の細胞を遊離する方法を開発した。(谷口, 国分, 野間, 入沢, Jpn. J. Physiol 31, 547-558, 1981)。この方法により正常な心室筋細胞を分離したが, 歩調取り細胞は単一の細胞として遊離することは出来なかった。しかしこの方法をつかって, 2, 3 の新しい研究が生まれた。第一は共同研究のため京都大学医学部内科学教室(河合忠一教授)のもとより一年間来所した松田と野間・倉智・入沢との共同研究であって, 細胞外液内の Ca^{++} 濃度を増しストロファンチゲンを与えたのち反復刺激後におこる一過性脱分極 (T. D.) の原因が細胞内 Ca^{+} イオンの一過性増加であることを示したものである。さらにこのような状態下では静止膜に約 3 Hz をピークとする周期的な膜電位の動揺がおこり, この動揺は細胞内に EGTA 注入, アルカリ液の注入などによって消失する。カフェインは動揺の振幅を減少させ頻度を増加する。このような結果から細胞内の小胞体のような小器官からの Ca 摂取と遊離とが細胞膜にわずかな電位変化を起こしていることが示唆された。(生理学会, 東京, 1982)。つぎに大阪大学理学部殿村研から二年間共同研究で来所した谷口は ATP, AMP, ADP, CP, クレアチン等の細胞内注入を試み, 細胞内 ATP が直接遅い内向き流を調節していることを示唆する実験を試みた。(J. M. M. C. Supple 2, 51, 1981)。さらに大学院受託学生として三年間慈恵医大生理学教室の酒井研より来所した国分は一個の心室筋細胞を吸引電極により細胞内灌流を行い, Isi が 20~30 分以内に消失するがもし灌流液が Brown らの原法のようにイオン

液のみであれば数分も持続しないこと、ATPを細胞内灌流することが本質的に重要であることを明らかにした。(9th ICEC, 東京, 1982)。さらに国分はisiの不活性チャネル内にある Ca^{++} の量によっていて細胞内のCa濃度にはよらないことを示した(生理学会, 東京, 1982)。倉智は細胞内に種々のpH液を注入し、酸性液にてはisiが減少するのに対しアルカリ液にては増加するのを見た。細胞内プロトンが増加すると一過性の脱分極(TD)がおこるので細胞内pH増加が細胞内Caイオン濃度増加を介して、isiに影響を与えるのではないかという可能性を考えたがCaイオンの増減ではpHが直接isiを制御することを示した。(生理学会, 東京, 1982)。さらに亀山は心筋細胞においてはじめて2個の細胞の結合部を介しての結合定数を測定し、正常時においては殆んど98%の結合定数を有することを示した。野間は単一心筋における研究全般に亘って実験指導を行ったが、さらにホンブルグのザール大学に出張してSakmann氏と共に歩調取り細胞のパッチクランプに成功した。1982年においては一箇の心筋細胞の電位固定実験、パッチクランプによる実験等の広汎な研究を予定している。入沢は、1981年8月Woods HoleにおけるSoc. Gen. Physiolの第35例会に出席して、isiのペースメーカー電流における貢献度について発表した。

考 察 部門開設いらい3年間に経過した。微小洞房結節にはじまった研究は、房室結節におよんだが、今年度は全員が主として、一箇の心室筋細胞をしらべた。秋には、野間、国分らがマーストリヒトの欧州生理学会に発表を行ったほか、名古屋において国際心臓研究会日本部会を主催した。またOsterrieder博士、Morad教授が滞在して研究を行った。野間は歩調取り細胞のパッチに成功したことは特筆に価しよう。1982年は主として、ペースメーカーのパッチ法による研究に全員が力を合わせることとなり、希望ある年となった。

《高次液性調節研究部門》

オペラント摂食行動下の前頭前野背外側部単位ニューロン活動と アセチルコリン作動系

研 究 課 題

大村 裕, 西野仁雄, 井上真澄, 栗生修司

われわれは昨年度, サルを用い, 摂食行動に関与する神経回路のうち前頭前野背外側部(DLF)のオペラント摂食行動下の単位ニューロン活動とそれに関与する神経化学物質の役割について検討した。今年度はとくにアセチルコリン(ACh)作動系のさらに詳しい解析を試みた。

研 究 目 的

大脳皮質のAChは, 解剖学的に前脳基底部の無名質(Meynert核)由来であることが最近明らかになり, 行動薬理的には覚醒レベル及び記憶に関与していることが示唆されている。しかし細胞レベルの解析は十分でなく, その生理学的意義は明らかでない。そこで, 他の皮質連合野からの入力と摂食中枢である視床下部外側野からの入力収斂する部位であり, 摂食行動を方向づけていると考えられているDLFの摂食行動中のニューロン活動様式に対するACh作動系の役割ならびに無名質との機能的連絡を電気生理学的に検討した。

行動課題等の方法については前年度に述べた。カニクイザル一頭, ニホンザル二頭を用い, 視覚誘導性高FR(Fixed ratio)レバー押し摂食行動課題の学習終了後, 頭部固定金具, 記録電極誘導器具に加えて同心型刺激電極を脳定位的に無名質に植込んだ。多連微小電極を用い, オペラント摂食行動時の単一ニューロンの活動様式とそのACh感受性との相関を調べた。次にACh及びそのブロック剤(アトロピン, スコポラミン)をその単一ニューロンに同時投与しながら, 摂食行動時の活動様式の変化を検討した。さらに無名質を電気刺激(0.2-1.0 mA, 持続0.3 m秒, 0.3 Hz 50-100回)し応答を調べた。

研 究 方 法

摂食行動課題遂行時の活動様式とACh感受性の両方を調べた71個のニューロンのうちAChに対し興奮性に反応したものが45個あった。活動様式を手がかり刺激呈示期, レバー押し期, 報酬期にそれぞれ単独に活動変化を示すもの, およびそれらの複合した活動変化を示すものの4群に分類した。これら

研 究 結 果

4群におけるACh感受性は順に62%, 60%, 70%, 67%で、4群間に差はなかった。また課題遂行時に活動変化を示さないものも同じ割合でAChに反応した。

次にACh またはそのブロック剤投与下の行動時の活動様式の変化を検討した。図AはACh投与下の活動様式の変化を示したものである。手がかり音刺激呈示時点をトリガー点(三角印)としている。上段がニューロン発火を点で示したラスター表示, 下段はその加算ヒストグラムである。ACh投与により発火頻度が増加するとともに、手がかり音刺激に対する興奮性応答が著明になり、それに続く報酬箱注視時の抑制性活動変化は逆に減弱した。図BはAChを反応閾値下の量を投与した場合である(このニューロンはACh 30nAで興奮性反応を示した)。食物を口に入れた時点(矢印)をトリガー点としている。この量のACh投与でも摂食中の興奮性活動変化が増強した。図CではAChブロック剤のスコポラミンの活動様式に及ぼす効果である。AChに量反応的興奮性反応を示すニューロン(C-c)にスコポラミンを投与し、AChの効果の特異的にブロックした時点(C-d, グルタミン酸に対する興奮性は保たれている)で活動様式を調べると、C-aに示すような摂食中に活動が上昇する活動様式を示した。スコポラミン投与中止3分後AChの反応性が回復した時点(C-e)で活動様式を調べるとC-bのように摂食中の活動上昇が著明に増強した。これらの結果から、AChは一般的に興奮性活動変化を増強する作用があると結論できる。

最後に、無名質を刺激し応答を調べた。応じた25個のニューロン中17個が初期に興奮性応答を示すものであり、その応答はアトロピンでブロックできた。潜時は最も短いもので17m秒、多くが20-30m秒であった。8個は抑制性反応だけを示すものであったが、潜時が長くすべて40m秒以上であった。興奮性に応答するニューロンはAChの電気泳動的投与に対し100%興奮性に反応した。

考

察

AChは解剖学的に無名質(Meynert核)から皮質全般にわたって投射していることが判明している。本実験結果から、機能的にも非特異的投射様式を示唆するものである。すなわち、DLFニューロンの特定の活動様式との相関はなく、AChは非特異的興奮作用をもっている。またその役割としては摂食行動下の興奮性活動変化をより増強する方向に作用している。ブロック剤投与で著しく活動変化が減弱していることから、摂食行動中にAChが神経終末

から持続的に放出されて皮質細胞に対し促進的に作用していると考えられる。脳波の徐波期に比べ速波時に皮質におけるAChの放出が多いという報告もあり、能動的行動時にAChが関与していることが推測できる。

無名質の刺激実験の結果から、ACh作動系は伝導速度が $1.5 - 2\text{ m/sec}$ のC線維に属し、前頭前野皮質ニューロンに興奮性に作用していると考えられる。この結果は中隔から海馬へ投射しているACh作動系の性質と一致している。

結論：本実験で無名質から大脳皮質へのACh作動系の電気生理学的機能的連絡の一端が明らかとなった。そのACh作動系は皮質ニューロンに対し非特異的興奮作用をもち、能動的行動時の興奮性活動を增強していると考えられる。

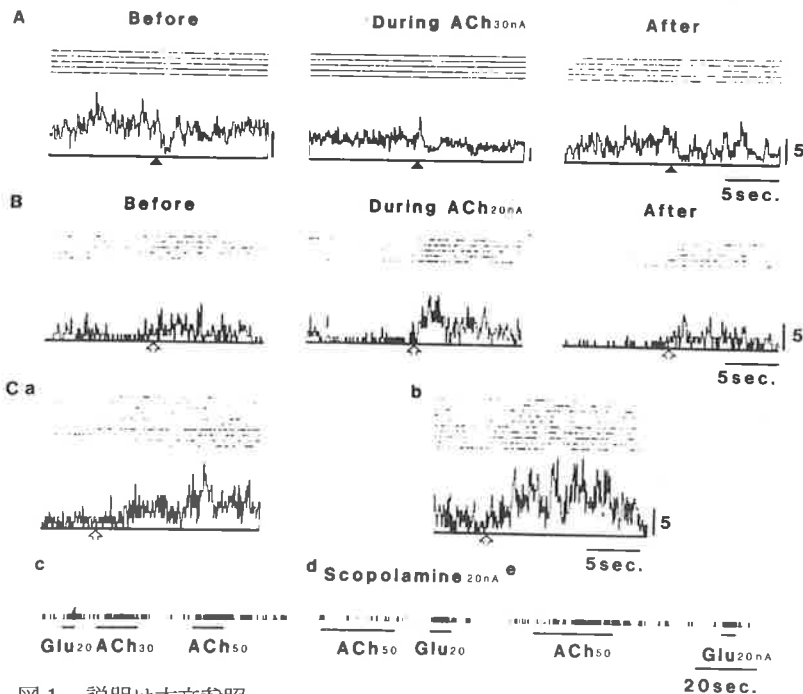


図 1. 説明は本文参照。

オペラント摂食行動下の前頭眼窩野単位ニューロン活動とその神経化学物質 研 究 課 題

西野仁雄, 大村 裕, 栗生修司, 井上真澄

摂食行動及びそれに付随する内臓諸器官の調節は視床下部を中心とする神経機構によって基本的に調節されている。前頭眼窩野(OBF)はこの視床下部と解剖学および機能的に密接な連絡を持っており、この部位の破壊や電気刺激は、摂食行動や内臓機能に影響を及ぼすことが知られている。しかし、実際の摂食行動時にどのような活動をしているか、まだ不明の点が多い。われわれ

研 究 目 的

は摂食行動時のサルOBFの単位ニューロン活動を記録し、その生理学的意義およびその活動を調節する物質の役割を明らかにすることを目的とした。

研 究 方 法

前年度に方法について詳述したが、簡単に記述すると手がかり光刺激で摂食行動を誘導するようにした視覚誘導性高FR (fixed ratio) レバー押し摂食行動課題遂行時に、サルOBFの細胞外単位ニューロン活動を導出し、活動様式を分類した。さらに、パンを報酬としたときを標準として、報酬を与えない無報酬試行と、干ブドウを報酬として与えた場合とで活動様式を比較した(サルは干ブドウの方をより好む)。その前後にノルアドレナリン(NA)、ドーパミン(DA)、アセチルコリン(ACh)、モルフィンを、また課題遂行時にブロック剤としてプロプラノロール、フェノキシベンザミン、アトロピン、そしてスピロペリドールを多連微小電極から電気泳動的に投与して、その反応性と活動様式に及ぼす影響を検討した。

研 究 結 果

1) 摂食行動時のOBFニューロン活動

レバー押し摂食行動下で、136個中106個(78%)が活動変化を示した。レバー押し行動時や摂食時に持続性の活動変化を示すものが75個(55%)、そのような持続性変化に加えて手がかり刺激にも相動的に反応するものが22個(16%)、また相動的な反応だけを示すものが9個(7%)存在した。持続性活動変化についてさらに詳しくみると、持続性変化がレバー押し期に限られ、報酬期にはもとに戻る型と、活動変化が報酬期まで持続する型とがあった。前者の型のニューロンが最も多く、そのうち活動低下型が44個(32%)、活動上昇型が34個(25%)で活動変化したニューロンの71%を占めた。後者のニューロンは、活動低下型14個(10%)、活動上昇型5個(4%)であった。

このような活動様式は報酬の有無や内容により活動性が変化した。代表的な例としては、課題を遂行しても報酬を与えない無報酬試行を繰り返すとレバー押し反応をやめる以前に、ニューロンの活動変化が減弱あるいは消失した。また報酬をより好ましい干ブドウ等にかえると活動変化が増強した。無報酬とした場合、調べたニューロンの85%、報酬の内容変化に対しては50%のニューロンで活動様式に変化が起こった。また手がかりランプがついてない(すなわち報酬を獲得することができない)にもかかわらず、サルが偶発的にレバー押し行動をするときにはニューロン活動は変化しなかった。

2) 摂食行動時の活動様式における神経化学物質の役割

約 100 個のニューロンで, NA, DA, ACh およびモルフィンの反応性を調べた。NA は約 40 % が反応し, ほとんどが抑制性であった。DA, ACh およびモルフィンは約 20 % に反応性があった。そして ACh はほとんどが興奮性であった。DA とモルフィンは両方向性の反応があったが, DA は主に興奮性, モルフィンは主に抑制性であった。各薬物とも投与開始後数秒 - 20 秒の潜時で反応が起こり, 投与中止後 10 数秒から数分効果が持続する経過の長いものであった。

活動様式との相関をみると(表), NA と持続性活動低下型ニューロン, DA と持続性活動上昇型ニューロンと有意の相関があった ($P < 0.01$)。ACh は非特異的興奮作用であり, 活動様式との相関はなかった。モルフィンは NA や DA に比べ弱い相関であるが持続性活動低下型と有意の相関があった。($P < 0.05$)。NA はレバー押し期だけに活動低下するニューロンに特に反応性があったことと比較して, モルフィンはレバー押し期から摂食期にかけて持続的に活動低下するニューロンで反応性が高かった。さらに β ブロック剤のプロプラノロール投与下でレバー押し期活動低下型の活動様式がすみやかに消失した。 α ブロック剤のフェノキシベンザミンは, 初期にはその活動様式は変化しないか, もしくは増強することがあったが, 長期投与でその活動変化が消失した。一方, スピロペリドールでレバー押し期の活動上昇が消失する例があった。

OBF ニューロンは, 前頭前野背外側部のニューロンの活動様式と比較して外界感覚刺激に反応するニューロンが少なく, 摂食行動時に持続性活動変化をするニューロンが多い。このことから OBF が外界情報の処理よりも, 内界状況や行動遂行を反映した活動をしていることが考えられる。実際 OBF ニューロンは, 報酬を獲得できる状況下でしかも定まった対象に対して摂食行動を遂行するときだけ特異的に活動変化している。さらに報酬の有無や内容すなわち報酬状況一動機づけに対応して活動性が変化している。したがって OBF は報酬状況の認識に関与し, 摂食行動の合目的制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

またこのような OBF の活動変化に, NA や DA が重要な因子であることを本実験は示している。これらの物質は下位中枢に含有ニューロンがあり前頭前野に広範に線維連絡があり, 脳内自己刺激にも関連している。報酬や動因の発生や認知に関係したものとして興味あるものであり, 今後さらに検討すべき問

考 察

題であろう。

結論：本実験からOBFにはカテコールアミン系の関与により，報酬状況に対応して持続性活動変化をするニューロンが多く存在した。そしてこのニューロン群が，摂食行動およびそれに付随する内的状態の制御に重要な役割を果たしていると考えられる。

表 OBFニューロンの薬物感受性と活動様式との相関

Drugs		Firing pattern during feeding task				Total
		sustained change		Phasic change	No change	
		Decrease (A+B)	Increase (C+D)	(E)	(N)	
NA	↑	0	0	0	1	3
	→	8	20	5	8	60
	↓	24**	5	1	1	40
DA	↑	0	8**	0	0	10
	→	23	11	4	7	65
	↓	3	1	0	0	5
ACh	↑	4	6	0	3	20
	→	23	20	5	7	77
	↓	0	0	0	1	1
Mor	↑	1	2	0	0	4
	→	17	17	5	8	64
	↓	11*	2	0	0	13

生 理 機 能 研 究 施 設

《 超 高 圧 電 子 顕 微 鏡 室 》

超高圧電子顕微鏡の医学生物学への応用

有井 達夫

研 究 課 題

これまで、超高（電）圧電子顕微鏡は、高い透過能の利点を生かして、医学生物学分野においては主に、厚い生物試料の観察に応用され成果を上げてきた。生理学研究所に昭和56年度中に導入され昭和57年5月現在、順調に調整が進んでいるH-1250M型（日立製：最高印加電圧1250 kV）は、これまでの超高圧電顕の成果を結集する形で、清浄な超高真空の実現（イオンポンプおよびターボモレキュラーポンプのみによる排気系：試料室まわりの真空度 $\sim 7 \times 10^{-5}$ Pa）サイドエントリーホルダー0.2 nmの高分解能の機能を備え、像は無回転ズーム方式をとり、サイドエントリーホルダーの傾斜軸をフィルムの辺に平行とし、傾斜角の精度を $\pm 0.1^\circ$ 以内にすると等、種々の工夫を採用している。又、STEM装置、スポットスキャンニング装置等も付属しており、これらを用いることにより生物試料への照射損傷を出来るだけ低減し、立体再構築等を容易に行なえるような仕様となっている。さらに現在立体的情報を画像処理するシステムに関して研究を進めている。

研 究 目 的 及 び

研 究 経 過

一方、超高圧電顕の他の重要な利点として理論的に分解能の向上が考えられこれは超高圧電顕の性能向上に伴って実現出来るようになってきた。この超高分解能については生理学研究所に導入されたものはトップエントリー型式を採用し、0.14 nmの高性能を持たせてある。前述の超高真空の条件下においての試料汚染の低減効果もあるので、生物試料においても高分解能観察が期待される。

この超高圧電顕を医学生物学上の研究に有効に応用することを目的として、生（ナマ）の生物試料観察、生物試料の高分解能観察を行なえるようにするために生物試料に適した雰囲気試料室の実現、試料支持膜作製技術の改良の研究を進めている。

これらの実験を行うための超高圧電顕室棟は昭和56年末に完成され、真空蒸着装置、ステレオスコープ、光回折装置、および生物試料作製の周辺装置等の整備が進められているが、今年度（昭和57年度）後半には、超高圧電子

顕微鏡が、いよいよ始動するので、これを用いることにより、超高圧電顕室における研究も進展するであろう。

《組織培養標本室》

神経グリアハイブリッド細胞の興奮と膜内粒子

古家喜四夫, 古家 園子

- 目 的** 神経細胞の興奮と膜内粒子の関連を神経グリアハイブリッド細胞の培養系を使って調べた。又、興奮性と cytoskeleton との関係についても実験を行った。
- 方 法** NG 108 - 15 細胞を 1 mM dBc AMP 含有 DMEM 培地で培養し、経時的に通常の培養液 (152 mM NaCl, 1.8 mM CaCl_2) 及び Na free 培養液 (152 mM Choline chloride, 10 mM CaCl_2) 中での活動電位の大きさとその最大立ち上がり速度を測定し、Na スパイクと Ca スパイクの発達の度合いを見た。一部をグルタルアルデヒドで固定し、フリーズフラクチャー法にてダブルレプリカを作製、Image analyzer にて膜内粒子の数と大きさの分布を測定した。また、TTX, ベラパミル, コルセミド, サイトカラシン B を添加して培養し、形態と興奮性におよぼす影響をみた。
- 結 果**
1. NG108 - 15 細胞では培養 3 ~ 4 日で Ca スパイク, Na スパイクが発生し始め、培養 6 ~ 7 日で最高値に達する。その時、P 面, E 面共に粒子数は約 2 倍に増加し、この粒子数の増加には興奮性を示さない Control の細胞では数の少い 10 nm 以上の粒子の発生が大きく関与していることがわかった (Fig. 1, 2, 3)。これらの膜内粒子と Na, Ca チャネルの対応について検討中である。
 2. Spinal cord 由来の細胞では TTX を加えて培養すると神経突起を出さず、興奮性発現と形態分化の過程が密接に結びついていることが知られているが、この細胞においては、TTX, ベラパミルを加えて培養しても光顕的には何らの変化もなかった。又、コルセミドやサイトカラシン B を加えて培養し、突起がなくなった状態においても、Na スパイク, Ca スパイクにはほとんど影響がなく、この細胞系においては興奮性と Cytoskeleton とは本質的には関連がないと思われる。

動物実験施設

研究課題 実験用 Aganglionosis rat の繁殖と育成

尾崎 毅

研究目的 小児外科領域で見られるヒルシュスプルング病は、大腸の腸管壁内神経叢の発達障害によってもたらされる「巨大結腸症」を主徴とする先天性の疾患であるが、近年、実験動物の中から、Aganglionosis rat と呼ばれるヒルシュスプルング病に類似の病態を示すラットが発見され、注目されている。このラットは、回腸より直腸までの腸管壁内神経叢が欠如してしており、これは Spotting lethal と名付けられた致死性の遺伝因子の支配を受けるとされている。

本研究は、ラットにおけるヒルシュスプルング病の病態生理学的研究とそれに必要な Aganglionosis rat の繁殖並びに育成を行なおうとするものである。

研究方法 Aganglionosis rat は、財団法人「動物繁殖研究所」より、繁殖用オス 1 匹、メス 2 匹を導入し、大型プラスチックケージを用いて昭和 56 年 10 月より繁殖を開始した。新生ラットは、個体識別を行なったのち毎日体重測定を行ない、発育状態を観察した。発育途上に死亡した個体は剖検を行ない、主要臓器の異常の有無を確認した。なお、ヒルシュスプルング病の病態を正常のものと比較するためには、同日令の Wister 系ラットを用いた。

研究経過 導入した繁殖用 Aganglionosis rat のメス 2 匹は、いずれも発情及び mating を確認したにもかかわらず妊娠せず、昭和 56 年 12 月に再度メス 2 匹を導入し、昭和 57 年 1 月、2 月、3 月に各 1 回ずつ計 19 匹の新生ラットを得た。このうち 7 匹が発育途中で死亡し、原因はいずれもヒルシュスプルング病による発育不良か、親ラットの食殺によるものであった。

新生ラットにおけるヒルシュスプルング病出現の割合は、第 1 回目産仔数 8 匹中 5 匹、第 2 回目 2 匹中 0 匹、第 3 回目 9 匹中 1 匹であった。

ヒルシュスプルング病で死亡した個体の肉眼的病理所見は、回腸上部の著し

い内容物の貯留とガスの産生による膨大と、回盲部以降腸管の狭小化、腸間膜の水腫などを特徴とし、大腸には内容物の通過した形跡が全く認められなかった。なお、ヒルシュスプルング病で死亡した個体の最長生存日数は28日、平均生存日数（食殺によるものを除く）は17.5日であった。

Aganglionosis rat におけるヒルシュスプルング病の発現は、毛色と連結した劣性遺伝子の支配を受けるとされているので、同遺伝子をホモに持つ個体にのみ出現する。そのため、同病ラットの出現率は、理論上、ヘテロ親同志からのもので $1/4$ となり、 $2/4$ はヘテロ、 $1/4$ は優性ホモ個体となる。このことは、新生ラットの中からヘテロ個体とホモ個体を選別する作業（後代検定）が必要であることを意味し、事実、「もどし交配」と呼ばれる方法を用いて行なう検定作業は著しく繁雑で時間と労力のかかる作業となっている。もし親の片方を劣性ホモ個体とすればヒルシュスプルング病個体の出現率は2倍に増え、しかも残りはすべてヘテロ個体となるので飛躍的に能率が上がることになるので、今後、何らかの手段を用いて、劣性ホモ個体を繁殖に供する試みを行なっていきたい。

考

察

研 究 員

《 特定領域奨励研究員 》

研 究 課 題 神経興奮とその伝達機能の分子的基础

藤田 省三

研 究 目 的 神経興奮膜の分子的基础の機能と実体を解明するためには、興奮膜に特異的に作用する神経毒素を精製し、その作用機構を明らかにすることが非常に有効である。私は Na チャネルに作用するイソギンチャク毒素の³H 標識化を行ない、毒素と神経膜との相互作用について研究をすすめた。

研 究 報 告 サンゴイソギンチャク (*Parasicyonis actinostoloides*) から毒素 (*Parasicyonis toxin*, PaTX) を精製して³H標識化を行ない、ザリガニ歩脚神経との結合様式について検討した。Na⁺-free 溶液内において 25℃で結合反応を行なわせると、1~2時間で結合量はピークに達しその後しだいに低下して、6時間以上反応させると 10μMPaTX 存在下で見られる非特異的結合と同じレベルにまで減少した。この一過性結合が毒素の生理活性に対応するものであることは、外液 KCl 濃度の上昇や軸索内への電流注入によって脱分極をおこすと毒素の生理活性が強くおさえられると同様に結合能が外液 KCl 濃度の上昇にともなって急激に低下することから明らかとなった。結合が一過性の変化を示すことは何らかの二次的要因によるものと考えられる。結合反応に使用している歩脚神経の性質を経時的に調べたところ摘出後 1~2時間経過すると興奮性が急速に失われていくことが明らかになった。時間経過が一致することから、結合量の減少は神経の経時変化に由来する可能性が高い。一過性結合のピーク時におけるみかけ上の解離定数は約 0.3 μM、飽和結合量は 3.4 fmol/mg protein であった。現在の反応条件では結合の平衡状態が得られていないと考えられるので、真の解離定数は 0.3 μM よりかなり小さいと予想される。³H-PaTX の結合における他毒素の競合を調べた。*Anemonia sulcata* の toxin II (ATX-II), サソリ毒素 (*Leiurus quinquestriatus*) の 50%阻害濃度はそれぞれ 30nM, 80nMであり、tetrodotoxin, veratridine は結合量に有意の変化を及ぼさなかった。このことは ATX-II, サソリ毒素は PaTX と共通の作用部位を持つが、後二者は作用部位が異なることを示している。

《 外国人研究員 》

Description of Activities During First Year in Laboratory of Prof. A. Kaneko
A. T. Ishida, 26 March 1982

My efforts here focused around two topics: Amino acid receptors on retinal luminosity (L-) type horizontal cells, and Photoreceptors and their synaptic complexes.

My previous studies demonstrated that L-glutamate can depolarize L-type cone horizontal cells at ≤ 100 μ M, 15X lower than the least effective concentration of L-aspartate, when extrasynaptic (i.e., pre-synaptic and glial) uptake mechanisms are saturated with relatively inert compounds. Under these conditions, the sensitivity of horizontal cells to L-glutamate is like that of other putative "glutamate synapses".

After a lengthy period of preparing the experimental apparatus here, I continued to study horizontal cells from two points of view. First, I wished to compare horizontal cells to muscles and other nerves which respond to L-glutamate. I therefore tested the effects of amides on L-type horizontal cells of carp and goldfish. Other compounds chosen for this study were analogs of L-glutamate derived from L-glutamate by substitution of side groups at either the carboxyl or amine positions of the α -carbon. Tests were performed by (1) exposing isolated superfused retinas to chosen compounds at set concentrations and for specified time periods, and (2) measuring changes in the membrane potential and light-evoked responses of the horizontal cells. I noticed that at relatively high concentrations (e.g., 3.2 mM), amides slowly depolarize horizontal cells even when the retinas are illuminated at an intensity which should reduce transmitter release from photoreceptors.

To test whether or not horizontal cell responses to amino acids

and their derivatives depend strictly on the presence of specific electron donors on the test compound molecules, conditions which isolate horizontal cells from pre-synaptic influences are desirable. I therefore examined the effects, on the membrane potential and light-evoked responses of horizontal cells, of Ca^{++} -free Ringers. The latter was concocted either by (1) simply deleting $\text{Ca}(\text{Cl}_2)$ from the Ringers recipe, or (2) adding ethylene bis (oxyethylene nitrilo) tetra acetate (EGTA) to normal Ringers at various concentrations (2-4 mM). As reported recently by other investigators, exposure of retinas to either of these kinds of solutions produced substantial (≈ 20 mV) depolarizations of horizontal cells and increases in their light-evoked responses. These effects persisted for periods as long as 10 min, and conceivably reflected effects of the lowered Ca^{++} levels on the light-dependent conductance of the photoreceptors. It is not clear how synaptic transmission was affected under the conditions I tested. Under these conditions, however, as well as in the presence of normal Ringers, horizontal cells are rapidly hyperpolarized (to membrane potentials between -70 and -80 mV) by the addition of 2-5 mM Co^{++} , and their light-evoked responses diminish concomitantly. This latter observation agrees quite well with previous reports concerning horizontal cells in numerous species. It is known that the effects of at least L-glutamate on horizontal cells persist under these conditions.

These experiments revealed several potential problems concerning the intact retina as a preparation for even rather basic pharmacologic experiments. An unequivocal chemical dissection of horizontal cells from pre-synaptic influences seems difficult to achieve in the intact retina, and this may justify other approaches, such as mechanical isolation of cells, for future detailed studies.

Along with the above, I studied the anatomy of the retina of a

marine catfish by preparing vertical, thick histological sections for light microscopy, and also examined preparations of carp, goldfish, and turtle retinas in which cells were injected with horseradish peroxidase, or stained by nitroblue tetrazolium. The aims of these projects were to identify the distribution and form of cones, and the interconnectivities of cones and horizontal cells. These projects are now in progress.

I presented results from my experiments on three occasions:

- (1) The International Comparative Neuropharmacology Symposium, Satellite to the 8th International Congress of Pharmacology (July 1981, Gifu-shi);
- (2) Chubu Seiri Gaku Danwa Kai (October 1981, Nagoya-shi); and
- (3) The 7th Seiri-ken Conference (February 1982, Okazaki-shi).

I was also fortunate to have two papers accepted for publication:

- (1) Selective Potentiation of Retinal Horizontal Cell Responses to L-Glutamate by D-Aspartate. Comparative Biochemistry and Physiology, Series C.
- (2) Ratfish Retina. Intracellular Recordings and HRP Injections in An Isolated, Superfused, All-Rod Retina. Vision Research.

技 術 課

技術課は4名が増員され、昭和56年12月現在は課長以下18名である。生理学実験研究棟が完成して2月に移転が行われた。その後しばらくは整理などに追われていたが、各研究室や研究施設が整備されてくるにつれて、それぞれの役割分担も定まってきて、組織としてまた個人としての技術力が問われる段階になっていると判断される。

昭和57年1月に「生理学研究所技術課業務分掌規則」が制定され、各持場における職務内容や課の体制が整ってきたので、課としてまた個人としての技術力を計画的に向上させてゆくことになり、各自もその目標に向かって努力することになった。

昭和56年3月13日(金)～14日(土)の両日、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。13日は技術研究発表、14日は「生理学研究所技術課の研究支援計画」「生理学研究における技官の技術修得」についての総合討論を行った。この研究会の詳しい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3号：1～44頁(B5版、6月刊)

また、昭和57年2月19日(金)～20日(土)の両日、生理学研究所において「生理学技術研究会(第4回)」を開催した。

昭和56年度から実施することになった技術課の4プロジェクト(①微小電極作成機器の開発、②電気泳動法によるタンパクライブラリーの作成、③生理学研究におけるEDP開発、④実験動物の解剖と組織標本の作成)は昭和57年度も引続いて実施されるが、昭和57年度には自主ゼミとして「マイコンの基礎」、「フォートランの基礎」、「電気回路の基礎」が予定されている。プロジェクトは、技官はこれら4プロジェクトのどれかの一つに参画して研修することになっており、勤務時間外に実施される。その他のゼミは自主参加の形で進められる。また、プロジェクトについては、終了後にその成果を公表の予定である。

その他、週1回定期的に実施されている「技術課ミーティング」などの一連の技術活動を通して、技官相互の自覚と活力、技術力を高めて行き、生理学研究所の研究体制に即応して行きたいと考えている。

研 究 活 動

発 表 論 文 (P. 77 - 92)

学 会 報 告 (P. 93 - 101)

《超微小形態生理研究部門》

Watari, H., Isogai, Y. & Nishikawa, H. (1981) Relation between Hill Constant and Allosteric Constants. J. Physiol. Soc, Japan. 43, 266

Shiga, K., Nishina, Y., Horiike, K., Tojo, H., Watari, H. & Yamano, T. (1981) Purification and properties of quasi D-amino acid oxidase from hog kidney. J. Physiol. Soc. Japan. 43, 267

Nishina, Y., Shiga, K., Tojo, H., Miura, R., Watari, H. & Yamano, T. (1981) Resonance Raman Study of D-amino Acid Oxidase-Inhibitor Complexes. J. Biochem. 90, 1515-1520

亘 弘, 志賀 潔, 二科安三 (1981), NMR による生体組織の局所的観察の進歩。医学のあゆみ 118, 185-189

亘 弘, 吉崎和男, 田中邦雄, 山田邦文, 阿部善右衛門 (1981) 核磁気共鳴法による生理機能の観察 (I)。総合臨床 30

田中邦雄, 山田邦文, 阿部善右衛門, 吉崎和男, 亘 弘 (1981) 核磁気共鳴法による生理機能の観察 (II)。総合臨床 30

亘 弘, 志賀 潔 (1981) 光解離後一酸化炭素ヘモグロビンの再成について。生化学 53, 1022

亘 弘, 志賀 潔 (1981) 医学生物学における光計測の現況。計測技術 9, 42-46

Uchizono, K., Ishikawa, M., Iriki, M., Inoue, S., Komoda, Y., Nagasaki, H., Higashi, A. & Honda, K. (1981) Purification of Sleep-Promoting Substances (SPS) Eighth International Congress of Pharmacology

内菌耕二, 石川正幸, 入来正躬, 井上昌次郎, 菰田泰夫, 長崎紘明, 東 晃史, 本多和樹 (1981) 睡眠物質に関する研究。神経研究の進歩 25, 5 号

Hughes, G.M., Kikuchi, Y. & Watari, H. (1982) A study of the deformability of red blood cells of a teleost fish, the yellowtail (*seriola quinqueradiata*) and a comparison with human erythrocytes J. exp. Biol. 96, 209-220

Miura, R., Nishina, Y., Shiga, K., Tojo, H., Watari, H., Miyake, Y. & Yamano, T. (1982) A Resonance Raman Study on the Reaction Intermediates of D-Amino Acid Oxidase J. Biochem. 91, 837-843

《細胞内代謝部門》

Kaneto, A., Sato, H., Kaneko, T., Yanaihara, C., Yanaihara, N. and Kosaka, K. (1981) Stimulation of somatostatin, pancreatic polypeptide, glucagon and insulin secretion by acetylcholine infused intrapancreatically in dogs. Biomed. Res., 2(1), 57-66

Kaneto, A., Kawazu, S., Sato, H., Kaneko, T., Yanaihara, C., Yanaihara, N. and Kosaka, K. (1981) Effect of the vagal and splanchnic nerve stimulation on the release of somatostatin, pancreatic polypeptide, glucagon and insulin. Biomed. Res. 2(2), 166-176

Yanaihara, N., Suzuki, T., Sato, H., Hoshino, M., Okaru, Y. and Yanaihara, C. (1981) Dibutyryl cAMP stimulation of production and release of VIP-like immunoreactivity in a human neuroblastoma cell line. Biomed. Res., 2(6), 728-734

Obata, K., Itoh, N., Okamoto, H., Yanaihara, C., Yanaihara, N. and Suzuki, T. (1981) Identification and processing of biosynthetic precursors to vasoactive intestinal polypeptide in human neuroblastoma cells. FEBS Lett., 136(1), 123-126

Yanaihara, N., Yanaihara, C., Mochizuki, T., Iwahara, K., Fujita, T. and Iwanaga, T. (1981) Immunoreactive GRP. Peptides, 2(Suppl. 2), 185-191

《 生 体 膜 研 究 部 門 》

Kukita, F. & Yamagishi, S. (1981) Properties of channels of squid giant axons changed by perfusing solutions with non-electrolytes. Nerve Membrane, University of Tokyo Press, 221-234

Kukita, F. & Yamagishi, S. (1981) Excitation of squid giant axons below 0 °C . Biophys. J. 35, 243-247

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

Hirano, H., Nishiyama, F., Fukuda, M., Baba, S., Yamagishi, S. & Furuya, K. (1981) Binding of the cytoplasmic surface of the axolemma and induction of the prolongation of the action potential by cationized ferritin(CF). J. Electronmicroscopy. 30, 264

Yamagishi, S. & Furuya, K. (1981) Effect of intracellular Ca on membrane properties and ultrastructure in squid giant axons. J. Physiol. Soc. Japan. 43, 287

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

Sugiyama, H. & Yamashita, Y. (1981) Tritium labeling of α -neurotoxins with N-succinimidyl [^3H] propionate. J. Biochemistry 90, 729-735

Sugiyama, H. & Yamashita, Y. (1981) Synthesis and differentiation of acetylcholine receptors in cultured skeletal muscle cells. Abstracts of 8th International Congress of Pharmacology, 1981, 664

Sugiyama, H., Yamagishi, S. & Yamashita, Y. (1982) Characterization of acetylcholine receptor precursors and related components in cultured rat muscle cells. Proceedings of the Japan Academy, 58, (Ser. B) NO. 2, 40-43

Fujita, S. & Warashina, A. (1981) Potential-dependent effect of sea anemone toxin on crayfish giant axon. J. Physiol. Soc. Japan 43, 284

Satake, M., Fujita, S. & Warashina, A. (1981) Parascyonyx toxin; a novel sea anemone toxin to crustacean sodium channel. The 8th Meeting of Int. Soc. Neurochem. Abs. 336.

Warashina, A., Fujita, S. & Satake, M. (1981) Potential-dependent effect of sea anemone toxins and scorpion venom on crayfish giant axon. Pflugers Archiv 391, 273-276.

久木田文夫, 山岸俊一 (1980) 興奮性膜のイオンチャンネルの研究の最近の進歩, 表面科学, 1 142-151.

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

山岸俊一 (1981) 神経膜の内外面からみた興奮チャンネル, 生体の科学, 32, 139-145.

久木田文夫, 山岸俊一 (1981) 尿素によるイカ巨大神経のKチャンネルの活性化, 日本生物物理学会第19回年会予稿集, 46.

久木田文夫 (1981) 0 °C 以下でのイカ巨大神経の興奮, 日本生物物理学会第19回年会予稿集, 47.

古家喜四夫, 山岸俊一, 平野 寛, 西山文朗 (1981) カチオン化フェリチンのNa チャンネルへの作用, 日本生物物理学会第19回年会予稿集, 48.

藤田省三, 藁科 彬, 佐竹 明 (1981) サンゴイソギンチャク毒素とザリガニ神経の結合, 神経化学, 20, 284-287.

杉山博之, 山下幸子(1981) ラット骨格筋培養細胞の細胞内 α -トキシン結合成分の性質, 神経化学, 20, 296-299.

《 機 能 協 関 部 門 》

Metuzals, J., Terakawa, S., and Tasaki, I. (1980) The axolemma-ectoplasm complex investigated in desheathed squid giant axons. Electron microscopy 2, Biology, Publ. by the Seventh European Congress on Electron Microscopy Foundation, Leiden 12-13

Terakawa, S. (1981) Ca-K bi-ionic action potential in squid giant axons. J. Membrane Biol., 63, 41-50.

Terakawa, S. (1981) Periodic responses in squid axon membrane exposed intracellularly and extracellularly to solutions containing a single species of salt. J. Membrane Biol., 63, 51-59.

Metuzals, J., Tasaki, I., Terakawa, S., and Clapin, D. F. (1981) Removal of the Schwann sheath from the giant nerve fiber of the squid: An electronmicroscopic study of the axolemma and associated axoplasmic structures. Cell Tissue Res., 221, 1-15.

Tasaki, I. and Terakawa, S. (1981) Oscillatory miniature responses in the squid giant axon: Origin of rhythmical activities in the nerve membrane. "Cellular Pacemakers", (ed. Carpenter, D.) John Wiley & Sons, Inc. New York, N. Y. Vol. 1, pp. 163-186.

Baumgold, J., Gallant, P., Terakawa, S., and Pant, H. (1981) Tetrodotoxin affects submembranous cytoskeletal proteins in perfused squid giant axons. Biochem. Biophys. Res. Comm., 103, 653-658.

Terakawa, S. and Watanabe, A. (1981) Mechanically induced responses in

squid giant axons. Abst. 19th Ann. Meet. Biophys. Soc. Jap. P. 42.

Terakawa, S. (1982) Periodic responses in squid axon membrane separating a single-salt solution. "Physiology and Pharmacology of Epileptogenic Phenomena" (eds. Klee, M. R., Lux, H. D., & Speckmann, E-J.) Raven Press, New York, N. Y. p. 397.

Nakayama, T. (1981) Synthesis of cytoskeletal proteins in bulk-isolated neuronal perikarya. J. Neurochem. 36, 1398-1405.

渡辺 昭, (1982) 神経線維の興奮に伴う旋光性の変化., 第59回日本生理学会大会予稿集 94.

寺川 進, 渡辺 昭 (1982) 膜の引き伸ばしに対するイカ巨大神経線維の応答., 第59回日本生理学会大会予稿集 94.

中山 孝, 小宮義璋 (1981) 軸索内蛋白の合成と輸送. 代謝 18, 25-32.

《能動輸送研究部門》

Fukushima, Y., and Nakao, M. (1981) Transient State in the Phosphorylation of sodium- and potassium-transport Adenosine Triphosphatase by Adenosine Triphosphate. J. Biol. Chem., 256, 9136-9143.

福島義博, 中尾 真, (1982) (Na^+ , K^+) ATPase の化学. 日本臨床, 40, 695-707.

Nakao, M., Nakao, T., Nakayama, T., Nagai, F., and Dogen, M. (1981) Further investigation on ATP metabolism and red cell membrane integrity. Acta Biol. med. germ. 40, 1003-1008.

Sano, K., Kanamori, K., Shiba, A., and Nakao, M. (1981) Automatic assay of urinary protein using coomassie brilliant blue G-250. Anal. Biochem. 113, 197-201.

Tsukita, S., Tsukita, S., Ishikawa, H., Sato, S., and Nakao, M. (1981)

Electron microscopic study of reassociation of spectrin and actin with the human erythrocyte membrane. *J. Cell Biology* 90, 70-77.

Hara, S., Hara, Y., Nakao, T., and Nakao, M. (1981) Ligand-dependent reactivity of (Na + K)-ATPase with showdomycin. *Biochim. Biophys. Acta* 744, 53-61.

Nakao, M., Hoshino, K., and Nakao, T. (1981) Constancy of cell volume during shape change of erythrocytes induced by the increasing ATP content. *J. Bioenergetics Biomembranes* 13, 307-316.

Hara, Y. and Nakao, M., (1981) Sodium ion discharge from pig kidney Na^+ , K^+ - ATPase, Na^+ -dependency of the $\text{E1P} \rightleftharpoons \text{E2P}$ equilibrium in the absence of KCl. *J. Biochem.* 90, 923-931.

Sato, S., and Nakao, M. (1981) Cross-linking of intact erythrocyte membrane with a newly synthesized cleavable bifunctional reagent. *J. Biochem.* 90, 1177-1185

Jinbu, Y., Sato, s., Nakao, T., and NaKao, M. (1982) Ankyrin is necessary for both drug-induced and ATP-induced shape change of human erythrocyte ghosts. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 104, 1087-1092.

太田英彦 (1981) 免疫レプリカ電気泳動法とその周辺, 生体の科学, 32(2) 155-161

太田英彦 小腸における脂質の吸収とキロミクロンの形成, 生体の科学, 32(3) 223-233

Fujita, M., Ohta, H., Uezato, T. (1981) Characterization of brush borders purified in isoosmotic medium and microvillous membrane subfractionated from mouse small intestine. *Biochem. J.* 196(3) 669-673

Fuijta, M., Ohta, H., Uezato, T. (1981) Endoplasmic reticulum membrane isolated from small-intestinal epithelial cells enzyme and protein

components. J. Cell Sci. 52, 215-222

《 神 經 情 報 研 究 部 門 》

金子章道 (1981) 細胞内染色法による網膜の機能形態——プロシオンイエロー法を中心に——, 神経研究の進歩, 25(3), 612-620.

Fukurotani, K. & Kaneko, A. (1981) Sensitivity changes during light- and dark- adaptation in intermediate horizontal cells of the goldfish retina *in vivo*. J. physiol. Soc. Japan, 43, 347.

Tauchi, M., Yang, X-L. & Kaneko, A. (1981) Response properties of external horizontal cells in the goldfish retina *in vivo*. J. physiol. Soc. Japan, 43, 346.

Kaneko, A. & Tachibana, M. (1981) Chromatic receptive field organization of retinal bipolar cells in the carp: double opponent cells. Neurosci. Lett., Suppl. 6, S110.

Kaneko, A. & Tachibana, M. (1981) Retinal bipolar cells with double color-opponent receptive fields. Nature, 239, 220-221.

Kaneko, A., Nishimura, Y., Tauchi, M. & Shimai, K. (1981) Morphological observation of retinal cells presumably made syncytial by an electrode penetration. J. Neurosci. Methods, 4, 299-303.

Kaneko, A., Nishimura, Y., Tachibana, M., Tauchi, M. & Shimai, K. (1981) Physiological and morphological studies of signal pathways in the carp retina. Vision Res. 21, 1519-1526.

大塚輝彌, 金子章道 (1981) 視覚受容器としての網膜, 精密機械, 47, 1035-1041.

Ohtsuka, T. (1981) Interconnection between photoreceptors and horizontal cells in the turtle retina (*Geoclemys & reevesii*). J. Physiol. Soc. Japan. 43, 344 .

大塚輝彌 (1981) 視覚の神経生理学, 科学と実験, 1月号 .

Tachibana, M. (1981) Membrane properties of solitary horizontal cells in culture. Investigative Ophthalmology and Visual Science, Suppl. 20, 3, 44.

MecLeish, P. R., Schwartz, E. A. & Tachibana, M. (1981) Voltage and time dependence of generator current in solitary rods from the salamander retina. Society for Neuroscience 11th Annual Meeting, 7, 728.

Tachibana, M. (1981) Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina. J. Physiol., 321, 141-161.

《 液 性 情 報 部 門 》

Hama, K. and Kosaka, T. (1981) Neurobiological applications of high voltage electron microscopy. Trends in Neuro Sciences, 4, 193-196.

Hosoi, J., Hama, K. and Kosaka, T. (1981) Whole mount observation of cultured cells by 200 kV ultrahigh resolution TEM. J. Electron Microsc., 30, 57-62.

Hosoi, J., Inoue, M., Kokubo, Y. and Hama, K. (1981) Addition of surface information to STEM image by signal processing. Scanning, 4, 155-158.

Hosoi, J., Oikawa, T., Inoue, M., Kokubo, Y. and Hama, K. (1981) Measurement of partial specific thickness (net thickness) of critical-point-dried cultured fibroblast by energy analysis. Ultramicroscopy,

7, 147-154.

Kosaka, T. and Hama, K. (1981) Ruffed cell: a new type of neuron with a distinctive initial unmyelinated portion of the axon in the olfactory bulb of the goldfish (*Carassius auratus*). III. Three-dimensional structure of the ruffed cell dendrite. *J. Comp. Neur.*, 201, 571-587.

《 高 次 神 經 機 構 部 門 》

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

塚原仲晃(1981) 神経損傷の回復過程(1) 中枢神経損傷, 医学のあゆみ, 116, 286-292.
藤戸 裕, 塚原仲晃(1981) 中枢神経系における機能代償の生理学. 総合リハビリテーション, 9, 11-18.

Bando, T., Tsukada, K., Yamamoto, N., Maeda, J. & Tsukahara, N. (1981) Mesencephalic neurons controlling lens accommodation in the cat. *Brain Res.* 213, 201-204.

Tsukahara, N. & Fujito, Y. (1981) Neuronal plasticity in the newborn and adult feline red nucleus. *Lesion Induced Neuronal Plasticity in Sensorimotor Systems*, edited by Flohr, H., & Precht, W., Springer Verlag, 64-74.

Fujito, Y., Tsukahara, N. & Kubota, M. (1981) Specificity and plasticity of the newly-formed corticorubral projection in chronically hemispherctomized kittens. *Neurosci. Lett.*, Suppl. 6, s81.

Tsukahara, N. (1981) Sprouting and the neuronal basis of learning. *Trends in Neuroscience*, 4, 234-237.

Tsukahara, N. (1981) Synaptic plasticity in the red nucleus. *Adv. Physiol. Sci.* vol. 2, *Regulatory Functions of the CNS.* edited by Szentagothai, J., Hamori, J. & Palkovotis, M., Pergamon Press, 1-20.

Bando, T., Tsukuda, K., Yamamoto, N., Maeda, J. & Tsukahara, N. (1981) Cortical neurons in and around the Clare-Bishop area associated with lens accommodation in the cat. *Brain Res.*, 225, 195-199.

Tsukahara, N. & Oda, Y. (1981) Appearance of new synaptic potentials at cortico-rubral synapses after the establishment of classical conditioning. *Proceeding of the Japan Academy.* 57, Ser. B, 10, 398-401.

Oda, Y., Kuwa, K., Miyasaka, S. & Tsukahara, N. (1981) Modification of rubral unit activities during classical conditioning in the cat. *Proceeding of the Japan Academy.* 57, Ser. B, 10, 402-405.

塚原伸晃 (1981) 大脳性機能代償とシナプス結合の可塑性, 神経研究の進歩, 医学書院, 25, 6, 1303-1312.

Bando, T., Tsukada, K., Yamamoto, N. & Tsukahara, T. (1981) Effect of cooling of the cerebellar peduncle on the lens accommodation evoked by cerebral stimulation. *J. Physiol. Soc. Japan.* 43, 323.

Oda, Y., Notsu, T., Kuwa, K. & Tsukahara, N. (1981) Unit activity of the red nucleus neurons associated with classical conditioning in the cat. *J. Physiol. Soc. Japan.* 43, 333.

Murakami, F., Ozawa, N., Katsumaru, H. & Tsukahara, N. (1981) Reciprocal connections between the nucleus interpositus of the cerebellum and precerebellar nuclei. *Neurosci. Lett.* 25, 209-213.

Murakami, F., Katsumaru, H., Saito, K. & Tsukahara, N. (1981) An electron-microscopic study of corticorubral projections to red nucleus neurons

identified by intracellular injection of HRP. *Neurosci. Lett.* S6, s61.

斎藤基一郎, 村上富士夫, 勝丸博信, 塚原仲晃 (1981) 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——解剖学雑誌, 56, 274.

村上富士夫 (1981) 神経細胞——形態と機能——臨床科学, 17, 1475-1482.

Maeda, J., Murakami, F. & Tsukahara, N. (1981) Measurements of the dendrites of HRP-stained red nucleus neurons using a digital image processing system. *Neurosci. Lett.* S6, s61.

Komatsu, Y., Toyama, K. Maeda, J. & Sakaguchi, H. (1981) Locations of plastic synapses in kitten striate cortex studied by current source-density analysis. *Neurosci. Lett. Suppl.* 6, s80.

小松由紀夫, 外山敬介, 前田 純, 坂口博信 (1981) 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. 第4回神経科学学術集会予稿集, 78.

前田 純, 村上富士夫, 塚原仲晃 (1981) 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. 第4回神経科学学術集会予稿集, 78.

Komatsu, Y., Toyama, K., Maeda, J. & Sakaguchi, H. (1981) Long-term potentiation investigated in a slice preparation of striate cortex of young kitten. *Neurosci. Lett.* 26, 269-274.

坂口博信, 窪田道典, 塚原仲晃 (1981) 脳切片による赤核細胞の研究. 第19回生物物理学会雑誌, 212.

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

Tsukahara, N., Fujito, Y., Oda, Y. and Maeda, J. (1982) Formation of functional synapses in the adult cat red nucleus from the cerebrum

following cross-innervation of forelimb flexor and extensor nerves. I. Appearance of new synaptic potentials. *Exp. Brain Res.*, 45, 1-12.

Fujito, Y., Tsukahara, N., Oda, Y. & Yoshida, M. (1982) Formation of functional synapses in the adult cat red nucleus from the cerebrum following cross-innervation of forelimb flexor and extensor nerves. II. Analysis of newly appeared synaptic potentials. *Exp. Brain Res.* 45, 13-18.

《高次神経調節研究部門》

Kokubun, S., Kotake, H., Noma, A. & Irisawa, H. (1980) Slow current systems in the atrioventricular node of the rabbit heart. *J. Physiol. Soc. Japan* 42, 321.

Noma, A., Kotake, H. & Irisawa, H. (1980) Ionic mechanism for the chronotropic effect of epinephrine on the rabbit sinoatrial node cell. *J. Physiol. Soc. Japan* 42, 323.

Kurachi, Y. & Irisawa, H. (1980) Interaction between Na pump and Na-Ca exchange in rabbit atrio-ventricular node cell. In 4th meeting of the working group on cardiac cellular electrophysiology. Bern, University.

Noma, A., Kotake, H., Kokubun, S. & Irisawa, H. (1981) Kinetics and rectification of the slow inward current in the rabbit sinoatrial node cell. *Jpn. J. Physiol.* 31, 491-500

Taniguchi, J., Kokubun, S., Noma, A. & Irisawa, H. (1981) Spontaneously active cells isolated from the sino-atrial and atrio-ventricular nodes of the rabbit heart. *Jpn. J. Physiol.* 31, 547-558.

Kurachi, Y., Noma, A. & Irisawa, H. (1981) Electrogenic sodium pump in

rabbit atrio-ventricular node cell. Pflüger's Arch. 391, 261-266.

Kurachi, Y., Noma, A. & Irisawa, H. (1981) Electrogenic Na pump evidenced by injecting various Na salts into the isolated A-V node cells of rabbit heart. Pflüger's Arch. 392, 89-91.

Irisawa, H., Kokubun, S. & Noma, A. (1981) Participation of the slow inward current on pacemaker depolarization in rabbit sinoatrial and atrioventricular nodes. J. Gen. Physiol. 78, 19a.

Kurachi, Y., Noma, A. & Irisawa, H. (1981) Effects of injections of various Na salts into the isolated rabbit A-V node cells. J. Mol. Cell. Cardiol. 13, suppl 2, 50.

Taniguchi, J., Noma, A. & Irisawa, H. (1981) The influence of intracellular ATP level on the membrane excitation on single ventricular cells of guinea-pig. J. Mol. Cell. Cardiol. 13, suppl 2, 51.

Noma, A., Trautwein, W. & Taniguchi, J. (1981) Mechanism underlying the Ach induced hyperpolarization in the isolated A-V node Cells. J. Mol. Cell. Cardiol. 13, suppl 2, 51.

Kurachi, Y. & Irisawa, H. (1981) Interaction between Na pump and Na-Ca exchange system in rabbit A-V node cells. J. Physiol. Soc. Japan 43, 380

Noma, A., Kokubun, S. & Taniguchi, J. (1981) Kinetics and magnitude of the slow inward current in the rabbit sino-atrial node cell. J. Physiol. Soc. Japan. 43, 385.

Kokubun, S. & Irisawa, H. (1981) Electrical activities of the internally perfused ventricular cell. In the 5th meeting of the working group on cardiac cellular electrophysiology. Maastricht, the Netherlands.

Noma, A., Taniguchi, J. & Kokubun, S. (1981) Intracellular injection of ATP and related substances into single ventricular cells of the guinea-pig. In the 5th meeting of the working group on cardiac cellular electrophysiology.

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.

野間昭典(1981) 電位固定法による心筋の自動能の機転について, 生物物理 Vol. 21(6), 302-310.

《高次液性調節研究部門》

Oomura, Y., Nishino, H., Sikdar, S. K., Aou, S. and Inoue, M. (1981) Unit recording from monkey prefrontal cortex—search for neurotransmitters involved in operant feeding behavior. Eighth International Congress of Pharmacology, Abstracts Tokyo 1981, 606.

Oomura, Y., Aou, S., Inoue, M., Sikdar, S. K., Yamabe, K., Noda, T., Nishino, H., Ono, T., Sasaki, K. and Fukuda, M. (1981) Neuronal responses during operant feeding behavior in the monkey prefrontal cortex and the role of putative neurotransmitters. J. Physiol. Soc. Japan 43, 337.

Oomura, Y., Nishino, H., Aou, S., Inoue, M., and Sikdar, S. K. (1981) Discharge pattern of the prefrontal cortex neurons during feeding behavior and their chemical sensitivity in the rhesus monkey. The EEG Journal 52, 62.

Nakamura, M., Ogata, Y. and Oomura, Y. (1981) A few example of neuronal spike train analysis by a new statistical method based on the MAICE procedure. Neurosci. Lett. 6, 62.

Oomura, Y. (1981) Chemical sensations and their perception. Adv. Physiol.

Sci. 16, 343-348.

Oomura, Y. and Ono, T. (1981) Neuronal activity in motivation of feeding behavior. Adv. Physiol. Sci. 17, Brain and Behav., 343-345.

大村 裕, 大山 浩, 富田忠雄, 小野武年 (1981) 概説生理学. 下巻一 動物的功能編. 南江堂. 東京.

大村 裕, 小野武年 (1981) 脳と行動—報酬系の生理学. モダンバイオロジーシリーズ 39, 共立出版, 東京.

大村 裕, 清水宣明 (1981) 摂食行動と脳ペプチド. 代謝 18, 53-63.

大村 裕, 清水宣明, 宮原郷士 (1981) 食欲中枢ニューロンの化学受容性. 神経精神薬理 3, 845-857.

栗生修司 (1982) 動機づけ行動時のサル前頭前野単位ニューロン活動とその薬物反応. 福岡医学誌 73, 308-327.

《超高压電子顕微鏡室》

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., 30, 121-127.

《超微小形態生理研究部門》

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

Watari, H., Shiga, K., Nishina, Y., Otsuka, J. & Kunisawa, T. (1981) On the recombination process of hemoglobin and carbon monoxide after flash photolysis. 日本生物物理学会 第19回年会講演予稿集.

曽我美勝, 長岡俊治, 井上 洋, 恵良聖一, 亘 弘, 志賀 潔, 赤坂一之 (1981) ^1H -NMP による血漿アルブミン構造転移の研究. 日本生物物理学会第19回年会予稿集.

高井 章, アジュリー F, 富田忠雄, 亘 弘 (1981) モルモット結腸紺における K 拘縮と高エネルギー磷酸. 第28回生理学中部談話会予稿集.

亘 弘, 志賀 潔, 村上政隆, 今井雄介, 富田忠雄, 山田和広, 米谷快男兄, 吉崎和男, 瀬尾芳輝 (1981) 広径試料管を用いての生体組織燐化合物の観察. 第20回NMR 討論会講演要旨集 185-188

Tojo, H., Horiike, K., Shiga, K., Nishina, Y., Miura, R., Watari, H. & Yamano, T. (1981) Thermodynamic Studies on the self-associating system of D-amino acid oxidase. The Proceeding of Seventh International Symposium on Flavins and Flavoproteins (Ann Arbor) M-2e.

Miura, R., Nishina, Y., Shiga, K., Tojo, H., Watari, H., Miyake, Y. & Yamano, T. (1981) Resonance Raman study on the reaction intermediates of D-amino acid oxidase. The Proceeding of Seventh International Symposium on Flavins and Flavoproteins (Ann Arbor) M-2f.

Shiga, K., Nishina, Y., Horiike, K., Tojo, H., Watari, H. & Yamano, T. (1981) A new material for the flavoprotein researches -Purification

and properties of hog kidney quasi D-amino acid oxidase. - The Proceeding of Seventh International Symposium on Flavins and Flavoproteins (Ann Arbor) M-2h.

Nishina, Y., Shiga, K., Tojo, H., Miura, R., Watari, H. & Yamano, T. (1981) A study of D-amino acid oxidase inhibitor complexes by resonance Raman spectroscopy. The proceeding of Seventh International Symposium on Flavins and Flavoproteins (Ann Arbor) W-2s.

《細胞内代謝研究部門》

佐藤晴子, 鈴木利光, 矢内原昇, 矢内原千鶴子, 大軽靖彦 「神経芽細胞腫培養細胞中の免疫活性VIP に対する(But)₂ cAMPの影響」 日本薬学会101年会 1981. 4. 熊本

矢内原千鶴子, 大軽靖彦, 後藤佳子, 矢内原昇, 佐藤晴子 「消化管におけるVIP様免疫活性の性状について」 日本薬学会101年会 1981. 4. 熊本

矢内原昇, 日置善雄, 亘 弘, 広橋 満 「Substance P 誘導体の構造と活性の関係」 日本薬学会101 年会 1981. 4. 熊本

Kito, S., Itoga, E., Kishida, T., Yanaihara, N., Inoue, M., and Nakamura, Y. Peptide immunohistochemistry of cultured nerve cells. Symposium on Peptide Neurotransmitters. 1981, 7. Hiedaira.

Kato, Y., Shimatsu, A., Yanaihara, N., and Imura, H. Stimulation by glucagon of somatostatin release from rat hypothalamus. Symposium on Peptide Neurotransmitters. 1981, 7. Hiedaira.

Shiraishi, T., Inoue, A., and Yanaihara, N. Effects of various neuropeptides on the lateral hypothalamus and gastric secretory mechanisms. Symposium on Peptide Neurotransmitters. 1981, 7. Hiedaira.

Yanaihara, N. Production and release of VIP in a human ganglioneuroblastoma. Symposium on Peptide Neurotransmitters. 1981, 7. Hiedaira.

佐藤晴子, 星野 稔, 矢内原昇, 大軽靖彦, 矢内原千鶴子 「神経芽細胞培養細胞系 NB-1 における VIP の産生および放出に関する研究」 第 54 回 日本生化学会 1981. 9. 仙台

星野 稔, 佐藤晴子, 鈴木利光, 矢内原昇, 矢内原千鶴子, 大軽靖彦, 荻野晃一, 日置善雄
「神経芽細胞腫培養細胞における VIP の産生」 第 5 回 神経科学学術集会 1982. 1. 横浜

神村 匡, 荻野晃一, 矢内原昇, 矢内原千鶴子 「神経芽細胞腫培養細胞膜粗画分における VIP 特異受容体に関する研究」 第 5 回 神経科学学術集会 1982. 1. 横浜

《 生 体 膜 研 究 部 門 》

山岸俊一, 古家喜四夫 「細胞内 Ca による膜特性の変化と膜内面構造」 日本生理学会 第 58 回大会 1981. 4. 徳島

平野 寛, 西山文朗, 福田 稔, 馬場幸枝, 山岸俊一, 古家喜四夫 「神経膜内表面におけるカチオン化フェリチン結合と膜興奮性の変化」 第 37 回 日本電子顕微鏡学会 1981. 5. 京都

古家喜四夫, 山岸俊一, 平野 寛, 西山文朗 「カチオン化フェリチンの Na チャネルへの作用」 日本生物物理学会 第 19 回年会 1981. 10. 福岡

久木田文夫 「0℃以下でのイカ巨大神経の興奮」 日本生物物理学会 第 19 回年会 1981. 10. 福岡

久木田文夫, 山岸俊一 「尿素によるイカ巨大神経の K チャネルの活性化」 日本生物物理学会 第 19 回年会 1981. 10. 福岡

Sugiyama, H., and Yamashita, Y. "Synthesis and differentiation of acetylcholine receptors in cultured skeletal muscle cells."
Eighth International Congress of Pharmacology, July 1981, Tokyo.

杉山博之, 山下幸子 「ラット骨格筋培養細胞内 α -トキシン結合成分の性質」 第24回 日本神経化学会 1981. 11. 長崎

山岸俊一, 古家喜四夫 「細胞内Ca, Mg およびMn イオンの膜電流に対する効果」 日本生理学会 第59回大会 1982. 3. 東京

杉山博之, 「ラット骨格筋培養細胞ACh 受容体の不均一性とその由来」 第59回 日本生理学会大会 1982. 3. 横浜

藤田省三, 藁科 彬 「膜電位に依存したサンゴイソギンチャク毒素の作用」 第58回 日本生理学会大会 1981. 4. 徳島

Satake, M., Fujita, S. & Warashina, A. "Parasicyonis toxin a novel sea anemone toxin to crustacean sodium channel" 8th Meeting of International Society for Neurochemistry 1981. 9. Nottingham U. K.

藤田省三, 藁科 彬, 佐武 明 「サンゴイソギンチャク毒素とザリガニ神経の結合」 第24回 日本神経化学会 1981. 11. 長崎

《機能協同研究部門》

寺川 進 「イカ神経線維膜の単イオン性興奮」 日本生理学会 第58回大会 1981. 4. 徳島

渡辺 昭, 酒井哲郎 「膜電位変化に伴う膜容量変化」 日本生理学会 第58回大会 1981. 4. 徳島.

寺川 進, 渡辺 昭 「膜の引き伸ばしに対するイカ巨大神経線維の応答」 日本生理学会 第59回大会 1982. 3. 東京

渡辺 昭 「神経線維の興奮に伴う旋光性の変化」 日本生理学会 第59回大会 1982. 3. 東京.

寺川 進, 渡辺 昭 「Mechanically induced responses in squid giant axons」 日本生物物理学会 第19回年会 1981. 10. 福岡

《能動輸送研究部門》

Fukushima, Y., and Nakao, M., Lower affinity of ADP-sensitive phosphoenzyme than K^{+} -sensitive phosphoenzyme of (Na^{+}, K^{+}) ATPase for divalent cations. 3rd International Conference on Na, K-ATPase 1981. New Haven.

Nakao, M., Nakao, T., Ohno, T., Fukushima, Y., Hara, Y., and Arai, M. High performance gel chromatography of horse kidney Na, K-ATPase. 3rd International Conference on Na, K-ATPase 1981. New Haven.

Hara, Y. and Nakao, M. Sodium ion discharge from pig kidney Na^{+}, K^{+} -ATPase. 3rd International Conference on Na, K-ATPase 1981. New Haven.

太田英彦 「マウス腎臓の細胞膜の分画」 第54回 日本生化学大会 1981. 9. 仙台.

神部芳則, 佐藤真悟, 中尾順子, 中尾 真 「ヒト赤血球ゴーストの形体変化に対する膜下構造の関与」 第54回 日本生化学会大会 1981. 9. 仙台

中尾 真, 星野久美子, 中尾順子, 荒居正子 「赤血球形状のATPによる変化と容積表面積」 第54回日本生化学会大会 1981. 9. 仙台

浦山 修, 中尾 真 「腎型 Na^{+}, K^{+} -ATPase のサブユニットと膜構造」 第54回 日本生化学会大会 1981. 9. 仙台

中尾順子, 大野和子, 荒居正子, 中尾 真, 神部芳則 「 Na^{+}, K^{+} -ATPase の活性最小単位」 第54回 日本生化学会大会 1981. 9. 仙台

原 論吉, 中尾 真 「 Na^{+}, K^{+} ATPase からのNa の放出」 第54回 日本生化学会大会 1981. 9. 仙台.

《神経情報研究部門》

大塚輝彌 「カメ網膜神経細胞と水平細胞の結合」 第58回 日本生理学会大会 1981. 4.

徳島

田内雅規, 楊 雄里, 金子章道 「*In vivo* キンギョ網膜外水平細胞の応答特性」 第58回
日本生理学会大会 1981. 4. 徳島

袋谷賢吉, 金子章道 「キンギョ網膜中間水平細胞の明暗順応特性」 第58回 日本生理学会大
会 1981. 4. 徳島

Ishida, A. T. " Selective Potentiation of Retinal Horizontal cell
Responses to L-Glutamate by D-Aspartate " The International Comparative
Neuropharmacology Symposium, Satellite to the 8th International
Congress of Pharmacology, July 1981, Gifu-shi.

金子章道 「Lucifer yellow の拡散を利用した水平細胞間結合様式の検討」 第28回 生理
学中部談話会 1981. 10. 名古屋保衛大

Ishida, A. T. 「L-グルタミン酸の網膜水平細胞脱分極効果に対するD-アスパラギン酸の
増強作用」 第28回 生理学中部談話会 1981. 10. 名古屋保衛大

Kaneko, A. " Carp bipolar cells with double color-opponent receptive
fields. " The Taniguchi Foundation International Symposia on Visual
Science, The Fourth Symposium Retinal Neuro-circuitry, November, 1981,
Katata.

大塚輝彌 「カメ網膜の視細胞と水平細胞間の結合様式」 第3回 国際眼研究会議日本部会
1981. 12. 東京

金子章道, 楊 雄里, 田内雅規 「L型外水平細胞における錐体入力間の相互干渉」 第5回 神
経科学学術集会 1982. 1. 横浜

田内雅規, 楊 雄里, 金子章道 「L型外水平細胞へ入力する視細胞の同定」 第5回 神経科学
学術集会 1982. 1. 横浜

Kaneko, A., Yang, X-L. & Tauchi, M. "Convergence of red-sensitive and green-sensitive cones on L-type external horizontal cells in the goldfish retina." The 7th Seiriken Conference, February, 1982, Okazaki.

Ohtsuka, T. & Kouyama, N. "Do rods converge on L-type horizontal cells of the turtle retina?" The 7th Seiriken Conference, February, 1982, Okazaki.

Ishida, A. T. "Effects of amino acid analogues on retinal L-type horizontal cells." The 7th Seiriken Conference, February, 1982, Okazaki.

Tauchi, M. & Yamada, M. "Oscillatory photoresponses of rods in the light-adapted bullfrog retina." The 7th Seiriken Conference, February, 1982, Okazaki.

Nishimura, Y., Shimai, K., Tauchi, M. and Kaneko, A.

"Three-dimensional reconstruction of carp cone pedicles" The third national congress of eye research, December, 1981, Tokyo.

《高次神経機構研究部門》

塚原仲晃, 北吉正人, 中村 真 「脳切片による赤核細胞の可塑性の研究」

日本神経科学会 第5回 学術集会 1982. 1. 横浜

板東武彦, 山本亘彦, 柿本茂文, 塚原仲晃 「焦点調節を支配する大脳視覚連合領細胞の逆行性同定について」 日本神経科学協会 第5回 学術集会 1982. 1

板東武彦, 山本亘彦, 柿本茂文, 塚原仲晃 「猫クレア・ビショップ領細胞の焦点調節刺激に対する応答」 日本生理学会 第59回大会 1982. 3. 横浜

小田洋一, 桑 一弘, 宮坂信司, 塚原仲晃 「条件付け学習に伴う大脳-赤核シナプスの伝達特性」 日本生理学会 第59回大会 1982. 3. 横浜

村上富士夫, 勝丸博信, 塚原仲晃 「末梢神経交叉縫合猫の赤核細胞のシナプス新生の電子顕微鏡による研究」 日本生理学会 第59回大会 1982. 3. 横浜.

村上富士夫, 勝丸博信, 塚原仲晃 「猫の赤核細胞の樹状突起の空間的分布パターン — HRP細胞内注入による解析」 日本解剖学会 第87回総会 1982. 4. 岐阜.

坂口博信, 窪田道典, 塚原仲晃 「脳切片による赤核細胞の研究」
日本生物物理学会 第19回年会 1981. 10. 福岡

窪田道典, 坂口博信, 塚原仲晃 「脳切片を用いた赤核細胞の研究」
日本神経科学協会 第5回学術集会 1982. 1. 横浜

《高次液性調節研究部門》

井上真澄, 大村 裕, 西野仁雄, 栗生修司, S. K. シクダール, M. ハイソنز, 片淵俊彦
「高FR摂食行動下前頭前野背外側部ニューロン活動と薬物作用」
第28回 生理学中部談話会 1981. 10. 名古屋

栗生修司, 大村 裕, 西野仁雄, 井之口昭, 水野勇司, 井上真澄
「動機づけ摂食行動下のアカゲザル前頭眼窩野単一ニューロン活動様式とその薬物反応性」
第28回 生理学中部談話会 1981. 10. 名古屋

大村 裕, 西野仁雄, S. K. シクダール, 栗生修司, 井上真澄
「サル前頭前野単位ニューロン活動 — オペラント摂食行動に関与する神経伝達物質」
第8回 国際薬理学会 1981. 7. 東京

大村 裕, 西野仁雄, 栗生修司, 井上真澄, S. K. シクダール
「摂食行動下のアカゲザル前頭前野ニューロン活動様式とその化学感受性」
国際脳波筋電図学会 1981. 9 京都

栗生修司, 大村 裕, 西野仁雄, 井上昭, 水野勇司, 井上真澄
「オペラント摂食行動下のアカゲザル前頭眼窩野ニューロン活動と動機づけの影響」

第5回 神経科学学会 1982. 1. 横浜

栗生修司, 大村 裕, 西野仁雄, 井上真澄, 井上口昭, 水野勇司

「摂食行動下のサル前頭眼窩野単一ニューロン活動に対するカテコールアミンの影響」

第59回 日本生理学会大会 1982. 3. 横浜

井上真澄, 大村 裕, 西野仁雄, 栗生修司, S. K. シクダール, M. ハイNZ, 片渕俊彦

「サル摂食行動下の前頭前野外側部ニューロン活動様式とACh作動系」

第59回 日本生理学会大会 1982. 3. 横浜

共 同 研 究 報 告

生体酸化還元機構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 (滋賀医大) 三浦 洸, 杉山俊博,
東城博雅, 山野俊雄 (大阪大医)
志賀 潔, 亘 弘 (生理研)

生体酸化還元系はエネルギー代謝などの生理機構上きわめて重要な役割を演じている。しかしながら、これらの機構についての分子レベル、あるいは、分子下レベルでの詳細については今なお多くの問題を残しているといえる。本研究は前年度行ったフラビン及びその誘導体のレーザーラマン (RR) スペクトルの研究をもとにして、酸素レベルでのフラビンの酸化還元状態の解析を行った。また、D-アミノ 酸化酵素 (DAO) の分子多様性、サブユニットの解離会合についても検討を加えた。フラビン酵素以外については、チトクローム P-450 (P-450) の反応機構について研究を行った。

DAO と O-アミノ安息香酸の複合体の RR スペクトルは、複合体を 632.8nm の光で励起した場合、 1583 cm^{-1} にフラビンの N(5)-C(4a) の振動に由来するラマン線と 569 cm^{-1} に O-アミノ安息香酸の振動に由来するラマン線のみが観察された (図 1)。この結果から、DAO のフラビンと安息香酸誘導体の電荷移動 (CT) 相互作用部位として、フラビンにおける N(5)-C(4a) 領域が重要であると結論された。 β -D-クロルアラニン、 β -D-シアノアラニンを基質としたとき、DAO の酵素反応中に 600nm 附近に CT 吸収帯をもつ反応中間体が観察され、すでに報告した。本研究ではこの中間体の RR スペクトルを解析し、488nm 及び 514.5nm の励起では酸化型フラビンに特徴的なラマン線が観察され、CT 吸収帯のみの励起では、 1585 cm^{-1} 及び 1350 cm^{-1} 附近に 2 本のラマン線が得られ、CT 相互作用にフラビンの N(5)-C(4a)、C(10a)-N(1)-C(2) の

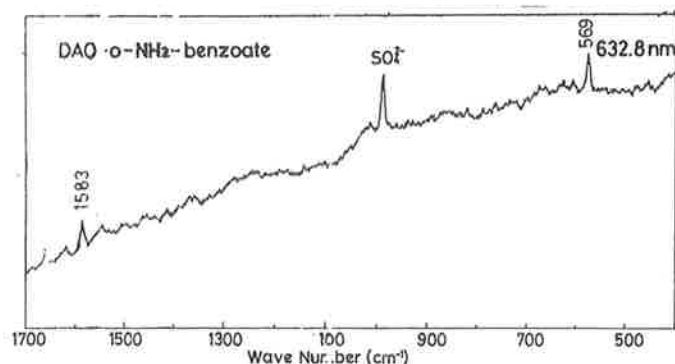


図 1. DAO-O-アミノ安息香酸複合体の共鳴ラマンスペクトル

部位が関与すること、また、 β -D-クロルアラニンの反応について、 ^{15}N を用いた逆反応の実験で、 $\text{C}=\text{N}$ の伸縮振動に由来する波数領域の 1657 cm^{-1} のラマン線にアイソトープシフトが観察された (図 2)。この結果から、反応中間体は酸化型フラビンを電子受容体とし、 β -D-クロルアラニンに由来する α -イ

ミノ- β -クロプロピオン酸を電子供与体とする CT 錯体であることが確認された。

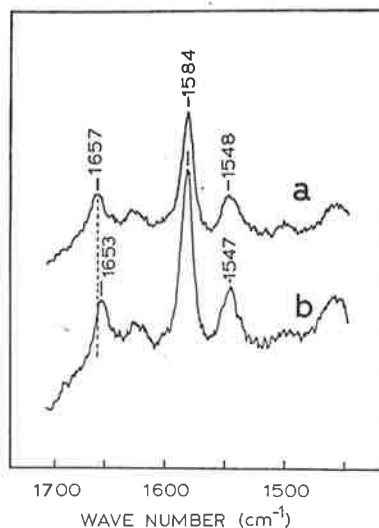


図2. DAO 反応中間体の共鳴ラマンスペクトルへの ^{15}N 置換の影響, (a) ^{14}N 硫安, (b) ^{15}N 硫安, 励起波長, 632.8nm, 反応組成, DAO, 硫安, クロルピルビン酸混液

DAO の分子多様性については, 2種のアイソザイム, DAO と quasi-DAO (QDAO), が存在することを見出し, ハイドロキシアパタイトを用いて両者を効果的に分離, 精製することに成功した。両酵素とも N 末端が Met, C 末端が Leu であるが, 酵素 1 モルあたり, DAO では Met, 5 モル, Pro, 22 モル, QDAO では Met, 4 モル, Pro, 20 モルであり, SDS 電気泳動から得られた QDAO の分子量は DAO より約 700~1000 小さいことが判明した。DAO サブユニットの解離会合については, 低角レーザー光散乱計による重量平均分子量の酵素濃度依存性を詳細に検討し, 従来認められていた単量体-二量体平衡では高濃度領域の実験データを十分に説明できないこと, また, さらに大きい重合度の分子種が関与する平衡系を考慮しなければならないことを明らかにした。非線形最小二乗法を用いた詳細なシミュレーションの結果, 本平衡が indefinite selfassociation system に属するものであることが示された。

P-450 の酸化還元については, この酵素がミクロゾーム膜で複合酵素系を構成し, 一原子酸素添加反応を触媒するが知られている。本研究では, P-450 が嫌気条件下でハロセン (CF_3CHBrCl) の還元反応をも触媒することを, ミクロゾーム膜から各成分を単離, 精製し, 複合酵素系を再構成したものをを用いて明らかにした。その結果, 本反応が 2 電子供与を必要とし, 主として $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{Cl}$ を生成することが判明した。

文 献

1. Nishina, Y., Shiga, K., Tojo, H., Miura, R., H. & Yamano, T. (1981.5)
Resonance raman study of D-amino acid oxidase-inhibitor complexes.
J. Biochem. 90, P.1515
2. Miura, R., Nishina, Y., Shiga, K., Tojo, H., Watari, H., Miyake, Y. & Yamano, T. (1982.8)
A resonance raman study on the reaction intermediate of D-amino acid oxidase, J. Biochem. 91, P.837
3. Shiga, K., Nishina, Y., Horiike, K., Yamano, T. & Watari, H. (1982)
A new material for the flavoprotein researches-purification and properties of hog kidney Quasi D-amino acid oxidase-Flavoproteins, eds. Massey, V. & Williams, C. H. Jr. Elsevier North Holland New York, in press

4. Tojo, H., Horiike, K., Shiga, K., Nishina, Y., Watari, H., Miura, R. & Yamano, T. (1982)
Thermodynamic studies on the self-associating system of D-amino acid oxidase. *Flavins and Flavoproteins*, eds. Massey, V. & Williams, C. H. Jr, Elsevier North Holland, New York, in press
5. Fujii, K., Miki, N., Sugiyama, H., Morio, M., Yamano, T. & Miyake, Y. (1981.1)
Anaerobic dehalogenation of halothane by reconstituted liver microsomal cytochrome P-450 enzyme system.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 102, P.507

神経興奮・伝達に関与する分子の性質と膜内分布様式

佐武 明, 藁科 彬 (新潟大)
山岸俊一, 杉山博之 (生理研)
藤田省三 (特定領域奨励研究員)

神経及び筋細胞膜は、興奮膜と呼ばれ神経系の情報伝達に必須の機構である。膜興奮の機構に関しては、電気生理学的手法によって詳細な研究がすすめられ、今日では興奮は各種イオンに特異的なチャネルの存在とチャネル透過性の変化によってかなりよく説明されている。Naイオンに特異的なNaチャネルは、タンパク分解酵素の細胞内投与によって影響を受けることからタンパク質であることが示唆されていたが、近年試みられたテトロドトキシン（又はサキシトキシン）レセプターの分離・精製の結果は、Naチャネルが糖鎖を持つ高分子量の疎水性タンパク質であることを示した。しかしながら個々のチャネルタンパク質の膜上や膜内における分布様式は、今だに不明のままである。

我々は、従来からイソギンチャク毒素の性質について研究を進めて来た。イソギンチャク毒素は、サソリ毒素とならんでNaチャネルに作用するポリペプチド毒素であり、テトロドトキシンなどの低分子量毒素に比べ、化学修飾や抗体の作製が容易におこなえる点で有利である。今回我々は、Naチャネルの分布様式をさぐるための手段として、イソギンチャク毒素に対する抗体の作製とイソギンチャク毒素へのケイ光色素の導入を試みた。

① 抗血清の作製

抗原としてサンゴイソギンチャク (*Parasicyonis actinostoloides*) から精製した毒素, *Parasicyonis toxin* (PaTX) を使用した。PaTXは、膜電位固定法による解析によって甲殻類神経に非常に強いアフィニティーを持つことが示唆されており (未発表), 結合飽和状態の毒素を

固定し、標識抗体によって結合部位を同定することが可能と考えられる。PaTXは、低分子量（約 3,300）であり、単独で抗原とすることは困難と予想されたので、カルボジイミドにより牛血清アルブミン（BSA）とのコンジュゲートを作製し、毒素 0.5 μ g 相当分を 3 週毎に 4 回 Freund complete adjuvant と共にウサギに注射した。頸動脈より全採血し、血清を凍結保存した。 ^3H -PaTX との結合によって抗体値を測定したところ（図 1, ○），1,000 倍希釈抗血清で 50% の結合が観察された。抗血清を種々のリガンドを持つアフィニティカラムにかけ、素通り画分について ^3H -PaTX 結合能をみたところ、PaTX 結合能を持つ物質は、anti-rabbit-IgG や BSA-PaTX によってカラムにトラップされることから、BSA-PaTX 又は PaTX を抗原決定基とする IgG であることがわかった（図 1）。抗血清をあらかじめ PaTX と 2 時間反応させておくと、ザ

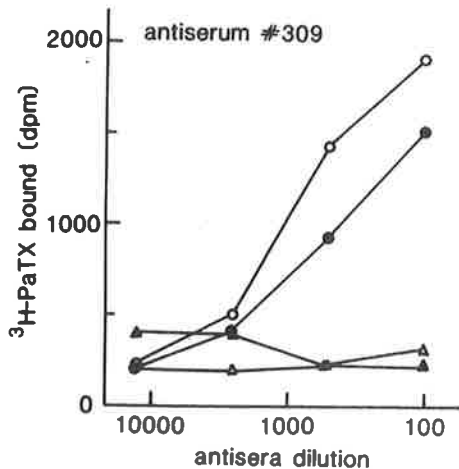


図 1. 抗血清と ^3H -PaTX の結合反応。
4°C 24 時間反応後、ゲルろ過によって bound と free を分離した。○：抗血清，△：抗血清の Sepharose-anti-rabbit-IgG カラム素通り画分，▲：Sepharose-BSA-PaTX，●：Sepharose-BSA。

して、イソギンチャク毒素の結合部位に関する知見を得るべく毒素へのケイ光色素の導入を試みた。PaTX と ATX-II について Rhodamine-B isothiocyanate (RITC), Dansyl chloride (DNS) 誘導体を合成した。RITC は、励起波長が 550 nm 付近にあり、神経組織の自己ケイ光による妨害をおさえる

ために有利と思われるが、RITC の導入によって毒素の電気的性質は大きく変化し、毒性も失なわ

りガニ巨大神経に対する PaTX の作用は阻害された。しかし別種のイソギンチャク、*Anemonia sulcata* の毒素 (ATX-II) は、抗血清によって阻害を受けなかった（図 2）。以上のように PaTX に特異的な抗血清が得られたので、今後組織化学的に毒素レセプター（Na チャネル）の分布を調べる予定である。

② ケイ光色素の導入

ケイ光色素は、周囲の環境条件に応じてケイ光スペクトルや強度を変える。この性質を利用

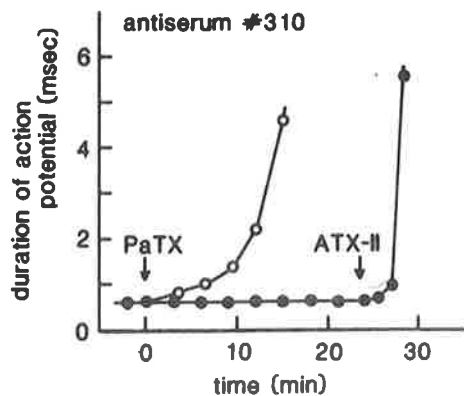


図 2. 抗血清による PaTX の活性の阻害。各毒素 (40 nM) は、5 倍希釈の抗血清と 25°C 2 時間反応後、ザリガニ巨大神経活動電位の半値幅を活性の指標としてテストした。○は、30 nM PaTX によるコントロール。

れた。DNSとATX-Ⅱの反応においては、電気的性質のそれほど変らない標識毒素が得られた。DNS-ATX-Ⅱの生理活性は、ATX-Ⅱと同程度認められたが、DNS-ATX-ⅡとATX-Ⅱの分離が若干不十分であった可能性があり、今後の課題となっている。湿重量あたりの膜面積が大きいザリガニ歩脚神経にDNS-ATX-Ⅱを作用させ、ケイ光顕微鏡にて検鏡したが、有意のケイ光を認めることが出来なかった。DNS-ATX-Ⅱの結合がおこっていないためか、DNS-ATX-Ⅱが親水性環境にあるためケイ光強度が弱いのかは現段階では明確ではない。今後DNS分子の比ケイ光強度を測定する必要がある。

脊椎動物網膜におけるシナプスの機能と微細構造

金子章道, 田内雅規, 楊 雄里 (生理研) 西村陽三
嶋井和世, 川野晃一* (慶大・医・解剖, 生理*)
袋谷賢吉 (富山大・工)

コイ網膜が錐体細胞にTelodendria(basal processes)を持っていることはCajal(1)以来知られていたが、この種の突起の機能に関しては、最近までほとんど注意が払われていなかった。ここ1, 2年やっとその機能に関する報告が出始めている。我々もすでに数年前から、この構造に興味をもち研究を進めて来た(2)。Telodendriaの機能を調べるためには、その外網状層内における空間的な広がり、他の細胞との機能的な連絡を調べることが不可欠である。

方 法

我々はHRP細胞内注入法により、コイの錐体細胞を標式し、連続薄切切片としたものを電子顕微鏡により観察し、その連続所見を復元して、Telodendriaの三次元的な広がりを調べた。またこれらの電子顕微鏡所見から外網状層内においてTelodendriaが持つ他の細胞との接触関係を調べた。

結果及び考察

この研究では2つの赤錐体と1つの青錐体を検索した。これらの3つの錐体の錐体小足はいずれも円錐状をなしており、その中でも赤錐体の1つと青錐体は、錐体小足の形態が極めて類似しており、錐体小足の形態によって錐体の種類を同定することは困難であった。

いずれの錐体においてもTelodendriaは数本あり、それらは錐体小足の硝子体面から放射状に外網状層内に拡がっていた。赤錐体のTelodendriaのいくつかは外網状層を横切って外網状層の硝子体側に達し、そこで水平細胞の細胞体と接触していた。一方、青錐体のTelodendriaは外網状層内の強膜側へ拡がっているだけで、水平細胞の細胞体に接触するものは見られなかった。

赤錐体のTelodendriaも青錐体のもの、それが他の細胞と持つ関係は4種類に分類された。即ち、(1)近隣の錐体小足に陥入し、そこで接触するもの、(2)近隣の視細胞から出るTelodendriaと接触

するもの、(3)双極細胞の樹状突起と接触するもの、(4)水平細胞と接触するものである。これらの接触位置には、まれではあるが化学シナプスを思わせる所見を示すものがあり、Telodendriaは軸索あるいは樹状突起様の働きを持つことが期待される。

発 表

1. Cajal, S. R. (1983) La rétine de vertébrés. La Cellule 9:119-246.
2. Y. Nishimura, K. Shimai, M. Tauchi & A. Kaneko (1982) Three-dimensional reconstruction of carp cone pedicles (Abstr). Jpn. J. Ophthalmol. 26, 85-86.

生理活性ペプチドの細胞内代謝に関する研究

高橋健治（京都大・霊長類研）

大塚正徳（東京医歯大・医）

谷口 洋（神戸大・医）

矢内原昇（細胞内代謝部門）

高橋は、プレペプシノーゲンのプロセッシングに關与するシグナルペプチダーゼの性状と作用機構を追求する研究の一環として、プレペプシノーゲンのシグナルペプチドの一次構造解析を行った。すなわち、ブタ胃粘膜よりペプシノーゲン mRNA を部分精製し、これより得た cDNA をプローブとして、ヒト遺伝子ライブラリーよりペプシノーゲン遺伝子のひとつを単離、クローニングし、その塩基配列を解析した。その結果、ヒトプレペプシノーゲンは 15 残基からなるシグナルペプチド：
Met-Lys-Trp-Leu-Leu-Leu-Leu-Gly-Leu-Val-Ala-Leu-Ser-Glu-Cys
を有することが明らかになった。したがって、シグナルペプチダーゼの切断点は Gys-Ile 結合（Ile はペプシノーゲンの N 末端基）となる。また、ラットおよびブタペプシノーゲンについても、それらの mRNA を用いて生合成させたプレペプチドについてラジオシーケンス分析を行い、シグナルペプチドの部分構造を決定し、ヒトの場合と類似し、ロイシン残基に富むアミノ酸配列を有することを明らかにした。更に、森山と高橋は、神経ペプチド前駆体をプロセッシングする酵素の検索を行なった。プロセッシングに關与する酵素は、前駆物質分子に含まれる塩基性ジペプチド配列に対して特異的に作用すると考えられるので、ブタ脳各部位におけるこの活性を、DNP-プロタミンをモデル基質として測定した結果、間脳の各部位において比較的強く、特に下垂体に強い活性が見られ、神経ペプチドの分布とプロタミンを基質として測定した酵素活性との間に相関がみられた。また、下垂体におけるプロタミンナーゼ活性は、可溶性分画に多く含まれるが、P₃ 分画の比活性が最も高く、膜結合性の酵素の存在が示唆された。次に、下垂体の膜分画を Triton X-100 で可溶化し、Sephacrose CL-6B のカラムでゲル濾過後、 α -ネオエンドルフィンを分解する酵素の活性

を検索した。その結果、分子量約5万と15万の酵素が見い出され、特に前者はエンケファリンには作用せず、プロセッシングに関与している可能性が示唆された。

矢内原は、ヒト神経芽細胞腫培養細胞系 NB-OK-1 における VIP 様免疫活性の産生および放出について解析した。本培養細胞系は、VIP 様免疫活性を産生し、かつ培養液中に放出することを明らかにした。しかも、VIP 様免疫活性の産生、放出は、 But_2cAMP の存在下で著しく増加した。細胞によって産生、放出されるVIP様免疫活性の分子多様性をゲルろ過によって解析した結果、VIP (分子量約3000) そのものの他に、2種類の大分子型を確認した。 But_2cAMP 存在下において、これら大分子型VIP様免疫活性の増加率は、VIP (低分子型) に比較して大であった。大分子型VIP様免疫活性がVIPの前駆体である可能性を追求するために、 ^{14}C -LeuのVIPへの取り込みを抗VIPイムノグロブリンアフィニティクロマトグラフィ、およびSDS-ゲル電気泳動によって解析した。その結果、 ^{14}C -Leuが、主に分子量3000, 8000, 11000, 15000のペプチドに取り込まれ、さらにチェイス実験によって大分子型(8000, 11000, 15000)からの分子量3000のペプチドが産生する可能性が示唆された。

大塚はSubstance Pに特異的な拮抗物質を見い出すため、30種類以上のSubstance P誘導体について検討を加えたが、これらのなかには強力な拮抗作用を示す誘導体は発見されなかった。しかし、この研究により Substance Pの活性部位に関する構造と機能の関係について有力な情報が得られた。すなわち、 $-\text{Phe}-\text{Phe}-$ 構造ならびにC末端 $-\text{Met}-\text{NH}_2$ は活性保持に重要な役割をしていることが明らかになった。

谷口は、従来神経組織に高濃度に存在し、非神経組織にはごく少量しか存在しないといわれていたGABAが膵島に高濃度に存在することを明らかにした。すなわち、酵素サイクル法によるGABAの微量測定法を確立し、諸組織のGABAを測定した結果、膵島内に中枢神経組織に匹敵する高濃度のGABAが存在した。これはアミノ酸分析によっても確認された。この高濃度のGABAの存在は、ヒト、ラット、マウスなどの哺乳動物の膵島のみならず、魚のBrockmann小体にも見られ、広く動物種間に認められることが示唆された。さらに、ラット膵島の中央部には周辺部より高濃度に存在し、逆にB細胞破壊性のStreptozotocin投与ラットの膵島ではGABAが著減することから膵島内のGABAは少なくともB細胞には高濃度に存在することが想定された。しかし、 ^3H -GABAの膵島への取り込みはほとんど認められないことより、神経系に存在するGABAとは異なる機能を有していると思われる。その理由のひとつとして、膵島内GABA濃度を γ -vinyl GABAで増加させると膵島内インスリン合成の亢進が認められ、インスリン合成への関与が示唆された。

聴覚受容器の比較生理学的研究

柳沢慧二, 浅沼 厚 (鶴見大・歯),
山岸俊一 (生理研)

音響実験室の整備をかねて本研究を行なった。側線器の有毛細胞にネオマイシンを投与すると、その応答性が可逆的に抑圧され、 Ca^{2+} がその回復を促進することが知られているが、この機構は有毛細胞の表面のイノシトールリン脂質に対して、ネオマイシンと Ca^{2+} が拮抗的に吸着することによると考えられる。この考えにとってはネオマイシンの作用部位が側線器の表面であるか、あるいはシナプス部であるかをたしかめる必要があるので、ツメガエル側線器を用いて、表面側あるいはシナプス側を別々に灌流した。シナプス側にネオマイシンを投与すると側線神経放電は消失し、化学的刺激に対する応答も消失したので、自発放電にさしたる変化のない状態で機械的刺激受容性の変化を観察している前記の現象は、明らかに側線器表面側の変化である。

蝸牛の有毛細胞においても同様の機構が存在すると考えられるが、このことを証明していくためにはいくつかの困難な点がある。たとえば、蝸牛内リンパ中の Ca^{2+} の濃度を高めるとマイクロホン電位は減少してしまうことである。ただし Ca^{2+} を除去するとマイクロホン電位はやはり減少してしまうことから、 Ca^{2+} が蝸牛内リンパ中に必要なことはいままでのない。そこで、今回は Ca^{2+} を変化させることはやめて、音響装置、無響室を用いて、モルモットに音刺激を負荷したときとしないときのイノシトールリン脂質代謝の差、およびネオマイシンのそれに対する効果を観察した。無響室はこの目的のためにきわめて有用であった。その結果、イノシトールリン脂質の多くに明らかに音負荷によって代謝の亢進がみとめられ、しかもこの代謝の亢進がネオマイシンによって抑えられていると考えられるような成績を得た。蝸牛についての成績は予報的であるが、有毛細胞における音受容の分子的機構の解明にきわめて大きな示唆を与えるものである。

網膜における情報処理機構の研究

橋本葉子 (東女医大・生理) 金子章道, 大塚輝彌,
田内雅規 (生理研)
L. E. Lipetz (Ohio State Univ.)

網膜の第2次ニューロンである水平細胞は、細胞の樹状突起の拡がりを遙かに超える大きな受容野を持つことが特徴である。この空間加重性は、同種の水平細胞間に存在する gap junction を介した電気的結合であると考えられている (1, 2)。従って、空間加重性は物理的なものであり、

水平細胞を syncytium として考えれば説明出来るものとされて来た (3, 4)。

コイ網膜において視細胞からの入力が最も単純であり、赤錐体のみからの入力を受けているとされて来た L 型外水平細胞においても、緑錐体からの入力が存在することが最近証明され (5)，更に、これらの入力間に応答を増強させる相互干渉作用が働いていることが明らかになった (6)。これらの事実から、われわれは水平細胞の応答の空間加重性が全く物理的なものであるかどうかという点を再検討した。

方 法

剥離したコイ (*Cyprinus carpio*) の網膜 (直径約 10 mm) を人工液中で灌流しながら、外水平細胞に微小電極を刺入して細胞内記録を行った。刺激光は円形のスポット光で、その中心を電極先端と合わせ、直径を $200\mu\text{m}$ から 3.2 mm まで段階的に変化させた。それぞれの大きさの刺激光について光強度と応答振幅との関係を求め、基準となる応答振幅を設定し、基準応答を生ぜしめるに必要な光強度の逆数をもって感度と定義した。刺激光の面積を増すことによって、どのように感度が増大するかを求め、用いた単色光の波長と受容野との関係を検討した。

結 果

41 例の L 型外水平細胞及び 14 例の 2 相性 C 型水平細胞から記録を行なった。細胞の種類は 451, 519 及び 706 nm の単色光に対する応答の極性から同定した。図 1 に L 型外水平細胞の 1 例を示す。振幅は、持続 400 msec の刺激光の開始後 390 msec の時点 (ほぼ応答の plateau に相

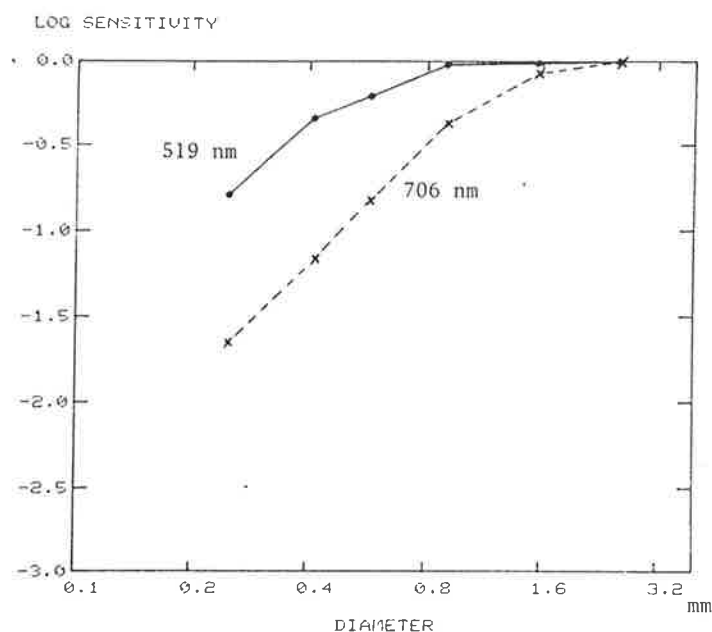


図 1. L 型外水平細胞の刺激光の直径に対する感度の変化, 706 nm および 519 nm は等光量子数を持つ単色光である。それぞれの感度は最大値を 0 として normalize した。

当する) で測定し、6 mv を基準振幅として感度を求めた。いずれの波長の光に対しても、照射面積の小さな範囲では、照射面積に比例して感度は増大し (このグラフで勾配 2 をもった直線となる)、心理物理学で知られる Ricco の法則に従った。しかし照射面積が大きくなり、519 nm の単色光に対しては直径 $400\mu\text{m}$ を超えるところで、また 706 nm の光に対しては $900\mu\text{m}$ を超えるところから、勾配 2 の直線からはず

れ、飽和する傾向を示す。この点をもって受容野と定義した。全てのL型外水平細胞において赤色光(706nm)に対する受容野は、緑色光(519nm)や青色光(451nm)に対する受容野よりも大きかった。

考 察

これまで、水平細胞の空間加重性を検討する実験では、照射面積と応答振幅との関係を求めることが一般的であった。しかし水平細胞の形質膜は強い整流作用を持つので、照射面積と応答振幅との間に一義的な関係を見出すことは困難であった。今回の実験では、応答の振幅を一定とした基準を設け、感度を求める方法を用いたので、水平細胞の膜特性による非線形性を避けることが出来た。その結果、限られた範囲では視感度と照射面積とが正比例するという心理物理学で知られているRioccoの法則が水平細胞にも適用出来ることが明らかになった。

さらに、波長によってL型水平細胞の空間加重性が異なることが見出された。コイ網膜においても、赤、緑、青各種錐体はほぼ一様に分布しているから(田内ら、未発表)、水平細胞と錐体との結合が網膜の部位によって異っているとは考えにくい。むしろ、水平細胞を介して行なわれると思われる赤錐体と緑錐体との間の干渉(5, 6)が、電気的結合による応答の空間加重性を修飾しているものと推測される。実験データは引き続き解析中であり、今後更に検討を加えたい。

文 献

1. Kaneko, A. (1971) Electrical connexions between horizontal cells in the dogfish retina. *J. Physiol. (Lond.)* 213:95-105
2. Kaneko, A. & Stuart, A. E. (1980) Coupling between horizontal cells in the carp retina examined by diffusion of Lucifer yellow. *Biol. Bull.* 159:486
3. Naka, K.-I. & Ruchton, W. A. H. (1967) The generation and spread of Spontentials in fish (Cyprinidae). *J. Physiol. (Lond.)* 192:437-461
4. Norton, A. L., Spekrijse, H., Wolbarshe, M. L. & Wagner, H. G. (1968) Receptive field organization of the S-potential. *Science (N. Y.)*, 160: 1021-1022
5. Yang, X.-L., Tauchi, M. & Kaneko, A. (1982) Quantitative analysis of Photoreceptor inputs to external horizontal cells in the goldfish retina. *Jpn J. Physiol.* (in press).
6. Kaneko, A. Yang, X.-L. & Tauchi, M. (1982) Interaction between redsensitive and green-sensitive cones in the goldfish retina: an observation made in L-type external horizontal cells. *Biomed. Res.* (in press).

CCK・CCK受容体結合のNMRによる解析

菅野富夫, 斎藤篤志(北大・獣医・生理)

矢内原昇(静岡大), 亘 弘(生理研)

CCK(Cholecystokinin)は、まず、ブタの小腸粘膜から抽出され、33個のアミノ酸からなるペプチドであることが確かめられた。やがて、ブタの小腸粘膜には、このCCK-33とモル当りの生物活性がほぼ等しいCCK-39も含まれていることが明らかにされた。CCK-33のN端にさらに6個のアミノ酸が結合してCCK-39を構成する。これらCCKの生物活性は、C端にあるとされ、それらのC端ペプチドであるCCK-8あるいはCCK-7は、CCK-33よりもモル当りの生物活性は強いとされている。生物活性は約 $1/100,000$ に低下するがCCK-4も同様の生物活性を有することが報告されている。現在のところ、CCKの生理的作用とされているのは①胆のう収縮作用、②膵消化酵素放出作用および③膵腺房細胞への栄養作用である。一方、中枢神経系、特に大脳皮質には、単位重量当りでは小腸粘膜よりも高濃度のCCKが含まれていることが明らかにされ、特にCCK-8の含有量が多いとされている。しかし、CCKの中枢神経における生理作用はまだ不明である。さらに、膵と中枢神経に、CCKと特異的に結合する蛋白(CCK受容体)が同定され、その性質が調べられている。斎藤は、Williamsらと共に、初めてラットとマウスの脳からCCK受容体を抽出した。CCKとCCK受容体とがどのような結合をしているのかをNMRで調べるのが本研究の目的である。

本研究を開始する前に、CCKとCCK受容体との結合がNMRの測定限界にあるかどうかを計算してみた。ラットとマウスの脳の抽出液中に含まれる受容体数は 6×10^{12} molecules/mlと計算される。もしこの標品をNMRで測定すると、測定時間が200時間以上になる。このような長時間測定では、たとえCCKとCCK受容体結合が生じて、その結合状態を保持するとは考えられず、その結合が生物活性を現わすとも考えられない。以上の理由によって、実際の測定を断念した。

CCK・CCK受容体結合をこれまでのとは違った方向からNMRあるいはTMRによって解析する可能性はないだろうか。TMRによるATP、ADPクレアチリン酸を測定することによって、CCK・CCK受容体結合によってひきおこされる細胞内代謝変化を解析できる可能性がある。菅野と斎藤は、最近、CCK-33で摘出ラット膵灌流標本を持続的に刺激すると、チトクロームa(a₃)b、c+c₁の同時性還元、酸素消費量の増大とATP含量の増大がみられることを確かめている。さらに、ウシガエル脳灌流標本をCCK-8で持続的に刺激すると、チトクローム還元、酸素消費量の増大とATP含量の増大がおこることも確かめられている。両標本共に、それぞれの生理的機能のエネルギー供給の大部分が酸化リン酸化から供給されていることを考慮すれば、上述の結果の生理的意義の重要性がよくわかる。しかし、この時のATP測定は、標本をすりつぶして生化学的

に測定したものであり、チトクローム還元と酸素消費量とがいずれも連続的に測定されていることに対応させる際に困難が生ずる。この困難は、TMRによるATPなどのりん化合物を連続的に測定すれば解決される。ここにTMR測定の有効性がある。

中枢神経におけるCCKの作用については、今日、主として動物の行動変化の観察に限られ、CCKの細胞レベルの作用機序については何らの研究も発表されていない。TMRをこの分野に応用することによって、全く新しい研究分野が拓かれるものと期待している。

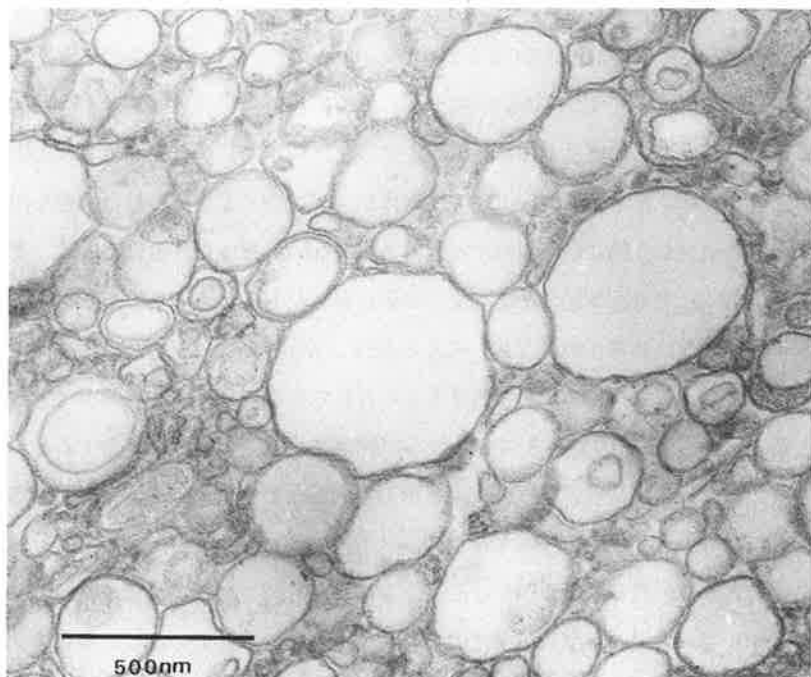
興奮性膜の動的構造形成についての研究

神野耕太郎(東京医歯大医) 渡辺 昭(生理研)

興奮現象のメカニズムを解析するうえで、興奮性膜の動的構造を明らかにすることが重要である。そのためには、intactな膜についてのみでなく、分離された膜標品についてin vitroでの実験が必要であることはいうまでもない。この研究では、イカ巨大神経線維膜の分離を試み、その電顕的観察、分光学的測定を行った。

1. 15~20匹のヤリイカ(*Doryteuthis bleekeri*)から巨大神経線維を切り出し、周囲に附着した結合織を除去した後、0.25M sucrose 液中でhomogenateして、sucrose重層遠沈法で神経線維膜を分離

した。このようにして得られた分画のペレットを固定し超薄切片にして電顕的観察を行った。膜は100~500 μ m ぐらいの径のVesicle状をなしている。このような性状はミクロソームなど他の膜と同様である。(図1)



2. 膜をsucrose(0.2M)中、海水中にsuspensionしてCDを測定し、220 nm近くにピークをもつCDスペクトルが得られた。このことから、膜に α -helicalな構造をもつある種のタンパクが存在することがわかる。このようなタンパク質が膜の構造、機能発現にどのような役割を持つか今後解明されなければならない問題の一つであると考えられる。

3. メロシアニン系色素はポテンシアル・プローブとして用いられるが、この色素の膜サスペンション中での吸光スペクトルについて調べた。天然海水中、エタノール中、アルブミン溶液中、膜サスペンション中で吸光スペクトルに著しい違いが見られた。特にピークを与える波長は、アルブミン溶液中、エタノール中、膜サスペンション中で長波長側へshiftしている。これは、メロシアニン・ローダニン系色素で膜電依存性の吸光変化の大きさが、ロダニン核についたアルキル鎖の長さに比例して大きくなることと合せて、ポテンシアル・プローブとしてのメロシアニン系色素が膜の疎水領域に結合することを強く示唆している。このような、色素の膜とのhydrophobicな結合と膜電位変化ともなる光学的变化の関係から膜の動的構造を解明する手がかりが得られる可能性がある。

眼の焦点調節の高次神経制御に関する研究

板東武彦(山梨医科大・医), 塚原伸晃(生理研),
前田 純(大阪大・基礎工)

眼の焦点調節の制御に高次神経系の果す役割が大きいことは、古くからの生理学的・心理学的研究により示唆されてきたが、近年、大脳後頭葉あるいは小脳が焦点調節に関与することを示す神経生理学的研究が報告されてきている。

本研究ではこれらの研究成果を基礎とし、焦点調節制御に果す大脳の役割を検討する手掛りを得るために、大脳を中心として焦点調節制御系の経路を明らかにすることを試みた。まず焦点調節に関与する大脳神経細胞(大脳焦点調節細胞)を生理学的に同定し、次にこれら焦点調節細胞と小脳・中脳との関係について小脳脚の冷却・電気生理学的方法を用いて検討した。

眼の焦点調節はキャンベル型オプトメータを用いて連続的にモニターした。ネコ大脳の内側上シルビウス溝の周囲で記録した173個の細胞のうち42個は、オフラインの計算機データ処理の結果、焦点調節の変化と時間的に相関を持ち、且つ焦点調節の変化に先行してスパイク発火数を増加させた。42個の焦点調節細胞のうち40個(95%)では焦点調節の増加(近方への焦点調節)に先行してスパイク数が増加した(先行時間は平均330ミリ秒)。焦点調節細胞のうち33個の記録部位を組織切片上で確認した。これらの細胞は内側上シルビウス回の内壁・底部・外壁にみら

れ、いわゆるクレア・ビショップ領とほぼ一致して分布した。

一方、小脳が焦点調節に関与することはすでに報告しているので、今回見出されたクレア・ビショップ領焦点調節細胞が小脳を経由して中脳の運動ニューロンに投射するか否について検討した。このため、上小脳脚に冷却プローブを刺入、可逆的冷却を行うことにより、小脳出力の一過性遮断を試みた。冷却により小脳中位核の刺激効果は消失したが、クレア・ビショップ領の刺激により得

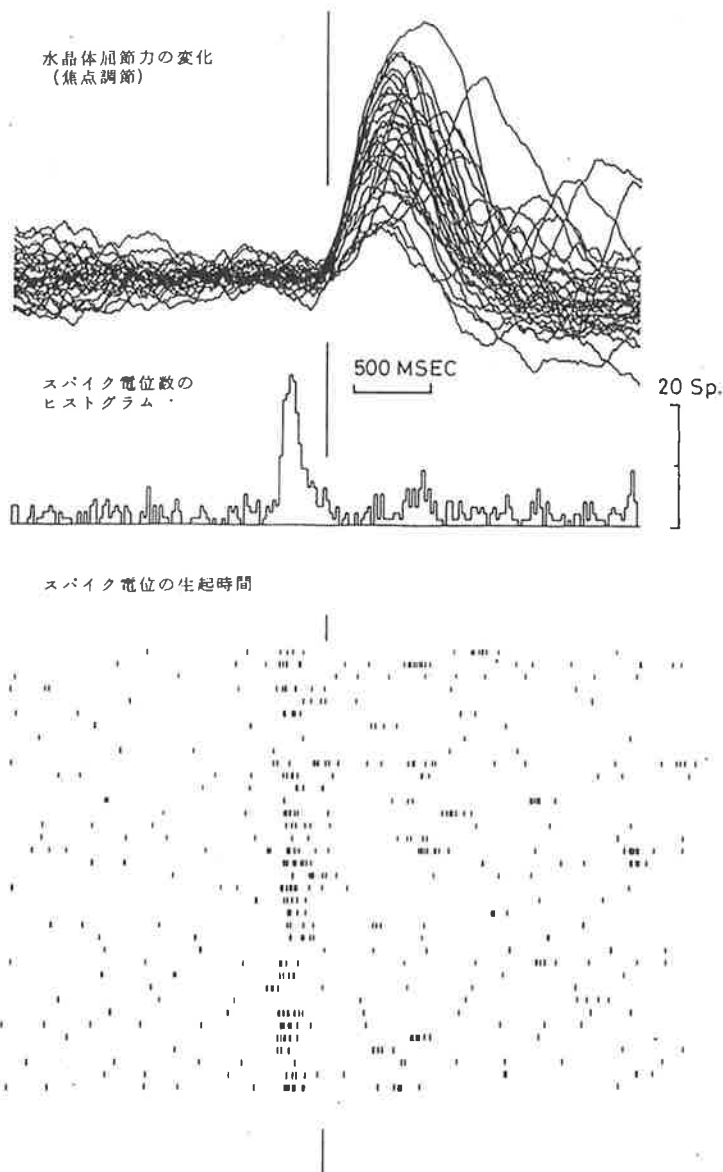


図1. 水晶体屈折力(上向きが増加、増加が近方への焦点調節を意味する)と同時に記録したスパイク電位の生起時間。上段は屈折力変化を変化の開始点を基準として重ね描きしてある。屈折力の増加に約300ミリ秒先行してスパイク数が増加している。ヒストグラムのビン巾は20ミリ秒。

られた焦点調節応答には有意な変化が認められなかった。従って、クレア・ビショップ焦点調節細胞の主な出力経路は小脳を経由しないと結論された。

次に焦点調節細胞の出力経路が直接中脳へ下行する可能性を電気生理学的方法を用いて検討した。20個の焦点調節細胞のうち12個は中脳背側部の上丘あるいは視蓋前野に刺入した刺激電極により逆行性に賦活された。また一部の標本ではさらに、中脳背側部から運動ニューロン至る経路の途中にある後交連の刺激を行った。後交連刺激により逆行性に賦活される焦点調節細胞は見出されなかった。従って恐らく、クレア・ビショップ領焦点調節細胞の軸索は中脳背側

部で終り、中脳背側部の上丘あるいは視蓋前野で中継されて中脳腹側部の運動ニューロンに達すると考えられる。

本研究の結果、ネコ大脳クレア・ビショップ領に焦点調節に関係する細胞が見出され、時間的關係から焦点調節系の制御信号あるいは内部フィードバック信号に関係すると思われる。これらの焦点調節細胞の主な出力経路は小脳を経由せず、直接中脳背側部に達すると考えられる。

文 献

- 1) Bando, T. Tsukuda, K., Yamamoto, N., Maeda, J. and Tsukahara, N. (1981)
Mesencephalic neurons controlling lens accommodation in the cat.
Brain Research. 213, 201-204.
- 2) Bando, T., Tsukuda, K., Yamamoto, N., Maeda, J. and Tsukahara, N. (1981)
Cortical neurons in and around the Clare-Bishop area related with
lens accommodation in the cat. Brain Research, 225, 195-199.

燐核磁気共鳴 (^3P NMR) による筋収縮におけるエネルギー利用の研究

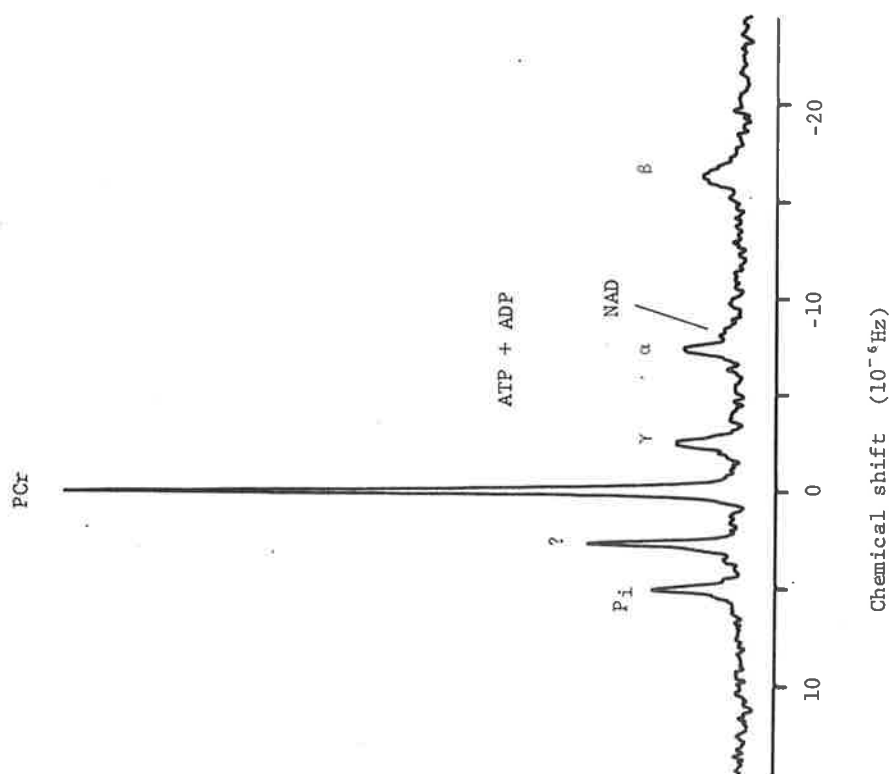
山田和廣, 米谷快男児, 田之倉優 (大分医大)
吉崎和男 (京都府立医大), 亘 弘 (生理研)

本研究の目的および方法論については、生理学研究所年報第2巻 (1981, 176ページ) にのべた。この目的にしたがい、ワイドボアマグネットに用いることのできる外径25mmの大型の試料管用の筋チェンバーを製作した。このチェンバーにはカエルの縫工筋を16ケまでとりつけることができる。また、Pt電極を用いて筋を刺激し、その張力発生を記録する。外部槽からのリンガー液の灌流、リンガー液の酸素による飽和、リンガー液の温度調節などは Dawson Gadian & Wilkie (1977) によっている。

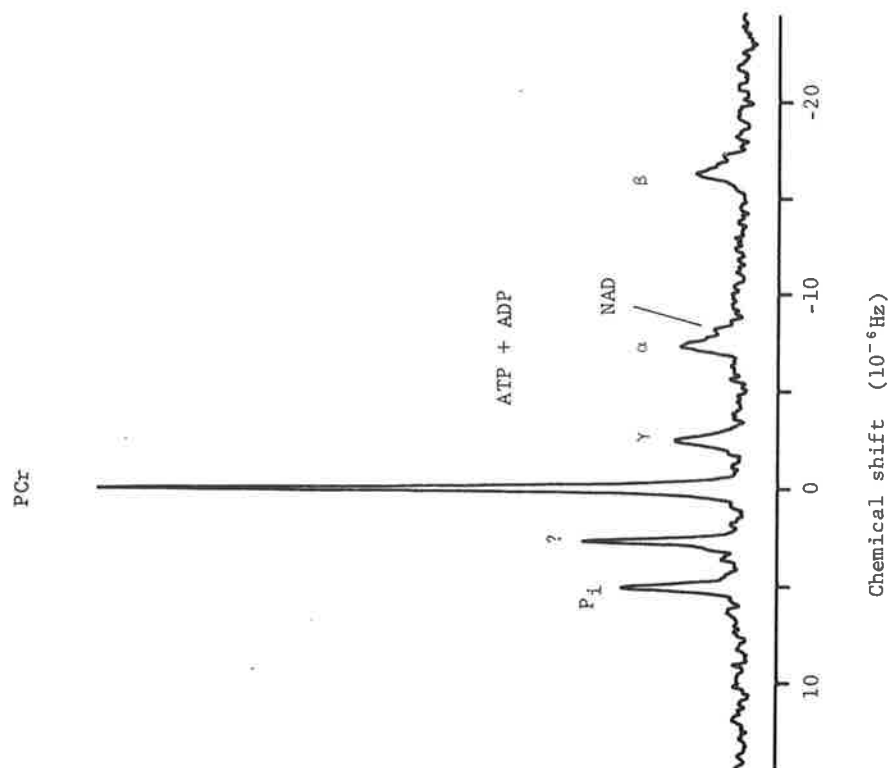
このようなチェンバーにとりつけ、生理的状态に保たれた筋に、スペクトロメータと同期した刺激パルスのトレインを与えて、テタヌ収縮させる。このようにして、収縮の直前、収縮直後、および収縮からの回復過程におけるスペクトルを比較する。

図に示したスペクトルは、このような方法によって得られたスペクトルの例である。スペクトルbは、16ケのヒキガエル縫工筋 (合計重量約7g) を用い2秒間のテタヌ収縮をさせた直後に60°パルスを2秒おきに16回照射してシグナルを加算し得られたものである。したがって、図のスペクトルの時間分解能は30秒である。図のスペクトルは、さらにこのような収縮を16回くり返し、そのシグナルを加算したものであり、したがってスキャンの数は256回である。このよう

a



b



にして、定量的測定に必要な S/N 比が得られている。また、収縮直前に得られたシグナルを同じ回数だけ加算し、静止筋のスペクトルを得た (a)。スペクトル b をスペクトル a と比べると、2 秒間のテタヌ収縮によって無機りん酸のピークが明らかに増加し、またクレアチンりん酸のピークは明らかに減少している。このような測定をテタヌ収縮の持続を変えて行い、収縮の持続による高エネルギーりん化合物の利用される時間経過を正確に知ることができる。このような実験を進めている。

ナトリウムポンプ・ATPase の脳細胞局在とその性質

浦山 修, 中尾 真 (東京医科歯科大・医),
杉山博之, 山岸俊一 (生理研)

概 要

高等動物脳は二種類のナトリウムポンプ Na, K-ATPase をもつ。一つは腎由来の酵素と同じ反応動力学と中間体の電気泳動的性質を示す分子型で、もう一つは脳にのみ局在する型である。部分精製の神経軸索膜分画はこの脳特有の酵素のみをもつことが報告され、電気的興奮との関係に興味をもたれている。私達は興奮性に違いがみられる神経芽腫と膠腫のクローンから細胞膜をそれぞれ単離し、これらの Na, K-ATPase 分子の神経細胞局在に違いがあるかどうかを調べた。得られた結果によると、神経芽腫も膠腫もともに二種類の Na, K-ATPase 分子をもつらしい。

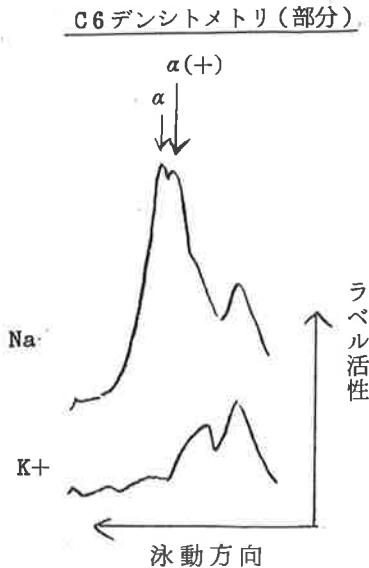
方 法

用いた細胞はマウス神経芽腫 N18TG Z とラット膠腫 C6Bu1 で、ともにウシ胎児血清 (10%) 添加の培地 DMEM で培養した。N18 は 6.9×10^7 , C6 は 8.4×10^7 の細胞を集め、デキストラン・ポリエチレングリコールによる水性二層法によって細胞膜を単離し、酵素標品とした。活性測定は (γ - 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。酵素標品の Na, K-ATPase 比活性 (μ mol Pi / mg / h で示す) および回収タンパク量は N18 では 3.4, 660 μ g, C6 では 2.2, 2800 μ g であった。脳特有型と腎型分子の区別は (1) ウアバイン感受性, および (2) (γ - 32 P)ATP を用いてリン酸化した後、リチウムドデシル硫酸・ゲル電気泳動 (Laemmli 法, 6%ゲル) を行い、そのオートラジオグラフィーで活性触媒サブユニットのラベルの泳動位置を観察することにより行った。

結果・考察

(1) N18 および C6 の Na, K-ATPase は 4mM ウアバインではほぼ完全に阻害された。みかけ上の半阻害濃度は、それぞれ 30 μ M, 80 μ M で N18 の方が約 2.7 倍高い親和性を示した。阻害の Hill

プロットではともに一次阻害とはならず、ウアバイン感受性を異にする複数成分の存在が示唆された。



(2) N18 および C6 のどちらの細胞膜分画でも Na 依存性にリン酸化され、K 添加により脱リン酸化されるラベルが 2 本 分子量 100,000 付近にのみ観察された (図参照)。これはブタ脳のミクロソーム標品と同じ結果であった。分子量の大きい方の触媒活性タンパクが $\alpha(+)$ で、脳に特異的に観察されるものである。小さい方が α で、腎酵素と同じ移動度を示した。

以上より、培養系ではあるが、非興奮性細胞 (C6) にも脳特有の分子型 ($\alpha(+)$), ラット、マウスではウアバイン高感受性の成分) が存在する。また神経細胞クローンが同時に 2 種類の Na, K-ATPase 分子を

産生していることは、興味深い知見である。

脳切片標本による視覚中枢の可塑性の研究

外山敬介 (京都府立医科大)

1. 研究目的

視覚領の特徴抽出機構について分析的および構成的手法による研究を行い、思考過程の基本となるシナプスの可塑性と神経回路網の自己組織システムを解明する。

2. 研究内容および成果

前年度の研究に引き続き子ネコの視覚中枢の切片標本を用い、シナプスの可塑的变化をひき起す要因やシナプス結合の可塑的变化による神経回路網の自己組織化の基本原則を明らかにすることを試みた。

すでに前年度の研究により、1) 幼若ネコの視覚中枢の脳切片を切り出し、酸素と炭酸ガスの混合ガス ($O_2 : CO_2 = 9.5 : 5$) で飽和したリンゲル氏液で灌流すると脳切片は約 15 時間の間、正常な電氣的活動を保つこと、2) 白質に含まれる視覚求心線維に条件刺激 ($2H_2$, 1 時間) を

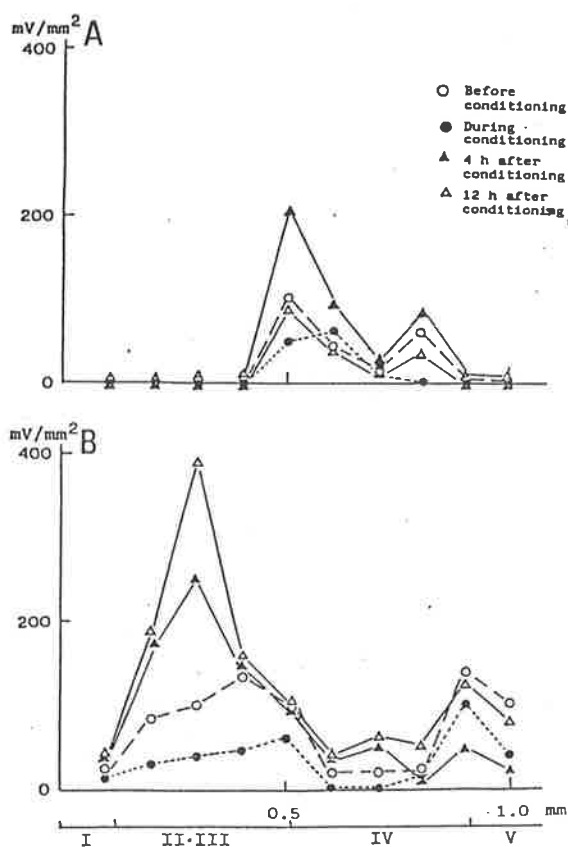


図 1. シナプス電流の局在と可塑的变化
A, 単シナプス性電流。 B, 多シナプス性電流

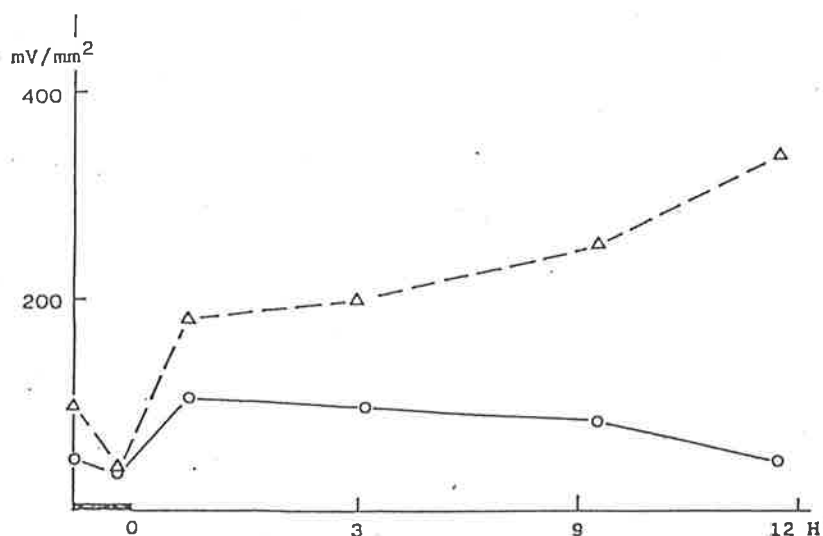


図 2. シナプス電流の可塑的变化の時間経過

加えると試験刺激によって引き起される誘発電位が 2—5 倍に増大すること、8) この増大は条件刺激後 1 時間で始まり、10—15 時間にわたり持続すること、4) この増大は 4 層の外側膝状体と視覚中枢細胞間のシナプスと 2, 8 層の視覚中枢細胞間のシナプス伝達の増強によることなどが明らかにされている。

今年度は電流源密度解析の手法を用い、1—6 の各層のシナプス電流の電流源を局在し、誘発電位の増強に伴う、これらの電流源の変化を調べた結果、次の点が明らかとなった。1) シナプス電流の増強は 2 層と 3 層で最も大きく (3—6 倍) で、次いで 4 層で大きい (1.5—3 倍)。2) 他の層 (1, 5, 6 層) ではシナプス伝達の増強は全く起らない。3) シナプス伝達の増強は 4 層の外側膝状体—視覚中枢細胞

のシナプスで最も早期に起り (条件刺激後 1 時間)、2・3 層の視覚中枢細胞間のシナプスの増強がこれに続く (条件刺激後 2—15 時間)。(図 1, 2 参照)。

これらの所見は可塑性が視覚中枢の全てのシナプスに一様に存在する

のではなく、一部のシナプスに限局され、しかも可塑的变化の時間経過もそれぞれ異っていること示唆している。

3. 今後の研究計画

視覚中枢の可塑性が層によって異なるという上記の所見は神経回路網の自己組織システムのモデル化を試みる際に特に重要と思われるので、各々の層について可塑的变化の要因の分析を行いたい。

レバー押し摂食行動における前頭前野および摂食中枢ニューロン活動とその化学感受性

小野武年, 佐々木和男, 福田正治 (富山医科薬科大・医),
大村 裕, 西野仁雄 (生理研)

視床下部外側野 (LHA) は摂食中枢と呼ばれ、摂食行動の発現に中心的役割をもつ。しかし食物の認知、食物獲得のための動因の維持、あるいは報酬の期待と評価などの高次の統合機能の達成には LHA と連合野の相互連絡が不可欠と考えられる。本研究では、サルのレバー押し摂食行動を 1) 食物識別期、2) 食物獲得のためのレバー押し動因期および 3) 食物摂取後の報酬期の 3 期に分け (図 1 A), 各期における LHA および前頭前野 (FC) ニューロン活動と行動様式の関係より、摂食行動における両者の意義を解析した。

1. LHA ニューロン応答 総数 200 個の LHA ニューロン活動を記録した。その応答様式は、1) I 型: 不透明な第 1 シャッター (W_1) が開放され、サルが食物と非食物を識別する識別期だけに応答 (12%), 2) II 型: 最後のレバー押しにより第 2 シャッター (W_2) が開放され、サルが食物を実際に食べる報酬期に応答 (17%), 3) III 型: 上記の 3 期すべてにわたり応答 (7%) の 3 型に大別できた。また識別期に応答したニューロン (I と III 型) の 50% は食物にのみ選択的に

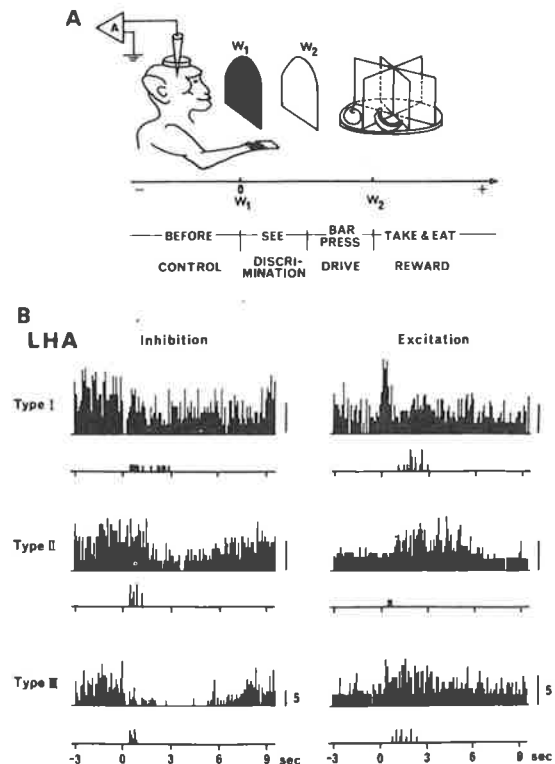


図 1. レバー押しタスクと LHA ニューロン応答。

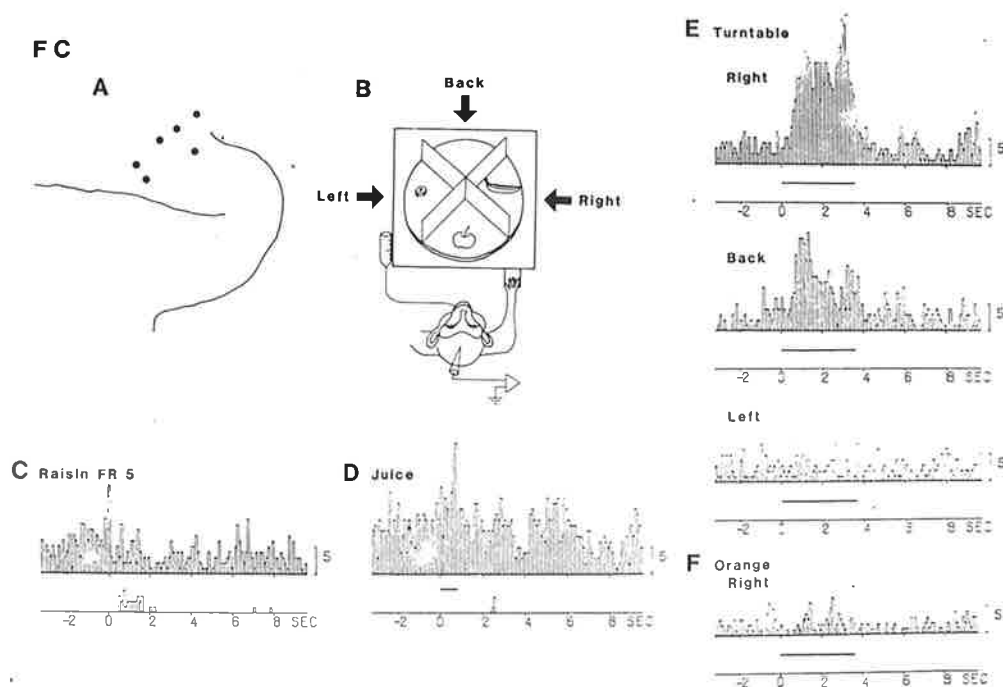


図2. 食物（報酬）の期待できる条件下のFCニューロン応答。

応答し、非食物には応答しなかった（食物選択応答，50％）。

2. FCニューロン応答 160個のFCニューロン活動を記録した。各期の応答ニューロンはLHAとほぼ同じで、識別期17％，動因期17％，レバー押し期7％であり，また食物選択応答は55％であった。

しかしFCの特徴はこれら3型の応答以外に，1）レバー押し動因期だけに応答するニューロンおよび2）食物報酬を予想（あるいは期待）できる条件下に応答するニューロンが存在した。図2にその一例を示している。Aはこれらの応答を示すニューロンの記録部位（9野），Bは実験の条件で，実験者は常にサル（ラット）の右前方からシャッター背後の回転台上の食物（あるいは非食物）をセットする。C～Fは同一ニューロンの応答様式の3回加算。ヒストグラム下の横実線は各刺激の期間を示す。このような条件下では，実験者が右側（B, right）から回転台上に手を差し入れる（食物をセットする動作）時（E, right）や，実験者が回転台背後に移動する時（E, back），あるいは図には示していないが，食物の入った紙袋のガサガサする音を聞かせた時ニューロン活動は上昇した。しかし普段食物をセットしない左側からの実験者の動作（E, left）あるいは右前方への食物（ミカン）の呈示（F）には全く応答しなかった。またレバー押し摂食行動（C）にも著明な活動変化を示さなかったが，音（約0.5秒間）の後一滴のジュースを与えるタスク下では，音の聞える期間中ニューロン活動は上昇した（D）。

3. LHAニューロンの化学感受性 LHA II型ニューロンの応答は血糖上昇時消失し、III型ニューロンの報酬応答はナロキソン前投与で拮抗された。したがって、LHAの報酬応答にはグルコースや内因性オピエートの関与が示唆された。

以上より、LHAは食物の識別、動因、報酬の各要因に関与し、その応答性は生体内在物質により修飾されること、一方FCは上記3要因の外に食物(報酬)の期待にも関係することを明らかにした。

ネズミの超音波発声と睡眠サイクルの関係について

鎌田 強, 亀田和夫(北大・歯),
亘 弘(生理研)

概 要

ネズミの超音波発声のうち spontaneousに出されるものと、睡眠の関係を明らかにするため、発声された音を、他の脳波などの情報とともに、コンピューターによって、同時に解析して、その相関関係をみようとした。その前段階として、ネズミの発声する超音波を、ディジタル化して、データーテープにとりこみ、後の解析に供せられるか否かを検討した。またこの場合、一方の計算機を用いて、ディジタル化した情報を、遠距離にあることなる計算機システムで解析できるようなプログラムについても検討した。

研究方法・結果

予め、アカネズミ属5種より、B&Kコンデンサーマイクロフォンによってデーターレコーダーに録音してあった超音波を、再生しながら、岩通DM501ディジタルメモリーによって、0.2 msecずつ8KWにディジタル化して、HITAC 20を用いて、MTテープにとりこんだ。このテープを生理研より北海道大学大型計算機センターにもちこみ、適当なプログラムを作って、このデーターを読み出し、発声された超音波の波形、長さ、さらにFFT処理により、その周波数を知ることができた。従って、超音波発声の意義について、他の行動との相関を調べようとすれば、音声を他の情報とともに、同時にディジタル処理しながら、

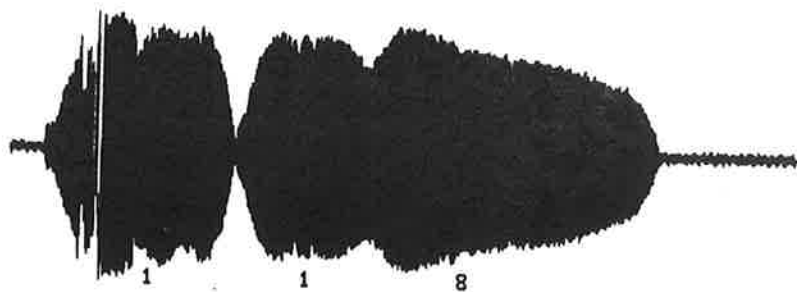


図1. デジタル化された信号を、ことなるコンピューターで再びアナログ化してえたアカネズミの超音波の波形。

ら、記録することによって、それが長時間にわたって可能であると思われる。

脊椎動物網膜視細胞の配列と細胞構築

神山暢夫（北大・理） 山口恒夫，新井田昭美，
島谷祐一（岡山大・理） 大塚輝彌（生理研）

脊椎動物網膜の視細胞は明るさに対する感度の異なる杆体と錐体とから成り、錐体はさらに分光感度の違いから赤・緑・青感受性錐体に分類される。これら4種の視細胞と2次ニューロンがどのように結合しているかを調べることは網膜における明暗・色覚情報の成立過程を解明するための重要な研究課題である。

視細胞と2次ニューロンとの機能的な結合に関しては電気生理学的知見が数多く得られ、さらに形態学的な研究も進んでいる。しかし2次ニューロンとの結合を電顕レベルで解析する際に、視細胞終末の種類を形態学的に同定することが困難であった。そこでカメ網膜の視細胞内節にある有色油滴の有無と色から視細胞の種類を形態学的に同定出来ることを利用して電顕レベルで視細胞終末の種類を判定する方法を開発した。またこの方法を用いて2次ニューロンの1つであるL型水平細胞にシナプス結合している視細胞の種類と数を調べた。

実験には既に有色油滴と分光感度の関係が明らかなクサガメの網膜を用いた。L型水平細胞にはHRPを電気泳動的に細胞内注入し樹状突起の先端部の同定は反応生成物によって行った。視細胞終末の同定は同じ箇所の視細胞の有色油滴と光顕用（ $1\mu\text{m}$ ）及び電顕用（ $0.1\mu\text{m}$ ）連続切片像の3者を比較して行った。

カメ網膜のL型水平細胞は細胞体部と軸索終末部より成り、細い軸索で結ばれている（図2）。両者は各々独立に樹状突起を有し、さらにその先端は小突起（Knob）に分岐して視細胞終末に終わっている。これらの小突起は細胞体部の中心部上面に位置する視細胞終末には多く（10個）見られ、細胞体部の周辺及び軸索終末部に位置する視細胞終末には少ない（1～2個）。この小突起は視細胞のリボン・シナプスの側突起（lateral process）であった。（図1矢印）。リボン・シナプスの両側の側突起のうちの片側にのみ小突起が入っている例が大多数であるがごく小数は両側に入っていた。また中央突起（central process）に入っている例はなかった。視細胞の種類によってこれらのシナプス結合に形態上の差異は見られなかった。

このようにしてL型水平細胞とシナプス結合している全ての視細胞の種類と数を調べた結果、細胞体部（1例）とシナプス結合している視細胞は63個あり、56%は赤（感受性）錐体、緑錐体は31%、青錐体は11%、杆体はわずかに2%であった。一方、軸索終末部（2例）と結合して

いる視細胞は平均24個あり、赤錐体は71%, 緑錐体は15%, 青錐体は4%, 杆体は10%であった(図2に例を示す)。

この結果は、L型水平細胞の主なる入力は赤錐体であると結論している電気生理学的知見を支持するものである。しかし、緑錐体との結合がフィードバック・シナプスではないかという説にもかかわらず、赤錐体と緑錐体のシナプス結合の所見には形態学的な差異が認められなかった。この点

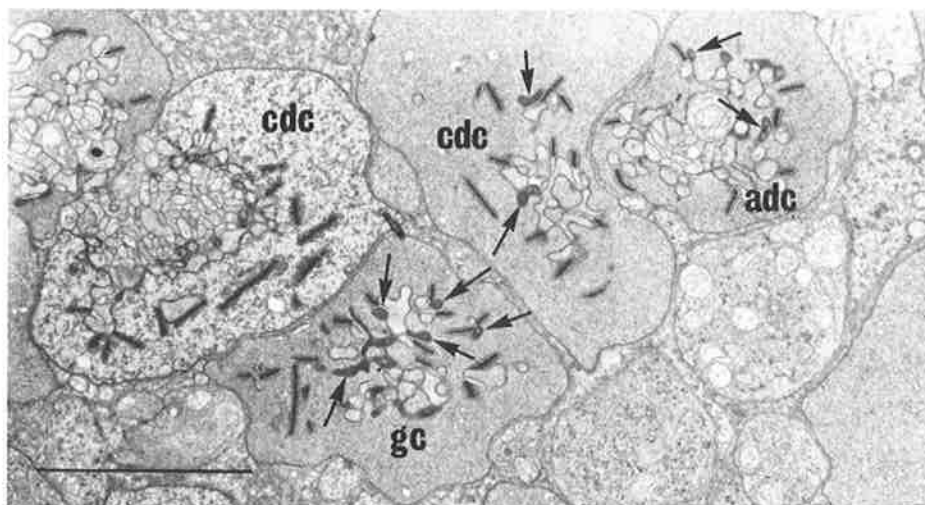


図 1. L型水平細胞細胞体部の樹状突起先端部とシナプス結合している視細胞終末。

gc : 緑感受性単一錐体, cdc : 複合錐体の主錐体 (赤感受性錐体)

adc : 複合錐体の副錐体 (緑感受性錐体)

HRPでラベルされた水平細胞の樹状突起先端部は矢印で示す。スケールは5 μ m。

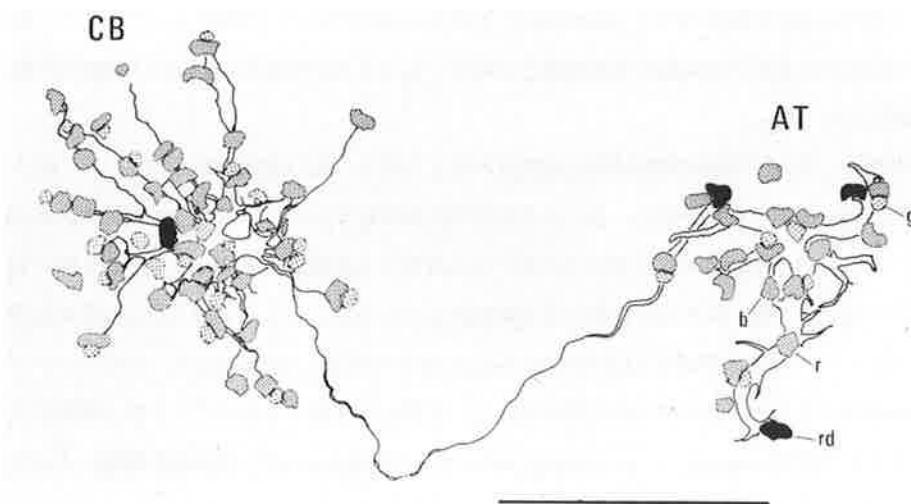


図 2. L型水平細胞とシナプス結合のみられた視細胞の分布。

CB : 細胞体部, AT : 軸索終末部

r : 赤感受性錐体, g : 緑感受性錐体, b : 青感受性錐体, rd : 杆体

スケールは100 μ m。

に関しては今後さらにリボン・シナプス以外の結合 (basal junction) も含めて視細胞と2次ニューロン間の信号伝達機構を検討する必要がある。

核磁気共鳴法による細胞内分子の動態の研究

吉崎和男, 成瀬昭二 (京府医大), 富田忠雄 (名大・医),
林 浩平 (群大・医), 赤坂一之 (京大・理),
亘 弘 (生理研)

概 要

パルス磁場勾配 NMR 法でカエル筋肉中の水, クレアチン磷酸, 無機磷酸の拡散係数を測定すると, 水溶液中に比べ約 $1/2$ に減少していた。すなわち筋細胞内のみかけの粘性が水溶液よりも約2倍高いことが明らかとなった。

また ^1H -NMR に選択的水飽和法を用いるとカエル筋肉 ^1H -高分解能スペクトルが得られた。この高分解能スペクトルには筋細胞内に多量にあるクレアチン磷酸, クレアチン, カルノシン, 乳酸などの低分子が検出できた。筋肉中の蛋白質や生体膜の磷脂質は巾の広い成分となり, これらの低分子に比べ運動が遅いことが示唆された。

研究方法・結果

1. パルス磁場勾配 NMR 法によるカエル筋肉中の水, クレアチン磷酸, 無機磷酸の拡散係数の測定¹⁾。

高分解能 NMR スペクトルの共鳴線の線巾は横緩和時間 T_2 を示す。この T_2 を精度良く測定するには Hahn のスピン・エコー法が用いられ, 共鳴線の線巾からでなく, その高さの減少率から求められる。この T_2 は, 緩和機構以外に拡散にも依存する。通常の T_2 測定時にはこの拡散の影響を小さくするために, 静磁場の均一度を良くしたり, Carr-purcell や Meiboom-Gill の multipulse が用いられる。しかし逆に, 磁場勾配をわざと加えると, エコーの減少率から拡散係数が求まることとなる。

拡散係数の測定に際し, 磁場勾配を定常的にかける方法とパルス状にかける方法とがある。単一成分系の場合には前者の方法で良いが, 多成分系の場合には高分解能スペクトルを得る必要があり, 後者のパルス磁場勾配法を用いなければならない。すなわち磁場勾配を短時間だけかけ, スペクトル測定時には元の均一な磁場となるので高分解能スペクトルが測定でき, 多成分系での各々の拡散係数が求まることとなる。

このパルス磁場勾配法を用い, ^1H -NMR でカエル筋肉中の水の拡散係数を測定した結果, リンゲル溶液に比べ約 $1/2$ となった。同様に ^{31}P -NMR で筋細胞内のクレアチン磷酸, 無機磷酸の拡散

係数を測定したところ、水溶液中の約 1/2 に拡散が遅いことが明らかとなった。この様に細胞内での拡散が遅くなっているのは、細胞内のみかけの粘性が 2 倍程度高いことを示している。

2. 選択的水飽和法によるカエル筋肉の ^1H -高分解能スペクトルの測定²⁾。

^1H -NMR 法でカエル筋肉のスペクトルを測定すると、通常、水のための共鳴線が得られ、重水置

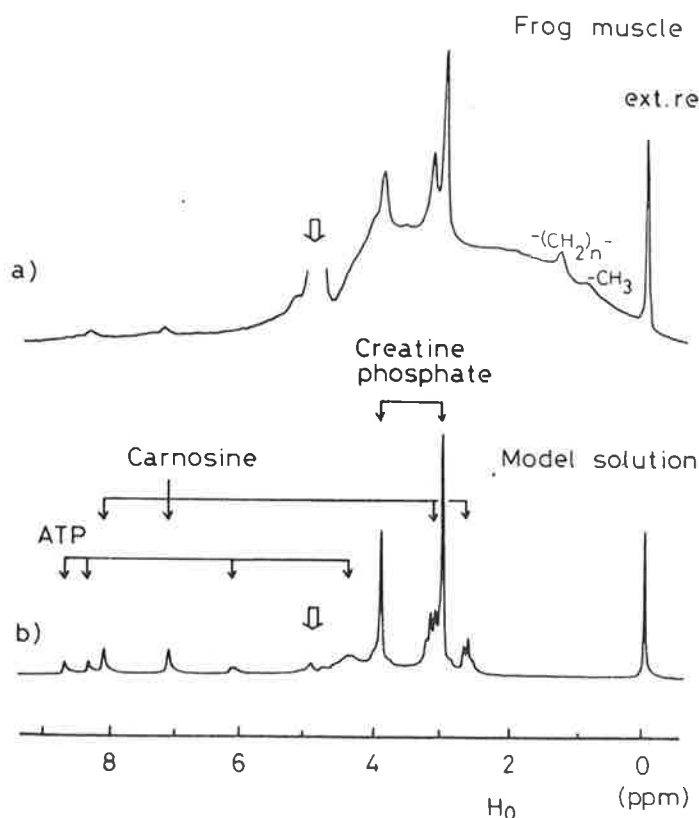


図1. 選択的水飽和法によるカエル筋肉の ^1H -NMR スペクトル (a) とモデル溶液 (30 mM クレアチン磷酸, 14 mM カルノシン, 5 mM ATP の重水溶液) のスペクトル (b)。

換後でも他の共鳴線は得られない。ところがこの水のシグナルを選択的に照射し、飽和・減少させると約 15 分の積算で水以外の共鳴線が測定できた (図 1 a)。このスペクトルは巾の広い成分と、その上に重なった高分解能スペクトルとからなる。

この高分解能スペクトルは、筋肉ホモジェネートの遠心分離で得た上清分画に認められ、しかもその除蛋白液に検出できた。従ってこの高分解能スペクトルを与える物質は、細胞内に多量にある低分子であると考えられる。図 1 b にそのような物質として、クレアチン

ン磷酸、カルノシンおよび ATP を含むモデル溶液のスペクトルを示す。モデル溶液と比較することにより、カエル筋肉の高分解能スペクトルにはクレアチン磷酸、クレアチン、カルノシンなどが検出され、さらに高磁場側のメチレン基の領域は乳酸に由来することが明らかとなった。

ところで筋肉中には蛋白質や生体膜を構成する磷脂質が多量にある。これらは生筋のスペクトルでは巾の広い成分となり、上記の低分子に比べ分子運動が遅いことを反映している。

文 献

1. Yoshizaki et al., Biophys. J. (in press)
2. Yoshizaki et al., Biochim. Biophys. Acta 678. 283 (1981)

細胞膜受容体分子の単クローン性抗体による解析

山下 昭, 木村廣光, 宮本 愛, 福本哲夫(浜松
医大), 杉山博之(生理研)

概 要

各種細胞の細胞膜受容体分子の多くは、微量な蛋白ないし糖蛋白分子であり、単離精製し、構造決定や機能を解析することが極めて困難な場合が多い。最近開発された単クローン性抗体産生法は、これらの微量で、しかも、しばしば複合体としてしか検出できない分子を単離精製するための極めて有効な解析法である。この方法を用いて、各種細胞の細胞膜に存在する膜受容体分子を含めた微量蛋白ないし糖蛋白に対する単クローン性抗体を産生し、得られた各種抗体の特性を、種々の細胞との特異的結合能で解析すると共に、膜分子の精製、構造及び機能の解析を行うことを目的とする。

研究方法・結果

1. リンパ球の細胞膜糖蛋白分子に対する単クローン性抗体

a) 細胞の同定。ラットのリンパ球膜糖蛋白に対する単クローン性抗体(オックスフォード大の Williams 博士らのグループによって開発されたマウス単クローン性抗体; 0X1:白血球共通抗原, 0X6:ラット Ia 抗原, 0X7:Thy-1 抗原, 0X8:T細胞 non-helper 抗原, 0X18:ラット主要組織適合性抗原である RT-1, W3/13:T細胞抗原, W3/25:T細胞 helper 抗原, など)を用いて、ラットの各種リンパ組織のリンパ球亜群および培養細胞の同定解析を行った。方法は 5×10^6 個のリンパ球, あるいは胸腺細胞に約 $5 \mu\text{l}$ の各種単クローン性抗体(腹水)を添加し、冷却下で1時間放置後、磷酸緩衝液(PBS)で洗浄し、ついで抗マウス IgG ウサギ F(ab)₂-FITC を添加して、さらに1時間放置したのち PBS で洗浄した細胞浮遊液を細胞自動分析装置(FACS II, 岡崎国立共同研究機構)により解析した。

b) 細胞の分画・分取。各種抗体に反応する細胞群(陽性群)と、反応しない陰性群とを、細胞自動分析装置により検出し、さらに Sorting により両群を分画分取し(図1)、各分画のリンパ球の免疫学的反応性を *in vivo* で検索した。なお以上の、細胞の同定、分画分取をおこなうた

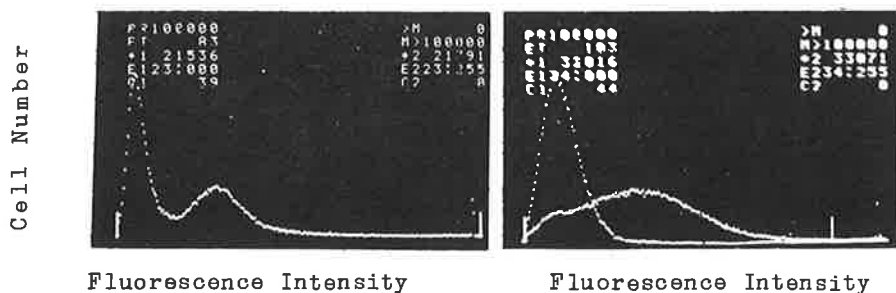


図1. ラットのリンパ節細胞をW3/25抗体に反応する群と、しない群に分画分取。

めには、FACSⅡは必須の設備である。

図1はその一例を示す。(左)はW3/25抗体に反応する亜群の示すprofileである。(右)は、その陽性群と陰性群を分画し、各々を分取し、再びFACSで解析したものであり、陽性群(太い点線)は100%の陽性率を、陰性群(細い点線)は0%に近く、純度の高い分画化がおこなわれたことを示す。このW3/25抗原を持つTリンパ球亜群は組織適合性抗原の異なる異種のリンパ球の膜抗原(RT-1)を認識する細胞亜群であることがin vivoで示された。

2. 肝細胞膜糖蛋白質に対する単クローン性抗体

ラット肝細胞膜糖蛋白質(種々のホルモン受容体や膜の酵素などを含むと想定される)に対する単クローン性抗体を3種(HAM1, HAM2, HAM3)見出すことに成功し(福本ら, 投稿中), さらにラット肝由来の各種腫瘍細胞に発現しているこれらの膜抗原をFACSⅡで解析し、肝細胞の分化過程における膜抗原の変化について検索した。

3. アセチルコリン受容体に対する単クローン性抗体

明確に実体を同定された抗原として、ニコチン性アセチルコリン受容体を取りあげ、その単クローン性抗体を作製することを試みた。材料として、日本産シビレエイ(Narke Japonica)の発電器官を用い、これより α -トキシンのアフィニティー・クロマトで精製したアセチルコリン受容体を得た。これを用いてマウスを免疫感作し、ハイブリドーマのクローニングによって、これまでに5種類の単クローン性抗体を作製するのに成功した。現在、これらの単クローン性抗体の特性の検討、これらを用いたアセチルコリン受容体分子の解析等を行っている。

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, 梅北峻一, 岡野桂樹, (帝京大・医),
金子章道(生理研)

研究目的

高次感覚器における求心性シナプス伝達物質の同定を目的とし、聴・側線器系の電気受容器(ゴンズイ)について、生物由来の活性物質を検討する。昨年度の予備実験に続き、下記の活性物質を集積、精製した。

研究成果: 1) ゴンズイ血漿中の低分子活性因子(M.W. 1000 以下)。

昨年度の予備実験では、約400mlの血漿について、ゲルろ過などによる分画法を検討した。生物検定(後述)により同定した4種の活性因子のうち、1つがTLC上で、伝達物質と類似することを報告した。

本年度はゴンズイの採集時期が大巾に遅れたが（冷水塊などの影響か？）、血漿約 600ml（約 600 尾分）を採取できた。昨年度の方法にほぼ従って分画、脱塩を進め、現在、先の活性因子成分を凍結乾燥して、生物検定を終った段階である。今後、酵素処理などによる化学的検索を進めるとともに、他種の高次感覚器での投与効果などを予定している。

2) 感覚上皮（アンブラ）よりの抽出。

本材料では多数のアンブラを一群として摘出でき、現在までに約 4000 尾分を集積した。しかし、数種の方法による粗抽出段階では、むしろ生物検定上、妨害因子と思われる活性がみられた。対策を検討中である。

3) アンブラへの順向刺激により放出される活性因子（伝達物質）。

生物検定法（図 1）：単離アンブラへの負の通電により、受容細胞の活動、伝達物質の放出は完全に抑圧され、求心神経放電も停止する。外液中の活性因子の存在は、条件刺激で抑圧されない求心神経放電によって検出できる。

刺激・放出実験：検出用アンブラと同一液中においた他のアンブラに順向性に促進性刺激を加える。連続刺激 5 分後に、過剰に放出された伝達物質は、検出用アンブラの求心放電の明確な増加として検出できた（図 1, B）。

多数のアンブラを同時に刺激する方法を開発し、数回の実験の灌流液を集積した。これを凍結乾燥、アセトン塩酸抽出の後、TLC 上に展開した。この試料では、アミノ基検出法により、グルタミン酸（Glu）は検出されない。図 2（フルオレスサミン法）のマーカー Glu の部位に注意（ $\text{Glu} < 10^{-7} \text{ M}$ ）。

さらにこの TLC 上からの再回収を試み、3 例について、水抽出により特定の部位から、生物活性を再回収できた。この部位はマーカー Glu の Rf 値に対して 80～95% の Rf 値に相当し、明らかに異なる（図 2、横軸上に示す）。

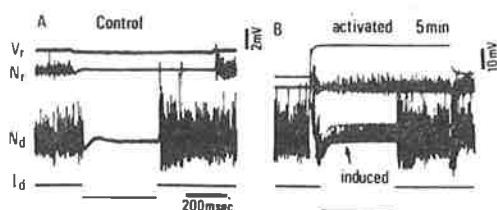


図 1. 伝達物質放出とその検出。

V_r, N_r: アンブラと求心神経の応答（放出用標本）。N_d, I_d: 神経放電と条件刺激（検出用標本）。

B（放出刺激 5 分後）での N_d の放電増加（矢印）に注意。

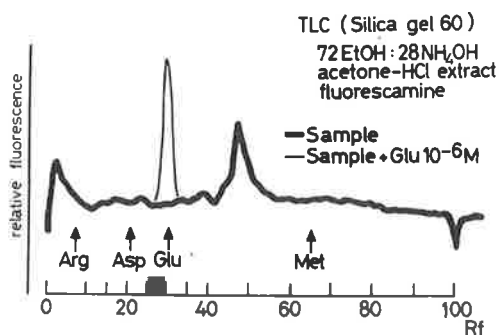


図 2. TLC 上の蛍光パターンと、生物活性の再回収部位。横軸上のマーク：活性部位。

この試料は主に、前記の他の活性因子に対する基準と考える。その化学的性質をさらに検討することも含めて、より大量の集積、精製法を試みる。

考察：この感覚器での伝達物質候補としてGluが示唆されており、事実強力な促進効果（ $10^{-4}M$ 以上）を示す。しかし、上記の活性因子はいずれもGluとは異なる。今後さらにこれらの精製を続け、化学的同定を目指す。

文 献

- 1) 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., 43, 296.
- 2) Obara, S., Umekita, S. and Matsumoto, Y. (1981): Stimulus-induced release experiments disprove L-glutamate as the afferent neurotransmitters in ampullary electroreceptors of the marine catfish, *Plotosus*. V[III] International Congress of Pharmacology, Tokyo, Abstr. 555.

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, 新免輝男 (東大・理) 山岸俊一 (生理研)

概 要

イカの神経の内部灌流による電気生理学的研究は1961年以来多くの成果が蓄積している。一方植物でも興奮性組織あるいは細胞の存在は古くから知られている。しかしイカの巨大神経に匹敵するほど大きく、形体的にも単純な輪藻の節間細胞が最も愛用されてきた。この材料は葉緑体をもつ緑色植物細胞でありながら、イカの巨大神経の活動電位とほぼ同じ大きさの活動電位を発生するので緑の神経とも呼ばれる。植物細胞と動物細胞の大きな違いは前者では原形質膜の他に液胞膜をもつことである。最近田沢ら (Tazawa et al. 1976) は輪藻節間細胞の液胞灌流により液胞膜を除去することに成功し、イカの巨大神経と同じように原形質膜の内側の物質組成を自由に制御できるようになった。細胞内灌流法を利用することにより植物細胞でも興奮性、膜電位発生機構について、古くから細胞内灌流による知見の蓄積しているイカ巨大神経とある程度比較できるような成果が得られてきた。全く異った進化過程をたどってきた二つの生き物—輪藻とイカ—の膜がその

興奮の機序においてどのような類似点をもつのか、またどのように違っているのかを知りたいという興味に駆られて、われわれはまず今までに得られた研究成果を対比してみようと思った。このような試みがわれわれだけでなく、研究者一般の関心を惹き、ひいては、生体膜に関する統一的理解への一助ともなりうれば幸いである。

研究方法・結果

以上の目的に沿って両細胞の電気生理学的特性を対比しながら記述することを試みた。その作業はほぼ完了し、近く清書して印刷に付し出来得れば適当な雑誌に投稿する予定である。なお本研究の一環として車軸藻類の節間細胞の膜電位、膜抵抗に及ぼす細胞内 Ca^{2+} の効果をしらべた。 Ca^{2+} は 10^{-6} M ですでにわずかながら静止電位を脱分極し、 10^{-5} M では約 100 mV にも及ぶ脱分極をひきおこした。これと平行して膜抵抗は $1/10$ にまで減少した。 Ca^{2+} 阻害はすばやく Ca^{2+} を洗い去ることにより完全に回復した。

電気シナプスを介する興奮伝導

川人光男, 山中 篤, 鈴木良次 (大阪大・基礎工),
入沢 宏, 野間昭典 (生理研)

1 はじめに

心臓は多数の細胞が電氣的に結合した複雑かつ大規模な振動システムである。従って心臓内の興奮伝導を解析しようとするれば、個々の心筋細胞の特性を調べるだけではなく、心臓全体をシステムとして研究しなくてはならない。本研究では個々の細胞に関する電気生理学的知見に基づいて、多数の心筋細胞の電氣的結合系を、計算機シミュレーションによって研究した。

2 心筋細胞の電氣的結合系

個々の心筋細胞は、その膜電位 E と数種のイオンチャンネルの開閉状態を表わすベクトルを用いて、次の非線形常微分方程式で表わせる。

$$\left. \begin{aligned} dE/dt &= f(E, \mathbf{x}) \\ d\mathbf{x}/dt &= G(E, \mathbf{x}) \end{aligned} \right\} \quad (1)$$

ここで f は非線形関数、 G は非線形ベクトル関数である。(1)で表わせる Hodgkin-Huxley 型の方程式は心臓の各種の細胞について実験的に得られている (プルキンエ繊維, 心室筋, 洞房結節, 房室結節: 入沢, 野間)。心筋細胞に 1 から N まで番号をふる。 i 番目の細胞の内部状態をその膜電位 E_i とイオンチャンネルについてのベクトル変数 $\mathbf{x}_i$ で書き表わせれば、心筋細胞が電氣的に結合したシステムは、次の常微分方程式系で記述できる。

$$\begin{aligned} dE_i/dt &= f_i C E_i(i) + \sum_{j \leftarrow N(i)} d_{ij} (E_j - E_i) \\ dX_i/dt &= G_i C E_i(i) \end{aligned} \quad \left. \begin{array}{l} i = 1, 2, \dots, N \end{array} \right\} \quad (2)$$

ただし $N(i)$ は i 番目の細胞と電気的に結合している細胞の番号の集合である。 d_{ij} は i 番目と j 番目の細胞の間の gap junction のコンダクタンスに比例する結合の定数である。

3 シミュレーションの方法と結果

シミュレーションは一種又は二種の心筋細胞を、線上に電気的に結合したシステムについて、方程式(2)を数値的に解いて行なった。主に次の四種類の結合システムを調べた。

- ① 45 個の房室結節細胞を電気的に結合させたシステム。
- ② 30 個の心室筋細胞を電気的に結合させたシステム。
- ③ 5 個の洞房結節細胞と 10 個の房室結節細胞を結合させたシステム。
- ④ 4 個の房室結節細胞と 8 個の心室筋細胞を、4 個の中間的性質を持つ細胞を介して、電気的に結合させたシステム。

一連のシミュレーションで d_{ij} は i, j によらず一定とした。また実験①, ②, ④においてはシステムの左端の細胞にそれぞれ周期 250 ms, 600 ms, 300 ms の電流刺激を繰返し与えた。

①のシステムでは、電流刺激の周期は、房室結節細胞の固有周期 350 ms より短い。その結果、システム全体がこの刺激周期に同調され、左から右に興奮波が伝播した。この興奮波の伝導速度 v は、1 個の細胞の長さを $100 \mu\text{m}$ と評価して、 3.1 cm/s であった。これは実測値 2 cm/s に近い。但し、伝導速度は刺激の周波数と結合定数 d の両方に依存するので更に検討を要する。

②のシステムに対応する偏微分方程式 (空間刻みを無限少として得られる反応拡散方程式) では、興奮伝導に対応する進行波の伝導速度 v は $\sqrt{d}$ に比例する。(2)の常微分方程式においても、 $v \propto \sqrt{d}$ の関係が近似的に成り立つことをシミュレーションで確認した。しかし(2)では d がある値より小さいと (例えば $d = 0.1$), 興奮伝導が生じない。これは伝導ブロックに対応する。

心室筋の結合抵抗は $2 \text{ M}\Omega$ 程度であることが実験的に知られている (亀山, 1982 私信)。心室筋を $100 \mu\text{m}$, $30 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$ の辺を持つ直方体とすると、 $d = 6.25 [\text{m}\Sigma/\text{cm}^2]$ となる。一方 V の伝導速度が 1 m/s であることと、 $v \propto \sqrt{d}$ から、 $d = 59.2$ という評価がシミュレーションから得られる。これは上記の値の約 10 倍である。以上の議論から、心室筋の膜の約 1/10 程度の面積を持つ部分だけが、興奮性を持つ膜であると予想される。

③のシステムでは興奮波が左から右へ伝播するが、全体の周期は 340 ms の平均に等しい。心臓全体の周期は洞房結節のそれに一致しているので、電気的結合システム全体の周期がどのように決定されるかは、各種細胞の実際の個数に強く依存すると考えられる。

④のシステムでは、房室結節が 2 度興奮する間に、心室が 1 回しか興奮しないという $2 = 1$ 房室ブロックがシミュレーションで発見された。

今回の報告は予備的ではあるが、心臓内興奮伝導の研究におけるシミュレーション実験の重要性

が明らかになったと思われる。

神経における興奮制御機構の研究

瀬山一正 (広島大・医)

ツツジ科由来のグラヤノトキシン (GTX) は Na 依存性興奮性膜に作用し、膜の Na^+ に対する透過性を特異的に高める。この特有な GTX の性質を利用し興奮性機構を解明するための薬理学的道具として GTX を育てていく試みを行なっている。これまでに明らかとなった GTX の作用機

序は以下の如くである。(1) Na^+ に対する膜透過性増大の際 Na^+ の流れは Na^+ に対する電気化学的ポテンシャル勾配による。(2) フグ毒は特異的に GTX の作用を抑制する。しかし K_a 値は $3 \times 10^{-8} \text{ M}$ であり Na チャンネル抑制の際の値とは一桁違う。(3) Na チャンネルの開閉機構の膜電位依存性に影響し m_∞ 及び h_∞ と膜電位の関係に過分極方向へ各々 28 mV 及び 16 mV 移動させる。(4) Na チャンネルは濃度依

存性に更に改変され不活性化過程を持たないチャンネルとなる。

(5) GTX は高度な立体特異性を有し、 $3\beta\text{-OH}$, $5\beta\text{-OH}$, $6\beta\text{-OH}$, $10\beta\text{-OH}_3$ 基が生理活性発現に必須である。又分子の有する疎水性の程度により活性に影響が出る事が解っている。実験は Na チャンネル構成蛋白の内 GTX との結合に関与するアミノ基を決定する事を目的として行なわれた。標本はイ

Enzymes	Specificity
Pronase	-Tyr (Phe, Leu, Trp, Arg, Lys) ↓
St. Fradiae protease	"
BPN'	"
St. Fradiae trypsin	-Arg (Lys) ↓
Trypsin	"
α -chymotrypsin	-Tyr (Phe, Trp) ↓
Thermolysin	↓ Leu (Phe)-
Neutral protease	"
Pepsin	-Phe (Trp, Tyr)-Phe (Trp, Tyr)- ↓

図 1. 投与酵素とその基質特異性。

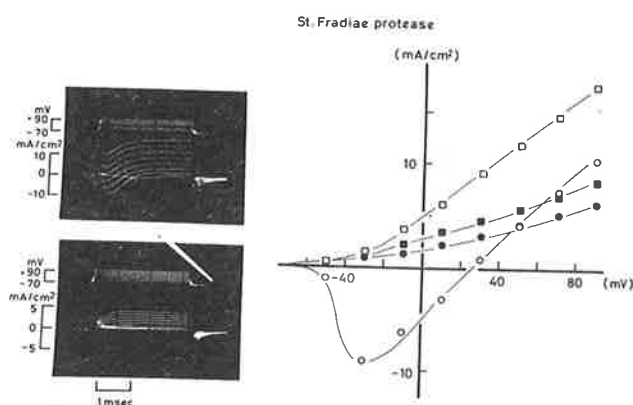


図 2. 酵素処理後の Na チャンネル及び K チャンネルの消長。酵素投与後 1 時間して記録した (○: I_{Na} , □: I_{K})。

カ巨大神経を用いた。蛋白の切断を目的として図1に掲げた Endopeptidase を投与した。GTX の結合部位は細胞内に存在するので各酵素は細胞内灌流法を用いて細胞内に投与した。各酵素の投与濃度は 1 mg/ml であった。実験は室温 (20°C) で行なわれた。Endopeptidase の作用によって Na チャンネルの破壊が完全に行なわれた事を膜電位同定法で確認した (図2)。酵素処理

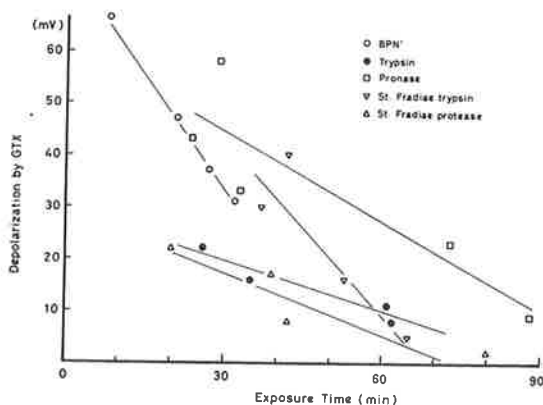


図3. 酵素処理時間と GTX 作用発現との関係。GTX による脱分極が有効に抑制される場合。各記号は一実験を示す。

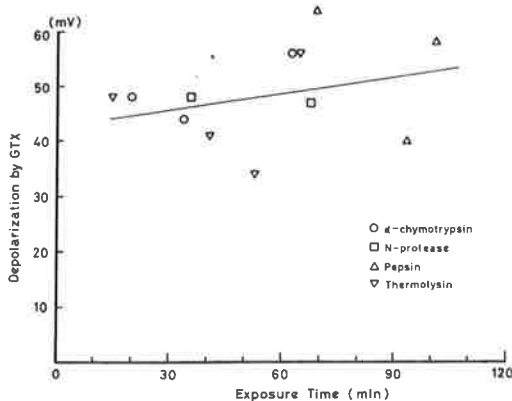


図4. 図3と同じ主旨の実験。GTX による脱分極が抑制されない場合。

後静止膜電位が -40 mV 以上ある標本において GTX を $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ 投与した。酵素未処理の巨大神経ではこの濃度の GTX を投与すると膜電位は例外なくオーバーシュートを持った脱分極を示し $20 \sim 30 \text{ mV}$ の電位となる。図3は酵素処理後 GTX 投与までの時間を横軸にとっている。いずれも Na チャンネルの消失を確認して GTX を投与した。その際認められる膜脱分極の値を縦軸に取っている。この図に示す様に酵素処理時間の長くなるに従い発生する脱分極は小さくなっている。即ち GTX の Na チャンネル改変作用は著しく阻害されている事を示している。このような作用を示した酵素の基質特異性を調べたものが図1に掲げである。Trypsin 及び放線菌トリプミン以外はいずれも広い基質特異性を示す。しかし Arg もしくは Lys はいずれの酵素の基質特異性にも含まれているので GTX 作用を生ずる際かならず関与して

いるであろう事を示している。一方図4に示す酵素はいずれもGTXによる膜脱分極を抑制する事が出来なかったものである。以上の事実はGTXの結合部位の破壊による結合障害が生じたのか、GTX結合後チャンネルへ影響を及ぼす中間過程が破壊されたのかは明らかに出来ない。しかしながらArg基の修飾によってNaチャンネル活性化過程が無くなる事とGTX作用の中にも不活性化過程の障害がある事を考え合わせるとGTXの膜結合にArgが必須である事は興味深い。

要 約

- (1) 図1に掲げたEndopeptidaseを細胞内から長時間作用させるとNaチャンネル及びKチャンネルはいずれも抑制を受ける。
- (2) GTXの細胞内面での結合部位は蛋白で構成されている。結合部位にはArg(Lys)が存在している。

哺乳類における聴覚情報の受容、伝達ならびに中枢処理に関する研究

田中康夫(独協医大), 山岸俊一(生理研)

この研究は、蝸牛毛細胞におけるエネルギー変換過程の追求、毛細胞神経終末接合部における伝達機序の解明と伝達物質の同定、聴覚路中継核における音響情報の特徴抽出により哺乳類聴覚系の情報処理機構を明らかにすることを目的としたもので、今年度は無響室と測定室の整備と末梢機構についての実験を行った。実験機器の整備については、音響刺激系では音波発生器、電気刺激装置、電子スイッチ、減衰器、増幅器およびスピーカーの結線、テストを行った。音響測定系では音圧測定装置や周波数計測器を配置し、電位記録系では微小電極用増幅器およびブラウン管オシログラフの配置とそれらの駆動テストを行った。またメモリスコープやX-Yプロッターの導入要請が検討された。手術設備として頭部固定器、耳手術器械が整えられ、無響室内の動物実験台や耳手術用顕微鏡の導入配備が検討された。

内耳における音波受容過程に関して、モルモットの蝸牛を用いて実験を行った。蝸牛中央階の毛細胞膜内リンパ側におけるCaイオン環境を変化させ、内リンパ静止電位(E_P)、蝸牛マイクロホン電位(CM)、Summating potential($-SP$)および蝸牛神経活動電位(N_1 成分)に及ぼす影響を観察した。 $EDTA$ の電気泳動的注入により中央階内リンパのCaイオンを除去すると、 E_P は正常範囲内に維持されたが CM 、 $-SP$ は縮小した。内リンパのCaイオンを泳動注入により増加させると、 E_P には変化が少く CM は縮小したが $-SP$ は増大した。Caイオンを $0.5 \sim 2.0 \times 10^{-6} A$ 、2分の電気量で注入した場合、通電終了後3分で $-SP$ は $157 \pm 35\%$ (12例)に増大し、この変化は可逆性であり約30分で元の大きさに戻った。この場合 N_1 には

-SPに付随した増大傾向が認められた。アミノグリコシド抗生剤の一つであるネオマイシンを 0.5×10^{-6} A, 2分の電気量で注動注入するとCMも-SPもともに急激に縮小した。蝸牛毛細胞の受容器膜に対するCa効果は-SPの増大が特徴的である。2価イオン除去剤であるEDTAや、結合部位をCaと競合するネオマイシンによって-SPの減少が起ることから、Caの結合サイトは受容器膜の磷脂質である可能性が強い。これは側線器で得られている成績と一致する。活動電位 N_1 はCMよりも-SPの変化に従う傾向が認められるので、受容器膜のCaイオン環境は-SPを介して蝸牛神経応答のMechano-sensitivityを高めることに役立っていることが、この研究の今までの結果から考えられる。

培養神経系腫瘍細胞のグルタミン酸・グルタミン代謝回路の研究

永田 豊, 安藤正人, 奥谷正人(名保衛大・医),
杉山博之(生理研)

概 要

Glutamate (GA) は、特に、中枢神経組織内に非常に高濃度含まれており、脳内での代謝経路も極めて活発な物質で、興奮性伝達物質としての作用は、よく知られている。GAは脳内で2-oxoglutamateのアミノ添加反応により生成されるほか、glutamine (GM) の脱アミノ反応によって生ずることが知られている。GAを伝達物質とするglutamergic synapseにおいては、神経刺激によって、neuronから放出されたGAはsynapse 伝達物質として作用後に積極的に周辺gliaに取り込まれて、そこにあるglutamine synthetase (GS) の働きによって生理的には不活性のGMに変換して不活性化されることが認められている。さらに、GMは隣接するneuronに移動して、そこでglutaminase (GMase) の作用により生理的活性をもつGAとなって、刺激に応じて、再び、神経末端部より放出されるというGM-GA代謝回路が、gliaとneuronとの間で示唆されている^①。我々は、neuron及びglia細胞のモデルとして確立されたneuroblastoma株・glioma株及び両者の雑種細胞を用いて、まず、GM及びGA生成に関与する酵素GS及びGMaseの活性を測定して比較検討した。

研究方法

1) 細胞培養: 培養神経腫瘍細胞は、glioma細胞(C₆BU1), neuroblastoma細胞(N18TG2), hybrid細胞[NG108-15(C₆BU1×N18TG2), NBr10A(Rat liver cell×N18TG2)]の4種を用いた。細胞培養は、無菌フラスコ中、Dulbecco's modified eagle mediumに10%牛胎児血清を加えた培地に細胞を接種し、37℃で90

% air, 10% CO₂ 気相の条件下で行ない、細胞が confluent な状態まで生育したものを Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free のリン酸緩衝液で洗浄してフラスコ面より剥離し、遠沈して集めた。すぐに使用しない場合、細胞は、-80℃に保存したが、酵素活性に影響しなかった。

2) 酵素活性の測定: Glutamine synthetase (GS) 活性の測定は, Prusner et al, および Pishak et al, の方法^②に準じて行った。すなわち, homogenate の supernat に存在する GS によって [¹⁴C] Glutamate から生成された [¹⁴C] Glutamine を酢酸型 Dowex 1×4 Cl⁻ form 200-400 mesh カラムで分離して, 液体シンチレーション・カウンターで測定したが, [¹⁴C] GM の recovery は 90% 以上であった。

Glutaminase (GMase) 活性の測定は, Graham & Aprison の方法^③に準じて行った。すなわち, GMase によって L-GM から生じた L-GA を NAD と Glutamate dehydrogenase とカップルさせた反応系で生ずる NADH 量を蛍光比色して GA の生成量を算出した。タンパク含量の測定は Lowry et al. の方法^④によった。

結 果

1) Glutamine synthetase (GS) 活性: 下表に示すように, GS 活性は neuroblastoma や hybrid 細胞に比して C₆ BU1 glioma 細胞で明らかな高値を認めた。GS は神経組織では, glia 殊に Astroglia に局在しており, neuron では活性が低いといわれている。我々の得た成績では, C₆ BU1 は Rat の Astrocytoma であるので腫瘍細胞ではあるが, かなり Astroglia の性質を反映しているものと思われる。一方, NG108-15 は, C₆ BU1 との雑種であるにもかかわらず, glia の諸性質を全く表面化していない。また, NBr10A も GS 活性が高い Liver cell との雑種であるにもかかわらず, やはり GS 活性が低値であった。

Tab. 1: GLUTAMINE SYNTHETASE AND GLUTAMINASE ACTIVITY IN CULTURED NEURAL TUMOR CELL STRAINS

Cultured neural cell strains	Glutamine synthetase*	Glutaminase*
C6BU 1 (rat glioma)	11.32 ± 0.89 (10)	391.68 ± 29.17 (6)
N18TG 2 (mouse neuroblastoma)	6.68 ± 0.23 (4)	1370.24 ± 74.79 (8)
NG108-15 (C6BU 1 x N18TG 2)	5.13 ± 0.06 (4)	1276.4 (1247.8, 1300.9) (2)
NBr10A (rat liver cell x N18TG 2)	2.96 ± 0.36 (4)	1185.33 ± 35.69 (8)
*: nmoles/mg-protein/20 min, Mean ± S.E.M.		

2) Glutaminase (GMase) 活性: GMase は神経組織においては, neuron に局在しており, glia には活性が低いといわれている。我々が検索した腫瘍細胞系では, glioma である C₆ BU1 では, GMase 活性は, かなり低値を示し, neuron の性質をもっている N18TG2 や N18TG2 との hybrid 細胞では, かなり高値を示した。このような GMase 活性は, 培養腫瘍細胞株においても, neuron や glia の性質を保っていることを示唆するものと考えられる。

ま と め

培養神経腫瘍細胞株の4種について、GA-GM代謝回路に關与する酵素GS、及びGMase活性を測定し比較・検討した。GS活性は、C₆BU1 glioma細胞に高く、N18TG2 neuroblastoma細胞やNG108-15及びNBr10A hybrid細胞では低値を示した。一方、GMase活性は逆にgliomaで低値で、neuroblastoma及びhybrid細胞では高値を示した。このようなGS及びGMase活性のneuron及びglia細胞における局在の差は、neuronよりtransmitterとしてのGAのreleaseならびに周辺gliaによるGM生成による不活性化過程系の代謝モデルとして興味ある成績と考えられた。

- | |
|--|
| <p>REFERENCES: (1) Hamberger, A., Chiang, G.H., Sandoval, E. & Cotman, C.W., <i>Brain Res.</i> 168:531 (1979)
 (2) Prussiner, S. & Milner, L., <i>Analyt. Biochem.</i> 37:429 (1970)
 (3) Graham, L.T., Jr. & Aprison, M.H., <i>J. Neurochem.</i> 16:559 (1969)
 (4) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J., <i>J. Biol. Chem.</i> 193:265 (1951)</p> |
|--|

神経膜構成高分子の細胞化学的研究

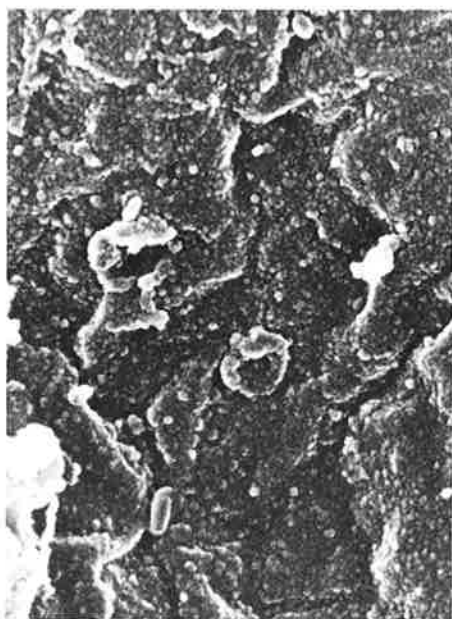
平野 寛，西山文朗（杏林大・医），
 山岸俊一，古家喜四夫（生理研）

カチオン化フェリチン (cationized ferritin, CF) が細胞表面に結合して細胞内に取り込まれる現象は良く知られている (高田邦昭, 平野 寛: 医学のあゆみ, 119, 911-919, 1981)。一方、CFは細胞膜、就中神経膜の内表面にも結合し、且膜活動電位に一定の変化を与えることが電顕的及び電気生理学的に既に確認されている (Hirano, H. et al: *J. Electr. Micr.*, 30, 264, 1981)。本年度は透過像のみならず走査像をも併せて追求し、細胞膜内に結合するCF分布パターンをさらに検討した。

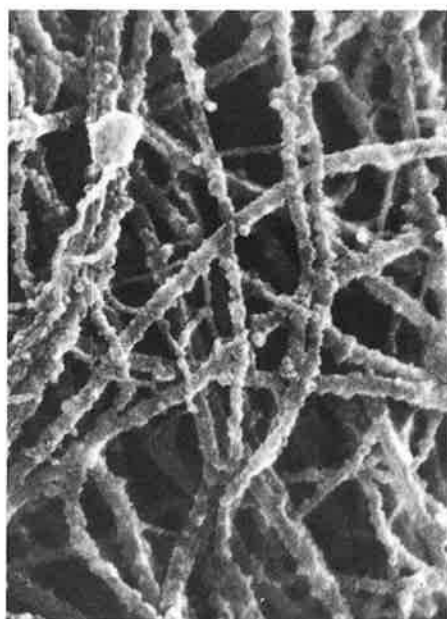
ヤリイカ (*Doryteuthis bleekeri*) 巨大神経線維をとりだし、ローラー法で細胞質成分を外側に排出し、pronose (Calbiochem, 最終濃度 0.01%) を含む細胞内灌流液 (50 mM KF, Hepes, pH 7.4) で細胞膜内表面を露出させ、洗滌 (250 mM KF, Hepes, pH 7.4)、未固定のまま CF (0.02~0.5 mg/ml, 250 mM KF, Hepes, pH 7.4) を 1.5℃又は 12℃にて 0, 1, 3, 10 又は 25 分間神経膜内表面に直接作用させた。一部の標本は CF と 3~10 分間反応後、CF を含みぬ液 (250 mM KF, Hepes, pH 7.4) にて 15 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 (520 mM NaCl, 5 mM KCl, 50 mM CaCl₂, Hepes, pH 8.0) を用いた。反応後、洗滌、固定、次いで走査型電顕観察には白金・パラジウム蒸着標本を、透過型電顕観察には通常の樹脂包埋薄切

標本をそれぞれ作製した。

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、神経膜表面は機械的及び酵素処理によりかなりの範囲にわたり露出しており、部分的に微小管や膜断片が残存的附着している。就中微小管は神経繊維軸方向に平行に配列することが多く、一部交織して網目を形成する。C F 投与 1 分後既に結合像が認められ、1.5℃では膜内表面や微小管表面に瀰漫性に分布し、12℃では部分的にクラスター化する。C F は走査型電顕下で径約 15nm 程度の粒子として認められる。一方 C F 結合に伴い膜静止電位及び活動電位は殆んど変化しないが、duration (約 2 msec) が 2 倍程度に延長する。但し内向き Na 電流は延長するが外向き K 電流は変化を示さない。低濃度 (0.02 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$) では C F は殆んど結合せず、膜活動電位にも変化を特にきたさなかった。細胞膜内表面や細胞骨格系についても免疫走査電顕法適用の可能性が示された。



C F が結合した神経膜内表面の露出した部分。



神経膜内表面に残存している微小管。結合した C F が粒状に見える。

核磁気共鳴測定による血漿アルブミン分子の構造転移と MOLECULAR AGEING の研究

曾我美 勝, 長岡俊治, 井上 洋, 恵良聖一 (岐阜大・医・生理) 亘 弘, 志賀 潔 (生理研)
赤坂一之 (京大・理・化学)

牛血漿アルブミン (BPA) は 0.10 M NaCl 中において N-F 転移 (pH 4.5 ~ 3.7), N-B

転移 (pH 7~9), N-A異性化反応 (pH 7以上で, 分子内 SH S-S交換反応により A 型と呼ばれる異性体が出来る) を示す。今回は 360 MHz NMRを用い N-F 転移における構造変化, 特に動的構造変化について研究した。

(1) N-F 転移において二次構造変化 (N 型: $f_\alpha = 0.73$, $f_\beta = 0.15$, F 型: $f_\alpha = 0.61$, $f_\beta = 0.22$) は観察されるが, 固有粘度の変化は僅少である。しかるに図 1 に示すように, ^1H -NMR スペクトルは F 型では, 一般にシャープになり, 特に低磁場側の aromatic region は蛋白質の "UNFOLDING" に似た変化が認められる。N-F 転移において, 大部分の側鎖の可動化, 無秩序化を起していると考えられる^{1, 2)}。

(2) BPA 分子の N 型, F 型の "固さ" の差について, スピン拡散法³⁾を用いて測定した。 $f_2 = -7.18$ ppm において presaturation pulse を 0.001~4.00 sec にわたって加えた。得られた $1/T_1^*$ (rate of saturation) と別に求めた $1/T_1$ (spin lattice relaxation rate) より $1/T_{IS}$ (rate of spin diffusion) を求めた。

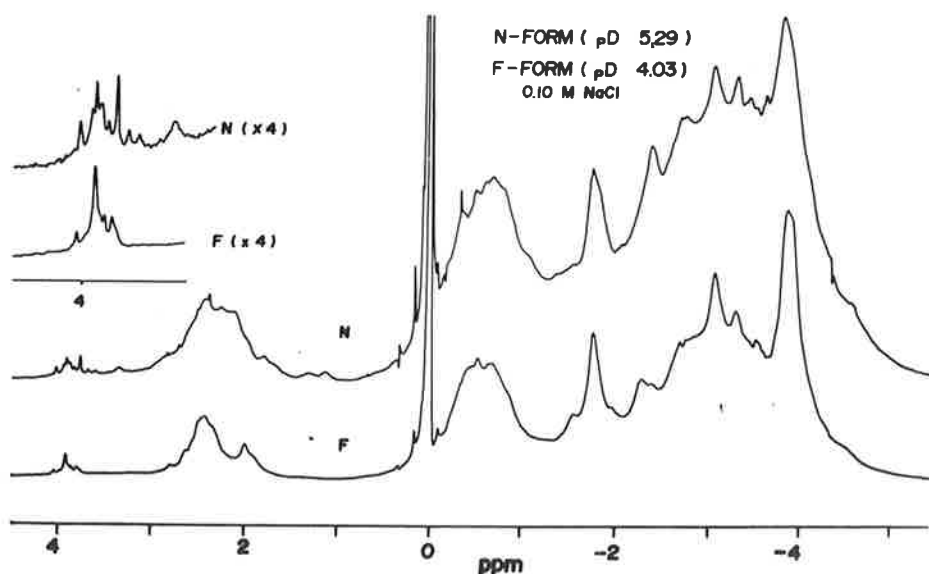
(表 1)

表 1 に示すように, BPA 分

		-CH ₃	LYS(CE)	AROM	HIS	
N-型	T_1 (sec)	0.88	0.86	1.06	1.25	子の固い部分にあるメチルプ
(pD 5.29)	T_{IS} (sec)	0.40	0.41	0.38	0.41	ロトンより -CH ₃ , LYS
F-型	T_1 (sec)	0.79	0.83	0.98	1.14	(CE), AROM, HIS へ
(pD 4.03)	T_{IS} (sec)	0.62	0.76	0.51	0.82	のスピンドiffusion, T_{IS} は N 型

では約 0.4 sec であるが, F

型では 0.5~0.8 sec である。云いかえれば, N 型では "固い領域" の多いことを示している。



- (1) 大串幹夫, 和田昭允, 球状蛋白質の液相, 日本生物物理学会予稿集, 19, 337 (1981)
- (2) 曾我美勝, 長岡俊治, 井上洋, 恵良聖一, 亘弘, 志賀潔, 赤坂一之, ^1H -NMRによる
血漿アルブミン構造転移の研究, 生物物理学会予稿集, 19, 167 (1981)
- (3) K. Akasaka, Longitudinal Relaxation of Protons under
Cross Saturation and Spin Diffusion (未発表)

研 究 会 報 告

Linear is good, non-linear is better

(1981. 6. 8.)

Van der Tweel (アルステルダム大学・医用物理・教授)

演者は視覚系の特性について Fourier 解析を用いたシステム解析法による研究を紹介した。強度が正弦波状に変化する光でネコの眼を刺激し、ERG を記録すると、ERG の波形と線形な関係を持つ事を示した。同様な刺激を用いてヒトの視覚誘発電位を解析すると、大脳皮質は選択的にある周波数の刺激によく応じるが(いわゆる共振周波数)、やはり、その応答波形は単純な線形モデルによって説明出来るものであった。誘発電位の共振周波数と同じ周波数を持つ変調光刺激に対してはほぼ完全に線形な応答を示したが、刺激の変調周波数を共振周波数の約半分にすると、刺激の2倍の周波数(第二次高調波)を持つ応答が出現した。この現象から網膜と皮質の間には整流特性を持つ神経機構が存在することが示唆された。

もし視覚系が単純に線形特性を持つ系が直列に連って出来ているのであれば、これらのサブユニットがどのような順序で配列しているかはシステム解析では判断はできないが、非線形特性を持つ整流機構の存在によってそれが可能になる。種々の実験例によって整流ユニットは誘発電位と同一の共振周波数を持つ脳の選択 filter 素子の前に存在しなければならないことが明らかになった。これが "linear is good, non-linear is better" といわれる由縁である。

雑音はこうした神経の情報処理機構に対してどのような影響を与えるのであろうか。一般的に言って、もしノイズレベルが modulation depth より大きければ、整流機構が働かなくなるはずである。この事実は視覚系にも当てはまる。第1に、整流特性を持つサブユニットの存在部位の同定にこの手法を用いた。いま光受容器 level で量子性雑音が modulation depth を越えと考えられるような刺激を両眼に同時に与えた場合には、第二次高調波は出現せず、刺激と同一の周波数を持つ誘発電位が得られた。しかし変調光を片眼に、ノイズを他眼に与えたのでは第二次高調波は消失しない。この事実から整流サブユニットは両眼入力が大脳皮質へ収斂する前段階に存在することが示唆された。第二に正弦波とノイズを両眼に与える場合でも第二次高調波の出現を抑える S/N 比が極めて低い事実である。即ち、視覚系の場合には、理論的に考えられるよりはかなり低い S/N 比を持つ刺激を与えても第二次高調波を持つ誘発電位が得られた。この事実は整流機構に到達する前に、収斂により受容器信号の加算平均が行なわれて S/N 比の改善が生体内で起っているためと考えられる。

(田 内 雅 規)

課 題 名

虚血の問題点と総合的解決に関する研究
(56. 6. 25 ~ 27)

春 見 健 一 (昭和大学)

Fast channel 依存性 slow conduction の性質と意義

有田 真 (大分医科大学・生理)

細胞内 ATP 及び pH の心筋活動電位への影響

— 心筋虚血による電気活動変化のメカニズム解明のために —

倉智嘉久 谷口淳一 入沢 宏 (生理研)

心筋虚血の定量的診断と心電図

井上通敏 (大阪大・医)

心筋虚血による電氣的障害の機序

平岡昌和 (東京医歯大・難研)

低酸素心筋に対するディソピラマイドの作用と抗不整脈効果

小西興承 (京大・医)

高血圧性血管障害の成因および病態についての臨床的検討

石井當男 (東大・医)

心臓の力学とエネルギー学

菅 弘之 (循環器病センター)

冠動脈狭窄による虚血とその指標

中村芳郎 (慶応大・医)

RI 法の最近の動向；虚血の問題の総合的解決に関する研究

石井 靖, 向井孝夫 (京大・医)

房室接合部領域の自動性並びに伝導性に及ぼす冠拡張薬の影響

元村 成 (山梨医大)

異型狭心症発作時の不整脈発生状況

早川弘一 大津文雄 鈴木謙吾 岸田 浩 (日本医大)

急性心筋虚血領域の定量的測定と後負荷軽減療法

猪岡英二（東北大・医）

虚血による心筋障害—心筋細胞構築崩壊過程からの検討

矢崎義雄 永井良三（東大・医）

我が国における循環器系の研究態勢の問題点

外山淳治（名大・環研）

概 要

虚血疾患は心疾患の中で最も重篤な疾患で、その発生、治療については総合的理解が必要であるに抱らず、ほとんど基礎的研究が行われなかった。本研究会は、春見教授の司会のもとに2日間に亘たり、あらゆる方向から問題点を探り出すことに重点をおいて討論が行われた。以下はその抄録であるが、さらに詳細に亘っては医学のあゆみに連載中である。

Fast channel 依存性 slow conduction の性質と意義

有田 真（大分医科大学生理）

細胞外液の K^+ 濃度を増加し、静止電位が -50mV 前後に脱分極した Purkinje 線維の活動電位は、その最大立ち上り速度 ($\dot{V}_{\max}$) が小さく、興奮伝導速度が遅いことより、Cranefield (1972) により slow response と命名されたが、以来 slow response の reentry 形成における重要性が注目されている。一方、急性心筋梗塞発症直後にみられる心室性不整脈の発生機序については定説がなく、細胞外 K^+ 濃度 ($[K^+]_o$) の増加、catecholamine 濃度の上昇、乳酸産生、pH の低下などの総合効果による reentry あるいは automaticity の発生が推定されているに過ぎない。最近 Kirche ら (1980) は K^+ sensitive electrode による細胞外の K^+ 濃度測定により、急性冠動脈結紮を行うと 10 分以内に虚血部心筋の $[K^+]_o$ は $16 \sim 17\text{mM}$ に達し、同時に冠静脈血中の noradrenaline の濃度が上昇すること、およびこれに一致して心室性期外収縮、心室頻拍、心室細動が生じることを示している。今回は、このような梗塞発作直後の不整脈の機序を知る一端として、 $[K^+]_o$ を $16 \sim 17\text{mM}$ に増加したときのモルモット心室筋でみられる活動電位と伝導速度の変化、およびこれらに対する catecholamine の効果を観察した。また摘出表面灌流標本の代謝状態を知るため、心筋内 nucleotids などの同時測定を試みた。

実験方法

モルモットの心室乳頭筋を摘出し、基部を電気刺激用銀線輪状電極で筋槽内に固定し、酸素加 Tyrode 液で灌流した。高 K^+ 液は Tyrode 液 ($K^+ = 5.4 \text{ mM}$) に 1 mol KCl を適量加え、 16.7 mM と 40 mM K^+ 液を調整した。catecholamine の効果はこれらの液に isoproterenol ($0.5 \mu\text{M}$) を添加して観察した。電気刺激は $0.1, 0.5, 0.9 \text{ Hz}$ の頻度で持続 2 ms 、閾値の 1.5 倍の強さで行った。また必要に応じ期外刺激を与えた。代謝産物の測定は、標本の状態を電気生理学的実験条件になるべく揃えるため、標本摘出後これを酸素加 Tyrode 液中に $20 \sim 30$ 分放置し (室温)、その後 5.4 mM (正常 K^+ 液) または 20 mM (高 K^+ 液) の酸素加 Tyrode 液で灌流する筋槽内 (37°C) に移し、 1 Hz の電気刺激で 20 分間駆動した後、液体窒素凍結下に標本をすりつぶし、 -20°C に保った 50% ethanol + 1.25 mM EDTA 溶液中で 4 日間、抽出を行った。抽出液を LKB Tachophor の capillary に移し等速電気泳動を行い、ATP, ADP, AMP, IMP, Pi, Lactate, Succinate, G-6-P, Pyruvate, NAD, NADH 等の濃度を測定した。

結果と考察

1. 電気刺激の強さ、極性と $\dot{V}_{\text{max}}$ の関係: K^+ 脱分極心筋を電気刺激して活動電位を発生させる場合、latency period の長短で最大立ち上り速度 ($\dot{V}_{\text{max}}$) が影響されるとの報告がある (Gettes & Revter, 1974)。そこで 0.1 Hz の脱分極刺激と過分極刺激を用い、その刺激強度を変え latency を色々変化させたときの $\dot{V}_{\text{max}}$ の変化を観察した。その結果、脱分極方向の刺激であれば $\dot{V}_{\text{max}}$ は latency に無関係であることが判明した。過分極方向の刺激では刺激の強さに応じ (従って latency の長短に応じ) $\dot{V}_{\text{max}}$ が複雑に変化するので、このような実験には使用できない。従って以後の実験では常に脱分極性刺激を用いた。

2. 高 K^+ 液と isoproterenol の再分極相に及ぼす効果: 標本を 16.7 mM の高 K^+ 液で灌流すると、膜は $-57 \pm 2 \text{ mV}$ まで脱分極し、活動電位持続時間 (APD) は短縮する。このとき刺激頻度を $0.1 \rightarrow 0.5 \rightarrow 0.9 \text{ Hz}$ と変化させても、APD は不変である。また活動電位が終了しても不応期は終了せず、先行活動電位終了点から最早期期外活動電位出現までに約 150 ms の時間 (post-excitation refractoriness, PX) を必要とする。これに isoproterenol ($0.5 \mu\text{M}$) を作用させると PX は刺激頻度によらず一様に約 $1/3$ に短縮し、かつ APD は 0.1 Hz では延長、 0.5 Hz では不変、 0.9 Hz では短縮を示した。その結果不応期 ($= \text{APD} + \text{PX}$) は 0.1 Hz では不変であるが、 $0.5, 0.9 \text{ Hz}$ と刺激頻度増加につれ有意に短縮した。すなわち、isoproterenol は APD に刺激頻度依存性の短縮を発現させる。このことは梗塞巣内心筋の $[K]_o$ が一定であっても、もし catecholamine の局所濃度に差があれば、不応期の長さには不揃いが生じ、unidirectional block による reentry が生ずる可能性を示す。またその不揃いは頻脈で一層著明となろう。

3. 高 K^+ と isoproterenol の脱分極相に及ぼす効果: $[K]_o = 16.7 \text{ mM}$ に

すると、前述のごとく静止電位は -57mV に脱分極するが、このとき活動電位上昇脚に step を生じ、その一次微分波形は二峰性となる (Split $\dot{V}_{\max}$)。その前方成分は比較的鋭く、振幅は $32 \pm 7 \text{ V/s}$ であった。一方後方成分は鈍で振幅は $10 \pm 2 \text{ V/s}$ で前者の約 $1/3$ である。前方成分は tetrodotoxin ($1\mu\text{M}$) で、後方成分は 1-verapamil ($1\mu\text{g/ml}$) で選択的に阻止されることにより、前者は fast channel、後者は slow channel の活性化によって生じると考えられた。次に微小電極を標本の縦方向に約 $2 \sim 3 \text{ mm}$ の間隔で刺入し、このような活動電位による伝導速度を計測した。それによると、このような K^+ 脱分極心筋の伝導速度は 30 cm/sec 内外であり、いわゆる slow response に近い伝導速度 ("slow conduction") を示した。Lidocaine ($2\mu\text{g/ml}$) を加えると、この速度は $15 \sim 20 \text{ cm/s}$ にまで低下し、その後急に伝導途絶を来す。この際、Split $\dot{V}_{\max}$ は常に前方成分のみが低下 (約 50%) し、後方成分は不変であった。一方 slow channel の選択的阻害剤 1-verapamil ($1\mu\text{g/ml}$) を作用させると、前方成分に変化なく、また伝導速度も変化しなかったが、後方成分の $\dot{V}_{\max}$ は約 50% に減少した。以上の事実より、 $[\text{K}]_o = 16 \sim 17 \text{ mM}$ では、通常、心室筋の conduction は slow channel ではなく、fast channel の活性化により行なわれていると考えられる。そこでこのような "depressed fast channel" に依存した "slow conduction" に対する isoproterenol の効果を観察した。著明な Split $\dot{V}_{\max}$ を呈している活動電位に isoproterenol ($0.5\mu\text{M}$) を与えると、まず後方成分が急速に前へ接近し、かつ振幅が $3 \sim 4$ 倍に増大する。一方前方成分には変化が生じないので、結局後方成分は前方成分をとり込み、かつこれを陵駕する。従ってこのとき伝導に与かる channel は fast より slow に移行したと考えられる。しかしその伝導速度は isoproterenol 作用前に比し、僅少の増加 (20%) にとどまった。この結果は、 K^+ 脱分極心筋の興奮伝導が、通常は fast channel に依存しているも、局所の catecholamine 濃度によっては、伝導速度を大きく変えることなく、fast $\rightarrow$ slow または slow $\rightarrow$ fast へと移行する可能性を示すものであろう。4. $[\text{K}]_o$ 変化と $\dot{V}_{\max}$: ある一定の $[\text{K}]_o$ ($= 16.7 \text{ mM}$) における split $\dot{V}_{\max}$ の性質は判明したので、次に $[\text{K}]_o$ を正常の 5.4 mM から最終濃度 40 mM へ増加してゆく途中経過における静止膜電位 (E_m) と $\dot{V}_{\max}$ の関係を求めた。 $[\text{K}]_o$ を $5.4 \rightarrow 40 \text{ mM}$ へと増加するとき得られる $E_m - \dot{V}_{\max}$ 曲線は、 $40 \rightarrow 5.4 \text{ mM}$ へと減少するときのそれに比し、約 8 mV 脱分極方向へ偏位した。すなわち $[\text{K}]_o$ 増加の場合は減少の場合に比し、同一 E_m における $\dot{V}_{\max}$ が大である。さらに同一の手技で $\dot{V}_{\max}$ と伝導速度 (θ) の関係をみるに、 $[\text{K}]_o$ を増加するときのほうが、減少するとき比べ、同一 $\dot{V}_{\max}$ における θ が大であることが判明した。これらの事実を併せ考えると、冠閉塞により $[\text{K}]_o$ が増加すれば、 E_m もそれぞれに応じ減少するが、 $\dot{V}_{\max}$ と伝導速度の減少は急には生じ難いことを意味しており、reentry 発生に対し防禦的に働いているように思われる。一方再灌流により $[\text{K}]_o$ を減少させるときは、 $[\text{K}]_o$ 減少に応じ E_m は増加し、かつこれに平行して $\dot{V}_{\max}$ も伝導速度もすみやかに回復することを意味する。5. $[\text{K}]_o$ 変化と心筋内代謝産物濃度: 二峰性 $\dot{V}_{\max}$ を得るような $[\text{K}]_o$ と刺激条件

において心筋内 ATP, ADP, AMP, CP, IMP, NADH, NAD, Pyruvate, Pi, Lactate G-6-Pなどを、等速電気泳動法を利用して測定した。その結果、筋槽内灌流液の K^+ 濃度が 5.4 mM と 20 mM の場合では、これら諸物質濃度の間に有意差が認められなかった。しかし摘出直後の乳頭筋（筋槽内で灌流や電気刺激を行わないもの）に比べると、灌流を行ったものは NAD, NADH, IMP で約 90%, ATP, ADP, AMP で約 80%, CP と G-6-P で約 50% の減少を示した。一方, Pyruvate, Pi, Lactate には有意な減少、増加を認めなかった。この結果は、正常 Tyrode 液中で一見“生理的”な収縮と電気現象を呈している標本であっても代謝の面からみると“非生理的”な状態にあることを示す。酸素加 Tyrode 液による表面灌流乳頭筋標本で、このような大幅な nucleotid の減少が生じる理由は不明であるが、可能性として① O_2 が標本の表面のみにしか浸透せず、内層では酸化的リン酸化が行われないこと、②摘出時の侵襲により膜透過性の異常が生じ、灌流により nucleotids が流出する、などが考えられる。

結 論

1) $[K]_o = 16.7$ mM におけるモルモット心室筋活動電位の立ち上り相の $\dot{V}_{max}$ は二峰性を示し、前方成分 (30 V/s) は fast channel, 後方成分 (10 V/s) は slow channel による。またこの際の興奮伝導は (depressed) fast channel による。2) Isoproterenol が存在すると、後方成分が前方成分を凌駕し伝導は slow channel 依存性に変化する。また 0.5 Hz 以上での不応期が短縮する。3) $[K]_o$ を 5.4 → 40 mM, または 40 → 5.4 mM へ連続的に変化させる経過中に得られる $E_m - \dot{V}_{max}$ 関係, $\dot{V}_{max} - \theta$ 関係は同一でない。4) 高 K^+ 脱分極心筋で $\dot{V}_{max}$ を測定するには刺激の強さと極性に充分留意する必要がある。5) 酸素加 Tyrode 液で電気刺激下表面灌流を行った摘出乳頭筋の nucleotid 総量は正常の 20% に減少している。

研究の総合的解決に関する意見

ある実験モデルにおいて、虚血による不整脈が reentry で生ずることがもし完全に証明されたとすれば、次の問題は「その impulse conducting channel は何か?」ということであろう。今回の結果は、reentry に必要な “slow conduction” を担当する ion channel は従来のごとく “fast”, “slow” といった固定的なものでなく、局所細胞内外の環境条件の変化（およびその変化が生じる速度）によっていかようにも変りうることを暗示している。たとえば抗不整脈剤による治療が画一的には成功しない背景の一つとして、このような “conducting channel の移行” の問題を考える必要がありそうに思われる。その際の “channel modulator” としては、今回示した catechalamine のほか、あらゆる生体内 transmitter, 代謝産物、および外部由来の薬物（抗不整脈剤を含む）などが考えられる。これに関連し表面灌流摘出標本の代謝産物濃度の測定を行ったところ、“生理的” とみなしていた標本が代謝面からは必ずしも生理的と言えなかつ

たのは教訓であった。摘出心筋標本の深部組織で、ATPの合成が行われていないとすれば、収縮性については勿論、表層の正常代謝部の興奮伝導にも間接的影響を与えると考えられる。従って今後は実験の目的に応じ、摘出標本の *metabolic state* をできる限り測定し、生理学的手段で得た *data* の解釈に反映させる方向が望まれる。

細胞内 ATP 及び pH の心筋活動電位への影響

—心筋虚血による電気活動変化のメカニズム解明のために—

倉智 嘉久, 谷口 淳一, 入沢 宏 (生理研)

心筋虚血は、低酸素、アシドーシス、代謝物質の蓄積等、複雑な変化の結果として心筋の電気活動の変化をきたし、種々の不整脈の原因となる。そのメカニズムを解明するためには、虚血によって引き起こされる細胞内外の変化が、それぞれいかに心筋の電気活動に影響するかを明らかにする必要がある。我々は虚血時心筋細胞内変化に焦点をあて、細胞内 ATP レベルの変化、および、細胞内 pH の変化の活動電位 (AP) への影響について、単一心筋細胞への注入実験により明らかにした。

1) 細胞内 ATP の AP への影響: 低酸素及び代謝阻害剤投与下では、心室筋 AP は短縮する。それは主として、細胞内 ATP の低下による緩徐内向き電流 (i_s) の減少によるとされている。しかし、未だ細胞内 ATP レベルと AP (とくに i_s) との相関は詳細には解明されていない。我々は、ATP を単一心筋細胞へ注入することにより、ATP レベルの AP への影響を検討した。ATP 注入により AP は著明に延長した。又、KCN 投与により短縮した AP も著明に延長し、細胞内 ATP レベルが AP のプラトー相を大きくコントロールしている事が示された。この AP の延長はジギタリス投与下でも観察され、Na ポンプの活性化による Na 及び Ca 勾配の増大によるものとは考え難く

i) 細胞内 ATP の変化によるサイクリック AMP の変化 ii) ATP が直接的に i_s をコントロールする事 iii) ATP レベルの変化による心筋細胞内小器官等による細胞内イオン濃度の変化 (とくに Ca イオン), の 3 つの可能性が考えられる。

2) 細胞内 pH の AP への影響: 虚血では、嫌気性代謝のため乳酸が著積し、細胞内アシドーシスがおこる事はよく知られている。細胞内アシドーシスは、1 つは ATP 産生を抑制する事により、又、1 つは細胞間アシドーシスをおこす事により、 i_s を減少させると考えられている。我々は種々の pH の溶液を細胞内へ注入する事により、細胞内 pH の AP への影響を検討した。酸性溶液を注入すると、AP は短縮し、アルカリ性溶液を注入すると延長した。この変化は TTX 投与下、あるいは高 K 溶液 (27mMK) 中でも観察され、主として i_s の変化によるものと考えられた。又、細胞内緩衝作用を考慮に入れると、この変化は比較的早く、ATP レベルの変化によるとは考え難く、pH

変化による細胞内 Ca イオンの濃度変化、及び、細胞内 pH の i_s への直接的影響の 2 つの可能性が考えられる。

以上、細胞内からの心筋の電気活動の制御因子として、我々の検討した ATP 及び pH について記述した。このように活動電位の細胞内制御メカニズムを明らかにしてゆく事は虚血時心筋の電気活動の変化の理解に大きく貢献すると考えられる。

心筋虚血の定量的診断と心電図

井上 通敏（大阪大学医学部第一内科）

心電図は現在も心筋虚血を診断する有力な方法である。ST 偏位や T 波の異常が心筋虚血と関係していることは疑いないが、その成立機序や因果の定量的な関係は必ずしも明らかでない。一方、臨床的には心筋梗塞や虚血の大きさ、拡がりを中心電図から判断しようとする試みがある。ここではこれに関して順方向と逆方向の問題を取上げてみる。

A. 順方向問題

動物実験やコンピュータシミュレーションによってある原因が与えられるとどのような結果が得られるかという順序で研究を進める。

i) T 波の極性は活動電位持続時間の gradient によって決める。正しくは、興奮伝導時間も関係し、伝導時間はプルキシエ線維と固有心筋とで異なる。シミュレーションの結果では、心内膜側と心外膜側への間に $30 \sim 40 \text{ msec/cm}$ の gradient があれば正常の QRS-T 夾角となった。肥大大心での平低 T、心筋梗塞初期の tall T、慢性期の coronary T あるいは HCM でみかけられる巨大陰性 T などの成立機序を同じようにシミュレーションで説明し得るであろうか。U 波の成立機序についてのいくつかの説を検証する方法としてもシミュレーションは有用かも知れない。

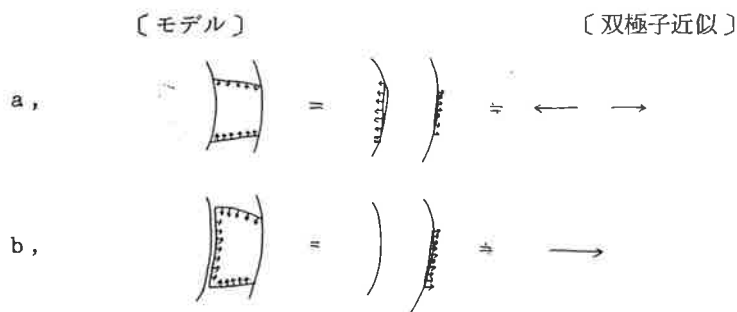
ii) ST の偏位は、虚血部と非虚血部の境界面に傷害電流が生じた結果起り、ST 偏位の大きさは、境界面が観測点に対して張る立体角 (ω) と傷害電流の強さ (ϕ : 単位境界面当り) の積に左右される。(立体角理論)、この理論が正しいとすると、胸壁面 ST 偏位の大きさは、虚血の大きさよりも虚血の形状、つまり境界面によって左右される。ここで 1 つ問題なのは、貫壁性虚血の際、心内膜下数層の心筋が一部 intact で (心腔内より直接灌流されるため) そのために側面 (lateral border) のみでなく心内膜にも境界面が生じているのではないかということである。シミュレーションの結果では、心内膜側にも境界面を考えた方が ST 偏位をより説明し得た。

iii) 共同研究者の堀は、犬の心臓に実験的に心筋梗塞を起し、心表面の ST 上昇を確かめた後、

KCl を心腔内に注入したところ（最終濃度は約 9 mmEq/l ），ST 偏位が減高することを観察した。この結果について，KCl により心内膜下心筋の脱分極が抑えられ，心内膜下に存在した境界面が消失または減少した結果ではないかと考察している。

B. 逆方向問題

胸壁面 ST 偏位のマッピングから心筋梗塞の大きさと部位を解くことを問題とした。モデルを設定するに当り，虚血－非虚血部境界面の形が問題となる。境界面が lateral border のみならば等価二重層のように心室壁をはさんで反対方向を向く 2 つの面に置き換えられる。一方，心内膜側にも境界面が存在するならば，心外膜側に 1 つだけの面を想定すればよい。（図 1）



現在，私どもが解いているのは後者のモデル（b）である。モデル（a）についても解く予定でいるが，a の面白さは，心内膜の方へ拡がった虚血（心内膜下梗塞など）と心外膜側に拡がった虚血（心膜炎を含む）とで違った解が出るかどうかである。

以上，虚血の定量に関し心電図の順方向問題と逆方向問題の例を示したが，両問題を併せ研究することによって何らかの解が得られるものと考える。

心筋虚血による電氣的障害の機序

平岡 昌和（東京医科歯科大学難治疾患
研究所循環器病部門）

心筋虚血に伴う電氣的障害の発生には多数の因子が複雑に関与しており，その詳細には不明な点が多い。それらの因子には，虚血による細胞障害の程度や範囲，酸素欠乏による細胞膜電気現象への直接効果，組織代謝産物による膜作用などが考えられる。そこで，これらのいくつかの要因についてのこれまでの研究成果について述べる。

受動的膜電気特性に対する低酸素の効果

犬の心室固有筋を用い、低酸素の受動的膜電気特性に対する効果を検討した。膜電気特性の諸値は、single sucrose gap法を用いて通流し、得られた電位変化の値からケーブル解析により求めた。対照時 200 mmHg 以上の酸素分圧を含む灌流液より pO_2 35 - 45 mmHg の低酸素液で 30 分間灌流し、その際に得られた値を対照時のそれと比較した。低酸素下 30 分で最も著明な変化のみられのは細胞内抵抗 R_i の増加 (25%) と空間定数 λ の減少 (14%) であり、これらは有意の変化を示した。膜抵抗 R_m は低下する傾向 (10%) がみられたが、有意の変化ではなかった。時定数 τ_m や膜容量 C_m には著変は認められなかった。

低酸素状態におけるグルコースの役割りをみるために、無グルコース液の効果をみてみた。無グルコースにて低酸素下におくと、 $R_i \cdot \lambda \cdot R_m$ などの変化がより著明になることが判明した。これらの結果は、低酸素による受動的電気特性の変化に対し、グルコースが防御的役割りを有している可能性が考えられた。

低酸素の Na 電流 (I_{Na}) の不活性化過程に対する効果

I_{Na} の不活性化とその回復過程は、膜電位と時間とに依存性を示し、不活性化からの回復の時間経過は膜電位によって異ってくる。このことは、不応期の決定、期外収縮のブロック発現、伝導遅延などをつくる因子となり、不整脈の発生と関連が深い。そこで、この I_{Na} の回復過程に対する低酸素の効果を検討した。

摘出した犬の心室固有筋を用い、活動電位とその最大立上り速度 ($\max. dV/dt$) を測定、後者を I_{Na} の指標とした。2つの連続刺激を種々の異なる連結間隔で与え、最初の刺激による活動電位の再分極から次の活動電位の立上りまでの時間を拡張期間隔 (diastolic interval) とし、その各時点での $\max. dV/dt$ の値を求めた。また、静止電位の値をかえるため K^+ 濃度を 2 - 20 mM まで変化させた。

低酸素状態 60 分で $\max. dV/dt$ の値はいずれの膜電位にても低下がみられたが、その定常状態での値は normalize とすると対照時のものと変化なく、膜電位依存性には著変のないことが判明した。一方、 $\max. dV/dt$ の回復の時間経過をみると時定数ではやや延長の傾向を示し、その最終値は各電位にて明らかに低下を示した。

この結果、低酸素状態により Na の最大コンダクタンス ($\bar{g}_{Na}$) が減少するが、その回復の kinetics には著変をきたさないことが判明した。

乳酸の電気生理学的作用

心筋虚血時に多量の乳酸が産生され、冠血流中に増加することは臨床的にもよく知られている。この増加した乳酸が電気生理学的にどのように作用するかまだ充分解明されていないので、摘出し

た犬のプルキニエ線維と心室固有筋とを用いて比較検討した。

乳酸 60mM を投与すると、静止電位の軽度減少（平均 8mV）、 $\max. dV/dt$ の減少（10%）、活動電位持続時間（APD）と不応期の短縮（17%）などが認められた。 $\max. dV/dt$ の低下の機序を知るために静止電位を変化させて調べたところ、対照時及び乳酸投与後の値は全く一致した。このことより $\max. dV/dt$ の低下は静止電位の減少によることが判明した。APD の短縮効果につき、プルキニエ線維と心室固有筋での効果の時間的差異をみたところ、プルキニエ線維にやや早く発現することが判明した。このために、乳酸投与の経過中に両者の APD の関係が逆転して、期外収縮が P-M 接合部でブロックされることのあることが観察された。なお、プルキニエ線維では乳酸投与により自動能の亢進することがみられた。

心室固有筋での膜電流の変化をみると、乳酸投与により slow inward current が減少、K 電流には殆んど変化がないか軽度減少した。

以上の結果、乳酸は $\max. dV/dt$ の低下、伝導遅延や一方向性ブロックを生じやすく、不応期の短縮とともに re-entry を生じやすくなること、また心室内特殊心筋に異所性自動能を亢進せしめることなどより不整脈発生に寄与することが判明した。ただし、これらの変化は比較的軽度であり乳酸単独では不整脈発生の主因とはなり難いと考えられた。

このように虚血時の不整脈発生に関与すると思われる 2～3 の因子について検討してみたが、その各々が異なる電気生理学的作用をもち、また組織による効果の違いなどを有している。今後は、これら各因子についてのより詳しい効果の定量的検討、組織間の感受性の差異などを明らかにするとともに、これら各因子の相互作用などについても明らかにされねばならない。

虚血研究の総合的ビジョン

方法論として

- ・虚血の定量的表現法ないし、その測定法の開発が望まれる。
- ・in vivo, in vitro の条件下での虚血のよい実験モデルの作製
- ・上記モデル標本を用いての電圧固定法やイオン感受性電極を用いた実験データをつみ重ねる。などが必要と考える。

総合的ビジョンとして

- ◎ 科学研究費の配分を 1 年単位とせず、独創的・創造的テーマに対しては 5～10 年単位で配分する。その際の対象者は若い研究者を対象とする。
- ◎ 全国に 2～3 ヶ所拠点の研究機関を設ける（この場合、既存の研究機関の設備の拡大や充実でもかまわない）。各々の機関で 1 年に 1～2 回種々のテーマにつき研究討論会を開くとともに、交流研究も行えるようにする。この参加者は実際に各研究テーマの研究に従事している者とし、また医学以外の領域の研究者も含むものとする。

- ◎ 日本で発行される循環器関係の英文雑誌の充実をはかる。その方法として査読制度の徹底、採用決定から印刷までの時間をできるだけ短縮することの他に、各研究者は優れた研究業績は海外雑誌に投稿しないことを申し合わせ、我国の英文雑誌の質を高めることに協力する。

低酸素心筋に対するディソピラマイドの作用と抗不整脈効果

小西 興承（京大医学部第三内科）

心筋虚血による不整脈はときに致命的となりその治療は臨床的に重要なテーマである。心筋梗塞の急性期を集中的に治療するCCUにおいては不整脈に対してもっぱらリドカインが用いられ著効をあげているが、それに続く慢性治療や梗塞にいたらない虚血性不整脈に各種の経口薬が使用される。ディソピラマイドもその一つで重篤な副作用が少いので近年よく用いられるようになって来ている。そこでこの薬剤の電気生理的不整脈機序を知るために低酸素条件下の作用を検討した。

方 法

ペントバルビタール静脈麻酔（ 30 mg/kg ），加圧人工呼吸下に摘出した家兎心臓から酸素飽和タイロッド液中で右室乳頭筋または右室自由壁 trabeculae を切出し、実験浴槽中に固定する。 $35 \pm 0.5^\circ\text{C}$ のタイロッド液で表面灌流し、心筋片の一端より閾値の2倍電圧、 2 ms 持続、 2 Hz の短形波で刺激し、30分後より通常の微小電極法により膜電位を記録した。基本刺激（ $S_1 - S_1500\text{ ms}$ ）8発毎に1発毎の期外刺激（ S_2 ）を加え連結期を 5 ms ずつ減少して活動電位を発生しない最長の $S_1 - S_2$ をもって有効不応期（ERP）とした。低酸素条件は液をバブルする混合ガスの O_2 を95%から5%（ CO_2 5%，他は N_2 に置換）に落すことで得た。灌流液の O_2 分圧は対照時（95% O_2 ） $500 \pm 40\text{ mmHg}$ ，低酸素時 $90 \pm 10\text{ mmHg}$ であった。低酸素条件30分後に同じ測定を行い、ディソピラマイド、 $5 \times 10^{-6}\text{ g/ml}$ を加え測定を繰返した。一方正常条件下の心筋に対するディソピラマイドの作用を記録して比較した。

結 果

低酸素は活動電位0相最大立上り速度（ $\dot{V}_{\text{max}}$ ）を $173.9 \pm 16.0\text{ V/sec}$ から 160.3 ± 17.4 （ $P < 0.001$ ）へ軽度減少させた。90%再分極時間（AP90）は $186.6 \pm 7.2\text{ ms}$ から 158.8 ± 15.5 （ $P < 0.01$ ）ERPは $159.0 \pm 11.8\text{ ms}$ から 138.0 ± 10.4 へと短縮した。これらの変化はさらに30分以上観察を続けてもほぼ定常状態にあることを確認した。静止電位（RP）は $80.7 \pm 2.5\text{ mV}$ から 80.0 ± 2.4 活動電位振幅（AP）は $108.2 \pm 5.2\text{ mV}$ から 106.7 ± 5.4 といずれも有意な変化を

示さなかった。ディソピラマイドを添加すると $\dot{V}_{\max}$ は 116.6 ± 21.2 と ($P < 0.001$) さらに減少し, AP_{90} 188.6 ± 12.7 ms, ERP 159.5 ± 5.8 ms は対照的と同値に回復した。RP, AP は軽度ながら有意 ($P < 0.05$) に減少した。正常灌流液中にディソピラマイドを添加した場合は $\dot{V}_{\max}$ 174.2 ± 14.2 V/sec から 152.4 ± 14.0 へ低下 ($P < 0.001$), AP_{90} は 186.4 ± 5.3 から 205.6 ± 12.7 ($P < 0.01$) 有意に延長した。RP, AP には有意な変化をみなかった。ディソピラマイドの低酸素下および正常心筋への作用を比較すると $\dot{V}_{\max}$ 低下は $-30.2 \pm 6.6\%$ と $12.6 \pm 1.3\%$, ERP 延長 $+15.9 \pm 4.7\%$ と $+9.2 \pm 4.5\%$ はいずれも低酸素下からの変化が大きかった。

考 案

抗不整脈剤の病的な心筋に対する作用は正常心筋に対するそれと異なり, 臨床条件での効果を知るためには必ず病的な心筋についての検討が必要とされている。われわれの目的は虚血心筋に対するディソピラマイドの作用を知ることであったが, 虚血は単なる低酸素でなく高 K^+ , アシドーシスも重要な因子である。しかし実験条件が複雑となるので今回は低酸素のみで検討した。まずディソピラマイドは低酸素で低下した活動電位 0 相立上り $\dot{V}_{\max}$ をさらに抑制した。心筋梗塞の場合は細胞外高 K^+ 環境のため RP が浅くなり $\dot{V}_{\max}$ はさらに低いことが予想される。心筋梗塞初期では虚血部への興奮伝播が極端に遅れリエントリー発生の因子とされているがこの伝導遅延が slow channel dependent か, partially inactivated fast channel が活動電位立上りに関与しているためか問題の残るところである。後者の方が有力であることは実験的にも臨床的にもベラパミルの効果は不確実でリドカインがその卓効ゆえに CCU での第一選択となっている事実からも推測される。そうであるとすればディソピラマイドもリドカインと同方向の作用をし, 一方向ブロックを両方向ブロックに変えることでリエントリー性不整脈の発生を防止すると考えられる。

次に低酸素では AP_{90} , ERP が短縮するがこれは正常心筋との差が生じ, ある時点で不応期にある心筋と不応期を脱した心筋の混在を生じることになりリエントリー好発の一因子となる。ディソピラマイドの AP_{90} , ERP 延長作用は正常心筋よりも低酸素心筋でより大きいことは上記の不応期のばらつきを均一化する方向にそろえリエントリー防止に効果を上げると考えられる。

総合的解決へ向けての多角的検討

今回の成績は摘出心筋を用いディソピラマイドの作用について低酸素という虚血の一条のみを加えて検討したが, 今後発展させるには当然臨床的虚血 — いわゆる冠不全から心筋梗塞にいたる種々の程度の虚血 — においての作用を調べなければならない。まず冠動脈結紮実験により生体位心臓について出来るだけ多くの電気生理学のおよび生化学的パラメータを得るとともに基礎的には以上で得られた諸条件を加えて膜電位固定法により, 詳しい膜イオン流の解析が必要である。一方ではこのような諸条件下での抗不整脈剤の効果をイオン動態の面から基礎的に検討した結果を生体

位心臓（動物）さらに臨床例への応用をすることによってはじめて理論的な不整脈治療が確立する。

虚血に関する問題点の総合的解決のための研究体制

虚血性不整脈の治療法確立というテーマを総合的に解決するために必要な事項を手がかりにして一般の循環器学研究に重要な体制を考察する。

1) 基礎と臨床の連繫

現在の循環器学にとって最も大きなテーマの一つである心筋虚血の研究分野は非常にひろがっており、とうてい一研究者、一研究グループで解決出来るものではない。

しかし各個がばらばらに研究に取り組んでいては総合的解決という点で十分な進展が期待できない。やはりある代表者または代表機関のもとに統一的な視野に立ったプロジェクトの必要性が感ぜられる。とくに基礎学者と臨床家の有機的連関が必要で、われわれ（臨床系）が微小電極法による基礎実験とヒス束心電図や Holter 心電図を用いる臨床検討を平行させた経験でも総合的解決には程遠いものであるが、基礎と臨床を同一研究者の視点でまとめる有用性をうかがわせるとはいえよう。なおまとめ役の視野と洞察力は重要で、あるプロジェクトを推進するに足る研究を判断する一方で、現在無意味と思われる研究の将来性を見抜く必要がある。因みに Circulation 1980 年 7 月号で Ross は過去 30 年の循環器系（心血管器、肺）における 10 大進歩の Key となる論文 529 編のうちもともと臨床を指向したものでなかったものが 41 % を占めるという。

2) 研究実施上の諸問題

虚血による心筋の生化学的変化を知るための生体物質測定には高速液体クロマトグラフィーなどの発達が目覚ましいが、ラジオアイソトープを用いる方法も多用されている。

アイソトープ廃棄の問題から考えて集中的に測定出来る体制が望ましい。また治療薬として有望な物質が外国で報告されていてもその入手は現在ほとんど製薬会社を通じて行われているので会社が営業品目としてとり上げないかぎり非常に困難である。学術的な目的に使用したい場合は国内に便義をはかってくれる組織があればよいと思う。つぎに研究の発表とくに学術誌の論文査読の問題は海外誌で評価されたものが逆輸入的に点数が高いことである。真にオリジナルなものはむしろ評価が定まらないこともあるわけで、短時日のうちに覆えるような論文でも誌上討論とともに掲載する雑誌があってもよいのではなかろうか。

3) 研究費

いつの世でも学術研究のための予算は不足する。しかしここ数年文部省科学研究助成金の上限が固定されたままで（例えば一般研究）、企業からの寄附金で補わなければならぬ部分が増えているのは不自然であろう。技術の進歩は一方で高価な大型機器を用いる必要を生じ消費費も値上りしているので配慮が欲しい。人員の面では研究技師の定員が少く、臨床講座では全く認められていないことも問題である。諸外国の研究室では有能な技師が各分野に配置され少人数の医師で効率よく研

究が進行しているのを目にする。

高血圧性血管障害の成因および病態についての臨床的検討

石井 當男（東大第二内科）

高血圧は動脈硬化発症の重要な危険因子の一つであることは周知の事実である。高血圧性血管障害の発生には、血圧上昇自体が直接的要因となりうるとの考えが広く支持されているが、最近、血圧調節機構に関連する諸因子が、それぞれ血管障害の発症と進展に関係する可能性が指摘されている。Laragh らは、高レニン状態は独立した血管障害因子であることを報告したが、この報告には多くの反論が示されており、高血圧性血管障害とレニン系との関係は明確にされていない。

高血圧性血管障害の発症・進展には、レニン系以外の多くの体液性因子の関与が想定されている。これらの因子のうち、特に prostacyclin は、血管の形態・機能の保全に重要な役割を演じていることが明らかにされつつある。prostacyclin は血管平滑筋細胞および内皮細胞より産生・分泌され、それ自体血管平滑筋弛緩作用を有している。さらに、交感神経刺激、あるいはアンジオテンシン等による血管収縮反応を阻止する作用、あるいは血小板由来の thromboxane A_2 に拮抗し、その血小板凝集作用ならびに血管収縮作用を阻止する作用等多くの生物学的作用を有することが明らかにされつつある。

今回の報告では、まず、高血圧の影響を最も鋭敏に反映する臓器の一つである腎の生検標本につき、血管障害と血圧ならびに血漿レニン活性との関係を検討した成績を述べ、次に、prostacyclin の主要代謝産物である 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ の血漿濃度を、本態性高血圧症患者と正常血圧対照者につき測定した成績を紹介する。

I 高血圧性腎障害の要因に関する臨床的および病理組織学的検討

1, 対象ならびに方法

対象はすべて入院患者であり、本態性高血圧症 42 例、原発性アルドステロン症 7 例、および腎血管性高血圧症 5 例の計 54 例である。本態性高血圧症では経皮的に、他の 2 群では手術時に直視下に腎生検を施行した。腎血管性高血圧症の患者では、非狭窄腎につき生検を行った。

腎障害の評価は、HE 染色、PAS 染色、およびエラスティカ・ワンギーソン染色標本を鏡検し、細動脈硬化度、硝子化糸球体の割合および間質の変化の 3 項目に、それぞれ評価点をつけた。即ち細動脈硬化度は Sommers らの分類に従い、変化の認められないものを「0」、限局性軽度肥の認められるものを「1」、細動脈壁の厚さが内腔半径をこえないものを「2」、内腔半径をこえるも

のを「3」とした。硝子化糸球体の割合については、全く認められないものを「0」、10%未満を「1」、10%以上30%未満を「2」、30%以上を「3」とした。間質の変化については、明確な変化の認められないものを「0」、線維化や細胞浸潤のみられるものを「1」とした。これらの各評価点の総計を以って組織障害指数とした。

このようにして得られた組織障害指数 (scores for Vascular Lesion; SVL) と血圧、腎機能、東大3内科高血圧重症度および血漿レニン活性 (PRA) との関係を検討した。血圧は降圧剤服用の有無にかかわらず、入院時の値を用いた。入院後は食塩摂取量を8-10 g とし、血漿レニン活性は早朝、空腹、安静臥床時に採血し、放射免疫測定法により測定した。

2. 結果ならびに考案

本態性高血圧症患者においてはSVLは平均血圧 ($r = 0.52, P < 0.001$)、および東大3内科高血圧重症度 ($r = 0.41, P < 0.01$) と有意な正の相関関係を示し、腎血流量 ($r = -0.50, P < 0.001$)、糸球体濾過量 ($r = -0.57, P < 0.01$) およびPSP 15分値 ($r = -0.48, P < 0.01$) と有意な負の相関関係を示した。しかしPRAとの間には有意な一定の相関関係を有しなかった ($r = 0.23, NS$)。SVLと年齢、高血圧経過推定年数との間にも一定の関係は認められなかった。

高レニン性高血圧の典型である腎血管性高血圧症患者と、低レニン性高血圧症の原発性アルドステロン症患者を比較すると、平均血圧値に差はなく、またSLVにも有意差は認められなかった (3.8 ± 0.4 対 4.1 ± 0.6)。

本検討で用いた腎組織障害指数は腎機能と良く相関し、生検という限られた組織標本を評価する上で有用であることを示している。本態性高血圧症患者においては、SLVと血圧値は並行し、PRAとは一定の関係を示さなかったこと、さらに腎血管性高血圧症患者と原発性アルドステロン症患者とではPRAに顕著な差があるにも拘らず、SLVには差がみられなかったことは、腎の血管障害の発症・進展には高血圧自体が重要な要因であり、レニン系の関与は少ないことが示唆される。

II 本態性高血圧症患者ならびに正常血圧者における血漿6-keto-PGF_{1α}濃度の検討

1. 対象ならびに方法

対象はすべて入院患者であり、未治療本態性高血圧症25例。および正常血圧対象者25例の計50例である。食塩摂取量8-10 g/日とし、入院1週間後、早朝安静臥位にて血漿6-keto-PGF_{1α}、PRAおよびアルドステロン濃度 (PA) を測定した。一部の症例では立位1時間後の血漿6-keto-PGF_{1α}も測定した。静脈血をEDTA-Na²添加試験管に採取し、血漿を低温下で分離し、アスピリンを加え、-70℃に凍結保存した。

血漿6-keto-PGF_{1α}は、石油エーテル、酢酸エチル、Sephadex G 25にて抽出精製し、HPTLCにて分取後、放射免疫測定法により測定した。本法による回収率は 69 ± 9 (SE) %、同時測定変動係数は6.2%、異常測定変動係数は10.0%であった。

2. 結果ならびに考案

対象とした高血圧群および正常血圧群には、年齢ならびに男女比に差はなかった。安静時血漿 6-keto-PGF_{1α} 濃度は正常血圧群 362 ± 17 (SE) pg/ml であるのに対し、高血圧群においては 223 ± 18 pg/ml と有意に低値であった ($P < 0.001$)。正常血圧群では、男 376 ± 28 , 女 377 ± 23 pg/ml と性差を認めず、また年齢との間にも一定の関係はみられなかった。これに対し、高血圧群においては年齢との間に正の相関傾向が認められた ($r = 0.41, P < 0.1$)。

血漿 6-keto-PGF_{1α} と平均血圧との関係を調べると、両測定値間には有意な負の相関関係が認められた ($r = -0.50, P < 0.005$)。1 時間起立による変化は、いずれの群においても一定の傾向は認められなかった。また、血漿 6-keto-PGF_{1α} と PRA および PA との間には有意な相関関係は認められなかった (それぞれ $r = 0.16, P < 0.2$ および $r = -0.04, P < 0.2$)。

血漿 6-keto-PGF_{1α} は本態性高血圧症患者においては、正常血圧対照者に比し、有意に低く、血圧との間に有意な負の相関関係を示した。血漿 6-keto-PGF_{1α} は起立により一定の変動を示さず、また PRA あるいは PA と一定の関係はなく、本物質の血漿濃度に影響を与える因子は明らかではなかった。しかし以上の所見は、6-keto-PGF_{1α} の前駆物質である prostacyclin と血圧との間には密接な関係があり、本態性高血圧症では、prostacyclin の産生・代謝に障害が存在する可能性を強く示唆すると思われる。高血圧群においては、年齢と血漿 6-keto-PGF_{1α} との間に相関傾向がみられたことは、高血圧群における血漿 6-keto-PG 濃度の低下は高血圧の持続に起因するものではないことを意味すると思われる。しかし、前述の成績に示したように、血圧と高血圧性血管障害との間には有意な相関関係が存在することから、本 PG の血漿濃度低下は高血圧に二次的現象の可能性も想定される。しかし、いずれにせよ、prostacyclin の代謝障害は高血圧上昇の維持ならびに血管障害へ進展に関与していると考えられる。

今回、虚血の問題を論ずるに際し、動脈硬化発症を、高血圧、レニン系、および prostacyclin と関連づけて検討したわれわれの成績を紹介した。

動脈硬化の発症・進展の要因としてすでにいくつかのものが注目されているが、今回の検討では、血圧上昇自体が動脈硬化、特に細小動脈硬化の重要な要因であることを確認した。われわれの研究では、血管障害におけるレニン系の役割を明らかにすることは出来なかった。アンジオテンシンは血管壁内皮細胞障害作用、血管壁透過性亢進作用等を有することが実験的に知られており、レニン系の血管障害における役割を臨床的に明らかにするには、アプローチの方法に工夫が必要であろう。

また今回、われわれは血漿 6-keto-PGF_{1α} の測定法を確立し、本態性高血圧症では本 PG の血漿濃度が低下していることを報告した。本症では prostacyclin 代謝の障害が存在することが想定される。本症における prostacyclin の代謝障害と血圧上昇の因果関係は明らかではないが、血中あるいは血管壁 prostacyclin 濃度の低下は高血圧の維持のみならず、動脈硬化の発症・進

展に重要な役割を演ずると考えられる。

Prostacyclinは血管平滑筋弛緩作用の他、血小板より遊出される thromboxane A_2 の活性を阻害する作用等多彩な生物学的作用を有し、また最近脂質代謝にも密接な関係を有することが指摘されている。高血圧、血小板機能異常および高脂血症はそれぞれ動脈硬化発症の独立した危険因子と見做されてきたが、これらの因子はプロスタグランジン代謝の面で密接な相互関係を有している可能性がある。今後これらの点を検討したい。

心臓の力学とエネルギー学

菅 弘之(国立循環器病センター 研究所)

はじめに

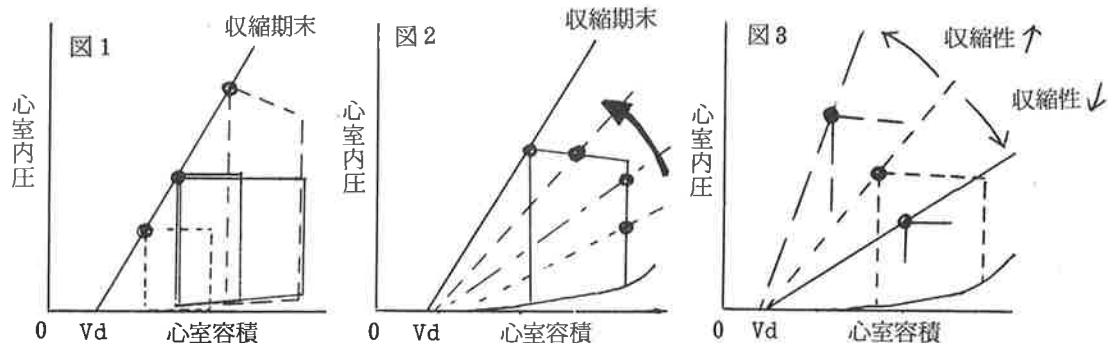
虚血は、臓器への酸素、代謝基質の供給および代謝産物の洗い出しが、それらの需要に応じられるだけの血流が存在しない状態を意味している。心筋の場合、身体の活動状態に応じて心臓の仕事量が10倍位の範囲で変り、それに依りて、心筋への酸素供給も大巾に変化している。この広範囲に変る心筋の酸素および基質需要に十分応じられなければ、心筋は虚血に陥り、仕事量が減弱し、身体の活動状態に限界が来る。これらの一連の因果関係は、過去の循環器科学の進歩によって、概念的には記述出来るようになって来たが、果して、心臓の仕事量に応じて心筋の酸素消費量がどの様に定量的に変るのか、心臓の力学的諸因子がどのような組み合わせで、心筋の酸素消費量の決定に関与して来るのか、心拍数、収縮性の影響はどうかなど、一見判っているかのようであるが、未だ満足のゆく結果が得られていない現状である。¹⁾

本研究者は、10余年にわたってイヌ左心室の力学的現象に興味をもって主として心室収縮期の内圧容積関係について研究してきたが、ここ数年、心室の力学模型から心室のエネルギー変化を求める方法を見出し、その裏づけを心室の酸素消費量の実験的測定により行う努力を続けて来た。これらの一連の研究結果は、心筋虚血を考える上の重要な基礎的知見を与えると思われるので、以下その概要をまとめた。

心室の内圧容積関係

ネブタール麻酔下でのイヌ摘出交叉灌流心臓標本の左心室の内圧容積関係は、心内外の変力作用が一定の条件下では、図1に示されるように、生理的範囲内の前負荷(拡張期末容積)、後負荷(拍出期内圧)の変化にかかわらず、内圧容積軌跡の収縮期末点がほぼ直線上に位置するように動くことで特長づけられる。さらに、収縮期中の一定の時点の内圧容積点も又、ほぼ別の直線上に位

置し、その直線は収縮期間中時間とともに左上へ反時計方向へ回転する(図2)。そしてこれら瞬時内圧容積関係直線は、収縮期末のそれを起えることはない。変力作用の変化により収縮性を増減すると、図3に見られるように、収縮期末内圧容積直線が左上へ、右下へと回転する。これらが、一連の実験から得られた生理学知見であるが、それらの詳細は、原著2)～6)を参照されたい。



心室の可変弾性模型とエネルギー変化

以上の生理学的知見から、心室の力学的模型として図4に示すような可変弾性模型が考えられる。拡張期末の心室はその容積弾性が低く、収縮につれて高くなり、収縮期末に最大となり、弛緩につ

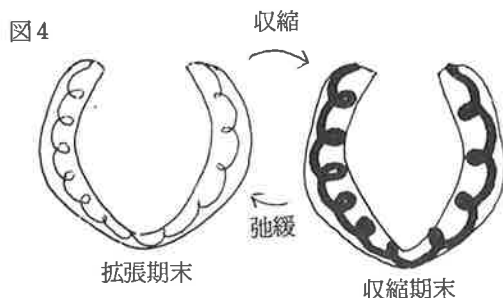


図4

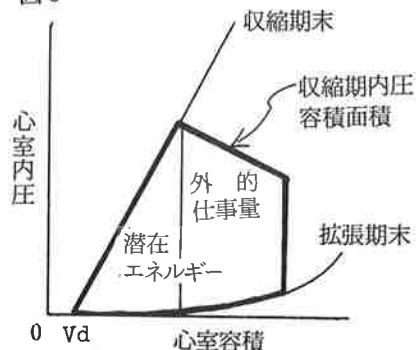


図5

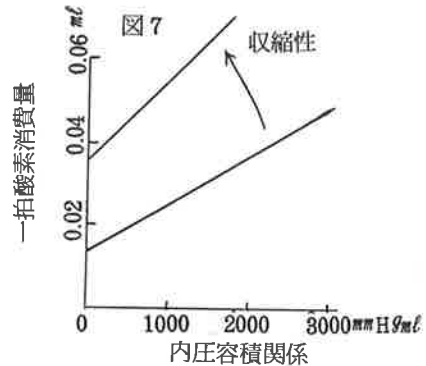
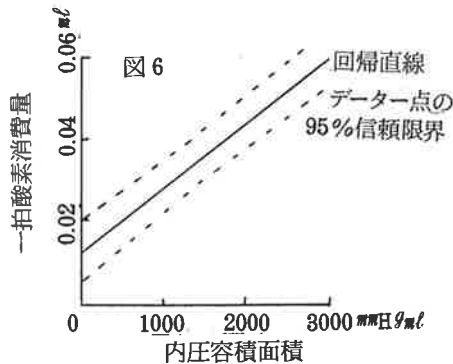
れて低下してゆくというものである。このような心室の力学模型について理論的考察を行うことにより、図5に示すように、一回の収縮にともなう心室模型のエネルギー必要量は太線に囲まれた部分の面積に等しいことが導びかれる。これを心室収縮期内圧容積面積と命名したが、これは一回外的仕事量と収縮期末潜在エネルギーの和である。この潜在エネルギーに相当する部分は、収縮期末内圧容積関係曲線と等容性弛緩内圧容積軌跡に囲まれた部分である。模型上意味が出て来た内圧容積面積が果して生理学上意味があるかどうかを、心臓のエネルギー消費量を示す酸素消費量を測定して検討した。以下それを総括する。

理論の詳細については、原著7)を参照のこと。

収縮期内圧容積面積と酸素消費量

イヌ左心室の内圧容積負荷を特殊サーボポンプにより広範囲に変化させ、右心室を空打ちさせた状態で、心臓酸素消費量を可及的正確に測定した。変力作用一定の条件下では、図6に見られるように、内圧容積面積と一拍酸素消費量とは非常に高い相関 (0.96 ± 0.01 (SE)) をもつ直線関係

にあった。しかも、等容収縮であろうが、拍出収縮であろうが、全く同じ関係であった。実験式として、一拍酸素消費量 (ml O_2) = $A \times \text{内圧容積面積} (\text{mmHg ml}) + B$, $A = [1.64 \pm 0.12 (\text{SE})] \times 10^{-3} \text{ ml O}_2 / (\text{mmHg ml})$, $B = 0.015 \pm 0.002 \text{ ml O}_2$ が得られた。さらに内圧容積面積の二つの



部分の酸素消費量に対する係数は全く等しいことも明らかになった。また、同時に計測した種々の心筋酸素消費量決定因子と言われているもの、例えば収縮期圧、TTI、心筋張力、心室容積などは、どれも内圧容積面積ほどは酸素消費量と高い相関関係にないことも示された。ペーシングによって心拍数を変えても、一拍当りの酸素消費量と内圧容積面積との関係は有意の変化を示さなかったが、カルシウム、カテコラミンにより陽性変力作用を与えると、図7にみられるように、大巾な変化を示した。これら実験結果の詳細は原著8)～11)を参照されたい。

将来への展望

以上一連の生理学的知見は、心筋虚血を十分理解するために必要と思われる基礎的知見となるのみならず、心筋虚血の研究におけるいくつかの問題点に対する洞察を与えるものと思われる。例えば、虚血の条件としての冠血流の需供不均衡を考える場合、心筋の酸素消費量が重要な変数となるが、それを規定する力学的因子として収縮期内圧容積面積の意義は大である。この場合、より相関の低い従来の規定因子を用いて考えると、誤った結論に至ることになる。あるいは、内圧容積面積と酸素消費量との相関は、心臓でのエネルギー変換効率を直接示すものである。従って心臓の機械的効率を上昇して同じ冠血流に対して虚血の程度を減少するのにどの様に心臓の力学的負荷を減らせればよいか。収縮性を変化させればよいのか理解、判断に有効な情報を与えるものである。また薬物の心筋虚血に対する効果を見る場合でも、冠血流の需供均衡が変わる時、需供のどちらがどれほど変化するかを知らねばならないが、その際にも内圧容積面積の変化、収縮性の変化を考慮することにより、事状が明解になろう。そのようなわけで、心筋虚血の諸問題解決の上で、今回述べたような心臓の力学とエネルギー学との相関に関する研究は資するところが大であると考えられる。今後のより深くかつ広い研究が必要であると考えられる。

参考文献

- 1) Gibbs: Cardiac energetics, *Physiol. Rev.* 58:174, 1978.
- 2) Suga et al: *Circ. Res.* 32:314, 1973.
- 3) Suga et al: *Circ. Res.* 35:117, 1974.
- 4) Suga et al: *Circ. Res.* 40:445, 1977.
- 5) Suga et al: *Circ. Res.* 44:238, 1979.
- 6) Suga et al: *Circ. Res.* 46:256, 1980.
- 7) Suga: *Am. J. Physiol.* 236:H498, 1979.
- 8) Suga et al: *Am. J. Physiol.* 240:H39, 1981.
- 9) Suga et al: *Am. J. Physiol.* 240:H320, 1981.
- 10) Suga et al: *Jpn. J. Physiol.* 30:907, 1980.
- 11) Suga et al: *Circ. Res.* in press.

冠動脈狭窄による虚血とその指標

中村 芳郎 (慶応大学医学部内科)

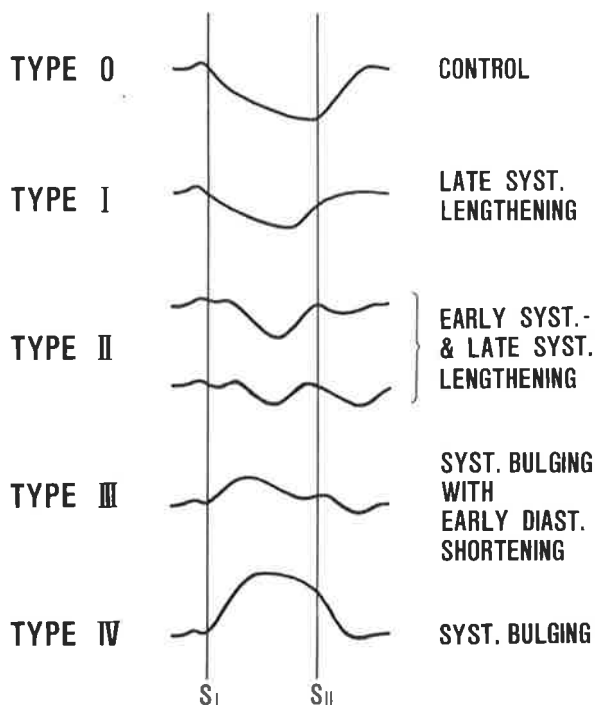
永続的であることは希ましいが、短期間であっても虚血心筋を保護しうる方法を明確にすることは臨床的意義が大きいと考えられる。しかし、虚血を心筋における酸素需給のアンバランスの面であらえようとした実験で、もし心筋代謝に変化をおこし酸素消費量を減少させる手段がとられていたにしても、通常の心臓全体を使用した実験では、心筋酸素消費量が一次的に減少させられているのか、心臓の仕事の変化を介して二次的に心筋酸素消費量が減少させられたのか、あるいは、酸素供給が増加したのかといったことさえ、実験計測値からは、各例間の、または計測ごとの計測値変動の中に、加えられた手技による計測値の変動が埋没してしまい、結論を得ることが困難に思われる。

臨床的に、負荷の少ない、連続的計測で、かつ再現性をたしかめられる方法で虚血の判定をしないかぎり、虚血心筋保護の手法の評価は不可能であろう。

断層エコー法で Stress test により誘発される局所的虚血をもたらし局所的心筋運動異常を発見することは、臨床的に虚血性心疾患診断に有用と思われる。この方法による虚血の程度の診断の基礎づけとして、局所虚血心筋の運動異常を、局所への血流量の減少の程度、心筋 ATP 含量などの虚血の指標と対比させ、ひいては局所心筋短縮様式を虚血の程度の指標として虚血心筋保護の手技の評価にまで応用を試みようとしたのが以下に述べる実験である。

方法：ネンブタール麻酔開胸犬を用い、動脈血 PO_2 を 100 mmHg, PCO_2 を 30 mmHg 程度に保ち、左前下行枝を段階的に狭窄できる標本を作成した。大動脈、左前下行枝血流量は電磁流量計にて測定した。左前下行枝を完全閉塞した時に Cyanotic になり運動異常をきたす左室心筋内膜下に約 1 cm の間隔で左室短軸方向に超音波クリスタル 1 対を埋め segment length を計測した。コントロ

PATTERN OF SEGMENT SHORTENING



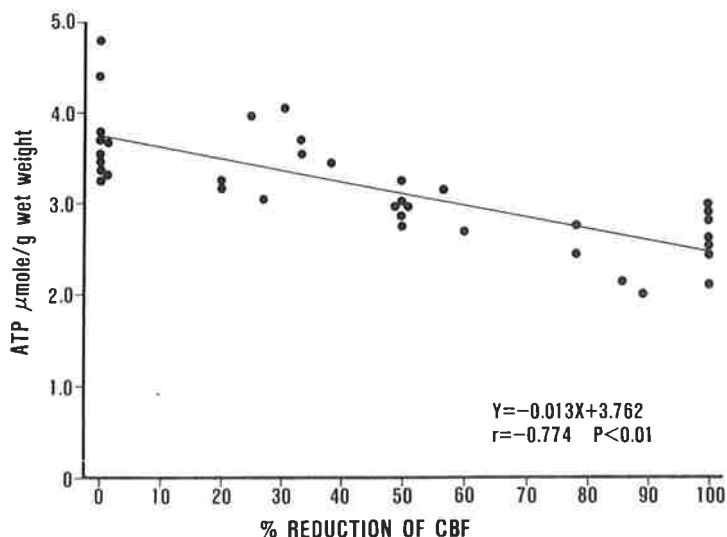
ール状態の記録の後左前下行枝に狭窄を作り、5分後に諸計測値記録の後、電気ドリルにつけた円筒状の刃を用いて虚血部の中心を全層にわたって生検、心筋はあらかじめ液体窒素で冷却した錘子にて圧縮凍結ATP測定にあてた。

虚血部心筋の短縮パターンは、冠状動脈閉塞を行なった時、時間的推移に伴なって見られる、左図の4 Typeに分け、% shorteningとともに検討した。左前下行枝狭窄の程度は、コントロールの血流量に比しての減少の%で示した。また、左前下行枝血流減少による左室内圧の変化をきたす例の虚血程度を補正する目的で、コントロールのTTIに対する虚血時のTTIの%、左前下行枝血流量/TTIのコントロール

ル時に対する虚血時の% (CBF/TTI%) も計算した。

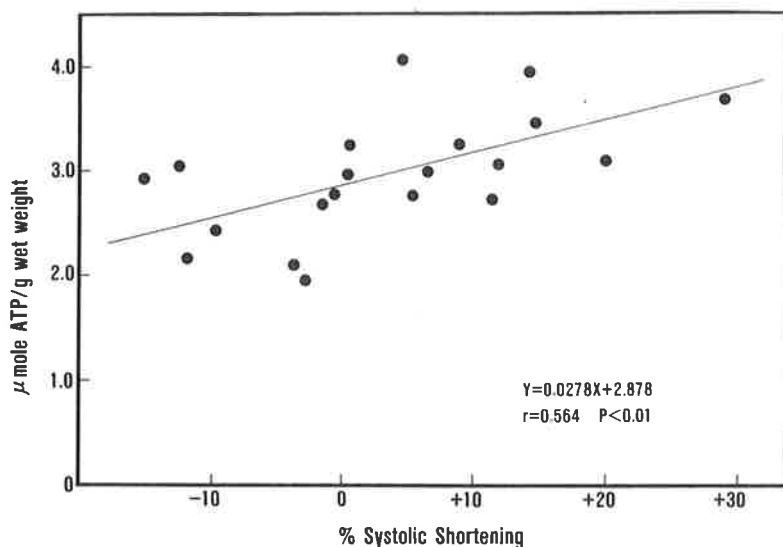
なお、一部の例ではカテーテルを大冠静脈まで挿入、主として虚血部から還流する冠静脈血を採取して、動脈血とともにlactateその他の測定も行なった。

結果：左前下行枝減少%と局所心筋短縮パターンとの間に並行関係があることについては、すでに Jap Heart J 21:225-234, 1980 に述べた。心筋ATP含量と左前下行枝血流減少%の関係は



左図に示す。さきに述べたCCF/TTI%による補正は左の関係をさらに密接にすることはなかった。

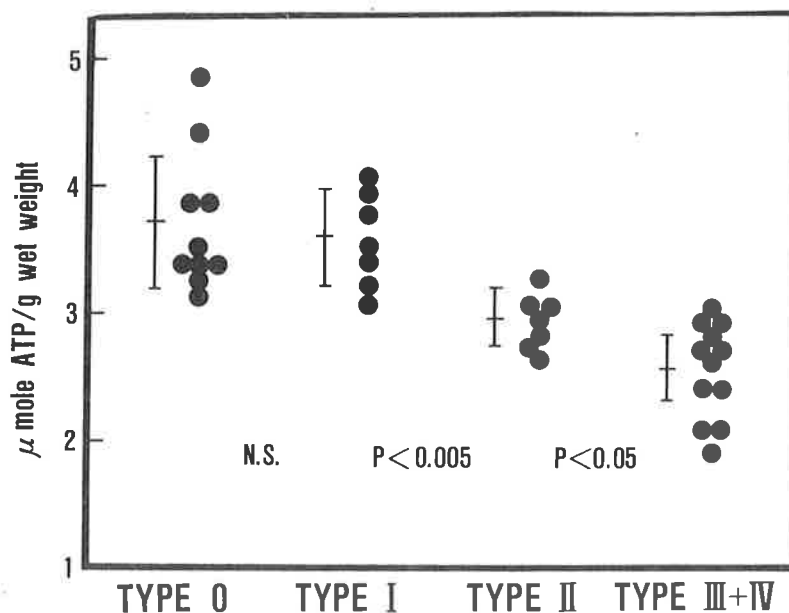
心筋ATP含量と虚血部心筋% shorteningの間にも、粗ながら左下図のような相関関係が認められた。% short-



ening という指標は、数量的表現であるが故に一見優れているが、先の図の収縮パターンで見ても理解できるように、収縮期の最大短縮の1点で表現したものであり必ずしも短縮様相のすべてを表現したものにはならない点に問題はある。なお、下図では、狭

窄を作らなかった群と完全閉塞群の数値をのぞいてある。

虚血部心筋の短縮パターンにより、Type 0群、I、II及びIII+IV群に分類し、ATP含量を比較したのが下図である。Type 0群のATP含量のvarianceが非常に大きいためその絶対値が比較的低いことから、コントロール値一すなわち、もしType I、Type IIを示した群を狭窄なしにATP測定を行なったら一がもっとvarianceがあるのではないかの疑問が出されるかもしれない。少くとも、虚血の指標に使える局所心筋の短縮パターンはType II以上の変化であろうとの結果となる。また、このTypeの変化をおこさせるには、左前下行枝血流量を50～75%程度減少させる必要があることが知られた。



臨床的意義：Hand grip stress testを行なった際、心筋運動異常を断層エコーで発見するのは比較的容易であるが、Mモードエコーで記録することに容易ではない。しかし、たまたま中隔の運動異常が記録できた例では、収縮期の後方運

動が認められることがある。例を重ねれば、この実験が、エコー法による虚血性心疾患診断の基礎として役立つと思われる。

研究の総合的解決について：虚血心に関する臨床的認識にあたって最も理解を拒げるものは虚血程度を変化させる因子が多すぎる事である。これらの因子を固定しようとする、その実験モデルが急激に臨床的意義を失ってしまうように思える。すなわち、虚血にかかわる心筋への酸素供給の調節の破綻過程が虚血の認識の中枢となっている。多因子が関与している調節破綻過程の解析は通常の negative feedback の解析とは異なっていると考えられる。

虚血の状態をある一時点で認識するために、とり得る手段は2つある。1つはポジトロンカメラによる核医学的方法であるが、そのためには莫大な予算を必要とするがために、学問の priority であるとか、研究システムの変更を必要とする。1つは、極めて短時間の間に心筋の状態を固定する手段を開発することである。数ミリ秒のうちに心筋の機械的、代謝的状态を固定して解析すれば、各例間の variance の問題が解決できるか否かはわからないが、少なくとも新しい一面の認識が可能となりうる。

ここに述べた虚血の指標を使用して、虚血心筋状態保護の実験を行なったのであるが、薬剤による心筋保護では、その作用は、血行動態を介したものなのか否かの判定すらつかない結果となってしまった。ふり返ってみれば、心筋虚血をおこした時に、灌流圧を上げれば、心筋酸素消費量は増すが冠血流量も増すという両面があることは諸々の人が知りながら、臨床的には常にどうする可きか明瞭でない。日常臨床に役立てるためにも、血行動態と虚血の関係は、現在のレベルでなされた研究を数多く集めて検討することも無意味ではないのかもしれない。

RI法の最近の動向；虚血の問題の総合的解決に関する研究

石井 靖（京大・核医）
向井 孝夫（京大・中央放射）

RI法の最近の動向を理解する上で、そのなりたちを知っておくと都合がよい。RI法のはじまりは、1927年、Blumgartが、ラドンを静注して、それが循環系を通過する状況を検出したことと、1934年、Hervesyが ^{86}P を生体代謝の tracer として使用したことが端緒となっている。かくて、生体外から生体内の生理学的及び生化学的現象が、選別して、非侵襲的に計測する道が拓かれることとなった。以後、RI及び標識化合物の開発進歩と、機器の開発進歩とによって、その情報は多様化し、その次元数は向上することとなった。心筋虚血の現象は、現在、血流分布欠損と云う生理学的異常としてと、異常集積と云う生化学的異常としての2様の画像化が可能となっている。ところで、RI情報は、本来 digital なものであり、また選別造影されるものであるから少ない

情報密度で映像化しやすい。この特質は、電算機処理しやすく、また、その享受しうるメリットの大きいところと云えよう。生体内で最も動きの早い心拍現象の映像化は、電算機を介しての画像収集、再編集による、いわゆる心電図同期法の採用によって可能となった。現在、循環器領域において、RI法が、確乎たる市民権を確立した背景には、このような時宜を得た電算機の利用がある。次に、CTの出現がRI映像に衝撃を与えることとなったが、もともと電算機となじみ深いRI映像もCTと同様にRI映像の3次元化と云う目標設定を行うこととなった。RI映像の3次元化とは、1つはRI 2次元像の時系列から、ある機能パラメータを各画素毎に算出し、これを映像化する、いわゆるfunctional image作成の試みがあり、他は、CTと同様、多方向の2次元像を集約加工して画像再構成を行なって断層表示する、いわゆるECT作戦の試みとがある。今回は、これら2つの、我々の最近の試みについて紹介を行ない、虚血評価の上での効用について御批判を仰ぎたい。

Functional Image

心筋血流のFunctional imageは、不活性ガス ^{133}Xe を冠動脈経由で心筋に導入し、これを飽和し、この脱飽和過程を γ カメラで経時的に映像化し、各画素当りについて、そのspecific flowを算出して作成することができる。正常心筋では右心室について30～50 ml/min, 100 G, 左心室については60～80 ml/min, 100 G程度の血流のほぼ均等な分布像が得られる。このよう方法と、従来の ^{201}Tl によるmyocardial perfusion imaging(MPI)との相違は、MPIが、心筋内の相対的血流分布を重り合った2次元像で示しているのに対し、本法は、specific flowの分布という形で、いわば、心筋需要に対する血流供給と云う生理学的関係のレベルを絶対値として示しているところに意義がある。従って、Fig 1に示すように肥大性心筋症において中隔肥大部は、MPI像では単なる放射能増加部として示されるに過ぎないが、functional imageでは、この部はむしろ乏血状態にあることが容易に理解できる。このように、functional imageは、RIの2次元分布に加えて、時間的因子を含んだ、次元数の高い三次元表示と考えてよい。

同様の試みは、心電図同期心プール像にも適用できる。本像の左心室のtime-activity curve

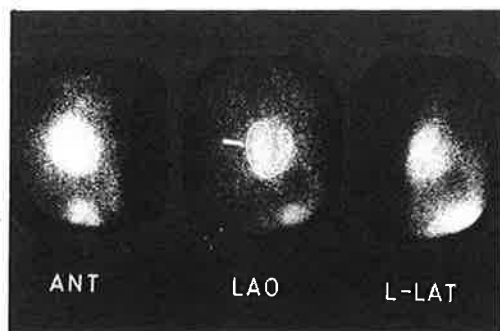


Fig.1-a MPI像

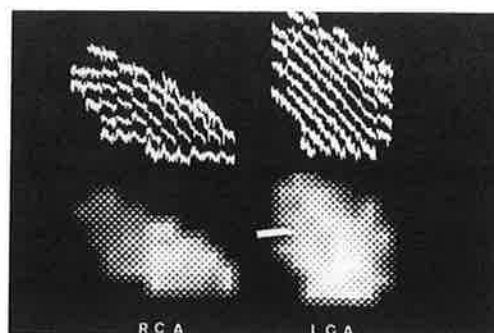


Fig.1-b functional image

は、左心室容量変化にアナログ的なものとして、その駆出分画等が算出でき、現在、非侵襲的な左心室機能評価法として、とくに負荷時の変動の評価の上で臨床上、不可欠な検査となっている。このような、心ポンプ機能に由来する cyclic な現象をフーリエ解析の対象とすると、その振巾成分と位相成分とについて functional image, すなわち, amplitude 像と phase 像とが作成できる。このような表示法は、刺戟電導系の異常、虚血による壁運動異常の評価に有用である。刺戟電導異常は phase 像において、心筋収縮伝播様式の異常として視覚化できる。他方、壁運動異常の評価は、従来の心室造影法によると収縮末期像と拡張末期像の輪かく変化の異常として、すなわち、2 時点の画像の一方向からの perimetric な変化としてしか捉えられず、いわば限られた情報の評価しか行い得ず、評価の盲点を生じていた。しかし、このような functional imaging を行くと、例えば、Fig 2 の心筋前壁梗塞例について示す如く、左前斜位像において、perimetric に検出し得ない、いわば、en face の異常が amplitude 像では、その部の局所活性変化の低下、

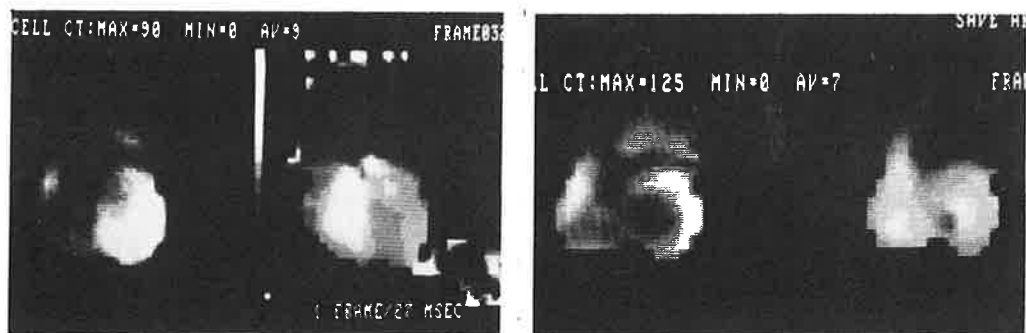


Fig. 2 - a : 正常例 amplitude 像(右)
phase 像(左)

Fig. 2 - b : 前壁梗塞例 amplitude 像(右)
phase 像(左)

消失として、phase 像では、その部の局所的な収縮のおくれとして、この部が asynchronous な部分であることが、よく理解できる。

以上いずれも画像の時系列から、電算機の助けを得て、有効に生理学的パラメータの抽出を行なって画像加工を行なった例であるが、本来 dynamic study を基本とする循環機能の画像診断として、今後、有力な武器となろう。

E C T

²⁰¹Tl MPI のような 2 次元 RI 画像の読影において虚血欠損の同定を行う上での支障は、吸収減弱を受ける放出 γ 線を、前後の重なりあったものとして評価せざるを得ないことである。そのため、できるだけ多方向から、できるだけ客観的に総合評価することが必要となる。しかし、このような作業を電算機に置き換えたものが CT の原理であるから、RI 像を CT 化する、いわゆる emission CT (ECT) 像の作成が、このような問題の解決となる。まず同時に多方向からの RI 像収集が必要となるが、現在、実用化している方法としては、7 pinhole collimator とか、slanthole

collimatorとか、RI像を電算機によって集約加工するとカメラ照準面に対して一連の縦断々層の心筋像を得ることができる。本法にて、前後の重なりを避けて虚血欠損像が視覚化できるので、その検出率は当然向上する。しかし問題は、画像収集が限られた視野についてのものであるので、再構成される断層像は定量性に欠け、従って、しばしば、読み過ぎによる信頼性の低下となる。信頼性の高い断層像を得るためには、CTと同様、対象断面について360°ひとわたりの画像収集による画像再構成が必要である。従って、現在、我々の試みている方法は、 γ カメラを体軸まわりに一回転させて行う方法である。このようにして作成したECT像は、虚血欠損検出のsensitivityを向上させるばかりでなく specificity も向上し、従って clinical efficacy を向上することになる。Fig 3は、通常の2次元像で検出し得なかった心尖～前壁梗塞欠損が本法で明らかとなった例である。

いずれにせよ、RI画像は、さまざまな画像加工の技術を導入し、虚血の存在を、より高い次元で画像化することに成功しつつあるが、加えて、サイクロトロン産生核種を用いる生化学的標識が可能となると、これに生化学的色づけを行うことができよう。

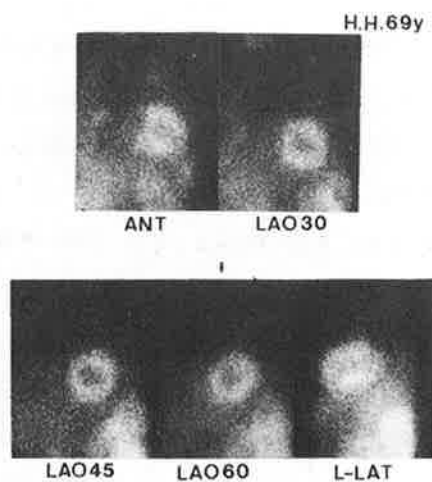


Fig. 3-a 2次元MPI像

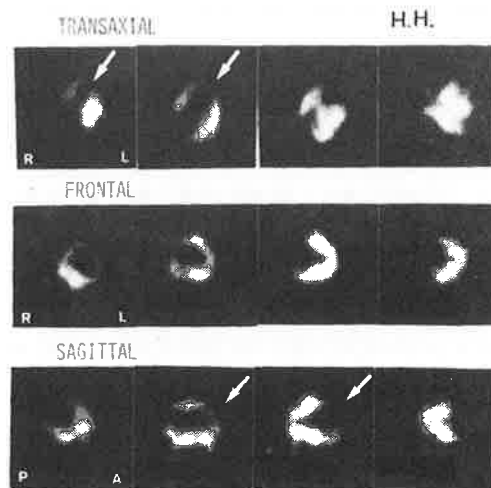


Fig. 3-b ECT像

房室接合部領域の自動性並びに伝導性に及ぼす冠拡張薬の影響

元村 成 (山梨医科大・薬理)

房室結節 (AV node) を含む房室接合部領域 (AV junctional area) は房室伝導 (AV conduction) の律速部位として重要であるのみならず、第二次自動性発生部位としても重要な役割を演じている。しかしこの領域から発生する自動性はその発生部位の同定の困難さから房室接合部調律 (AV junctional rhythm) と総称されているが、その発生機序に解剖的部位の差、即ち房室接合部領域の近位部と遠位部により差異が認められている。同様に房室伝導の律速は近位部によって為され、遠位部は殆んど関与していない。房室接合部領域近位部 (Proximal portion) とは房室結節心房縁及び結節自体を含み (電気生理学的に AN, N regions とされている)、この領域の血液供給は後中隔動脈 (PSA, 房室結節動脈とも称する) によってなされる。一方遠位部 (Distal portion) は NH region から His 束に相当し、前中隔動脈 (ASA) の分枝が血液供給している。この解剖学的特徴は房室接合部領域における自動性及び伝導性の部位内における差異の研究を可能にし、様々な情報を我々に提供している。伝導性に関しては、近位部 (PSA 領域) の細胞 (特に N cells) の活動電位は浅い膜電位から脱分極し、その結果の遅い立ち上り速度、小さな振巾の為に、伝導性が著しく低下する事。そして、これはその活動電位が主に緩徐な内向カルシウム (一部ナトリウム) 電流による事。一方遠位部 (ASA 領域) の細胞 (His-Purkinje 系) は深い膜電位、速い立ち上り速度、大きな振巾を持ち、伝導速度が速い事。そしてこれは速いナトリウム電流による事、等が電気生理学的に明らかになってきている。この事は PSA 領域に選択的に薬物を投与すれば、伝導性に関し slow inward Ca/Na currents に対する影響が判明し、同様に ASA 領域に作用すれば Fast Na current に対する作用を検討する事ができる。実際に、イヌ摘出血液灌流房室結節標本を用いて実験すると、Acetylcholine (ACh) を PSA に投与すれば容易に房室伝導遅延・ブロックを生じるが、ASA に投与しては影響はない。逆に Norepinephrine (NE) を PSA に投与すると房室伝導促進が起こるが、ASA 投与では変化しない。この事は各種冠拡張薬・抗不整脈薬、 β 遮断薬にも適要される。Slow inward current inhibitor であるいわゆる Ca-拮抗薬は PSA 投与により房室伝導遅延・ブロックを生じるが、ASA 投与では影響がない。一方 Quinidine, Dysopyramide 等 Vaughan-Williams の分類で Class I に分類されている抗不整脈は ASA 投与により、より強く伝導 (心室内伝導) を阻害する。一方、自動性に関しては、房室接合部調律の発生部位が先ず問題となる。洞結節 (sinus node) を破壊すると通常は房室接合部遠位部 (ASA 領域) より自動性が発現してくる。この自動性に対し、ASA に投与した ACh は減少させ、NE は増加させる。一方、近位部 (PSA 領域) には自動性はあるにはあるが、

通常はASA領域の自動性にマスクされている。従ってAChをPSAに投与しても伝導性の障害のみが顕著で、自動性の変化は表にあらわれてこない。ところがNEをPSAに投与するとPSA領域の自動性が亢進し、ASA領域の自動性を凌駕して、上室性頻脈(Supraventricular tachycardia, SVT)を呈する。自動性の発生機序(Pacemaker mechanism)には、洞結節とPurkinje線維で大きな相違がある事が明らかになってきている。洞結節の自動性はSlow inward inhibitors (マンガン Mn^{++} 等無機イオン及びいわゆるCa拮抗薬)によって抑制されるのに対し、Purkinje線維の自動性は実質的には殆んど影響をうけない。従って、洞結節の自動性の発現にはSlow inward Ca/Na currentsが何らかの役割を演じている可能性が示唆され、一方Purkinje線維ではOutward K current, ik_2 、の時間-電位依存性の減少がその機序と考えられている。房室接合部領域の自動性についての知見は現在蓄積されつつあるが、明確でない。

今回は房室接合部領域の自動性(遠位部より発生するAV rhythmと近位部でNE投与により出現する上室活頻脈(SVT)が各々、いわゆるCa-拮抗薬であるVerapamil, Nifedipine, Diltiazemでどの様に影響をうけるか?、新しい冠拡張薬である2-nicotinamidoethyl nitrate (SG-75)(最近K透過性を亢進する薬物として注目をあつめている)によりどの様に影響されるか比較検討した。

方 法

実験にはイス交叉環流房室結節標本を用いた。標本は右心室及び心房心室両中隔より成り、右冠動脈(RCA)、後中隔動脈(PSA, 房室結節動脈)、前中隔動脈(ASA)の3動脈を通して供血犬のヘパリン化した動脈血にて120 mmHgで定圧灌流されている。PSA, ASAの血流量は各々約5 ml/min, 8 ml/minである。右心房及び心室中隔より各々双極電極よりエレクトログラムを導出し、心拍計にて各々の拍数を記録する。AVrhythm時には逆行性伝導が出現するが、室房伝導時間(Ventriculoatrial Conduction time, VACT)としてAVinterval meterで自動的に記録する。薬物は全て近接動注した。

結 果

洞結節を破壊すると通常約55beats/minのAV rhythmが発現してくる。この時の逆行性VACTは約90msecである。この時、PSAにはACh 3nmolを動注するとAVrhythmには影響がないが、VACTは延長、ブロックを生ずる。一方同量のAChをASAに動注すると、伝導には殆んど影響なく、AVrhythmのrateが減少してくる。このような状態で、Verapamil, Nifedipine, Diltiazemの1~10nmolをPSAに投与すると、AV rhythmには影響ないが、VACTは用量依存的に延長し、10nmolでVABlockを生ずる。一方、これらのCa-拮抗薬をASAに投与すると、10nmolにおいてさえもAVrhythm, VACTともに影響をうけない。一方、SG-75を100nmol~3 molをPSAに投与しても、AVrhythm, 及びVACTに殆んど影響しないが、ASAに投与するとVACTに変化はないが、AVrhythmは用量依存的に減少する。次にNEを100pmol~1nmol

をASAに投与すると、用量依存的にAVrhythmの増加がみられる。このNEによる増加はVerapamil, Nifedipine, Diltiazemの各10nmolにて影響をうけないが、SG-75 1~3 molにて用量依存的に増加分が減少した。一方NE 100pmol~1nmolをPSAに投与すると用量依存的に、標本の調律を規定しているAVrhythmを凌駕して上室性頻脈(SUT)が発現してくる。この時VACTは短縮後、逆転して順行性(Antegrade)伝導を示している。このNEのPSA投与による上室性頻脈はVerapamil, Nifedipine, Diltiazem各10nmolのPSA投与で抑制される。又SG-75 3 molでも同様に抑制された。

考 察

房室接合部領域内の遠位部に2つの自動性中枢が存在し、その発生機序に差異がある事、そしてNEによって増強される機序にも差がある事が明らかになった。房室接合部領域の近位部(PSA領域)は通常は低い自動性して有していないが、NEにより増強された時、その機序に洞結節の歩調取り機序と酷似したSlow inward Ca/Na currentの関与が考えられる。更に何らかの形でカリウム(K)の動きが関与している事が考えられる。一方、遠位部His束でのNEによる自動性の増強の機序もPurkinje線維同様、 ik_2 のactivation curveのless negativeへの移行と勾配の増加の両方が示唆される。詳細は電気生理学的検索を待ちたい。

参 考

- 1) Motomura, S., Iijima, T., Taira, N. and Hashimoto, K.: Effects of neurotransmitters injected into the posterior and the anterior septal artery on the automaticity of the atrioventricular junctional area of the dog heart. *Circulation Research*, 37, 146-155, 1975
- 2) Motomura, S., Iijima, T. and Taira, N.: Cholinergic intervention in intracardiac autonomic nerves in atrioventricular junctional area. *Am. J. Physiol.* 239(Heart Circ. Physiol. 8), H181-H188, 1980
- 3) Motomura, S. and Taira, N.: Differential effects of organic slow inward current inhibitors, verapamil and nifedipine, on rate of atrioventricular rhythm and supraventricular tachycardia in the canine isolated, blood-perfused AV node preparation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 315, 241-248, 1981

展 望

今回の研究のテーマである虚血の総合的解決という問題と今回発表した実験を含めた一連の血液灌流房室結節標本の関連について、向後の私の実験研究方向という形で触れさせていただきます。房室結節標本のみならず、血液灌流標本(洞結節標本、乳頭筋標本)の特徴は酸素供給が動脈血によっているという摘出標本の欠点を補っている事にある。各標本を使用した一連の実験系の中で残され

ている問題は血液灌流標本にて虚血状態での実験である。虚血を何らかの方法（方法の検索も必要とされる）で生ぜしめ、房室結節標本ならば、房室伝導時間の変化を詳細に検討する事になる。薬理学の立場からは、それら虚血による変化の各種薬物の影響の検討が主点となる。現在、房室伝導時間の連続的記録が可能であるので、一定時間の房室結節動脈の狭窄（一番簡単な虚血の方法として使用する）後の回復過程（房室伝導時間の延長後の改善）への諸種冠拡張薬の影響の実験に着手したところだ。この実験から各種冠拡張薬の心筋の防禦の問題を追及したいと考えている。

異型狭心症発作時の不整脈発生状況

早川弘一、大津文雄、鈴木謙吾、岸田 浩（日本医大・第一内科）

他の狭心症とは異なり、異型狭心症ではその発作の際、心室細動や完全房室ブロックなどの致死的不整脈をはじめとして種々な不整脈が高頻度に出現することは、よく知られた事実であり、その原因は心筋の急性虚血によるものとみなされる。

今回の研究は、異型狭心症発生時の不整脈の発生頻度とその種類をST低下型安静狭心症のそれと比較すると共に、不整脈出現とST上昇あるいは冠動脈造影所見との関係を調べ、その本態を解明することを目的とした。

1. 対象・方法

対象は安静時に狭心症が発生しその心電図が記録できた86例であって、この中、異型狭心症は54例（男43例、 57.2 ± 9.2 才、女11例、 59.5 ± 13.5 才）、ST低下型安静狭心症は32例（男23例、 59.5 ± 9.2 才、女9例、 61.4 ± 10.1 才）である。

狭心症発生の記録はまず日医大木村式超小型心電計あるいはホルター心電計（Avionics）を用いて確認し、その後患者を入院させ発作の際に12誘導心電図記録を行うことを原則とした。

2. 成績・考案

(1) 異型狭心症（VA）と安静狭心症

（RA）の不整脈出現頻度とその種類

（図1）

VAでは38/54例（70.4%）に何らかの不整脈が認められたのに対し、RAでは6/32例（18.6%）にすぎず、

両群間に有意差を認めた。

		異型狭心症	安静狭心症
不整脈	あり	38(70.4%)	6(18.8%)
	なし	16	26
		(p<0.001)	
不整脈の種類	心室性期外収縮 (short run型)	23 (5)	心室性期外収縮 3
	心房性期外収縮	13	心房性期外収縮 3
	心室細動	4	
	房室ブロック	5	
	(完全房室ブロック)	3	
	著明な洞性不整徐脈	4	

註：一症例にて2つ以上の種類の不整脈を有したものあり

不整脈の種類としては、VAでは心室性期外収縮(VPC)が23例と最も多く、さらにこの中5例に、房室ブロックは5例(3例は完全房室ブロック)にみられた。一方、RAでは、VPCはわずか3例のみであった。

以上、心室性不整脈がRAに比しVAで高頻度に出現した事実はVA発作時の虚血の程度が強いことを示唆する。

(2) VAのST上昇誘導と不整脈の関係(図2)

VAではST上昇が広範囲の誘導にわたる例ほど不整脈が高率に出現し、

特にI, aVL, V₂₋₆でST上昇のみられた群では93.8%の高率に不整脈の出現が認められた。なお、VPCや心室細動はどの誘導でST上昇がみられても出現したのに対し、房室ブロックⅡ、Ⅲ、aVFでST上昇が出現した場合のみ認められた。

(3) VA発生持続時間と不整脈出現有無(表1)

VA発作が5分未満では不整脈ありが35/86回(40.6%)なのに対し、5分以上では55/80回(68.8%)と不整脈の発生頻度が高い傾向が認められ、5分未満と以上の群で有意差が認められた。

ホルター心電図により、VA発作の全経過が記録されたもののみを、不整脈出現群と非出現群に分けて、ST上昇持続時間を比較すると、図3のごとく出現群の持続時間は5.43 ± 5.41分なのに対し、非出現群では1.84 ± 1.81分で、やはり出現群が有意に長いことが認められた。

(4) 不整脈出現有無とST上昇度(図4)

不整脈出現群の最高ST上昇度は0.62 ± 0.65mVで、非出現群の0.32 ± 0.24mVに比し有意に高いことが認められた。Kernらは、STが0.4mV以上に上昇する例では不整脈の出現頻度が高いことを報告しているが、われわれの成績もほぼこれに対応するものと思われる。さらに、われわれの成績では図3のごとく、ST上昇度の著明な例にVPCのshort-runあるいは心室細動(Vf)の

		不 整 脈		
		あり	なし	%
V ₁₋₄	心室性期外収縮	3	5	10
	著明な洞性不整徐脈	1		
	心室細動	1		
V ₁₋₆	心室性期外収縮	19	27	24
	心房性期外収縮	7		
	心室細動	1		
I・aVL・V ₂₋₆	心室性期外収縮	7	15	1
	心房性期外収縮	8		
Ⅱ・Ⅲ・aVF	心室性期外収縮	11	34	14
	心房性期外収縮	11		
	著明な洞性不整徐脈	6		
	房室ブロック	5		
	(完全房室ブロック)	3		
V ₆ のみ	心室性期外収縮	4	9	27
	心房性期外収縮	4		
	心室細動	1		
		1		

図2. 異型狭心症におけるST上昇誘導と不整脈との関係(発作回数)

異型狭心症の発作における不整脈出現有無と持続時間との関係(発作回数)

	不整脈あり		不整脈なし	
～1分未満	7	35	23	51
～5分未満	28		28	
～10分未満	19	55	10	25
～15分未満	15		9	
～30分未満	16		4	
30分以上	5		2	
計	90		76	

5分未満の頻度有意差あり(χ^2 検定 $p < 0.001$)

出現が多く認められたが、この事実は注目すべき点とみなされる。

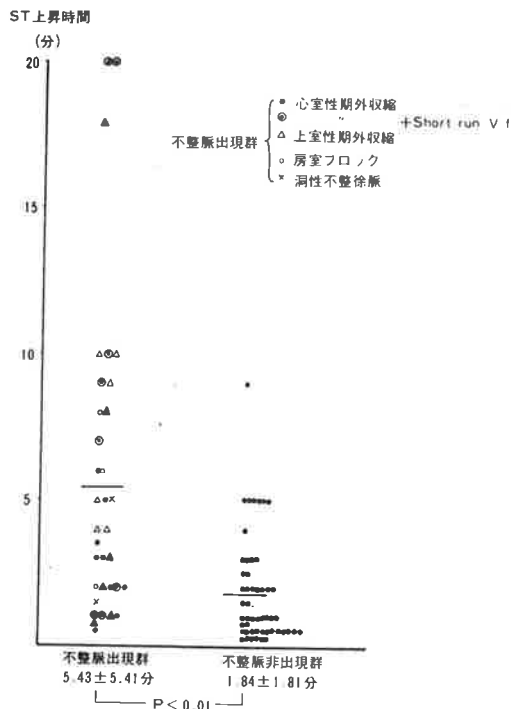


図3. 異型狭心症における不整脈出現群と非出現群におけるST上昇時間の比較

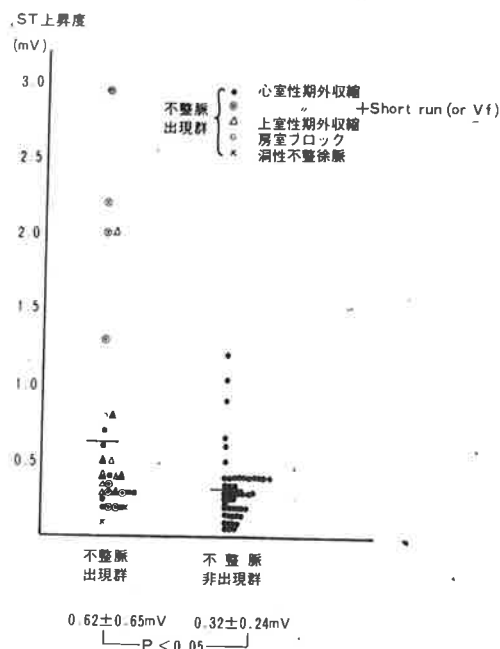


図4. 異型狭心症における不整脈出現群と非出現群におけるST上昇度の比較

(5) 不整脈出現有無と冠動脈造影所見

冠動脈造影を施行しえたVA29例

とRA11例の所見と発作時不整脈出現の有無との関係を検討したところ、

VAでは不整脈の出現の有無と障害枝数の間には何らの関係を認めなかったのに対し、RAでは全例に有意

狭窄を認め、不整脈出現例はすべて多枝障害例であった。

	障害枝数	不整脈(+)	不整脈(-)	計
VA	0 枝	7	1	8
	1 枝	11	2	13
	多 枝	8	0	8
RA	1 枝	0	5	5
	多 枝	4	2	6

表2. 冠動脈所見と不整脈の有無(例)

(6) ST上昇経過と不整脈出現との関係(図5)

ホルター心電図によりVA発作の全経過を記録できた30回の発作につき、ST上昇の経過と不整脈の出現の経過との関係をEliminatorによる高速圧縮心電図で分析すると、次図に示したごとく5つのパターンに分類できた。例えば1はST上昇開始直前から不整脈が出現し、ST上昇極期に不整脈が消失するパターンである。

これらのパタンのうち、ST上昇極期から不整脈が出現し、STが基線に戻るまでこれが持続する場合（パターン2）が最も多く見られた。VPCあるいはそのshort-runやVfの出現頻度は図右に示すごとくである。パターン2は実験的な“reperfusion arrhythmia”に対応する可能性があり興味ある点と考えられる。

3. 結 論

VAではRAに比し、その発作中の不整脈の出現頻度が高く、重症不整脈も多く認められ、その出現には発生時間の長さ、ST上昇度が強く関与していることが示された。一方、VAでは冠動脈に障害のない例でも発作時に不整脈が発生し、さらに不整脈発生様式

では、ST上昇極期に不整脈の出現する率はむしろ低く、ST上昇開始ないし消失期にその率が高いことが観察された。以上の成績はVAの本態を解明する上でいくつかの情報を提供していると思われる、さらに心筋虚血による不整脈出現機序の解釈にも示唆を与えるものと結論される。

4. 将来の展望

- (1) 心筋虚血と不整脈の関係については、すでに多くの動物実験の報告がなされているが、その成績が必ずしも臨床に結びつくとは限らず、その意味から臨床的な研究がさらに推進されねばならない。
- (2) VAは一過性かつ強い心筋虚血を示す典型的臨床モデルであり、これに関する研究は人間の心筋虚血による不整脈の発生機序を解明する発端を与えてくれることが大いに期待される。
- (3) 今後、VAと不整脈の関係をさらに深く研究するために次の事が必要となろう。a, 発作時の体表マッピング b, 発作時の血行動態 c, 発作時の冠動脈所見ないしRI像 d, 発作時の冠静脈洞からの採血による分析, など。

以上を総合すると共に、発作に対する各種薬剤の効果を検討することも重要と考えられる。

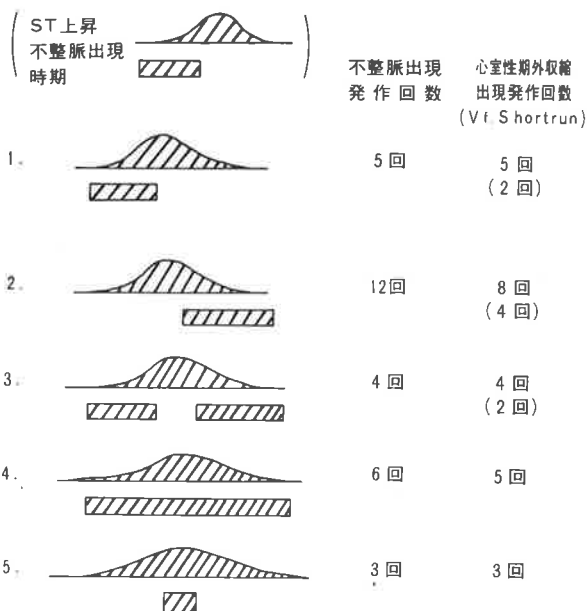


図5. 異型狭心症におけるST上昇と不整脈出現時間の関係 (n=30)

急性心筋虚血領域の定量的測定と後負荷軽減療法

猪岡 英二（東北大・第一内）

急性心筋虚血に際してその病態は時々刻々変化し、それに対応した適切な処置をとることを要求される。しかし現在虚血巣の進展ないし、縮小を短時間で知る方法がなく、心筋保護の治療法開発の隘路となっている。我々はこの問題を解決する一方法として、心筋虚血巣の広がりを中心図 ST mapping により定量測が可能か否かの実験的検討を試みた。また急性心筋虚血時の心不全治療の一つとして後負荷軽減療法を取りあげ、心機能の評価と心筋酸素消費、局所収縮の面からみた本療法の効果につき検討した結果を述べる。

1. ST mappingによる虚血巣の定量

心筋虚血時に虚血領域、正常領域の境界に電氣的二重層〔Ischemic boundary〕が生じ虚血側で ST 上昇、正常側で ST 下降をみる。Epicardial ST mapping でこれを追跡できれば虚血域を判定し得るので、これを体表から推定する、いわゆる逆問題の解が得られれば、臨床的応用可能である。またこの Ischemic boundary を心筋より離れた電極で求める際は理論的には立体角により計算し得る。但し虚血による ST 偏位は上述のごとく Ischemic boundary で説明し得るか、あるいは、局所の心筋電位を主に反映するかいまだ論争のわかれる所である。そこで我々は以下の実験を行って、この点を検討した。（図1）冠灌流摘出犬心標本を作製、等容な縮心とし、心内胚下、心外膜面に電極装着、体表に模した竹製ケージの中に固定、全体を加温生理的食塩水を満たした水内に置いた。心房 pacing により心拍数を一定に保ち、左回旋枝分枝、ないし同起始部を5分間完全閉塞した後開放、この間の心電図を経時的に記録、ST レベルを、QRS 前 50msec の PQ レベルを基線とし、QRS 後 80msec を ST₁ としその後 30msec ずつ ST₂、ST₃ として自動計測した。心電図記録後、各電極の位置を三次元的に測定、その後 Schleginger 法により非閉塞動脈に造影剤を、閉塞動脈へは墨汁を注入、ホルマリン固定、超軟 X 線撮影し虚血域を決定した。この虚血境界線上に等間隔で Epi, End 交互に 20～25 点を取り各点の三次元的位置を測定、相接する 2 点と対側の 1 点を結ぶ 3 角形を画き、これが各電極にはる立体角を求め、その総和を立体角とし、実測の ST 偏位と対比した。図2に Epi, の ST mapping を示すが、small, large, ischemia で ST 上昇の範囲をよく反映し、且つ測定した ST 偏位と、計算した立体角は、よい相関を示した。このことから理論的には、Ischemic boundary をよく反映し、虚血境界決定可能といえる。しかし、臨床応用には、無限均一媒体とみなしたことによる差、単純な急性虚血でない場合等、尚多くの問題が残る。

2. 後負荷軽減による心機能とMVO₂

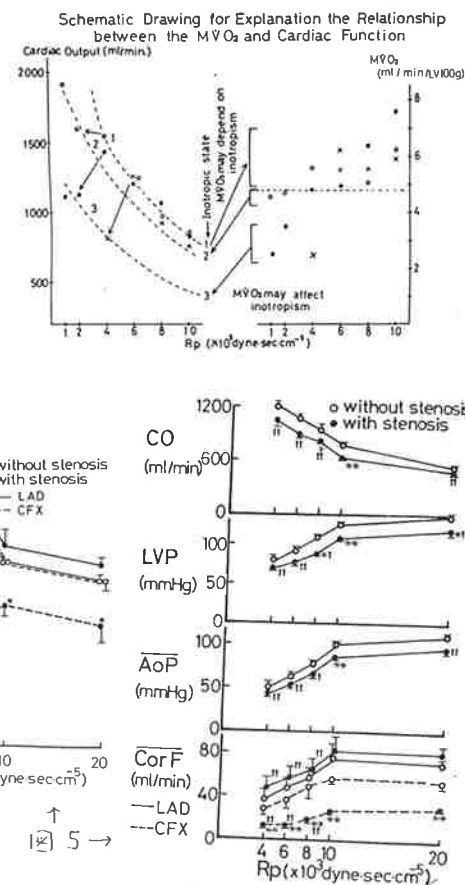
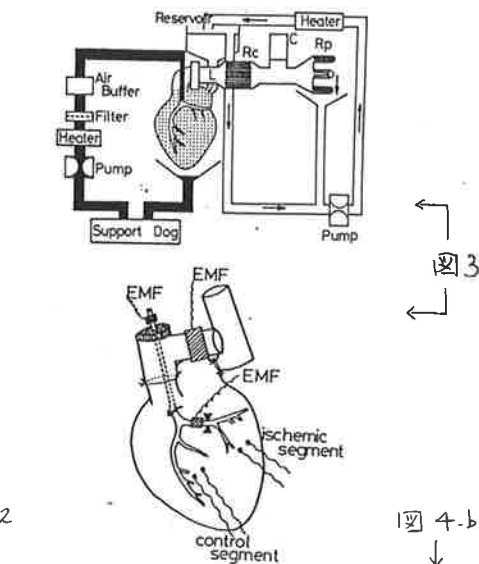
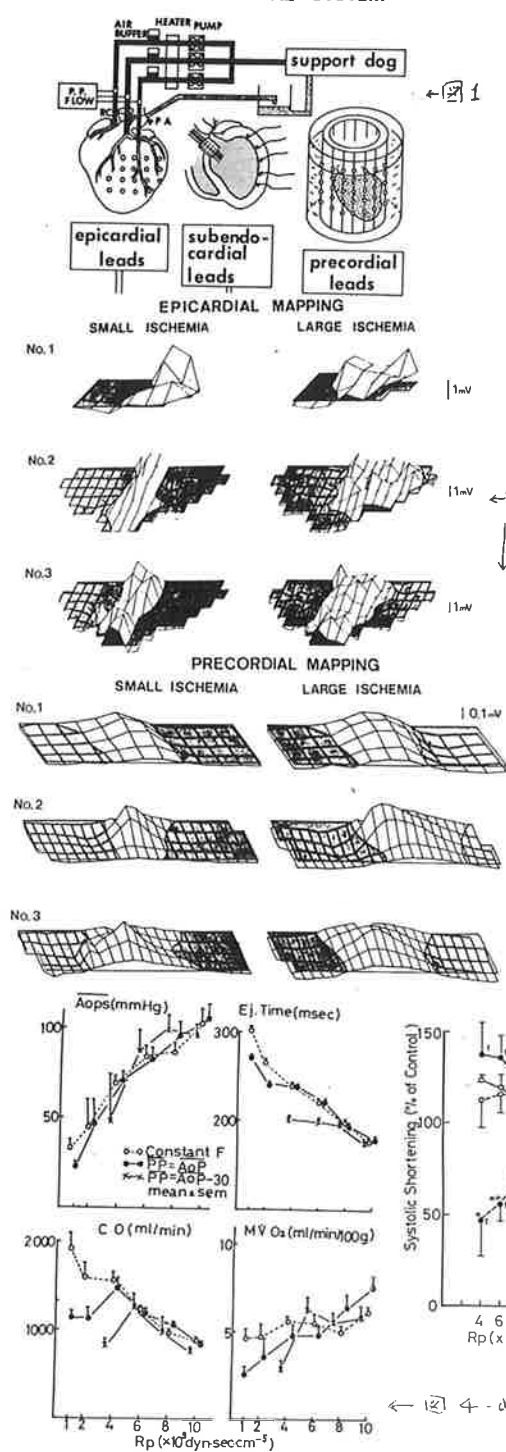
重症心不全における後負荷軽減療法の効果が示されてから久しい。しかし本法は後負荷をさげ心拍出量を増し虚血心筋ストレスを軽減するが、逆に冠灌流を低下し、心機能抑制、虚血進展の恐れもある。そこで本療法における至適な後負荷を実験的に検討した。冠灌流摘出犬心の大動脈起始部に犬大動脈入カインピーダンスと等価の device をつけ、また左局に高さを調節し得る Reservoir をつけ加温生食を満たし、overflow systemにより左室拡張末期圧を一定に保ち、左房、左室、device Reservoirと循環させた。(図3)冠灌流量は末梢抵抗(R_p)を $\text{lodyne sec cm}^{-5}$ (以下単位略す)とし発生圧が 10 mmHg となるように左室拡張末期圧を調節した時の平均大動脈圧と等しい冠灌流圧で灌流、以後、そのままの血流量で灌流した Constant F、灌流圧を平均大動脈圧と等しくした $PP = Aop$ 、 Aop より 30 mmHg 低く保ち虚血心に模した $PP = Aop - 30$ 灌流の三種の灌流法で、 R_p を $10 \sim 1$ までの間 step で変化させ、心拍出量、心筋酸素消費量等を測定した。また一部では、左回旋枝を 50% 狭窄し心内膜下に microsonometer をつけ、狭窄部血流量、局所収縮率を測定し、健常域のそれと比較した。その結果、心拍出量は各灌流とも R_p の減少にともない増加したが、 $PP = Aop - 30$ 灌流では各々 $R_p 4, 6$ で Peak を呈し、以後減少した。MVO₂ は、constant F では R_p の低下によりほぼ不変、 Aop 灌流では次第に低下 $R_p 2$ 以下で著明に、また $Aop - 30$ 灌流では $R_p 4$ で著明に低下した。この両者の関係から図4にみるごとく、 R_p の低下につれ CO は増加するが、心機能曲線からみると、より低い機能曲へ移行しつつ、CO は増しており、心筋虚血が強められている可能性がある。すなわち CO は増加しても、心筋虚血は増強し、長期的に亘ると、障害の生ずる恐れが上分予測される。また局所の血流を減少し $PP = Aop$ のまま R_p を低下すると図(5)の如く、CO は増すが冠血流は低下、狭窄領域局所収縮も低下し、健常領域局所収縮が増して CO を増加していることがうかがわれた。以上のごとく急性心筋虚血時に後負荷をさげることは、あるレベルまでは CO を増し、局所心筋負荷を低下するが、ある限度以上上げると、CO は増しても局所心筋虚血は進行する恐れがあり、至適レベルの決定 CO のみでは不十分で、困難を思わせた。

3. 将来の展望

前述の実験成績の臨床応用をめざす、すなわち、ST Mappingにより、虚血境界、ないし虚血の程度を、定量的に時々刻々測定しつつ、後負荷軽減、薬物治療、大動脈 Balloon pumping 等の治療を試み、急性心筋虚血の治療法の評価を行いより良き治療の開発をはかる。心電図逆問題の解が得られれば、心表面電位図より虚血境界を画けるが、それまでの間、心表面電位が単純に体表へ投影されていると仮定し、arbitraryに境界を画き、各電極、体表、心臓等の位置関係を求めて立体角を計算し、各電極での ST 偏位と対比し、最も高い相関が得られるよう、境界を画きかえてゆくことにより、虚血巣の定量化をはかる。上記測定を行ないつつ、種々の処置、後負荷軽減等試み、大動脈圧、冠循環、心拍出量、心容量等の血行動態を測定、これらの成績より、症例ごとに

preload afterload, CO, Contractility 指標の諸関係を, Computer により simulate させ, afterload, preload を変えた際, これらの関係がいかに変動する力を予測させ, 至適な条件を推定した上で治療を行ない, これをくりかえすことにより best の処置を求めてゆく。

EXPERIMENTAL SYSTEM



虚血による心筋障害 — 心筋細胞構築崩壊過程からの検討

矢崎 義雄・永井 良三（東京大・第三内）

目 的

虚血による心筋障害の程度と範囲を推定する方法として、障害心筋より血中に流出する物質を生化学的に測定する方法が心電図法とともに現在最もひろく用いられている。その指標物質として、心筋細胞質中に含まれるCPK, GOTなどの酸素およびミオグロビンなどが従来検討された。しかしこれらの指標物質は虚血による心筋細胞膜の透過性亢進のみによっても血中に容易に流出するものであり、実際の心筋細胞の崩壊過程を直接反映していない可能性がある。そこで我々は、梗塞時の心筋細胞構造の崩壊過程を直接反映する指標物質として、心筋固有の構造蛋白である心筋ミオシンの軽鎖をえらび、その血中流出パターンを据えて虚血による心筋細胞の障害過程を明らかにし、さらに心筋保護作用についても考察したい。

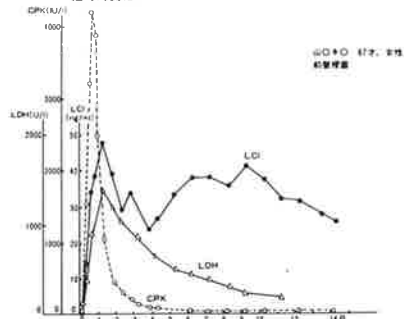
方 法

イヌおよびヒトの心筋よりミオシンを改良せる稀釈法にて抽出、さらにそのサブユニットの軽鎖を分離し、ゲル電気泳動法により軽鎖IおよびIIを分画純化した。そして抗体を作成してラジオイムノアッセイによる測定法を確立、障害心筋より血中に流出する軽鎖値を測定した。実験的心筋梗塞は、イヌの冠動脈前下行枝に絹糸のワナをおく閉胸下覚醒時結紮法にて作成。急性心筋梗塞臨床例は、発作後12時間以内にC. C. U.に入院した症例で検討した。

結 果

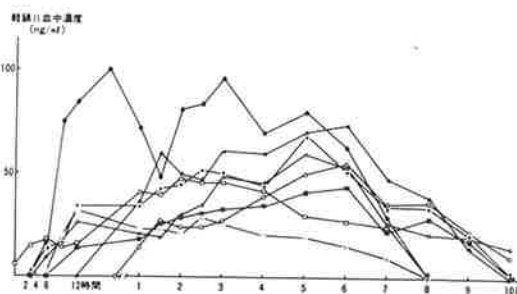
〔心筋ミオシン軽鎖のラジオイムノアッセイ法〕¹²⁵I 標識軽鎖を標準標品とした二抗体法による方法を用いた。我々のこの方法による測定限界は0.2ngで、正常域は6ng以下であり、骨格筋ミオ

心筋梗塞後の心筋ミオシン軽鎖I(LCI), CPK, LDHの血中濃度の経時的変化



心筋梗塞発作後

冠動脈結紮後の心筋ミオシン軽鎖II血中濃度の経時的変化



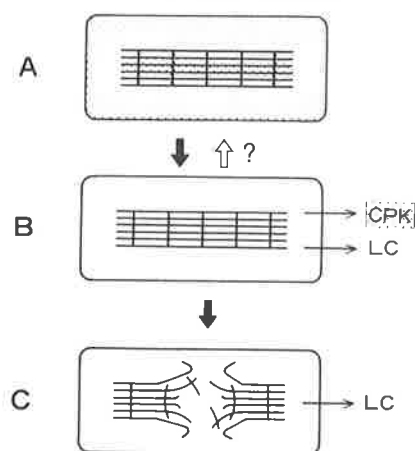
冠動脈（前下行枝）結紮後

シン軽鎖との交叉反応は10%であった。

〔心筋梗塞後の指標物質の血中流出パターン〕(CPK) 心筋から流出するCPKの血中レベルの変動をみると、冠動脈閉塞後早期に上昇して24時間以内に最高値に達し、以後迅速に下降する。このCPKの血中流出パターンは、実験的心筋梗塞でも臨床例においても殆んど相違はない。これはこの酸素が梗塞部心筋細胞から、それが梗塞部中心に存在しようが、周辺の境界領域にあらうが一樣に早期に逸脱してしまうことを意味している。

ところが血中軽鎖値の変動をみると、軽鎖は構造蛋白でありながらCPKとほぼ同時の6時間以内の早期に上昇し、3日から5日後に漸く最高値に達し、1週間以上の長期にわたって高値が持

心筋細胞構築の崩壊過程



続する特徴あるパターンが示された。これはまず心筋細胞質内にCPKと同様のフリーの形で存在する軽鎖が流出し、その後細胞構造構築として最も重要な筋原線維の崩壊により流出してくることが考えられる。さらに、血中からの軽鎖の消失は早く、その半減期は約4時間半であることから、長期にわたる血中連鎖値の上昇は軽鎖が血中に停滞しているためではなく、心筋細胞より流出しつづけていることを示している。なお得られた抗体の特異性の問題でイヌでは軽鎖Iを、ヒトでは軽鎖IIをラジオイムノアッセイ法で測定したが、イヌにおいて軽鎖Iと軽鎖IIではその梗塞後の

血中変動パターンには本質的な相違は認められず、

従って臨床料では軽鎖Iを、動物実験では軽鎖IIを指標物質として用いた。

梗塞部心筋の組織学的検討

一方、実際に動物実験において梗塞部位の心筋組織を経時的に観察すると、冠動脈を結紮して数時間後の早期に心筋細胞の崩壊がはじまるが、一週間後でも細胞構築がこわされつつある同様の状態にある心筋細胞が梗塞部位にまだ多数存在することが組織学的に認められ、心筋細胞構築の崩壊は長時間観察されるところとなり、軽鎖流出パターンとよく一致する。すなわち、血中への酸素の逸脱は梗塞部心筋に一樣におこるが、細胞構築の崩壊は虚血の程度の著しい心筋細胞からはじまることが考えられる。このことは逆に、虚血により心筋細胞から酵素が逸脱しても、細胞構築の崩壊に進展することが阻止できれば可逆的变化にとどまり、心筋細胞は壊死を免れる可能性があることを示唆している。

梗塞部心筋の病理組織学的変化の経過

病理組織所見	冠動脈結紮後				
	8時間	24時間	2日	5日	8日
筋フィラメントの崩壊	±	+	卅	卅	+
筋フィラメントの過収縮	+	卅	卅	卅	±
筋フィラメントの過伸展	+	卅	卅	卅	±
ミトコンドリアの崩壊	卅	卅	卅	卅	+
筋線維の崩壊	±	+	卅	+	+
結合組織の増加	—	—	±	卅	卅

〔薬剤による血中流出パターンの変化〕ステロイドと Coenzyme Q_{10} (CoQ_{10}) 投与による影響を実験的心筋梗塞において検討した。冠動脈結紮前より経時的に投与を行うと、病理学的に定めた梗塞の大きさには無処置のものと有意の差は認めなかったが、CPKと軽鎖流出量の減少傾向と最高値に達する時期が有意に遅れることが示された。とくに CoQ_{10} の場合にはその効果が大きく、血中軽鎖値の最高値が著しく低下するばかりでなく、流出持続時間も対照群に比して有意の短縮が認められ、総流出量の著明な減少がおこった。このような薬剤による効果の作用機序とその意義については、さらに詳細な組織学的な検討が必要であるが、少なくとも梗塞による心筋細胞の筋原線維崩壊を抑制することは確かと思われる。

考 案

心筋梗塞後早期にCPKなどの細胞質中に存在する酸素は心筋細胞より逸脱してしまうが、構造蛋白のミオシン軽鎖の血中流出パターンからみると、細胞構築の崩壊は梗塞部心筋で一樣におこるのではなく、虚血の影響を最も強く受ける心筋細胞より漸次崩壊されてゆく可能性がある。このような観点から心筋保護を考察すると、心筋細胞の膜系やミトコンドリア等に早期に出現する不可逆的な病変に対する防禦ばかりでなく、その次の段階で生じる細胞構築の崩壊に対する予防的処置も梗塞部心筋の salvage に関与しうる可能性があり、今後この方面からの検討が必要と思われる。

虚血に関する研究の総合的ビジョンと将来展望

虚血にともなってどのような過程で心筋細胞の障害が出現し、そしてその進展をどのような因子が遅延ないしは抑制するかは、現在循環器学の研究においてその基礎的解明が最も望まれている命題のひとつである。

そもそも虚血による心筋障害は早期に出現し、冠血流停止 60 分で大部分の心筋細胞に不可逆的な機能的、形態学的な変化が生じることはすでに確立された事実となっている。しかし我々の構造蛋白の血中への流出パターン及び経時的な梗塞部心筋の組織学的検討により、心筋細胞構築の骨格となる筋原線維などの崩壊は、ミトコンドリアや膜系に主としてみられる早期におこる変化と異なっており、早期からはじまるが、1週間以上の長期間にわたって持続するものであり、それも梗塞部心筋で一樣におこるものではなく虚血の影響を最も強く受けた心筋細胞より漸次進展してゆくものであることが示唆された。従って虚血からの心筋保護を研究する場合にはこのような観点からの検討も必要と思われる。

すなわち、細胞機能に重要なミトコンドリアや膜系の変化は虚血の早期に出現し、その対策には虚血前からの予防的処置が最も効果を有することが予想され、少なくとも虚血直後からの治療が必要である。しかし臨床応用の観点からはすべての症例にこの方法を実施することは不可能である。一方、心筋細胞構築の崩壊は長時間持続するものであり、臨床例においても、心筋梗塞発症後時間が経ても、心筋細胞構築崩壊の進展を抑制するような心筋保護作用をはじめれば、この方面から心筋を salvage する可能性は十分考えられる。我々の構造蛋白である心筋ミオシン軽鎖の血中への障

害心筋からの流出量及び組織中に存在する量を据える方法は、このような心筋保護法の効果を適格に評価することを可能ならしめ、さらにその研究の将来の発展に寄与するものと思われる。

我が国における循環器系の研究態勢の問題点

外山 淳治（名古屋大学環境医学研究所）

我が国のこれまでの医学研究，特に基礎医学の研究に関しては，大学における施設・講座の構成とそれに裏付けられた研究者のポストの数から見て，癌と脳神経に関する研究が主流であり，循環器系の研究は傍流であったと考えざるを得ぬ状況である。しかし最近になり虚血性心疾患の罹患率が我が国において急激に上昇してきたことから，循環器疾患が社会的に大きく注目されるようになり，循環器病を専門とする診断治療機関の数は著増したが，その研究態勢は質量ともに真に不十分であり，我が国の循環器系の研究の多くは，欧米で行われている研究を追従しているに過ぎない。このような現在の状況を打ち破るには，我々研究者の一層の努力が必要であることは無論であるが，我が国の循環器系の研究態勢の問題点も掘り下げ，それを改善してゆく努力も払わねばならない。従って以下にその問題点に関する私見を述べ，諸家にその批判を仰ぐと共にその解決策に関して真摯な討論を期待する。

研究部門・施設

近年の成人病に占める循環器疾患の重要性が増すにつれて，国公立ならびに私立大学・研究所で循環器系を専攻する臨床講座・部門の充実が目覚ましいものばかりあり，これに従事する臨床系医師の数も著増し，その技術的な水準も著しく上昇している。しかし循環器系の基礎研究を専攻する講座・施設の新設はわずかであり，循環器系の基礎研究を標榜する研究所に至っては，既設を含めて全国で数ヶ所に過ぎない。この数は癌研究や脳神経研究のそれに比べ著しく少ない。これは我が国において癌や脳神経疾患に比べ循環器系疾患の重要性に対する認識の低さがその主因であろうと考えられる。我が国における前述した循環器系の臨床部門の新設ラッシュは，最近の循環器疾患の著増に対応するための社会的な要請を直接反映したものである。しかしこれらの部門では，欧米で開発された診断・治療技術の導入・修得に追われているのが現状であろう。今後我が国の循環器学の水準が欧米と肩を並べ，さらには我が国において独創的な研究を発展させることを望むなら，広汎な基礎的研究ができる研究所・施設が必要になるが，質量共に非常に不十分な現状であると考ええる。

研究者

一般に医学研究は，他の基礎科学の分野の先端的な技術や理論を取り入れて発展してきたものである。循環器系の研究も，その例外ではなく，特に虚血性疾患の診断・治療に関しては，電磁気学

や電子工学を応用した研究が多く見られ、最近では電算機を利用したデータの解析処理もその研究の発展に重要な役割を占めている。

このように医学研究に対する理工学系の技術・理論的基礎がますます重要となってきた現在、医学教育においてこれら基礎科学の重要性が再認識されなければならない。現在の医学専攻者は、ともすれば単なる機器を利用した診断・治療技術の修得に偏り、その基礎原理や能力の限界などに対する理解を軽視する傾向にあり、医学の基礎的研究に対する興味を失う傾向にも係わっている。他方、医学研究に興味を示す理工系の研究者の数が最近になり著しく増加し、臨床・基礎を問わず我が国の医学研究の発展に大きく貢献している。しかしこれらの研究者の多くの医学研究への参加は“および腰”の状態ある。今後、若い研究者が“本腰”を入れて医学研究に参加できるためには、彼等を受け入れ、その身分と研究を保証する基礎医学系の部門・施設が必要となる。しかしここで逆に問題となるのは、医学専攻者が前述の如く医療技術の修得のみに興味を示し、基礎医学の研究に携わなくなる傾向のために、基礎医学の部門における医学専攻者が減少することである。この傾向が著しくなることは、臨床医学と基礎医学との密接な関係が保たれなくなる虞に陥る。

研 究 費

一般に大学の研究費は、講座費、文部省科学研究費、その他の機関の研究助成金から成っている。これらの研究費は年々数パーセントずつ増額はされているものの、物価や人件費の伸び率を勘案すれば、逆に目減りしている。特に国立大学では総定員法の制定により、技官、研究補助職員の定員が大幅に減少されており、これを補う目的で非常勤職員を講座費を流用して雇い上げているのが現状である。

従って研究費に占める人件費の比率が大幅に増加しているが、これを少しでも抑えるために本来は研究補助員に依頼すべき雑用を研究者が肩代りしているのが現状である。これによる研究者の負担は、当然ながら研究に費すことのできる時間の減少に係わる。

我が国においては終身雇用制が定着しているためか、研究に必要な経費としての人件費の算定法が曖昧なきらいがある。現在医学研究では、創造的なテーマに取り組む際には、個々の研究室の枠を越えた別の分野の研究者や技術者の参加を必要とする。したがって、その際の個々の研究における人件費の算定を充分行い、それに見合った研究費の支給が望まれる。

実験動物の飼育その他の共同利用施設

各研究部門が実験用動物の飼育や特殊な器具の製作などを依頼できる共同利用施設の貧弱さは、循環器系の研究部門では目を覆わざるを得ない。特に、実験に用いるイヌ、ネコの供給は、専ら一般家庭で不用となったペットに依存しており、これが実験結果の信頼性を著しく低下させている。これらの実験動物については、早急に公的機関による飼育を行わねば、安価で良質な動物を得ることは困難である。

その他実験に必要な器具の製作についても、共同利用に足る機器と技術者を備えている研究部門

は皆無に等しい。研究を支えるこれらの施設の整った欧米の研究者に反して、劣悪な条件の下で、我が国の循環器系の研究者が優れた研究を成し遂げているのは驚異的であると考ええる。

How ions cross membranes

(1981 . 7 . 14)

Charles Edwards

(State University of New York at Albany)

概 要

イオンが、細胞膜、ことに神経・筋などの興奮性膜を通過する機序について考察を行った。膜を介してのイオン分布に大きな影響を与えるのはドナン関係の存在である。筋線維においては K^+ イオンと Cl^- イオンとはいずれもよく膜を透過するが、細胞内の非透過性陰イオンの存在により K^+ および Cl^- の濃度勾配が生じ同時に膜電位が発生する。内外のイオンを変化させてこのバランスを破ると、水の移動がこれに伴う。ナトリウムイオンの分布を制御しているナトリウムポンプを、ウアバインによって停止させると、細胞は膨張し、ナトリウムポンプの存在が水の移動にとって重要であることを示している。イオンは一般に水和していて、膜の脂質層を通過できない。イオンの移動は、膜に存在するチャネル及び各種のポンプ($Na-K$ ポンプ、 Cl^- ポンプ、 $H-HCO_3$ ポンプなど)によって行われる。チャネルの存在の証明として、最近の単一チャネル電流の誘導は大きな意味を持つ。チャネルの作用としては、選択性と通門性の2つを考える必要がある。選択性是一種のフィルター作用であり、大きなイオンは小さなイオンに比し透過性が低い。通門性の性格はチャネルにより種々異なり、膜電位によるもの、伝達物質によるもの、細胞内メッセンジャーによるものなどがある。細胞内メッセンジャーとしては、カルシウムとか、サイクリックGMPなどが著明である。チャネルには選択度の高いものと低いものがあり、 Na チャネル、 K チャネル、 Ca チャネルなどは選択性が高く、 Cl チャネルや終板のチャネルは選択性がこれに比して低い。

課 題 名

Comparative Physiology of Neuromuscular Transmission

(56. 7. 24 — 25)

小 林 惇 (広島大・総合科学)

The neuropeptide FMRFamide: Its actions on molluscan muscle

Price, D. A. (Florida State University)

Actions of the molluscan cardioexcitatory neuropeptide

FMREamide(Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) on identified *Helix* neurones

Cottrell, G. A. (University of St. Andrews)

Mode of actions of neurotransmitters in antagonistic radular muscles
of a mollusc.

Kobayashi, M. (Hiroshima University)

Evidence for neurohumoral control of the electrogenic sodium pump
in molluscan cardiac and buccal muscle.

Hill, R. B. (University of Rhode Island)

Extracellular and intracellular calcium ions in transmitter release
at the insect neuromuscular junction.

Washio, H. (Mitsubishi - Kasei)

Action of catecholamines on the smooth muscle of genital organs
(seminal vesicle, prostate gland and oviduct).

Ohkawa, H. (Yamaguchi University)

Electrophysiology of the smooth muscle of the dog vena cava.

Prosser, C. L. (University of Illinois)

Pharmacological properties of neuro-muscular junctions in the heart
of a mollusc(*Dolabella auricularia*)Kuwasawa, K. (Tokyo Metropolitan
University)

Enhancement of contraction by biogenic amines and the neuropeptide
FMRFamide in *Mytilus* smooth muscle

Muneoka, Y. (Hiroshima University)

本研究会は、各種筋肉（主として心筋・平滑筋及び無脊椎動物の筋）に対する神経伝達物質の作用機序や筋細胞膜の興奮機構について、参加者が夫々の最近の研究結果を発表し、今後の研究協力とお互いの研究発展に役立てることを目的として行なわれた。発表者として内外の研究者 10 名の参加を得、その他にオブザーバーとして常時 10 数名が参会した。

第 1 日目の初めは、伝達物質と認められた神経ペプチドの一つフマファミドの軟体動物諸組織に対する作用について論じられた。宗岡は軟体動物の平滑筋に対する作用を述べ、Price は心筋と口筋に対する働きを他の伝達物質の働きと比較して論じ、Cottrell は中枢ニューロンに対する特異的な作用機構を論じた。次いで、小林と Hill は軟体動物の口筋の拮抗的な働きや、心筋のリズムに対する神経伝達物質の修飾作用について、夫々の研究結果を中心に論じた。1 日目の最後は、入沢が哺乳動物の心筋の自発興奮機構に関する研究紹介の後、教室の若手研究者と共に実験の供覧を行なった。

第 2 日目には、桑沢、鷺尾、大川の 3 名が夫々の立場から神経筋伝達の機構を比較生理学的に論じた。最後に、Prosser は平滑筋のリズム性興奮を比較生理学的に概観し、徐波発生の機構を考察した。

近年、脊椎—無脊椎動物を問わず、神経伝達物質や修飾物質に関する情報は余りにも多く、いずれを取捨すべきかに迷う状態である。このような時機に開催した今回の研究会は、従来の知見を総合的に解析し、問題を比較生理学的に考察し直す上で、重要な意義があったと考えられる。参会者一同大いなる成果を得たものと確信する。

神経伝達物質，心筋・平滑，無脊椎動物筋，神経₂筋の比較生理学
リズム性，フマファミド

- 1, Kobayashi, M. and Muneoka, Y. : Modulatory actions of octopamine and serotonin on the contraction of buccal muscles in *Rapana thomasiana*. I, II Comp-Biochem Physiol. 65c 73-79, 1980. 81-86, 1980.
- 2, Price, D. A. and Greenberg, M. J. : Pharmacology of the molluscan cardioexcitatory neuropeptide FMRFamide. Gen-pharmac. 11

237-241, 1980

- 3, Cottrell, G. A. : Action of molluscan cardio-excitatory neuropeptide on identified 5-hydroxytryptamine containing neurons and their follower neurons in *Helix pomatia*. J. Physiol 284, 130-1319, 1978.
- 4, Prosser, G. L. : Evolution and diversity of nonstriated muscles. Handbook of physiology ~ The cardio-vascular system II Chapter 21 130-670, 1980.

神経ペプチド、フマファミド；その軟体動物筋組織に対する作用

David A. Price
(Florida State Univ)

フマファミドはハマグリ的一种 *Macrocallista nimbosa* の神経節から抽出された生理的に活性なペプチドで、4ケのアミノ酸を含むアミド（フェニールアラニン-メチオニン-アルギニン-フェニールアラニン、アミド）である。

フマファミドはハマグリ *Mercenaria* の心室筋に対して強い収縮増強作用をもつが、それは 10^{-8} M の濃度で高周期的にも変力動的にも有効であった。セロトニンもハマグリ心室筋に対してフマファミドと同様な作用を示した。両物質の濃度-反応曲線は平行であるが、フマファミドの方がセロトニンより5～10倍強力であった。また、セロトニンもフマファミドも共に心臓の細胞内環状AMPの濃度と膜のアデニレートサイクラーゼ活性を増大させることがわかった。

フマファミドは、一方巻貝 *Busycon* の歯舌伸出筋に働いて持続性の収縮をひき起こした。アセチルコリンもまた歯舌伸出筋の収縮をひき起こすが、両物質の濃度-反応曲線は平行でなく、両物質の効果は質的に異なることが示唆された。ベンゾキノニウムはアセチルコリン収縮を抑制したが、フマファミド収縮を抑制しなかった。

これらの実験結果や、他の多くのペプチド関連物質の軟体動物筋組織に及ぼす効果などから、フマファミドの作用機構について考察した。

マイマイの同定された神経細胞に対する フマファミドの作用

Glen A. Cottrell
(Univ. of St. Andrews)

マイマイ *Helix* の同定されたセロトニン含有ニューロンと、そのニューロンから単シナプスを介して興奮性の神経支配を受けるいくつかの従属細胞に及ぼすフマファミドの作用をしらべた。フマファミドは電気泳動的に与えるか、またはニューロンを浸した灌流液に加えた。

10^{-7} M またはそれ以上の濃度で、フマファミドはセロトニン含有ニューロン及びその従属ニューロンの活動を抑制し過分極を起こさせた。この際、細胞の膜抵抗の減少が観察された。セロトニン含有ニューロンの反応は従属ニューロンのそれより大きかった。セロトニン含有ニューロンでは、外液 K 濃度を減少させると、反応の逆転電位はマイナス方向へ移動したが、Cl 濃度を変えても反応に影響はなかった。従って、この反応は主として K^+ 伝導度の増大によると考えられる。

フマファミドに対するセロトニン含有ニューロンの反応を膜電位固定法を用いてしらべたところ、静止電位 (約 -50 mV) より浅い所では、電位依存性の内向き電流のあることがわかった。フマファミドに対するこの第2の反応は脱分極性であり、 g_{Na} 及び/又は g_{Ca} の増大、又は g_K の減少によると考えられるが、これまでの研究で g_{Na} 増大の可能性は除かれた。

受容器の活性化が膜電位依存性のイオン伝導度の変化による例は、アメフラシのニューロンとカエル交感神経ニューロンでしられているが、このような反応は一般的なものか、その機構は何か、また生体における役割は何か、などについて考察を行なった。

軟体動物の拮抗的な歯舌筋における神経伝達物質の作用機構

小林 惇 (広島大・総科・生理)

軟体動物のアカシの歯舌伸出筋と牽引筋とは拮抗筋で、これらは交互に収縮・弛緩をくり返して歯舌運動をおこしている。これまでの研究により、歯舌伸出筋の興奮性神経伝達物質はアセチルコリン (ACH) であるが、牽引筋の主たる興奮性伝達物質はグルタメイトであると考えられる。伸出筋の興奮-収縮はオクトパミンとセロトニンによって増強されるが、牽引筋のそれはこれら両アミン物質によって抑制を受ける。本研究では、これら両筋の拮抗的反應のしくみを、二重蔗糖隔絶法を用いてしらべた。

歯舌伸出筋と牽引筋の両筋において、オクトパミンとセロトニンは膜の過分極と膜低抗の減少を

ひき起したが、低 Cl^- 液中では過分極高は減少し、膜抵抗の減少も僅かになった。この結果は、膜過分極は主として Cl^- 伝導度の増大に基くことを示している。

伸出筋では、オクトパミンとセロトニンによって ACh 脱分極の増大がおこったが、この増大は電流を流して電位膜を変えてもみられた。自発放電は両アミン物質によって抑制されたが、閾値以上の脱分極性電流を流すと、アミン物質投与前の自発放電よりも大きなスパイク波が得られた。アミン物質による自発放電の停止は、 Cl^- 伝導度増大に基く膜過分極によると考えられるが、ACh 脱分極やスパイク波の増大はアミン物質の他の作用によると考えざるを得ない。

一方、牽引筋では、オクトパミンとセロトニンによってグルタメイト脱分極の抑制がおこったが、この抑制は脱電位に関係なく観察された。牽引筋においても自発放電は両アミン物質によって停止し、閾値以上の脱分極をおこすとスパイク波が再発した。セロトニン作用下で再発したスパイクは作用前の自発興奮波よりも著しく小さかったが、オクトパミン作用下のそれはコントロールとはほぼ同じ又はやや大であった。これらの結果は、セロトニンとオクパミンの作用機構が異なることを示唆しており、セロトニンによる抑制は Cl^- 伝導度増大によって説明できるが、オクトパミンは Cl^- 伝導度増大に共に脱分極性電流増大の作用をもつことが想像される。

最後に、これら両アミン物質の作用には、環状スクレオチドが関与している可能性のあることが示された。

軟体動物の心筋と口筋における電気発生性 Na ポンプ の神経ホルモン性支配

Robert B. Hill
(Univ. of Rhode Island)

軟体動物—後鰓類、アメフラシの心室筋では、 K^+ 欠除液中で約 8 mV の脱分極が起こり、 Na^+ 欠除液中では逆に約 2 mV の過分極が起こることがわかった。 K^+ 欠除液中の脱分極高は、電気発生性 Na ポンプ停止による脱分極と、 K^+ —平衡電位の変化による過分極との差に等しいと考えられる。アセチルコリン (ACh) は、拍動している心室を抑制し、膜をやや過分極させた。 K^+ 欠除液に対する脱分極性反応は、ACh 濃度を増大させるか、外液 Na^+ 濃度を低下させておくと減少した。これらの結果は、ACh が Na^+ ポンプを抑制すると考えれば説明できることである。

一方、軟体動物—前鰓類 Busycon の歯舌伸出筋では、 K^+ 欠除液に対する反応はより複雑である。先ず過分極相 (HP) が起こり、次いで脱分極相 (DP) へ移行するが、 K^+ 濃度を元に戻すと過剰の過分極 (EHP) が生じた。DP と EHP とは、 Na^+ に依存し、ウアベイン感受性が大で、また K^+ 濃度によって変った。そこで、この脱分極相 (DP) も電気発生性 Na^+ ポンプの停止によるものであり、細胞内に蓄積した Na^+ が Na^+ ポンプを刺激して、 K^+ を加えたときに大きい過分極 (EHP) を起こし

たとえられる。

伸出筋をK 欠除液に浸す前にAChを与えておくと、K 欠除による最初のHPがみられず、いきなりDPが生じた。この反応の変化は Na^+ とストロファンチジンに依存した。AChの代りにセロトニンやフマファミドを用いても同様なことが起こった。また、この影響は伝達物質の拮抗剤によって抑制された。AChとセロトニンはK 欠除液に対する反応(DPとEHP)増大さる相乗効果をもつことがわかった。

以上の結果から、Busycon 歯舌伸出筋では、神経末端から分泌されるAChやセロトニンが、定常状態における電気発生性 Na^+ ポンプの働きを活性化させるということが明らかになった。

昆虫筋・自発性伝達物質放出に対する細胞外 ・細胞内カルシウム・イオンの作用

鷲尾 宏(三菱化成生命科学研究所・東京)

I. ワモンゴキブリの脚の筋肉から興奮性の自発性微小電位を細胞内より記録しその量子的放出のランダム性を正常リンガー液中と高カルシウム・リンガ液中において比較した。細胞内記録による時系列の解析によって、出現頻度が一樣であるとみなせる系列について、特にvariance - to - mean curveの結果から両者の時系列についてランダム過程からの著しい“ずれ”はみられなかった。この結果は高カルシウム液中においても伝達物質放出の統計学的な性質はその頻度の増加にもかかわらず殆んど変化しないことを示唆している。

II. 神経・筋接合部における伝達物質放出のために外液のカルシウム・イオンが不可欠であり、このCaの作用はマグネシウム・イオンによって拮抗的に阻害されることが知られている。ここでは外液のコバルト・イオンによってCaイオンの神経末端膜の透過性が如何に調節されるかを調べた。高K液中でCaの濃度を1 mMに保ちCoの濃度を0から1 mM, 10 mMと高めてゆく時、明らかに自発性微小電位の頻度の減少を記録することが出来た。この結果はCoの影響はCaの濃度と拮抗的に作用することを示唆している。そこで高K液中でCoの濃度を1 mMに保ちCaの濃度を0.1 mMから20 mMまで増加させるとCaが1 mM以下では明らかに頻度の増加が観察され1 mM以下では減少がみられた。更に定量的に両者の拮抗的阻害を調べるためにその平衡解離恒数を実験的に求めた。この値をMgのための値と比較することによってCoがMgに比べ強い拮抗的阻害作用を持ちその作用点と同じであることが示唆された。しかしこの阻害作用に引続きCoの伝達物質放出に対する増強作用が観察された。

更に神経末端内のカルシウム・イオン濃度がその末端部内のミトコンドリアによって調節され又

カルシウム・イオンはミトコンドリア内に貯蔵されている可能性が知られている。この様な細胞内カルシウムの働きを調べるために低濃度のカルシウム溶液で処理した標本に低濃度のシアン化合物或いはフルハリンを加えると一過性に微小電位の頻度の増加を記録することが出来た。この実験で頻度の増加は細胞内からのカルシウムのリークによる二次的なものであると考えられる。この様に細胞外・細胞内カルシウム・イオンによって伝達物質放出が調節されていることを示唆する証拠が昆虫筋において実験的に示された。

モルモット精囊輸走筋における神経筋伝達

大川 博通（山口大・生理）

モルモット精囊平滑筋の電氣的活動性を、微小電極で細胞内誘導し、神経筋伝達機構について検討した。摘出精囊から輸走方向に長さ約5 mm、巾約2 mmの標本を作り、粘膜剤から電極を刺入した。

精囊輸走筋の静止膜電位は約52mVであり、多くの標本で自発性の興奮性接合部電位（e. j. p. s）が記録された。これらのe. j. p. の大きさは平均2.6mVであったが、時に15mV程度の大きなe. j. p. をみることもあった。e. j. p. の大きさの分布は、精管平滑筋で報告されたものと類似しており、大部分は1—3mVの大きさであった。また、その発生頻度は、平均26.61分であった。一つのe. j. p. の最大のrate of riseは0.7 V/sec, 平均の持続時間は116m secであった。

多くの標本では自発性収縮がみられ、その頻度は3.3—7.5/分であり、一つの標本では、その収縮の大きさは一定していた。頻回刺激（0.3m sec, 3—4Hz）によって収縮をひきおこすことができた。自発生活動電位も記録され、この活動電位はslow wave上にスパイクがのる。slow waveの大きさは10—20mVであった。Field刺激によってe. j. p. sを生じた。これらのe. j. p. sではsummationやfacilitationのratioは1—2.5であった。活動電位の生ずるレベルは、刺激頻度の大きい程、早く到達する。しかし、刺激が持続していても、膜電位が、徐々に増大する細胞もあり、この場合には活動電位は生じないが、この時期でも、facilitationは見られた。

刺激により生じたe. j. p. sはTTX（ 10^{-6} g/ml）によって10—20分後には消失した。ヨヒンビン（ 10^{-6} g/ml）も同様で、e. j. p. sを抑制したが、後に、収縮を伴うsingle spikeを生ずることもあった。プロプラノロール（ 10^{-5} g/ml）は無効であった。フェントラミン（ 10^{-5} g/ml）は自発性e. j. p. sを抑制したが、自発性活動電位に大きな影響はなかった。また、evoked e. j. p. sはフェントラミンによって抑制された。フェノオキシベンザミン（ 10^{-5} g/ml）中では、自発性活動電位の頻度は幾分増加したが、evoked e. j. p. sは後に抑制がみられた。シベナミン（ 10^{-5} g/ml）では、抑制ができなかった。

これらの結果から、モルモット精囊輸走筋への神経筋伝達機構は、交感神経性のものであり、輸走筋には α -促進性受容体の存在が考えられるが、次の諸点については、今後の検討が必要と思われる。1) 自発性 e. j. ps と evoked e. j. ps との差異 2) facilitation の機構 3) α -遮断剤により遮断効果の再検討 4) transmitter 放出に対する遮断剤の作用。

平滑筋のリズム性と Slow wave の発生機序

C. Ladd Rösser
(Univ of Illinois)

話の骨子は大きく分けて2部に分けられる。

第1部は平滑筋における複雑多岐にわたるリズム性とその機構の概観である。ここでは、脊椎動物のさまざまな平滑筋組織から得られる律動的興奮の様子を示し、その起源、伝導、増幅などについて論じた。リズム性は筋原性であるが、摘出した単一細胞ではリズム性はみられず、筋組織でなければならぬこと(ガマ胃平滑筋)や、リズム性は縦走筋で発生するが、輪状筋に伝導されそこで増幅されること(哺乳動物腸平滑筋)などが示された。

第2部はslow wave 発生の機構である。slow wave の振幅と頻度はウアベインや低温に対して非常に感受性が高く、 Ca^{++} -欠除、 Co^{++} 、 Mg^{++} 等はslow wave の間隔を延長するが、高濃度の Ca^{++} は間隔を縮めてslow wave の頻度を増加する。これらの結果をもとにして、細胞には Na^{+} ポンプと Na^{++} ポンプとが並行して活動しており、 Ca^{+} -カルモジュリン系を介して生ずる細胞内Ca濃度の変化がSlow wave の頻度を形成するという仮説を提唱した。

軟体動物心臓接合部電位の阻害剤による効果とイオン機構

桑沢 清明(東京都立大・理・生物)

腹足類タツナミガイ(*Dolabella auricularia*)心臓では促進性及び抑制性接合部電位(それぞれEJPとIJP)を室及び房室弁から記録することができる。一般に軟体動物で心臓の促進性又は抑制性神経-筋伝達物質はそれぞれセロトニン又はアセチルコリンであるとする考えが受け入れられている。近年これらの伝達物質の作用のイオン機構が軟体動物各種の中樞神経細胞において調べられ膜電位に対する多重的效果が知られている。最近アセチルコリンの二枚貝心筋における反応でも神経細胞同様のイオン機構が存在することが報告された。いずれの場合もアセチルコリンは

Na, K, Cl の各イオン channel を活性化することが報告されている。これらのアセチルコリン効果のうち Cl⁻ で仲介される反応はクラレによって有効に阻害されることが一致して示されている。

心筋膜電位に対する推定伝達物質のイオン機構は環流投与や電気泳動投与法によって調べられているが、これらの結果から心臓神経支配のイオン機構が推定されている。二枚貝やアメフラシでの実験から心臓の神経性抑制は、脊椎動物同様、K イオンの透過性増大によってもたらされるものと筋測されている。

タツナミガイ心臓のアセチルコリン反応のうち弁のそれは過分極反応が特徴的である。この過分極反応はクラレによって有効に阻害され、(その分)脱分極反応は逆に増大する。一方クラレは、IJP に対して明瞭な阻害効果をもたらす。クラレによって阻害される IJP の過分極成分は Cl⁻ 欠損液中で逆転する成分であることがわかった。このことはこの電位が Cl⁻ により仲介される成分であることを示している。正常液及び Cl⁻ 欠損液中での活動電位サイクルの各膜電位レベルで IJP 振巾を測定し、外挿法により IJP の平衡電位を求めたところ正常液中に比べ Cl⁻ 欠損液中では明らかに脱分極側に移動していることがわかった。直流通電法によって膜電位を変えて直接両液中での IJP 平衡電位を調べたところ、外挿法同様の結果が得られた。

これらのことはこの動物の神経性心臓抑制のイオン機構に Cl イオンが含まれることを示すものと考えられる。アセチルコリンの作用や Cl⁻ 仲介機構のクラレによる阻害等は従来の報告と一致するが心臓抑制のイオン機構については矛盾した結果が示された。しかし IJP を直接対象とした実験結果という点で、少なくとも神経性心臓抑制の機構のなかで Cl イオンの寄与を除外して考えることはできないと思われる。

生体アミン及び神経ペプチドによるイガイ平滑筋収縮の増強

宗岡洋二郎(広島大)

ムラサキイガイ足糸前牽引筋は少なくとも二種の神経、すなわちコリン性興奮神経とセロトニン性弛緩神経によって支配されており、前者から放出されるアセチルコリンは筋収縮とそれに続く特異的緊張状態(キャッチ)をもたらし、後者から放出されるセロトニンはキャッチを解除して筋弛緩をもたらすとされている。しかし、最近の比較生理学的研究から、一般に筋活動は多数の物質によって複雑に支配されていることが想像され、本筋の収縮弛緩も上記二種の物質のほかに、他の物質によって制御されている可能性が考えられる。特に、収縮を増強する神経伝達物質やホルモンによる筋制御は、すでに若干の筋で明らかにされており、本筋においても、収縮増強神経伝達物質やホルモンによる制御の存在が想像される。そこで、本筋の収縮に対する生体アミン類及び軟体動物

神経ペプチドであるフマーファミドの効果を調べた。

生体アミン類のセロトニン、ドパミン、オクトパミン、ノルアドレナリンは、いずれも収縮を増強したが、オクトパミンの効果が最大で、閾値は 10^{-9} M 以下であった。オクトパミンの収縮増強効果はフェントラミンによって完全に遮断された。筋に短いパルスの電気刺激を反復的に与えて、筋組織中の神経を刺激すると、次の刺激に対する収縮が大きくなることが知られているが、このような前置反復電気刺激の後置刺激（電気刺激やアセチルコリン刺激）による収縮に対する増強作用はフェントラミンによって完全に遮断された。これらの結果は、本筋がオクトパミン性収縮増強神経によって支配されていることを示唆している。実際、Catapane（私信）は本動物の神経系にオクトパミンが存在することをみている。

ドパミンは、まえもって筋に作用させておくと、筋収縮を増強するが、収縮惹起刺激と同時に与えると収縮を抑制する。ウァバイン存在下ではこのようなドパミンによる収縮抑制はみられない。ドパミンは本筋の筋細胞膜を過分極させ、この過分極はウァバインによって遮断される。本筋を支配する神経を刺激すると、筋から外液中にドパミンが放出されることが知られており、したがってドパミンは本筋における抑制性伝達物質かもしれない。

フマーファミドも収縮を著しく増強する。このペプチドは軟体動物の神経系に一般に存在すると考えられており、本筋に対しては収縮増強ホルモンとして働いている可能性が考えられる。

以上、ムラサキイガイ足糸前牽引筋は、コリン性興奮神経、セロトニン性弛緩神経の他に、オクトパミン性収縮増強神経、ドパミン性抑制神経によっても支配されている可能性があり、さらに、神経ホルモンのフマーファミドによっても収縮増強的に支配されている可能性が考えられる。今後更に検討すると共に、もしこのような複雑な機構の存在が事実ならば、その存在の個体における意義を明らかにする必要があろう。

単一視細胞の応答および膜特性について

(1982. 7. 30)

P. Macleish (Harvard Univ.)

最近、我々によってタンパク質分解酵素を適用することにより網膜の種々の細胞を単離し、それに硝子微小電極を刺入して電気生理学的実験を行う事が可能になった。従来、網膜中で視細胞および水平細胞は相互に電気的結合を有する為に細胞全体を同一の電位に保つ事が困難で膜特性の解析に無理があった。もし生体中にある場合の性質を良く保存したまま単一視細胞を取り出し実験できるなら直視下で電極の刺入部位を選べる上に、上述の電位固定法の適用条件も改善されるわけである。ここで紹介する研究は比較的大きな網膜細胞を有する tiger salamander の視細胞杆体を用いて行われたものである。視細胞の光応答の特性を詳しく知ることは光受容の基礎過程を知る上で重要なことであるがそのためには光および電圧—時間依存性の conductance と ionic current の同定が必要でありその目的には膜電位固定法が最も適している。実験の結果、我々の標本はこの条件を十分満足させるものであることが示された。単離細胞は以下に述べるような方法で得られた。まず動物は10 時間以上暗順応し、その後 decapitation を行い眼球杯標本を作る。それをタンパク分解酵素 (papain) を含んだ Ringer 中で 37 °C, 30 分振盪する。次いで網膜を Hank solution に移し Rinse した後、網膜を硝子ピペットを用いて潰し視細胞の懸濁液を作る。実験に際してはその一部を取り Agarose を含む Ringer 中に入れるか polystylen coated cover slip 上に載せて不動化し電極の刺入を行う。単離された視細胞は incubator 中に置いて数日間保存が可能である。なお、標本作成および実験は光刺激を除き可視光を与えず全て赤外光の下で image converter を用いて行われた。単離された視細胞は電子顕微鏡を用いた形態学的検討から網膜中にある場合の標本との間に差のないことが認められた。即ち細胞内の構造は良く保存され、膜にも損傷が認められなかった。細胞の膜特性を電気生理学的に調べるために膜電位固定法および定電流通電法を適用したが、それには一本の電極を用いて時分割で通電と記録を行えるような装置を用いた。又、必要に応じて複数の電極を使用して同法を適用した。なお、外節と内節に電極を刺入して検討した結果、単離杆体では通電効果は両部分に全く等しく現われ等電位が達成されている事は疑いない。単離杆体は通常、 -45 ± 5 mV の暗時膜電位を持ち外節と内節の間で差異を認めなかった。光刺激に対する最大応答振幅は 20 mV 以上あり、応答の動作範囲は $25-30 \log \text{ unit}$ に亘っていた。以上の特性について生体にある場合と較べ特異的な差異は認められなかった。しかし乍ら暗時の膜抵抗は $300-400 \text{ M}\Omega$ あり網膜中にある場合より数倍高くこれは細胞が単離され電気的結合が decoupling されて実効抵抗値が増大したためと考えられた。また光照射時に膜抵抗は増大し $1000 \text{ M}\Omega$ になった。定電流通電および電流は共に $0-+10 \text{ mV}$ にあることが多数例について示され又外節と内節で差がなかった。又、暗時、光照射時共に膜電位が

-60 mV 以上および +10 mV 以上で顕著な内向きおよび外向きの整流特性の現われることが観察され、それらは TEA, Cs^+ , 4-AP および D-600 の mixture を適用することによりほぼ阻止された。一方、通常の光応答と膜電位固定時の光応答との比較において特徴的な事柄として光応答電位では刺激強度が強い場合に著明な on initial transient がみられるのに対し光応答電流にはそれが全く認められないことが挙げられる。

上述の drug mixture の存在下では暗時および光照射時共に膜電位変化に対する膜電流変化が電位依存性であるが全く時間依存性を示さない。従って、photo-transduction 機構によって直接に起こるイオン流の変化よりも二次的におこりかつ drug mixture によって抑制される残与のイオン流が上述の応答波形の差に関与している可能性が考えられた。

実際に非常に強い光を与えておいて残与電流のみの性質を調べると膜電位を光応答と同じ方向（過分極）に変化させると膜電位を脱分極させる方向に時間の経過と共に増大する電流が認められ、これが光刺激に対する電位応答と電流応答の差異を説明するものと結論された。

（ 田 内 雅 規 ）

チャネルの概念と実体

電気ウナギ電気器官の Na チャネルに対するホトアフィニティーラベル

上原 政治 植村 慶一(埼玉医大)

神経における興奮発生機構の薬理学的研究

瀬山 一正(広島大・医)

ザリガニ巨大神経の非対称容量性電流

村山 公一(滋賀医大)

培養細胞における Na チャネル, Ca チャネルと細胞内骨格

福田 潤 亀山正樹 山口和彦(東大・医)

興奮性膜と細胞骨格との相互作用

寺川 進(生理研)

マイクロチューブルと神経興奮

松本 元 室伏 擴^{*} 酒井彦一^{*}(電総研, 東大・理)^{*}

高浸透圧溶液中および 0°C 以下でのイカ巨大神経の興奮

久木田文夫(生理研)

Na および Anomalous K 単位電流について

福島 泰夫(東大脳研)

イカ巨大神経膜の K チャネル不活性化と K チャネルスパイク発生機構

井上 勲(徳島大・医)

ヒトデ卵における異常整流 channel について——最近の研究より

吉井 光信(日本医大)

Ca チャネルを通過する 2 価陽イオンと, チャネルにおけるイオン間の競合作用

赤池 紀扶(熊本大・医)

概 要

チャネルの概念と実体(56. 7. 30 ~ 31)

松本 元(電子技術総合研究所)
寺川 進(生理研)

生体興奮膜でのイオンの選択透過を行うチャネルとその制御機構に関する概念を明確にするとともに, その実体に関する最近の研究を討論することを目的とした。まず, Na チャネルに関し

討議を行った。Naチャンネル蛋白の分子量が、AgnewとRaftery等の主張する260Kとは大幅に異なり、140Kのものではないかという実験があった。TTXの光活性誘導体による研究であるので、Agnewらと手法も異なる。Naチャンネル蛋白は神経興奮の実体を明らかにする上で最も重要なものの一つであるので、真偽の結着が気にかかる。単一Naチャンネルからの離散的Naイオン電流が検出され、Hodgkin-Huxleyの式との現象論的対応が美事であった。Naゲートに対するGTXおよびその誘導体の構造と薬理活性の相関の研究から、NaチャンネルのGTX受容部の構造の提案があった。Naゲートについては、さらにゲート電流測定からの研究が強力な武器になると思われる実験の紹介があった。国内でゲート電流に本格的に取り組んでいるグループからの発表であった。今後も是非大いに頑張ってもらいたい。次に、Kチャンネルに関し討議を行った。Kチャンネルの異常整流機構の最近の研究の詳しい紹介のあと、単一Kチャンネルからの離散的K電流の検出の成功が伝えられた。離散的なK電流を何度か重ね合わせるとマクロなK電流と良く一致することも実験的に証明され、チャンネルにエルゴード性が成り立つことが示された。また、Hodgkin-Huxleyの式との対応もすばらしいものである。Kチャンネルを通して内向きに流れるCa電流の性質と膜電位発生機構およびCaチャンネルの最近の研究も紹介された。最後に、低温（ -20°C ）でのチャンネルの性質および細胞骨格のチャンネルに対する役割の討議があった。細胞骨格がリーク電流を制御し、文字通り細胞骨格としての役割を果たしているのは疑いのないところとなったが、さらにNa、K電流に対しても何らかの役割を果たしているかどうかは今後の課題である。

電気ウナギ電気器官のNaチャンネルに対する ホトアフィニティーラベル

上原 政治・植村 慶一
(埼玉医大・第一生理)

テトロドトキシン(TTX)のアジド誘導体である2-nitro-4-azidephenyl-B $\cdot$ alanine-TTX(NAP-B $\cdot$ alanine-TTX)は光照射によってNaチャンネルのTTX結合部位に不可逆的に結合することが報告されているが、研究例は非常に少ない。我々はこのligandを合成して、電気ウナギ電気器官の形質膜を用いて、Naチャンネル構成タンパクの同定を試みた。現在までに以下の成果が得られている。

- (1) 未標識のligandは ^3H -TTX結合を暗所では可逆的に、光照射によって不可逆的に抑制した。
- (2) ^3H -NAP-B $\cdot$ alanine-TTXを光照射によって形質膜にラベルすると、M. W. 100,000(SDS存在下で測定)~140,000のタンパクが特異的にラベルされていた。

神経における興奮制御機構の薬理学的研究

瀬山 一正（広島大・医・第一生理）

ツツジ科植物より抽出した Grayanotoxin (GTX) は Na 依存性興奮性細胞に作用し特異的に Na イオンに対する膜透過性を高める。GTX の特徴的な薬理作用は興奮に伴うチャンネルの開閉機構の研究に有力な薬理的道具となりうる。GTX の Na チャンネルへの作用機序についてはイカ巨大神経で細胞内灌流法と膜電位固定法を用いて下記の事柄を明らかにした。1) イカ巨大神経の静止膜の Na に対する透過性を約 90 倍高める。2) TTX は特異的に GTX 作用を抑制する。その際の解離定数は $3 \times 10^{-8} \text{ M}$ であった。3) Na チャンネルの開閉機構の $m\infty$ -膜電位関係及び $h\infty$ -膜電位関係を各々 28 mV 及び 16 mV だけ過分極方向に移動させる。4) 更に GTX 濃度を上昇せしめると、不活性化過程を伴わないチャンネルへと変化する。5) Na チャンネルのイオン選択性は影響を受けないが、4) で述べた改変された Na チャンネルのイオン選択性は $\text{Hydroxylamine} > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ \simeq \text{Li}^+ > \text{Foramidine} > \text{Methylamine}$ となり著しい変化があった。以上の結果は GTX が Na チャンネルに作用し持続的解放状態を作り出す事が解った。この様に Na チャンネルへの作用機序の明らかな GTX を薬理学的道具として開発するためには GTX 分子内の生物作用発現に必須な基を決定し GTX の化学修飾の可能性を検討しなければならない。この目的のために α -dihydro-GTX II を母体として 34 種の GTX 誘導体を作り構造-活性相関が調べられた。その結果、1) 3β -OH もしくは 2β , 3β -OHide 基, 5β -OH 基, 6β -OH 基そして 10β -methy 1 基が必須である事が解った。これらの基の立体的配置は極めて厳密なものであった。2) 分子の有する疎水性と親水性のバランスが必要であった。蛙骨格筋においては 5 つの OH 基を有する GTX 分子が最も生物活性が高かった。3) GTX における必須な基の空間配置を Batrachotoxin, Veratridine, Aconitine と比較したところこれらの Toxin 中にも分子内に同様な基が良く似た配置をしている事が解った。これらの結果を踏まえて GTX の薬理学的道具としての可能性について検討した。

ザリガニ巨大神経の非対称容量性電流

村田 公一（滋賀医大・第二生理）

非対称容量性電流 (I_s), また gating current とか asymmetrical displacement current とも呼ばれている電流は、チャンネルのゲート開閉に関係した極性基の動きを反映する容

量性電流と考えられている。即ち、興奮性膜のコンダクタンスの変化は、特徴として膜電位依存性であることから、脱分極によるコンダクタンスの増大は、チャネルのゲートを構成している分子の極性基が膜中の電位勾配に従って移動し、チャネルを開くように配向する結果であろう。その極性基が配向を変えれば、容量性電流が流れる筈であるので、この容量性電流を記録、解析することによって、チャネルのゲート開閉の分子機構を解明する手掛かりを得ることができると考えられる。Hodgkin & Huxley(1952)の仮説に従うと、 m 、 h および n 粒子の動きはすべて膜電位依存性であることから、各粒子の動きを反映する独立した3種類の I_s が得られ、その各々が g_{Na-ON} 、 g_{Na-OFF} および g_K-ON に対応する筈である。 I_s の研究はこの仮説を基礎とし、その正当性の再検討、さらにチャネル開閉の分子機構に対する解答を与えるであろうという考えのもとに行なわれている。吾々は、1) 今まで検討されていないザリガニ巨大神経より I_s を記録、解析し、その特質をイカその他の I_s と比較検討し、さらに、2) I_s の活性化と不活性化は、独立した過程なのか連続した過程なのかを検討し、以下の結果を得た。

1) ザリガニ巨大神経では、非常に緩やかな g_{Na} の不活性過程が顕著である。この現象と直接関係するか否か今のところ明らかではないが、十分長い時間膜を過分極にholdしないと、大きな I_s は記録できない。2) 脱分極テストパルスのONおよびOFFに対し、Naチャネルのopeningを反映する I_s-ON およびclosingを反映する I_s-OFF が得られた。すべての脱分極テストパルスに対し、 I_s-ON は外向き、 I_s-OFF は内向きであった。この結果はこの電流が容量性電流であることを示す。下降相に関しては、 I_s-ON は2成分よりなり、 I_s-OFF は1成分であった。3) I_s をもたらす電荷の移動量(Q)は、 I_s の積分から求めることができる。 $Q-ON$ は、テストパルスの膜電位に対しS字状に増加し、約40mVでほぼ飽和し、最大値 $24nQ/cm^2$ に達した。このように大きな膜電位で Q が飽和するということも、 I_s のcriteriaの一つである。4) I_s 下降相の遅い成分が g_{Na} の不活性過程に対応する h の動きによるのか否かは、現在のところ明らかでない。5) 一方、ザリガニ神経でも、ゲート開閉の電荷の移動がimmobilizeされることが確認された。immobilizationは速い相と緩やかな相の2種類が認められた。6) 種々の長さのテストパルスに対する $Q-OFF/Q-ON$ を求め、速い相のimmobilizationを検討すると、 $Q-OFF/Q-ON$ は時定数1.7msで減少し、最終的に2/3の電荷がimmobilizeされた。このimmobilizationの時間経過は速い g_{Na} の不活性過程のそれによく対応することから、Naチャネルの速い不活性過程の実態はゲート電荷のimmobilizationによるという考えを支持する。7) 緩やかなimmobilizationの時間経過は緩やかな g_{Na} の不活性過程のそれにあまりよく対応しない。

培養細胞における Na チャネル,
Ca チャネルと細胞内骨格

福田 潤・亀山 正樹・山口 和彦^{*}
(東京大・医・第一生理学教室)
(^{*} 生理研)

細胞膜に分布している Na チャネルと Ca チャネルが, 細胞内骨格線維とどのような関係にあるかを調べる目的で, 成熟モルモットより分離した, 脊髄神経節細胞を培養し (Fukuda, J. and Kameyama, M. *Nature* 279, 546, 1979), 次いで, 細胞内骨格線維群のうち microfilament あるいは microtubules を特異的に破壊する薬物とともに細胞を培養した。このようにして生ずる細胞の形態的变化を, 倒立位相差顕微鏡を用いて観察するとともに, ガラス管微小電極を細胞内に刺入して, 細胞膜の生理学的性質を調べた。microtubules 破壊に用いた薬物は colchicine (2×10^{-8} M), vinblastine (10^{-8} M), vincristine (10^{-8} M), colcemide (2×10^{-8} M) であり, コントロールとして, lumicolchicine (10^{-7} M; コルヒチンを紫外線照射によって非活性化したもの)を用いた。これらの薬物の細胞内濃度は, 少なくともこの濃度の 1/10 以下であると考えられる。microfilaments を破壊する薬物として, cytochalasin B, dihydrocytochalasin B, cytochalasin D を用いた。

Vinka-alkaloid で microtubules を壊すと, それに起因する形態変化をとともうとともに, Ca スパイクの Maximum rate of rise が大きく減少する。しかし, 静止膜電位や膜抵抗に著明な変化は生じない。更に, Na スパイクの MRR にも, 膜電位依存性にも変化は生じなかった。cytochalasin B 等で microfilament を破壊すると, 形態的变化とともに Na スパイクに特有の変化が生じ, Na チャネルの数が減少したと考えられるが, Ca チャネルに著明な変化は生じなかった。又, 静止膜電位や, 膜抵抗にも変化は認められなかった。

このことから, Na チャネルの分子はマイクロフィラメントと密接な関係があるが, マイクロチューブルスとは関係がうすいと結論出来る。松本らは, イカの巨大神経で我々と反対の結論を得ているが, 濃度や作用時間を考えると, コルヒチンによって膜が受ける非特異的影響である可能性が強い。

Fukuda, J., Kameyama, M. and Yamaguchi, K. *Nature* 294, 82-85, 1981.

Fukuda, J. and Kameyama, M. *Physiology of Excitable Membrane, Advance in Physiological Sciences*. Volume 4, 1980.

Fukada, J., Henkart, M. P., Fishbach, G. D. and Smith, T. G. *Develop. Biol.* 49, 395 (1976)

興奮性膜と細胞骨格との相互作用

寺川 進 (生理研)

イカの巨大神経線維において、KFを含んだ溶液で細胞内灌流をし、灌流液中に溶出してくる蛋白の量とその種類について調べた。灌流液中の蛋白はBolton - Hunter 試薬で放射化標識し、TGAで沈澱分離して定量、二次元電気泳動法に銀染色法を用い同定した。これによると、40分以上灌流したあとに得られる灌流液には殆んど蛋白が含まれなくなるが、その後、電気刺激や化学刺激によって繰り返し型興奮を起させると、100ng程度の蛋白が灌流液に流出してくる。その分子量は、12,000以下の小さなものと、43,000, 55,000, 68,000, 180,000 daltonのものを含み、成分はアクチン、 α , β -チューブリン、ニューロフィラメントプロテインを含んでいた。テトロドトキシンを細胞外から作用させても同様の溶出蛋白の増加が認められた。これらの蛋白の溶出源は、走査型電子顕微鏡による観察から、興奮膜の原形質側を蓋っている線維性の蛋白であることが判明した。膜の興奮は一種の情報として細胞内に伝わり線維性蛋白の重合状態を変える働きをしている。

一方、灌流液としてKClやKBrを主に含んだ溶液を用いると、細胞内圧が興奮性に著しい影響を与えるようになる。すなわち、膜は引き伸しの外力に弱くなる。しかし、細胞内圧を注意深く除くようにすると興奮性は長く維持される。このような神経の細胞内面を走査電顕下に調べてみると、通常、膜内面を蓋っている線維性の構造が広範囲にわたってきれいに消失しているのがわかる。逆に、細胞内圧をかけずに膜内面をKClやKBrを含む溶液で十分に処理し、線維構造が失われたと考えられる時間の後に細胞内圧をわずかに(1 cm H₂O)上げると、殆んど瞬時にして興奮性は失われてしまう。以上のようなことから、線維性の蛋白は膜に結合し、膜の力学的支持体としての役割を担っていることがわかる。

マイクロチューブルと神経興奮

松本 元・室伏 擴・酒井 彦一
(電総研 東大・理)*

細胞骨格構造の微小管が神経興奮とどのようにかわり合っているかの実験研究の総説を行った。実験はヤリイカ巨大軸索を用いて行った。電気生理実験研究に用いたヤリイカは短期間(2ヶ月間迄)実験室小型(発面積1.68m², 深さ1m)水槽中で飼育¹⁾したものである。

(1) 軸索よりローラーによって原形質を抽出し、しごき出した原形質と軸索中に残された原形質由来成分に夫々含まれる蛋白分子量の同定をSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定した。²⁾この結果、しごき出した原形質中に含まれる総蛋白量の約30%は微小管の構成素材であるチューブリンで、軸索側の成分には大量の300K蛋白(分子量約300,000)が含まれていた。

(2) 軸索断面の電子顕微鏡観察によると、微小管は軸索膜近傍で最も密度が高く(約100本/ $(\mu\text{m})^2$)、軸索膜より離れるにつれ減少する(5 μm 離れたところで約30本/ $(\mu\text{m})^2$)。³⁾従来ヤリイカ巨大軸索中で微小管が電子顕微鏡観察されないのは固定のアーティファクトであろう。1mMコルヒチンで数分灌流し大幅に神経興奮能を失わせたものでは、微小管の密度は大幅に減少している。

(3) 神経興奮能維持を好適にする条件と微小管重合の為の条件は良く符号する。^{2,4)}とくに陰イオン順序($\text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$)、Fとグルタメートの陰イオン濃度、2価陽イオン種(Ca^{2+} , Mn^{2+})SH修飾剤や分裂阻害剤の影響などが両者で一致した。

(4) 一度興奮能を大幅に低下させた軸索での神経興奮能の回復^{5,6)}。微小管重合の為の材料(チューブリン, MAPS)生化学的条件(Mg^{2+} , GTP)の他に、チューブリン・チロシン・リガーゼとこのリガーゼを活性化する為の生化学条件などを満足すると、活動電位・静止電位・閾値などに大幅な回復をみた。

(5) 分裂阻害剤(コルヒチン・ポドフィロトキシン・ビンブラスチンなど)の軸索生理機能に対する効果を電位固定法で調べた。^{7,8)}その結果、(1) ^6Na , ^8K を大幅に減少させる。(2)リーク電流を増加させる。(3)Naゲートmの電圧依存性を弱める。(4)Kゲートnの電圧依存性を脱分極方向に移動させる。(5)Na不活性化ゲートhにはまったく無影響。

(6) 興奮機能を回復させる試みを上記(4)と似た条件で行ったところリーク電流を大幅に回復、Na電流回復の徴候があった。この点は今後の課題である。⁹⁾

以上によって、軸索内微小管はリーク電流を制御するという静的な役割がある(細胞骨格としての本来の役割)とともに、Na・K電流ともかわりがあるという動的な役割にも参画している可能性を示した。後者については今後明白にしてゆきたい。

文献) 文献(1)~(9)はすべて我々のグループのもので最も新しい次文献にすべて含まれる:

Matsumoto et al., 1981 Woods Hole Seminar

高浸透圧溶液中および0℃以下でのイカ巨大神経の興奮

久木田文夫(生理研)

細胞内灌流したヤリイカの巨大神経線維を用いると、細胞内外液の浸透圧を変化させ、一定値に

保っておくことができる。この際、細胞内外溶液の浸透圧を一致させておくと、細胞膜を通る水の浸透圧流を無くすとともに、神経線維の興奮性を長時間保つことができる。このような条件下では、浸透圧を上げるために加えた非電解質の効果が観察できる。神経興奮の時間経過の時定数や膜抵抗は非電解質により溶液の微視的な粘性の増加にともなって増加するが、活動電位のピークの電位や Na 電位は殆んど変化しないため、イオンチャネルの開閉機構が影響を受けていると考えられる。

高浸透溶液中で神経興奮は通常の等浸透圧溶液中での神経興奮と全く同様な性質をもっており、かつ長時間安定に測定できる。このため、グリセリンによる高浸透圧溶液の不凍性を利用し、0℃以下の低温で電気生理学的な測定を行うことが可能になった。その結果、-19℃までの低温で神経線維は興奮の伝導を行なうこと、Na チャネル、K チャネルの開閉の時定数やコンダクタンスは0℃以下の低温でも、転移様の急激な変化を示さないこと、Na チャネルと K チャネルの開閉の時定数の温度変化は異なることが明らかになった。

低温での神経興奮は非電解質の効果と低温の効果とにより、常温での体液中の神経興奮の3桁程度 緩やかな時間経過をもっている。そのため時間分解能を高めることが現実には無かしい、種々の電気生理学的及び、分光学的測定への適用が期待できる。

Na および Anomalous K 単位電流について

福島 泰夫（東大医・脳研）

従来より、ホヤ未受精卵には卵を脱分極させた時に内向きに流れる Na 電流、過分極させた時に内向きに流れる Anomalous K 電流の存在が知られている。近年 Ach receptor において Neher らが用いた Patch recording の方法によって Na 及び Anomalous K 単位電流を記録した。二本のガラス電極を刺入して卵細胞全体を voltage clamp した後、第三の電極を卵細胞表面に押付けて膜の微少部位を通して流れる電流を current voltage converter で記録した。

Na 電流においては、patch pipette の中に 600mM Na, 1.5mM Mn からなる溶液をつめ、卵全体に -120mV の holding level から 170msec の脱分極パルスを加えた。その時 patch 電極から一定電位ではほぼ一定振幅のパルス状の電流変化が観察された。このパルス状の電流の振幅は膜電位に対してほぼ linear な変化を示し、その reversal level を推定するとそれは卵全体での Na 電流のものとよく一致した。またこのパルス状の電流の積分値、すなわち電荷移動量の膜電位に対する関係は、卵全体での Na 電流が示すものと同様な関係を示した。さらにパルス状の電流の時間特性を調べるために latency, open time, closed time を測定したが、これらの時間分布は Hodgkin - Huxley の model から期待されるものとよく一致した。

Anomalous K 電流の場合は, patch pipette の中には Na と K または Cs と K からなる溶液をつめ, -10mV の holding level から 150 または 900msec の過分極パルスを加えた。Patch 電極からは過分極が大きいほど open-close の変化が早いパルス状の電流が記録された。200mM Na, 100mM K からなる溶液で, 150msec のパルスを加えた時に最初に channel の開いていた時間を open time として, すぐそれに続いて閉じていた時間を closed time として測定した。この時 open state と closed state の first order transition を仮定しその opening 及び closing の rate constant を卵全体での anomalous K 電流より求めた。その rate constant を用いて計算した open time と closed time の期待値と patch 電流から実測したものはよく一致した。また 900msec と長い command pulse を用いて測定できるすべての open time と closed time を, 200mM Na, 200mM K または $10\mu\text{M}$ Cs, 200mM K の溶液において測定した。その分布は時間に対して exponential な減衰を示し, その時定数は open time においては膜電位に対して急激な変化を示すのに対して, closed time においてはわずかな膜電位依存性しか見られなかった。また Cs 溶液での Kinetics は Na 溶液でのものに比して 10 倍早かった。この patch 電流で推定された opening および closing の rate constant から計算される卵全体での電流の時定数は実際に測定されたものとよく一致した。

以上のようにホヤ未受精卵を用いて Na および Anomalous K 電流には単位電流の存在することが示された。

イカ巨大神経膜の K チャンネル不活性化と K チャンネルスパイク発生機構

井上 勲 (徳島大・医)

細胞内灌流下で, 内外の塩組成を適当に選ぶことにより, イカ巨大神経膜の K チャンネルの平衡電位を細胞内-正にすることができる。このような条件では, K チャンネルを流れる内向き, 外向き電流が記録される。この電流には電圧依存性の活性化-不活性化が認められ, 不活性化には, 少くとも 2 つの過程, すなわち, 比較的速い過程 ($\tau = \sim 100\text{ms}$) と, ゆっくりした過程 ($\tau = \sim 10\text{s}$) が含まれている。この不活性化は, K コンダクタンスの時間変化にほぼ一致する。

ヒトデ卵における異常整流 channel について

— 最近の研究より —

吉井 光信 (日本医大・第二生理)

ヒトデ未成熟卵における静止膜電位は、細胞内外の K イオンに対する平衡電位(V_k)とはほぼ完全に一致する。この静止膜コンダクタンスを担っているのが異常整流 K^+ channelであり、最初にKatz (1949)がカエル twitch muscle で発見したものと本質的に同一のものであることが、Hagiwara を中心とする UCLA グループにより明らかにされた。膜系が極めて単純で膜電位固定法において骨格筋よりも遥かに有利な卵細胞の利点を生かして、この異常整流 channel の定量的解析が1974年以来Hagiwara グループで重点的に行なわれてきている。

これ迄の研究で明らかにされた異常整流の特性のうち、次の点がこの channel を特異的なものにしてしている。細胞外 K^+ 濃度 $[K^+]_o$ を変えた時、 K コンダクタンス—電圧曲線が K^+ 平衡電位(V_k)の移動に従って移動する、ということである。即ち、異常整流 channel の gating は、膜電位(V)そのものに依存するのではなく、 $\Delta V = V - V_k$ に依存するということである。この ΔV 依存性を説明するため、Armstrong (1975) や Ciani ら (1978) がいくつかのモデルを提唱している。細胞内灌流により、細胞内 K^+ 濃度 $[K^+]_i$ を変えて ΔV を移動させた時、もし $[K^+]_o$ が一定であれば gating は期待通りに ΔV ではなく V 依存性を示すかどうか、興味ある問題である。なお、この K コンダクタンス(G_k)は $\sqrt{[K^+]_o}$ に比例することが知られているが、Ciani のモデルでは、これは single channel コンダクタンスの特性を反映しているものとして扱われ、その論理的帰結として $G_k \propto \sqrt{[K^+]_i}$ も予測している。

今回のUCLA, Hagiwara 教室での研究 (1977-1980) で、我々はこれらの間に答えるべく、ヒトデ卵に対し細胞内灌流を行ない $[K^+]_i$ の効果を調べた。更に異常整流の特性が温度変化とともにどう変わるか、という点についても調べた。結果は次の通り。

- 1) $[K^+]_i$ の変化では、 $G_k - V$ 曲線は予想通り $V - V_k$ 依存ではなく V 依存である。
- 2) 予想通り $G_k \propto \sqrt{[K^+]_i}$ である。 $G_k \propto \sqrt{[K^+]_o}$ と合わせると、 $G_k \propto \sqrt{[K^+]_o \cdot [K^+]_i}$ 、即ち、 G_k は $[K^+]_i$ と $[K^+]_o$ との幾何平均となる。
- 3) G_k が活性化されるためには細胞内 Na が必要である。これは予測外の発見である。 $G_k \propto [Na^+]_i / \{KNa + [Na^+]_i\}$ と表わすことができ、この見かけ上の解離定数(KNa)の値は約35mMである。 Li にもこの効果が僅かながら存在する。
- 4) 異常整流の種々の特性は、 $10^\circ C$ 付近が transition となり低温閾で大きく変化する。 G_k の Q_{10} は、1.6より5.8に急激に増加し、 $3^\circ C$ 付近では $G_k \propto \sqrt{[K^+]_o}$ となり $[K^+]_o$ 依存性が低

下する。しかし、 ΔV 依存性は保持されている。

5) gating の活性化時定数の Q_{10} は、 10°C より高い時、膜電位依存となっている。

Ca チャネルを通過する2価陽イオンと チャネルにおけるイオン間の競合作用

赤池 紀扶 (熊本大・医・第2薬理)

マイマイ (*Helix aspersa*) から摘出した subesophageal ganglion より、神経節中最大の神経細胞 (直径約 $200\ \mu$) を吸引電極法にてその神経線維より分離し、電圧固定下に細胞内灌流を行なった。外液中の Na は Tris^+ で、又 K^+ は Cs^+ で置換し、細胞内灌流液中の K^+ も Cs^+ で置き換えて Na と K イオン電流を抑制し、Ca イオン電流を単離した。なお K イオン電流の完全抑制という意味において、外液に TEA および 4-aminopyridine を、又内液にも TEA を添加した。その後外液中の Ca を等モル濃度の Ba, Sr, Mn, Zn および Cd で、しかも Mg なしの状態で置換し、2 価陽イオン電流の研究を行なった。

外液が 10mM の 2 価陽イオンを含む時、その最大内向きイオン電流の大きさの順は $\text{Sr} > \text{Ba} > \text{Ca} > \text{Mn} > \text{Zn} > \text{Cd}$ となり、Co, Ni, Hg などは全く Mg と同じくイオン電流をはこばなかった。 25mM となると Ba と Sr がいれかわるが他の陽イオンの順位は変化しなかった。一般に Ba や Sr 電流は Ca 電流の約 2 倍であり、Mn や Zn は Ca 電流の約 $1/7$ から $1/10$ であった。Cd も一過性に非常にわずかの内向き電流を示したが、経時と共に細胞膜に不可逆的な破壊を与えた。なお、上記の 2 価陽イオンの最大ピーク内向き電流の発生する電位より推察されるところの、膜表面荷電に対する修飾効果は $\text{Mn} > \text{Zn} > \text{Ca} > \text{Ba} > \text{Sr}$ となった。

Ca イオン電流が細胞内灌流液中の Ca^{++} 濃度を上昇させることにより減少されるが、Mn イオン電流も細胞内の Mn^{++} 濃度を上昇させることにより time-dependent に抑制された。結果的には、Ca, Sr, Ba, Mn, Zn 全てのイオン電流が細胞内からの 2 価陽イオンの作用で減少することがわかった。なお 2 価陽イオン電流は外液からの Co, Ni によっても十分に抑制された。しかし、同一濃度の Co^{++} を外から与えた時抑制される 2 価イオン電流の抑制率は $\text{Sr} \geq \text{Ba} > \text{Ca} > \text{Mn} > \text{Zn}$ となり、crystal ionic radius の大きいイオンほどよく抑制されることが明らかになった。ほぼ同様な結果が Co^{++} の代りに有機抗 Ca 剤 diltiazem を与えた時も得られた。なお、diltiazem は Mn イオン電流に対しての細胞内からも効力をあらわした。

Ca, Ba と Sr イオン電流はその inactivation に 2 つの components (τ_{h1} と τ_{h2}) を有する。そしてそれは Ca イオン電流において特に著明に観察される。しかし Mn と Zn イオン電流は一つの τ_h のみを示す。

心臓の神経支配 — Reciprocal Control の再検討

(1981. 8. 10)

小泉 喜代美 (New York 州立大学)

自律神経系の一つの特徴といわれる “double innervation” 殊に心臓の神経支配に於ては reciprocal control が常に中枢を介しておこるものと考えられてきた。しかし, reciprocal control というものはすべての反応におこるものではなく中枢は selective に, ある場合には reciprocal, 他の場合には non-reciprocal な control をするものであるということがわかってきた。これを裏付ける仕事の一部をここで報告したい。麻酔した犬で交感神経及び迷走神経の心臓枝より同時記録を行うと baroreceptor reflex とそれに関連した種々の反応の場合には, きれいな reciprocal discharges がみられる。一方, chemoreceptor reflex の場合には両神経の活動が同時に強く高まり, いわゆる co-activation の現象がおこる。その他 chemoreceptor の活動が変化する場合——血中の O_2 , CO_2 , 張力の変化とか anoxia, asphyxia ——にも同じ現象がみられる。もう一つの例は, 心房の mechanoreceptor を刺激した場合である。こうした交感神経, 迷走神経両方の活動が増加した場合には, 心拍数の変化はそれぞれ相対する作用を示す両神経のバランスによって決まるものと考えられる。hypothalamus の種々の部位を低電流で直接刺激し, いわゆる “defense reaction” に伴う自律神経反応をおこさせた場合には全くきれいな reciprocal action がおこるが, 他の部位の刺激によって両心臓神経の co-activation もみられる。また, まれには co-depression をおこすこともできる。reciprocal control の機能的意義は理解し易い。しかし, non-reciprocal control の生理的重要性というものは何であろうか。これを理解する為に予め tape をとった交感・迷走神経の discharges を刺激の pulses にひかえて交感・迷走神経の心臓にゆく末梢端を同時刺激して cardiac output 及び筋の収縮度を測った。両方の神経活動が同時に高まると, 交感神経の作用により心拍の上昇及び心筋収縮が増大するが, 迷走神経活動も同時に上昇するため心拍数の上昇をある程度抑えることによって cardiac filling がふえ cardiac output が増加する場合がある。同じ条件の下に reciprocal control の pattern を刺激に使うとこの現象は見られない。以上のことから reciprocal control というのは主に血圧, 心拍を変化させるという時に efficient な反応であり, non-reciprocal control 殊に二つの神経の co-activation は, 心拍数の変化をより細かく control できると同時に cardiac output と変化させるのにより efficient な反応であろうといえる。そして異なった receptors からの inputs によって中枢というものはその場に応じて reciprocal, non-reciprocal な control をするもので, 常に stereotype な決まった変化を誘起するものでないといえよう。では中枢がどのような機序で, ある時は non-reciprocal な control をするものであるかということについてはよく研究されては

いないが、その一部について検討するつもりである。

Brain-gut peptide の局在, 化学構造と機能

(1981. 31 ~ 1981. 9. 2)

- | | |
|---|------------------|
| 脊髄における新しい神経ペプチドについて | 金沢一郎 (筑波大・神経内科) |
| 脊髄および交感神経節におけるペプチド性伝達物質 | 大塚正徳 (東京医歯大・薬理) |
| 視床下部 — 下垂体系および視床下部 — 自然系におけるペプチドの産生ニューロンの働き | 山下 博 (産業医大・生理) |
| 脳と膵の CCK receptor | 斉藤篤志 (北大獣医・生理) |
| CCK-PP axis に関する研究 | 馬場茂明 (神戸大・第二内科) |
| 分離壁細胞と paracrine, neurocrine | 松尾 裕 (東大・第三内科) |
| 爬虫類の口腔粘膜のパラニューロン | 小林 繁 (山梨医大・第一解剖) |
| 刺激 — 放出連関における電子伝達系の役割 | 菅野富夫 (北大獣医・生理) |
| 免疫活性ガストリン放出ペプチド | 矢内原昇 (生理研) |

中枢神経系と胃腸膵との両方に存在することが確かめられているペプチドは約 20 種ある。この知見は、主として免疫組織化学による各ペプチド含有細胞の同定と、標識免疫検定法による組織含有量の測定の結果に基づいている。最近では、各ペプチドホルモンを構成するアミノ酸残基の各部分に特異的に結合する特異抗体が作られ、ペプチドとそれを含む細胞の分析は一層精密になってきている。さらに末梢神経、腸管壁の神経叢、肺、下垂体などいろいろの器管や組織にも同種あるいは類似ペプチドが発見されてきている。脳・腸ペプチドの生化学とその含有細胞の形態学のめざましい進展に比し、その生理学は著しく遅れている。最近 brain-gut axis (脳・腸軸) という言葉が使われているが、この言葉にこめられている希いは、中枢神経系と消化器系とに共通するペプチド群が、互に何らかの相互関係をもって生体機能調節に重要な役割を担っているであろうということである。

ある。脳と腸とを結ぶ軸 axis として次のような様式が考えられる。1 これらの脳・腸ペプチドを化学的伝達物質とするニューロンあるいは神経分泌細胞が、中枢神経系からの遠心路として消化機能を調節している。この様式の研究は視床下部、脊髄、自律神経などで進められている。2 脳・腸ペプチドが中枢神経系の化学的伝達物質候補であって、消化機能とそれ以外の多様な生体機能を調節している。この様式の研究は、化学的伝達物質候補のオーソドックスな同定法にそって行われている。3 中枢神経系の一部から脳脊髄液中に一旦放出されてから他部に効果を現わす。この様式は脳内 CCK の作用様式の一部と想定されている。4 消化器系から中枢神経系への求心性情報伝達様式の第1は、胃腸腓ホルモンが求心性ニューロンに情報を伝え、求心性ニューロンを介して中枢機能に影響を与える様式である。この様式の研究も進められている。5 血液中に放出された胃腸腓ホルモンが、血液を介して中枢機能にホルモンとして効果を現わす。この様式を想定する際の問題点は血管・脳関門の存在である。しかし最近、血管、脳関門を一時的、機能的に開く方法が発表され、この方法を応用して我々（菅野富夫、斉藤篤志）は、最近、CCK-8 が血流を介してウシガエル脳のチトロクロームを還元方向に動かす証拠をえている。

本研究会では、脳・腸ペプチドに関する日本における研究の現況と今後の展望を2日半にわたって話しあわれた。この領域の研究発展にとって意義ある集会であったと信じている。

脊髄における新しい神経ペプチドについて

金澤一郎（筑波大・臨床医・神経内科）

脊髄にむけて上位中枢（大脳や脳幹）から下行してくる神経維群は、形態学、生理学的に十分な知識が集積している。一方、この重要な材能をもつ線維群の神経伝達物質についてはほとんど知られていなかった。そこで我々は、この線維群の変性に伴って、下部脊髄で減少する物質をスクリーニングし、伝達物質候補を見出す研究に着手した。アセチルコリン合成酵素活性には全く減少が認められなかったが、substance P は脊髄前角でのみ有意の減少を示しその候補の1つと考えられたので、ペプチド全般について検索することにした。

方 法

5匹のネコの第1—2頸髄の左側のみを完全に吸引除去し、1週間後に全頸髄を剥出した。第5—8頸髄の健側と手術側とを出発材料とし、Chang と Leeman の方法によりペプチドを抽出した。これをSephadex G—15 カラムにより分画し、図1の斜線で示した第Ⅲ分画を凍結乾燥した。これをセルロース TLC にて図2の如く分離し、ペプチドスポットをかきとり、水解後その量を健側と手術側で比較した。

結 果

図2に示す如く、第Ⅲ分画には5個のペプチドが認められたが、星印のスポットは常に認められるとは限らないので対象外とした。残り4つのペプチドスポットのうち、表1に示すようにNo.1スポットのみが手術側で約30%の有意な減少を示した。このペプチドは、ニンヒドリン反応陰性であり塩酸分解の結果 $\text{Asp}; \text{Glu} = 2:1$ であることがわかった。カルボシペプチダーゼによる分解の結果、アミノ酸配列は $x\text{-Asp-Asp-Glu}$ であることがわかり、さらに質量分析、核磁気共鳴分析は結果 x は β -ヒドロキシ酪酸であることを示唆していた。

本研究で、脊髄下行線維の変性に伴って下部脊髄で減少する新しいペプチドが見出された。このペプチドの構造はこれまでに類をみないユニークなものである。

図1

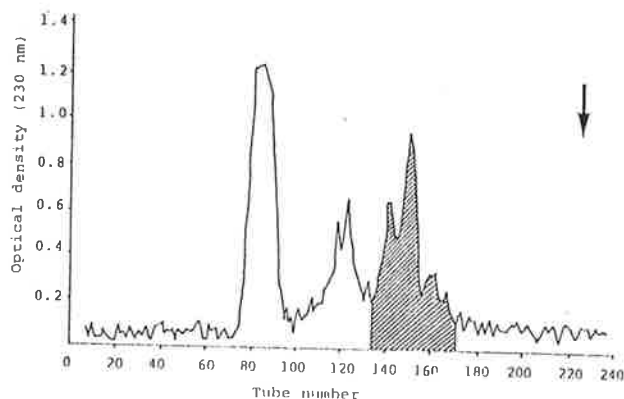


図2

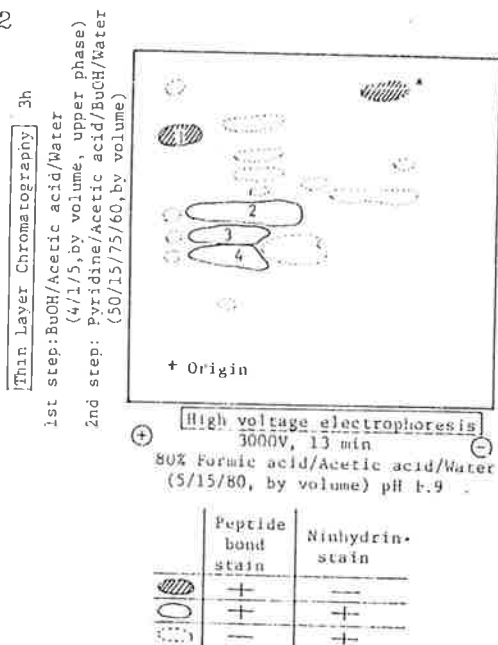


表1

Comparison of individual peptide contents between the operated side and the control side of the lower cervical spinal cord

Spot No.	O.D. ratio (after hydrolysis)	
1	0.71 ± 0.15 (5)	p<0.01
2	0.82 ± 0.11 (4)	n.s.
3	1.12 ± 0.07 (5)	n.s.
4	0.93 ± 0.19 (5)	n.s.

$$\text{O.D. ratio} = \frac{\text{O.D.}_{570} \text{ for operated side}}{\text{O.D.}_{570} \text{ for control side}}$$

Values are mean ± S.E.M. (numbers)

n.s.: not significant

脊髄および交感神経節におけるペプチド性伝達物質

大塚 正 徳 （東京医科歯科大・医・薬理）

ある種の神経ペプチドが化学伝達物質として働いているかどうか、という問いに対する答は、数年前まで必ずしも明快なものではなかった。しばしば「その答は伝達物質の定義による」などと言われた。しかし、ここ2、3年の進歩によって、いくつかのペプチドが伝達物質として機能していることは疑いないといつてよい状態になった。このような進歩の理由の一つは、末梢神経組織において、より明快な実験結果が得られるようになったことであり、他の一つは特異性の高い拮抗物質を用いて実験が行われたことである。これらの神経ペプチドとしてはLHRH様ペプチド(1)、substance P(SP), およびenkephalins を挙げることができるが、ここでは後二者について述べる。

〔1〕 Substance P

このペプチドは脊髄後角の一次知覚ニューロン神経終末中に濃縮されており、後根の電気刺激によって脊髄から放出される。またSPは脊髄ニューロンに対して強い興奮作用を示す。従って、このペプチドが脊髄において興奮性伝達物質の一つであることは確実と思われるが、SPがひきおこすシナプス電位(epsp)は中枢ニューロンではまだ記録されていない(2)。

しかし、最近温血動物の交感神経節においてSPがnoncholinergic slow epspの伝達物質であることが確実と考えられるようになった。すなわち、SPはモルモット下腸間膜動脈神経節中に高濃度に存在し、また高K液によってSPの放出が起こる。SPは神経節細胞の脱分極を起し、このSPの作用とnoncholinergic slow epspとは多くの点で類似している。さらにSPとnoncholinergic slow epspの伝達物質はともに同じ受容体に結合することが示唆された。またcapsaicinによってSPの枯渇が起った後にはnoncholinergic slow epspは消失するか、あるいは著しく抑制された(3)。

交感神経節における結果から考えて、SPは中枢ニューロンにおいてもslow epspをひき起こしていることが推定される。しかし、SPはこの他に時間経過の速いepspの伝達物質として働いている可能性も十分考えられる。

〔2〕 Enkephalins

下腸間膜動脈神経節の一部の神経終末中にはenkephalin様免疫活性が認められる。Met-enkephalin およびその誘導体はコリン作動性epspを抑制し、その機序はシナプス前性である。節前神経の刺激によってコリン作動性epspのシナプス前抑制が起こり、この抑制はnaloxoneによって特異的に遮断された。これらの結果からモルモット下腸間膜動脈神経節においてenkepha-

lins またはその類縁のペプチドガシナプス前抑制の伝達物質として機能していることが示唆される(3)。

文献 (1) Kuffler, S. W. (1980) J. Exp. Biol. 89, 257. (2) Otsuka, M. & Takahashi, T. (1977) Ann. Rev. Pharmacol. 17, 425. (3) Konishi, S., Tsunoo, A., Yanaihara, N. & Otsuka, M. (1980) Biomed. Res. 1, 528.

視床下部一下垂体系および視床下部一自律系 におけるペプチドの産生ニューロンの働き

山下 博, 河南 洋, 稲永清敏 (産医大・第一生理)

古くから知られている典型的な視床下部一下垂体路のペプチド産生ニューロンのシステムの研究は、ペプチドの研究にとり基本的なものの1つであろうと考えられる。ここでは、このシステムの典型的な働きである浸透圧受容と最近明らかになりつつある自律神経系の関与の可能性について報告したい。

最初に浸透圧受容性の研究については、現在浸透圧受容体の部位が問題点となっている。われわれはラット視床部の前額断スライス標本を用いて、視索上核(SON) および室旁核(PVN)ニューロンから細胞外記録を行った。これらのニューロンの放電パターンは放電頻度が低いことを除き *in vivo* で観察されている phasic と tonic 型が同様に観察された。高浸透圧刺激に対する反応は、調べた SON ニューロンの約 50% が促進で反応し、PVN では約 50% が抑制を示した。浸透圧の増加に対しては、促進されるニューロンでは放電は直線的に増加したが、抑制されるニューロンではステップ状に減少した。閾値は抑制・促進ともに $305 \sim 310 \text{ mosm/kg}$ であった。対照として調べた他の視床下部ニューロンでは約 20% のみが浸透圧刺激に反応した。

この結果は、浸透圧に反応するニューロンそれ自身が浸透圧受容あるいは感受性を持っているのか、他の受容器からの入力を受けているのかは不明である。 Ca^{++} free, high Mg^{++} 容液を用いて、シナプス入力を遮断したあと高浸透圧液で灌流するとニューロンの放電頻度が増加し、先に得られた浸透圧・放電曲線にはば一致することが観察された。

以上の結果より、視索上核ニューロンはそれ自身浸透圧感受性をもっていることが判明した。しかし、ニューロン自身がいわゆる浸透圧受容器であるのかどうかについては細胞内記録で検討中である。

次に最近室旁核から延髄背内側部および脊髄側角への連絡が解剖学的に報告されている。これらの部位は自律神経系に関連する部位として知られている。われわれはすでに循環系の圧・容積・化学受容器や自律系の変化を引き起こす筋の polymodal 受容器からの入力が、視索上核および室旁

核ニューロンに大きな影響をおよぼしていることを報告してきた。室旁核内で記録すると延髄背内側部から逆行性に反応するニューロンが観察された。室旁核より下垂体に軸索を送るものと、延髄に軸索を送るものの比率はほぼ1:1であり、139個のニューロンのうち2個はこの両方に軸索を送っていることがわかった。この延髄に軸索を送るニューロンのうちいくつかは、頸動脈圧受容器の刺激に反応した。しかしこの系の機能は不明であり、これらのニューロンの産生するペプチドが下降路でどのような働きをしているか現在検討中である。

脳 と 脾 の CCK receptor

斎藤 篤志 (北海道大・獣医・生理)

消化管から抽出され、長い間消化管ホルモンとされてきたCCKは、近年中枢神経系にも存在することが明らかになった。更に、大脳皮質細片を高K液中で孵置すると、外液Ca依存性にCCK様物質が放出されること、海馬のpyramidal cellは、CCK投与により脱分極と活動電位発生頻度増加を起こす。また、CCKの脳室内投与は、体温下降、摂取量低下、catalepsyの抑制などの種々の中枢作用を発現させることなどから、最近では、CCKはBrain-Gut Peptideという概念でとらえている。CCKが中枢において生理的意味をもつかどうかを知る上には、中枢神経系にCCKと特異的に結合するreceptorを証明する必要がある。しかし、1980年のSAITOらの報告まで、中枢神経系にCCKreceptorが存在することは、知られていなかった。以下に脳及び脾CCK receptorに関する我々の研究の概略を紹介する。

方法：Bolton-Hunter 試薬により 125 IをCCK88に結合させた物質、 125 I-BH-CCKを標識CCKとして使用した。ラットあるいはマウスの大脳皮質、海馬、尾状核、中脳、小脳、後脳、視床下部、嗅球及び脾から得られた粗膜標品が、CCKと結合させるための膜標品として使用された。膜標品と 125 I-BH-CCKは、非標識CCK8の存在下と非存在下で、24℃で60～120分間孵置後、膜標品に結合した 125 I-BH-CCKを測定することでCCK receptorの測定とした。

結果： 1. ラットとマウスの脳と脾には、CCKと特異的に結合するreceptorが、存在していた。特に、脳におけるreceptorは、大脳皮質、嗅球、尾状核及び視床下部に多く、小脳、中脳及び後脳には、ほとんど存在していなかった。この結果は、脳内におけるCCKの分布と一致するものであった。 2. 脳及び脾CCK receptorへのCCKの結

合は、急速かつ可逆的であった。 3. 脳及び膵 CCK receptor への CCK の結合を Scatchard plot により解析すると、脳の CCK receptor は一種類であった。(Kd : 1 ~ 2 nM, binding capacity : 100 fmoles / mg 蛋白)。膵では、二種類の CCK receptor が同定された。(Kd : 0.2 nM, binding capacity : 12 fmoles / mg 蛋白と Kd : 1 nM, binding capacity : 40 fmoles / mg 蛋白)。 4. 脳及び膵への CCK 結合は、pH 6.0 ~ 6.5 で最大で、それより低い pH と高い pH になるにつれて減少した。 5. ^{125}I -BH-CCK の脳及び膵への結合は、CCK の analogues で抑制された。CCK8 は、一番強力な抑制効果を示し、次いで CCK33, 脱硫 CCK8, CCK4 の順であった。しかし、脳における CCK4 の結合抑制効果は膵におけるそれよりも 100 ~ 1000 倍強力であった。 6. CCK 刺激による膵腺房細胞からのアミラーゼ放出と膵 CCK receptor への CCK 結合は、dibutyryl cyclic GMP (dbcGMP) で完全に抑制されるが、脳 CCK receptor への CCK の結合は、同じ濃度の dbcGMP で 50 % 抑制されるにとどまった。以上の結果、ラットとマウスの脳と膵には、CCK と特異的に結合する receptor が存在するが、両 CCK receptor 間には、以下の 3 点で性質を異にしていた。

1. 脳には一種類の、膵には二種の CCK receptor があるらしい。 2. 脳及び膵の CCK receptor は、CCK4 にたいする結合力に差がある。 3. 膵への CCK 結合は、1 mM dbcGMP で完全に抑制されるが脳への結合は、50 % 抑制されるだけだった。

- 1) Saito, A., Sankaran, H., Goldfine, I. D. and Williams, J. A. Science, 208, 1155-1156, 1980
- 2) Saito, A., Williams, J. A. and Goldfine, I. D. Nature, 289, 599-600, 1981
- 3) Saito, A., Goldfine, I. D. and Williams, J. A. J. Neurochem., 37, 483-490, 1981

CCK-PP axis に関する研究

馬場 茂明 (神戸大・医)

Gut hormone の研究が進み、gastrin, cholecystokinin (CCK), secretin, GIP 等の消化管ホルモンにインスリン分泌刺激作用を有することが示され、これらホルモンが entero-insular axis を形成する一つの因子であると考えられている。また、新たに発見された膵ホルモンである Pancreatic Polypeptide (PP) の分泌機構にも同様の axis の存在することが示され、膵ホルモン分泌における entero pancreatic axis の重要な一因子としての消化

管ホルモンの生理的意義が注目されている。しかしこれら消化管ホルモンのうちCCK については radio immunoassay の困難さや純化、合成品の入手困難さ、さらにはCCKの持つ分子多様性により、膵内外分泌機能への作用や膵ホルモン分泌調節機構の全容についてはまだ解明されていない。そこで、CCK合度C端各種フラグメントを用い膵内分泌機能への作用を観察し、CCK-C 端構造と膵ホルモン分泌刺激調節機構について検討を加えた。

方法および成績

雑種成犬(平均体重12 kg n=6)を対象に16時間絶食絶水後 sodium thiamylal 麻酔条件下でブタ合成CCK C端各種ペプチド(静岡薬大の矢内原教授により合成)を経静脈内に投与し、血糖、血漿PP、インスリン濃度を測定した。

I CCK-C 端構造と膵ホルモン分泌刺激作用 1) CCK C端フラグメントであるCCK-4,-5,-8,-10,-14 を、それぞれほぼ生理量と思われる65pmol/kg を5分間ずつ40分間隔で経静脈投与した。(図1) CCK-4,-5では明らかなPP並びにインスリン分泌を示さなかった。一方、CCK-8,-10,-14では、いずれも投与開始後5分で頂値となる著明な一峰性のPP並びにインスリン分泌反応を示し、それぞれの分泌量は各フラグメント間で有意差を認めなかった。次にCCK-4,-8,-14の投与量を、それぞれ1.8 pmol ~2352 pmol/kg まで段階的に増量し、投与後40分間に分泌されるPP分泌総量を検討した。(図2) CCK-4,-8,-14のいずれも容量反応的にPP分泌の増加を示したが、CCK-8,CCK-14では共に小量投与(1.8~10.8 pmol/kg)ですでに明らかなPP分泌を認めた。一方、CCK-4では大量投与(392pmol/kg)にて初めてPP分泌刺激作用を示し、その作用は等モルのCCK-8のそれと比べて約 $\frac{1}{8}$ であった。またインスリン分泌刺激作用においてもほぼ同様の成績であった。2) CCK-8のアナログであるCCK-8 [Nleu³], [Nleu⁶] [Nleu^{3,6}] (CCK C端より3番目と6番目に位置するMethionineの一方あるいは双方をNor leucinに置換したもの)、CCK-8OH (CCK C端部のphenylalanineの-NH₂基を-OH基に置換したもの)の4種類をそれぞれ392pmol/kg/5分、40分間隔で投与した。(図3) CCK-8OHでは、明らかなPP並びにインスリン分泌反応を認めなかったが、CCK-8 [Nleu^{3,6}], [Nleu³], [Nleu⁶]ではいずれもCCK-8とはほぼ同程度の著明なPP、並びにインスリン分泌反応を示し、それぞれのPP、インスリン分泌総量には有意差を認めなかった。なお、今回の検討で用いた麻酔薬(Sodium+thiamylal)や、CCK-C 端フラグメントの反復投与による、膵ホルモン(PP、インスリン)分泌反応への影響については、CCK-8を用いた検討ではほとんど影響を認めていない。

II CCK-8による膵ホルモン分泌刺激機構の解析。 1) 同量(392 pmol/kg)のCCK-8を単回投与、5分間、30分間持続投与し、投与方法による膵ホルモン分泌刺激作用について検討した。(図4) PP分泌反応は、単回投与や、5分間投与ではいずれも投与開始後5分で頂値となる一峰性の反応を示した。一方30分間投与では、投与開始後5分で頂値となり、以後投与中は

ば同値を維持する持続性の PP 分泌反応を示した。インスリン分泌反応は CCK-8 の投与方法による相違はみられず、いずれも投与開始後 5 分で頂値となる一峰性の反応を示した。 2) 生理食塩水、15%ブドウ糖、20%ブドウ糖を順次持続静注し、段階的に血糖を上昇せしめ、血糖レベルが一定化した時点で同量 (392 pmol/kg) の CCK-8 を 30 分間持続投与し、CCK-8 による膵ホルモン分泌を及ぼす血糖の影響について検討した。PP 分泌反応は血糖上昇に一致して客量反応的に分泌反応の低下を示したが、インスリン分泌反応は逆に分泌反応の増加傾向を示した。 3) 迷走神経幹切除術前、後 (4 週後) にそれぞれ 65.3 pmol/kg の CCK-8 を投与し、CCK-8 による膵ホルモン分泌刺激機構における迷走神経の役割について検討した。(図 5) PP 分泌反応 ←図 5 は迷切後著明に低下したが、インスリン分泌反応はむしろ増加傾向を示した。

結 論

- ① ほぼ生理量と思われる 10.8 pmol/kg 量の CCK-C 端フラグメント (CCK-8, -10, -14) ではほぼ同程度の明らかな膵ホルモン分泌を認めたことにより、CCK-8 が CCK の膵ホルモン分泌刺激最少生理活性単位であると考えられた。
- ② CCK-8 の膵ホルモン分泌刺激作用の発現には、従来より知られている CCK-C 端 7 番目に位置する Tyrosine の $-SO_3H$ 基以外に、C 端部の phenylalanine の $-NH_2$ 基が重要な役割を演じている。
- ③ CCK-8 による IRI 並びに PP 分泌は共に血糖依存性を示した。
- ④ CCK-8 による膵内分泌刺激伝達機構は、複数の伝達機構が存在していた。すなわち、IRI 分泌刺激は主として膵 B 細胞への直接作用であり、PP 分泌刺激は主として迷走神経を介して PP 細胞に伝達されるものと考えられた。

分離壁細胞と paracrine, neurorine

松 尾 裕 (東京大・医)

はじめに

胃酸分泌の調節機構には多数の因子が関与しており、最近では paracrine neurocrine のホルモンが胃酸分泌調節機構に関与するものと思われる。視床下部ペプチドとして発見されたソマトスタチンも paracrine 作用により胃酸分泌調節機構に関与していると考えられており、in vivo の実験では著明な胃酸分泌抑制作用が知られている。

しかし、in vivo の実験ではソマトスタチンによってガストリン分泌も著明に抑制されるので、ソマトスタチンの胃酸分泌抑制作用が壁細胞に対する直接的な作用なのか、あるいはガストリンな

ど胃酸分泌促進作用を有するホルモン分泌抑制を介する間接的な作用なのかを判定するのは困難である。paracrine のこれらの問題を解決するためには、壁細胞を分離し *in vitro* においてホルモンを生理的濃度で作用させ、その生理作用を推定することが可能である。われわれは今回、壁細胞を分離しその酸素消費量を測定することによって生理的胃酸分泌刺激剤であるアセチルコリン、ヒスタミン、ガストリンの作用を検討、さらにソマトスタチンの作用についても検討したので成績を報告する。

方 法

約 300 g の雄モルモットを用い、撲殺後胃を取り出し前庭部および膨隆部を切除して胃体部を残してその粘膜をカミソリにてかきとり、かきとった粘膜を dispase $2\text{mg}/\text{ml}$ collagenase $0.1\text{ mg}/\text{ml}$ を含む TCM-199 溶液にて 10, 30, 45, 45 分間 incubation を行なう。さらにこの間に、EDTA 1mM を含む Ca, Mg free 25 mM Hepes Krebs Ringer 液にて 10, 15 分と incubation を行なう。次に細胞浮遊液を 200, 400 の mesh で汙過し 10% BSA を含む TCM-199 溶液で洗浄し、最後に 0.1 mM Ca と 25 mM Hepes KRB 液にて細胞浮遊液として保存する。この方法で得られた細胞は Trypan-blue で調べた viability は 95% 以上あり、約 70% 壁細胞が得られた。これらの細胞を用いて酸素消費量を測定した。酸素消費量の測定には生物用酸素消費モニター (YSI 社 MODEL 53) を用いた。測定の方法は細胞浮遊液 $10^6\text{ cell}/\text{ml}$ を 4 ml 用いて 10 分間の酸素消費量を測定し、各刺激剤およびソマトスタチンの影響を検討した。

実験結果

control の細胞の酸素消費量を 100% として、histamine, carbachol, gastrin による酸素消費量の増加率をみると、histamine では 10^{-6} M で最大反応を示し、約 30% の増加がみられ $10^{-9}\text{ M} \sim 10^{-6}\text{ M}$ で dose response が認められた。Carbachol では最大反応が、 10^{-8} M で約 40% の増加がみられ、 $10^{-10}\text{ M} \sim 10^{-8}\text{ M}$ にて dose response が認められた。gastrin では最大反応が 10^{-9} M で約 30% の増加がみられ、 $10^{-12}\text{ M} \sim 10^{-8}\text{ M}$ の範囲で dose response が認められた。さらにこれら胃酸分泌刺激剤による酸素消費刺激効果に対してソマトスタチン 10^{-6} M は著明な抑制作用がみられ、それぞれ最大反応を生じる刺激剤の濃度による刺激作用を 50% 以下までに抑制した。また壁細胞の基礎消費量に対してもソマトスタチンは抑制作用が認められ、 10^{-10} M から抑制作用があり、 $10^{-8}\text{ M} \sim 10^{-6}\text{ M}$ では $20 \sim 30\%$ の抑制効果が認められた。

爬虫類の口腔粘膜のパラニューロン

内田 隆, 小林 繁 (山梨医大・第一解剖)

口腔粘膜にみられるパラニューロンとしては、味蕾の味細胞とメルケル細胞があげられるが、爬虫類のこれらのパラニューロンに対する形態学的研究はほとんどなされていない。そこで、カメ、トカゲ、ヘビの味蕾とメルケル細胞の存在部位、微細構造、モノアミンの局在について検索した。

味蕾はカメとトカゲでは舌と上下顎の歯列にそって口腔粘膜中にみられたが、ヘビでは舌にはなく、上下顎の口腔粘膜中のみ認められた。哺乳類の葉状乳頭や有郭乳頭に相当する構造は、爬虫類口腔には見い出されなかった。味蕾を構成している細胞は数種類あると考えられるが、味細胞の数は比較的少なく、味蕾の細胞の10%から15%であった。味細胞は大型の芯あり小胞を細胞質中に含むことと、神経終末との間にシナプスを形成していることにより他の細胞から区別される。芯あり小胞は細胞質全体に散在するが、特にゴルジ体周囲と細胞基底側に多くみられ、その大きさはカメで80 - 150 nm, トカゲでは60 - 90 nm, ヘビで70 - 130 nm であった。味細胞と神経終末との間のシナプスは、多くの場合味細胞側にのみ芯あり小胞と小型のシナプス小胞が集積していて、求心性のシナプスと考えられるが、時として神経終末側にもシナプス小胞の集積が認められ、中枢神経にみられる交叉性シナプスと類似しているものも考えられた。カメ味蕾では軸索-軸索間のシナプスがしばしばみられ、その一部は交叉性シナプスとみなされる構造をもっていた。

カメ味蕾のモノアミンの局在を蛍光組織化学により検討した。無処置及び5-HTP 投与例では味蕾内に蛍光を認めなかったが、L-DOPA 投与例の味蕾では、一部の味蕾細胞に弱い黄緑色の蛍光が観察された。電顕的には、L-DOPA 投与例の味細胞の芯あり小胞が増加しており、味蕾頂部の細胞質中には大きな分泌果粒様の構造が多数出現した。以上の結果から爬虫類の味細胞はL-DOPA を取り込み、これをモノアミンに転換する能力があると結論された。

メルケル細胞は触覚受容に関係すると考えられている。爬虫類口腔粘膜にも形態学的にメルケル細胞と同定される細胞がしばしば見られる。カメでは歯列内側の口腔粘膜上皮基底側に多数存在し、特有の指状突起を有し、細胞質中に多数の分泌果粒を有していた。神経終末はしばしばこの細胞と接触しているが、その部位にシナプス様構造は見られない。トカゲにもメルケル細胞は認められるがその出現頻度は低く、ヘビではメルケル細胞は見い出されなかった。

刺激-放出連関における電子伝達系の役割

菅野 富夫 (北海道大・獣医)

Douglas と Rubin が 1961 年に stimulus-secretion coupling (刺激-放出連関)

という言葉を提唱したときには、放出刺激が分泌細胞に作用し分泌物の放出をひきおこすに到る過程において、細胞内カルシウムイオン濃度が、 $[Ca^{++}]_i$ 、重要な役割を演じていることを強調している。1968年のDouglasの総説では、この考えをさらに詳しく解説し、さらに、副腎髄質果粒内に含まれるATPも、この連関に何らかの関連があることを示唆している。さらにその果粒膜にはチトクロームb559が含まれているという報告もある。WinkerとSmithは、次のように考えている。細胞質から果粒内へのカテコルアミン取り込みは能動輸送であり、この能動輸送のエネルギー源としてATPが使われるのであろう。

一方、刺激-放出連関にもエネルギーが費されることも確かであるが、副腎髄質の刺激-放出連関で費されるエネルギーは酸化的りん酸系と解糖系の両方から供給され、どちらか一方が阻害されると他方がエネルギーを供給し続けるという結果が発表されている。中枢神経系と膵腺房細胞の刺激-放出連関で費されるエネルギーのほとんど全部が酸化的りん酸化系から供給されている。

電子伝達系の中でNAD(P)Hの量はその蛍光(波長460~480 nm)をRedoximeter(立石ライフサイエンス研)で検出し、チトクロームa(a_3)、bおよびc+c₁の還元をそれぞれ波長605 nm, 562 nm および550 nmの差スペクトルとしてscanning organ spectro photometer(立石ライフサイエンス研)で測定、計算、記録することができる。

ラット摘出膵血管灌流標本をコレストキニン(CCK)あるいはアセチルコリンで持続的に刺激し、消化酵素放出量と電子伝達系の変化とを同時に記録した。2 mU/ml CCK あるいは 3×10^{-8} M ACh 持続刺激時には、チトクロームa(a_3)、およびc+c₁のいずれも刺激開始直後から最大還元位の数10%に及ぶ還元方向へ変化し、数分後に持続的な消化酵素放出反応がみられるが、NAD(P)Hは変化しなかった。50 mU/ml CCK あるいは 10^{-7} M ACh 持続刺激時には、チトクロームとNAD(P)Hのいずれも還元方向に大きく動き、消化酵素は刺激直後最大放出に達して次第に刺激前のレベルに戻るという高濃度刺激後放出型を示した。酸素不足の状態にすると、いつも、チトクロームの還元とNAD(P)H変化量とはほぼ平行した。以上の結果は 1 生理的な濃度のCCKあるいはAChによってひきおこされる刺激-放出連関の初期にチトクロームの還元がみられ、 2 高濃度刺激時には酸素不足が生じていることを示している。

ウシガエル血管灌流標本の灌流液中の Ca^{2+} を減らすか、 K^+ を増すと、大脳半球表面からチトクロームの還元がみられた。マニトール前投与によって血管脳関門を機能的に開いてやるとこれらのイオン効果はさらにはっきり現われた。この時、脳の電氣的活動が亢進していると考えられるので、チトクローム還元はニューロンの活動上昇に伴う変化と考えられる。

副腎髄質の灌流実験では、カテコルアミン放出に伴うチトクロームの変化はほとんど検出できない。

膵と脳の実験結果から次のような仮説をたてている。酸化的りん酸化からエネルギーの供給をうけている分泌細胞の刺激-放出連関には、ミトコンドリアが重要な役割を演じており、おそらく、

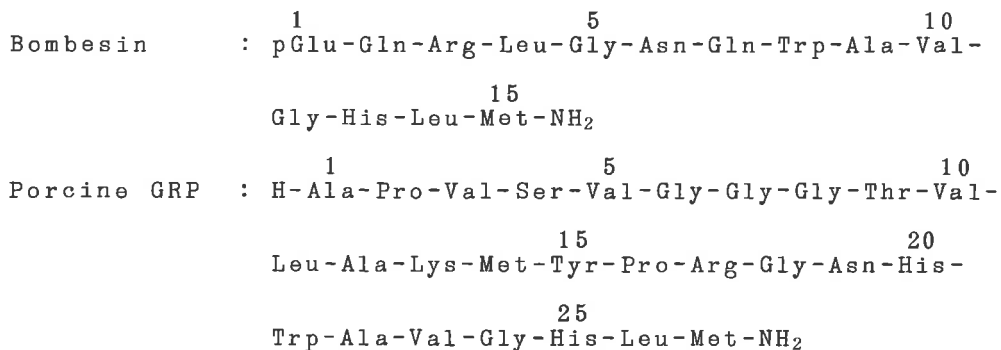
ミトコンドリアのATP生産とCa²⁺取り込みとが相反性過程であるというLehningerの考えがここに適用できるであろう。

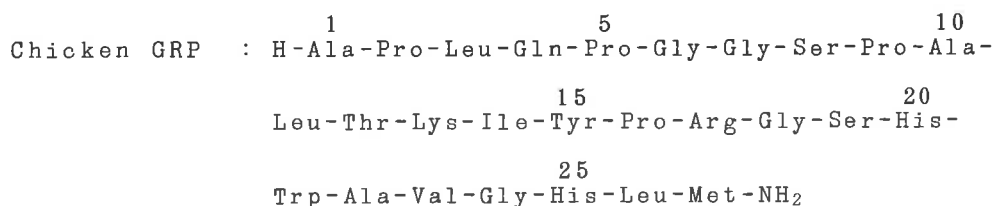
- 1) Douglas, W. W. and Rubin, R. P. J. *Physiol. (Lond.)* 159, 40-57, 1961.
- 2) Douglas, W. W. *Br. J. Pharmacol.* 34, 451-474, 1968
- 3) Winkler, H. and Smith, A. D. In "Handbook of Physiology Section 7 vol. VI" Chapter 23, 1975
- 4) Rubin, R. P. J. *Physiol. (Lond.)* 202, 197-209, 1969.
- 5) Rubin, R. P. J. *Physiol. (Lond.)* 206, 181-192, 1970.
- 6) Kanno, T., Ikei, N. and Nakase, Y. *Biomed. Res.* 2, 381-389, 1981.
- 7) Kanno, T. and Saito, A. *Biomed. Res.* 2, 699-704, 1981.
- 8) Lehninger, A. L., Vercesi, A. and Bababunmi, E. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1690-1694, 1978.

免疫活性ガストリン放出ペプチド

矢内原 昇(生理研)

McDonaldら¹⁾により、ブタ消化管より単離されたブタガストリン放出ペプチド(pGRP)は27アミノ酸残基よりなるポリペプチドであり、そのC末端デカペプチド配列は1アミノ残基を除きカエルボンベシン²⁾と一致するものであった。最近、トリGRPの化学構造も明らかにされた³⁾。





本研究では天然 pGRP に諸性質が一致する合成 pGRP を抗原として作製した抗血清 (R6902 および R6903) を用い、125 I-合成 pGRP を標識抗原として確立した RIA 系によりブタ消化管、豚ならびに脳組織の GRP 様免疫活性を検討した⁴⁾。ブタ消化管では粘膜内 GRP 免疫活性は胃体部および前庭部の粘膜に存在するのみで、他の消化管粘膜には存在しなかった。一方、筋層では噴門部筋層以外の消化管すべてに免疫活性が検出された。さらに豚組織内にも高濃度の免疫活性が検出された。これら胃腸豚組織の抽出物のゲル濾過による検討で、pGRP ならびにその C 末端フラグメント pGRP (14-27) の溶出部位に相当する二つの免疫活性ピークが認められた。

一方、脳組織の GRP 様免疫活性の分布は、視床下部、大脳皮質、延髄など測定したすべての組織に認められ、各々の組織の抽出物のゲル濾過で視床下部では消化管同様免疫活性は、2 ピークを示したが、大脳皮質、延髄のそれは GRP より低分子の pGRP (14-27) の溶出部位に相当する 1 ピークを示したにすぎない。ヒト胎児肺にも高濃度の GRP 免疫活性が認められ、そのゲル濾過による検討で、その主要免疫活性は pGRP (14-27) に相当する低分子量のものであった。なお、成人肺組織中にはほとんど免疫活性が検出されないのは特徴的であった。

pGRP のアミノ酸配列において、13 位に Lys 残基、17 位に Arg 残基が位置し、それらの位置でトリプシン様酵素が作用すると、pGRP (14-27) または pGRP (18-27) が生成することが推定できる。

さらに免疫組織化学的検討でブタ十二指腸筋層内神経叢ならびに豚内神経節に GRP 陽性線維が確認された。しかし、ブタ胃腸管の粘膜内の内分泌細胞には免疫組織化学的には GRP は認められなかった。これらの結果は GRP が新しい脳-腸管ペプチドの一つであり、神経伝達物質または調節因子として作用していることを示唆するものであった。Suzue ら⁵⁾によれば、テトロドトキシンによりシナプス間の活動を抑えた状態で pGRP およびボンベシンが運動ニューロンを明らかに脱分極することを示した。

本 RIA 系によりヒトおよびラット組織の検討でも、GRP 様免疫活性が認められ、ブタ組織内分布ときわめて類似した分布であった。

文 献

- 1) McDonald, T. J., Jornvall, H., Nilsson, G., Vagne, M., Ghatei, M., Bloom, S. R., and Mutt, V. *Biochem. biophys. Res. Commun.* 90;227, 1979.
- 2) Anastasi, A., Erspamer, V., and Bucci, M. *Experientia* 27;166, 1971.

- 3) McDonald, T. J. , Jornvall, H. , Ghatei, M. , Bloom, S. R. , and Mutt, V. FEBS Letters 122;45, 1980.
- 4) Yanaihara, N. , Yanaihara, C. , Mochizuki, T. , Iwahara, K. , Fujita, T. , and Iwanaga, T. Peptides 2(Suppl. 2);185, 1981.
- 5) Suzue, T. , Yanaihara, N. , and Otsuka, M. Neuroscience Letters 26;137, 1980.

筋の興奮・収の間にあらわれる生理・生化学現象の解析

(56. 9. 25—26)

短縮熱の筋節長依存性

山田和広, 米谷快男児 (大分医大)

筋肉の過渡的収縮過程における中間体の諸性質

清水 博, 田仲広明 (東大 薬)

筋小胞体のイオンチャンネル

葛西道生, 山本信行, 田口隆久 (大阪大 基礎工)

カフェインのカルシウム遊離機構

小川靖男 (順天堂大 医)

平滑筋細胞内 Ca store

遠藤 実, 八木 忍 (東北大 医)

平滑筋細胞内におけるカルシウムの局在とその収縮時の移動

杉 晴夫 (帝京大 医)

諸種平滑筋の収縮における Sodium nitroprusside の作用

砂野 哲 (札幌医大)

子宮平滑筋の張力変化の速度論的解析

—— 平滑筋におけるカルシウム動態研究の一方法

加藤誠志, 小笠原利保, 長 琢朗 (山口大 医)

単一分離平滑筋細胞の分離

薮 英世, 小坂 功, 小原一男 (札幌医大)

カエル骨格筋における K^+ による conditioning depolarization 下の caffeine 拘縮

高氏 昌, 筒浦理正, 金谷秀秋 (札幌医大)

血管平滑筋における β -弛緩

栗山 熙, 鈴木 光, 伊藤猛雄 (九州大 医)

心室筋の緩徐内向き電流の不活性化の機序 Ca の流入との関係

大地陸男 (順天堂大 医)

温血動物心筋における細胞内 Ca の調節機構

栗原 敏, 小西真人, 酒井敏夫 (慈恵医大)

La^{3+} の作用からみた心筋収縮における negative surface charge の意義

河田 溥, 波多江純真, 大場三榮 (福岡大 医)

心筋の膜電流要素への Ca^{++} イオンの作用

後藤昌義, 浦田百美 (九州大 医)

心房筋の力速関係と力学定数について

真島英信 (順天堂大 医)

骨格筋線維内への Arsenazo — III の注入

松村幹郎, 越智和典 (川崎医大)

収縮時の diffraction 強度の変化と張力発生の相関

大羽利治, 堀田 健 (名市大 医)

硬直と横紋構造の乱れ

馬詰良樹 (慈恵医大)

Acrolein 系物質と Excitation — Contraction Coupling

藤野和宏, 佐藤義昭, 有馬利昭 (防衛医大)

甲状腺機能低下症における

—— 特異性筋隆起 (idiomuscular contraction) 現象の亢進について

水沢英洋 (浜松医大)

高木昭夫 (国立武蔵療養所神経センター)

杉田秀夫 (東大 医)

概 要

筋の基本的性質は多くの興奮性細胞の一つのモデルであり, 歴史的にみても生理学における多くの基本概念は筋の研究に負う所が多い。今研究会では筋の内部膜におけるカルシウムチャンネルの動態, カルシウム蓄積遊離の機構をはじめとして平滑筋・心筋・骨格筋における最近のトピックス

をあらゆる角度から討論したものである。

また、第1日夕刻には名取礼二学長の学士院賞受賞記念談話会がもようされ、第2日目には興奮収縮連関における内部膜系の活性化の生理学的研究について酒井敏夫教授、杉晴夫教授から報告があった。さらに、最近の国際学会に出席された江橋節郎、藤野和宏、遠藤実、杉晴夫の諸教授よりの報告があった。

短縮熱の筋節長依存性

山田和広、米谷快男児（大分医大）

等尺性に収縮している筋を短縮させるとき、筋は等尺性収縮時に比べ、その熱産生の速度が大きくなる。等尺性収縮時の維持熱産生の速度と比較して、それより余計に産生される熱量が短縮熱とよばれている（Hill, A. V., 1938），短縮熱産生が、短縮によるクロスブリッジサイクルの反応速度の増大と密接に関連しているとする（Kodama & Yamada, 1979），短縮熱産生と筋節長との間の関係を知ることは、クロスブリッジ機構を解明するためにたいへん重要である。

短縮熱産生の測定はアカガエルの半腱様筋を用い、0℃で行った。熱電堆は鍍銀法を用いて製作した（山田他，1981）。筋節長の範囲は2.2～3.5 μm であり、熱電堆に取りつけた筋についてレーザー回折法によって測定した。短縮熱産生は、強縮中の筋をほぼ最大速度に近い等速度で1 mmだけ短縮させ、短縮開始より0.34 s 後までの間に余計に産生される熱量として求めた。

一方、その筋節長が2.5 μm 以上に伸展された筋を静止状態のまま、同様に等速度で短縮させるとき、筋は熱量を吸収した（ゴム様弾性）。伸展された筋の示すこのようなゴム様弾性は、並列弾性要素に由来するものと考えられ、この並列弾性要素は活動筋の短縮時にも同様にはたらいているはずである。このことは、伸展の大きい筋ではみかけの短縮熱産生は負となる事実と一致している。

以上のことから、みかけの短縮熱を、同じ筋節長での静止筋の短縮による吸熱量で補正して得た真の短縮熱産生は、筋節長2.2～3.1 μm の範囲では筋節長によらず一定であり、筋節長が3.3 μm を越えると急速に減少した。

以上の事実は、クロスブリッジ機構についての理論の検証にとって大変重要であるので、さらにいくつかの点について検討を加えている。

Hill, A. V. (1938) The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. Proc. Roy. Soc. B. 126, 136-195.

Kodama, T. & Yamada, K. (1979) An explanation of the shortening heat based on the enthalpy profile of the myosin ATPase reaction. in Cross-bridge Mechanism in Muscle Contraction (Sugi, H. & Pollack, G. H. eds.), pp. 481-488, Univ. Tokyo Press, Tokyo.

山田和廣, 米谷快男兄, 小林孝和 (1981) 鍍銀法を用いた微小熱電堆の作製と筋熱產生の研究, 生理学研究所年報, 第2巻, 439-440頁, 岡崎国立共同研究機構

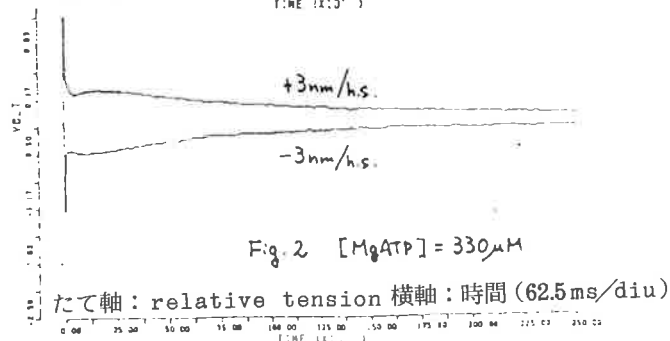
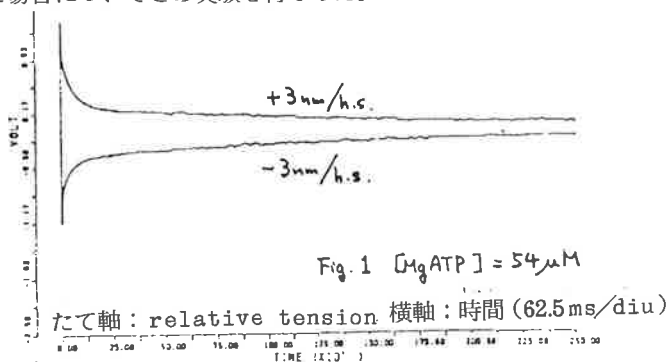
筋肉の過渡的収縮過程における中間体の諸性質

清水 博, 田仲広明 (東京大・薬学)

骨格筋収縮の力学的要素過程に関しては, 急速筋線維長変化時の過渡的張力変化 (いわゆる “isometric transients”) の測定から多くの知見を得ることができる。本研究ではさらにこの力学的要素過程の生化学的に知られているアクチン-ミオシンの反応過程との対応関係を明らかにするため, 基質濃度を变化させた場合についてこの実験を行なった。

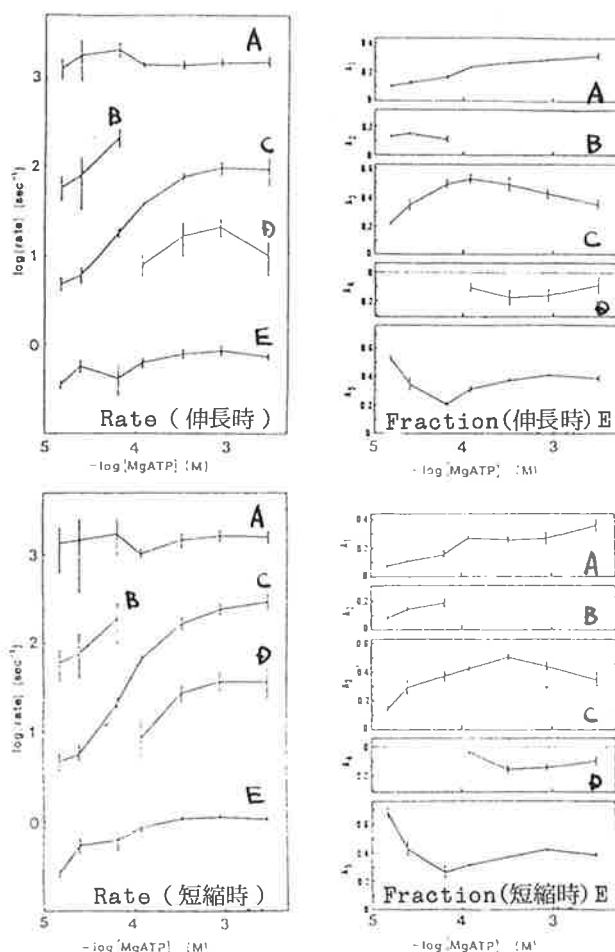
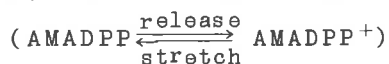
材料としてはグリセリン処理ウサギ腸腰筋を用いた。溶液にはATP再生系を加え, 基質濃度を補償している。筋線維長を, 立ち上がり時間 $320\mu\text{sec}$ のサーボモータを用い, 半サルコメアあたり 3nm 伸長あるいは短縮させ, その際の張力変化を固有振動数約 7.5KHz の半導体検出器で測定している。

第1図と第2図に張力変化の代表例を示した。基質の濃度が $100\mu\text{M}$ より濃い時には, 急速な張力の回復の後, 逆方向の変化がみられ, 次の



でゆっくりした張力の回復がみらる。ところが、基質の濃度が $100 \mu m$ 以下になると、急速な張力回復の後半が遅くなって、逆方向の張力変化がみられなくなる。なお、張力変化は伸長時と短縮時でかなり対称的である。

張力回復過程を定量化するため、成分解析をした結果が第3回である。この結果、Mg ATP 濃度依存性がある成分は、C成分とMg ATP 濃度が $30 \mu M$ 以下でのE成分であり、この成分がアクトミオシンの基質による解離反応 ($AM + ATP \rightarrow A + MATP$) と対応していることがわかった。一方、A成分は3状態モデルによるシミュレーション結果と比較して、結合しているクロスブリッジの状態変化に対応していると思われるが、伸長時と短縮のRate Const に差がないことから、アクトミオシンの生化学的反應において ($AMADPP \xrightleftharpoons[\text{stretch}]{\text{release}} AMADPP + Pi$) という対応は成り立たず、たぶんAMADPPに力学的に性質の異なる二つの状態が存在しているものと思われる。



第3図. 成分解析の結果

筋小胞体のイオンチャンネル

葛西道生, 山本信行, 田口隆久 (大阪大・基礎工)

筋小胞体は神経からの刺激によって細胞内に Ca^{2+} を放出し、筋収縮を開始させ、 Ca^{2+} を取込むことにより、筋を弛緩させる細胞内小器官である。従って筋小胞体膜にはこれらの機能に関係した、カルシウム放出チャンネルとカルシウムポンプが具っていることが期待される。ところが近年、この膜にはアニオン輸送体とカチオンチャンネルが存在することがわかった。これらのイオン輸送体の生理学的意義は不明であるが、筋小胞体の Ca^{2+} 輸送や、放出反応と何らかの関係のある可能性もある。

アニオン輸送体は、トレーサーとして硫酸イオンを用いた実験、浸透圧差をかけたときの筋小胞体ベシクルの体積変化を光散乱強度変化としてモニターする方法、アニオンの拡散電位を $\text{dis-C}_3-(5)$ という蛍光色素を用いてモニターする方法でしらべることによって、その存在が確かめられた。この輸送は赤血球のアニオン輸送のインヒビターであるスチルベンの誘導体SITS、DIDSなどで特異的に抑制される。またこれらのインヒビターの分布をSDSPAGEでしらべると分子量約10万のタンパク質が、アニオン輸送の可能性を示した。しかし、この分子は Ca^{2+} ポンプと重なるために、単離には成功していない。またアニオン輸送は胞電位依存性を示し、グルコン酸の流出は内側頁の膜電位によって抑制された。速度論的には電気的中性の交換輸送として説明できた。

カチオンチャンネルはMeissnerらによって、その存在が示唆されたが、最近Millerらは平面黒膜と筋小胞体ベシクルを融合させて、そのコンダクタンスを測ることにより K^+ チャンネルであることを明らかにした。我々は Tris^+ や Choline^+ の透過を光散乱法と膜電位を蛍光色素で測る方法を併用して、 K^+ チャンネルを Tris^+ や Choline^+ が通ることを示した。このチャンネルの種々の性質をしらべると、 10^{-6}M 程度の Ca^{2+} によりこのチャンネルが開き、 10^{-3}M 程度の Ca^{2+} により閉じることがわかった。またカフェインによって透過性が上り、プロカインによって抑制された。

これらの受動的なチャンネルの生理的意義は不明であるが、 Ca^{2+} の輸送は放出、とり込みともに正の電荷の移動を伴っており、膜電位の形成がそれらの反応を抑制するので、これらのチャンネルを通るイオンの速い流れが、そのような膜電位の決成を打消している可能性がある。

また受動的な Ca^{2+} の流出をトレーサー法とCTC（クロルテトラサイクリン）による蛍光法でしらべると、 10^{-6}M 程度の Ca^{2+} により加速されることがわかった。この反応はカフェインにより加速されプロカインで抑制され、スキンドファイバーで観測されている Ca^{2+} 誘導 Ca^{2+} 放出に似ていた。更に Mg^{2+} の流出をCTC法でしらべると 10^{-6}M 程度の Ca^{2+} による加速が見られた。この Mg^{2+} はカルシウム放出チャンネルを通っている可能性があるが、上述の K^+ チャンネルを通るのかもしれない。

今後、これらのチャンネルの単離、再構成という途を通して、これらの問題は解決されなければならない。

カフェインカルシウム遊離機構

小川靖男（順天堂大・医・薬理）

Ogawa & Ebashi (1976) は ATP の非分解性アナログである β , γ methylene adenosine triphosphate (AMPOP CP) がカエル骨格筋により調製した筋小胞体から Ca を遊離することを報告した。この Ca 遊離はカフェインによる Ca 遊離の特性とよく似ているが、カフェインと AMPOP CP の作用相乗効果があるので作用部位は異なると考えられる。AMPOP CP の Ca 遊離作用は AMPOP CP が Ca とりこみ速度に関して競合型抑制を示しうる低 ATP 濃度存在下でみられることから ATPase 酸素のある状態が Ca 遊離を変調することが示唆された。しかしカルバミルリン酸存在下で形成されたリン酸化中間体 (E~P) レベルは AMPOP CP 添加により速やかに減少するが、E~P レベル及びその減少の時間経過はカフェインの有無によって影響を受けなかった。一方同様の条件下での AMPOP CP による Ca 遊離はカフェイン存在によりその速度、量とも著しく増強されるので E~P レベルそのものの関与は否定された。

我々は ATPase 蛋白との関係を更に詳しく検討するため、まずカエル骨格筋筋小胞体の pCa-CaATPase 活性に及ぼすカフェインの効果を検討した。Mg 濃度 4 mM では 5 mM カフェインは CaATPase 活性に有意な影響を及ぼさなかったが、Mg 濃度を 1 mM に下げるとカフェインにより CaATPase 活性の促進がみられた。この増強は Ca^{2+} 濃度依存性であり、 Ca^{2+} 濃度が高まるにつれ増強し、10 μM 附近で最大に達する。30 μM Ca^{2+} 以上では CaATPase 活性が減少し、カフェインの効果はみられなくなった。これらの結果は A. Weber の結果と一致する。同様の条件下での ATP-ADP 交換反応はカフェインにより影響されなかったので、E~P レベルはカフェインにより変化しないと考えられ、前述した結果と一致する。カフェインによる pCa - CaATPase 活性関係の変化は Mg g^{2+} 濃度を下げた時の pCa - CaATPase 活性関係の変化とよく類似し、しかもカフェインの CaATPase 活性に対する作用は前述したように Mg 濃度依存性であるので、カフェインは CaATPase 活性に関与する Mg 結合部位の親和性を低下させるのではないかと考えられる。そこで ATP 不在下、18 μM Ca 存在下に Mg 濃度を種々に変えてカフェインによる Ca, Mg 含有量の変化を原子吸光法により測定した。Ca 含有量はカフェインにより減少するが、その程度は Mg 濃度依存性で、Mg 濃度が低い程 Ca 減少量が大きく、カフェインによる Ca 遊離とよく対応する。一方 Mg 含有量は extravesicular space を [14C] sucrose space で補正した結果について Scatchard plot を行くと 2 つのクラスの結合部位に分かれる。一つはその解離定数 $K_d \approx 2 \text{ mM}$, 部位数 $n \approx 80 \text{ nmol Mg/mg protein}$ の low affinity site であり、もう一つは $KD \approx 0.2 - 0.3 \text{ mM}$, $n \approx 20 \text{ nmol Mg/mg protein}$ の high affinity site である。high affinity site の K_d は遠藤が得た skinned fiber における Ca-induced Ca release

に拮抗する見掛けの K_d 値によく対応する。カフェインはこの high affinity site の K_d を増大した (n は不変)。また, low affinity site に対しては K_d を変えないで, n を増加した。カフェインの作用は用量依存性であり, いずれの部位での変化も 2mM Mg 存在下の Ca 遊離量と直線関係にある。カフェインによる膜の Ca^{2+} 濃度依存性亢進が Mg で強く抑制されることから, Mg が存在する in situ ではカフェインの Ca 遊離作用は主として Mg 結合能の変化を介するものと考えられる。

平滑筋細胞内 Ca store

遠藤 実 (東北大・医)

八木 忍 (東北大・医)

平滑筋の収縮が骨格筋と同様 $10^{-7} \sim 10^{-5}$ M 程度の Ca によって制御されていることはよく知られている。しかしその Ca^{++} が細胞外からの流入によるのか, 細胞 Ca store からの遊離によるのか, 未だ明らかではない。細胞内 Ca store と思われる筋小胞体の存在は形態学的には Somlyo らによりかなり明らかにされているが, 機能的な面については未だ不十分な点が多い。そこで我々はモルモット盲腸紐の intact 及び skinned fiber を用いてその Ca store の種々の性質について検討した。

実験はモルモット盲腸紐から直径 100–150 μ m, 長さ 1.5–2.0 mm の細い筋束をとり出し, 速やかに液交換のできる実験槽につるして, K 拘縮をみたあと, intact fiber の場合には, 主として Ca-free (EGTA 4 mM), K-脱分極下に行なった (pH 7.4, 25°C)。張力は strain gauge で測定し, ペンレコーダーに記録した。骨格筋小胞体から Ca をほぼ完全に遊離させることが知られている。25mM caffeine (caf) を Ca-free, K-脱分極下に適用すると一過性の張力発生が見られた。洗浄後再び caf を適用しても収縮は見られないが, Ca (1–10 mM) を一定時間 (1–10 分) 適用すると, Ca-free 下に再び caf による収縮が見られた。より低濃度の caf では収縮は小さく, その後 25mM caf により収縮が見られた。carbachol (carb) で同様の収縮が見られることは, 大橋ら (1973) により示されているが, 十分濃度の carb (又は caf) の収縮のあとでは caf (又は carb) の収縮は見られなくなることから, caf と carb とは共通の Ca store に作用していると考えられる。サポニン処理による skinned fiber では MgATP 存在下に Ca をとりこみ, caf によって Ca を遊離する Ca store の存在が確認された。carb では Ca 遊離は見られなかった。この Ca とりこみは, その時間経過及び Ca 濃度依存性が骨格筋小胞体の場合と類似していた。また MgATP が必須であり, 温度依存性 (Q_{10} 約 2) があった。また Ca とりこみ抑制剤の quercetin で同様に抑制された。以上の結果

からこの Ca store は骨格筋小胞体と非常によく似た性質を有し、恐らく筋小胞体であることが示唆される。

キーワード：平滑筋, Ca store, caffeine, carbachol, サポニン, skinned fiber, Ca とりこみ, 筋小胞体

研究発表

- 1) Endo, M., Kitazawa, T., Yagi, S., Iino, M., Kakuta, Y. : Some properties of chemically skinned smooth muscle fibers
 "Excitation- Contraction Coupling in Smooth Muscle" 1977. R. Casteels et al. eds., pp. 199-209. Elsevier/North-Holland Bimedical Press.
- 2) Endo, M., Kitazawa, T., Yagi, S., : Different features of responses of the sarcoplasmic reticulum in cardiac and smooth muscle
 "Muscle Contraction: Its Regulatory Mechanisms", 1980. S. Ebashi et al. eds. pp. 447-463, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin.

平滑筋における Ca の局在と移動

杉 晴 夫 (帝京大・医・生理)

イヌ冠状動脈平滑筋細胞における収縮系を活性化する Ca の起源について研究し、以下の結果を得た。

- (1) イヌ冠状動脈平滑筋の高 K 液による拘縮張力は外液の Mn イオンおよび low pH により著しく抑制される。
- (2) K 拘縮張力は外液の Ca イオン濃度に依存し Ca-free 液中でゼロになる。
- (3) K 拘縮の自発的弛緩は外液の La イオンにより抑制される。
- (4) K 拘縮張力はベラパミール等の Ca antagonist で著しく抑制される。
- (5) ノルアドレナリンは標本の弛緩のみをおこす。

(6) カフェイン, 外液 2 価イオンの除去および急速冷却はいずれも標本の収縮をおこさない。

以上の結果はイヌ冠状動脈平滑筋の収縮をおこす活性化 Ca が外液に由来することを示している。

ピロアンチモン酸法により静止筋における Ca の局在を知らべた結果, Ca を含むピロアンチモン酸の沈澱は細胞内では核以外にほとんどみられず, 形質上のカベオラの内腔に多くみとめられた。

この結果は上記の生理実験の結果とよく一致しており, イヌ冠状動脈平滑筋における収縮系を活性化する Ca は主としてカベオラの内腔に存在することを強く示唆している。

発 表

1. 杉 晴夫 イヌ冠状動脈平滑筋の興奮収縮連関
生理学研究年報 2, (1981)
2. 藤條格彦, 鈴木季直, 杉 晴夫 イヌ冠状動脈平滑筋の収縮弛緩機構
I 収縮系を活性化する Ca イオンの起源 平滑筋学会誌 17, (1981)
3. 鈴木季直, 藤條格彦, 杉 晴夫 イヌ冠状動脈平滑筋の収縮弛緩機構
II 収縮時の細胞内 Ca イオン分布の変化 平滑筋学会誌 17, (1981)

諸種平滑筋の収縮における Sodium nitroprusside の作用

砂 野 哲 (札幌医大・第二生理)

血管平滑筋をはじめとする多くの平滑筋で sodium nitroprusside (Na-NP) が収縮を抑制することが知られている。このことに関し, Na-NP が Ca 拮抗剤としての作用を示すという報告もあるが, その作用機序が D-600 等とは異なるとも報告されている。さらに, 各組織による差も報告されている。本実験では, モルモット精管平滑筋の収縮と Ca の関係を知る目的で用いた Na-NP, 逆に収縮増強作用を示すことがわかり, これらの機序および他の平滑筋との比較の検討を行った。

モルモット精管平滑筋に Na-NP (1~2mM) を作用させると自発性収縮が出現する。この自発性収縮は phentolamine, atropine で抑制されない。門脈平滑筋では逆に自発性収縮が消失する。K 拘縮でみると, 門脈平滑筋では phasic, tonic 両要素ともに抑制されるが, 精管では

tonic 要素が極く軽度抑制されるのみで, phasic 要素は逆に増大された。K 拘縮の経過中に Na-NP を作用させると, 門脈, 結腸紐では著明な弛緩がみられ, これは細胞外 Ca の増量が反転された。一方, 精管では極く軽度の弛緩のみがみられた。門脈のノルアドレナリン (NA) による拘縮, 結腸紐のアセチルコリン (Ach) 拘縮はいずれも, Na-NP によって抑制されたが, 精管では NA, Ach いずれの拘縮も増強された。これらの薬物による拘縮中に Na-NP を作用させると門脈, 結腸紐では弛緩反応がみられたが, これは Ca の増量では反転しなかった。精管では逆に収縮反応がみられたが, 細胞外 Ca 増量はこれを弛緩させた。

Na-NP は精管平滑筋を軽度脱分極させ, 自発放電をもたらしした。このとき膜抵抗の低下がみられた。Na-NP は K による脱分極と脱分極の初期にみられる自発放電, 膜抵抗の低下等を妨げなかった。細胞外 K の上昇 (20~30 mM), ouabain 処理等も同様の脱分極効果を示すが, これらの前処理はいずれも K 拘縮の phasic 相を増強させた。

Na-NP は一部には Ca 拮抗的な作用を示し平滑筋の K 拘縮を抑制するが, 薬物による収縮の抑制, あるいは精管でみられた薬物収縮の増強は主として平滑筋細胞膜の興奮性の変化で説明されよう。精管でみられた K 拘縮の phasic 相の増強は K 拘縮に先行する膜の軽度の脱分極にが原因となっていると考えられる。しかし, この軽度の脱分極が高 K 液適用時に起ると考えられる phasic contraction に関与する Ca 動態にどのような影響を与えるかは不明である。

子宮平滑筋変化の速度論的解析—平滑筋 におけるカルシウム動態研究の一方法

加藤誠志, 小笠原利保, 長 琢朗 (山口大・医・第一生理)

平滑筋の興奮・収縮連関を理解することは, 細胞膜や内膜で隔てられた各コンパートメント間の Ca の動態を理解することと考えられている。そのためには各コンパートメントにおける Ca 濃度の示標として張力を用い, 張力変化の速度論的解析により平滑筋における Ca 動態の検討を行ない, 次のような結果を得た。

- ① エストロゲン処理した去勢ラットの子宮縦走筋においては, 組織を構成している個々の細胞が機能的に均一であることを示した。
- ② 高 K 脱分極下における Ca 拘縮の張力発生速度および弛緩速度は, 試料片の厚さに強く依存し温度依存性が小さいことから, 各プロセスの律速過程は細胞外間隙における Ca イオンの拡散過程であることが示唆された。
- ③ 張力変化の速度はかん流液の影響を強く受けることから, 試料表面に存在する静止層 (unstirred layer) における Ca イオンの拡散過程も無視出来ない。

- ④ 静止層をも考慮したシート状試料における Ca イオンの拡散方程式を解くことにより、上記の結果を定量的に再現出来た。
- ⑤ 実験結果と理論曲線との比較により求められた細胞外間隙における Ca イオンの見かけの拡散定数は、水溶液中の値の20分の1であった。この違いは、細胞外間隙における Ca 結合の影響によって説明出来ることを理論的に示した。
- ⑥ 細胞外間隙の Ca 結合を考慮することにより、 Ca の流出カーブをも Ca イオンの拡散律速と考えて理論的に求めることが出来た。

以上の結果から、外液の Ca 濃度を变化させた場合には、静止層や細胞外間隙における Ca イオンの拡散過程が張力変化の律速段階であることが明らかとなった。

単一分離平滑筋細胞の分離

藪 英世, 小坂 功, 小原一男(札幌医大・第一生理)

緒 論

平滑筋細胞の収縮-弛緩サイクルにおける Ca^{++} 動態は、細胞膜を介しての Ca^{++} 流入, Ca^{++} のくみ出し(Ca -pump), また細胞膜結合 Ca^{++} , 細胞内貯蔵 Ca^{++} の遊離, 再結合などの複数の反応が関与し、極めて複雑な様相を呈している。平滑筋細胞の $\text{E}-\text{C}$ coupling を理解するためには、細胞自体の Ca^{++} 動態を正確に観察する必要があるが、平滑筋筋束を実験材料とする限り、1) 細胞自体が極めて小型である。2) 細胞間隙が大きい。3) 非筋肉組織、ならびに間質成分の存在などが、その Ca^{++} 動態の定量的、ならびに時間経過の解析を困難にしている。

著者らは、これらの点を除外すべく、単一分離筋細胞の調整を試みている。この種の研究はすでに *FAY, et al.* および *Momose* らにより精力的に進められているところであるが教室で得られた preliminary な2,3の実験結果をここに紹介する。

分離方法は、*Momose* の方法を動物種、臓器種(モルモット結腸紐, サンショウウオの胃平滑筋など)に応じて modify して行った。収縮の測定は、a) 自由短縮は、*Deth* の方法により、単一分離細胞の発生張力は、photo diode を用いた ultra sensitive force transducer を用いて、吸引法により細胞の両端を固定して行った。

Ca^{++} 動態の測定は、a) ^{45}Ca flux をミリポアー法により、b) 細胞結合性 Ca の遊離をクロールテトラサイクリン(CTC)を probe として蛍光分光法により測定した。

結果ならびに考案

1) 単離平滑筋細胞はCaffeineにより濃度依存性に自由短縮した。2) CTCはCa, および細胞と ternary complex を生成し, ある強度 (arbitrary unit) の蛍光発光を発しているが, ここでCaffeineを添加すると, その強度低下が濃度依存性に起った。これは単離細胞内の結合CaがCaffeineにより遊離したことを示す。3) 単離細胞を予め ^{45}Ca でloadしておき ^{45}Ca を含まない液で経時的に洗出し, いわゆる washout (efflux) curve を決定した。この曲線は3~4 components よりなり, 各 component の $t_{1/2}$ はそれぞれ1.4 min, 4 min, 13.1 min および30 min であった。“Washout”を開始する前に, 10 mM EGTAで単離細胞を処理し, extracellular の Ca^{++} をすべて除去したので細胞自身が, Ca^{++} の分布について3~4のcompartmentsを有することを示す。30 min Compartment に4 mM Caffeine を添加すると, 明瞭なeffluxの促進が認められた。しかし, 1.4 min Compartment ではCaffeineを添加するも何ら変化は認められなかった。これらの結果によりCaffeineは, 細胞の比較的深層部の貯蔵Caを遊離させ, 結果として収縮を惹起したと推論される。4) 単離筋細胞の両端を固定し, 固定点間の長さをほぼ400 μm とし約200 μm 急激に伸展すると, 2~3 mg の一過性の張力を発生した。

結 論

単一平滑筋細胞の分離を試み, 蛍光分光法により収縮時の Ca^{++} 動態を測定しうる可能性について一連の吟味を加え, また単一筋細胞の諸種条件下の発生張力を測定せんとしている。

カエル骨格筋における K^{+} による conditioning depolarization 下の caffeine の拘縮

高 昌, 筒浦理正, 金谷秀秋 (札幌医大・第一生理)

カエルの骨格筋から分離したsingle twitch muscle fiberを用い, カリウム拘縮(K拘縮)のinactivationの発現機構を知るために以下の実験を行った。主な結果につき報告する。

1) $[\text{Cl}]_o$ = 一定 (120 mM) の条件下で, single fiberを25 mM K^{+} を含むcholine-Ringer液に10あるいは15分間浸漬(conditioning depolarization)した後, 190 mM K液でtestすると, 拘縮は完全に抑制されることが認められた。(complete inactivation)。

2) これに対し, 上と同様の条件下に190 mM K^{+} 液でtestするかわりに, 25 mM K + 5 mM caffeine (以下25 K + 5 caffと略す)を作用させると, 上述のconditioning periodのいずれにおいてもcaffeine拘縮が認められた。しかし, この拘縮は, control

(25 K と 5 caffeine の同時作用による拘縮) に比し, その rate of rise ならびに peak tension が著明に抑制された。

3) 一方, 2) におけると同様の実験を $[K]_o \times [Cl]_o = \text{一定}$, 外液の Cl^- を SO_4^{--} , $CH_3 SO_3^-$ あるいは propionate で置換した条件下で行うと, 15 ~ 30 K + 5 caff (場合により 3 caff) による test 拘縮の rate of rise は conditioning period の増加に依存して抑制されたが, peak tension はほとんど抑制されないことが示された。

4) 以上の 2) および 3) に示した実験は, intact single fiber についてのものであるが, 同様の実験を glycerol-treated fiber (T-disrupted fiber) につき試みた。T-disrupted fiber では, 通常 E-C coupling が block されているため, conditioning depolarization を行っても inactivation は起こらないはずであるが, 本実験において, $[Cl]_o = \text{一定}$ の条件下で 25 K により 15 分前処理 (conditioning) した後の 25 K + 5 caff による拘縮は, rate of rise および peak tension のいずれも著しく抑制された。一方, この種の抑制は, $[K]_o \times [Cl]_o = \text{一定}$, ならびに Cl^- を SO_4^{--} , $CH_3 SO_3^-$ および propionate で置換した場合には全く認められなかった。

5) さらに, $[Cl]_o = \text{一定}$ の条件下で, 25 K による conditioning depolarization により, single fiber の diameter したがって volume が著明に増加することも確認された。

6) 以上の成績は, $[Cl]_o = \text{一定}$ の条件下で, 25 K による conditioning depolarization 後に示された前述の caffeine 拘縮の peak tension の抑制は, Cl^- が conditioning の間に single fiber の表面膜を介して水および K^+ を伴って fiber 内に侵入し, おそらく筋小胞体 に作用して, 活動時の Ca^{++} 遊離機構あるいは遊離された Ca^{++} の収縮要素への作用過程に 2 次的に影響を与え, その結果, caffeine 拘縮の peak tension の抑制をもたらすものと思われる。

7) さらに, $[Cl]_o = \text{一定}$, $[K]_o \times [Cl]_o = \text{一定}$, その他上記のいずれの条件下でも conditioning depolarization による completely inactivated state において, caffeine 拘縮の rate of rise が著しく抑制された事実 (上の 2) および 3) 参照) は, inactivation の進行過程で, fiber membrane おそらくは T-membrane の drug (たとえば caffeine) あるいは ions (たとえば Ca^{++}) に対する透過性が低下する様な変化が起こっていることを示唆する。なお, この可能性は, 低濃度 (0.01 %) Triton X-100 を用いて得られた成績, ならびに K 拘縮そのものの biphasic time course と inactivation に関する成績によっても支持される。

血管平滑筋における β -弛緩

栗山 熙, 鈴木 光, 伊藤猛雄 (九州大・医・薬理)

血管平滑筋細胞は β -adrenoceptor を活性化することにより弛緩する。この弛緩の発生機序について種々研究されてきたがまだ不明の点が多い。主とした作用機序は1) 血管平滑筋の活動電位の発生の抑制(膜の過分極と自発放電の抑制)が考えられるが自発放電を発生するのは門脈以外に報告されていないので自発放電のない血管平滑筋での証明にはならない。2) β -adrenoceptor を介して活性化されたadenylase によって作成されたC-AMPがNa-K ATPase を活性化し, ポンプの結果 $[Na]_i$ が減少し, そのためにNa-Ca 交換拡散(Na-influx Ca-efflux)を促進するその結果 $[Ca]_i$ を減少させる。3) C-AMP によって筋小胞体のCa 貯蔵能を増しその結果 $[Ca]_i$ を減少させる。4) C-AMP によってC-AMP dependent protein Kinase が活性化されmyosin の light chain phosphokinase を燐酸化してcalmodulin の作用を抑制し, 直接的に収縮蛋白の機能を低下させる。5) 筋形成のCa ポンプを促進するなどが考えられている。

私共はSaponin を処理したskinned muscle を用いてC-AMP の細胞内の構造への効果を観察した。用いた材料はモルモット腸間膜動脈で摘出標本を0.1 mmの巾と0.3-0.5 mmの長さに細分し, $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ Saponin を20分間投与して作成した。

Saponin 処理前のintact muscleで 10^{-6} M isoprenaline は僅かに膜を過分極する。 10^{-6} M isoprenaline はC-AMP を約2倍に増加するがこの量は子宮筋の20倍に比して僅かな増加にすぎない。Saponin 処理が完全であるかを確かめる方法として $\text{Ca } 10^{-5}$ M (pCa 5) で発生する収縮が正常筋のK拘縮(128 mM)よりも大きい事とpCa 収縮曲線がCaをSrに置換することにより10倍以上右方に移動することをめやすとした。

C-AMPをSkinned muscle に投与すると 10^{-5} M C-AMP のみではpCa 収縮曲線には変化を与えないがそれに $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ C-AMP dependent protein kinase を添加すると約10%の収縮の抑制がみられていた。

細胞内のCa 貯蔵能および放出に関してはCaffeine の拘縮について観察した。Saponin で処理した組織に種々の濃度のCa 含有液を1分-3分間処理し(1), 再びCa-free 液で灌流(2分間)後(2), 5 mM - 10 mM Caffeine を添加して収縮の大きさを測定し(3), その大きさをCa 貯蔵能と推定した。 10^{-6} M C-AMP と $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ C-AMP dependent protein kinase を(1)に添加すると収縮は大きくなるが(2)と(3)では著変がなかった。また3分間以上(1)液中にC-AMPを添加すると 10^{-6} M以上のCa 溶液中では収縮は抑制された。すなわち, C-AMP と C-AMP dependent protein kinase の添加によってCa-induced Ca-release 機序が活性化さ

れることが分った。もしこの機構が活性化されると free Ca は増加することになるので弛緩ではなくむしろ収縮が発生することになる。また収縮蛋白自身を抑制するために生産される以上の濃度の C-AMP を必要とする。そこで β -adrenoceptor の活性化によって弛緩するためには、Ca の貯蔵と共に細胞外への Ca の排出機構が重要な機序と考えられる。そこで現在、細胞外への Ca-排出機構についての研究を行っている。

心室筋の緩徐向き電流の不活性化の機序・Ca 流入との関係

大 地 陸 男 （順天堂大・医・第二生理）

心室筋の緩徐内向き電流（ i_s ，Ca 電流）の不活性化は、心臓の他の部位の緩徐内向き電流と同様に、膜電位と時間に対する依存性に関して、膜電位固定法で詳細に検討されてきた。例えば i_s の定常状態の不活性化（ f_∞ ）は、先行する長いパルスの膜電位（ V ）を変化させた後に一定の脱分極を与えたときの i_s の比から $V-f_\infty$ 関係として記述された。また不活性化の時間経過はパルス中の i_s 減少の時間経過から求められた。さらに不活性化から回復過程の時間、電位依存性も判明している。これらの研究は一応完結しているともいうことさえでき、実際ここでえられたパラメーターを使用して活動電位波形のシミュレーションが行なわれている。ところで、最近、ゾウリムシ、アメフラシのニューロン、昆虫筋、心臓のプルキンエ線維で、Ca チャンネルの不活性化が Ca 電流として流入する Ca によって惹起される証拠が呈出された。心室筋で不活性化の時間経過が強い脱分極で遅くなるという事実はこの不活性化機序で説明しうる。我々は心室筋で流入 Ca による Ca チャンネル不活性化の可能性を検討した。

単一蔗糖隔絶法でモルモット心室乳頭筋を膜電位固定し、 i_s は Ca 非感受性電流を差引いて求めた。まず同一パルス（50 ms）を二発与えると二発目パルスによる i_s はパルス間隔に応じて変化した。間隔 100ms では半分近くであり、1 sec ではほぼ元に戻った。次に試験パルスとなる二発目パルスを一定とし、一定の先行時間で条件付けパルスを脱分極レベルを種々に変化させて与えた。試験パルスによる i_s は先行パルスが -0 mV 近くであるとき最も強い不活性をうけた。先行 i_s として流入した荷電の量が大きい程効果が強かった。 $+30 \sim +50$ mV の大きな脱分極後の i_s はむしろ 0 mV の後よりも大であった。この不活性化が先行 i_s により Ca が細胞内に流入し $[Ca]_i$ を減少させたことによる可能性は、 i_s がより大きかった Sr による i_s では不活性化がおきにくいことや、一定の条件付けパルスを与えた後に試験パルスの脱分極レベルを変化させてえられる $I-V$ 関係からの i_s の逆転電位が対照時と等しいことから否定された。

細胞外 Ca 濃度を 1.8 mM から 5.4 mM に増大すると最大の i_s がえられる電位は不活性化最大

となる電位と平行してより大きな脱分極方向へ偏位した。これはCaが細胞内に蓄積しCaチャンネルを内側から不活性化させるという仮説を支持する。ところでアセチルコリンは i_g の時間経過も、逆転電位も変化させないで i_g の振巾を減少することが判明している。もし、細胞内Caが不活性化に重要であるならば本研究でえられた先行パルスによる不活性化もおこり難いはずである。イソブチリルメチルキサンチン(3×10^{-6} M)は i_g の振巾を2倍に増大した。2 mM Achはそこでは i_g の振巾をほぼ半減した。電流が減少したにもかかわらず、先行パルスによる不活性化の程度に差は認められなかった。

外液Ca濃度の変化は各チャンネル毎のCa流入量を変え、一方Achはチャンネル数を減少させ i_g を減少すると仮定すると、流入したCaの総量によって i_g の不活性化がおこるのではなく、各チャンネル毎の流入に応じて不活性化が進行することになる。しかし、不活性化が従来通り単に膜電位依存性でその関係が強い非線型性を示すという可能性も完全には除外できなかった。

温血動物心筋における細胞内 Ca^{++} の調節機構

栗原 敏, 小西真人, 酒井敏夫 (慈恵医大・第二生理)

温血動物心筋の興奮収縮連関機構において、 Ca^{++} が重要な役割を果たしていることは広く認められているが、細胞内 Ca^{++} の調節機構について、以下の点が十分に明らかにされていない。① 収縮を実際に誘起するのは、細胞外からのCa流入が、 Ca^{++} 貯蔵部位からの Ca^{++} 遊離によるものか。② Ca^{++} の貯蔵部位は筋小胞体(SR)だけか。③ 筋小胞体内には静止筋、活動筋、それぞれの場合どの程度の Ca^{++} が存在しているのか。④ 収縮に先立ち細胞内 Ca^{++} はどのような時間経過で、どの位増加するのか。我々は正常心筋細胞を用いて上記の点を検討した。

方法：標本にはラット、モルモットの右室乳縮一弛緩過程における細胞内free Ca^{++} の測定には、free Ca^{++} と反応すると465nmの発光を示す、クラゲから抽出したCa sensitive photo-protein (Aequorin)を細胞(30-100個の細胞)内に加圧注入し、張力と光を同時記録した。細胞内 Ca^{++} 貯蔵部位からの Ca^{++} 遊離を引きおこす手段としては、急速冷却法(rapid cooling method)を用いた。温度に通常36℃から5℃以下に数秒以内に低下させ、液温はサーミスター温度計によりモニターにした。膜電位は微小電極法により測定した。結果：正常液中で張力と光信号を観察すると電気刺激後約5 msecで、光の信号は急激に上昇し、ラットでは10-30 msecで、モルモットでは30-60 msecでピークに達する。その後、指数関数的に減少する。張力の最大値に達するまでの時間(time to peak tension)はラットで100 msec、モルモットで150 msecであった。光信号のピーク値と、標本の単位断面積当たりの発生張力は、

刺激頻度に依存した。 $1/5s$ の刺激頻度の時、ラット心室筋はほぼ最大張力を示し ($2g/mm$), その時の細胞内 free Ca^{++} はおよそ $1-3 \mu M$ であった。一方、モルモットの心室筋では $1/5s$ の刺激頻度の時には、 $0.05 g/mm$ の張力発生があり、その時の free Ca^{++} は $0.1-0.3 \mu M$ であった。刺激頻度の上昇により発生張力は、free Ca^{++} の増加を伴って増強した。ラットとモルモットの発生張力の差異は、収縮が誘起される時の細胞内 free Ca^{++} の量に差異があるため、細胞内に free Ca^{++} が同じ程度増した時には、収縮タンパク系が発生しうる張力は、両者において同じと考えられる。細胞内 free Ca^{++} の制御機構に関しては、ラットでの刺激頻度増加に伴い発生張力は低下、モルモットでは逆に増加し、それぞれ、細胞内 free Ca^{++} は増加、激少する。このことは、両者において細胞内 free Ca^{++} の調節機構が異っていることを示唆している。モルモットの細胞内 Ca^{++} 貯蔵部位の Ca^{++} 調節機構を知るために、急速冷却法を用いた。静止筋を急冷しても張力発生はほとんどなかったが、 $0.1-3 Hz$ の刺激を5分間与えた後、刺激を停止して5秒後に急冷すると、収縮が誘起され、張力は刺激頻度に依存して増強した。膜電位を微少電極により計測すると、冷却時には約 $10 mV$ の脱分極がみられたが、活動電位の発生はなかった。二価陽イオンの Ca^{++} は、 Ca^{++} 電流を抑制することが知られているが、 $2 mM$, Co^{++} は活動電位のプラトー相を抑制し、単収縮を消失させた。しかし、 $0.2, 1, 2, 3, Hz$ の刺激後、急冷を行うと刺激頻度に応じた急冷拘縮が観察された。これらの結果は、急冷拘縮は、 Ca 内向き電流によるものでなく、直接、細胞内 Ca^{++} 貯蔵部位に温度変化が影響して Ca^{++} 遊離をおこすことを示唆している。また刺激頻度の影響は、急冷により遊離される Ca^{++} が細胞内貯蔵部位に蓄積することを示唆している。細胞外液の Na^+ 減少により、急冷拘縮は増強し、同時に膜電位依存性に増加することから、 $Na-Ca$ exchange が直接または間接に、この部位に蓄積する Ca^{++} を制御していると考えられる。

La^{3+} の作用からみた心筋収縮における negative surface charge の意義

河田 溥, 波多江純真, 大場三栄 (福岡大・医・第二生理)

細胞表面の negative charge は細胞の安定性・細胞同志の固定・興奮性の制御等に重要な役割を演じていると考えられる。最近温血動物の心筋細胞表層の negative charge が収縮 activator Ca の binding site として機能していること、および La^{3+} がこのような site に強く作用することが指摘されているが (Langer, 1973), 細胞内構造の比較的簡単なカエル心室筋について、活動電位と収縮におよぼす La^{3+} の効果を観察した。

La^{3+} ($0.2 mM$) は切り出したカエル心室筋の単収縮張力を強く抑制し、その経過は $0 Ca-$

Ringer 液灌流時のそれにほぼ一致する。($t\frac{1}{2} = 1.8 \text{ min}$) $\cdot 0.2 \text{ mM La}^{3+}$ 灌流時と 0 Ca-Ringer 液灌流時の細胞内活動電位変化はよく似ており、いずれも静止電位にほとんど影響することなくプラトー相の抑制と活動電位持続時間の顕著な短縮をもたらす。活動電位初期の立上がり相には変化はみられず、従って活動電位持続時間の抑制は Ca 電流を主体とする I_{Si} の抑制を介してもたらされたものと考え得る。さらに収縮張力の抑制もこの変化に基づくものと考えられる。

I_{Si} ならびに収縮張力抑制の機序としては、 La^{3+} が筋細胞表面から Ca^{2+} を駆逐してしまうため、細胞外供給源としての activator Ca^{2+} が減少したことによるいわゆる driving force の減少効果と、 I_{Si} channel に対する La^{3+} の遮断効果の 2 つが考えられるが、これらを調べる目的で neuraminidase 処理を行ない、negative surface charge の除去を試みた。30 °C で pH は 7.4 または 5.5 とし、neuraminidase 2.5 U/ml を 1 時間作用させた後常温に戻すと十分大きい単縮が発現するが、この酸素処理筋に対する 0.2 mM La^{3+} の抑制効果は著しく減弱した。すなわちその抑制の $t\frac{1}{2}$ は 7.1 min であった。また La^{3+} による活動電位の抑制も減弱した。しかし neuraminidase 処理後に 0 Ca-Ringer 液を灌流すると、抑制の程度は無処理筋に比べてわずかに減弱 (約 10 g) したに過ぎなかった。

心筋細胞に対する La^{3+} 結合状態を電顕的に観察したところ、カエル心室筋はモルモット乳頭筋に比して negative charge の密度が著しく低いことがわかった。また neuraminidase 処理後に La^{3+} を灌流した筋標本では La^{3+} の deposits は観察できなかった。

これらの所見から、カエル心室筋においては、negative surface charge は細胞表層の activator Ca^{2+} の維持のためよりもむしろ ionic channel の regulator として機能している可能性が示唆される。

Langer, G. A. Heart: Excitation-contraction coupling.

Ann. Rev. Physiol. 35: 55-86, 1973.

心筋の膜電流要素への Ca^{++} イオンの作用

後藤昌義, 浦田百美 (九州大・医)

心筋の興奮収縮連関において収縮に主役を果す細胞内 Ca^{++} イオンは、筋小胞体からの

Ca^{++} 放出のみならず、形質膜の Ca^{++} 電流、 $\text{Na}-\text{Ca}$ exchange機構、 $\text{Na}-\text{K}$ pump などにより直接、間接に多様な影響をうける。他方、細胞内外の Ca^{++} イオンは逆に心筋の膜電流要素または上記の $\text{Na}-\text{Ca}$ exchangeなどの膜のイオン輸送機構に影響し、巧妙かつ複雑な Feed-back control を行なっているように見える。Meech 効果はそのよく知られた1例であるが、その他の電流要素また pump 要素への Ca^{++} の効果は必ずしも明確にされていない。本研究はそれらへの Ca^{++} 効果の実体また全様を明らかにするにある。

研究方法 実験には膜電流要素、張力要素が定量的に解析されている食用ガエル *Rana catesbeiana* の心房筋束（径 0.5～0.6 mm, 長さ 8～10 mm）を使用した。蔗糖二重隔絶法によりその収縮張力、隔絶膜電位を同時記録するとともに、膜電位固定法を駆使してその膜電流要素を解析した。また、細胞内 Ca^{++} 濃度を調整するため $[\text{Na}]_i$ 不足, Ouabain 投与, Overdrive などの手法を採用した。

研究結果ならびに考案

1) $\text{Na}-\text{K}$ pump への効果 心筋細胞の活動に基本的に重要な $\text{Na}-\text{K}$ pump への効果を Overdrive hyperpolarization を指標にまず検討した。すなわち静止心房筋に持続 4 分, 1.0～1.8 Hz の刺激を与えると、膜静止電位は刺激中初期に脱分極、後期に再分極し、刺激停止後に過分極する。その刺激中の再分極と刺激後の過分極は ouabain, 無 Na 液, 無 K 液によって消失し、明らかに $\text{Na}-\text{K}$ pump によると判定された。ゆえにこれらに対する無 Ca の効果を検討したところ、刺激中の脱分極、再分極、刺激後の過分極ともに顕著に増強された。膜電位変化を semi-log plot すれば膜電流要素 (I_{xa} , I_{xs}), $\text{Na}-\text{K}$ pump の活性化と不活性化の 4 成分に区別できるが、無 Ca 液中での明らかな $\text{Na}-\text{K}$ pump の増強が確認された。

2) 膜電流要素への効果 無 Ca^{++} 液中では背景電流 I_b は抑制され、異常整流を示す外向き電流 I_{K1} も抑制された。また Ca^{++} 欠下の速い内向き電流 I_{Naf} には著変は認められないがやや抑制され、遅い内向き電流 I_{Nas} はその activation が速く、inactivation が遅く、 Na^+ 欠下の I_{ca} と逆の所見を示した。しかし I_{Nas} の再分極後の deactivation は著しく速やかであった。他方、遅延整流を示す外向き電流 I_x はその activation が無 Ca^{++} 液中で著しく遅延し、再分極後の deactivation は加速され、これらも Na^+ 欠下 ($[\text{Ca}]_i$ 増大下) の I_x の速い activation, 遅い deactivation と対比的な効果を示した。

結 論

これらの膜電流への効果から、 Ca^{++} 欠下の長い低いプラトー相をもつ活動電位は主として持続の長い I_{Nas} に依存し、遅れて出現する急峻な再分極は潜時をもって急増する I_x によることが明確になった。他方、 $\text{Na}-\text{K}$ pump の増強は細胞内 $[\text{Na}]_i$ 濃度の増加による 2 次効果か、それとも直接の一次効果であるかはなお検討が必要であるといえる。

心房筋の力速関係と力学定数について

真島英信（順天堂大・医・第二生理）

カエルの心房より長さ約1 cm, 直径500 μm 以下の筋線維束を切り出し, 力速度関係を求めた。筋を Ca^{2+} 9 mM を含むリンガー液中に水平に置き, 10 Hz の交流を用い, 筋の長軸に直角方向の電場刺激(20 V/cm)を加えると強縮(定常収縮)がえられる。最大張力, F_m , のえられる長さを至適長, L_m , とする。この長さでは静止張力が大きいので0.9 L_m の長さを初期長とした。それでもまだある程度の静止張力があるので, 短縮速度の測定には急速解放は不便であり, 後負荷法によった。温度は20 °Cに固定し95% O_2 と5% CO_2 の混合ガスを通気した。筋試料の一端に等尺性レバー, 他端に等張力レバーをとりつけ, 種々の負荷による短縮速度を測定した。27 例中6例において直角双曲線をなす力速度関係がえられた。他の21例は筋線維の配列が不規則だったり, 実験中に千切れたりして良い結果がえられなかった。6例については, 力学定数として $a/F_m = 0.27$, $b/L_m = 0.25$, $F_m = 0.87 \text{ g/mm}^2$ などがえられた。これから, $V_{\max} = 0.93 L_m / \text{sec}$ となった。これらの値をカエル心室筋のものと比べると, a/F_m は心室筋の約1/2であり, b/L_m は約1/3, $V_{\max}$ は1/1.5である。つまり, エネルギー遊離速度は1/3であるが, 力損失が1/2なので, $V_{\max}$ は1/1.5でそんなに遅くなっていない。従来のデータはすべて単収縮について求められているが, 心房筋の方が心室筋より速度が速いとされている。しかし強縮でみると, 心房筋より心室筋の $V_{\max}$ の方が大きい。もっとも心房筋の速度にしても従来の報告より大きい速度となっている。これら a , b の値を知ることにより, われわれの心筋モデルにおける連結橋滑走部のパラメーターを決定することができる。連結橋運動については静止状態をR)とし, Caがアクチンの活性部(トロポニン)に結合した状態1), ミオシンの連結橋がアクチンに結合して力を発生した状態を2), 連結橋の運動により滑走のおこった状態を3), 連結橋がアクチンから解離した状態を4)とし, 1), 2), 3), 4)間の速度定数をそれぞれ K_1 , K_2 , K_3 , K_4 とする。またそれぞれの状態にある連結橋の間の動力学方程式が導かれる。ここで, $K_2 = \alpha_0 + \alpha_1 v$ と置く, v は滑走速度であり, α_0 , α_1 は定数である。また単一連結橋の発生する力を f とし, 運動に際しては $f v = \beta v$ なる粘性抵抗を受けるものとする。 β は定数である。このモデルの定数状態における運動方程式およびエネルギー遊離速度の式から導かれる関係式を用いると a , b を知ることによって, α_0 , α_1 , f , β , K などを数値的に決定することができる。ここに $1/K = 1/K_1 + 1/K_3 + 1/K_4$ である。カエル心房筋については, $K = 0.63 \text{ sec}^{-1}$, $\alpha_0 = 0.1 \text{ sec}^{-1}$, $\alpha_1 = 2.6 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$, $f = 1.14 F_m / N_m$, $\beta = 1.23 F_m / L_m N_m$ であった。ここに N_m は総連結橋数である。

骨格筋線維への Arsenazo — III の注入

松村幹郎, 越智和典 (川崎医大)

Arsenazo — III 色素は Ca イオンと特異的に結合して特定波長の吸光度を変える物質であり, 近年, この色素を種々の細胞内に注入し活動中の細胞内 Ca²⁺ イオン濃度の変動を測定するのに用いられるようになった。Arsenazo — III は単に入手しやすいばかりでなく, Ca イオンとの反応が速やかであるという利点を持っている。この研究では, Arsenazo — III を筋線維内に注入して, 収縮中に起こる Ca イオン濃度上昇の経過を求めるとともに, これに及ぼす単収縮増強物質の影響を検討した。

トノサマガエル胸部皮筋を実験材料に用いた。倒立顕微鏡のステージの上に筋槽をおき, その中に筋試料を横たえ筋長を自由に換えられるように配置した。収縮中の筋の動きを最小にするために筋線維束を静止長の約 2 倍に引き伸ばし, 筋線維が全長にわたって同時に収縮するよう massive に刺激した。市販の Arsenazo — III を 10 mM KHCO₃ 液にその濃度が 1 mM であるように溶かし, これを通常のガラス微小電極にみだし, 電極を筋線維内に刺入して, $1 \sim 5 \times 10^{-8}$ A の直流を 10 ~ 20 分間通電して電気泳動的に注入した。顕微鏡の光源にはハロゲンランプを使用し, その光束の直径を約 100 μ m としてこの範囲における透過光の変化を 535nm と 605nm の波長において測定し, おおのの吸光度変化の差をオシロスコープに表した。通常 8 ~ 32 回の加算平均をおこなった。細胞外刺激電極から持続 1.0 msec の方形波刺激を与えると Arsenazo — III の吸光度変化は刺激後約 2 msec の潜伏時間の後に開始される (25°C)。この時間は, 細胞内 Ca イオンと試薬との結合に費される時間よりは十分に長いので, 活動電位の発生から筋小胞体 Ca 放出にいたる興奮収縮連関の時間をあらわしているといえる。Arsenazo — III の吸光変化は, 速やかに上昇して 10 ~ 12 msec 後に最高に達し, その後徐々に減少して 70 msec で刺激前の値にもどるが, しばしば 100 msec 以上にわたって刺激前の値よりも高い値にとどまっているのが観察された。Arsenazo — III の吸光度変化を測定した後, 筋長を少し短くして張力曲線を得て, これを吸光度変化の経過と比較すると, 吸光度変化の開始は張力発生より先行すること, 吸光度変化の最高に達する時間は張力曲線の立ち上がりが最大になる時間よりも早いこと, 張力が最大に達する時吸光度変化は $1/2$ 以下に消褪していること, などが明らかになった。リンゲル液の Cl を NO₃ で置換すると, 単収縮は増強されるが, NO₃ リンゲル液中における Arsenazo — III の吸光度変化は, 最大に達するまでの時間が 8 msec に短縮しており, その潜伏時間もまたわずかに短縮し, その消褪時間経過もわずかに遅延しているように見える。NO₃ は収縮の閾値を低下することによって, 活動電位のより早い時期から Ca 放出を開始させることが確かめられた。

従来, 単収縮中の筋形質内 Ca イオン濃度変化は Arsenazo を使って測定されているが (Bli-

nks ら) , その結果と本研究で得た結果を比較すると, Arsenazo-Ⅲ の吸光度変化は, 最高に達するまでの時間が速やかで, しかもその消褪の経過が緩徐であり, 吸光度変化の振幅は温度の変化によってそれ程影響されない, などの相違点が認められている。今後はこの相違の理由を明らかにする必要があると考える。

収縮時の diffracton 強度の変化と張力発生との相関

大羽利治, 堀田 健 (名市大・医・生理)

骨格筋にレーザー光線を照射すると数次の光回折線が観察される。我々はこの光回折線強度のうち, 一次の強度が筋収縮を起こす刺激によって減少することを報告した。(Oba, 1981 ; Oba & Hotta, 1981a)。これはサルコメアのわずかなゆらぎ現象によるものであろうことを推測した。一方 skinned fiber において, 一次の回折線強度の減少の度合はメジウム中のカルシウム濃度に依存していた(Oba & Hotta, 1981b)。このことは一次回折線強度が収縮蛋白近傍の Ca^{2+} 濃度のプローブとして用い得る可能性を示している。今回は単一筋線維を用いて電気刺激時の一次回折線強度変化と発生張力を同時測定することによりこの点を確かめた。

トノサマ蛙半腱様筋から単一線維をとり出し, レーザー光線(4 mW, He, NEC)が筋線維の中心に照射するようにし, 一次回折線強度を筋の上方 35 mm にセットしたフोटダイオード(UDT,

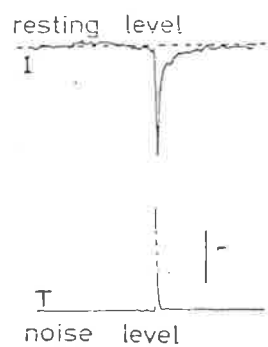


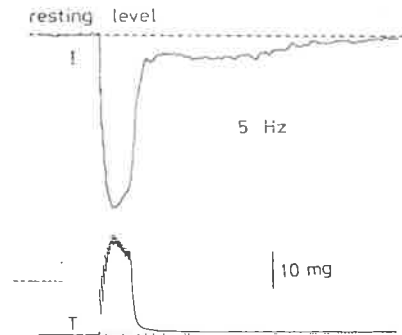
図 1

Santa Monica) で検出し, 増巾後ペンレコーダー上に記録した。一の腱はトランスジューサー(日本光電)に接続した。電気刺激は筋線維をはさんで平行においた 2 本の白金線電極で行った。第 1 図に示すように筋は電気刺激に応答して 10 mg の単収縮が記録された。(静止時のサルコメアの長さ = $2.90 \mu\text{m}$)。この単収縮に対応して大きな一次回折線強度の減少(第 1 図下向きのふれ)がみられた。回復過程は収縮時に比べ遅れを示した。この関係は 5 Hz の電気刺激に対する応答でも同様であった(第 2 図)。静止時のサルコメアの長さを $3.5 \mu\text{m}$ に延ばしても, 収縮の立ち上がりと回折線強度の減少の開始は同時におこるが, 回復の遅れがより大きくなった。この遅れは秒の単位であり, 筋節のゆらぎ現象からは説明できない。張力の立上りと回折線強度の減少の時間関

係について更に詳しくしらべる必要はあるが, この実験結果は張力を一次の回折線強度の減少でモニターすることができることを示している。

文 献

Oba, T., Baskin, R. J. & Lieber, R. L.
(1981) Light diffraction studies of
active muscle fibers as a function of
sarcomere length J. Muscle Res. Cell Mot.
2: 215-224



Oba, T. & Hotta, K. (1981)a: Effect of 2
dantrolene on light diffraction intensity of skinned skeletal muscle
fiber. 8th Int. Cong. Pharmacol. (abst) p. 670

Oba, T. & Hotta, K. (1981)b: Modification of light diffraction intensity
by dantrolene in skinned striated muscle fiber of frog. J. Physiol. soc.
Jap(abst)43: p371

硬直と横紋構造の乱れ

馬 詰 良 樹 (慈恵医大・第1生理)

骨格筋の形質膜を剥離した skinned fiber は ATP, EGTA を含む弛緩液中で膨潤する。また弛緩液に polyvinylpyrrolidone (PVP) のようなポリマーを加えると、浸透圧効果により線維は圧迫され、それを除くと元にもどる。これらの現象は、skinned fiber がその幅方向にも弾性性質を有することを示している。今回は2～3の条件下で skinned fiber の幅を観察し、幅方向弾性性質に寄与する因子を考察した。

〈実験方法〉

ウシがエル半腱様筋から分離した skinned fiber を用いた。弛緩溶液の組成: KCl 100, MgCl₂ 4, EGTA 4, MOPS 10, ATP 4 (mM), pH = 7.0。イオン強度の変化は KCl 濃度の変化によった。ATP を除いた硬直液や ATP を P_i に置換した溶液も用いた。標本は顕微鏡下の容器中に自由に伸展、回転ができるように固定した。幅の測定は対眼マ

マイクロメーター（分解能 $0.5 \mu\text{m}$ ）によった。多くの標本は 0.5% Brij58 15分処理を行った。実験温度は 20°C とした。

〈 結 果 と 考 察 〉

弛緩液に PVP を加えた時の線維幅 (ϕ) は 10% PVP で元の 70% に減少した。これは筋節長 (L) が 2.5 と $4.5 \mu\text{m}$ の双方で同様の関係を示した。 0.6 M KCl 10 分処理 (A 帯溶解) 標本は弛緩液中で ϕ が数%減少し, 10% PVP で 60% になった。 0.6 M KI 処理 (A, I 溶解) 標本は弛緩液 70% , 10% PVP で 30% も ϕ が減少した。 KCl , KI 処理筋とも圧迫後 PVP を除いても圧迫前の ϕ には完全にもどらなかった。以上の結果は A および I フィラメントの存在が幅方向弾性に大きく寄与することを示す。 $L = 2.5 \mu\text{m}$ で高イオン強度処理中に内部規則構造の乱れが intact skinned fiber では生じるが Brij58 処理 fiber では生じなかった。次にクロスブリッジの状態と幅方向の硬さとの関係を求めた。 $L = 2.5 \mu\text{m}$ で弛緩液から ATP を除くと標本は大きく動き (これは硬直張力の発生に対応する) やがて筋節長の不均一な状態で硬直に陥った。そこで不均一さと動きを生じさせないで硬直筋を作成することを試みた。それは弛緩液を 10% PVP を含む弛緩液に置換後, 10% 硬直液, 硬直液と順次置換することにより実現された。硬直筋の ϕ は 80% となった。 $L = 4.5 \mu\text{m}$ では PVP の効果は弛緩, 硬直液中とで差はなかった。以上の結果はクロスブリッジの形成が ϕ を減少させ, さらに幅方向に硬くなることを示す。

幅方向弾性に対するフィラメント間および原線維間の反発力を考慮して pH を変化させた。pH 6 からの間で ϕ は $60 \sim 70\%$ に減少した。この減少は KCl , KI 処理筋でも同様の傾向を示した。また pH 5.5 以下に浸せきした標本の ϕ は再び pH 7.0 にしても, 元にもどらなかった。pH 8.5 $\sim$ 4.0 の範囲では内部構造に著明な変化はみられなかったが, pH 9.0 以上, pH 3.5 以下では fiber は透明化すると同時に著しく膨潤した。

acrolein 系物質と Excitation-Contraction Coupling

藤田和宏, 佐藤義昭, 有馬利昭 (防衛医大・第一生理)

興奮収縮連関 (Excitation-Contraction Coupling, E-C coupling) を化学物質で抑制する目的で, *Xenopus laevis* の骨格筋線維に先ず acrolein を作用させた。その結果, 5 mM の acrolein で 10 分間処理すると, その E-C coupling は完全に抑制される事が判った。

1. この処理は, 静止及び活動電位の大きさに影響せずに, twitch, tetanus, k -

contracture を完全に抑制し, caffeine - contracture を殆ど抑制しない。

2. この抑制作用は irreversible である。
3. 膜の静的電気特性の中, 膜抵抗だけを大きく減らし, 約 $1/2$ にする。
4. 他のアルデヒドには, acrolein 作用 (静止及び活動電位, caffeine contracture と無影響で, 収縮と K - contracture を抑制する) を真似るものは今迄の所見当らなかった。

以上から, この E-C coupling 抑制作用は acrolein 分子内のアルデヒド基と二重結合部位に関係を持つかも知れない事が示唆された。そこで先ず, acrolein 作用と SH 基との関係を検討した。

1. SH 阻害剤は E-C coupling を抑制しない。
2. システイン, その他 monothiol 類は acrolein の抑制作用を減弱させる。
3. ジチオスレイトール (DTT), ジチオエリスリトール (DTE), ジメルカプロール等の dithiol 類は acrolein の抑制作用を可逆的にする。

以上から, acrolein の抑制作用は, 筋細胞側の SH 基に無関係でアミノ基を介して発現する事, acrolein は dithiol 類と complex をつくり, 可逆的な作用となるであろう事が判った。この結果に基づき, acrolein と DTT の共存溶液をつくり, ゲル透過クロマトグラフィー分析による complex 分離を試みた。

1. acrolein, DTT の何れよりも早い fraction 位置で, 新たに物質が溶出する。
2. この物質には SH 基が存在せず, アルデヒド基が証明された。
3. この事から, この物質は, 2 分子の acrolein に 1 分子の DTT がスルフィド結合した鎖式ジアルデヒドで, 分子量 266 であると推定される。
4. この acrolein 誘導体の E-C coupling 抑制作用は可逆的である。

結 論: 1. acrolein 及び acrolein-dithiol complex 等の acrolein 系物質は E-C coupling を抑制し, この抑制には少なくともアルデヒド基が重要因子となっているものと思われる。 2. 前者は不可逆的に作用し, 後者の作用は可逆的である。 3. acrolein-dithiol complex の作用は E-C coupling 部位に撰択的であり, acrolein は膜抵抗を減少させる。E-C coupling の抑制は一種の“抵抗”の増加であるから, acrolein 系物質は, E-C coupling 部位に特異的な様式で作用し, その結果電氣的に著明な抵抗増大を起している可能性があり, 換言すれば, E-C coupling 部位は周囲とは可成り異なる特徴的なものであると推定される。

甲状腺機能低下症における

特異性筋隆起 (idiomuscular contraction) 現象の亢進について

水 沢 英 洋 (浜松医科大・第一内科)

高 木 昭 夫 (国立武蔵療養所神経センター)

杉 田 秀 夫 (東京大・医・脳研)

1. はじめに

特異性筋隆起とは、筋を叩打したときに生ずる持続的局所収縮であり、横紋筋に普遍的に見られる現象である。昨年の本報告にて明らかにしたように、本現象は1) 表面膜, T小管あるいはT小管小胞体連結とは本質的には関係なく、小胞体そのものと密接な関係を有し、2) おそらく叩打により小胞体から直接的にCa⁺⁺イオンが放出され、収縮系を活性化して生ずると考えられる。臨床的には甲状腺機能低下症や悪液質などにおいて特に出現しやすい(亢進している)ことが注目されているが、今回この特異性筋隆起現象の易出性(亢進)について以下の実験を行った。

2. 方 法

10週令のウィスター系雄ラットを甲状腺全摘群と対照群(副甲状腺の移植のみ)とに分け、12週後にひらめ筋および長趾伸筋を検索した。1側の筋は昨年と同じ方法で叩打し、出現した筋隆起の大きさ(強縮張力に対する筋隆起張力の百分率で表示)と、持続時間(筋隆起張力の半減期で表示)を叩打の強さを色々変えて比較した。他側の筋は、5 mM EGTA 溶液で化学的にスキンドファイバーとし、分離した単一筋線維につき、 3×10^{-5} M Ca⁺⁺ による最大張力(P₀)と、 10^{-6} M Ca⁺⁺ 溶液に浸漬後40 mM カフェインで生ぜしめたカフェイン拘縮の張力(P_{caf})を測定し、P_{caf}のP₀に対する比をCa摂取指数として比較した。

3. 結 果

甲状腺機能低下群においては、対照群と比して筋隆起の大きさ、持続時間ともに有意に増加しており、その差は強い叩打より弱い叩打でより明らかであった。また対照群を100%としたときの単一筋線維のCa摂取指数は、タイプ1線維76.5%、タイプ2線維78.9%、最大張力はタイプ1線維74.1%、タイプ2線維49.7%と有意に低下していた。

4. 考 察

筋隆起の易出現性の原因としては、① 叩打の強さは一定でも小胞体からCa⁺⁺が放出されやすい。あるいは② 放出Ca⁺⁺量は一定でも収縮系がより強く反応する。という2つの可能性がある。今回実験的甲状腺機能低下症ラットの筋隆起の出現しやすい筋においては、Ca摂取指数によって表わされた小胞体機能と最大張力によって表わされた収縮系の機能がともに障害されていることが明らかとなった。したがって上記②の可能性は非常に少ない。もちろん摂取指数の低下は、Ca⁺⁺放出のしやすさを直接的に示すものではないが、小胞体機能の一面を表わす指標と考えることは可能である。

現在のところ特異性筋隆起の易出現性は、小胞体の障害により叩打でCa イオンが放出されやすくなっているためと推定される。

Chromatic and achromatic channels in the
visual system. How colors depart from gray ?

(1981. 9. 29)

M. Guirao (Laboratory of Sensory Investigation,
University of Buenos Aires Medical School)

赤絵具に白絵具を混ぜてゆくと赤色の鮮やかさが次第に白っぽくなり（飽和度が減少し）最後には白と区別がつかなくなる。このような表面色の鮮やかさの感覚に心理学の Stevens の法則が適用出来るかどうか調べた。

Stevens の法則とは感覚の大きさ（ ϕ ）と刺激の物理量（ S ）がべき関数で表わされる。

$$\phi = k S^n \quad k, n : \text{定数}$$

このべき乗法則は心理物理学における基本的法則であり、あらゆる感覚について適用されている。実験には青から赤まで15色のテンペラ絵具を選び、これを各々灰色を混ぜて色純度の異なる115色の色紙（5cm角）を使用した。各色紙の色純度は色度計を用いて測色した。色紙の明度率は約20%にしたが明度率は結果に影響しなかった。

この色紙を自然光下又は昼光色蛍光灯下に置き暗室の被検者（10名）に窓を通して（視角4°）一枚ずつ呈示し、色の鮮やかさ（飽和度）を数値で答えさせた（分量評定法）。

このようにして色紙に塗った塗料の色純度（ P_c ）と被検者の飽和度の感覚（ S ）を求め両対数グラフにプロットすると

$$\log S = k + n \log P_c$$

の関係が得られた。 k 及び n は色紙の色（波長）に依存しており、 n は黄色（577 nm）で最大値4.06を示した。青及び赤色では約2.0に低下していた。又 k は、ほぼ n の逆数の関係にあった。次に色紙の視角を0.7°にして同じ実験を行ってみると n の値は黄色で変わらず他の色は全て4°の実験に比べて増加していた。このようにStevensの法則が適用されることが分った。

これらの結果から表面色の飽和感覚では黄色の飽和度閾が高く、かつべき数が大きいいため黄色の弁別が悪いと結論される。この結果はサルを用いた生理学的実験における外側膝状体の神経細胞の活動で見られた知見とも一致するものである。

（大塚輝彌）

Physiological mechanisms of the axoplasmic flow

(1981. 11. 10)

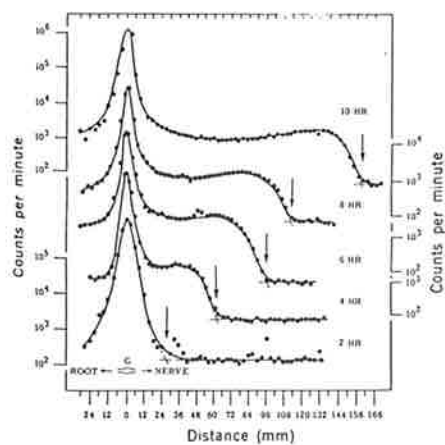
Sidney Ochs

Waller, Weiss らを先駆として軸索内輸送の研究が進められてきた。我々はトリチウムでラベルしたロイシン (^3H -leucine) をトレーサーとしてネコ腰髄第7後根神経節内に注入し、坐骨神経軸索内の放射性活性を測定することにより fast axonal flow を観察した。その結果図1のように神経節に放射性活性のピークが見られ、それから離れるに従い急速に低下してからプラトーに達し、やがて再上昇を見た後、低下消失する。この輸送速度は動物種、軸索の直径、髄鞘の有無、神経の種類(運動性か知覚性等)によらず一定であることが特徴で、その値は $410 \text{ mm} / \text{day}$ (at 38°C) であった。

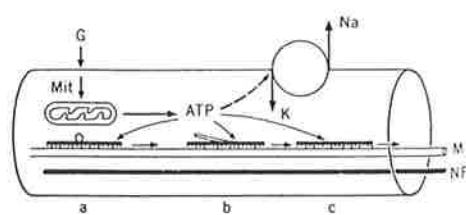
この輸送 Sodium cyanide, dinitrophenol, azide などの代謝阻害剤、或いは anoxia によって阻害され、この際軸索 ATP 濃度が減少していることから ATP 依存性であると考えられる。また ^3H -leucine をとりこんだタンパク分子は、その分子量にかかわらず一定の速度で輸送されることから共通の輸送担体が存在すると思われる。colchicine が輸送を阻害することから輸送担体は microtubule と深い関係を持つものであろう。以上を総括して、microtubule の上を輸送物質を載せた担体 (sliding filament) が滑っていき、この energy は Na-K ATPase を介して供給されるという transport filament hypothesis をたてた (1971 年)。今回は我々はこのモデルに Ca-Mg ATPase を加えた新しい仮説を提出する(図2)。Ca 依存性とした根拠として、① desheathed nerve で外液 Ca^{2+} 濃度を 0mM にすると輸送は止まり、 Ca^{2+} 濃度を正常かそれ以上にすると正常の輸送が見られること、② 冷却によって microtubule を tubulin に分解するとこの tubulin が Mg-Ca ATPase 活性を持つこと、③ Calmodulin に結合する trifluoropyridine によって輸送が阻害されることが掲げられる。但し軸索内 calmodulin 濃度は Ca-Mg ATPase を活性化するには少量すぎるものが問題点として残る。今回は slow transport system については述べなかったが、この system は独立して存在するのか或いは fast transport system よりの脱落が slow transport に見えるのかは不明である。

(川野 晃一)

1



2



Synaptic transmission from photoreceptors to the second-order neurons in the turtle retina.

(1981. 11. 26)

David Copenhagen (Dept. of Ophthalmology, School of Medicine, University of California at San Francisco)

脊椎動物網膜の視細胞と2次ニューロン間の信号伝達は化学シナプスによって行われている。雑音解析法を用いてこのシナプス伝達の時間特性を調べ視細胞と2次ニューロン間のシナプス伝達機構を明らかにした。

網膜細胞には数 mV に達する膜電位の動揺が見られる。この電位動揺の振巾(分散値)は光照射によって変化し細胞内通電による膜電位の上下に無関係であることから光照射に伴う細胞の活動及びシナプス伝達に関係すると考えられる。そこで視細胞と2次ニューロンの電位動揺をフーリエ変換しパワースペクトルを求めて両者を比較することにより視細胞—2次ニューロン間のシナプス伝達の時間特性を得て伝達機構を定量的に解析した。実験にはカメ網膜を用いた。

視細胞—双極細胞間のシナプス伝達機構： 双極細胞は中心部照射による応答の違いから過分極性双極細胞(HBC 又はオフ中心型双極細胞)と脱分極性双極細胞(DBC 又はオン中心型双極細胞)に分けられる。これらの双極細胞の光照射に伴う膜抵抗変化、平衡電位、光強度と応答振巾の関係及び雑音解析法によるシナプス伝達の時間特性などの結果から双極細胞の応答は次のように推定される。光照射によって視細胞の伝達物質が放出を止めるとHBCの場合にはイオンチャネルの開き(時定数 10 msec)に関係する伝達物質が減少するため過分極し、DBCはイオンチャネルの閉じ(時定数 40 msec)に関係する伝達物質が減少するため脱分極する。この推論はフラッシュ光刺激による視細胞と双極細胞のインパルス応答の解析からも裏づけられた。

視細胞—水平細胞間のシナプス伝達機構： 水平細胞の応答には錐体由来の早い時間経過の過分極性応答と杆体由来の遅い過分極性応答が重畳する。これら時間経過の異なる応答が杆体と錐体の電位変化を反映しているかどうかを確かめるため、2本の電極を杆体と水平細胞又は錐体と水平細胞に刺入し、フラッシュ光に対する応答を同時に記録した。この応答から逆コンボリューションによって細胞間の伝達関数を求めた。杆体—水平細胞、錐体—水平細胞間の伝達関数は一次のローパス、フィルターで近似出来、両者の時定数を比較すると杆体—水平細胞間の方が約10倍大きかった。これは杆体のシナプス伝達が錐体に比べて遅いことを示唆している。

(大塚輝彌)

細胞および分子レベルの協同現象 (1981.12.4~5)

— モデルと現実 —

概 要

志賀 健 (愛媛大・医)

協同現象と数理 I

亘 弘 (生理研)

協同現象と数理 II

品川嘉也 (京都大・医)

分子レベルでの現象 I

曾我美勝 (岐阜大・医)

分子レベルでの現象 II

前田信治 (愛媛大・医)

アロステリーのモデルと現実

中馬一郎 (大阪大・医)

細胞内顆粒での現象 I

入交昭彦 (高知大・医)

細胞内顆粒での現象 II

辻本 毅 (和歌山医大)

神経膜での現象 I

竹中敏夫 (横浜市大・医)

神経膜での現象 II

北里 宏 (滋賀医大)

細胞膜での現象 I

宮本博司 (近畿大・医)

細胞膜での現象 II

今井雄介 (大阪医大)

細胞間での現象

菅野義信 (広島大・歯)

概 要

志 賀 健 （愛媛大・医）

分子レベルにおける協同現象についてはヘモグロビンを筆頭にタンパク構造と機能の関係が詳しく議論されている。一方、細胞レベルの機能についても協同現象の如き現象が広くみられ、特に膜内機能性タンパクの働きについて実験的には協同現象ないしリンケージ現象が多く知られてきた。本研究では、分子・細胞下・細胞および細胞間の各レベルにおいてどのような協同現象があり、現存の数値モデルとどう対応し、現時点での問題点を検討することとした。

1. （分子レベルの現象と理論）ヘモグロビンでよく知られた協同現象について実験事実と現象論的理論との対応が呈示され、実験技術の向上により従来の理論での対応できない局面が始まっていることが今後の問題点となる〔中馬，亘〕。また、アルブミンへの非特異的結合においても現象的には協同性を考慮すべきことも示された〔曽我美〕。

2. （膜現象と理論解析）赤血球膜〔前田〕，ミトコンドリア膜〔辻本，入交〕とも機能発現に関連して膜タンパクの働きと膜構築のダイナミックスとの関係を実験的にどう検出・解析するかが今後の問題として強調された。

細胞膜〔宮本〕，神経膜〔北里，竹中〕でも膜内の機能性タンパク作用と局所的な膜の動的構造との関係が浮き彫りにされた。

このような現象解析のための理論としては回路網熱力学の応用〔今井〕，非線形現象の解析法〔品川〕が紹介され、モデル化による現象記述と解析の有用性が呈示された。

3. （細胞間における現象）培養細胞間におけるコミュニケーション成立の実体としてイオンチャンネル形成があり〔菅野〕，現象の複雑さをうかがわせた。

二日間の討論の中から現状認識と今後の問題をまとめると次のようになろう。

1. 溶液中の純粋タンパクが示す協同現象もその実体となると現存の分析手段の及ばぬ領域があり、比較的マクロな現象理論は成立しても、よりミクロな構造変化の推定はまだ今後の問題となるだろう。
2. 膜内機能性タンパクの働きについては膜の動的構造の変化がどう起りどう影響するのか、現象のすべてを観測することは不可能であるが、現在の局面では機能性タンパク相互間のリンケージ・膜脂質との相互関係が問題となっている。理論面で、現象の数理的記述はかなりしっかりして来たが、実体との対応はまだ遅れがある。実験上の問題としては *in vitro* 実験系で発達してきた分子レベルの研究法をどのように細胞レベルに持ち込むかが今後の問題であろう。

協同現象と数理 1 — 一酸化炭素ヘモグロビン光解離後の再結合過程の解析—

亘 弘 (生理研)

ヘモグロビンは配位子の濃度の低い場合は結合しにくく、濃度が高くなると結合しやすくなるが、これは飽和度曲線がS字状になることから知られる。つまり配分子結合の度合によってその結合の強さが変化していくことを意味し、これは協同現象の一つである。

MWC のモデルはRとTの二つの状態があって、配分子がそれぞれに異なった親和性を持っているというものであるが、高濃度の配位子が存在する場合で4量体のヘモグロビンに配位子が結合して行く過程を考える。RとTに*i*個の配位子が結合したものをR(*i*)とT(*i*)で示すが、R(*i*)あるいはT(*i*)に配位子が結合する場合、高い濃度であると一次反応と考えてよい。これらの速度定数をそれぞれ*a*(*i*), *b*(*i*) (*i*=0, 1, 2, 3)とし、R(*i*)とT(*i*)の転換の速度定数を*c*(*i*), *d*(*i*) (*i*=0, 1, 2, 3, 4)とする。この反応スキームを図1に示し、この微分方程式を(1)式に示す。

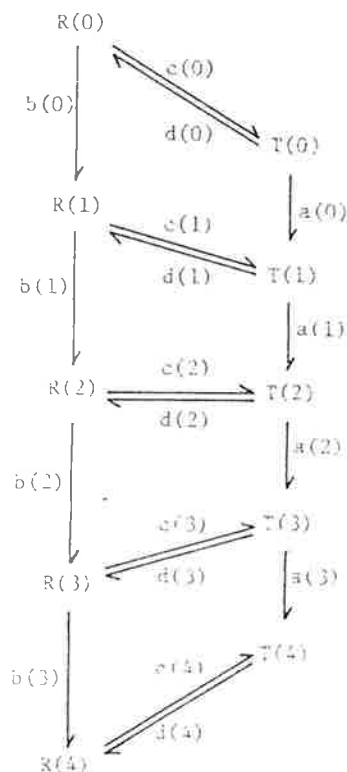


図 1

$$\begin{aligned}
 & \frac{dR(0)}{dt} + [b(0) + c(0)] R(0) - d(0) \cdot T(0) = 0 \\
 & \frac{dR(0)}{dt} + [a(0) + d(0)] T(0) - c(0) \cdot R(0) = 0 \\
 & \frac{dR(i)}{dt} + [b(i) + c(i)] R(i) - d(i) \cdot T(i) = b(i-1) \cdot R(i-1) \quad (i=1, 2, 3, 4) \\
 & \frac{dR(i)}{dt} + [a(i) + d(i)] T(i) - c(i) \cdot R(i) = a(i-1) \cdot T(i-1) \quad (i=1, 2, 3, 4)
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

この微分方程式は完全にとくことができ、(2)式のようになる。

$$\begin{aligned}
 R(i) &= \sum_{j=0}^i [R_{i\alpha j} \cdot e^{\alpha(i)t} + R_{i\beta j} \cdot e^{\beta(i)t}] \quad (i=0, 1, 2, 3, 4) \\
 T(i) &= \sum_{j=0}^i [T_{i\alpha j} \cdot e^{\alpha(i)t} + T_{i\beta j} \cdot e^{\beta(j)t}] \quad (i=0, 1, 2, 3, 4)
 \end{aligned}
 \tag{2}$$

$\alpha(i)$, $\beta(i)$ は速度定数のみに依存し, $R_{i\alpha j}$, $R_{i\beta j}$, $T_{i\alpha j}$, $T_{i\beta j}$ は速度定数および初期値の関数となっている。

$a(3) = 138 \text{ sec}^{-1}$, $b(3) = 5756 \text{ sec}^{-1}$ として $a(i) = (4-i) \cdot a(3)$, $b(i) = (4-i) \cdot b(3)$ のような速度定数を, アロステリック定数 L と C をそれぞれ 1917, 0.14 として $c(i)/\alpha(i) = LC^i$ の関係を持つように $C(i)$ と $d(i)$ をきめる。 $T(0)$ の初期直を 1 および $R(0)$ の初期直を 1 として解いたものをそれぞれ図 2a および図 2b に示す。

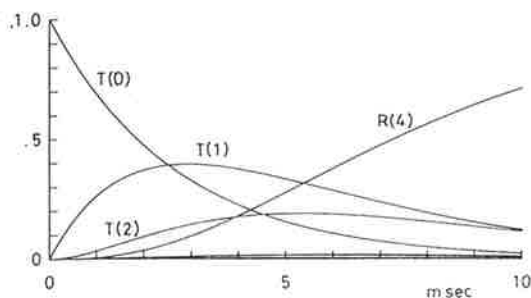


図 2a

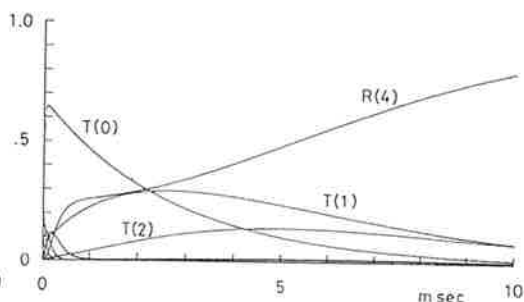


図 2b

反応を光の吸収で観測するとき, $R(i)$ と $T(i)$ との吸収が同じで, かつ配位子が 1 個着くごとに吸収が 1 減少するものと仮定すると, 吸収の差 ΔA は

$$\Delta A = \sum_{j=0}^3 \left[\sum_{i=j}^3 (4-i) \{ (R_{i\alpha j} + T_{i\alpha j}) e^{\alpha(j)t} + (R_{i\beta j} + T_{i\beta j}) e^{\beta(i)t} \} \right] \quad (3)$$

($i=0, 1, 2, 3$)

のように表すことができるが, これは $\alpha(i)$ と $\beta(i)$ を緩和定数とする緩和現象に他ならない。

(3) 式に初期値として $T(0) = 1$ を用いて計算したものを図 3a に, $R(0) = 1$ の場合を図 3b に示す。

図 3a では $R_{1\alpha 1}$ と $R_{1\beta 1}$ が 0 となるので, $R(0)$ からの緩和は全く観測されないことを意味している。つまり実験的に異なる初期値の条件を作って, これからの緩和を観測すると, すべての速度定数が知られることになる。

このように平衡定数の測定のみでは, その中に存在するすべての緩和が見られず, 解析が不可能である。したがって協同現象を緩和現象と眺めることによって, 現象の把握についての新たな進展が期待できよう。

協同現象と数理 — 膜透過と協同現象 —

品川 嘉也 (京大・医・生理)

非協同現象は本質的には、孤立系における独立現象で近似され、平衡からはずれている場合でも一様に平衡に接近することが多く、線型方程式かそれに近い形で表現される。協同現象は、二つ以上の現象の相互作用であり、二次以上の非線型方程式で表現される。

非線型方程式の特色(1)解は一意的でなく非決定論的である、線型方程式が一つの初期値に対して一意的な解を持つことと対照的である。(2)飽和現象はS字型で起り、線型方程式の双曲線型とは異なる。(3)解の爆発、有限時間内に無限大となる解があり、増加は双曲線的、線型方程式では指数関数的増加までである。(4)Threshold の存在、閾値を境に解の様子が定性的にも変る。(5)分岐、不安定平衡解は二つの枝のどちらにも移行できる。これらの特色は何れは協同現象と共通で、非線型方程式が協同現象を表現するのに適していることを示している。

電解質の膜透過。非線型方程式Nernst-Planck-Poisson の連立微分方程式で記述される。正負のイオン流束の間の協同現象であり、方程式が爆発解を持つことを報告した。

非電解質の膜透過、基本方程式はKatschalsky-Kedem-Currana の連立微分方程式で、やはり非線型である。溶質流と体積流の連結が強い場合にオーバーシュートが見られる(溶質量、溶質濃度、細胞溶積がすべて平衡値を上廻る)。またリミットサイクルを持つ振動現象がみられ、培養細胞における膜振動現象に対応していることが見出された。これらは、担体輸送において著しく、膜内濃度が高いことが必要条件であるから、高い担体濃度を前提としている。これらの解は当研究で初めて報告されたものである。

Key Words; Non-Linear equation, Membrane transport

1) 品川嘉也, 上坂伸宏, 品川泰子, 亀山亜砂子, 日本生理学会 (1982)

大沢一爽, 星 猛: 赤血球および小腸刷子縁小胞における糖輸送の膜方程式

2) Y. Shinagawa: Exact solution of in "Dynamic aspect of Nernst-Planck-Poisson equations. Membrane Transport" Elsevier (1982)

血漿アルブミン分子における協同現象

曾我美 勝 (岐大・医・第二生理)

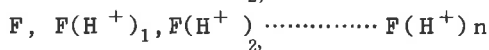
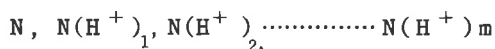
牛血漿アルブミン(BPA)は酸性側においてN-F転移(pH 4.4 - 3.8), 酸膨潤(pH 3.6 -

2.8), 中性領域におけるN-B 移転 (pH 7.0 - 9.0) なる構造転移を示す。これらの構造転移は協同現象的で, Foster ら⁽¹⁾(1957) は Monod, Wyman, Changeux⁽²⁾(1965) による

Allosteric Model と全く同一の理論をN-F 移転について発表している。比較のため, Table I にBPAとHb の性状を示している。BPAの場合はHbと異なり, 結合Ligand 数, 2種類の構造を非常に容易に, しかも精確に測定し得る。筆

TABLE I

	(Hb)	(BPA)
者は (3) 式を用いN-F 移転における $\Delta\nu_{H^+}^-$ 値が	To $\rightleftharpoons$ Ro	No $\rightleftharpoons$ Fo
測定方法により如何に変化するかを調べた ⁽³⁾ N-F	L = To/Ro $\gg$ 1	1/Ko = No/Fo $\gg$ 1
転移は非常に協同現象的で, しかも少くとも2種類	O ₂	H ⁺
の協同現象的構造転移より構成されることを見出し	K _T , K _R	K _{H⁺,N} , K _{H⁺,F}
た。またHill Constant (n _H) に対応した $\Delta\nu_{H^+}^-$	DPG	ANIONIC SURFACTANT
の類値は, BTA分子のMicroheterogeneity ^(4,5)	($\alpha\beta$) ₂	3 - POMAIN
により大きな影響を受けることを見出した。	n _H $\sim$ 2	n _H $\sim$ 3



$$K = \frac{(\text{Fo})(1 + K_{H^+}, \text{FaH}^+)^n}{(\text{No})(1 + K_{H^+}, \text{NaH}^+)^m} = K_o \frac{(1 + K_{H^+}, \text{FaH}^+)^n}{(1 + K_{H^+}, \text{NaH}^+)^m}$$

$$\frac{\partial \ln K}{\partial \ln a_{H^+}} = \Delta\nu_{H^+}^- \quad (2)$$

BPA-Dodecylbenzene sulfonate 相互作用も協同現象的の反応であり, 構造転移における $\Delta\nu_{H^+}$ は25と36の反応が2種類ある。

Allosteric Transition, Cooperative Transition AND Binding, Plasma Albumin

1) Foster, J. F. & Aoki, K. J. Phys, Chem. 61, 1369-1374 (1957)

2) Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J. P. Mol. Biol. 12, 88-118 (1965)

3) Sogami, M., Era, S., Nagaoka, S. & Inouye, H. Int. J. Peptide Protein Res. 607 (in press) (1981)

4) Sogami, M. & Foster, J. F. J. Biol Chem. 238, PC 2245-2247 (1963)

5) Decker, R. V. & Foster, J. F. Biochemistry 5, 1242-1254 (1966)

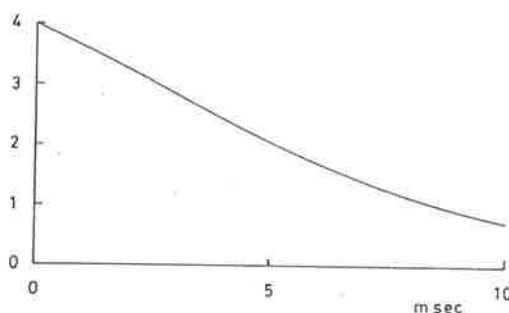


図 3a

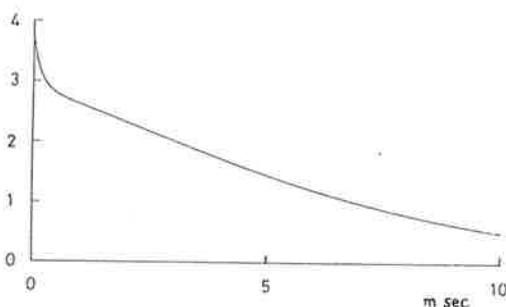


図 3b

分子レベルでみた赤血球の生体加齢現象

志賀 健, 前田信治, 昆 和典,
須田武雄, 関谷美鈴 (愛媛大・医・第二生理)

赤血球が骨髄で産生され, 約 120 日の寿命で脾臓にて破壊されるまでの過程で, (1) 赤血球内代謝活性の低下 (各種酵素活性の低下), (2) 酸素運搬機能の減少, および (3) 赤血球浮遊液粘度の上昇がおこる。これらの機能障害の原因を明らかにする目的で, 若い血球と老化血球を密度勾配遠心法で分離し, 赤血球の各構成要素の加齢にともなう状態変化を検討した。

(1) 解糖素代謝状態: 加齢にともなうグルコース消費量および乳酸産生量は低下した。老化血球では解糖系中間代謝物質である 2, 3-DPG 量, 高エネルギー化合物 (ATP) 量は常に低レベルにあった。

(2) 酸素運搬機能: 老化血球においては 2, 3-DPG 量の減少により酸素に対する親和性は高く, 末梢組織への酸素供給量は減少していた。

(3) 赤血球浮遊液粘度: 老化血球では変形能の低下による浮遊液粘度の上昇がみられた。その原因として: (i) 形態変化: 加齢にともなう膜脂の脱失により容積が減少して球形化する。ATP 量の減少も形態変化と関係する。 (ii) 内部粘度の変化: 血球容積の減少によりヘモグロビンは濃縮され内部粘度が上昇する。 (iii) 膜の粘弾性の変化: 脂肪酸スピンドラベル法でみる限り老化血球では明らかに膜の流動性は低下していた。老化血球においては ① 総脂質/タンパク比の減少 (コレステロール/リン脂質比は不変), ② 陰イオン輸送タンパク (band 3) の機能変化, ③ 膜の裏うちタンパク (Spectrin) の構造変化が観察され, 膜流動性の低下は膜脂質とタンパクとの相互作用の変化および膜タンパクの質的变化に起因するものと考えられた。

以上の結果から, 赤血球は老化にともなって代謝活性および酸素運搬機能が低下するだけでなく

流体力学的な性質も障害されて血液粘度を上昇させ、末梢循環抵抗が増して脾臓でも補促されやすいものと思われる。

アロステリーのモデルと現実

— ヘモグロビンを例にとって —

中 馬 一 郎 (大阪大・医・第一生理)

現在、アロステリーのモデルには、大きく分けて Monod-Wyman-Changeux (MWC) の提出したものと、Koshland-Nemthy-Filmer (KNF) のものと 2 種類がある。これらをヘモグロビン (Hb) について観測されるアロステリーの諸現象についてはあてはめてみて、どちらがより現実に近いかを検証することはかなりむずかしい問題である。定性的にはどちらのモデルでも現実をかなりよく説明できる。しかし、定量的に微細な点まで立入って検討すると、両モデルとも提出された型式のままでの現実と一致しないところが目立ってくる。これを解消するようにモデルを改変すると、必然的にパラメータの数が増し、モデルの魅力がなくなってしまう、というのが現状である。

目下のところ MWC の two state model が大勢として受け入れられているのは、以下の二つの事実からである。

- (1) 多くの異常 Hb や化学修飾 Hb の四次構造が、酸素親和性の高い R 状態と、酸素親和性の低い T 状態におおむね分類でき、 O_2 の結合していない R 状態や O_2 が 4 個結合している T 状態もある。
- (2) Hb の物理化学的な量は O_2 の結合に伴って変化するが、二つの状態の重ね合せで説明できるものが多い。

四次構造は R と T の 2 種類しかとりえないものかどうか、が二つのモデルの当否を決める鍵になる。これを検証するには O_2 を 1～3 分子結合した中間酸素化段階の Hb 分子種の性質を調べなければならない。しかし、この目的には X 線解析は使えず、また協同性のためにこの中間体分子種の生成する役割は極めて少ない。これらの事情からこの方向の研究は、新しい研究方法の開発を要求している。

アロステリズム ヘモグロビン MWC モデル KNF モデル

- 1) Tyuma, I., K. and Shimizu, K. Analysis of oxygen equilibrium of hemoglobin and control mechanism of organic phosphates. Biochemistry, 12, 1491-1498 (1973)

- 2) 中馬一郎 酸素に伴うヘモグロビン高次構造の変化呼吸と循環, 25, 664-670 (1977)
- 3) 中馬一郎 タンパク質の4次構造の機能, 岩波講座・現代生理科学1・生命の物理化学的基礎, 193-241 (大井龍雄, 佐藤了 編) (1975)

“細胞および分子レベルの協同現象 — モデルと現実 — ”

細胞内顆粒の誘電挙動とモデルによる解析

志 賀 健 (愛媛大・医・生理)

入 交 昭 彦 (高知医大・生理)

浅 見 耕 司 (高知医大・生理)

細胞あるいは細胞内顆粒の限界膜や内相の電気的性質を知るのに、それらの懸濁液の誘電挙動を解析することは有力な方法となるが、それにはモデルの設定が必須である。従来用いられてきた“single-shell”モデルおよびこれを一般化して得られる“multi-shell”モデルの特徴と現実の解析への適用法については昨年度の本研究会(本年報2, 480)において報告した。今回は、上記multi-shellのモデルの最も簡単なばあいである“double-shell”モデルに依拠して、単離ミトコンドリアを解析したので、その結果を中心に今後の見通しを述べる。

常法によりラット肝からintactミトコンドリアを調製し、130 mM KClに懸濁したものの複素誘電率を10 kHz ~ 500 MHzにわたって調べると、全体の分散図はいわゆるDebye型(均質single shellに相当)とは勿論のこと、単一のCole-Cole型(不均質single shellsに相当)ともかなり異なるbroadな誘電分散を示した。そこで2つの中心緩和周波数($f_{01} \approx 2$ MHz, $f_{02} = 20$ MHz)をとり、その周りに軽度($\beta_1 = 0.9$, $\beta_2 = 0.8$)の分布を仮定して理論的誘電分散図を描くと、実測誘電挙動をほぼ完全にsimulateできた。正常ミトコンドリアは内外2重の膜をもつから、電顕的に得た形態パラメータ値を用いて“double-shell”モデルに基づくcurve fittingを行えば、内膜・外膜などモデルの各相の電気パラメータが得られる。その結果を列挙すると：内膜と外膜の電気容量はそれぞれ0.4-0.9および1.4-1.9 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ；膜間相の導電率は外液のそれに等しい；内相(マトリックス)の導電率は外液の $1/5 - 1/3$ であることが分った。内・外膜の厚さはほぼ同じだから、容量の差は膜誘電率の差を意味する。また内相の低導電率は電解質濃度の低値あるいはマトリックス内の膜構造を反映するものであろう。

いずれにせよ、外膜を除去したミトコンドリアでは、他の細膜内顆粒（たとえばクロマフィン顆粒）や単層リボソームなど single-shell モデルで近似されるものと同様の誘電挙動がみられるから、intact ミトコンドリアに対してはここで用いた “double-shell” モデルの適用がより適切と考えられる。

今後、さらに外膜のベシクルを調整し、その解析結果と上記数値を比較することにより、モデルの選択および解析法そのものの妥当性を検証すべきであろう。後者の検討は、単一リボソーム（直径 $\sim 2\text{nm}$ ）について実施したところ、全く問題のないことが示された。

- (1) 浅見, 入交, 白石, 内海 (1981) 細胞内顆粒の誘導解析——ミトコンドリア。日本生物物理学会第19回年会予稿集, 326.
- (2) Irimajiri, A. Asami, K. (1981) Dielectric properties of isolated chromaffin granules as revealed by fast impedance analysis. VII Int. Biophys. Congr. (Mexico City) Abstr. 256.

逆呼吸調節

辻本 毅 (和歌山医大)

ADPによるミトコンドリアの呼吸刺激はorganic mercurialのmersalyl (約 $6\text{nmol}/\text{mg protein}$)によって消失するのみならず、更に抑制されることをみた(逆呼吸調節現象)。従来、mersalylは Pi/OH^- 交換反応を阻害するが、 $\text{ADP}^{3-}/\text{ATP}^{4-}$ 交換輸送は阻害しないとされている。然し、 Pi/OH^- 輸送の阻害は $\text{ADP}^{3-}/\text{ATP}^{4-}$ 交換輸送による荷電不平衡を補償し得なくするため、間接的に $\text{ADP}^{3-}/\text{ATP}^{4-}$ 交換を阻害したと推測された。 Pi とADPの輸送阻害は、然しながら、逆呼吸調節の原因たり得ないと考えられる。

Dicarboxylate輸送は、mersalylにより阻害されうるが、使用濃度は低濃度であり、ADPによる即時的阻害を起こすとは考え難い。然しながら、malate輸送の阻害は、malate shuttleによる NADH/NAD 系の酸化還元状態の調節を妨げ、 NADH/NAD 系の酸化型へのシフトを起こしうると推測され、逆呼吸調節の一因たり得ると考えられた。

逆呼吸調節はATP, glutamate + malate + Pi 等による前処理で強化又は軽減された。mersalyl作用は、thiol試薬(cysteine, DTT, penicillamine, Thiola等)により解除、脱抑制されるが、逆呼吸調節の高度な程、thiol試薬による脱抑制は高度であった。低濃度(約 $10\text{nmol}/\text{mg protein}$)のADPによりSH基がunmaskされたことは、ADPのenergy状態に対する影響ではなしに、conformation状態に対する影響によるSH基反応性

変化の起こることを示唆した。

Glutamate + malate, 更に glutamate + malate + Pi (各 3 mM) との preincubation は逆呼吸調節を軽減した。この基質による SH 基の masking 又は unmasking 現象は、ミトコンドリアのエネルギー状態、或いは conformation 状態が、逆呼吸調節の一因であることを示唆し、又、ミトコンドリアのイオン輸送系と酸化的磷酸化反応系の conformation 状態に基づく密接な相互作用を示唆するものと考えた。

神経膜の流動性とそれに対する myrmicacin の作用

竹中敏文, 堀内秀典, 堀内英明 (横浜市大・医・生理)

河崎行繁 (三菱生命研)

myrmicacin は Schildknecht らが 1971 年に南アメリカ産のアリの分泌物の中からとり出した阻害物質の一種である。彼らは、その分泌物の中に含まれていて、発芽を抑える働きをしている物質が炭素数 10 の 3-hydroxydecanoic acid であることをつきとめ、その物質をアリが作る阻害物質という意味で myrmicacin と呼んだ。

myrmicacin は, HeLa 細胞の分裂や植物茎の屈光性に阻害力をもつこと、およびこれらの物質が核分裂を中期以後において阻害できるという特殊な阻害の仕方をすることが明らかにされている。myrmicacin の阻害機構については、現在殆んど知られていないが、これら物質による阻害が、物質除去により容易に回復することなどから、細胞の膜に作用するのではないかと考えられる。そこで神経線維膜に対するその薬物の効果を調べた。まず神経線維の外液に 0.2 ~ 2.0 mM の myrmicacin を投与した時におこる静止電位、活動電位、膜抵抗の変化をみた。myrmicacin を与えると興奮性は 15 分位で消失し、活動電位はなくなる。これに反して静止電位は 2 ~ 5 mV 位しか脱分極せず、膜の抵抗値は全く変化しない。そして myrmicacin を除去すると、この作用は完全にもどりと可逆的であった。次ぎに膜電位固定法で、Na 電流を調べるとそのピーク値が 50 % 減少しているのが分った。一方 K⁺電流の方は myrmicacin によって全く変化をうけない。この事は、myrmicacin が Na⁺チャンネルにのみ働くことを意味する。次に、Fluorescence Photobleaching Recovery (HPR) で膜の流動性に対する効果を調べた。薬物の時は膜の拡散常数は $0.20 \pm 0.5 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{sec}$ であったが myrmicacin 投与後は $0.27 \pm 0.13 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{sec}$ になり、約 30 % の増加がみられた。これらの事からこの薬物は膜の流動性を増加し、その結果として Na⁺チャンネルを阻害するものと考えられる。

膜流動性, ミルミカシン

Inhibitory Effects of Myrmicacin on the Sodium channel in the Squid Giant Axon. Takenaka, T., Horie, H., Hori, H., Yoshioka, T. and Iwanami Y. Proc. Japan Acad. 57B. 1981.

非対称容量性電流の "immobilization" と βh の膜電位依存性

北里 宏, 村山公一 (滋賀医大・第二生理)

静止状態にある神経線維に脱分極を与えたときに流れる容量性電流は、同じ大きさの過分極を与えたときに流れる容量性電流より大きい。この2つの容量性電流の差を非対称容量性電流という。非対称容量性電流はイオン・チャネルのゲートの開閉に関与する極性基の膜での移動を反映していると考えられるので、ゲート電流とも呼ばれている。神経線維をあらかじめ脱分極しておくと、脱分極の大きさに応じて非対称容量性電流は小さくなる。また、脱分極の持続時間と共に非対称容量性電流は小さくなる。Armstrong らは、脱分極の持続時間と共に進行する非対称容量性電流の減少の時間経過がNaチャネルの不活性化の時間経過とほぼ一致することから、Naチャネルの不活性化と呼ばれる現象はNaチャネルの活性化に関与する極性基が脱分極と共に一担チャネルを開く位置へ移動した後さらにチャネルを閉じる位置へ移動し、そこで "immobilize" される結果であると説明している。

われわれは、Naチャネルの不活性化に関与するh因子の速度係数の膜電位依存性を表わす実験式が他の因子の速度係数の膜電位依存性を表わす実験式と非常に異なり、 $1 / (1 + \exp [-(E - E_0) z F / RT])$ の形になることに注目し、この式が膜電位と平衡関係にある極性基の分布状態を表わす式であることから、膜電位が変化すると準平衡的に直ちにその位置を変える極性基とその極性基がある位置を占めると初めてチャネルを閉じるように構造変化を起す部分との2つの因子を考えることによって、脱分極による非対称容量性電流の減少を説明しうる結論に達した。また、Naチャネル不活性化に関与する因子のうち膜電位変化に従って直にその位置を変える極性基の移動は可成り大きな容量性電流をもたらし、これが活性化の因子の移動に基づく容量性電流の上に重畳して記録される可能性を示した。実験材料はザリガニ巨大神経線維である。

ザリガニ巨大神経線維・Naチャネルの不活性化・immobilization・ゲート電流

培養細胞膜 Na ポンプとイオン環境の影響

宮 本 博 司 （近畿大・医・生理）

細胞の Na ポンプに及ぼすイオン環境の影響に関する研究は、赤血球・イカ巨大神経等の特殊で細胞内イオン組成の人為的調節が可能な材料を用いて行なわれてきた。この研究結果と Na, K-ATPase およびその人工膜への組みこみ再構成標品を用いた酵素活性・ポンプ活性の研究結果を照合して、Na ポンプの一般的な性質が推定されてきた。しかし、細胞膜 Na ポンプの一般的な性質を知るためには、上記の生体材料だけでは不十分であると考えられる。そこでヒト上皮細胞の性質を保有する培養細胞である HeLa S3 細胞を用い、細胞内イオン組成を監視しながら、1 価陽イオンの細胞内外レベルと Na ポンプ活性の関係について定量的実験を試みた。HeLa 細胞膜の主な K 輸送機構は、Furosemide 感受性 efflux を除き、K と Rb を全く識別しないので、K のアナログとして Rb を使用することができる。Rb の細胞内蓄積量は、 $dC(t)/dt = J_{Rb} \{1 - C(t)/C_p\}$ で示す割合で増加する。（ $C(t)$ は時間 t における細胞内 Rb 含量、 C_p は Rb で交換できる K プール量、 J_{Rb} は Rb influx 率）。

次に細胞を予め異なる時間に冷却して細胞内 Na 含量、K 含量を変えたのち 37 °C に戻して Na 含量と Ouabain 感受性 Rb influx, Na efflux との関係を見ると、両者の輸送共役比（ Na^+ / Rb^+ ）は Na 含量が正常値附近では 1 に近く、Na 含量の増加につれて 1.5 に近づく。予め十分に冷却した細胞の Ouabain 感受性 Rb influx 率 J は、 $1/J_{max} \{1 + K_{Rb}^1 / [Rb]_0\}^2$ （ K_{Rb} はみかけの Rb 半飽和濃度）の式で表わされるが、対照群の細胞では $[Rb^+]$ が 1 mM 以内のときこの関係が成立する。この式は HeLa の細胞が 2 つの K^+ 輸送部位をもつことを示す。外液の Na はこの部位に対して Rb と競合する。なお上述の予備冷却と対照の細胞に関し、 $1/J$ と $1/[Rb^+]$ の関係を示す 2 直線は互に平行となるが、これは細胞内 Na のポンプ活性に対する関与の様相についてさぐるための手がかりとなるであろう。

細胞および分子レベルの協同現象 — モデルと現実 —

（回路網熱力学による細胞膜輸送現象のモデル化）

志 賀 健 （愛媛大・医）

今 井 雄 介 （大阪医大・医）

生体はいかなるレベルにおいてもダイナミックなシステムとしてみることができる。各システムは多くの要素を含み、要素間の相互作用の総合的結果は機能として表現される。このような機能の

理解のためには、その生体システムをモデル化することが有効である。細胞膜レベルにおいては各種成分の輸送過程、反応過程等の相互連結の結果、全体としての秩序の維持、形成がみられる。従来輸送系のモデル化に等価回路手段が用いられてきた。等価回路法は一種の流れを表現するもので、他種の流れとの相互連結によって生じる影響はそれと等価の素子で表現される。電氣的等価回路ではイオン拡散は濃淡電池の表現で電気回路に組入れられる。等価回路は電氣的および水力的なモデルにおいて成功してきたが、多種の流れを同時に、しかも多くの相互連結を含めて表現する手段ではない。最近発展してきた回路網熱学は相互連結した多種のエネルギーの流れ（パワー）を総合的にモデル化する手段を提供した。ここでは相互連結はパワーの変換伝達を意味するものとなり、ある変換比を持った変換体として表示される。このような一般化されたパワー変換体と散逸素子である抵抗体、および蓄積素子である容量体の3素子を用いることで、あらゆるシステムがモデル化される。即ち、この3素子の直列の接続からモデルを作る。今回この方法で細胞膜輸送システムのモデル化につき検討した。各種のイオン、水、電荷の流れ、および反応の流れを相互連結も含めて同時に表現する。各流れにはそれと共役する力変数があり、それらの積がパワーの次元を持つ。パワー輸送路の出入口はポートと呼ぶ。したがって、膜輸送システムはマルチポートシステムである。膜区画は変換体を含む抵抗的マルチポート回路網として表現され、溶液区画はやはり変換体を含む容量的マルチポート回路網として表現され溶液区画はやはり変換体を含む容量的マルチポート回路網として表現されることが明らかになった。具体的モデルを紹介し検討する。

回路網熱力学, システムダイナミックス, 膜輸送, パワー変換, 膜レベルでの相互作用

- 1) Y. Imai et al.: Flow analysis in a biological system adopting the buffer capacitor concept. *J. Theor. Biol.* 77, 115-128 (1979)
- 2) M. Murakami et al.: Method and application of weight differentiating flowmeter. *Jpn. J. Physiol* 30, 791-794 (1981)
- 3) 今井雄介, 等: 灌流系細胞膜での保存的成分流束の測定膜 6, 61-67 (1981)

細胞および分子レベルの協同現象

細胞間での現象

志賀 健（愛媛大・医・生理）

菅野 義信（広島大・歯・生理）

集合した細胞群の接触部位にギャップ結合が存在すると、この部の膜抵抗は他の表面膜の抵抗より低いので、ある細胞内に通電すると、隣接する細胞内からも電気緊張電位を記録できる。この状態は電氣的細胞間結合とか電氣的細胞間連絡（以下 IC と略す）と呼称されている。卵の割球細胞や分離した培養細胞の複数細胞を機械的に接触させると新たにギャップ結合が生ずる例も少くない。一方 IC は細胞機械的分離、ギャップ結合部位への分離酵素の適用、外液中の 2 価イオンの減少、細胞内のギャップの結合近傍のカルシウムイオン濃度の上昇等で離断する。この IC の離断は原因によっては微細構造の変化を殆んど伴わず、機能的とも思える可逆性を示すことがある。IC は細胞間の物質交換や電氣的信号の伝搬による細胞間の情報伝達に重要な役割を果たすものと思われる。生体中での統制を逸脱した増殖を行う癌細胞には IC が欠如する発見は IC の生物学的意義をほぼ確定したかに見えた。しかし、培養細胞では癌化した細胞にも IC の証明された例も見出され、又培養細胞では生体中とは逆に上皮系細胞の IC の程度が小さく、線維芽細胞の IC の程度が大きいくことから、IC の意義にも混乱も生じている。

細胞の癌化と IC の関係を整理するために、化学発癌剤とプロモーターの培養細胞の IC への影響を調べた。化学発癌剤である MNNG、ベンツピレン、DMBA はヒト由来の上皮系 FL 培養細胞の IC に 24 時間程度では何等の影響を与えない。一方マウス皮膚癌のプロモーターである TPA、メゼレインはそれぞれの活性に対応した濃度で IC の形成を成逆的に阻害し、完成した IC に対しては数時間で可逆的に離断させる。しかし線維芽細胞系の 3T3、ヒト由来の LM の IC に対しては影響を及ぼさなかった。プロモーターは培養細胞に対しても細胞特異性があるらしい。IC の共通的、一般的意義を見出すことはそう容易ではなさそうに思えて来た。

ポジトロン・エミッション・トモグラフィー

(57. 3.12)

大村 裕 (生理研)

 ^{14}C - 2DG 法による脳活動の観察

加藤 元博 (九大・医学部・脳研施設)

ミニサイクロトロン — CYPRIIS 構造と機能

田沢 修一 (住友重機工業・設計部)

バイオマグネスティクス — 磁気と生体との関連

上野 照剛 (九大・工学部・電子工学)

ポジトロン放出放射性薬剤の製造と応用

井戸 達雄 (東北大・サイクロトロンRIセンター)

ポジトロン標識単糖類の医学的応用

松沢 大樹 (東北大・抗酸菌病研究所)

〔 ^{14}C 〕 2-Deoxyglucose 法による脳活動の観察

加藤 元 博 （九大・医・脳研・神経内科）

ポジトロン・エミッション・トモグラフィー（PET）は生体における脳代謝や脳循環動態を通して、脳活動を観察する方法として大きな期待が寄せられている。PET の応用法の一つに〔 ^{18}F 〕fluorodeoxyglucose（ ^{18}FDG ）による脳局所のグルコース代謝率測定法があるが、これを全く同一の原理で実験的に利用される方法として〔 ^{14}C 〕deoxyglucose 法（ ^{14}CDG 法）がある。これはオートラジオグラフィーによって局所脳グルコース利用率（LCGu）を測定する方法である。

本報告では ^{14}CDG 法の神経科分野への応用方法について概括し、私共が行って来た研究のあらましを紹介し、 ^{18}FDG 法の利用の一助としたい。

LCGu は脳の局所活動状態をよく表現することが知られており、脳の活動亢進状態ではLCGuが増加し、活動低下状態ではLCGuの減少が起こる。

本法による脳活動観察の利点は、電極挿入の必要がないので、より生理的な状態での脳機能観察が可能で、また全ての脳構造における活動状態をあますところなく観察でき、オートラジオグラム の解像力も高いので、肉眼レベルでのかなり詳細な分析が可能で、しかも定量も可能であることなどである。欠点として、観察時間が30 - 45分と長いため、一過性現象や時間的に動揺する現象の観察には不適當であることと感度がそれほど高くないこと、動物をその都度屠殺しなければならないことなどである。

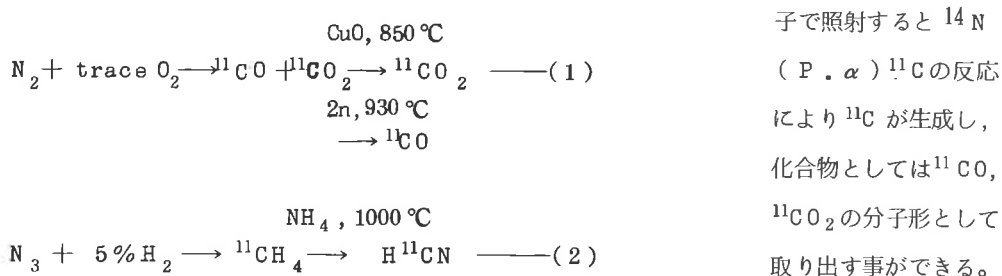
本法の応用についてまとめてみると、① 正常脳における各脳構造での活動性の相違の研究。② 脳の年令的变化（発達・成熟・加齢）の研究。③ 脳機能の局在、脳内神経連絡など機能解剖学的研究。④ 種々の条件変化に対応する脳活動の生理学的研究。⑤ 神経薬理学的研究。⑥ 病態生理学的研究。などが挙げられる。

私共の今日までの経験のあらましは以下のようである。① 覚醒安静時の脳活動の部位的不均一性：成熟サル のLCGu は灰白質で高く、白質で低い。灰白質でも大脳皮質、線条体で高く、淡蒼球で低い。② 脳の発達に伴うLCGu 変化：新生児期サルは全般にLCGu が低く、各脳部位毎のLCGu の相違も少ない。③ 焦点性てんかん活動の伝播経路：大脳皮質における焦点の位置により、てんかん活動の脳内伝播経路が一定している。また皮質下構造間のsomatotopical organization がみられる。④ 新生児期サル のてんかんの特異性：同程度のてんかん活動で新生児期サル のLCGu を成熟サル のそれと比較すると、LCGu の増加率が新生児期サル で高く、しかも広範囲にみられる。これは新生児期脳の抑制機構が未発達であることをうかがわせる。⑤ Rolling mouse Nagoya における脳内異常活動の観察：このミュータント・マウスは小脳障害が推定されているが、LCGu からみると大脳基底核の著しい活動亢進状態がみられる。

ミニサイクロトロン「CYPRIS」の構造と機能

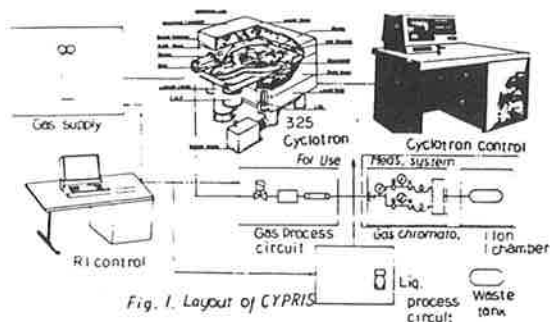
田 沢 修 一 (住友重機械)

従来、サイクロトロンは原子核物理実験用の加速器として発展して来た。しかし、最近、種々の応用分野に使用する途が開けつつあり専用機を開発、使用する機運にある。その一つの応用は、POSITRON EMISSION CT 診断用に使用される短寿命RI 核種 ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F 生産を目的とした小型サイクロトロンである。このサイクロトロンはRI の半減期が2~110分と短いために、使用施設内に設置すると共に、RI 製造装置(ターゲット)、標識化合物合成装置、純度検定装置、RI 搬送設備等の一連の関連した設備を設け、被験者に供与する必要がある。また、短寿命であるために、標識化の初期には、RADIOACTIVITY の高いRI を扱う必要があり、作業者の被爆を少なくするために、自動化(CHEMICAL BOX 化)が必要となる。これ等の問題を考慮して、“CYPRIS”(Cyclotron for Production of Radio-Isotopes)は、フランスのCGRMeV 社と共同開発され、一号機は京大病院並びに、イタリアのピサにそれぞれ設置される。このシステムの概要は図1に示され、325 型サイクロトロン、短寿命RI 合成装置、標識ガス純度検定装置、排ガス貯蔵設備から構成される。典型的な標識化合物 $^{11}\text{CO}_2$ (^{11}CO)とH CN の合成プロセスは、式(1), (2)による。 $^{11}\text{CO}_2$ はガスとして肺機能診断に使用される他に、 ^{11}C -パルチミン酸、 $^{11}\text{CH}_3\text{I}$ の中間標識化合物を経由した。メチオニン、クロルプロマジン、カフェインの合成に使用される。 H^{11}CH は ^{11}C -Deoxy Glucose の前駆物質として使用され、グルコース代謝を調べるのに重要である。 $^{11}\text{CO}_2$ 合成の場合、窒素ガス5気圧をターゲットに封入し、陽



標識化合物合成装置でCuO, 850 °C に加熱した電気炉中を通過することにより、 $^{11}\text{CO}_2$ を生成することができる。純度については、標識ガス純度検定装置のガスクロマトグラフで検査し、RI 収量は電離箱により測定する。使用済みのガスは排ガスタンクに貯蔵し、RI の減少を待って大気中に放散する。以上の一連の操作により合成されるので制御はマイコン搭載の操作卓より押釦操作により自動的に行うことができる。他の化合物合成も極力自動化が計られている。

表 1. CYPRIS の主要特性



加速粒子:	P, D	$^{13}\text{N}_2$, $^{15}\text{O}_2$
Enrg(MeV):	16, 8	C^{16}O , C^{15}O_2
Current(μA):	50	
Target:	8 ポート	$^{13}\text{NO}_x$, $^{13}\text{NH}_3$
標識化合物:	$^{11}\text{C}_2$, $^{11}\text{C}\text{O}$	H_2 , ^{15}O , H^{18}F

バイomagネティクス — 磁気と生体との関連 —

上 野 照 剛 (九州大・工・電子工学)

1. はじめに

磁気と生体の関連について、最近の研究の概要を二つの面から紹介する。一つは磁界の生体へ及ぼす影響についての研究であり、他の一つは生体内の電気的・化学的変動の情報を磁気的に検出する生体磁気計測についての研究である。直流磁界の生体に対する作用については種々論議の多いところで、ここでは言及しない。ここでは、変動磁場の生体へ及ぼす影響について得られた知見を紹介し、一方、生体内イオン電流、特に脳障害部位のまわりの異常電流から生じ得る異常脳磁場の理論的考察について述べる。

2. 変動磁場の生体へ及ぼす影響

我々は、特定の変動磁界に対する特定の生体変化量を抽出評価する方法として、単一神経を用い、細胞内記録電極による活動電位の測定を行ない、外部変動磁界の神経膜興奮過程に及ぼす影響を、活動電位発生の有無、活動電位の波形パターン、興奮伝導速度、不応期等から直接調べる実験方法を考案した。その結果、変動磁界による神経刺激においては、膜表面の微視的渦電流による効果は小さく、膜のまわりの組織をも含めた広範囲の渦電流路が神経興奮に大きく寄与していることが明らかとなった。

また、変動磁場の人体へ及ぼす影響について、研究の対象として、末梢血管系をモデルに選び、重電機工場のインダクションヒータにより変動磁界を発生させ、インダクションヒータの上に置かれた手の血流変化をレーザードプラー形血流計で測定した。その結果、変動磁界に対する末梢血管系の血流変化の機構として、磁界が血液や血管に直接作用を及ぼすのではなく、渦電流により皮膚受容器が興奮し、血管運動中枢機構により血管収縮が生じる、いわゆる、神経作動性の間接作用で

あることが明らかとなった。一方、磁気閃光の発生機構について渦電流の考えから考察を行い、閃光知覚閾値の周波数特性を満たすようなモデルを提案した。これら実験をもとに、変動磁場における生体内の渦電流モデルを提案し、この渦電流モデルから興奮性膜の興奮に対する磁束密度の閾値を推定する方法を導いた。更に、電解質溶液を用いる実験により、渦電流モデルの妥当性を確かめ、体積導体中の渦電流の幾つかの基本的性質を明らかにした。

3. 脳波と脳磁場

脳病巣の周囲の導電率の変化が頭皮上の脳波及び脳磁場の空間パターンにどのように影響を及ぼすかを調べるため、不均一導体球における順方行問題を考察した。すなわち、頭部を一定の導電率の球と仮定し、病巣を異なった導電率をもつ小球で仮定した。異常電源として小球の中心に電流双極子を仮定し、そのつくる球表面での電位及び磁場分布を求めた。その結果、導電率の変化によって電位パターンは大きく変わるが、磁場に関しては、球面の各点での値は変化するが、球表面の磁界法線成分の全体の空間パターンは均一導体球におけるパターンと相似となることが明らかとなった。

Organization of visual field in striate cortex

(1982. 3. 16)

P. O. Bishop

(Department of Physiology, John Curtin School of
Medical Research, Australian National University)

HubelとWieselによる大脳視覚領のニューロンの分類はその後の研究の発展により再検討してゆく価値があると考えられる。我々は猫の大脳皮質視覚領(17野)から単一ニューロン活動を記録し、それらの受容野構成について定量的解析を行い、それに基く、新しい分野を提出するものである。実験は猫の網膜の任意の位置に種々の大きさの直線(スリット光)または明暗のエッジを静止したフラッシュとして、あるいは動きを伴わせて与えて行われ、受容野の大きさ、最適方位、最適方向および空間加重の性質、加えて“end stop”と呼ぶ反応抑制領域の有無とその程度等が検討された。これらの解析から17野のニューロンは単純型細胞(S)、複雑型細胞(CとB)、超複雑型細胞Ⅰ(S_H)、および超複雑型細胞Ⅱ(C_HとB_H)に分類し得た。以下にこれらの細胞型分類の鍵となる特性を各々について示す。単純型細胞(S)：受容野はONおよびOFF反応に呈す副領域(〜4個)からなり、それぞれの副領域は鋭いピークを形成している。刺激の最的方位に沿って与える光の両端を長くしていくと反応は増大する。複雑型細胞(C)：ONとOFF反応部分が一樣に混じり合って存在するような受容野を構成している。反応は刺激部位が受容野の中心あるいは周辺であっても同様に強く反応する。最適方位に沿って刺激を長くして、それが発火中心を越えると発火はやや弱まる。複雑型細胞(B)：受容野内にON反応とOFF反応の部位が小さな塊りを成して存在し反応の強度は受容野内の部位とは関係ない。超複雑型細胞Ⅰ(S_H)：単純型細胞と極めて似た性質を持つが受容野の最適方位の直角方向の一方あるいは双方に反応をほぼ完全に抑制する“end-stop”領域が存在する。超複雑型細胞Ⅱ(C_HとB_H)：複雑型細胞と良く似た性質を有しているが超複雑細胞Ⅰと同様に強い“end-stop”の領域がある。

(田内雅規)

Topics of the Cardiac Physiology

W. Trautwein (Saarland 大学 西ドイツ)

56 年 7 月 27 日(月) 10 時 30 分より, 12 時まで, カルシウム拮抗剤である D-600 の作用機構を主として最近の研究を報告された。

Neurotransmitter substance

J. Dudel (Munchen 大学・生理学研究所 西ドイツ)

56 年 7 月 29 日(水) 13 時 30 分より 15 時まで軟体動物のグルタメート受容器のグルタメート依存性電流系の雑音解析について報告された。

Respiratory motoneuron activity

T. A. Sears (ロンドン大学 神経生理学教室)

56 年 9 月 29 日 脊髄レベルの呼吸性の運動ニューロンについて報告し, 電位固定法によらないでニューロンのイオン流の分析を行うことを話された。

Implications of Intracellular Ca^{2+} -release on the membrane currents in atrial muscle.

M. Morad (ペンシルバニア大学)

57 年 2 月 24 日(水) 15 時より 16 時までアザラシの心房筋が T 管の欠除していることを利用して E-C 結合について報告をした。

生理学研究所年報 第3卷

印刷 昭和57年6月25日

発行 昭和57年6月30日

編集者代表 入 沢 宏

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) 54-1111

