

岡崎国立共同研究機構

生理学研究所年報

第 4 卷



1983

巻 頭 言

科学 と 記 録

科学的実験を実施する際に研究者は何等かの方法によって研究の動機なり、その方法なり、その成果その反省を記録してとどめるのが普通である。いまではこのような順序で論文を書くことがパターン化されているので、当事者以外のものでも、その論文の必要な個所のみを取捨選択して利用することが可能である。実験の流れが一般化されたパターンで記録されているために、論文の理解のためにも効果的ですらある。これが芸術作品、特に文学作品の発表形式と基本的に異なる点でもある。

さて、科学は研究者自身の自由意志によって企画され、実施され、発表され、批判されるものである。科学者の行動には何ものにも束縛されない自由が望ましいことはいうまでもない。自由な研究環境下にあつてこそすぐれた創造的な成果が得られることは勿論のことである。そこで研究者がその成果について発表し、または発表しないことも、基本的には科学者自身の恣意にまかせて然るべきものである。

さて、ここでは科学とその記録一般について論じてみたい。実験科学においては、研究者はたえず実験にまつわるもろもろの事実をメモし、記録し、これを取捨選択して、最終的にはこれを論文の形にまとめ、印刷して世に送り、その批判をまつものである。時々刻々に頭の中に生起し、消滅する心の動きの中で、必要なものを残し、雑音を消去し、昇華した成果を発表するのが普通である。個人の実験においてもこの程度の記録は必要である。科学者の自由は完全であるべきであるからといって、実験によって得られた成果を発表し世の批判をうけるのではなくては、その科学者の社会的意義は失われよう。

個人の集団からなり、有機的結合体であるべき研究所においても、これと事情は基本的には全く同一である。研究所に属する科学者集団が個人として、あるいは集団として何を企画し、いかにこれを実施に移し、いかなる成果を得たかは、明確な形で記録され、印刷され、世に流布され、その批判をうけなくてはならない。特に国税によって支えられている国立の研究所においては重大な義務の一つ

でもある。

科学者個人の自由の原則を集団にまで拡大し、発表するも発表しないも研究所の自由であるとする考え方は、社会的には指弾されるべき過誤であると思われる。

研究によって得られた成果は、ポジティブであれ、ネガティブであれ、記録され印刷され積極的に世に送り社会の批判をうけるべきものと考えられる。

研究の日々の営みの上にまとめられた成果を国内外の専門誌に送り、創造的な業績として世に問う行為は、社会に対する義務であるばかりでなく、研究者自らの存立基盤であることを、今日の研究者ならば十分自覚し且つ実施している所である。

生理学研究所ではそれと同時に研究者集団の自由意志により研究所が行った年間の活動記録とその成果を一巻の印刷物にまとめ、これを世に送ることになっている。これは研究所が志向した目標をどこまで達成でき、それがどれだけの科学的、社会的意義をもつものであるかの目安となる唯一のまとまった記録であるため、最低の社会的義務であると考えている。さらには、10～20年と年月を経過した後での研究所の研究の流れを概観し、将来にそなえるという点からも、研究所が集団としての記録を世に残すことの重要性をここにあらためて指摘したい。

昭和 58 年 5 月

所 長 内 菌 耕 二

主な職員（昭和 57 年度）

所 長 内 藺 耕 二

分子生理研究系

神経化学研究部門

教 授 江 橋 節 郎
助 手 三 川 隆

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 仲 晃
客 員 助 教 授 谷 口 郁 雄
助 手 村 上 富 士 夫

液性情報研究部門

教 授 濱 清
助 教 授 小 坂 俊 夫

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
助 手 粟 生 修 司

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
係 長 大 庭 明 生
市 川 修
池 田 明 聡
勝 丸 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
加 藤 勝 巳
藤 原 文 治
小 川 良 斎

非 常 勤 講 師

坂 口 博 信
木 村 純 子

特 定 領 域
奨 励 研 究 員

藤 田 省 三
八木沢 仁

特別協力研究員

Harvey J. Grill
松 田 博 子
加 計 正 文
Andrew T. Ishida

E.E. Daniel
中 山 敏 夫
Young Bae Park
Rondang R. Soegianto

受託研究員

小 平 司
山 田 雅 弘

文 部 省
外国人研究員

Eva.Marie Kosar.

学 術 振 興 会
外国人招へい者
研 究 者

徐 科

目 次

卷 頭 言

主 な 職 員

研 究 概 要

分子生理研究系	1
細胞器官研究系	13
生体情報研究系	44
生体調節研究系	70
生理機能研究施設	83
動物実験施設	85
技 術 課	88

研 究 活 動

論 文	94
学 会 報 告	112

共 同 研 究 報 告

昭 和 57 年 度	126
------------------	-----

研 究 会 報 告

昭 和 57 年 度	196
------------------	-----

研 究 概 要

分子生理研究系

神経化学部門

江橋 節郎, 三川 隆

本部門は昭和 57 年度に開設されたばかりであり, 当研究室で行った成果を発表する段階には至っていないので, ここには, 我々が行って来た研究の理念ないし背景を説明し, 当面の目標を設定して来年度以降の研究の目安としたい。

〔研究の背景〕 Ca イオンが細胞の多くの機能の最も基礎的な段階において, 直接的な制御ないし調節因子として働いていることは, 今や周知のことであり, それに関する知識は日々増大しつつあるが, 神経・筋といった興奮組織においては, その意義は一層重要で, 細胞の特性的な機能全般と別ち難く結びついているといっている。

このような細胞機能における Ca イオンの不可欠性は, 最初に 1960 年頃に骨格筋において証明された。その当時は, 筋収縮という特殊な機能に関する特異的な機構と見なされたが, 間もなくその役割が代謝系にも拡張され (1967), 更に筋以外の組織でも同様の事実が相次いで確認されるに及んで, Ca イオンの問題は生物細胞全般に共通する本質的なものであることが理解されるようになったのである。

Ca イオンの細胞内過程に及ぼす影響は, 筋と神経細胞の内で高度の類似性があり, 細胞の分化を考慮し入れるならば, この類似は本質的なものといえる。このことは, 筋における Ca イオンの動態から, 神経におけるそれを推定することが可能であることを示している。

他方, 種々の筋組織の比較から, その収縮機構における Ca イオンの関わりの様式は, 極めて多様多彩であることが明らかにされてきた。このことは, 筋収縮という現象を, 細胞運動という広い視野から眺める必要のあることを示すばかりでなく, Ca 機構というものが本質的に多様であり, 寧ろ Ca イオンをいかに扱うかということが細胞の特性の重要な一部であることを示唆するものである。

Ca イオンの細胞内外に関する生理学的薬理学的研究の発展に伴い, 細胞外 Ca イオンの細胞内機能に及ぼす影響が, 今まで予想されたものよりも遙かに重大であることが明らかになりつつある。

このように Ca イオンを中心とした分子生理的研究は, 生理機能解明への極めて強力な

アプローチの一つであるが、このことは、生命発生の場とされている海の生成と関連して、興味ある進化論的問題を提起するものでもある。

〔当面の研究目標〕 骨格筋収縮系における Ca の役割の発見および解明が現在の Ca 時代の魁けとなったが、平滑筋についての研究は、他の生理領域においてもしばしばそうであるように、やや等閑にされて来た。平滑筋収縮系における Ca 制御に関しては、1976 年以後、アクチンに関連したライオトニン (leiotonin) が Ca 制御に関する主要因子であるとする説と、ミオシン軽鎖の Ca 依存性磷酸化がその主体であるとする多数研究者の説が鋭く対立している。この問題の解決を当面の緊急課題として取り上げたい この帰趨は、細胞機能一般における磷酸化という素過程のもつ生物学的意義を占うよすがとなるものである。

これと関連して、筋収縮機構の一環として見出された小胞体の Ca 取り込み (及び放出) 機構の意義は、神経細胞においても、筋細胞のそれに劣らないばかりでなく、寧ろより複雑微妙であると考えられる。古い問題ではあるが、細胞機能との関連において、再検討を試みたい。

なお、筋の一つの特徴は、形態学的に蛋白質を同定し易いことであるが、これと、高度に発展した筋構造蛋白質に関する知識とを利用して、蛋白質の基盤の上に細胞分化の問題を追及してゆきたいと考えている。

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-アミノ酸々化酵素の研究については異った分子種である Quasi-D-アミノ酸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いアイソザイムとして存在することを明らかにした。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に関する研究の進展が期待される。また細胞膜の流動性についての研究が進展した。生体内燐化合物の消長と生理機能との関連について核磁気共鳴による細胞内分子の動態の研究を行った。

非破壊的手法による細胞膜構成分子の分子生理学的研究

亘 弘・志賀 潔・二科 安三

燐脂質により構成される生体膜はコレステロールなどの脂質を含んでいる。この脂質の役割は膜の流動性の制御にあるとされている。膜にはイオンチャネル、ホルモン受容体やエネルギー変換体などの機能を持つタンパク質が多量に存在し、生理的機能を営んでいるが、これらの機能は膜の流動性により大きく変化し、機能の制御につながっているものと思惟される。つまり流動性がタンパク質に対する雰囲気を作り出し、その結果として機能の調節が行われているものであろう。本研究の目的は飽和移動 ESR 法によって膜の流動性を求めることにある。

粉末スペクトル中のスピン束の飽和移動を観測することにより、遅い分子運動の強度とその相関時間を決定するのが飽和移動 ESR 法であるが、dipalmitoyl lecithin (DPL) と dimyristoyl lecithin (DML) の配向膜を作製し、膜中に少量挿入したスピンラベルの第二次高調波吸収スペクトルの 90°位相おくれ成分 (V_2') を観測することにより、脂質膜の相転移にともなうゆらぎの解析を行った。

配向脂質膜の各温度における超微細分離巾はゲル-液晶相転移にともない急激な変化を示す。スピンラベルである CSL のテンソルの異方性より、脂質分子は膜面に垂直に配向していることがよくわかる。又、角度変化より、コレステロールを含まない膜の pretransition 以下の温度域で脂質分子の傾斜角をも評価することが可能となった。DML 配向膜におけ

る V_2' の積分強度の温度変化より、25℃付近の main transition と 18℃付近の pretransition が観測できた。また変曲点近傍の高さ比より、液晶相では $10^{-6} \sim 10^{-8} \text{sec}$ 、ゲル相では、 $10^{-3} \sim 10^{-5} \text{sec}$ と、それぞれのゆらぎの相関時間が決定された。分子運動のゆらぎが 10^{-3}sec に近くなると、 V_2' スペクトルは吸収スペクトル (第 0 次高調波: V_0) に近似が可能である。この結果 V_2' の積分強度は分子運動の相関時間に逆比例する。

局所核磁気共鳴による生体内臓器機能の評価

亘 弘・志賀 潔・二科 安三

核磁気共鳴は物質の化学構造や物性の研究に用いられて来たが医学・生物学の領域においても非破壊的計測法としての利点を生かし、多くの研究がなされて来た。1971 年阿部善右衛門教授は磁場焦点核磁気共鳴法を提唱したが、この方法は動物を静磁場の中に入れ、更に局所的に磁場を垂畳することによってこの局所にある核スピンを検出するものである。本研究は磁場焦点法を脳、心臓、腎臓、唾液腺に適用し、生体内リン化合物を観測することによりその生理的機能の評価を行う事を目的とした。装置は Oxford Scientific Research 社の TMR-32 で、生理学研究所に各研究者が来所の上、共同で利用した。本機を使用し、下記の実験を行った。脳においてはラット頭部、犬頭部、猫頭部を用い実験的脳虚血および脳硬塞時の脳内エネルギー代謝の変化を経時的に観測した。脳虚血は両側椎骨動脈電気凝固および両側総頸動脈結紮によって製作した。虚血前の ^3P -NMR スペクトルでは α - β - γ -ATP, phosphocreatine (PCr), phosphodiesterase 又は 2, 3 DPG, 無機リン (Pi), sugar phosphate を示すピークが認められた。4 動脈の血流を遮断すると PCr と ATP のピークの急激な低下, Pi のピークの上昇が見られた。また組織内 pH も正常時の 7.27 から 6.52 へと急速に酸性化することが Pi の chemical shift より算出された。30 分後に両側総頸動脈を再開通させると PCr, ATP のピークは急速に回復し Pi のピークは減少した。そして 30 分～1 時間後スペクトルは正常パターンに戻った。1 時間虚血後の再開通では半数が正常パターンに回復したが 2 時間虚血後の再開通群では逆性変化を示さなかった。ラット心臓、兎腎臓、犬唾液腺の測定も行なった。腎臓および唾液腺では同時に外分泌機能を測定しエネルギー代謝より機能の評価を行った。これらにおいて、30 分間の阻血後血流を再開すると燐代謝の面で完全に回復することが判った。以上各臓器における機能評価には TMR の利用が有用であることが判った。

新たに発見されたフラビン酵素の物理化学的性質の研究

志賀 潔・二科 安三・亘 弘

D-アミノ酸々化酵素は体内においてシステアミンとグリオキザル酸の代謝に関与する酸化還元酵素であるが、最近我々は本酵素のアイソザイムと思われるフラビン酵素 (Quasi D-アミノ酸々化酵素) を発見し、その精製法を確立した。又本酵素と D-アミノ酸との反応過程で紫色中間体が出現することもすでに報告した。両酵素における紫色中間体の構造の比較検討は酵素反応機構を知る上で重要な事であるが、これら中間体の出現はトランシエントなものであるのでスペクトル的な研究はそれほど簡単ではない。今回我々は両酵素に基質と共に反応生成物を加えることにより中間体を安全に存在せしめ、その共鳴ラマンスペリトルを測定することに成功した。

両酵素の中間体より得られた共鳴ラマンスペリトルは本質的に同じであった (図)。即ち、632.8 mm の光で励起すると 1605 cm^{-1} 周辺に還元型フラビン由来のラマン線が、又 1692 cm^{-1} および 1359 cm^{-1} 周辺に基質由来のラマン線が観測された。これより両酵素の中間体の構造はよく似たものと考えられる。

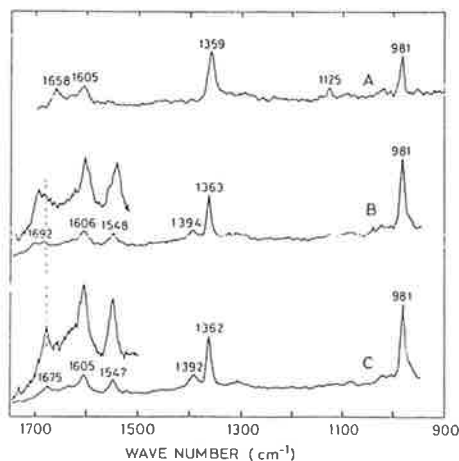


図1 (A): D-プロリンとの複合体; (B): D-アラニンとの複合体;
(C): (B)を重水中で測定したもの。

脳内活性物質の抽出・精製および合成： 個体レベルの生物検定法の改良

東 晃史

精神機能の解析には、慢性実験下に使用できる生理学的手法と行動学的手法を併用する必要がある。加えるに、センサーを用いた計測技術並びにコンピューターを十全に活用した診断技術の開発が必要である。本研究においては、マウスの覚醒・睡眠の「状態変化」を長期間連続計測し、投与される不確定物質の様々な作用機作が推定できる自動分析システムの開発を当面の目標にしてきた。

覚醒状態側の解析にはマウスの運動の激しさを定量し、睡眠状態側は徐波睡眠とREM睡眠を定量している。これらの状態の接点が入眠期と出眠期（目覚め）であり、いくつかのアルゴリズム（未発表）により、図1に示す④および⑤の状態として特定している。

この時期は睡眠の持続に関する睡眠物質の関与と交感神経活動の抑制及び脱抑制が緊密に関係している。また意識や自覚の機構の接点であり、記憶の再生に関する制御機構が分離される時期である。この時期に注目して睡眠現象に対する自律神経活動の役割を薬理学的処方によって検証するのは一つの方法であろう。

図2は秒単位のマウスの状態をシンボル化して経時的に並べたもので、これらは覚醒と睡眠に関するワンセットのパラメーターに対応する1つの表現であり、異常な入眠時の前後の状態を確認する場合に出力している。

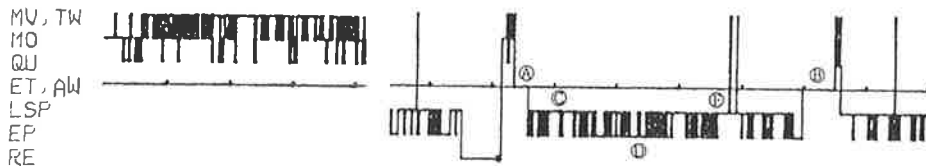


図1 「東法」アルゴリズムによる1秒単位のマウスの「状態」表示：MV；激しい動き，MO；注目に値する激しさの動き，QU；Quietness，ET；入眠時の浅眠（Light Sleep），AW；目覚め時の浅眠，LSP；睡眠持続中に出現する浅眠，EP；深睡眠（Deep Sleep），RE；REM Sleep。中央の線を境にして上側が覚醒，下側が睡眠と考える。④から⑩までの約5分間が1回の眠りの長さを示す。④はLight Sleep 優位，⑤はDeep Sleep 優位を示し，⑥はTwitch様体動（TW）が睡眠側から出現することを示している。

[illegible]

7

細胞内代謝部門

神経ペプチドについて、特異抗血清を用いたラジオイムノアッセイ及び免疫組織化学的手法により、それらの組織内分布および存在様式について詳細な検討を加えた。とくに、ガストリン放出ペプチド (GRP), VIP, エンケファリン類について研究した。さらに、培養細胞系を用い、神経ペプチド、とくに VIP, モチリンの生合成、代謝過程について検討した。VIP の生合成過程についてはその詳細を $[^{14}\text{C}]$ -Leu のとりこみ実験から明らかにし、培養細胞から 3K ダルトン成分を単離するにいたった。

cDNA のヌクレオチド配列から推定されたプレプロエンケファリンおよびアセチルコリンレセプター α の関連ペプチドを化学合成し、その生理機能を検討した。プレプロエンケファリン B のアミノ酸配列からその存在が推定された leumorphin を初めて化学合成し、その生理活性の検討から新しい型のオピオイドペプチドであることを証明した。新しい消化管ホルモンの一つである PYY, および神経ペプチドの一つである NPY の化学合成も行なった。

ヒト神経芽細胞腫培養細胞における VIP の生合成と放出

星野 稔・日置 善雄・佐藤 晴子

荻野 晃一・鈴木 利光・矢内原 昇

ヒト神経芽細胞腫培養細胞 NB-OK-1 では、 $(\text{But})_2$ cAMP によって免疫活性 VIP の産生および放出が著しく促進され、その免疫活性 VIP は大分子型成分を含むことをすでに明らかにしたが、本研究では NB-OK-1 細胞における免疫活性 VIP の生合成過程と放出した免疫活性の性状について検討した。

NB-OK-1 細胞は 10% 牛胎児血清を含む RPMI-1640 培養液中で 37°C , 5% CO_2 下で培養した。また培養液中には 1mM $(\text{But})_2$ cAMP を添加した。細胞中の免疫活性 VIP は 0.1M 酢酸で抽出した。アフィニティクロマトグラフィーには抗ブタ VIP-IgG を結合した Sepharose 4B カラムを用いた。免疫活性 VIP の測定は VIP 特異 RIA によった。

$(\text{But})_2$ cAMP 存在下、 $[^{14}\text{C}]$ -Leu のとりこみ実験を行い、アフィニティクロマトグラフィーにより分離した免疫活性 VIP の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果から、3K, 8K, 11K および 18K ダルトンの主要成分の生成を明らかにした (図 1)。さらに

chase-labeling 実験により 8K, 11K および 18K ダルトン成分はほとんど消失し, 3K ダルトン成分に変換されることがわかった。また, 培養液中にも, 3K, 8K および 18K ダルトン成分が検出され, 時間の延長とともに 3K ダルトン成分の放出が著明に増加した (図 2)。上記の成績にもとづき, この (But)₂ cAMP 刺激培養細胞から 3K ダルトンの免疫活性 VIP の分離, 同定を検討し, ゲルろ過, アフィニティクロマトグラフィーおよび逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により精製した結果, HPLC でブタ VIP に一致する画分を含む 4 画分の存在を検出した。それらの構造については検討中である。

一方, 本培養細胞 NB-OK-1 をヌードマウスに移殖して形成した腫瘍組織中の免疫活性 VIP をゲルろ過および HPLC により検討した結果, その主要成分は 3K ダルトンの VIP に相当する画分であり, 大分子型の画分は僅かに存在するのみであった。

以上, 本研究により NB-OK-1 培養細胞において, 3K ダルトン成分が大分子型から生成し, さらに 3K ダルトン成分のみならず, 大分子型の免疫活性 VIP が培養細胞から放出されることが明らかになった。さらに, 本研究において培養細胞と, その移殖により形成した腫瘍細胞とでは VIP 前駆体のプロセッシングが異なることが示唆された。

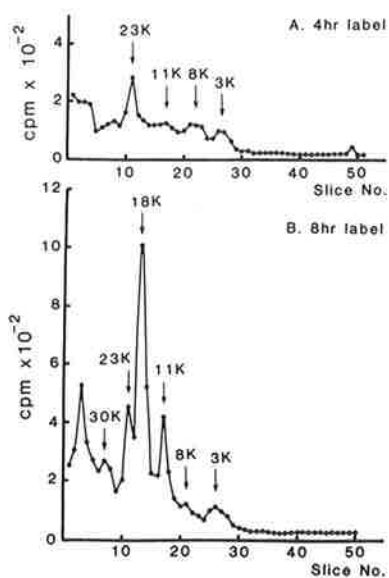


図1 ヒト神経芽腫培養細胞 NB-OK-1 細胞抽出物中¹⁴C-標識 VIP 様免疫活性の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動。

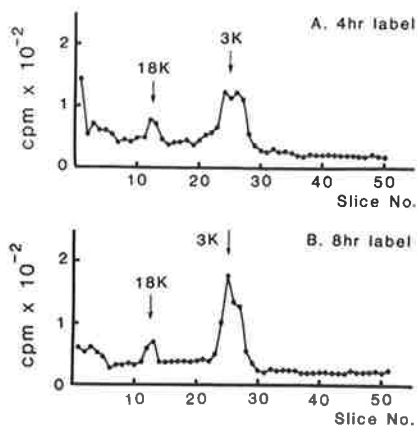


図2 ヒト神経芽腫培養細胞 NB-OK-1 培養液中¹⁴C-標識 VIP 様免疫活性の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動。

ラット胃灌流系における各種刺激によるガストリン放出 ペプチド (GRP) の放出動態

島崎 英樹・星野 稔・矢内原 昇

GRP はガストリン放出活性をもつ 27 アミノ酸基よりなる神経ペプチドの一つである。免疫活性 GRP の組織内分布では、その免疫活性が胃体部に高濃度に存在し、ガストリン分泌刺激作用を示すことから、胃における GRP のガストリン分泌への関与を解明する目的でラット胃灌流実験系を用いて、各種刺激による GRP の放出動態を検討した。

Wister 系雄性ラット 200-400 g を用い、24-48 時間絶食後、ペントバルビタールを 60 mg/kg 腹腔内投与にて麻酔し、開腹、脾動脈、総肝動脈を結紮し、腹腔動脈よりカニキュレーションを行い、左胃動脈より胃を灌流し、灌流液採取は門脈より行った。胃標本は 37°C 生食中に設置し、灌流液は Krebs-Ringer bicarbonate 緩衝液に 4% デキストラン、5.5 mM グルコースを加え、95%O₂、5%CO₂を送気し、pH 7.4 に調製したものをを用い、2 ml/min の流量で灌流した。薬物投与は灌流ポンプを用い、0.12 ml/min の流量で行った。約 20 分間の前灌流後実験を開始し、灌流液は 500 KIU/tube のアプロチニンを添加した試験管に滴下し、2 分ごとに採取して凍結乾燥し、RIA に供した。ガストリン RIA には抗ヒトガストリン血清 R1303-2 を用い、GRP-RIA には抗ブタ GRP 血清 R6903 を用いた。

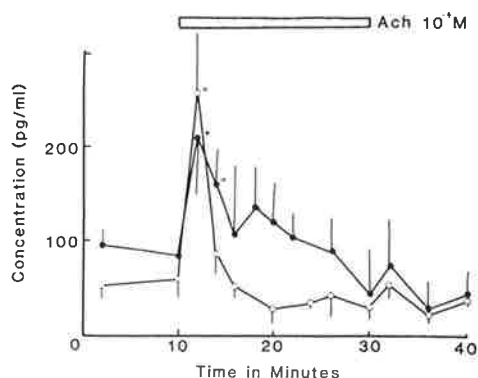


図1 ラット単離胃灌流系におけるアセチルコリン刺激による免疫活性ガストリン (○) ならびにガストリン放出ペプチド (GRP) (●) の放出 (* P<0.05)。

合成ブタ GRP の C 末端フラグメントであるブタ GRP (14-27) 10⁻⁷M を 20 分間灌流すると二相性のガストリンの放出がみられ、灌流開始 4 分後に急激なガストリンの放出を観察した。アセチルコリン (ACh) (10⁻⁶~10⁻⁴M) の灌流によりガストリンの放出と同時に GRP の有意の放出がみられ、用量反応的であった (図 1)。つぎに ACh のガストリンおよび GRP 放出活性に対するアトロピンの影響を検討した。アトロピン 10⁻⁵M を 10 分間灌流後、ACh 10⁻⁴M 添加したところ、GRP は有意の放出を示し、アトロピン処置による影響は

みられなかったが、一方、免疫活性ガストリンの放出は明らかに抑制された。逆に、ヘキサメトニウムの Ach 刺激放出に対する抑制作用は GRP に対してのみ認められた。すなわち、 10^{-4}M ヘキサメトニウムを 10 分間灌流後 10^{-4}M Ach を加えたところ、ガストリン放出のみ有意に増加し、GRP 放出は認められなかった。脱分極刺激として灌流液中の KCl 濃度を 47mM に高めると、ガストリンと GRP の両者はともに有意の放出増加を示した。

以上、GRP が単離ラット胃から Ach, KCl によって放出され、Ach によるその放出はアトロピンによって影響されないが、ヘキサメトニウムによって抑制されることがわかった。これらの結果は、GRP が非コリン作動性ニューロンから直接、あるいは非コリン作動性ニューロンにつながる GRP 含有細胞から放出されることを示すものであった。しかしながら、さきにラット胃に分布する GRP はその神経線維に局在することを免疫組織化学的に証明していることから、後者の可能性は少く、ラット胃には GRP を放出する副交感神経節後非コリン作動性ニューロンの存在することを示唆するものであった。

ブタ Leumorphin の化学合成とその生理活性について

山本 栄仁・勝丸由美子・矢内原 昇

β -neo-endorphin と dynorphin の両者をコードするブタ視床下部 mRNA に相補的な DNA のヌクレオチド配列の解析から第 3 のオピオイドペプチドの前駆体、プレプロエンケファリン B のアミノ酸配列が推定された。その結果、この前駆体分子には、 β -neo-endorphin と dynorphin の他に第 3 の Leu-enkephalin 単位が存在が示された。その配列は Leu-enkephalin の C 末端に 24 アミノ酸配列が連結された 29 アミノ酸残基からなり、プレプロエンケファリンの C 末端部 228~256 位に位置している。このものは新しいオピオイドペプチドとして leumorphin と命名された。(図 1)。

本研究は leumorphin の存在と生理的意義を証明することを目的とし、まずその化学合成を行い、若干の生理活性を検討した。

Leumorphin の全合成は固相法により行い、合成ペプチドの純度および構造を確認した。合成ブタ leumorphin はモルモット回腸標本の電気刺激収縮に対し用量反応的なオピエート活性 (ED_{50} $4.70 \times 10^{-9}\text{M}$) を示し、その活性は Leu-enkephalin の約 100 倍であった。なお、leumorphin は dynorphin (1-13) (ED_{50} $0.38 \times 10^{-9}\text{M}$) より低活性であったが、 β -endorphin (ED_{50} $18 \times 10^{-9}\text{M}$) より高活性であった。leumorphin のオピエート活性はナロキサンにより部分的に抑制された。合成 leumorphin のマウス脳室内投与により有意

の鎮痛効果 (ED_{50} 7.31nmol/mouse) が認められたがその活性は β -endorphin (ED_{50} 0.60nmol/mouse) よりも低く、一方, dynorphin (1-13) (ED_{50} 16.10 nmol/mouse) より高いことがわかった (図 2)。

以上の結果は leumorphin が新しい型のオピオイドペプチドであることを示唆し、さらに本研究の合成ペプチドが今後の研究展開にきわめて重要であることを示した。なお、本研究のブタ leumorphin の全合成は世界で初めてなされたことを付記する。

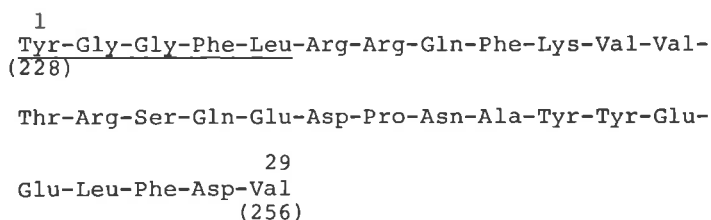


図 1 ブタ leumorphin のアミノ酸配列

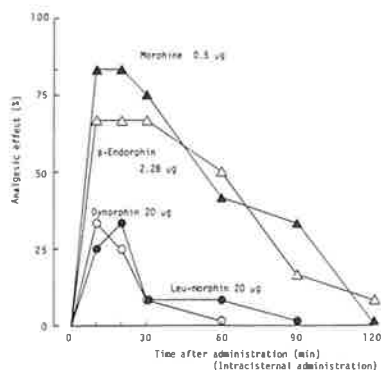


図 2 マウス脳室内投与による各種オピオイドペプチドの鎮痛効果 (tail-pinch 法による)。

細胞器官研究系

生体膜部門

本研究部門の研究目標は、いわゆる興奮膜およびシナプス膜の興奮チャネルはいかに形成され、いかに機能するか、その実体像を明らかにすることを目指している。昭和 57 年度はイカ巨大神経線維、ザリガニ神経線維、培養神経細胞、骨格筋アセチルコリンリセプターを研究材料として研究を進めた。

細胞内 2 価イオンによる Na チャネル, K チャネルの制御

山岸 俊一・古家 喜四夫

〔研究目的〕 細胞内において Ca イオンは多彩な生理機能を発現している姿が次第に明らかにされつつある。本研究では細胞膜の内側から直接 Na チャネルおよび K チャネルに作用してイオン電流の状態を変える Ca イオンの作用機序を追求すると共に、各種の 2 価イオンの作用を比較検討して、膜の内膜面からチャネルに働きかける 2 価イオンとしての共通の性質と Ca イオンの固有の性質を明らかにしようとした。

〔研究方法〕 人工海水に浸したヤリイカ巨大神経線維を 25 mM~250 mM-K-glutamate または KF 溶液で細胞内灌流し、これに 0.1~30 mM の濃度範囲の Ca, Mg, Sr, Co, Mn, Ni, Zn イオンを加えて Na チャネル電流および K チャネル電流に対するこれら 2 価イオンの効果を速い時間経過が測定可能な膜電位固定法で検討した。

〔結果および考察〕 2 価イオン作用による電流変化の共通の特徴は①内向き電流を発現する膜電位の低電位側への 5~15 mV のシフト, ②内向きピーク電流の抑制, ③外向き K 電流の抑制, である (図 1)。内向き電流の低電位側へのシフトは 2 価イオン投与直後 10 秒のうちにおこり, 10 秒~60 秒の間に最大になるが, のち, 電流値減少とともに, 内向き電流発生の膜電位レベルも, コントロール値の方向に戻る傾向を示す。25 mM-K 溶液に 1 mM 2 価イオンを加えたときの低電位側への膜電流のシフトの大きさの順はおよそ $Mg > Sr > Co > Ca > Ni > Zn$ の順で Mg イオンが最も顕著であった。100 mM-K 溶液中に 1 mM 2 価イオンを加えた条件で測った内向き Na 電流ピーク値の抑制の順序は $Zn > Mn, Ca,$

Sr, Co>Ba>Mg で、最も抑制高の少いのは Mg イオンであり Ca イオンは中程度の抑制を示した。外向き K 電流に対する効果については 2 価イオンは 3 つのグループに大別することができた。即ち ④外向き電流抑制が内向き電流抑制の割合より小さいもの；Ca, ⑤外向き電流抑制が大きいもの；Mg, Sr, Co, Mn, ⑥殆ど外向き K 電流を抑制してしまうもの；Ba, Zn, とであった。以上の結果、2 価イオンの膜電流に対する効果は、傾向として共通の性質をもっているが、仔細に効果の数値を検討するとそれぞれの明瞭な個性をもつことが判明した。

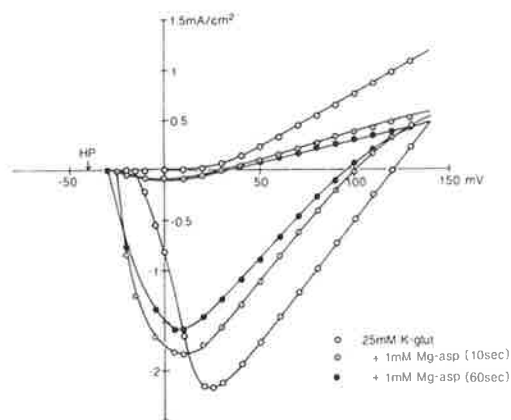


図1 V-I 曲線に対する 1 mM Mg の効果。内向き電流の低電位側へのシフト，内向き Na 電流の抑制，外向き K 電流の抑制が顕著に認められる。

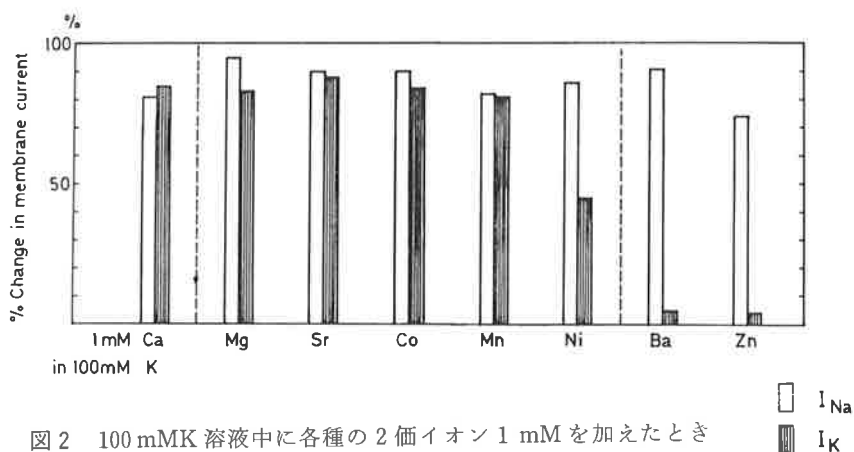


図2 100 mM K 溶液中に各種の 2 価イオン 1 mM を加えたときの Na 電流と K 電流の抑制効果。抑制のパターンにより、3 種に大別できる。

アセチルコリン受容体に対するモノクローナル抗体

杉山 博之・山下 幸子

〔研究目的〕 アセチルコリン受容体は、近年そのサブユニット組成や、一次構造についての知見が著しく進められた。これらの知見をもとにして、より高次の構造、すなわち各サブユニット間の配置関係、細胞膜への組み込まれ方、等を理解することは、膜タンパク一般の構造と機能を考察するうえで有用な参考例となる。このような目的に対し、モノクローナル抗体は分子下レベルのプロープとして格好の手段を提供すると考えられるので、我々はこれまでにその作製を試み、また得られた数種類のモノクローナル抗体について幾つかの特徴を検討した。さらにモノクローナル抗体法をこれ以外のいろいろな系に応用するための方法を開発する目的で、これらの抗アセチルコリン受容体モノクローナル抗体を用いて特異抗体のアッセイ法を数種類比較検討し、高感度かつ簡便な方法を開発することを試みた。

〔方法〕 日本産のシビレエイ *Narke japonica* の発電器官より抽出・精製したニコチン性アセチルコリン受容体を抗原として用い、Balb/c マウスを免疫した。この脾細胞とマウスミエローマ NS-1 株細胞とをポリエチレングリコールによって融合し、得られたハイブリッド細胞を、特異抗体産生の有無によって選択した。抗体のアッセイについては、次の3方法を基本とするものを検討した。

- (1) IgG 吸着剤 (プロテイン A 結合顆粒) を用いたラジオイムノアッセイ。
- (2) マイクロテストプレートに吸着させた抗原を用いた酵素免疫測定法。
- (3) 固相化二次抗体を用いたラジオイムノアッセイ。

〔結果及び考察〕 (1)抗体のアッセイ法については、上記3種類の方法のいずれもが実際のモノクローナル抗体スクリーニングの目的に有効であることがわかった。このうち第3番めの方法が特に操作の簡便さと感度においてすぐれていることが示され、その測定条件が見い出された (詳細は J. Biochem. 93, 1709-1712. に記載)。

(2)これまでのところ、抗アセチルコリン受容体モノクローナル抗体として、7種類のものが得られた (NAR-1 ~ NAR-7)。それらの抗体の特徴の幾つかを表1に示す。この表に見られるように、これらの抗体は全て、膜結合型のアセチルコリン受容体と結合することができる。すなわち、その抗原決定部位は全て、膜外に露出した部分にあり、受容体分子の表面積のうちの大部分が膜外にさらされていることを推測させる。また、これら7種のモノクローナル抗体の間での、拮抗的結合実験の結果、それぞれの抗原決定部位は受容

体分子上に、図1に示されるように配置していることが明らかになった。今後、これらの抗体の結合するサブユニット特異性を更に検討し、アセチルコリン受容体分子におけるサブユニット間の配置関係について検討を加える計画である。

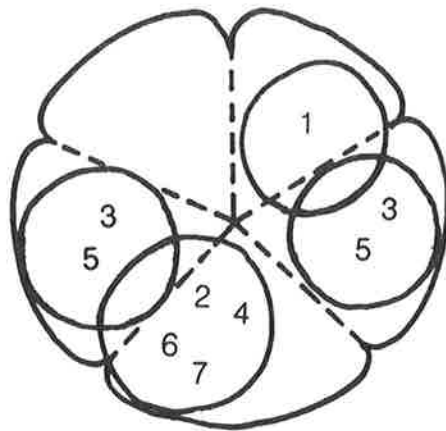


図1 モノクローナル抗体結合部位の配置模式図

花卉状の輪郭はアセチルコリン受容体分子を表す (サブユニット組成 $\alpha_2\beta\gamma\delta$)。図中の数字は抗体番号。それぞれの抗体は円で囲まれた領域内に結合する。NAR-3およびNAR-5の結合領域は二つの α サブユニット上にある。

モノクローナル抗体	膜結合受容体への結合	最大結合数	結合サブユニット	交叉反応性		
				ラット筋	鶏筋	電気ウナギ
NAR-1	+	1		—	—	—
2	+	1		—	—	—
3	+	2	α	—	—	—
4	+	1		—	—	+
5	+	2	α	—	—	—
6	+	1		—		±
7	+	1		—		—

図1 *Narke japonica* アセチルコリン受容体に対するモノクローナル抗体。

神経膜内表面に結合した荷電ポリアミノ酸分子の 膜興奮性への作用

古家 喜四夫・山岸 俊一

〔研究目的〕 ヤリイカ巨大神経に内側からカチオン化フェリチン (CF) を作用させると CF は膜内表面にびっしりと結合していることが電顕で観察される。しかしその興奮性への作用は Na チャネルのみに作用し、その不活性化のみを抑制するという非常に特異的な働きをし、いわゆる表面電位を変化させた効果は全くみられなかった。以下で述べる正電荷をもったポリアミノ酸の場合は一見 CF とはまったく異った作用をし、表面電位の変化が露にみられる。これらの現象を理解することは興奮膜の構造を知る上で重要と考えられる。

〔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数分 pronase を作用させて膜内表面を露出させた。外液は人工海水、内液は 250 mM KF (PH 7.4) を用いポリ-L-リジン (PLL), ポリ-L-アルギニン (PLA), ポリ-L-グルタメート (PLG), プロタミンなどを作用させた。

〔結果および考察〕 0.05 mg/ml の PLL を細胞内灌流すると数分で活動電位は消失した。静止電位は少し上昇傾向を示し、膜抵抗はわずかに減少した。膜電位固定法で調べてみると図 1 に示すように保持電位が静止電位 (-60 mV) では外向電流は減少し、内向き電流は殆んど完全に抑制された。しかし保持電位を -100 mV にして測定すると外向き、内向き電流ともに回復した。また負電荷をもった PLG を灌流すると保持電位 -60 mV でもほぼ完全な回復がみられた。PLL の結合は KF 溶液で洗ってもはずれず、保持電位にも無関係であった。PLG は結合した PLL の正電荷を打ち消す働きをしていると考えられる。また PLG のみでは興奮性に影響はなかった。図 2 のプレパルス法によって測定した内向き電流不活性化の電圧依存性が示すように、Na チャネル近傍の負電荷に結合した PLL は Na チャネルの不活性化の電圧依存性を最大 50 mV シフトさせ、Na チャネルの不活性化を引き起こすと考えられる。Na チャネルの活性化や K チャネルへの影響は Na チャネル不活性化に対するほど大きくない。また PLL が作用した神経では不活性化を取り除くためのプレパルスの長さは 5 ～ 10 秒を要し、不活性化のメカニズムもなんらかの修飾を受けていることを示唆する。PLA, プロタミンなども基本的には同様の作用を示すが、電位シフトの大きさなど詳細には違いがみられた。

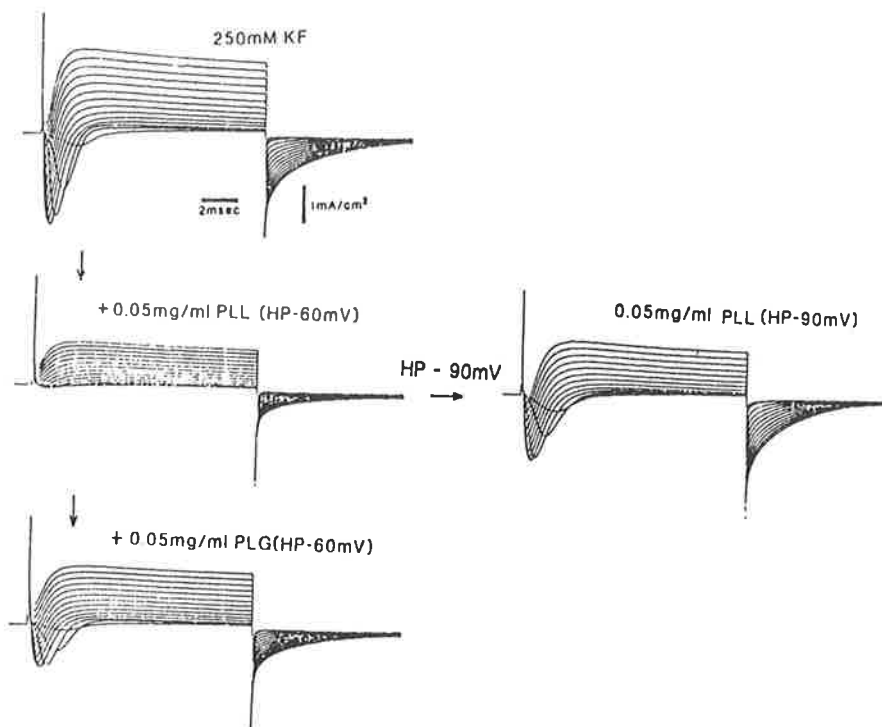


図1 膜電流に対する PLL, PLG, 保持電位の影響

保持電位 -60 mV では PLL によって電流は抑制される (とくに内向き電流が大きい) が保持電位を -90 mV にすると電流は回復する。また PLG を続けて灌流すると保持電位 -60 mV でも回復する。

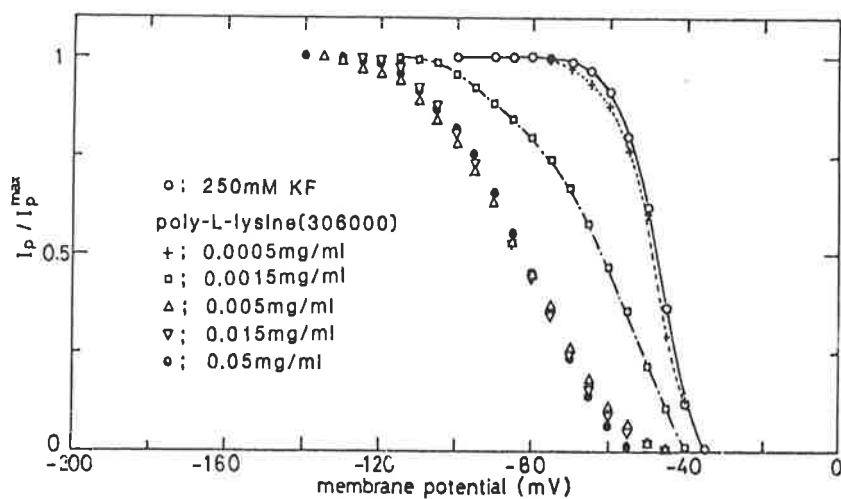


図2 Na チャネル不活性化の電圧依存性への PLL の作用

横軸はプレパルス (5 秒) の電圧, たて軸は内向き電流のピーク値をその最大値で規格化した値。0.005 mg/ml 以上の濃度で作用は飽和し, ある一定の曲線になる。

神経興奮とその伝達機能の分子的基础

藤田 省三 (特定領域奨励研究員)・山岸 俊一

神経興奮膜の分子的基础の機能と実体を明らかにするためには、興奮膜に特異的に作用する神経毒素の作用機構を明らかにすることが非常に有効である。私達は 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、毒素と神経膜の相互作用について研究を行なっている。昨年はサンゴイソギンチャク毒素 (PaTX) とザリガニ神経膜との結合様式について研究をすすめてきた。

本年は *Anemonia sulcata* toxia II (ATX-II) について放射能標識毒素を合成し、ザリガニ神経膜に対する結合様式を調べ、PaTX の結果と比較した。PaTX および ATX-II の生理学的性質はすでに調べられ、毒素の作用は基本的には類似しているが、毒作用の膜電位依存性には著明な差のあることが報告されている¹⁾。

標識毒素と歩脚神経の結合は25℃では1時間、15℃では2～4時間で最大となり、その後しだいに低下して14時間以降一定値に落ちついた。結合量は加えた標識毒素濃度に依存し、15℃、20時間反応後の結合量から最大飽和結合量 (Bmax) と解離定数 (Kapp) を求めると、1.5pmol/mg protein, 1.6nM となった。反応初期にみられる結合活性は上記 Bmax 値の2倍程度あり、Kapp も 7 nM と高い値を示した。以上の結果は速い時間経過で減衰する低親和性結合と、減衰しない高親和性結合の2成分があることを示唆している。歩脚神経より膜画分を調製し、結合量の時間変化を追うと、上記と同様に二成分からなることを示唆する結果となった。減衰する成分は温度依存性があり、4℃ではほとんど結合が抑制された。両成分の KCl 濃度依存性には差がなかった。神経束と膜画分の双方で結合が二成分からなっているので、これが神経束標品の中の神経線維間の damage の差にもとづく人工産物である可能性は否定できる。膜画分における Bmax, Kapp は1.5pmol/mg protein, 1.1nM となった。両成分のいずれが毒素の活性に対応するかは明らかではないが、減衰する成分が低温でほとんど結合を示さないのに対し、毒素の Na チャネル不活性化への作用はさほど温度に影響されないので、減衰しない成分と毒素の活性が対応していることが示唆される。

PaTX と ATX-II の結合に対する外記 KCl 濃度依存性を比較すると、PaTX では KCl が 5 mM 増加すると結合量が $\frac{1}{2}$ に減少するが、ATX-II では45mM の KCl を必要とする。ザリガニ巨大神経で調べた KCl 濃度と膜電位との関係を上の結果にあてはめ、生理活性の膜電位依存性との比較を行なうと両者はよい一致を示し、毒素の活性の膜電位依存性が結

合反応における依存性に由来することが明らかとなった。又両毒素の電位依存性が大きく異なることは、Na チャネルが (もしくはそのゲートが)、限られた膜電位でのみコンフォメーション変化をおこすのではなく、膜電位の広い範囲にわたってコンフォメーション変化をおこすものであることを示唆している。

文献

- 1) Warashina *et al.* (1981) *Pflügers Archiv* 391,273-276.

ムスカリン性アセチルコリンセプターの精製

八木沢 仁 (特定領域奨励研究員)・杉山 博之・山岸 俊一

〔研究目的〕 ムスカリン性アセチルコリンセプター (mAChR) については従来よりその単離・精製の困難さが指摘されている。本研究ではモノクローナル抗体を利用して mAChR を精製し、そのサブクラスを解析することを目的とした。その第1段階として、ハイブリドーマ作成のため、マウスに有効な免疫感作を付与し得るような純度まで、mAChR を大量に部分精製する方法を確立することが必要である。

〔材料及び方法〕 プタ脳の大脳皮質または尾状核のホモジェネートより粗膜画分 (P_2) を得、放射性標識されたムスカリン性アンタゴニストである [^3H] QNB (quinuclidinyl benzilate) あるいは [^3H] PrBCM (propyl benzilcholine mustard) (共有結合標識剤) を結合させた。 P_2 画分ではホモジェネートに対しすでに約2～3倍ほど mAChR の純度は上昇しているが、この段階を基準にして、デタージェントによる可溶化や、種々の生化的手法を適用した場合のセプターの精製状況 (純度及び収率) を検討した。

〔結果〕 1) 不連続ショ糖密度勾配遠心によるシナプトソームの分画によって、更に約2.5倍の純度の上昇がみられたが、収率は10%程度になった。

2) デタージェントとして Lubrol-PX を使用し、mAChR の可溶化条件を検討した。1% Lubrol-PX, 4℃, 1時間の処理後、抽出された分画を Sephacryl S-300 のゲルろ過にかけ、遊離の標識剤や非特異的結合をふくまない放射活性画分を得ると、数倍～10倍程度の純度の上昇がみられた。可溶化した mAChR の0.2% Lubrol-PX 中でゲルろ過の溶出位置から、可溶化 mAChR のみかけ上の分子量は約20万と推定された。(図1-a,b,c)

3) 可溶化 mAChR は DEAE セルロース (DE52) カラムに吸着し、100-200mM の NaCl によって溶出されてくるが、放射活性とタンパクの溶出パターンはブロードなほぼ

相似形のピークとなり、この手法は mAChR の濃縮と精製度の向上という目的のためには不向きであると考えられる。また等電点電気泳動でも、放射活性とタンパクの主要ピーク(いずれも 1 つ) は重なってしまい、電荷による mAChR の精製・分離はニコチン性リセプターの場合と比べて著しく困難であると思われた。

4) [^3H] PrBCM で標識した mAChR を SDS ポリアクリルアミド電気泳動ゲル上で、放射活性の単一ピークとして検出することができた。2-メルカプトエタノール存在下の見かけ上の分子量は $70 \pm 3 \text{ K}$ であった。

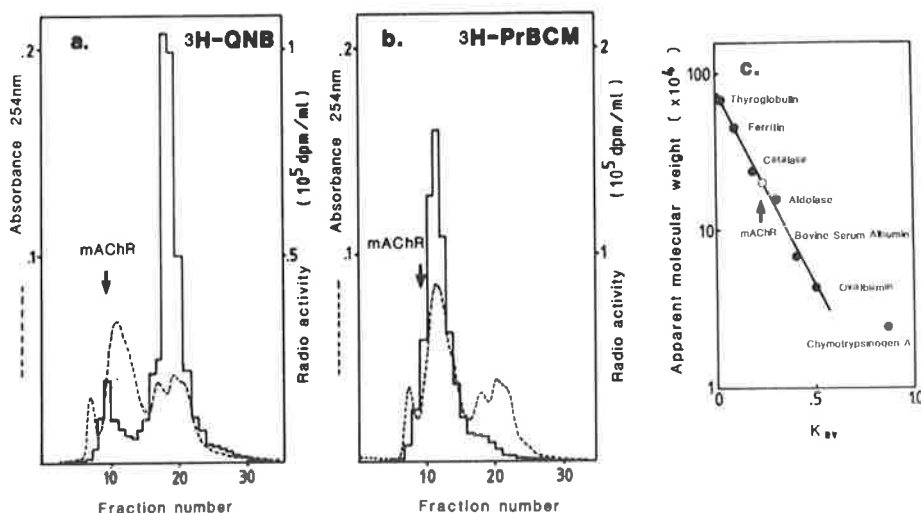


図1 Lubrol-PX によって可溶化した mAChR の Sephacryl S-300 によるゲルろ過のプロフィール。a: [^3H] QNB で標識した場合, b: [^3H] PrBCM で標識した場合, c: 較正曲線によるみかけ上の分子量の推定 [a.b.の放射活性プロフィールは非特異的結合と遊離のリガンドに由来するものを含む。これらバックグラウンドを差し引くと矢印の位置に単一ピークが出現する。尚, 溶出バッファは 0.2% Lubrol-PX/10mM Na-PBS (pH7.2)]

機 能 協 関 部 門

概 要

本部門では、神経・筋などの表面を被う興奮性膜に発生する興奮の機構についての研究を行っている。興奮は、活動電位を測定することにより最も簡単に研究できるので、電気生理学的手法は現在でも研究方法の根幹である。しかし、この方法で測定できるものは、膜の起電力と、膜のインピーダンスという2つの電気的性質に限定される。ところが、興奮性膜についての最近の進歩から、興奮現象も、他の基礎的な生理現象と同様に、生体の巨大分子の活動によるものであることが明らかとなりつつある。興奮現象を出現させるものは、興奮性膜に存在する膜内巨大分子（いわゆるチャンネル蛋白）であり、その活動様式を明らかにすることが現在の最も緊急な課題である。このためには、電気生理学的方法と同時に、巨大分子の活動様式を直接に把握しうる他の方法をも導入しなければならない。この認識が本部門を特徴づける。

本部門で実際に手がけることができたのは、(1)興奮に伴う膜の光学的変化、(2)興奮に伴う膜の機械的变化、および(3)興奮性を担う膜のチャンネル蛋白の抽出、という3つの課題であり、これらについて以下に述べる。また、中国より来訪された徐科氏は、今まで疑問につつまれていたクルマエビ巨大線維の電気生理について成果をあげたので併せて報告する。

神経線維よりの旋光性シグナルに対する複屈折性変化の関与

渡辺 昭

昨年度、エビの歩脚神経およびイカ巨大線維を用い、興奮に伴って旋光性の変化が認められることを報告した。本年度は、このシグナルについてより正確な測定を行い、特に複屈折性変化の関与の有無について検討した。このため、静止時の神経線維の旋光度の測定を行い、複屈折性変化の関与が旋光性シグナルに与える影響が僅小であることを証明した。

(1) 理 論

昨年までの取り扱いでは、神経線維は複屈折性を持ち、興奮にさいして旋光性変化がこれに重畳して現われるが、これは入射光の電気ベクトルの回転として取り扱うという簡単なものであった。この点を改善するために、複屈折性と旋光性とを共有する材料を通過す

る光の強度の計算を行った。この計算は、Jones マトリックスの理論を用いて行なわれた。この理論によると、偏光子と検光子の間に置かれた光学的要素は、 2×2 のマトリックスで表現できる。複屈折性と旋光性を共有する材料では、このマトリックスは計算されている(文献 1 および 2 を参照)。このマトリックスを、神経線維の直線 2 色性を考えた形に拡張し、これを用いて通過光の強度を表現する式(1)を得た。

$$\frac{I}{I_0 g h} = q_1 \cdot \cos^2(a-p) + q_2 \cdot \sin^2(a-p) + q_3 \cdot \cos^2(a+p) + q_4 \cdot \cos(a+p)\cos(a-p) + q_5 \cdot \sin(a-p)\cos(a-p) \quad (1)$$

ただし、 I は通過光の強度、 I_0 は入射光の光度、 g は神経線維の長軸方向についての振巾減衰率、 h はこれと垂直な方向についての振巾減衰率、 a は神経線維の長軸を基線とする検光子の透過軸の方位角、 p は偏光子の透過軸の方位角で、 $q_1 \cdots q_5$ は、神経線維の旋光角 α 、レターデーション δ 、および、2 色性を表わすパラメタ k の函数である。 k は

$$k = \frac{1}{2} \ln(g/h) \quad (2)$$

で定義される。 $q_1, q_2 \cdots q_5$ の具体的な形を図 1 として示す。

$$\begin{aligned} I/(ghI_0) &= q_1 \cdot \cos^2(a-p) + q_2 \cdot \sin^2(a-p) + q_3 \cdot \cos^2(a+p) \\ &\quad + q_4 \cdot \cos(a+p) \cdot \cos(a-p) + q_5 \cdot \sin(a-p) \cdot \cos(a-p) \\ q_1 &= \frac{1}{2} (\cosh 2v + \cos 2u) \\ q_2 &= \frac{1}{2} \alpha^2 (\cosh 2v - \cos 2u) / \rho^2 \\ q_3 &= \frac{1}{2} (\beta^2 + k^2) (\cosh 2v - \cos 2u) / \rho^2 \\ q_4 &= \{ (vk - u\beta) \cdot \sinh 2v + (uk + v\beta) \cdot \sin 2u \cdot \cosh 2v \} / \rho^2 \\ q_5 &= \alpha \{ u \cdot \sin 2u \cdot \cosh 2v + v \cdot \sinh 2v + k (\cosh 2v - \cos 2u) \} / \rho^2 \\ u &= \rho \cos \theta, \quad v = \rho \sin \theta \\ \rho &= (\alpha^4 + \beta^4 + k^4 + 2\alpha^2 \beta^2 + 2\beta^2 k^2 + 2k^2 \alpha^2)^{1/4} \\ \theta &= -\frac{1}{2} \tan^{-1} \frac{2k\beta}{\alpha^2 + \beta^2 - k^2} \\ \beta &= \frac{\delta}{2} \\ k &= \frac{1}{2} \log(g/h) \end{aligned}$$

図 1 旋光性、複屈折性および、直線 2 色性を持つ物質を偏光子と検光子の間においた時の光の強度を記述する式。 I は透過光の強さ。 I_0 は入射光の強さ。 g は x 軸方向の振巾減衰率、 h は y 軸方向の振巾減衰率。 q_1, q_2, q_3, q_4, q_5 は下の 5 つの式で決定されるパラメタで、物質の旋光性 (α)、レターデーション (δ)、2 色性 (k) によって定まる。 a は検光子の透過軸の神経の長軸に対する方位角。 p は偏光子の透過軸の神経の長軸に対する方位角。神経の長軸は x 軸と一致する。

(2) 静止時の旋光性 α の測定

式(1)を用いると、静止時の神経の旋光性を求めることができる。その方法は、まず検光

子と偏光子を直交させ、間に神経を入れて回転し、光の極小値において神経を固定する(この時、神経の光軸は偏光子または検光子の透過軸と平行または直角となる)。ここで検光子を回転させると、神経線維に旋光性のある時には、光強度はさらに低下するので極小値になるまでの検光子の回転角度を読む。この角度は、旋光角の第1近似であり、式(1)を利用して近似をくり返すことによって充分な精度の旋光度を求めることができる。表1に、そのようにして求めたエビの歩脚神経の旋光度を示す。(神経線維は Merbromin で染色されている)。顕著なことは、入射光の E ベクトルが神経線維に垂直なとき、神経線維は右旋性を示し、平行なとき、神経線維は左旋性を示す(Nerve #3 のみが例外)。

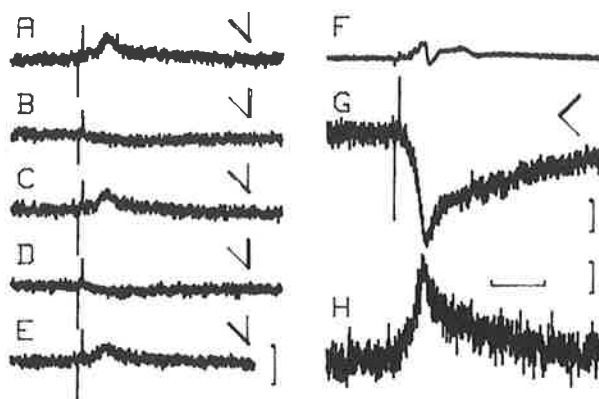


図2 旋光性シグナルと複屈折性シグナルの比較, エビの歩脚神経を摘出し, 0.025 mg/ml の Merbromin で染色したのち偏光子と検光子の間に置き, 510 nm の光で照対した。A, C, E では, 偏光子は神経に垂直(図中の太線で示す), 検光子は偏光子に対し反時計まわりに 45° におく(図中の細線で示す)。B, D では, 検光子と偏光子の方位角を交換した。較正は背景光の 5×10^{-5} , F は, 神経の一端よりとった細胞外活動電位, G は, 偏光子と検光子を直交させ, 神経に対し 45° として得られる複屈折性のシグナルを示す。較正は背景光の 10^{-5} , A-G では, 上向きのは透過光の強度の上昇を示す。H は A, C, E の平均から B, D の平均を引いて2で割ってえられたシグナル。較正は大略 5×10^{-6} ラジアン(または 3×10^{-4} ミリ度)の変化を示し, 上向きは左旋性の上昇を示す。時間の較正, 10 ms, 20°C 。

(3) 複屈折性変化に基づく誤差の推定

図2に, 旋光性変化と考えられるシグナルの1例を示す。光源を出た光は干渉フィルターにより準単色光となったのち, 偏光子, 標本(エビ歩脚神経, 0.025 mg/ml にて10分間染色), 検光子を通過し, 光検出器(シリコンフォトダイオード)に入る。検光子の方位角が偏光子の方位角にくらべて反時計まわりにある時, 刺激に応じて透過光の上昇が見られるが,

検光子と偏光子の方位角を交換すると刺激に応じて透過光のわずかな減少が見られるのみとなる。従って、刺激により神経の旋光性は変化し、左旋性が増大したものと考えられる。A, C, E の記録の平均と B, E の記録の平均との差の半分を H に示す。

(1)で述べた理論によると、A-E の記録は、神経の光学的パラメタ (α , δ , k のいずれか) が変化したために生じた透過光 I の変化である。今これが δ の変化にもとづくものと考えたと、変化の量 $\Delta\delta$ は小さいので

$$\Delta I = \frac{\partial I}{\partial \delta} \Delta \delta \quad (3)$$

と現わすことができる。方位角を交換しても、5番目の項以外は不変にのこるので、その差をとって2でわると、記録 H に相当するものとして、

$$\Delta H = \frac{\partial q_s}{\partial \delta} \Delta \delta \quad (4)$$

という式がえられる。 $\partial q_s / \partial \delta$ の価は、静止時の α の価とよく比例するので、表1から、偏光子が神経に垂直なグループのうち α の絶対値が最大である例 (#4) をとって計算を試みると、 $\Delta\delta$ は記録 G から 1.8×10^{-3} 度となり、 $dq_s / d\delta$ は 3.5×10^{-4} となるので、 $\Delta H = 6.3 \times 10^{-7}$ となる。実測されたシグナルは 1.7×10^{-5} であるので、複屈折性変化がこのシグナルに与える影響は、シグナルの大きさに比し軽微であることがわかる。

Nerve	Ae (Deg)	δ (Deg)	k	α (Deg)	polarizer
1	-1.79	74.1	-0.015	-2.38	p
2	0.95	69.6	-0.041	1.18	v
3	1.55	110.4	-0.044	3.07	p
4	1.03	82.3	-0.003	1.48	v
5	0.75	72.2	-0.010	0.98	v
6	-0.50	69.5	0.023	-0.66	p
7	-1.40	75.0	0.015	-1.92	p
	0.10	75.0	0.015	0.14	v

表1 静止時の神経の旋光性, エピの歩脚神経を Merbromin 0.1-0.025 mg/ml の溶液で約 10 分間染色し, チェンパーにいれて, 交叉させた偏光子と検光子の間にいれ, 回転させて光の極小値の位置で固定し, さらに検光子を回転させて光の極小値にいたるまでの回転角 Ae を読む。このうち, ($a=0^\circ$, $p=0^\circ$), ($a=90^\circ$, $p=90^\circ$) および ($a=45^\circ$, $p=-45^\circ$) の光の強さを記録すると, レターデーション (δ), 直線 2 色性 (k) とともに旋光度 (α) を式(1)により計算しうる。p は, 偏光子の透過軸と神経の長軸とが平行であること, v はこれらが直交していることを示す。波長は 490-510 nm。

(4) [結論]

さい

Jones マトリックスを用いた理論計算によると、標本が複屈折性変化を行うさい により、見かけ上の旋光性変化のシグナルを生じることがわかる。しかし、定量的な計 染色 算により、その大きさは観測されるシグナルに対し非常に小さいことがいえる。したがって染色された神経は、興奮に伴ってその旋光性を変化させていることが結論される。

文献

- 1) Disch, R. L. and Sverdlik, D. I. (1967). J. Chem. Phys. 47: 2137.
- 2) Watanabe, H. (1979). Rept. Prog. Polymer Phys. Japan, 22: 581.

巨大神経線維における細胞内圧変化の特徴

寺川 進

イカ巨大神経の細胞内の圧力は、興奮に伴ってわずかながら変化することが見出されている (本年報 第3巻)。この圧力応答の発生部位と発生機構、さらにチャンネルの活動との相互関係を解明するために、応答の性質と特徴を調べた。

細胞内灌流法によって原形質を取り除いたイカの巨大神経線維内に、直径 0.5 mm 長さ 5 mm のガラス管を挿入し、このガラス管断端に細胞内液の液面を形成させた。この液面は、通常、外向きに凸の形にすることができ、水の表面張力による圧力は細胞内圧と平衡する。そこでこの液面の形状をガラスファイバー製の反射型センサーによって測定し、加算平均法によってそのわずかな変化を検出した。

巨大神経を電気刺激すると、活動電位が発生するとともに、約 10 mPa の細胞内圧の変動がおこる。この変動は 5 ms 程の持続をもち、圧力の上昇する相とそれに続く下降する相とから成っている。この下降相は、細胞外液中の Ca イオン濃度を上げると大きくなる (図 1)。また、低温下ではその時間経過は遅くなる (図 2)。これらの変化は活動電位にみられる変化よりもはるかに大きい。

細胞内液としてイオン強度の低い溶液 (30 mM KF) を用いたり、テトラエチルアンモニウムを含む液を用いると、活動電位の持続は長くなりいわゆるプラトーをもつようになる。このときにみられる細胞内圧変化は圧上昇相の長いものとなる。細胞膜内面を蛋白分解酵素で処理した場合にも同様の結果が得られる。

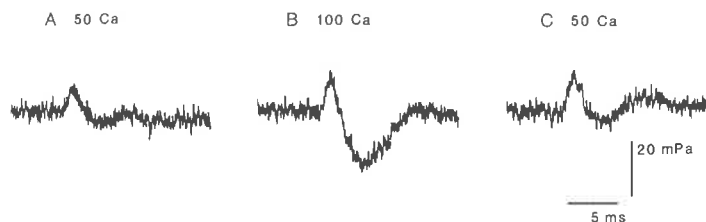


図1 細胞内圧変化に対する外液Caイオンの濃度の効果。外液人工海水中の CaCl_2 を NaCl とおきかえた。Aはcontrolで CaCl_2 濃度50 mM, Bは CaCl_2 濃度を100 mMにして5分後にとったもの, Cは回復を示す。圧力変化の上向きは圧の増大を表す。電気刺激は細胞外からで0.05 msのパルスによる。

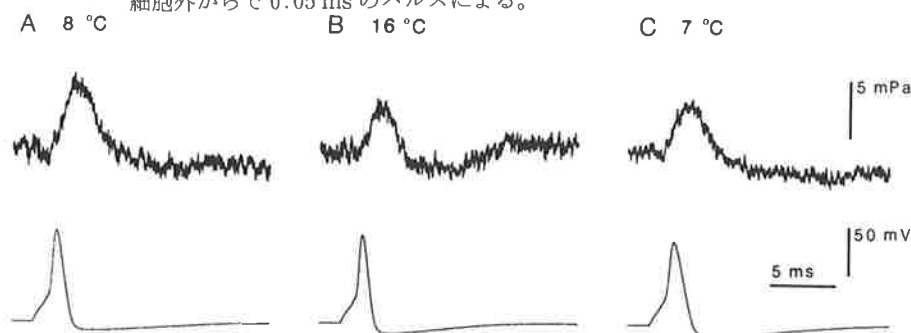


図2 細胞内圧変化(上)と活動電位(下)に対する温度の効果。溶液の温度を8 °C, 16 °C, 7 °Cと順に変えた。細胞内圧変化は1000回の加算平均によりもとめた。細胞内に2本のプラチナ線電極をおき, 一方で通電刺激し, 他方で活動電位を記録した。

細胞内に通電用の電極をおき, 矩形状に膜に外向き電流を流すと圧力上昇が認められ, 逆に, 内向き電流を流すと圧力の下降が認められる。圧力変化の時定数は約20 msである。通電時間を秒以上にするとこれらの圧力変化の方向は逆転し, 通電時間が短いときにみられる現象に別の現象が加わってくることがわかる。この遅く起きる現象はその大きさが桁ちがいに大きく, 電気浸透による水の膜透過と考えるとその方向が説明できる。通電時にみられる細胞内圧の速い変化は, 細胞外液のKイオン濃度を上げたとき(300 mM KCl)には小さくなる。このときには膜コンダクタンスは増大していることが知られているので, 細胞内圧変化は, 膜を通過する電流よりも膜にかかっている電圧に, より強く依存しているといえる。また, 通電により膜を過分極させたときにみられる圧力応答は, 細胞外に3 mMのlidocaineを加えることによって完全に抑えることができる(図3)。同様の圧力応答に対するテトロドトキシンの効果は小さい。

細胞内に2本のプラチナ線を挿入して, 膜電位固定法により膜電位を矩形状に変えたときには, 5 ms程度の時定数をもった細胞内圧の変化がみられる(図4 AとB)。その向き

は、脱分極時に圧力の上昇であり、過分極時には圧力の下降である。同時に観察される膜電流との関係は殆んど無いといってよい。膜電位と圧力応答との関係をプロットしてみると、第4図Cのようになり、約+150 mVに極値をもつような放物線に近い形の曲線が

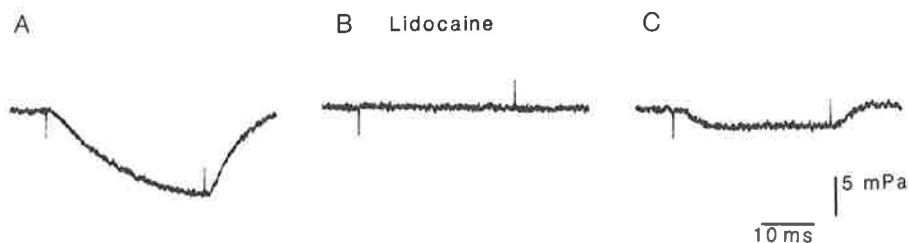


図3 膜の過分極に伴う細胞内圧変化に対する lidocaine の効果。A は lidocaine 投与前の圧力変化。B は細胞外に 3 mM の lidocaine を投与して 25 分後に記録したもの。C は lidocaine をとり除いてから 45 分後に記録したもの。スパイク状のアーチファクトで示される間、90 μ A の内向き電流を流している。下向きの変化は圧力の減少を示す。

得られる。この関係は、Cohen¹⁾らが神経線維の複屈折性変化と膜電位との間の関係として求めたものに類似している。このことは、複屈折性変化と細胞内圧変化とが共通の発生機構をもつ可能性を示唆している。

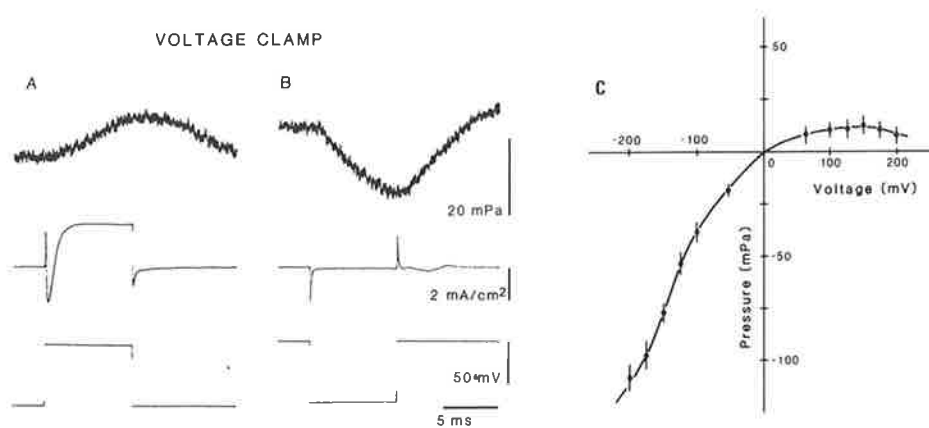


図4 膜電位固定下にみられる細胞内圧変化。A と B では上段が細胞内圧の変化、中段が膜電流、下段が膜電位変化を示す。A は脱分極性パルスを加えたとき、B は過分極性パルスを加えたときである。細胞内圧の変化は上向きが圧力の増大を示す。C は静止電位 (0 mV) からの分極の大きさ (+が脱分極方向) と細胞内圧の変化 (+が圧力増加) との関係を示す。黒丸が測定値を、小さな縦棒は記録に現われるノイズの巾を示している。

以上のことから、圧力応答の発生部位は膜の脂質領域であり、その発生機構は膜厚の膜電位依存性の変化であるという仮説が受け入れられる。さらに、膜厚の増大した状態では、興奮(膜コンダクタンスの高い状態)は終止しえず、膜厚が減少すると膜は静止状態に落ち着く、という解釈が矛盾の無いところであるが、膜厚の変化が実際にチャンネルの活動にどれ程作用を及ぼしているかはこれからの研究課題として残されている。

文献

- 1) Cohen, L.B. et al. J. Physiol. 218: 205-237 (1971)

norTTX の K チャンネルに対する効果

寺川 進 ・ 中山 孝

Lazdunski らの方法を用いてテトロドトキシン(TTX)の C₆ の位置をケト化し、これを逆相高速液体クロマトグラフ法により精製し、ケト化 TTX(norTTX)を得た。このものの、興奮性に対する効果を、ザリガニ巨大神経の活動電位と電圧固定下にみられる膜電流を指標に調べた。

norTTX を約 0.5 μ M の濃度で Harreveld 溶液に加えると、数分で活動電位の立ち上りが遅くなり大きさも減少する。これらの効果は TTX のもつ効果とまったく同じであるが、著しいちがいは、このときに活動電位の再分極の過程も遅くなることである(図 1)。活動電位の持続時間は、活動電位の大きさが初めの 70% になった時点で測定して、約 3 倍にのびる。

その後、上記の変化は進行し、約 15 分で活動電位の発生は完全に抑えられる。静止電位は 2 ~ 3 mV 脱分極方向に動く。norTTX を含まない Harreveld 溶液にもどすと、約 30 分で正常な活動電位にもどる。

巨大神経線維を 2 つのワセリンによる仕切で 1 mm の長さに仕切り、中央にガラス微小電極を刺入し、仕切りの両外側から中央部に向かって通電する方法によって、膜電位固定をおこなった。TTX で早い内向き電流を抑えると、0.5 ms でピークに達しその後持続するような外向き電流(いわゆる K 電流)だけがみられる。norTTX を作用させるとこの外向き電流の時間経過は遅くなり、大きさも減少する(図 2)。この変化は可逆的である。norTTX を先に作用させておくと、後から TTX を加えても新たな変化はみられない。

電圧固定下の膜の I-V 特性を調べてみると図 3 のようになり、norTTX は内向き電流を抑えるとともに、外向き電流も抑え、時間に依存した形で K コンダクタンスを低下させる

ことがわかる。norTTX の作用は $100\ \mu\text{M}$ の TTX 存在下でも認められる。

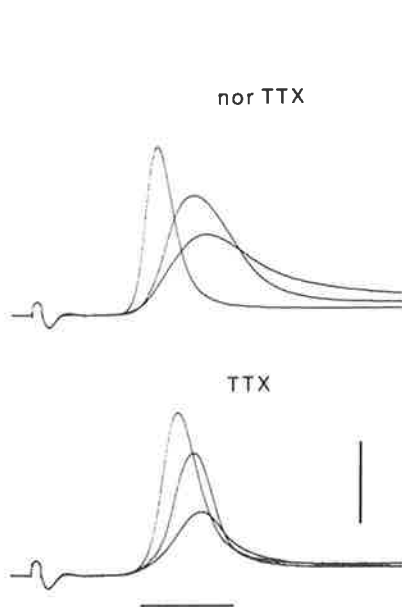


図1 norTTXとTTXの作用のちがい。上は $0.5\ \mu\text{M}$ のnorTTXを与える前と、与えてから10分後、18分後の活動電位。下は $0.2\ \mu\text{M}$ のTTXを与える前と、与えてから3分後、6分後の活動電位。較正は横棒1 ms, 縦棒50 mV。

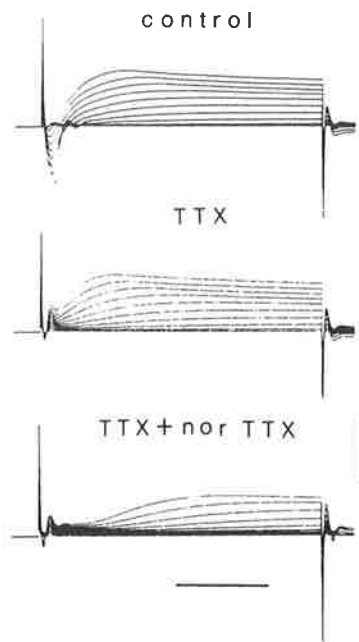


図2 電圧固定下の膜電流に対するTTXとnorTTXの作用。上段は薬剤投与前、中段は $2\ \mu\text{M}$ TTXを加えた場合。10 mVごとに脱分極パルスの大きさを変えている。較正は横棒1 ms, 縦棒10 mA/cm^2 。

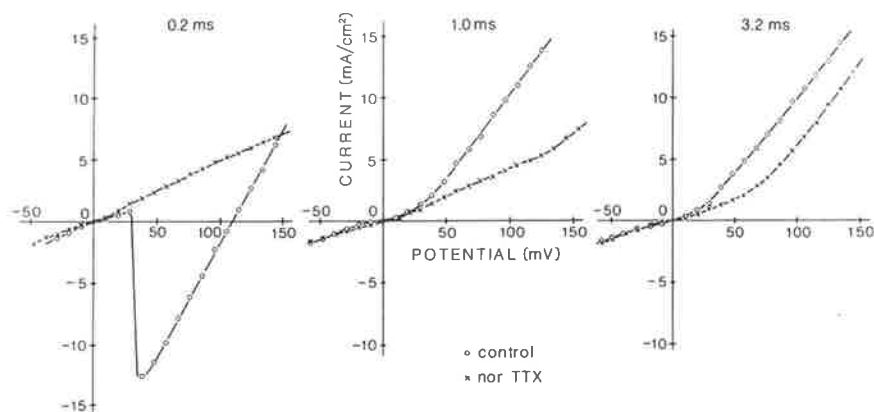


図3 膜電位固定法で得られる膜の電圧電流関係に対するnorTTXの効果。○印はcontrol, ×印は約 $0.5 \mu\text{M}$ のnorTTXを外液に加えて13分後にとったもの。電圧固定パルスの立上り後の各時刻にて測定した。0 mVは静止電位のレベル。

以上のことから, norTTXはNaチャンネルに作用するだけでなく, Kチャンネルにも作用することが結論される。これらの作用は, norTTXが2種類の異なる部位へ, それぞれ独立に結合することによって起るものである。しかしながら, これらの2つの部位は, 共にnorTTXに結合するという意味では, 構造的に共通の部分をもっていると考えられる。すなわち, NaチャンネルとKチャンネルはその構造の少なくとも一部が類似している可能性がある。Kao¹⁾らは C_6 に分子量100程度の未知の側鎖をもつTTX誘導体(Chiriquitoxin)がNaチャンネルとKチャンネルの両方に同時に結合すると報告している。 C_6 の位置を修飾したTTXは, 今後, チャンネルの構造と機能を解明するためのmolecular toolとして有用になるであろう。

文献

- 1) Kao, C.Y. et al. J. Pharmacol. Exp. Therap. 217:416-429

テトロドトキシン誘導体によるテトロドトキシン 結合タンパク質の単離

中山 孝

ナトリウム・チャンネルを興奮膜から可溶化し単離する時に, テトロドトキシン(TTX)との結合を示標としており, TTX結合タンパク質としてナトリウム・チャンネルの精製が

試みられている。TTX 結合タンパク質を可溶化する際に、TTX の結合部位が非常に不安定なため界面活性剤のほかにリン脂質を加え、さらにあらかじめ結合部位を TTX で保護しておく必要がある。したがって TTX をカラムクロマト樹脂に結合させ、可溶化の後に TTX 結合タンパク質をアフィニティクロマトグラフィーで回収する方法が非常に困難であった。今回合成した TTX 誘導体は、TTX にビオチンを結合したものであり、組織化学で応用されているアビジン・ビオチン法を利用することにより、TTX 結合タンパク質の単離を試みた。合成したビオチン化 TTX は昨年報告した高速液体クロマトグラフィーによる方法で精製をおこなった。TTX 結合タンパク質の単離方法は下図に模式的に示した。

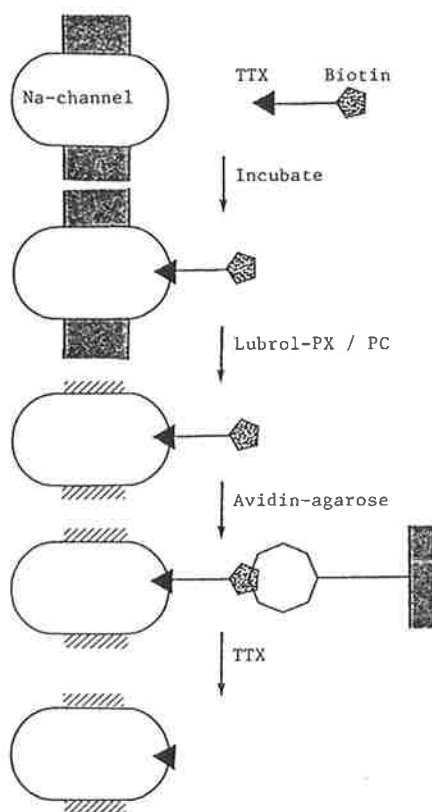


図1 単離の模式図

あらかじめビオチン化 TTX を、ナトリウム・チャンネルと結合させておき、その後界面活性剤とリン脂質で興奮膜より可溶化する。可溶化したタンパク質をアビジンアガロースカラムを通過させることにより、含まれているビオチン化 TTX をアビジンに結合させる。結果的に TTX 結合タンパク質—TTX—ビオチン—アビジンの複合体が形成されることになる。カラムを十分に洗浄したのちに過剰の TTX を加えることによって TTX 結合タ

ンパク質を流出した。TTX 結合成分を SDS-PAGE により調べたところ、分子量 25 万～27 万にかけてバンドが認められ、従来の電気ウナギでの結果とよく一致する。これによりビオチン化 TTX による、間接的なアフィニティクロマトグラフィーが有用なことが明らかとなった。

クルマエビ巨大神経線維における興奮膜の生理学的同定

徐 科 (外国人研究員)

クルマエビの神経線維は幾つかの構造的、機能的特徴を有している。そのひとつは軸索を被う厚い髄鞘である。この髄鞘には Node of Ranvier がないが、少なくとも内側巨大神経線維には跳躍伝導が起ることが電気生理学的に推定されている。組織学的に同定された軸索の外側には、微小管束からなる特有な鞘がみられ、この微小管鞘とその外側の髄鞘の間にはなお広い液体間隙が存在している。この細胞外に相当する髄鞘下腔からは、静止電位が 0 でしかも軸索内記録の特徴を有する 80mV 以上の活動電位が得られる。一方、髄鞘を横切って軸索に直接微小電極を刺入する試みをして、静止電位が 0 のまま、活動電位と思われる記録が得られる。このため、どの部位が本当の興奮膜であるか不明であった。そ

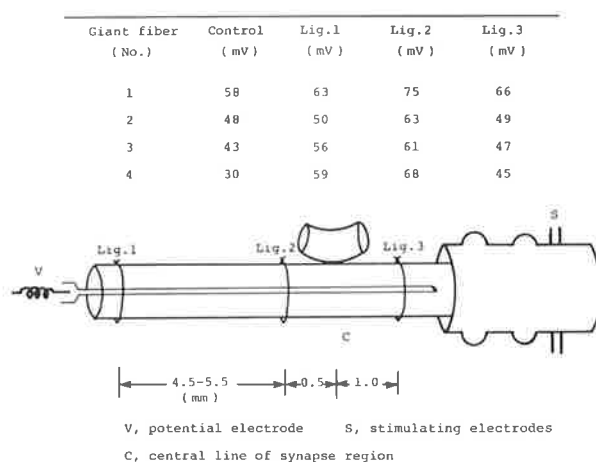


図1 Lig.1, Lig.2, Lig.3の順に結紮を行っていったときに測定される活動電位の大きさ。内側巨大神経線維の太さは約100 μ m。Cの部分に、運動巨大神経線維の一部を切り残してつけてある。両神経線維の軸索間にシナプス結合がある。

ここでどこが興奮発生部位であるかを同定するために次のような実験を行った。

図1に示したように、内側巨大神経線維の髄鞘下腔にガラス毛细管電極を挿入し、その先端をシナプス部を越えたところにおいた。ガラス管挿入端とは反対の端から細胞外刺激をしながら活動電位を記録した。絹糸で切口あたりに第一の結紮を、シナプスに近い所に第二の結紮を行うと、活動電位の大きさはそのたびに増加したが、シナプスを少し越えたところに第三の結紮を行うと、活動電位は約10~20mV小さくなった。この結果はシナプス膜に興奮性が存在することを示唆する。

内側巨大神経線維の軸索の直径は約15 μm であるが、運動巨大神経線維とのシナプス部(図1のC)にはシナプス前膨大部があり、ここは約30 μm の大きさを有している。さらに、シナプス膜はわずかながら髄鞘の被覆を免れている。そこで Lucifer yellow を充填した微小電極をシナプス前膨大部に刺入した。軸索だけが蛍光色素で染まった場合には約-60 mVの静止電位と、50~70mVの大きさの活動電位が見られた(図2, 3)。従って、シナプス膜は完全な興奮性をもち、これ以外の軸索膜は跳躍伝導の際にまったく興奮していないことが結論される。

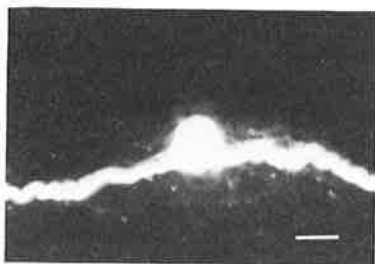
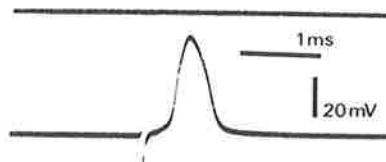
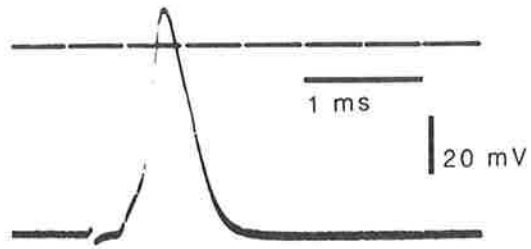


図2 Lucifer yellow によって染まった内側巨大神経線維の軸索とシナプス前膨大部(球状の部分)。較正は30 μm 。



Resting and action potentials recorded from the axon of the medial giant fiber of *Penaeus japonicus*.

シナプス部以外の軸索膜もおそらく静止電位をもっているであろうことは次の2つのことから推定される。1) 内側巨大神経と同様の構造をもつ運動巨大神経では、軸索がやや太く、微小電極の直接刺入によって静止電位と活動電位が確認できた(図4)。2) 内側巨大神経を凍結固定して、軸索内のKイオン濃度をX線マイクロアナライザーによって調べると、髄鞘下腔のそれよりはるかに高かった。



Resting and action potentials
recorded from the axon of the
motor giant fiber of *Penaeus*
japonicus.

以上のことから、クルマエビの内側巨大神経線維では、各体節ごとにあるシナプスの部分が興奮性をもち、この部分を介して跳躍伝導する、というモデルが正しいことが確立された。

(X線マイクロアナリシスは大阪医科大学の佐々木貞雄、中垣育子両先生の協力によって行われたものである。)

能 動 輸 送 部 門

中尾 真

まえおき

能動輸送とは生体膜をへだてて化学的及び電気化学的勾配にさからって低分子物質を移動させる働きの事である。その中でも最も重要なものは一次的能動輸送と云われる ATPase を用いたもので、ATP の化学エネルギーを直接浸透のエネルギーに交換する装置である。高等動物についての代表格である Na, K-ATPase は当部門の主要目標である。又生理学的意義のまさるとも劣らない Ca-ATPase は共同研究としてとり上げている。更に一部は ATP 消費をとまなう膜の隣接現象をとり上げている。

本年度「生体膜研究部門」の杉山助教授と共同で Na ポンプ (Na, K-ATPase) に対するモノクローナル抗体を作製するのに成功した。世界各国で幾つかのグループにより手がけられているものであるが、進行状況はほぼ一線上とみなされる。今回の成功は東京医科歯科大学杉浦助手と当部門の大学院生長宗及び「生体学研究部門」の杉山助教授に負う所が大きい。この研究は本年当部門全員と杉山助教授を中心に東京医科歯科大学医学部 (生化学教室、浦山助手)、東京都衛生研究所毒性部 (中尾順子科長) 東京都臨床研 (真崎教授) を含む大きなプロジェクトとして進行中のもので、Na ポンプに関する多くの性質を明らかにするために多彩な技術と組み合わせて利用される予定である。

他に馬腎 Na, K-ATPase について、はじめてトリマー構造を示唆した。酵素中間体 2 種の反応機構における役割についても若干の進歩を示した。培養細胞を用いた研究ではポンプの器管差の問題は昨年の知見を補強し確認した。佐藤温重教授等との共同研究では、耐塩細胞の順応過程においてポンプ活性の増加の実体について追求中である。赤血球の ATP による変形機構については大幅な進歩がみられ裏打ち構造のみで Ca^{2+} と ATP に反応して変形する現象を見出した。

活性を有する馬腎の Na, K-ATPase のサブユニット構造

中尾 真 (生理研) ・中尾 順子 ・大野 知子
前木 吾市 (都衛生研)、石川 春律 (東大・医)

膜結合の NaK-ATPase については詳細な研究がなされているが、界面活性剤で可溶性

した酵素についての報告は少ない。私共は、ブタ脳ミクロソームから LnbrolWX で可溶化した酵素について、アミノエチルセルロースカラムを用いて分画し、3つの peak を得たことを既に報告した。本実験は $C_{12}E_8$ 抽出酵素を馬腎髄質外帯の SDS 処理酵素から得て、東洋ソーダの G 3000 SW または G 4000 SW による高速液クロにより分画した実験の途中で、NaK-ATPase を待つ fraction が溶出液中に存在する Na イオンと K イオンにより溶出位置が異なることを見出した。同様な現象は、Sephacrose 6 BCL より Post と共同研究者が報告している。しかし、この現象は支持体と酵素の間の相互作用であるか、または分子量のちがいは、クロマトグラムのみでは決定できないので、より正確な結果を得るために、低角レーザー光線乱を上述の多孔性シリカゲルを支持体とした HPLC と組み合わせることにより分子量の正確な測定を行った。この方法は高木ら¹⁾により可溶性蛋白の分子測定量と SOS 可溶性蛋白について利用できることが報告されている。本法への適用は高木の示唆によるものである。私共は $C_{12}E_8$ で可溶化した Na, K-ATPase を本法に適用した結果、次のことを見出した。即ち K^+ を含む溶離液で溶出した時の主たる peak の分子量は、 Na^+ を含む溶離液で溶出した時の約 2 倍であること、また最小の活性を持った単位は、Na のイオン peak の 1/3 の分子量を示し、 Na^+ または K^+ を含む溶離液で共に同じ大きさであり、このことにより酵素がモノマー、トリマー、およびヘキサマーとして存在する可能性を示した。また電顕陰染色像はこの推定を支持した。

〔材料および方法〕 馬腎髄質外帯から Na, K-ATPase の精製は Jprgensen に従った。Buffer は、Histidine-Cl buffer で 2mM の EDTA を含むものを用いた。SDS 処理は 1.4mg のタンパク当り 0.9mg の SDS を用いた。34~45 μ mole Pi/mg prot/min の活性を持つ ATPase は、0.5% Sucrose, 2M Histidine 1mMEDTA に suspend しタンパク濃度は 2~4mg/ml とした。このものに $C_{12}E_8$ solution を徐々に加えて、わずかに混濁した状態にした。 $C_{12}E_8$ とタンパクの比は 0.7—5 まで、この混液は直ちに、32 万×G 1 hr ベックマンの Ti 75 rotor で遠心した。全く透明な上清を分離し、Esmann²⁾の方法に従って活性を測定した。比活性は 42—51 μ mole Pi/mg prot/min, SDS-PAGE は Laemli の方法を用いた。HPLC gel filtration は、varian Model 4100 に TSK-G4000SW または、G3000SW を装着して 100mM Tes-Tris pH6.8 に 0.01% $C_{12}E_8$ と 25 mM NaCl または 10-25mM KCl で平衡したものを用いた。 $C_{12}E_8$ はヘキサンから再結晶したものを用いた。50-100 μ l の上清を一回の分析に用いた。280mm でモニレータし、必要な時は PNPase を測定した。光散乱は低角度のレーザー光線乱計 (He-Ne, 633mm) 東洋ソーダ製の Model LS-8 を用いた。レフラクトメーター RI-8 (東洋ソーダ製) を用い室温 25℃ ± 0.5℃ で測定した。分子量測定は高木の方法により次式に従った。

$$\frac{(\text{out put}) \text{ LS}}{(\text{out put}) \text{ RI}} = \text{No}^2 \left(\frac{\text{dn}}{\text{dc}} \right) \text{ K'M}$$

ここに No, dn/dc, Ls, RI, K'および M は refractine index of the solvent at 633mm refractine increment of the protein light scattering, refractine intensity instrument constant および molecular weight と示した。サイログロブリン, アルドラーゼおよび BSA を標準蛋白として用いた。タンパクの測定はブラッドフォード法を用いた。

〔結果〕 C_{12}E_8 で Na, K-ATPase の活性は, 80~90%抽出され, 比活性は $51\mu\text{mole/mg prot/min}$ この活性は 0.1 mM ウワバインで完全に阻害される。活性は -80°C で 3 ヶ月間ほとんど活性の変化がない。BDS-PAGE では, α と β バンドのみで γ バンドはない。dn/dc の値は標準蛋白について, NaK-ATPase を測定した条件で RI によって求めた事と BSA 0.144 サイログロブリン 0.141 C_{12}E_8 ミセル 0.135 で大きな違いはなかった。分子量 $\times$ dn/dc と Ls/RI は直線関係を示した。ATPase ピーク, K-2, Na-2, Na-3 について分子量 $\times$ dn/dc は 6 : 3 : 1 となる。この関係は各ピークについての電顕陰染色像によっても説明され, Na-2' についてはトリマーの像が見られ, Na-3 では分散したモノマーであった。ATPase の他のピーク, Na-1, K-1 はボイド容積に近く, LS/RI は大きい。K-3 は Na-3 に等しい。Armstrong によれば血清中の 10 種の蛋白は 75% のリピドを含む場合でも (an/dc) の値の差が 10% 以下であった。それ故, ここでは NaK-ATPase の (dn/dc) を 0.14 と仮定して計算の根拠とした。Na-3, K-3 共に (dn/dc) を 0.14 とすると, 分子量 1.4×10^5 となり, この結果からの β のモノマーと推定され, Na-2 は $\alpha\beta$ のトリマーで 5.2×10^5 であり, K-2 はヘキサマーと推定され 10.4×10^5 であった。

文献

- 1) Takagi, T., Miyake, J. and Mashima, T. (1980) Biochem. Biophys. A. 629 : 5-14
- 2) Esman, M., Skou, J. C. and Christiansen, C. (1979) Biochem. Biophys. A. 567 : 410-420

赤血球裏打ち構造の ATP による変形

神部 芳則¹・中尾 真³・佐藤 真悟¹・大塚美恵子¹・月田早智子²・石川 春律²

(¹)東京医歯大・医・²)東京大学・解剖・³)生理研)

ヒト赤血球は細胞内 ATP 濃度に依存し形態変化を呈するが, ghost 及び Triton shell を用いてその分子機構を検討した。ACD 保存血を生理学的食塩水で洗浄し, 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) で調整した ghost は低イオン強度の条件でも 2 mM Mg-ATP 存在下で

Echinocyte → Discocyte の変化を生じる。即ち、10mM トリス 塩酸緩衝液中では Spherocyte を呈するが、2mMMg-ATP (pH7.4) 添加で低温でも直ちに Echinocyte に変化する。しかし 37°C で 20—30 分加温すると徐々に Discocyte へと変化する。この ghost を 1mMMgCl₂ (pH7.4) で洗浄すると Spherocyte に戻り、再び 2mMMg-ATP を添加すると、今度は室温でも直ちに Discocyte に変化した。ATP に依存した ghost の形態変化には 2つのステップがあると考えられる。ステップ I は mM オーダーの Mg-ATP 存在下で 37°C, 20~30 分の加温を必要とし、ATP アナログは無効である。一方、ステップ II でも mM オーダーの Mg-ATP が必須でやはり ATP アナログは無効であるが、室温 (25°C) でも直ちに形態変化を生じ、明らかにステップ I と区別される。また新鮮血を用いた場合には、ステップ I が不必要である。次に Ca-EGTA 緩衝液を用いて Ca²⁺イオンの影響を検討した。全てのステップに 10⁻⁷~10⁻⁶M の Ca²⁺イオンを存在させると、ステップ I までは全く同様に Echinocyte → Discocyte の変化が見られるが、1mMMgCl₂ で洗浄後 Echinocyte を呈とする。新鮮血の場合も同様で、10⁻⁷~10⁻⁶M 程度の Ca²⁺で Echinocyte を生じやすい。このように 2mMMg-ATP と加温することで Ca²⁺イオンの影響を受けやすくなる。この場合も、7mMMg-ATP の再添加で直ちに Discocyte に変化する (ステップ II)。以上の 2段階の形態変化は等張でも同様である。この形態変化に於ける裏打ち構造の関与を検討する為に、0.5%TritonX-100 で処置したいわゆる Triton shell を調整した。調整した shell はネガティブ染色後、電子顕微鏡で観察し、明らかに脂質二重層が破壊され一部欠如していることを確認し、実験に用いた。さらに次の 5つの理由によっても未処置の ghost とは明らかに異なり、shell であることが示される。(1) SDS ポリアクリルアミド電気泳動によりバンド 3 の一部バンド 4.2 が Triton 処理後、上清に回収される。(2) 0.6 M, 0.8 M Sucrose 液中でも収縮しない。(3) 暗視野光学顕微鏡で表面を観察すると ghost は Smooth であるのに対し、Triton 処理後は rough になる。(4) ghost には赤血球、裏打ち構造、ATP DNaseI が作用しないのに対し Triton 処理後は DNaseI の作用で崩壊する。(5) リン脂質の定量により約 50%のリン脂質が除かれている。このような Triton shell を用いて、まず ghost の場合のステップ I に相当する、Mg-ATP との加温の影響を検討した。約 10 週前後の ACD 保存血から ghost を調整し、さらに Mg-ATP と加温、洗浄した後 0.5%TritonX-100 で処理し shell を得た。この shell を各 Ca-EGTA 緩衝液に加え、暗視野光学顕微鏡にて形態変化を観察した。Mg-ATP との前加温の結果、Ca²⁺感受性が増大する。即ち、10⁻⁷~10⁻⁶M の生理的濃度の Ca²⁺イオン存在下で著明な収縮を示すようになる。この収縮した shell に Mg-ATP を再添加すると shell は拡張し disk 型に似た形態を呈する。この場合も mM オーダーの MgATP を必要とし、ATP アナログは無効であり、また室温で短時間に生じることから ghost のステップ II に対応すると考えられ、この現象

は可逆的である。

〔考察〕 ATP 依存性の ghost の形態変化には 2 つのステップが存在することが示された。このうちステップ I では Mg-ATP の依存下, 37°C で加温することが必要で, この条件ではタンパク mg 当たり 0.38 μ mole のリン酸化が生じることが (σ - 32 p) ATP を用いた実験で示された。一方 0.5% TritonX-100 処理で 85% 以上の 32 p が除かれ, この状態でも, ghost の変化に対応する形態変化が再現されることから裏打ち構造のリン酸化の重要性が示唆された。一方, ステップ II は室温でも直ちに生じることから ATP-binding と考えられる。以上から赤血球の形態変化にはスペクトリン-アクチンを主体とする裏打ち構造のリン酸化と, さらに裏打ち構造への ATP-binding の両方が重要であると考えられる。また ATP の水解が必要であるか否かについては, 今後の検討が必要である。

文献

- 1) Nakao, M., Nakao, T., Tatibana, M. and Yoshikawa, H.; J. Biochem. 47, 694 (1960)
- 2) Sheetz, M. P. and Singer, S. J.; J. Cell Biol. 73, 638-646 (1977)
- 3) Birchmier, W. and Singer, S. J.; J. Cell Biol. 73, 647-659 (1977)
- 4) Yu, J., Fischman, D. A. and Steck, T.; J. Supramol. Struct. 1, 233-248 (1973)
- 5) Sheetz, M. P.; J. Cell Biol. 81, 266-270 (1979)

腎臓上皮細胞の輸送機構成分の単離と生合成

太田 英彦

〔研究目的〕 上皮細胞の Na^+ , K^+ -ATPase は, 上皮細胞を通して行なわれる二次的能動輸送系の駆動力として, 管腔側細胞膜に存在し Ma^+ の電気化学的ポテンシャルに依存した輸送系の作用を可能にしている。この ATPase の生理作用とちょうど対応して, Na^+ , K^+ -ATPase は, 上皮細胞の反管腔側, つまり側底細胞膜にくみ込まれた細胞膜固有蛋白質として分布している。この様な分布がいかにして保たれているのか, それは管腔側の輸送系とどの様な関連をもつのかを明らかにすることを究極的な目的として, まず Na^+ , K^+ -ATPase の生合成をしらべるための準備を行なう。

〔研究方法と結果〕 (1) 種々の動物組織からの Na^+ , K^+ -ATPase の簡易部分精製法の開発 Na^+ , K^+ -ATPase の標品はイヌ・ブタ・ヒツジ等の腎臓から高度に精製されたものが得られているが, かなり操作がむづかしく, ゴーナルローターを必要とする等の難点もある。我々は, イヌ・マウス・ラットの腎臓や脳, 小腸等から得たミクロソーム画分を, 界面活性剤 SDS により洗浄する簡便な方法を用いて, 従来の方法による標品には劣るが, 容易に

比較的比活性の高い Na, K-ATPase 標品を得ることに成功した。この結果は第 55 回日本生化学会で報告した。さらにこの方法で得たラット及びイヌの腎臓からの標品を再度 SDS 処理後、密度勾配遠心を行なうことにより、純度が極めて高いとされる標品の 1/2-程度にまで精製を行なうことが可能であった。この標品を抗原として、 Na^+K^+ -ATPase に対するモノクロー抗体を現在作製中である。

(2) イヌ腎臓 Na^+ , K^+ -ATPase のアフィニティーラベル

Na^+ , K^+ -ATPase を精製し抗体を作製する第二の方法として、 Na^+ , K^+ -ATPase をアフィニティーラベルしそのラベルをハブテンとする抗体により Na^+ , K^+ -ATPase を単離することを試みた。既に Na^+ , K^+ -ATPase は反応サイクル中にコンフォメーション変化を示すこと、それに従い、 Na^+ , K^+ -ATPase の触媒活性をもつサブユニットのアミノ基が FITC によりラベルされやすくなったり、ラベルされにくくなったりすることが知られている。我々は FITC に変え、TNBS を用いたところ、 Na^+ 存在下では、 β サブユニットがラベルされないのに対し、 α サブユニットがラベルされ、この Na^+ のラベル促進効果は ATP, K^+ , Rb^+ , Ti^+ 等で低下することを見出した。FITC と TNBS は一部では同一のアミノ基を修飾している様であるが、両者夫々のみが修飾するアミノ基も存在する可能性を明らかとなった。無水酢酸、N-ヒドロキシルサクシニミド化ビオチン、等は TNBS と異なり、アフィニティーラベル作用を示さなかった。

TNBS は比較的安定な修飾を行なう化合物であり、これに対する抗体も容易に得られるばかりでなく、TNP 化されたポリペプチドはポリペプチド部分の抗原性が増強することでも DNP 化された蛋白質の例から推定される。従ってこの方法を Na^+K^+ -ATPase の α -サブユニット精製法として利用できると考えられる。以上の結果の一部は第 8 回生体エネルギー研究会で発表した。

(Na^+ , K^+) ATPase の基質阻害のメカニズム

福島 義博・中尾 真

〔概要〕 (Na^+ , K^+) ATPase は基質 ATP が高濃度存在すると阻害を受ける。特に Mg^{2+} より ATP 濃度の方が高い時に阻害は著しい。 Mg^{2+} と ATP に関しての (Na^+ , K^+) ATPase の至適条件は、両者が等モルあるいはわずかに Mg^{2+} の方が多い場合である。この基質阻害は (Na^+ , K^+) ATPase の真の基質が $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$ 複合体であるため、 Mg^{2+} フリーの ATP が基質結合部位で真の基質と拮抗することによると説明されてきた。

しかし、(Na^+ , K^+) ATPase の真の基質が $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$ であることは未だ証明されていない。それどころか Mg^{2+} 非存在下で ATP と (Na^+ , K^+) ATPase は高い親和性を示すことが明らかになっている。また速度論的解析によれば、 $\text{Mg}\cdot\text{ATP}$ もフリー ATP もともに基質になり得るとの結果も示されている。従って (Na^+ , K^+) ATPase の高濃度 ATP による阻害機構として上記の現在の説明が必ずしも正しくはないであろう。

本研究では、(Na^+ , K^+) ATPase のリン酸化中間体の加水分解速度が、高濃度 ATP で遅くなることを見出した。しかもこの ATP による加水分解阻害は、十分量の Mg^{2+} 存在下では起こらない。これらの結果から、(Na^+ , K^+) ATPase の基質阻害のメカニズムは、従来考えられていたような酵素と ATP の結合という反応の第一ステップに関するのではなく、中間体の分解という反応順序の上で、より後の出来事に関与している可能性が大きい。

〔研究方法・結果〕 NaCl 25 または 100mM および MgCl_2 50 μM 存在下で、(Na^+ , K^+) ATPase 0.1 mg/ml に 10 μM [^{32}P]ATP を添加してリン酸化反応を開始する (0 $^{\circ}\text{C}$, pH7.4)。50 秒後に得られるリン酸化酵素は全て K^+ に感受性であった。この状態のリン酸化酵素を以下では E_2P と略す。(K^+ 感受性に対し、ADP にリン酸基を与え ATP を再生するタイプのものを E_1P と呼んでいる。) 他の条件はリン酸化時と同じに保ったまま、 E_2P に過剰量の CDTA を添加すると、リン酸化に必要な Mg^{2+} がキレートされただけにリン酸化反応は止る。従って E_2P の分解速度を直接、蛋白部分の ^{32}P 減少によって求めることができる。

このチェース実験において、mM 単位の ATP を CDTE とともに加えると E_2P 加水分解は著しく阻害を受ける。 Na^+ 濃度 100mM の時、コントロール (CDTE のみ添加) の速度定数 0.075 s^{-1} に対し、2.4mM ATP によってそれが 0.042 s^{-1} になる。0.8mM ATP で 50% 阻害がかかる。このような ATP 阻害がかかっている条件下では、 K^+ による分解も減少している。すなわちチェース後 16 秒で 10mM K^+ を添加した場合、コントロールでは E_2P は初期値の 14% にまでただちに減少するが、5mM ATP 存在下では 23% のレベルで止まっている。

なおこの阻害は dATP または ADP でも部分的に起こる。しかし ITP, CTP, UTP および GTP では効果はなかった。

一方、CDTA を添加せず、過剰量の非放射性 ATP のみでチェースした場合、阻害は幾分弱いようであった。このことはフリーの Mg^{2+} が存在すれば ATP 阻害が起こりにくいことを示唆しているようである。ATP と Mg^{2+} の結合は CDTE とのそれより弱いためである。この可能性をテストするために、5mM 非放射性 ATP と共に等モルの MgCl_2 を加えると E_2P 分解の阻害はかなり保護され、さらに高度の MgCl_2 の存在によって完全にコントロールと同じ分解速度を示した。

〔考察〕 以上の結果から (Na^+ , K^+) ATPase の基質阻害の少くとも 1 つの原因は、 E_2P 加水分解が ATP で阻害されることである。今後 (Na^+ , K^+) ATPase の全体反応での阻

害が、このメカニズムのみで説明されるのか、または他の部分反応も考えに入れるべきなのかを知らなければならない。また、 Mg^{2+} による保護のメカニズムとして次のようなことが考えられる。 E_2P はMgを強く結合している。そのため $Mg \cdot ATP$ とは相互作用が弱くなるのではないだろうか。さらに今後の問題として、この阻害部位は、単に基質部位の変形として E_2P 上に残っているのか、または調節部位といわれているものと何らかの関係があるのか、いずれとも異った第三のサイトなのかを調べなければならない。阻害部位が細胞内側に面しているとすれば、細胞内にフリーの Mg^{2+} がATPと同等濃度以上存在することが、ポンプのフル回転のために要求される。

Na, K-ATP ase に対するモノクローナル抗体

浦山 修・長宗 秀昭・福島 義博*・原 諭吉・中尾 真*

杉山 博之* (東京医歯大・医・第一生化・*生理学研究所)

次の3つを目的として、Na, K-ATP ase に対するモノクローナル抗体を作製した。1つは、Na, K-ATP ase 機能における各サブユニットの役割を明らかにすること、2つめは触媒活性ペプチドの特定部位に対する特異的修飾プログの開発、3つめはアイソザイムを区別することである。免疫はブタ腎のSDS処理酵素(比活性平的 $1,400 \mu \text{ Mole Pi/mg/hr}$)をFreundの完全アジュバードに懸濁して抗原として、Balb/cマウス当り $50 \mu \text{g}$ を3週間隔で3回皮下注射することにより行なった。スクリーニングは最終的に酵素活性測定によった。SDS処理酵素と抗血清を 0°C でインベキューベ、そこにIgG吸着剤を加えて酵素・抗体複合特を遠心で沈殿させたのち、上清に残った遊離の酵素量を($\partial-^{32}\text{P}$)ATPを用いて測定した。正常血清をコントロールとして、Na, K-ATP ase 活性の減少を抗体活性とした。上記免疫で抗体価は、血清の1,000倍希釈でも50%の抗体活性を有するレベルまで上昇した。ブースター注射の3~4月後に脾臓をとり出し、融合はこの脾臓細胞とその1/10教のNSエミエローマ細胞をPEG 1.500中で混合することにより行なった。希釈後リンブロープレートにまいて、HAT選択培地を加えてそのまま10~14日間放置した。コロニーの観察できるウエルの培養上清を一部とり抗体価を調べた。4回の細胞融合実験で脾臓細胞は全部で 7×10^8 これを348ウエルにまきそのうち109ウエルにハイブリッド・コロニーが出現した。40%以上の抗体価をもつ47ウエルから全部85個コロニーをひろい個々に培養した。2回のクローニング操作を経て現在4個のクローンが得られている。

生 体 情 報 研 究 系

神 經 情 報 部 門

脊椎動物の網膜は光受容器であるばかりでなく、視覚刺激に含まれる形状や色などの情報を処理している中枢神経組織でもある。すなわち光信号は視細胞で視細胞電位に変換された後、双極細胞を経て神経節細胞に達し、その軸索（視神経）を経由して高次の視覚中枢へと送られる。網膜には2つのシナプス層があり、そこには上記の直接的な信号伝達路を側方に連絡する2種類の細胞がある。その第1は水平細胞で視細胞間の連絡を行なうと考えられている。第2はアマクリン細胞で内シナプス層において双極細胞や神経節細胞と結合している。

これまでの研究によって各細胞の受容野の構成や、主たる信号伝達路は明らかになった。しかし、分光応答の異なる subtype がどのような結合を持つのか、あるいは ON 応答, OFF 応答が発生する機構は何か、水平細胞やアマクリン細胞で考えられているフィードバックシナプスの動作様式は如何なるものであるか、網膜ニューロンの伝達物質は何か、網膜ニューロンのように緩電位によるシナプス伝達はいかなる機序で行なわれているのかといった問題は未だ明らかにされていない。これらの問題点は必ずしも網膜に限定された問題ではなく神経伝達に関する一般的な問題でもあり、網膜はその研究材料として種々の優れた点を持っている。

網膜のような神経ネットワークの中に組み込まれた細胞の伝達物質を研究する場合にはネットワークによる相互干渉が研究の大きな障害になる。最近開発された酵素による細胞単離法はこの困難を克服する有力な方法である。われわれは単離した水平細胞を用いて視細胞の伝達物質を探る研究に着手した。この研究は継続中であるが、この報告でその一部を紹介する。

一方、網膜神経網の動作様式を知る上で正確な形態学的知識がその基礎として不可欠である。ネットワークの中に組み込まれた細胞の詳細な結合を知るにはトレーサーを細胞内注入し、それを電子顕微鏡下で検索するのが優れた方法である。われわれはこれを網膜細胞に適用して形態に関する有意義な情報を得ている。この種の研究が部門の第2の研究課題でもあり、また当部門で行った2つの共同研究の課題でもあった。

このように当部門では機能と形態の上から脊椎動物網膜の研究を推進中である。

キンギョ網膜から単離した水平細胞の“glutamate”に対する応答

金子 章道・立花 政夫

網膜視細胞から放出される伝達物質としてはグルタミン酸など酸性アミノ酸である可能性が示唆されている。すなわち、視細胞の入力を直接受ける水平細胞や双極細胞にこれらの物質を与えると、水平細胞は脱分極し、双極細胞はON型では過分極、OFF型では脱分極を示し、これらの応答の極性は内在性の伝達物質に予期されるものと同じであることが報告されている(1～3)。しかし、網膜組織全体に与えたのでは、これらの物質が水平細胞や双極細胞に直接作用しているかどうかの判定は難しく、“diffusion barrier”や、他の細胞による取込みがあるため極めて高濃度に投与しなければ有効でない。また、in situ の標本では応答のイオン機構を解明することが困難であった。最近、網膜細胞を単離、培養する技術が開発され、それによって水平細胞の膜特性も明らかにされたので、われわれはこれを利用しグルタミン酸の水平細胞に対する作用を解析した(4)。

〔方法〕 1時間暗順応させたキンギョ (*Carassius auratus*) から眼球を取り出し、30秒間70%エタノールに浸した後、前眼部を除去し、5-7単位/mlのパパインと2.7mMシステインを含む液中に28℃で20分間インキュベートした。その後網膜を剥離し、小片にした後、再び同様の液で更に20分間インキュベートした。網膜を0.1mg/mlのアルブミンを含む液で洗浄した後、ピペットの中に出し入れして機械的に細胞を単離した。細胞浮遊液60～80μlを直径25mmの培養皿に移し、2mlの培養液を加えて10℃の空气中で培養した(5)。

このように単離した細胞の中から水平細胞はその形態から容易に同定することが出来た。すなわち、網膜組織中にある場合と同様に、水平細胞は5～8本の太い樹状突起を持つ星形の細胞であり、更に培養によって、この樹状突起から細い突起が多数伸びて来た。図1は培養3日目と9日目の水平細胞である。培養日数と共に突起の伸長が著明であることが認められる。

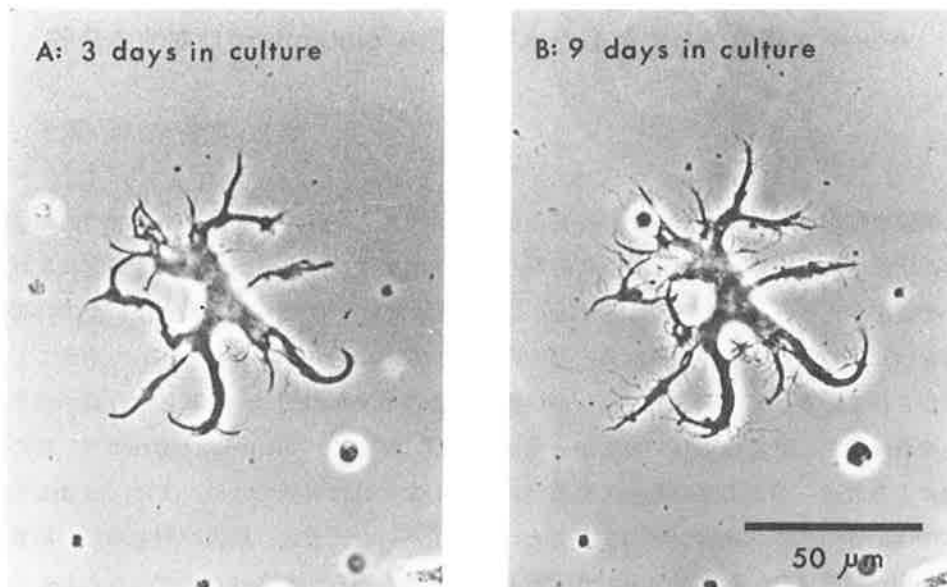


図1 キンギョ網膜から単離した水平細胞，左は培養3日目，右は9日目のもの。

酢酸カリウム (2M) をつめたガラス微小電極を刺入してこれらの細胞から細胞内記録を行った。

〔結果〕 キンギョの網膜から単離した水平細胞から細胞内記録を行いつつ，約 $20\mu\text{m}$ のバイペットにつめた $100\mu\text{M}$ のL-グルタミン酸を約 $200\mu\text{m}$ の距離から圧を加えて5秒間持続的に与えると，単離水平細胞は迅速，且つ，持続的な脱分極を示した (図2)。

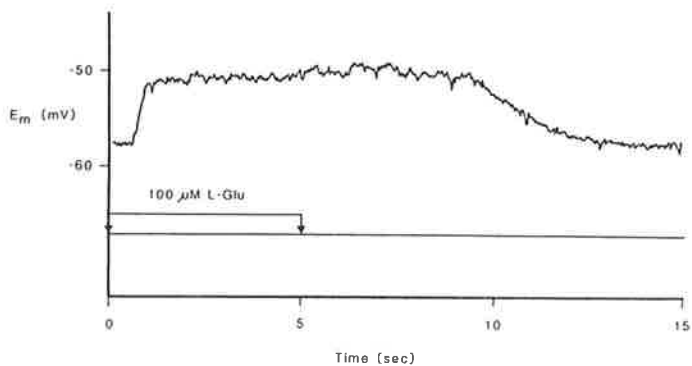


図2 単離水平細胞のL-グルタミン酸に対する応答。 $100\mu\text{M}$ のL-グルタミン酸を加えたリンゲル液を先端直径約 $20\mu\text{m}$ のガラス毛细管につめ，細胞から約 $200\mu\text{m}$ の距離から圧を加えて5秒間投与した。

電気泳動法により L-グルタミン酸を投与した実験でも、1 秒の間隔で与えた場合の応答と 50msec の間隔で与えた場合の応答には差がなく、“desensitization”の兆候は観察されなかった。この結果に基づき今回の実験では、必要に応じて、bath application によって投与した。L-グルタミン酸に対する応答は、濃度に依存して増大（最低有効濃度は約 $30\mu\text{M}$ ）したが、高濃度の L-グルタミン酸を与えると L-グルタミン酸による脱分極が活動電位を引き起した。我々がテストした 4 種類の物質のうち、静止膜電位にある単離水平細胞に対して、L-グルタミン酸は脱分極作用を示したが、L-および D-アスパラギン酸 (Asp) は 3mM という高濃度でも、脱分極作用を示さなかった。

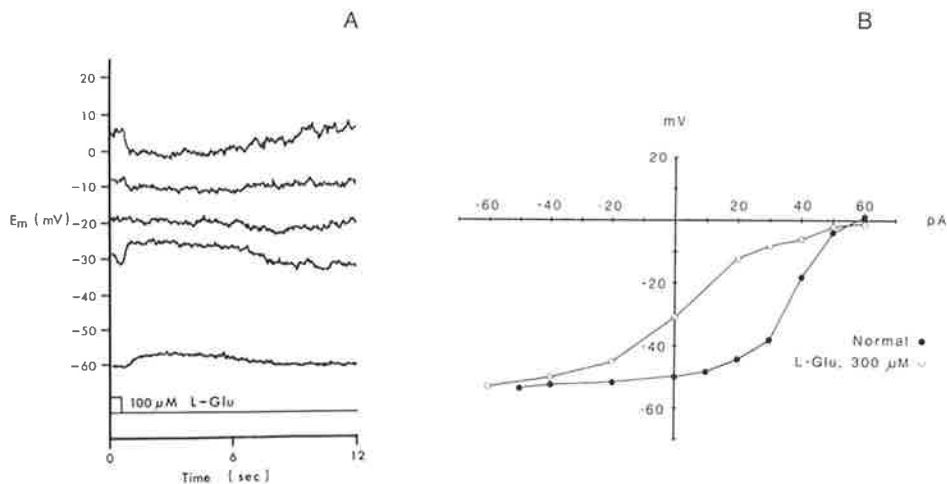


図3 単離水平細胞に対する L-グルタミン酸の効果。A, 刺入した微小電極から通電して、細胞の膜電位を種々のレベルに変え、L-グルタミン酸を投与した際の応答。L-グルタミン酸 ($100\mu\text{M}$) を詰めたピペット (先端の直径約 $10\mu\text{m}$) を細胞から約 $50\mu\text{m}$ の距離に置き 0.4kg/cm の圧を 0.5 秒間加えて L-グルタミン酸を投与した。B, L-グルタミン酸を含まない灌流液中 (黒丸) および $300\mu\text{M}$ L-グルタミン酸を含んだ液中 (白丸) で測定した単離水平細胞の電流-電圧特性。 -50mV 付近より過分極側では、内向き整流作用のため膜抵抗は著明に減少した。 -5mV 付近で応答の極性は反転した。2 つの曲線を同じ電位レベルで比較すると、L-グルタミン酸を含んだ液中で測定した曲線の傾きは常に緩やかで (-30mV 付近では、コントロールの液中で $1.94\text{G}\Omega$, L-グルタミン酸を含んだ液中では $0.93\text{G}\Omega$), 抵抗の減少を示している。図 A と B は別の細胞からの記録。

次に、L-グルタミン酸に対する応答のイオン機構を検討するため、細胞内電極から通電して膜電位を変え、応答の反転電位を求めた。L-グルタミン酸に対する応答は、 -20mV 付近で消失、細胞を 0mV 以上に脱分極すると応答の極性が反転した (図 3A)。図 3B は、対照の溶液中 (黒丸)、および L-グルタミン酸投与時 (白丸) の膜の電流-電圧特性を示す。脱分極性応答に伴って膜抵抗は一見、上昇したかのように見える。しかし、同じ電位レベル (例えば -30mV) で較べると、応答に伴って、明らかに、抵抗の減少が見られた。活動電位 (カルシウムスパイク) のプラトー相で L-グルタミン酸を与えると、反転した応答が得られた。L-グルタミン酸による脱分極性応答は、外液中のナトリウムイオンを除去すると消失した。これらの事実は L-グルタミン酸の応答がカルシウムイオン透過性の増大によるものではなく、主として、ナトリウムイオンに対する透過性の増大によって発生するものであることを示唆している。

D-アスパラギン酸は、それ自身では水平細胞を脱分極させなかったが、L-グルタミン酸に対し拮抗作用を示した。すなわち、L-グルタミン酸によって脱分極した水平細胞に、 3mM の D-アスパラギン酸を与えると、この脱分極が消失した。

以上の結果は、(1) キンギョの単離水平細胞は L-グルタミン酸に対する感受性を保持しており、網膜内で水平細胞に対するシナプス入力は、グルタミン酸作動性である可能性を示す、(2) グルタミン酸による脱分極は、主として、ナトリウムイオン透過性の上昇によって発生する、(3) 比較的高濃度の D-アスパラギン酸は L-グルタミン酸に対して拮抗的に作用する、ことを示唆しているものと思われる。

文献

- 1) Cervetto, L. and Piccolino, M. Synaptic transmission between photoreceptors and horizontal cells in the turtle retina. *Science*, N.Y. 183 (1974) 417-419
- 2) Kaneko, A. and Shimazaki, H. Synaptic transmission from photoreceptors to the second-order neurons in the carp retina. In *Neural Principles in Vision* (edited by F. Zettler and R. Weiler) Springer, Berlin (1976) 143-157
- 3) Ishida, A. T. and Fain, G. L. D-aspartate potentiates the effects of L-glutamate on horizontal cells in goldfish retina. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 78 (1981) 5890-5894
- 4) Ishida, A. T., Kaneko, A. and Tachibana, M. Responses of solitary horizontal cells of goldfish retinas to L-glutamate and related compounds. *Abstr. Jpn Neuosci. Soc.* (1983) 213
- 5) Tachibana, M. Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina. *J. Physiol.* 321 (1981) 141-161

カメ網膜 L 型水平細胞の受容野形成機構

大塚 輝彌

水平細胞は視細胞から入力を受ける第 2 次ニューロンであり、双極細胞の周辺受容野の形成に関与していると考えられている。カメ網膜の L 型水平細胞は可視光全域の単色光刺激に対して過分極性応答を示す。この種の細胞は細胞体と軸索終末からなり、細い軸索で結ばれている。細胞体で記録された受容野の大きさは軸索終末のものより小さい(1)。これは 1 つの L 型水平細胞の細胞体は軸索終末と電気的に隔絶していることを意味している。しかし、網膜上の異なる部位にある水平細胞の形状はかなり異っており、直接 L 型水平細胞を電気生理学的に調べて細胞体と軸索終末が独立に働いているかどうかを調べる必要がある。この研究では L 型水平細胞の受容野の大きさを調べどの部位から光に対する応答を記録したのかを調べた。このため、一個の水平細胞の全体像を得るため HRP の細胞内注入を行い光学顕微鏡下で注入された細胞の形態を詳しく観察した。この研究の結果は細胞体と軸索終末が軸索によって結ばれていることを示し、かつ、この長さが 2 つの部位を電気的に隔絶するのに十分な距離があることを明らかにした。

〔材料と実験方法〕 淡水産のクサガメ (*Geoclemys reevesii*) (体長 20~23 cm) を断頭し両眼を剔出した。眼球後部の硝子体液を除去した後、湿った酸素ガスを満した記録用チャンパーに置いた。刺入した細胞の光応答を調べるため、白色光 (最大光強度 $117 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) と単色光を用いた。単色光は光路中に干渉フィルター (半波値 7~10 nm) を挿入し、さらに中性楔フィルターによって各波長の強度を $1.4 \times 10^{12} \text{ photon}/\text{cm}^2\text{sec}$ の等光量子数に調節した。

5%の HRP, 0.2M KCl と 0.05M Tris-HCl バッファーの混合液を詰めたガラス微小電極を用いた。L 型水平細胞の同定は以下のような定形的な光刺激を用いて行った。すなわち、大 (直径 10 mm), 小 (直径 0.56 mm) の 2 種類のスポット光 ($0.117 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, 照射時間 600 ms), および 540 nm と 640 nm の単色光の網膜全面照射である。これによって、L 型と C 型、受容野の大小を容易に判定することができた。これら 4 種の刺激に対する応答を記録した後、直ちに電極から +3~5 nA のパルス電流を流して HRP を細胞内に注入した。注入後再び上記 4 種類の刺激を与えて応答を調べ電極が同一の細胞内に滞っていたことを確認した。注入後のテストで同じ応答を示さなかったユニットは全て除外した。

水平細胞の応答を記録し HRP を注入した後、電極の位置は固定したまま、標本を水平面上で直線に添って約 300 μm 移動させ次の刺入を行った。このような操作を数回繰返し行

ない、直線上で数個所に HRP を注入した。

HRPの注入が終って後、眼球盃標本から網膜のみを剝離し、グルタルアルデヒドとパラフォルムアルデヒドの混合固定液中で12時間(4℃)固定した。その後網膜をデアミノペンチジンと反応させて発色させ、オスミック酸で後固定を行いQuetol812に包埋した。

HRP を注入した細胞のうち、約 $\frac{1}{2}$ は細胞体と軸索終末部の両方に HRP の反応生成物が認められた。記録電極の刺入部位は電極の通った道筋に沿って細胞の構造が現われるので、これによって判定した。この道筋からはずれた所に見られた構造へは、刺入部位から HRP が拡散していったものと考えられる。

47 匹のカメの 66 個の眼球から 507 個の L 型水平細胞の光応答を記録し、受容野を測定し、HRP を細胞内に注入したが、そのうちの 82 例においては細胞体と軸索終末部とが細い軸索によってつながっているのが観察された。

〔結果〕 クサガメ L 型水平細胞の形態 クサガメの L 型水平細胞は細胞体と軸索終末の 2 つの部分から構成されている。これら 2 つの構成要素は網膜全体を包埋した標本でも、縦切の切片標本でも容易に判別することができた。細い軸索 (直径約 0.5 μm) が細胞体と軸索終末部とをつないでいた。図 3 は典型的な一例を示しており、電極刺入部位は軸索終末部であった。このことは、軸索終末部から細胞体へと HRP が軸索中を拡散したことを示している。電極の刺入部位は 38 例で細胞体、43 例で軸索終末部であった。

L 型水平細胞の細胞体は軸索終末部に比較してより球状を呈し、樹状突起を多数有していた。樹状突起は細胞体の中心から約 6 μm 離れた部位から楕円状に拡っており、長軸が 70~150 μm 、短軸が 60~110 μm の領域を占めていた。個々の樹状突起はさらに二股に分れ、そこから 2、3 の短い第 2 次の突起を出していた。L 型水平細胞の細胞体は内顆粒層にあり、そこから出た樹状突起は外網状層に向って拡がり視細胞の終末部へ陥入していた。細胞体は軸索終末部より厚く (20~25 μm)、またここには直径約 8 mm の核が認められた。軸索終末部からは 2~5 本の太い管状の突起がほぼ水平方向に伸びていた。樹状突起は楕円状に拡がりその長軸は 70~150 μm であった。軸索終末部も内顆粒層に存在し、樹状突起は外網状層に向って伸びていた。縦切標本で観察すると軸索終末部は約 10 μm の厚みを持ち、数本の樹状突起が視細胞終末部に終っていた。軸索終末部には核は認められなかった。

軸索は水平細胞の細胞体の中心から 30~50 μm 離れた樹状突起の一部から始まる。軸索の表面は滑らかで棘状の突起は認められなかった。細胞体の中心から約 150 μm 離れたあたりから軸索の径が太くなり、軸索終末へとつながっている。軸索の走行経路は外網状層に平行で、5 μm 以上は離れない。しかし網膜の層に平行な面では軸索の走行経路は非常に曲りくねったものであった。測定した軸索の長さを図 4 に示す。この図は個々の水平細

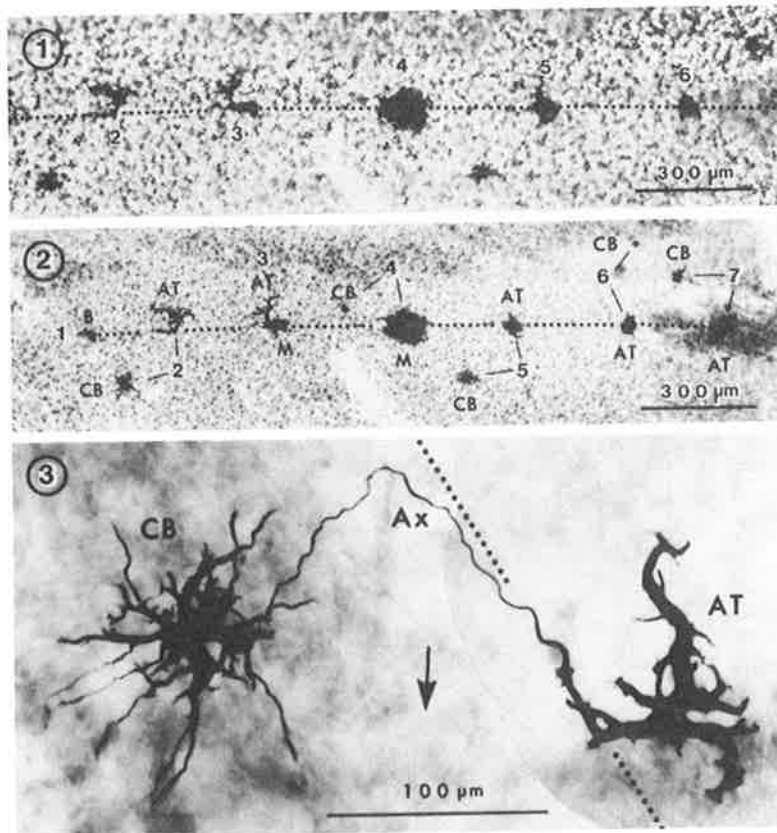


図1. カメの剝離網膜標本を固定し DAB 処理後、硝子体側から観察した像。HRP 細胞内注入を約 300 μ m 毎に行っているの、これらの細胞が直線状に並んでいるのが見られる。点線は微小電極を動かした跡を示す。細胞に付けた数字は刺入した順番を示す。この図では細胞 1 と 7 は見えない。

図2. 図1と同じ標本を脱水、包埋した後、硝子体側から観察した像。脱水、包埋により組織は約 21% 収縮した。点線は電極を移動させた跡を示す。点線上にある HRP の入った構造が注入を行った細胞部位。細胞 2 ~ 7 ではいずれも軸索終末部が刺入部位である。細胞 2, 5 ~ 7 では HRP が細胞体へ拡散しているのが見られる。しばしば、注入時 HRP が漏れて近傍のミュラー細胞 (M) へ入っているのが見られた (細胞 3 ~ 7)。細胞 1 は変位双極細胞 (displaced bipolar cell)。

図3. 細胞 2 の強拡大像。L 型水平細胞は細胞体 (CB) と軸索終末部 (AT) から成り、軸索 (Ax) で結ばれている。矢印は視神経乳頭のある方向を示す。

胞の細胞体と軸索終末部の中心間距離と軸索の走行に沿った長さとのプロットしたものである。

軸索は2つの形態学的特徴を持っていた。すなわち、第1に細胞体と軸索終末部との中心間距離と軸索の長さの比は常に1（図4の直線）より小さかったこと、第2に、中心距離が短くそのため細胞体と軸索終末部の樹状突起が重複するような場合でも、軸索の長さは250 μm 以上であったことである。この第2の所見は中心間距離に拘らず、軸索の長さは一定値以上であり、そのため、軸索は途中でループを作ったり曲りくねる結果となるのであろう。中心間距離は平均 139 μm に対し、軸索の平均長はこの 2.3 倍、325 μm であった。

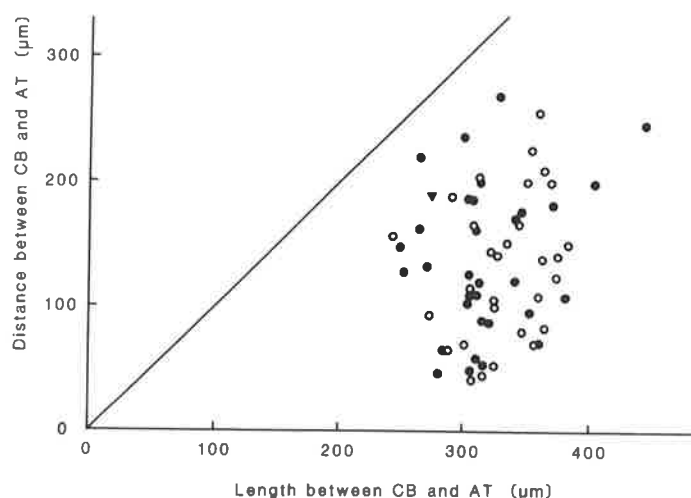


図4. L型水平細胞の細胞体と軸索終末部を隔てる中心間距離（縦軸）と軸索の長さ（横軸）との関係。軸索の長さは2つの構造の中心間を軸索に沿って測ったもの。○：細胞体へHRPを注入した例。●：軸索終末部へ注入した例。▼：刺入部位が判定出来なかった例。63例の中心間距離の平均は $139 \pm 39 \mu\text{m}$ ，軸索の長さの平均は $325 \pm 39 \mu\text{m}$ 。直線は中心間距離と軸索の長さが等しい場合を示す。

細胞体あるいは軸索終末部のいずれかのみがHRPで染った例は多数見られたが、細胞体と他の細胞体、あるいは軸索終末部と他の軸索終末部が軸索で結ばれていた例は一つも認められなかった。いずれか一方のみが染った例ではHRPが軸索中を十分に拡散しなかったためと思われる。

クサガメL型水平細胞の受容野の特徴 L型水平細胞の光応答の振幅はスポット光の径

を大きくするに伴って増やし、ある径の値で飽和に達した。細胞体から記録した応答と軸索終末部からの応答では振幅が飽和するスポット径に有意な差があり、前者では約 1 mm、後者では約 5 mm であった。応答振幅の絶対値は細胞により異なっていたが、細胞体あるいは軸索終末部の大小のスポット光に対する応答振幅の比はそれぞれほぼ一定であった。図 5 は細胞体から記録した応答 ($n=27$) と軸索終末部から記録した応答 ($n=27$) のそれぞれ大小のスポット光に対する振幅をプロットしたものである。記録部位によって明らかに 2 群に分れており、その差は標準偏差の 2 倍以上である。この結果は細胞体と軸索終末部とは受容野に大きな差があることを示している。

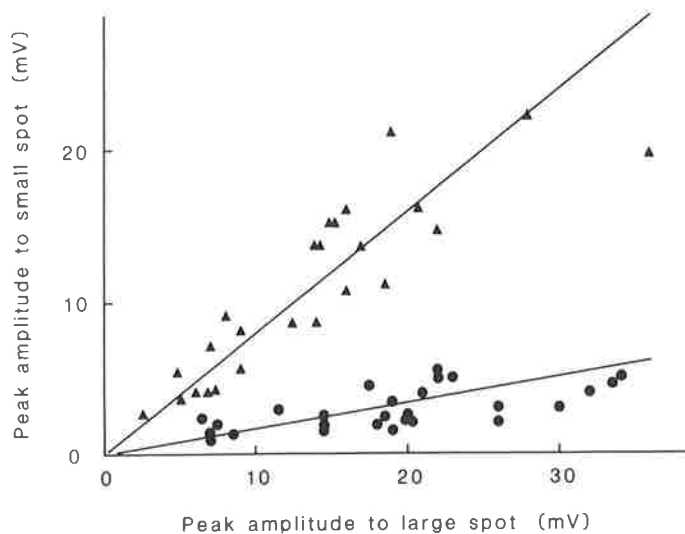


図 5. 記録部位と受容野の大きさとの関係。▲：細胞体。●：軸索終末部。大 (直径 10 mm)、小 (直径 0.56 mm) のスポット光 (白色光, $0.117 \mu\text{W}/\text{cm}^2$, 持続時間 600 msec) に対する応答振幅の最大値をそれぞれ縦、横軸にプロットした。各点は 1 つの細胞からの記録を示す。小スポット光と大スポット光に対する応答振幅の比は、細胞体で 0.80 ± 0.20 軸索終末部で 0.17 ± 0.07 であった。図中の直線は比の平均値を表わす。

〔考察〕 最近水平細胞の軸索の特性に関して 2 つの説が提唱されている。第 1 は、細胞体と軸索終末部は軸索によって結ばれてはいるが、電気的には独立した働き方をし、軸索は伝導を行わないというものである。他の説は軸索は信号増幅作用を持ち細胞体の電氣的応答は減衰せずに軸索終末部へ伝わるというものである。前者はネコの水平細胞での実験に基づいて提唱されたものであり、前述のようにネコでは細胞体と軸索終末部とがそれぞれ樹状突起を出して錐体あるいは桿体と結合し異った応答様式を示すのでこれら 2 つの構

造は分離されていると主張している。一方、硬骨魚類では軸索終末部は視細胞からの入力を受けていないのに細胞体と類似の応答を示すので、その応答は細胞体で発生したものが軸索を伝導して来たのだと考えられている。

本研究の結果から、カメの L 型水平細胞の軸索はネコのものと同様であり、細胞体と軸索終末部とは互いに独立していること、仮に軸索内を信号が伝導しても非常に減衰するものであることが示された。この減衰の程度は L 型水平細胞を構成している 3 つの要素を抵抗に置き換えて推定してみよう。細胞体と軸索終末部の入力抵抗をそれぞれ $20\text{ M}\Omega$ とする。軸索の形質の比抵抗を $100\text{ }\Omega\cdot\text{cm}$ とすると、長さ $100\text{ }\mu\text{m}$ 、直径 $0.5\text{ }\mu\text{m}$ の軸索は $500\text{ M}\Omega$ の抵抗を持つことになる (但し、この際の軸索の形質膜の抵抗は考えないものとするが、実際にはある値を持つので信号は一層減衰することになる)。このモデルによれば、細胞体で発生した電位変化のわずか 4 % しか軸索終末部へは伝わらないことになる。逆に、軸索終末部で発生した電位変化もその 4 % しか細胞体へは到達しない。

図 4 で示したように、軸索の長さは $100\text{ }\mu\text{m}$ 以上あるので細胞体と軸索終末部とは機能的にはほぼ完全に分離独立していると考えられる。他の動物の L 型水平細胞の軸索の長さ (細胞体の中心部と軸索終末部の中心部を軸索に沿って測定したもの) はアカウミガメで $290\sim 330\text{ }\mu\text{m}$ 、ネコで約 $390\text{ }\mu\text{m}$ 、ウサギでは $350\text{ }\mu\text{m}$ である。これらはいずれも細胞体と軸索終末部を機能的に分離するのに十分な長さである。

本研究ではカメの L 型水平細胞の細胞体と軸索終末部とが機能的に分離した単位であることを明らかにした。このことは、L 型水平細胞の細胞体は錐体に由来する応答を示し、軸索終末部は杆体に由来する応答を示すというこれまでの報告を支持するものである。これらの電気生理学的所見はさらに軸索終末部の樹状突起が杆体とシナプス結合を作っているという電子顕微鏡による観察結果(2)とも一致する。今後それぞれの構造と各種視細胞との結合を定量的に明らかにし、その応答の起源を確立することが必要である。

なお、この報告は印刷中の論文(3)の要約である。

文献

- (1) Simon, E.J. (1973) Two types of luminosity horizontal cells in the retina of the turtle. *J. Physiol.* 230: 199-211.
- (2) Ohtsuka, T. & Kouyama, N. (1982) Rod input to luminosity-type horizontal cells in the turtle retina. *Biomed. Res.* 3. (Suppl.): 1-7.
- (3) Ohtsuka, T. (1983) Axons connecting somata and axon terminals of luminosity type horizontal cells in the turtle retina: receptive field studies and intracellular injections of HRP. *J. Comp. Neurol.* (in press)

液 性 情 報 部 門

浜 清・小坂 俊夫

〔概要〕 本研究部門は神経細胞の形態と機能の関連, 特にシナプスの形態解析を主なテーマとして下記のような研究を進めている。

1) 中枢神経系における局所回路の解析

イ) 硬骨魚類嗅球の細胞構築と局所回路網の解析

ロ) 海馬におけるニューロパイルの解析

2) 電気シナプスの形態計測的研究

3) 聴側線感覚上皮の研究

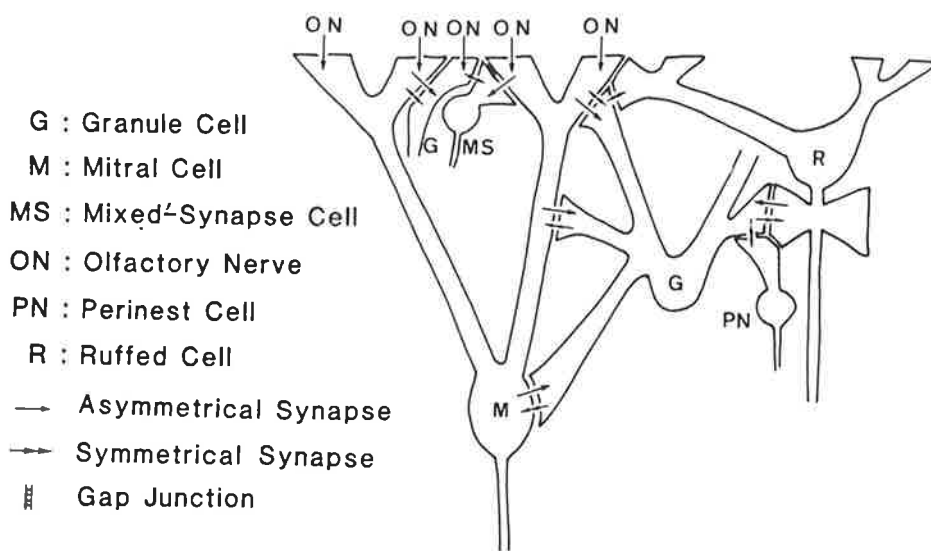
〔研究課題〕 嗅球の細胞構築と局所回路網の解析

〔研究方法〕 Golgi 染色法, Golgi 電顕法, 超高压電顕法, 超薄切片立体再構築法を併用し, 光顕的に同定されたニューロンについて神経突起の三次元的な分布, シナプスの微細形態とその分布を観察し, ニューロパイル内における各神経要素間のシナプス結合による相互関係を解明する。

〔研究目的と所見〕 嗅覚の1次中枢である嗅球は, 非常に簡単な細胞構築をもち, その基本的構成が円口類から哺乳類までほぼ同じだとされている。しかし哺乳類から両生類までは relay neuron である mitral cell が olfactory receptor から synapse をうける1次樹状突起とそれをうけない2次樹状突起として分かれ, それに伴って interneurons も olfactory receptor からの synapse をうけるいわゆる glomerulus で mitral cell に抑制をかける入力コントロールとしての periglomerular cell と2次樹状突起で抑制をかける出力コントロールとしての granule cell として分化している。硬骨魚類以下では mitral cell の1次, 2次樹状突起の区別, periglomerular cell, granule cell の区別がなく“poorly developed organization”であるとされてきた。我々は硬骨魚類の嗅球を形態学的に検索し, 局所回路を構成する少なくとも5つの neuron types を同定し, それら相互間の synapse 結合を解明した。その結果, 硬骨魚類嗅球は哺乳類のものとはかなり異なる構成をしており, 硬骨魚類の嗅球は“poorly developed”というよりは, 哺乳類とは異なる方向に develop したのではないかという結論に達した。材料としてはキンギョ *Carassius auratus* を主に用いたが, 他の硬骨魚類, ナマズ *Parasilurus asotus*, アナゴ *Conger myriaster* でも同種の neurons, synapses がみられており, その organization はキンギョと同様であると思われる。キンギョ嗅球には2つのはっきりしたシナプス野がみられる。

glomerular area と nest でありそれぞれ olfactory nerve terminal → mitral cell dendrite ⇔ granule cell dendrite, ruffed cell axon protrusion ⇔ granule cell dendrite → perineuronal cell dendrite が基本的なシナプスパターンとして存在する。これ以外に glomerular area では mitral cell と特異的に mixed synapse すなわち chemical synapse 及び gap junction (= electrical synapse) をつくる mixed-synapse cell の dendrite がみられる。図はこの 2 つのシナプス野の構成に参与する 5 つのタイプの細胞による局所回路を示したものである。mitral cell と ruffed cell は抑制性 interneuron である granule cell を介して reciprocal に結合されている。また ruffed cell 及び perineuronal cell は granule cell からの抑制入力だけしか受けていないように見えるのでその生理学的な特性の解明が待たれる。

“硬骨魚類嗅球の細胞構築と局所回路網の解析”の説明図



〔研究課題〕 rat 海馬および歯状回の局所回路の解析

〔研究方法〕 研究方法は嗅球の解析と同様の手法を用いた。

〔研究目的と所見〕 歯状回 dentate gyrus と海馬は一連の構造で層構造が明確で比較的簡単な神経細胞の構成をもっている。Golgi 染色による仕事や電気生理的な仕事によって、その基本的な回路が示されているが、中枢の局所回路で重要と思われる interneuron については basket cell が relay neuron である granule cell (dentate gyrus) や pyramidal cell (hippocampus) の cell body 上に抑制シナプスをつくるという単純な図式で終わっている。しかし Golgi 染色でみられている interneuron にはいくつかの types があり、そのような単純なものでないことは明らかである。更に、昔の Golgi 染色は、新生～若年の動物を用いており、生後の発達が著しい脳の構造を生理学との対応づけで考えるには不十分であり、

成年の動物を用いて神経細胞及びそれらの間の結合様式を解析する必要がある。このような観点から現在、成年の rat を用いて光学顕微鏡及び電子顕微鏡を使って形態学的な解析を行なっている。現在までのところ、断片的ではあるが下記のような所見が得られている。internuron の dendrite の比較的太いところで 2 本の dendrites が contact した部位に $\sim 0.5 \mu\text{m}$ 位の patch 状の gap junction がみられる。このような gap junction は介在ニューロン間にかなりの頻度でみられ、またその存在部位が dendrite の近位部であることから機能的には、かなり重要であると思われる。gap junction の存在は、いくつかの interneurons が同期して 1 つの unit のようになっていることを示唆し生理学的にみられる強力な抑制系の存在に一致する所見と思われる。

〔研究課題〕 電気シナプスの形態計測的研究

〔研究方法〕 ミミズ (*Eisenia foetida*) の巨大神経セプタムについて連続切片を作製し、セプタム上にみられる各種の細胞間結合部についてその拡がりの大きさを計測した。また freeze-fracture 法により膜内粒子の計測を行なった。

〔所見と考察〕 ミミズの median 及び lateral 巨大神経のセプタム上には 8 つの異なったタイプの細胞間結合部が区別できた。その内 gap junction と II 型 junction のセプタム全面積に対して占める割合は表の通りであった。

	Med. G.F.	Lat. G.F.
Gap J.	$3.03 \pm 1.03\%$	$0.20 \pm 0.05\%$
II J.	$2.54 \pm 2.06\%$	$13.96 \pm 5.36\%$

freeze-fracture replica 上における gap junction 粒子は約 $2400/\mu\text{m}^2$ であった。セプタムの約 3 % が gap junction とした場合、Med. 巨大神経セプタム上の gap junction の比抵抗は $\sim 0.2 \Omega\text{cm}^2$ となる (Brink と Barr 1977)。各コネクソンあたりの抵抗 r_p は $r_a \cdot L/A$ で与えられ、(r_a はコネクソン孔内液の抵抗、 L, A はそれぞれコネクソン孔の長さ、断面積) gap junction の抵抗は $R = \frac{r_p}{\text{コネクソン数}/\text{cm}^2}$ で与えられるので、コネクソン数 $2.4 \times 10^{11}/\text{cm}^2$ 、コネクソン孔の直径 $20 \text{ \AA}$ 、長さ $180 \text{ \AA}$ とした場合、gap junction の比抵抗が $0.2 \Omega\text{cm}^2$ となるための r_a は約 $800 \Omega\text{cm}$ となり、軸索原形質の約 4 倍の抵抗をもつことが推定された。II 型結合部が電気シナプス部であるとする、この部のセプタムに占める割合 2.5%、膜内粒子数 $500/\text{cm}^2$ を入れて同様の計算を行なうと $r_a < 200 \Omega\text{cm}$ となり、軸索原形質より小さい抵抗値を持つこととなる。以上の結果から、セプタム上における電気シナプス部は gap 結合部であり、II 型結合部は他の膜機能に対応することが推測される。

〔その他の研究課題〕 従来からの研究の継続として聴側線系感覚上皮の構造研究を続けており、特に細胞内繊維系の研究が新しい展開を示した。また大学院委託研究生によって

次の3つのテーマによる研究が行なわれており、それぞれみるべき成果をあげている。

- 1) 神経節細胞欠落ラットにおける腸管神経支配の研究
- 2) 上皮細胞間接着開始機構の形態学的解析
- 3) 心筋細胞 T-tubles の超高压電顕による定量的研究

〔考察〕 本年度から教授、助教授が専任となり、3人の大学院委託学生が加わったため、研究活動は活発となった。肉眼解剖学から分子解剖のレベルに至るまで構造と機能の関連の解明というテーマは形態学者の永遠のテーマであるので機能の解明をめざす生理学者の方々が安心して踏まえることの出来る確実な形態データを積み上げていきたいと思っている。

高次神経機構部門

概 要

本研究部門は、感覚器官を通じて大脳・脳幹や小脳に伝わってきた信号を判読・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。上記の目的遂行のため、電気生理学的方法、電子顕微鏡を含む形態学的方法、薬理学的方法、および計算機画像処理技術などの工学的手法を有機的に結合させて研究する。本年度は、当研究部門でモデル実験系として、学習、記憶、適応現象のメカニズム解析のために集中的に行ってきた大脳→赤核系の化学伝達物質に焦点をあて研究を行った。また、従来から当研究部門で研究してきた視覚中枢の情報処理の問題が一段落したので新たに、聴覚中枢での情報処理の研究に着手した。

キクガシラコウモリの反響定位：発声系と聴覚系の連関

谷口 郁雄

〔研究目的〕 反響定位を行っているニホンキクガシラコウモリが発射する超音波パルスの周波数分析を行い、聴覚系の周波数－閾値曲線（オージオグラム）との関係を調べ、発声系と聴覚系の機能的な連関について検討する。

〔研究方法〕 実験動物としてニホンキクガシラコウモリ 6 匹を用いた。パルスはコウモリが停止している状態で記録し、周波数分析を行った。オージオグラムは耳介反射を利用して測定した。

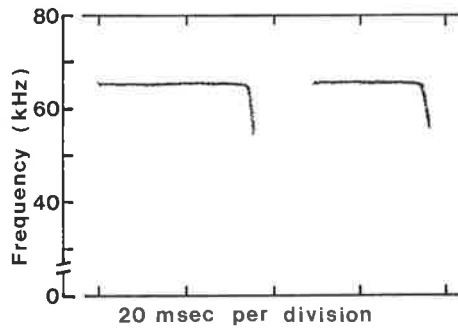


図1 ニホンキクガシラコウモリが発した二つのパルスのソナグラム。一定周波数(CF)成分と周波数変調(FM)成分から成り、ハーモニクスをふくまない。

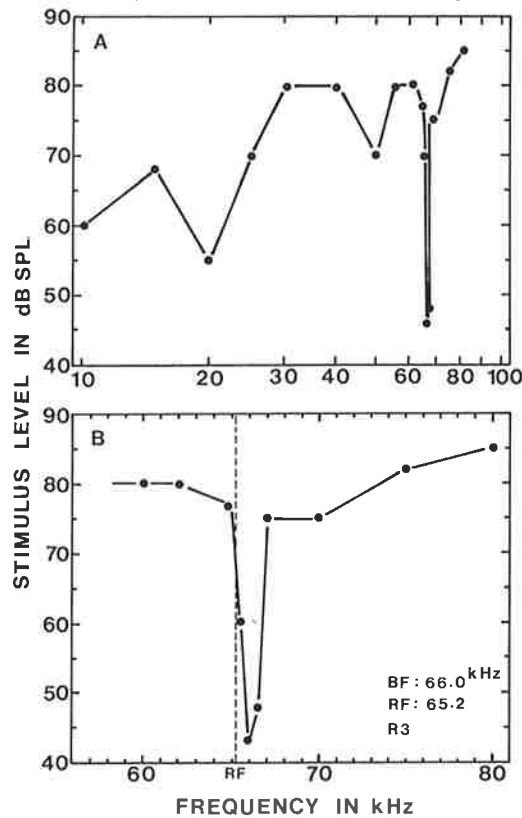


図2 ニホンキクガシラコウモリのオーディオグラム。BはAの高い周波数領域を拡大したもの。BFはRFよりも高い。

〔研究結果〕 パルスのソナグラムの例を図1に示す。パルスは約30 msec持続する一定の周波数 (CF) 成分と、その後続く約2 msecのFM成分とから成っている。CFの平均は65.5 kHzであった。パルスはハーモニクスを含まず、単純な構造をしている。図2はオーディオグラムの例で、閾値が最低となる周波数 (BF) に鋭く同調し、Q値は極めて高い。BFの平均は66.3 kHzであった。コウモリが停止時に発するパルスのCF (RFと呼ぶ) は

BF よりも高く、その差は平均 0.8 kHz であった。

〔考察〕 オーディオグラムにおける BF が発声音の RF よりも高く、その Q 値が極めて高いということは、コウモリの聴覚系が自分の発声音には同調しないようにできていることを示す。コウモリと標的が停止している場合には、エコーの周波数はパルスのそれと同じであるから、聴覚系の BF との間にずれがあって、反響定位は難しいであろう。そこでコウモリは BF と RF (エコー) との差を何らかの方法で補償しているはずである。その仕組みはヨーロッパ産キクガシラで発見された、飛行中に行う、発声系によるドプラー変換補償とは別のものである。停止して反響定位を行っているキクガシラは標的に向ってさかんに耳介を振動させる。その運動速度はかなり高く、ドプラー効果によってエコーの周波数上昇が起こり得る。キクガシラは耳介運動によるドプラー変換を積極的に利用し、BF と RF (エコー) との差を補償しているに違いない。この行動は標的を検知するには感覚系と運動系の協調が必要であることを示すモデルとして神経生理学的に興味深く、今後、この点について検討したい。

免疫組織化学及び HRP 細胞内注入による赤核脊髓路細胞への GABA 作動性入力の特異性

村上富士夫・勝丸 博信・塚原 伸晃

ネコの赤核脊髓路細胞へ投射する大脳感覚運動野からのシナプスは著明な可塑性を有することが知られ、この系の研究の重要性が指摘されている。大脳感覚運動野から赤核へは直接の投射があるばかりでなく、抑制性介在ニューロンを介した 2 シナプス性の入力も並列に存在し、大脳→赤核系の機能の問題を論ずる場合必ず考慮する必要がある経路である。近年この抑制性介在ニューロンの伝達物質が GABA であることを示す証拠が揃ってきた。遊離、作用、赤核領域における存在などはこれまでに示されてきたが、赤核脊髓路細胞上の終末中に GABA が存在するか否かという問題は未解決のままであった。そこで我々は GABA の合成酵素であり、これまで多くの GABA 作動性ニューロンの終末に特異的にその存在が示されている GAD (glutamic acid decarboxylase) に対する抗体を用いた免疫組織化学法と HRP や細胞内染色法を組合せることによってこの問題の答を得た。

まずネコの赤核脊髓路細胞を逆行性に同定したのち細胞内に HRP を電気泳動的に注入する。その後、脳を 0.1% グルタルアルデヒド及び 4% パラフォルムアルデヒドを含む固定液を用いて灌流固定し、赤核を含む領域を 50~100 μm の厚さに切り出し、DAB を用いて反応をさせた。次に HRP の細胞内注入によって染色された赤核脊髓路細胞を含む切

片を選び出し、GAD に対する抗血清 (Dr. J.-Y. Wu より分与を受けた) を反応させ、引続き PAP (peroxidase-antiperoxidase) 法によって反応をおこなわせた。最後にオスミウム酸による後固定をおこなったのちエポキシ樹脂に包埋した。包埋した切片は光学顕微鏡による観察ののち準超薄切片を作製して更に光学顕微鏡で観察するか又は超薄切片を作製して電子顕微鏡による観察をおこなった。

図1はこのようにして作製した厚さ $2\text{ }\mu\text{m}$ の切片の光学顕微鏡写真である。このように赤核細胞の細胞体や樹状突起が多くの GAD 陽性終末で囲まれているのが観察された。このような終末は電子顕微鏡による観察で、シナプスを形成していることが確認された。図3～5は HRP を注入された赤核脊髓路細胞の樹状突起とシナプス結合する GAD 陽性終末の写真である。GAD 陽性終末は細胞体や樹状突起幹のみでなく樹状突起棘状のものとも結合しているのが観察された。以上のように GABA 作動性ニューロンの終末が赤核脊髓路細胞にシナプスを形成していることが明らかとなった。この GABA 作動性ニューロンの細胞体が赤核の中にあるかどうかという問題は共同研究の報告のページにこの問題に関する研究の結果が示してあるのでそれを参照されたい。

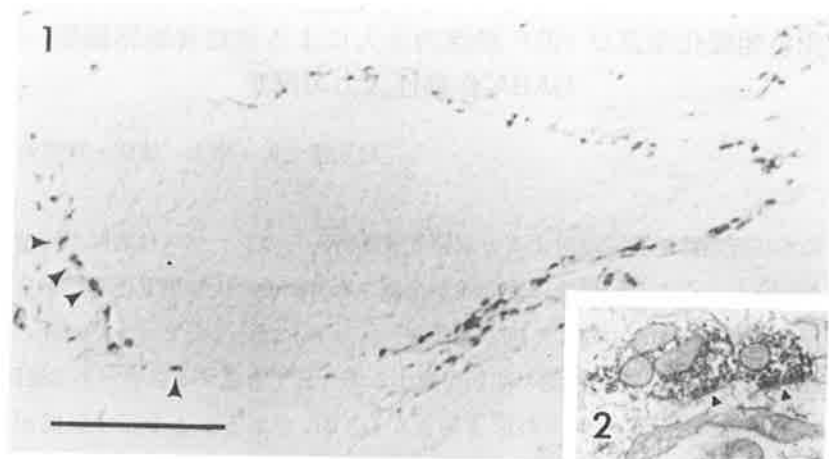


図1 GAD 免疫陽性終末 (▲印) で囲まれた赤核大細胞、スケールは $30\text{ }\mu\text{m}$ 。

図2 GAD 免疫陽性終末とそれのつくるシナプス (▲印) の電子顕微鏡写真。×18000

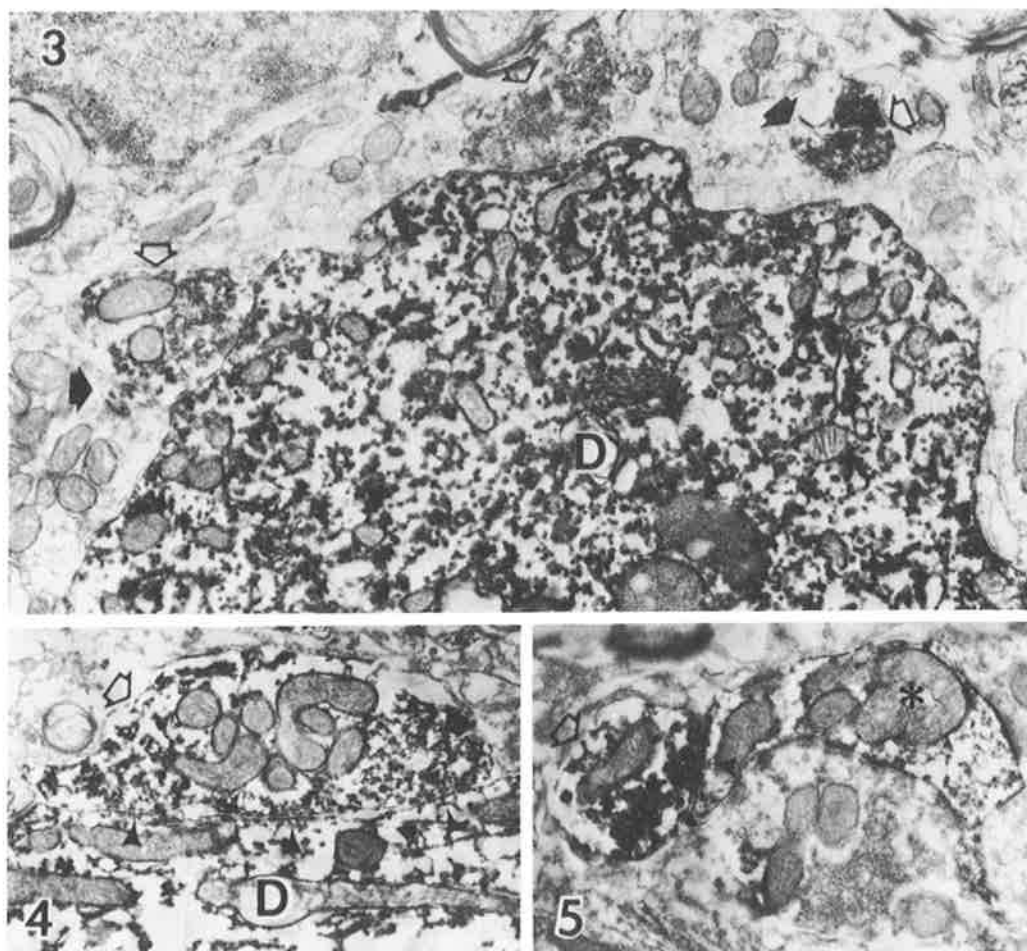


図3～5 HRPの細胞内注入を受けた赤核脊髄路細胞の樹状突起(D) やそこから出る棘状構造物(←印—3図, *印—5図)とシナプス結合するGAD免疫陽性終末(⇐印)。3,5— $\times 23000$, 4— $\times 21000$ 。

脳切片を用いた猫の赤核細胞に対するアミノ酸の作用

坂口 博信・窪田 道典・塚原 仲晃

昨年度の年報 (生理研年報 NO.3, 1982, p.50-54) において, 脳切片を用いた種々の薬物の作用について報告した。アミノ酸は, 赤核細胞への入力線維の伝達物質として可能性が高いと考えられるので, より詳細に調べた。

実験は, 脳切片を用い, シナプス伝達を阻害するために, 低 Ca^{2+} (0.1 mM) / 高 Mg^{2+} (6.3 mM) 状態で既知の濃度のアミノ酸を灌流によって与え, 16 枚のスライスで, 20 個の赤核細胞の細胞内記録により行なわれた。(膜電位の平均値, 45.6 ± 5.4 mV, 膜抵抗の平均値, 5.5 ± 1.5 M Ω)

図 2 A は, L-アスパラギン酸, L-グルタミン酸を灌流した時の典型的な赤核細胞のレスポンスである。両者に, スパイクの発生, 膜電位の脱分極, 後過分極, 回復が観察された。図 2 B は, 濃度-反応曲線 (それぞれ 3 個の細胞の平均) である。L-アスパラギン酸, L-グルタミン酸の作用の強さはほぼ同じであった。

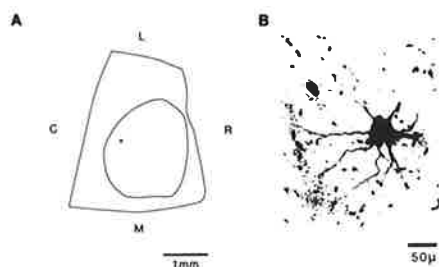


図 1 GABA と L-グルタミン酸に対するレスポンスを確めた後, HRP 染色した赤核細胞。A 図の大きな丸の中が赤核領域, 黒丸が B 図の写真の赤核細胞の位置。

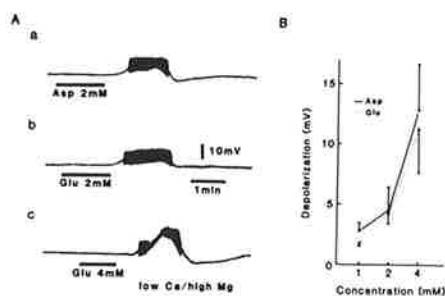


図 2 赤核細胞に対する L-グルタミン酸, L-アスパラギン酸の作用(A)と濃度-反応曲線(B)。A の a, b, c は同一細胞での記録。

図3 A, 3 Bは2 mM グリシン, 2 mM ガンマアミノ酪酸を灌流した時の典型的なレスポンスを示している。両者に、膜電位の過分極、膜コンダクタンスの増大 (1 nA, 15 msec の過分極電流によってモニター) がみられた。図3 Cは濃度-反応曲線 (それぞれ3個の細胞の平均) である。グリシン, ガンマアミノ酪酸の作用の強さは同じであった。

図4 Aはテストされた一部の細胞にみられた2 mM ガンマアミノ酪酸の二相性のレスポンス (最初の膜電位の過分極作用とそれにつづく脱分極作用) を示している。同一細胞において、グリシンには脱分極作用はなく (B), 0.25 mM ガンマアミノ酪酸の灌流では過分極作用だけが観察された。

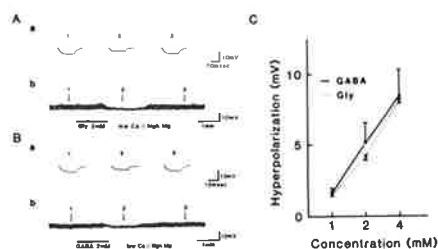


図3 赤核細胞に対するグリシン (A), ガンマアミノ酪酸(B)の作用と濃度-反応曲線(C)。A, Bは同一細胞での記録。

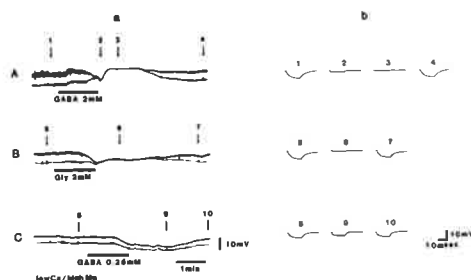


図4 赤核細胞に対するガンマアミノ酪酸の二つの作用 (過分極作用と脱分極作用)。A, B, Cは同一細胞での記録。

赤核細胞は小脳核および大脳より興奮性入力、介在神経細胞より抑制性入力を受けている。赤核細胞に対して、L-グルタミン酸及びL-アスパラギン酸は興奮性作用をおよぼし、グリシン、ガンマアミノ酪酸は抑制性作用をおよぼした。これらは作用の点から、それぞれ、興奮性、抑制性の伝達物質の候補と考えられる。(ガンマアミノ酪酸の放出に関しては本年報、窪田・坂口・塚原参照) ガンマアミノ酪酸の脱分極作用については培養細胞、海馬の神経細胞などで報告されている。赤核細胞においてもこの脱分極作用が観察されたが、このことは神経細胞に普遍的な現象であることを意味しているかもしれない。

ネコ赤核領域からの GABA の放出

窪田 道典・坂口 博信・塚原 仲晃

ネコの赤核細胞は、大脳感覚運動野から介在ニューロンを介して抑制性の入力を受けている。この抑制性介在ニューロンの伝達物質は存在、作用などの点からガンマアミノ酪酸 (GABA) である可能性が高い。そこで、GABA がこの介在ニューロンの伝達物質であるという可能性をさらに確める目的で、スライスを用いて赤核領域からの GABA の放出を調べた。

生後 4～8 週の仔ネコから、赤核を含む厚さ 600 μm のスライスを作り、95% O_2 、5% CO_2 で飽和させたクレブス・リンガー液中で、33.5 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベートした。それから、赤核だけを含むようにトリミングし、液を 1 ml/分の流速で灌流し、5 分毎に液を集めた。GABA の量は、OPA 法を用いてアミノ酸分析機で測定した。

図 1 は、50 mM カリウムで刺激した時の内因性 GABA の放出の結果を示す。実線は標準液で灌流した時の結果を示し、破線は 0.1 mM カルシウム、10.3 mM マグネシウムを含む液で灌流した時の結果を示す。最後の 5 分間で高カリウム刺激を与えている。GABA 放出量は、高カリウム刺激で顕著に増加し、この増加は低カルシウム/高マグネシウムを含む液では抑制された。各点と縦線は、それぞれ 7～16 例の平均と標準偏差を示し、星印は 1% 以下の危険率で有意であることを示す。

図 2 は、0.075 mg/ml のベラトリンで刺激した時の内因性 GABA の放出の結果を示す。実線は標準液で灌流した時の結果を示し、破線は 1 μM テトロドトキシンを含む液で灌流した時の結果を示す。最後の 5 分間でベラトリン刺激を与えている。GABA 放出量は、ベラトリン刺激で顕著に増加し、この増加はテトロドトキシン存在下で抑制された。各点と縦線は、それぞれ 4～8 例の平均と標準偏差を示し、星印は 1% 以下の危険率で有意であ

ることを示す。

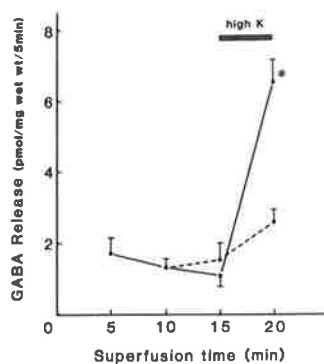


図1 高カリウムによる GABA の放出。

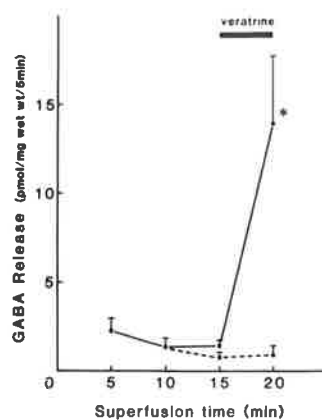


図2 ベラトリンによる GABA の放出。

以上のように、ネコ赤核領域のスライスから内因性 GABA が放出されることが示された。従って、他の満たされた同定規準を考え合わせると、赤核細胞に投射する抑制性介在ニューロンの伝達物質が、GABA であることの可能性は非常に高くなったと考えられる。

最後に、アミノ酸分析機を操作して下さった勝丸由美子さんと、凍結乾燥機を使わせて下さりテトロドトキシンを分けて下さった中山博士に感謝します。

情報記憶部門

概要

記憶及び学習の過程に神経機能の可塑性が関与することには殆んど疑いがない。この可塑的变化は、個々の神経細胞に独立におこるのではなく、その神経細胞に対する支配神経細胞、並びにその神経細胞が支配している標的細胞との干渉に依存している。本部門の研究は、神経系における細胞間の長期にわたる干渉作用の機構を明らかにすることを目的とする。この機構を細胞レベルにおいて解析するには、比較的単純なシステムを対象とすることが要請される。そのシステムとして哺乳動物の筋伸展単シナプス反射弓を実験対象として選んだ。この反射弓は、筋紡錘と、この感覚受容器から由来する Group Ia 知覚線維と、脊髄運動ニューロンによって形成される。Ia 求心性神経から運動ニューロンへのシナプス伝達の効率が、筋の感覚受容器の状態変化によって如何に影響されるかを検討し、正常の中枢シナプス機能を維持する具体的な因子を見いだすことを試みている。

無筋紡錘感覚神経の中枢シナプス伝達

久野 宗・宮田 雄平・本間 信治

〔研究目的〕 出生時のラットの筋には既に筋紡錘が形成され、その感覚神経は筋の伸展に対して反応を示す。しかし、生後3日以内に筋神経に傷害を与えると、神経が再生しても、筋紡錘は既に消失し、その再形成は見られない (Zelena, 1957)。したがって、筋に再生した Group Ia 感覚神経線維は感覚受容器を所有することなく残存する。このような無筋紡錘 Ia 線維の中枢シナプス伝達の効率を検討し、正常の中枢シナプス機構を維持する因子の解析を目的とする。

〔方法〕 新生ラットを A と B の 2 群にわけ、A 群では、一側の下肢の medial gastrocnemius (MG) 神経を出生の翌日に切断し、B 群では、同様な手術を出生 5 日後に行った。術後、4 及至 5 週間して、脊髄の MG あるいは lateral gastrocnemius-soleus (LGS) の運動ニューロンから細胞内記録を行い、これらの筋神経の刺激によって発生する単シナプス性の EPSPs を観察した。この結果を同年令の正常ラットから得られた結果と比較した。

〔結果〕 (1)術後 4—5 週間において、傷害した MG 神経刺激によって発生した MG 筋の

収縮張力と、MG 筋直接刺激による収縮張力を比較し、MG 筋の運動神経再支配度を測定した。A 群、B 群共に、運動神経の再支配は 100% であった。

(2) 正常のラットでは、MG 神経刺激に対して LGS 運動ニューロンから記録される EPSP の平均値は、1.2 mV であった。

(3) A 群のラットでは、MG 神経刺激に対して LGS 運動ニューロンから記録される EPSP の平均値は、0.1 mV であった。

(4) B 群のラットでは、上記の EPSP の平均値は 0.7 mV で、筋神経傷害後に低下した EPSP の回復の傾向が見られた。

(5) これらの結果から、Ia 知覚線維の中枢シナプス機能の維持には、その感覚受容器の存在が必要であると結論される。この結論は、Ia 知覚線維の機能の維持に、感覚受容器からの栄養因子が媒介していることを示唆する。

〔考察〕 神経を筋から切り離すと、約 2 週間後に、その筋神経刺激によって発生する運動ニューロンの EPSP の減弱が見られ、6—8 ヶ月後には EPSP は完全に消失する (Goldring, Kuno, Nunez & Snider, 1980)。筋神経を切断するかわりに、その伝導を tetrodotoxin で 2 週間ブロックすると EPSP の亢進が見られる (Gallego, Kuno, Nunez & Snider, 1979)。したがって、末梢神経切断の EPSP に対する効果は、感覚神経インパルスの除去によるものではない。切断した神経を筋肉に再縫合すると、2 ヶ月以内に、その神経の刺激に対する EPSP は正常に回復するが、この回復には、神経筋伝達及び Ia 感覚神経の機能的回復を必要としない。このことは、Ia 感覚神経と、筋のある構造との機械的コンタクトが EPSP の回復に関与していることを示唆する。本研究では、切断神経が筋に再生しても、筋紡錘の形成されない条件下では、EPSP の回復が見られない結果を得た。この結果は、筋紡錘と Ia 線維のコンタクトが、Ia 線維の中枢シナプス機能の維持に必須であることを示唆している。

文献

- 1) Zelena, J. (1957) . *J. Embryol. exp. Morph.* 5:283.
- 2) Goldring, J.M., Kuno, M., Nunez, R. & Snider, W.D. (1980) . *J. Physiol.* 309:185.
- 3) Gallego, R., Kuno, M., Nunez, R. & Snider, W.D. (1979) . *J. Physiol.* 291:191.

生 体 調 節 研 究 系

高次神経性調節部門

概 要

生体調節研究系は、高次神経性調節部門、高次液性調節部門、生体システム工学部門（未設置）の三部門から成り立っており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法の研究を進めている。

高次神経性調節部門では新しく開発された単一遊離心筋細胞をつかって、一般生理学的な立場から心臓の自動発生機転を明らかにしようとしている。一箇の細胞の膜電位、電流の測定にはじまり一箇のイオンチャネルの解析に至る一連の実験は、すでに心筋という特殊な細胞のみではなく広く骨格筋細胞、神経細胞又は卵細胞膜の有する興奮膜としての性質と対比できるレベルまで進み得たと考えられる。

これらの研究を通して、従来多細胞系の心筋束標本で得られてきたイオン電流に関する種々の情報を再検討すると共に、新しくイオンチャネル自身の性質についての知見が集まりつつある。さらにこれらの基礎的研究を土台として心筋の不整脈、虚血時の心筋の反応についての生理学的理解が次第に深まりつつあると考えられる。以下今年度中に出版されたか又は出版を受理された論文についてその概要を報告することとする。

家兎洞房結節のムスカリン性アセチルコリン反応の イオン機構について

野間 昭典・国分真一郎・谷口 淳一

兎洞房結節細胞群を電圧固定しアセチルコリンによって増加するK電流が、骨格筋のニコチック受容器と同様、drug operated チャネルであることは既に野間、Trautwein (1978) によって明らかにされたが、当時は細胞数が数百の微小標本であったためアセチルコリンとその受容器との間に拡散に要する時間がかかり充分その Kinetics の分析が出来なかった。兎洞房結節細胞 10-20 箇よりなるクラスター標本を用い、アセチルコリンの電気泳動的投与後に起こる過分極応答について調べた所、細胞表面に電極をおけば反応はほとんど潜時なしに起こるを見た。

アセチルコリンにより引き起こされるK電流のカイネテックスと振幅についての方程式をつくり、上記の過分極反応を計算によりシミュレートした所、アセチルコリン反応を極めてよく再現した。

発表 J. Physiol (Paris) (1981), 77: 1073-1076.

家兎 A-V 結節の膜電流について

国分真一朗・西村 昌雄・野間 昭典・入沢 宏

洞房結節の膜電流系については1976年野間、入沢の報告以来多くの研究が発表されたが、房室結節については細胞構築があまりにも複雑であるため洞房結節よりもイオン流測定は困難とされてきた。1980年に始まった本研究は今年は完全な報告として発表された。(Pflugers Archiv 1982, 393, 15-22)。房室結節細胞を $0.2 \times 0.2 \times 0.2$ mmの小標本とした。時定数は 21.5 ± 1.5 ms ($n=5$)、長さ定数 692 ± 96 μ m ($n=5$)であった。活動電位は小標本としない前のものとよく類似した。電圧固定は二本電極法により行ない、遅い内向き流、外向き流、過分極側で活性化する電流が記録された。内向き流は、D-600 (2×10^{-7} g/ml) の作用によりブロックされるが、TTX (1×10^{-7} g/ml) は感受性がない。内向き流はNa-or Ca-free Tyrode液によって減少するが、NaかCaの何れか一方が残っていればそれぞれ特徴ある内向き流を測定しえた。一方、外向き流については外液の K^+ 濃度により変化し、逆転電位はK電極として変化することがわかった。外向き流は従ってK電流であると考えられた。過分極側により活性化する電流はS-A結節の i_h と同様の性質を有することが明らかとなったが、自発興奮をするにもかかわらず i_h 電流が存在しない例もでてきて i_h が自動性には重要な意義を持たないことが明らかとなった。

一方、TTXは明らかにA-V結節の早い立上り相には効果がありA-V結節細胞に i_{Na} が貢献していることが明らかとなった。これらの実験結果は従来、間接的な証明しかなく多くの点が不明であったA-V結節の自発活動に一つの新しい情報を提供したものである。これらの研究をまとめて第16回理論心電図研究会に於いても報告され、心臓14巻4号566-571頁に学会討論とともに掲載された。

単一心室筋細胞への cAMP, カルシウム, アセチルコリン等の影響について

Trautwein・谷口 淳一・野間 昭典

心室筋と房室結節細胞群をコラゲナーゼ法で分離し cAMP, cGMP, Ca, EGTA 等を微小電極より加圧する方法で細胞内に注入した。その結果は cAMP は心室の活動電位持続時間を延長させ、プラトー層の電位を高めた。A-V node の活動電位波形は、cAMP 注入により大きく変化を示さなかったが、自発興奮の頻度は増した。cGMP は、先づ心室活動電位を短縮させたが、次いで活動電位の持続を延長させた。dibutyryl cGMP の細胞外投与及び細胞内注入によっては活動電位延長は認められなかった。しかし GMP の直接注入によつのみ持続延長を起こすことが出来た。

A-V 結節への cGMP の注入は膜を過分極させることも自発活動の頻度を減少させることもなかった。この結果から cGMP が電位依存性にイオンチャネルを制御するというを支持するが、それがムスカリン作用、すなわち Ach によって活性化した K チャネルに作用するものではないことを示唆できた。

発表 Pflugers Arch 393: 307-314 (1982)

単一心室筋細胞の電気活動に対する細胞内 H^+ の効果について

倉智 嘉久

細胞内に酸性又はアルカリ性の溶液を注入し、その心室筋の活動電位に及ぼす影響を観察した。酸性液 pH 3.9-4.7 を心室細胞に注入すると活動電位は短縮しプラトー相は減する。これは I_{si} が減少しかつ外向き流が増加するためである。大量の酸性液を細胞内に注入するとストロファンチジンで起こされた様な一過性の脱分極 (transient depolarization, TD) が起こり、徐々に減する周期的な電位変化を起こした。これに対してアルカリ液を注入すると TD は減少した。アルカリ液 pH 9.3-9.7 を注入すると活動電位は延長しプラトー相は増高した。

pH の酸性液注入と同様な変化が細胞内 Ca 濃度の増加のときに見られ、又アルカリ液注入と同様な変化が EGTA 注入時に見られた。しかし単に細胞内 Ca を増す、または減少させる場合と pH 変化とでは遅い内向き流 (I_{si}) の不活性化過程の時定数に著明な差があっ

た。従って心室筋細胞の電氣的变化を変えるには、pH 変化と細胞内の Ca 変化とは単独に効果を示すものではなく、両者が共に膜のイオンチャンネルに変化を与えている可能性があることを示唆した。

発表 Pfugers Arch 394: 264-270 (1982)

モルモット心室筋の単一心室筋細胞に於ける 一過性脱分極と自発性電位変動について

松田 博子・野間 昭典・倉智 嘉久・入沢 宏

ジキタリス剤の心筋細胞に対する中毒作用の一つは一連の活動電位を起こしたのちに見られる一過性脱分極 (TD) であって、活動電位のレベル、膜電流のレベルから詳しく検討されてきた。しかし、これらはすべて多細胞系の実験であり一箇の細胞でもこの現象があるものか否か、この現象に細胞内 Ca イオンはどのような関与をするか、等については全く知られていなかった。ジキタリス作用下で単一心室筋細胞でも TD が誘発されることが先に確認された。これは電圧固定実験により一過性の内向き電流 (TI) として確認された。

TD は細胞内に EGTA を注入するかまたは 5 mM Caffein を細胞外に投与するかの何れかで停止してしまう。一方細胞内に CaCl_2 を注入することによって誘発でき、また cAMP を細胞内に与えることによって増大することができた。TI と同時に静止膜電位に電位を固定すると振動性の微小変化が見られ、電位固定をしていない時は電位の変化としても見られた。スペクトラル分析では微小振動の最大周期は 2-7 HZ で、これは TD、または TI が連続して出現する際の頻度と極めてよく一致した。この周期的変動は EGTA の細胞注入によって消失し、また 5 mM カフェインによつては振幅が減少しその代わり頻度の増加をみた。膜電位が陽電位側に傾くと高頻度側にピークの移動が起こった。

これらの事実は細胞内 Ca の変動が膜透過性を振動性に変えて、膜電流および膜電位の微小振動を生じさせており、細胞内でばらばらに起きている Ca の取りこみと放出が、脱分極により周期された結果 TD と IT が出現することを示唆する。

発表 Circ. Res., 51: 142-151 (1982)

モルモット心室筋細胞間における電氣的結合について

亀山 正樹

モルモット心室筋細胞をコラゲナーゼ処理によって分離し、相接している細胞対を用いて細胞間の電氣的結合を測定した。電流を一方の細胞から注入すると他方の細胞にも膜電位の変化を生じた。一方の細胞から電流を流し2つの細胞で電圧を測定することにより、結合係数と結合抵抗を求めた。また一方の細胞を電位固定し、他の細胞に電流を流すとその細胞には電位変化を起こすがクランプをした細胞の方には電位変化は起こさず、そこに流れ込んだ電流が測定できる。この方法によっても結合抵抗を求めることが出来た。この標本における両細胞間の電氣的結合は0.8以上であったが、2, 3の細胞では細胞間は機能的に孤立していた。このような例では結合係数は0に近くなる。従って測定した42例の細胞間結合についての結合係数は0.6以上か、または0.05以下に2大別され、このことは電氣的結合が徐々に0.8から0.05に移るのではなく悉無律的にある段階で急に結合がわるくなることを示している。

結合部の抵抗は膜電位によっても結合部を流れる電流によっても影響を受けず、外部 Na^+ 濃度の減少か、または外液にストロファンチデン (10^{-5}M) を投与することにより結合抵抗の増加が認められた。従って、細胞内の Ca 濃度増加は結合部抵抗の増加を起こすことが示唆された。

発表 J. Physiol. 336: 345-357 (1983)

細胞内 ATP 及び cAMP のモルモット心室筋遅い内向き流調節について

入沢 宏・国分真一郎

モルモット心室筋を直径 $5\sim 7\mu\text{m}$ の吸引電極を用いて電圧固定を行い、電極内に種々の物質を灌流した所、細胞内まで有効に透折できることがわかった。電極内にATP, cAMP及びEGTAを含むことが遅い内向き流を30分にわたって維持するためには必要で、これらの物質のうちATPの作用が特に顕著であった。電極内ATP濃度を2 mMから9.5 mMに増加させると、内向き流の振幅は増加し不活性化の時間経過の遅い成分は促進され

た。I-V 関係を見ると負スロープが著明となった。すなわち $-40 \sim -10$ mVの間では外向き流は大きくなり、 -10 と $+40$ mVの間ではより内向きとなった。 i_{si} の増加はcAMPを $30 \mu\text{M}$ に増加させても起こったが、負のスロープはATPと違って影響を受けなかった。これらの結果から細胞内のCaがEGTAを灌流することによって完全にbufferを受けていると仮定すれば細胞内ATP及びcAMPが膜電流に細胞内Caを介さず直接作用することが明らかにされたわけである。

発表 J. Physiol, 338: 321-357 (1983)

家兎洞房結節細胞のペースメーカー機転

入沢 宏・野間 昭典

これは洞房結節細胞の再構成実験を再びやりかえた実験で、従来の柳原、野間、入沢(1980)のモデルの時よりも i_{si} の測定が充分行われるようになったので、この段階でもう一度柳原のモデルの訂正すべきは訂正した方がよいという考えに基づいている。

このモデルにより依然ペースメーカー機転が i_{si} と i_k 主動型であり過分極側で活性化する i_h 電流は大きな役割をつとめないことを再確認した。また、このモデルの特徴はこれらの電圧時間依存性電流以外の背景電流の存在がペースメーカー機転にとって極めて重要な役割をつとめることを示した。このような背景電流の本態の追求が今後の課題となる。さらにこのモデルにはアセチルコリンにより活性化する電流因子をも加えたのでアセチルコリン投与によって起こる電流と従来の i_k 及び i_{si} とを同時に記述することが出来るようになった。

発表 Cardiac Rate and Rhythm: 35-51 (1982)

兎洞房結節細胞の拡張期脱分極に 所謂ペースメーカー電流は寄与するか

野間 昭典・マーチン モラッド・入沢 宏

兎の洞房結節標本を二重電極法で電圧固定を行ない、過分極側で活性化する i_h 電流が拡張期脱分極相にいかなる関与をするかについて実験を行なった。 2mM で Cs^+ の影響下に自発活動の頻度は極めてわづかしか減少しなかった。しかし、 -60mV で活性化する i_h は

著明に抑制された。 Cs^+ は -50mV より負側の電圧一時間依存性の電流系には大きな影響を与えなかった。 Cs^+ は i_h に対して電圧依存性が認められなかったので拡張期の緩徐な脱分極相が i_h の活性によっているとは考えられないことが明らかとなった。

Cs 作用下のS-A結節標本であってもアドレナリンによる陽性変時作用がみとめられた。この時 i_{s1} は著明にましたが i_h 電流には大きな変化はおこらなかった。この結果も i_h がペースメーカー脱分極に大きな関与をしていないことを示すもので、 i_{s1} の関与が大きいことを示している。

発表 Pflügers Archiv. (1983) 印刷中

心室細胞に対する定常膜電流に対する Ca^{2+} 注入の効果

松田 博子

細胞内 Ca イオン濃度が増加すると K^+ コンダクタンスが増加することは色々な組織で知られていてプルキンエ線維においても Isenberg によって既に報告されている。一方、同じ細胞内 Ca イオン濃度の増加によっても K^+ コンダクタンスの増加だけでなく、非選択的な膜のコンダクタンスの増加もみられている。実際細胞内 Ca 濃度を増加させた場合、電流系にどのような変化がおこるかを単一心室筋電圧固定法により細胞内に Ca イオンを注入することによって調べた。先づ静止電位に固定し Ca 注入をおこなうと、内向の電流が流れ、決して外向き電流がますことはないのをたしかめた。定常状態における電圧電流曲線を Ca の注入前後において比較すると -22mV 附近で曲線の交叉がおこった。 -22mV より正電位では外向き流がましていた。膜電位 -60mV から $+10\text{mV}$ 間では細胞内 Ca イオンの増加と膜電位との間にほぼ直線関係にあることがわかった。この電流は恐らく Ca によって活性化される非選択的な電流系と考えられた。

発表 Pflügers Archiv. 1983 397, 81-83

1982年における部門の全活動はこれらの発表の課題ではなく、Patch クランプ法の利用に基づく心筋単一チャンネル解析法の研究が展開したことであった。以下にその表題のみ記す。これらは日本生理学会 (1983)、日本循環器学会 (1983) 及び国際生理学会 (1983) で発表する。

内向き整流特性チャンネルのカイネテックス分析について

野間・亀山・清末

内向き整流特性チャンネルの心筋部位による差異について

野間・清末・中山・副島・入沢

房室結節細胞における外向きチャンネルの分析について

加計・野間

単一結節歩調取り細胞の膜電流の記録

中山・倉智・野間・入沢

アセチルコリンチャンネルの分析

野間・副島

単一心房節におけるアセチルコリンの影響

亀山・飯島

高次液性調節部門

本研究部門では、摂食行動時の中枢性調節機構とそれに関与する生理活性物質の役割の解明を目的としている。そのため 1) 大脳皮質前頭前野—視床下部—脳幹の機能的関係、2) 摂食行動時の各部位のニューロンの活動様式、3) それぞれのニューロン活動を制御する神経伝達物質やその他の生理活性物質の同定とその作用機序を多連微小電極法および脳内電氣的化学的刺激法を行動中のサルに応用することにより検討している。さらにニューロン活動の長期記録 (5-48 hr), 多チャンネル記録およびテレメーターによる自由行動下のサルからのニューロン活動の記録にも取り組んでいる。本年度はサル視床下部外側野の摂食行動時のニューロン活動とその薬物感受性を検討した。その結果、ブドウ糖感受性ニューロンが求餌行動時の神経情報処理に特異的な役割を果たしていること、ノルアドレナリン、ドーパミンおよびオピエート系が求餌に関係するニューロン群に多く入力していることなどが明らかとなった。また前頭前野とくに前頭眼窩野ニューロン活動の長時間記録で内部環境および外部環境変化の及ぼす影響を検討し、その統合機能の新しい一面を見出した。

サル摂食中枢ブドウ糖感受性ニューロンの 摂食行動時の活動様式

栗生 修司・大村 裕・西野 仁雄・László Lénárd・
南 武嗣・三崎 久好・井之口 昭

視床下部外側野 (LHA, 摂食中枢) には、ブドウ糖をニューロンに直接投与したときに放電頻度が減少するブドウ糖感受性ニューロンが存在している。このニューロンは血中代謝産物、ホルモンおよびその他の摂食行動に影響を及ぼす生理活性物質にも感受性を有する。また肝臓などの末梢器官に存在するブドウ糖感受性ユニットから迷走神経性入力を受けている。一方、視覚、嗅覚および味覚等の外界情報も LHA に入力している。これらの事実は、摂食に関係する内界および外界情報が LHA に収束すること、そしてブドウ糖感受性ニューロンが摂食行動に関係する情報処理に重要な役割を果たしていることを示唆している。しかしこのニューロン群が摂食行動中にどのような活動をしているかはよくわかっていない。そこで本実験で多連微小電極法を用いて、無麻酔サル LHA ニューロンの化学感受性を調べ、レバー押し摂食行動中の活動様式との相関を検討した。さらにノルアドレナリ

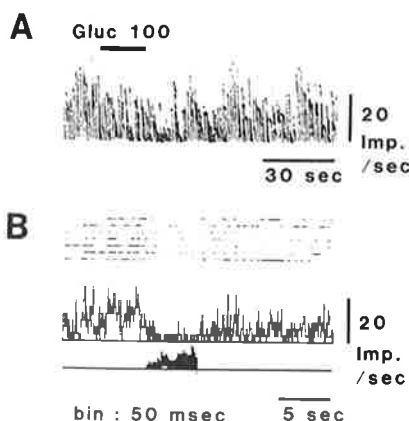


図1 LHA ブドウ糖感受性ニューロンの活動様式 A: ブドウ糖 (Gluc) 100 nA 投与により活動低下。 B: A と同一ニューロン。レバー押し期 (下段ヒストグラム) にニューロン活動 (上段ラスタ表示と中段ヒストグラム) が著名に低下。

した。促進性のものは1個存在した。ノルアドレナリンは86個中44個 (51%) が抑制性, 3個 (3%) が促進性に, ドーパミンは72個中17個 (24%) が抑制性, 12個 (17%) が促進性に作用した。ブドウ糖で抑制されるブドウ糖感受性ニューロンはすべてノルアドレナリンにも抑制性に反応したが, ドーパミン感受性とは関係がみられなかった。このブドウ糖感受性ニューロン17個および非感受性ニューロン63個について活動様式との相関を検討した。17個中13個 (76%), 63個中31個 (49%) それぞれ活動変化を示した。ブドウ糖感受性ニューロンは非感受性ニューロンに比べ活動変化するものが多い傾向にあるが, とくにレバー押し期 (10/17 に対して 23/63) と摂食期 (6/17 に対して 12/63) で顕著であった。さらにレバー押し期の変化については, ブドウ糖感受性ニューロンは10個中9個が活動低下であったのに対し, 非感受性ニューロンは23個中15個は活動上昇であり有意の差 ($P > 0.01$) があった (図1)。ノルアドレナリン感受性ニューロンおよびドーパミン感受性ニューロンについては, レバー押し期の活動性については非感受性ニューロンと有意の差はみられなかったが, 摂食期に活動変化するものが有意に多かった。

本実験により, サル LHA ニューロンの大半がレバー押し求餌行動中や摂食中に活動変化し, 食物内容や血糖値に修飾されることが明らかになった。さらにブドウ糖感受性ニューロンがラットと同様サルにも存在することが明らかとなった。このブドウ糖感受性ニュー

ン系とドーパミン系の関与も検討した。

総数約200個のLHAニューロンの活動を記録した。そのうち150個のニューロンでレバー押し摂食行動中の活動様式を解析した。活動様式を1) 手がかり光刺激呈示期, 2) レバー押し期, 3) 手がかり音刺激呈示期, および4) 摂食期に分けて分類すると, 83個のニューロンがこれら4期のうち少なくとも1期に活動変化を示した。各期に反応するものはそれぞれ15個, 66個, 15個, 47個であった。食物の内容やブドウ糖の静注で活動様式に変化がみられるニューロンが35個中29個存在した。

薬物感受性については, ブドウ糖は98個中23個 (23%) が抑制性に作用

ロンはノルアドレナリン感受性ニューロン群の中に含まれ、レバー押し求餌中に活動低下という特異的活動様式を示した。このことは、ブドウ糖感受性ニューロンが、ブドウ糖濃度や他の内界液性環境に対応して求餌行動時の神経情報処理の調節を行なっていることを示唆する。

サル前頭眼窩野ニューロン活動のグルコース負荷 及び満腹による変化

中野 保彦・西野 仁雄・大村 裕

栗生 修司・山本 智矢・根本 清次

麻酔下のサル、ネコを用いた実験では、前頭眼窩野 (OBF) の刺激により、自律神経系を介して、胃腸系、呼吸循環系に種々の影響を与えることが知られている。しかし OBF の破壊実験では、こうした影響はほとんどみられず、一過性の摂食行動異常や、情動行動時の変化が主となる。従って覚醒下における OBF の自律系ないし内部環境に対する役割につ

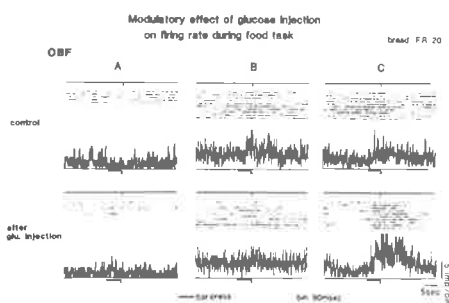


図1 ブドウ糖静注によるレバー押し期間中のニューロン活動の変化を示す。A及びBのユニットは、静注後にレバー押し中の活動変化が减弱、Cでは逆に亢進している。図は各々上段がラスタ表示、下段がヒストグラムを示す。

いては不明の点が多く、又これに関する実験も少ない。そこで今回、摂食行動を通じて OBF の内部環境に対する関与をさぐるため、レバー押し摂食行動、自然摂食の期間中ニューロン活動を長時間記録しこれにグルコース負荷、満腹状態という内部環境変化がどういう影響を与えるかを調べた。記録は、白金イリジウム電極を用い44個のニューロンについて解析した。グル

コース静注 (600~700 mg/kg) により、血糖は一時的に 200 mg/dl 前後に上昇し約 30 分後に元のレベルに戻るが、20 例中 19 例で OBF の自発放電頻度に変化はなかった。しかしレバー押し期間中の活動は、静注後に 14 例中 6 例で减弱、1 例で増強と半数に変化がみられた (図参照)。自然摂食については、22 個のニューロン中半数でサルが満腹に近づくにつれて自発放電頻度に変化がみられ、満腹後 (摂食終了後) も 10~30 分と比較的長期にわ

たり持続性の変化を示した。以上より OBF ニューロンの自発放電頻度は、血糖上昇という単一の要素では特に影響を受けず、満腹という各種内的情報の統合された状態で変化することが明らかとなった。血糖上昇に伴う、レバー押し期間中のニューロン応答の減弱を主とする変化については、同様の現象が視床下部外側野で行なった実験でもみられたこと、解剖学的、電気生理学的にも OBF と視床下部で相互の連絡がみられることなどより、視床下部のブドウ糖に感受性を有するニューロン群よりの二次的な影響を受けている可能性が考えられる。すなわちレバー押し行動中に活動を変化するニューロンに対して内部情報(血糖変化)が修飾因子として働く可能性が示唆される。

以上のことから、OBF は従来指適されてきたような外界情報の処理、統合のみならず摂食行動に伴う内部環境変化にも関与し、これに対し何らかの処理統合を行ない、摂食行動の動機付けないしその遂行に関与している可能性が考えられる。

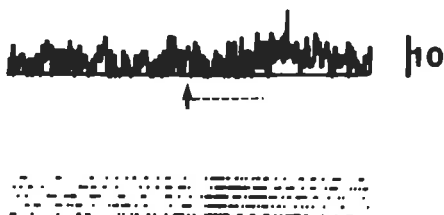
情動行動時のサル前頭眼窩野ニューロン活動

山本 智矢・大村 裕・西野 仁雄
粟生 修司・中野 保彦・根本 清次

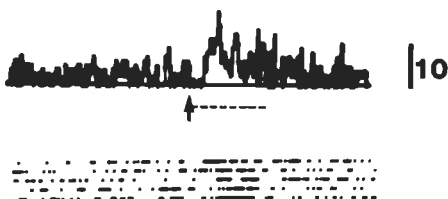
前頭眼窩野 (OBF) が破壊されたサルでは情動行動、摂食行動や社会的行動に変化が起ることが知られているが、情動行動時の OBF ニューロンの活動様式についてはあまり知られていない。本研究ではテフロン被覆プラチナ・イリジウム微小電極をサルの OBF に慢性的に埋め込み、OBF の情動行動および摂食行動における役割を単一ニューロンレベルで解析することを目的とした。チェア上の無拘束下ニホンザルより単一 OBF ニューロン活動を長期間記録し、快刺激 (イモ、レーズンなどの食物)、不快刺激 (おもちゃのヘビ、注射器、棒など)、および中性刺激 (黄色いテープなど) の呈示に対する反応様式やレバー押し摂食行動時の活動変化を検討した。その結果総数 45 個の OBF ニューロンのうち、快および不快刺激のどちらかに反応したものが 27 個 (60%)、両方のどちらかに特異的に反応したものが 7 個 (16%)、両者に応答したものが 12 個 (27%) あった。これらのなかには、快、不快刺激によって応答が逆転するものが 7 個 (16%) あった。多くのニューロンで、同じ刺激を繰り返すことによって応答が減弱する傾向が見られた。また同じ刺激に対しても、それに対するサルの情動行動の出現によって応答様式の変化するものも見られた。さらに 7 個 (16%) のニューロンにおいて快刺激の呈示や摂食行動の反復によって放電頻度が持続的に上昇し、不快刺激の呈示の反復によって放電頻度が持続的に減少した。これらの結果

より、OBF では単に快、不快刺激に応答するだけでなく、それらの識別や外的状況の短期的ならびに長期的なモニタリングが行なわれている可能性が示唆された。現在では OBF に加え、摂食行動の発現や食物、非食物の認識に重要な働きを持つと言われている外側視床下野 (LHA) においても同時に記録を行ない、それぞれの部位における情動刺激に対する応答や摂食行動の発現上に対する役割について解析を進めている。

SWEET POTATO



INJECTOR



TOY SNAKE

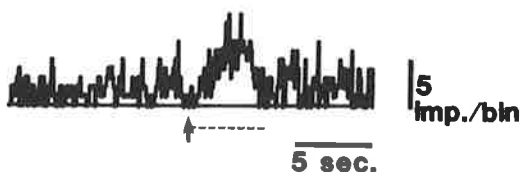


図1 前頭眼窩野ニューロンの刺激呈示に対する反応様式。このニューロンはイモ (SWEET POTATO), 注射器 (INJECTOR), おもちゃのヘビ (TOY SNAKE) に対して異なった応答様式を示している。刺激は (↑) で加えられ、点線のあいだ呈示されている。

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

概 要

医学生物学専用を原則とする超高(電)圧電子顕微鏡(H-1250M型:日立製)が昭和56年度に導入された。常用加速電圧は、1000 kVであり、立体的情報の解析に有利な機種である。昭和57年度前期の調整期間を経て、後期11月より、これを用いての全国共同利用実験が開始された。この共同利用実験は、I. 厚い生物試料の立体観察 II. 生物試料の高分解能観察 III. 生物試料の自然状態における観察 の三課題を主な柱としている。昭和57年度は、所内1件、所外5件の計6課題が採択され、順調に実験が進められた。

超高圧電子顕微鏡室としては、これらの課題を支える基礎データの集積を重要な課題とし、次の研究を進展させようとしている。

研究目的及び研究経過

I. 立体観察のための解析法の確立

試料の傾斜角度を電顕使用状態において精度良く知るために結晶試料を用い結晶方位に敏感に対応する菊池模様を利用して傾斜角度の確認を行い、この値を用いて立体観察における深さ方向の情報の精度を向上させる。さらに、これらのデータを基に昭和57年度に計画、導入した立体像解析装置を用い深さ方向の情報解析を行おうとしており今後、立体像解析の精度は向上することが期待される。

II. 高分解能試料観察

電子顕微鏡の性能を最大限に発揮させるためには基本的に高分解能観察に必要な諸条件を整備し安定した状態で観察することが不可欠である。この条件を確立するために非晶質膜を用いて光回析法を用いることにより、当室における高分解能観察の条件を確立しよう

としている。又、生物試料においては照射損傷は不可避の問題であるため、このためのロー
ドーズ方式について検討し、現在シャッター方式を用いた方法を推進させている。

III. 雰囲気試料室

凍結試料の観察をも含めた生の試料観察を目標において 200 KV 電頭到低温冷却ホル
ダーを導入し、この方面の基礎データを得ると共に、超高圧電頭に用いる隔膜方式による
試料ホルダー実現に向けて研究計画を進めている。

組 織 培 養 標 本 室

神経グリアハイブリッド細胞の分化

古家 園子

従来、神経グリアハイブリッド細胞を使って分化過程を超薄切片法、フリーズフラク
チャー法、微小電極法で観察し、その time table を作製してきた。その結果、興奮性発現
に伴い、10 nm 以上の大きな膜内粒子が細胞体で増加することが明らかになった。これらの
増加した膜内粒子がどのような化学的性質を持つものであるかを明らかにする為にフラク
チャー面での免疫組織化学（フラクチャーラベル）を行うことにし、その予備実験を開始
した。今後、Na チャネルがフラクチャー面でどの大きさの膜内粒子に対応し、細胞の分化
に伴ってどの様に分布するかを、ニューロblastomaや正常な培養神経細胞を使って調
べていく予定である。

動 物 実 験 施 設

〔概要〕 動物実験施設は、生理学・基礎生物学両研究所で用いられる実験用動物の飼育と供給、および動物実験を行なうための共同利用施設として、昭和55年4月より発足、3年計画をもって施設設備の整備を行なって来た。昭和57年度は、創設整備の最終年度にあたり、前年度に引き続いて、主として陸生動物室の飼育設備、手術室・実験室の実験機器の整備を行なった。また、動物からの感染事故防止と、疾病予防のため、動物搬入時の検疫を徹底させることにつとめた。

〔施設利用〕 施設の利用は、陸生動物室における実験室の利用がのべ135件、飼育室の利用40件で、飼育した動物は15種約3,000匹（昆虫を除く）であった。また、水生動物においては、恒温室・飼育水槽の利用が21件、飼育した動物は15種約6,000個体（計数出来ないものを除く）であった。

陸生動物室月別利用件数

室 名	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
手術室		2	5	10	8	10	7	7	8	9	14	17	97
測定室	2	1		1	1	1	1						7
生理実験室		1	2	1	2		1			1		1	9
生化学実験室	3	3		2						1			9
解剖実験室	1	2								1			4
手術実験室	(1)												(1)
そ の 他	1	2	1		1	1	(1)				2		8(1)
計	7(1)	11	8	14	12	12	9(1)	7	8	12	16	18	134(1)

() は長期利用

陸生動物月別搬入頭数

動 物 名	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
ラ ッ ト	12	2	59	63	69	43	54	77	83	100	59	45	666
マ ウ ス	25	12	15	29	16	18	26	5	10	500	78	30	764
モルモット	10	10	26	26	24	50	25	15	73	40	10	25	334
ハムスター				9	8							3	20
ウ サ ギ	10	71	40	33	34	35	31	27	31	29	18	42	401
イ ヌ	2		1	17	2			5	12	9	9	13	70
ネ コ	21	53	99	90	33	58	57	26	36		3	20	496
サ ル		3			12		2						17
ヤ ギ											2		2
ウシガエル				6								12	18
カ メ		20	20		5		50						95

水生動物月別搬入数

動物名	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	計
ワキン	90	120	—	40	50	50	20	10	20	20	—	250	670
コイ			2		2					●	8		12
アマゴ	4		6		10	60		4		80			164
ニジマス			1			1							2
アメリカナマズ		100	29			49						25	203
テラピア	4				280								284
アナゴ			60										60
アメリカザリガニ		200			200	250				100			750
イセエビ				7	3	7	5			6	27	37	92
クルマエビ				5		35	12	35	24	16	13	80	170
ゼノバス		30		20						1		10	61
クサガメ					22								22
ヒトデ		2500	100				800						2400
ウニ			30	40		100	30			250		150	600
ヤリイカ	11						29	11	25	82	139	30	372

〔検疫と治療〕 検疫は、イヌ70頭、ネコ28頭、サル14頭、ヤギ2頭について実施し、実験不適として処分したもの3件、治療を行なったもの22件、検疫期間中に死亡したもの8件であった。死亡及び疾病原因の大部分は、パルボウイルス感染によると思われるイヌの急性出血性下痢症であった。

長期飼育中の動物における疾病発生はイヌ12件、ネコ9件、ヤギ1件、ラット1件で、治療回数のはべ92回であった。死亡した個体については11例で剖検を行ない原因の解明につとめた。

〔事故〕 人畜共通感染症による感染事故や動物実験に起因する発熱などの報告は現在まで皆無であった。

先天性 Aganglionosis Rat の繁殖

尾崎 毅

〔概要〕 食物の消化、吸収に与かる様々な形式の腸管の運動は、消化管の全長にわたって分布する壁内神経叢によって調節、制御されている。そして、壁内神経叢の何らかの原因による機能不全は消化管の運動に重大な障害をもたらし、ヒトの大腸にみられる症例では、結腸部以下の腸管の運動障害により、いわゆる「巨大結腸」を呈し、ヒルシュスプル

ング病の名で知られている。

近年、本邦で、先天的に腸管壁内神経叢の一部が欠如した Aganglionsis Rat と呼ばれるラットが発見され、ヒルシュスプルング病のモデルとして注目されている。本研究は、このラットの腸管を用いて、壁内神経叢の発達と、神経叢の機能発現に至るメカニズムの解明を行なおうとするものである。

〔研究経過〕 Aganglionsis Rat は、発見者筏井洋氏（動繁研）の好意により分与を受け、昭和56年1月より繁殖を開始した。このラットの Aganglionsis は、劣性ホモ個体のみ出現する致死性の遺伝病であるため、実験にはまず Aganglionsis の因子をヘテロに持つ親を大量に作る必要がある。現在までに、導入したヘテロ親2組より、 F_1 世代の中からオス、メス各6匹、 F_2 世代の中からオス3、メス4、 F_3 世代からメス2匹のヘテロ親を得ることが出来た。実験には週2～3匹の劣性ホモ個体が必要であるので、劣性ホモの出現率と哺育期間中の消耗や、受胎率、親の消耗などを考慮に入れると、なお現在の数倍のヘテロ親が必要である。この間に得られた劣性ホモ個体、すなわち Aganglionsis Rat のうち約20個体を実験に供し、主に組織化学、形態学的検索を行なった。（検索の結果は共同研究者の長浜真人氏、沖充氏の報告を参照）

〔考察〕 Aganglionsis Rat の繁殖上の問題点としては、1) ヘテロ個体の検定作業が、繁雑で労力を要すること。2) 親による食殺が多く、特に、大切な劣性ホモ個体が失なわれやすいこと。3) 受胎率、産仔数にばらつきが大きく、作業能率が低下すること。などがある。このため今後の課題としては、産仔数、受胎率の良い、性質のおとなしい系統を選別して行くことと、効率的なヘテロ個体の検定法を確立する事が必要である。

技 術 課

大平 仁夫

概 要

生理学研究所技術課は、研究所における研究支援のための研究所長直属の技術専門組織である。技術課の技官は、それぞれの職場に出向して日常の業務を行っているが、技術課独自の活動も自主的にまた組織的に実施しており、その主なものは①技術課ミーティング、②生理学技術研究会、③技術課プロジェクトである。

技術課ミーティングは毎週月曜日の朝1時間、全員が技術課室に集って事務打合せや技術研修を行っている。これによって技官相互の意思の疎通と相互の技術情報の提供が計られ、技術力と作業能率の向上を目指している。

生理学技術研究会は、生理研技術課技官と全国の大学医学部や医学部共同研、医学部実験実習機器センター、医学系研究所等において生理科学技術に従事している技官との技術交流を計るため、毎年2月に「生理学技術研究会」を開催しており、本年度は2月18日(金)～19(土)に開催した。今回は19大学から31名の参加があり、1日目の研究発表に引続いて2日目の総合討論と熱心な会議であった。この技術研究会についての詳しい内容は「生理学技術研究会報告」の第5号として昭和58年6月に発刊の予定である。



図1 第5回生理学技術研究会(S 58.2.18～19)

技術課プロジェクト活動は、技術課が自主的に組むものと、研究所の要請によって組まれるものがある。技術課が自主的に組むプロジェクトは、各技官の技術力の向上を目指すための自主的な研修の意味も含まれ、専門の異なる複数人員によって課題ごとにチームワークが組まれる。これには技術課全員が、設定された課題の一つに参画することになっている。また、研究所の要請によって組織されるものは、課題の内容や規模、目的によって技術陣が組織される。技術課プロジェクトはまだ試行の段階であるが、いずれは本格的なプロジェクトにして行きたいと思っている。

昭和57年2月に実施した第4回生理学技術研究会の概要と技術課の活動状況は、以下の出版物にまとめられている。

生理学技術研究会報告 第4号：1～55 (B 5版, 6月刊)

研究施設の概要

研究所の組織は研究部門と研究施設とからなっており、研究施設には生理研の研究施設(生体機能検査室, 組織培養標本室, 超高圧電子顕微鏡室, 電子計算機室), 生理研と基生研との共通の研究施設(動物実験施設, 電子顕微鏡室, 工作室, 低温・冷凍実験室)などがある。技術課の技官はこれらの施設にも出向して職務を行っている。

研究施設における技官はまだ数名で、技官のいない施設もあり、研究施設としての本来の機能を充分発揮するまでには至っていない面もかなりみられる。しかし、研究施設についての理解を深め、より効率的に活用していただくための情報手段として、技術課では「研究施設だより」を編集して毎月1回発刊してきた。現在(昭和58年5月)までに22号を発刊。これによって研究施設の動きの概要が把握できるようになった。

それぞれの研究施設には運営を円滑に推進するための委員会が設けられており、基生研との共通施設では両研究所から代表者が選ばれている。また、組織培養標本室, 生体機能検査室, 超高圧電子顕微鏡室, 動物実験施設には専任の教官がおられる。これらの施設のうちのいくつかの概要をそこに所属する技官に技官の立場から報告して頂くことにした。

●電子計算機室

HITAC M-150が導入されてから3年が経過する。現在の電子計算機室へ移転する前は、仮研究棟の空調もままならない室に設置されていた。そして1年, 新しい生理学実験研究棟ができあがり, その4Fに生理研電子計算機室として運転を開始することになった。現在では各研究系に設置する電子計算機もすべて決定し, あとは電子計算機室における機能充実だけとなっている。

しかし, 一口に機能充実といってもいろいろな問題がある。まず, 各研究系に設置したミニコンピューター間だけでなく, 各測定器にも考えられることであるが, データ移動の媒体としては磁気テープ, フロッピーディスク, 紙テープや特定回線などがあり, これらをすべてカバーすることはできなくても, 何らかの方法によってデータの移動ができるようにしたいと考えている。一例としては, パーソナルコンピューターなどを中央計算機の端末として利用できるようにするなどである。

第2には, 分子研電子計算機センターで行っているようなライブラリーの管理である。これは他の研究者にも利用できるようなプログラムを登録してもらい, プログラムライブ

ラリーとして計算機室で管理していくものである。第3には、今後増えると思われる図形処理や画像処理を行えるようにすることである。この分野においては、利用方法が多種多様なため、どのようにすべきかは目下検討中である。

以下に計算機室の年間の利用状況を表にまとめて報告する。

M-150 年間利用状況

昭和57年度

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月
バッチジョブ	423	109	60	109	85	30	190	489	139	88	277	140
TSS	192	22	17	87	18	11	41	98	122	26	70	59
利用時間	130:25	17:53	29:08	1905:08	33:47	14:40	45:46	147:22	156:57	53:20	252:55	77:21
プリントOUT	4415	643	399	1100	901	136	1189	2557	1296	1100	3257	1720

(※注. バッチジョブ=件, TSS=件, 利用時間=時:分, プリントOUT=ページ,)

(伊藤 昭光)

●動物実験施設

動物実験施設は陸生動物室と水生動物室とからなっているが、規模としてはそんなに大きなものではなく、飼育動物数も多くない。しかし、やっている作業はどこの動物室も同じで、動物が搬入されてからある期間飼育し、そして実験に供されている。このような一つの基本的な流れから、それにかかわる様々な流れが生じ、それが円滑に流れるようにすることが技官の重要な役割と考えている。

ここでいう動物とは、実験動物とか実験用動物とか云われているものであるが、飼育しはじめるとそれは家畜(社会上での)と何等変らない。毎日餌や水を与え、1日のうちの数十分あるいはそれ以上の時間をそれぞれの動物と共にしているわけだから、情がわかないはずがない。研究のために合目的に生産された動物(ラット、マウス)などや産業上合目的に生産された動物(ウシ、ブタなど)などの用途については十分理解しているつもりである。しかし、これら実験動物に接するにあたっては精一杯の愛情をもって接したいと思う。実験などで処分された後でも自責と感謝の念を忘れてはならないと思う。そういった心が、彼らにしてやれるせめてもの償いではないかと思う。

これは、3年間に実験動物に接して得た動物室技官としての心構えである。なお昭和57年度の動物実験施設の利用状況については別に尾崎助教授が発表されているのでそれを参照していただきたい。

(稲田 和久)

● 工作センター

工作室センターは地下の洗浄センターと合せて、「共通施設棟Ⅱ」として独立の建物が完成して2年が経過した。現在では設備も充実し利用も安定してきている。この工作センターにおける役割は、大きく3つに分けられると思われる。

まず、研究者および技官がいつでも自由に工作できるように、機器や工具等を整備し、また工作実習も行ない、機械を使用したことのない人でも正しい使い方をして怪我なく工作ができるようにすること。

次は研究にはつきものの、新しい発想による実験装置の開発や試作である。研究者と技官が一体となって試行錯誤をくり返しながらか新しい装置を作り上げることと、市販品にはない、下請けでも出来ない装置を作りあげること。

最後はサービス部門である。下請けや市販品に頼れないほど緊急を要する部品等の製作を行なうことは、研究を円滑に推進するうえにきわめて重要なことである。

工作室の昭和57年度の利用状況は以下のとおりである。

工作室利用人数表 (昭和57年度)

月	生理研 (人)	基生研 (人)	計	延べ時間
4	65	8	73	162
5	53	6	59	132
6	61	16	77	152
7	51	19	70	125
8	48	11	59	137
9	42	10	52	99
10	36	6	42	93
11	45	18	63	130
12	49	5	54	109
1	61	8	69	151
2	49	12	61	131
3	65	19	84	146
計	625	128	763	1571

工作室使用機器表 (件数)

(昭和 57 年度)

月	フライ ス盤	施 盤	コンタ マシン	ボール 盤	切断機	横切盤	その他	計
4	34	27	30	26	12	5	32	166
5	26	27	21	14	12	11	18	129
6	31	26	24	22	15	13	24	155
7	22	12	18	21	13	11	30	127
8	12	15	19	20	13	10	28	117
9	26	10	21	8	7	12	12	96
10	17	21	15	11	6	10	22	102
11	22	20	11	18	10	11	19	116
12	19	23	11	10	8	9	17	97
1	23	21	21	23	12	13	18	131
2	19	27	11	23	9	10	22	121
3	23	25	25	18	11	10	24	136
計	274	254	232	214	128	125	266	1493

(加藤 勝己)

●電子顕微鏡センター

電子顕微鏡センターは、昭和57年11月に共通施設棟Ⅰ(アイソトープセンター、分析センター、電子顕微鏡センター)の地下に写真作画室と共に設けられた。

この施設への電子顕微鏡の導入は昭和52年度から始まり、現在までに研究者の研究目的に対応した機種を選定によって、透過型電子顕微鏡4台、走査型電子顕微鏡2台、分析型電子顕微鏡2台が配置されている他、各種の生物試料作製装置等の機種の充実を計っている。電顕センターの運営は、浜委員長が述べておられるように(研究施設だより12号)、管理規制ではなく使う人のスピリットであるということと「仕事を終わった時、次の人がベストの状態で見えるようにしておく」ことを指針にして利用者に対応している。しかし、電顕センターは、試料作製から写真処理、作画までの一連の作業過程が能率的に行えるように企画されているので、その方向への努力も続けて行きたいと考えている。

現在センターに設備されている電顕は以下のようである。

透過型電子顕微鏡 日立 H-500H, 日本電子 JEM-100CX

PHILPS EM 400HM, 日本電子 JEM-200CX

走査型電子顕微鏡	日立 S-450, 日立 S-800
分析型電子顕微鏡	日本電子 JEM-200CX, 日本電子 JEM-1200CX

(大庭 明生)

発表論文

《神経化学部門》

S. Ebashi, Y., Nonomura, H, Nakasone and Kohama, K. : Regulatory mechanism in smooth muscle actin-linked regulation. Federation Proc., 41 : 2863-2867 (1982)

S. Ebashi, Y. Nonomura, and M. Hirata : Mode of calcium binding to smooth muscle contractile system. In Ca^{2+} -binding proteins in smooth muscle (ed. S. Kakiuchi and H. Hidaka). Plenum Publ. Corp., New York, 1982 : 189-197.

S. Ebashi : Calcium ion and calcium binding proteins, In Ca^{2+} -binding proteins in smooth muscle (ed. S. Kakiuchi and H. Hidaka). Plenum Publ. Corp., New York, 1982 : 421-424.

S. Ebashi : Diversity of regulatory mechanisms and regulation in smooth muscle, In Basic Biology of Muscles : A Comparative Approach (eds. B.M. Twarog et al.), Raven Press, New York, 1982 : 283-290.

Ebashi, S. : Regulation of contractility, In Muscle and Nonmuscle Motility (ed. A. Stracher), Academic Press, New York, 1982 : 217-231.

S. Ebashi, S. Nakamura, H. Nakasone, K. Kohama and Y. Nonomura : In Calcium Modulator (eds., T. Godfraind, A. Albertini and R. Paoletti), Elsevier Biomedical Press, 1982 : 39-49

K. Ohashi, T. Mikawa and K. Maruyama : Localization of Z-Protein in isolated Z-Disk Sheets of Chicken Leg Muscle. (1982) J. Cell. Biol. 95 : 85-90

江橋節郎 (1982) 収縮タンパク質とは何か? 蛋白質・核酸酵素 vol27 No.6 : 978-984

江橋節郎 (1982) カルシウムイオンと生体现象, 内分泌 vol58 No.11 : 1395-1402

江橋節郎 (1982) Ca^{2+} と Ca 結合蛋白質 : その回顧と展望, 蛋白質・核酸・酵素 vol27 No.21 : 2121-2125

《超微小形態生理部門》

亘 弘, 肥塚 泉, 高田宗春, 成瀬昭二 (1982) TMR (topical magnetic resonance) による生体内リン化合物の測定. NMR 医学 2 (1) : 6-16.

楠岡英雄, 常岡 豊, 井上通敏, 阿部 裕, 亘 弘 (1982) 燐核磁気共鳴法 (^{31}P -NMR) による心筋内高エネルギー燐酸動態の解析. NMR 医学 2 (1) : 41-48.

Williamson, G., Engel, P. C., Nishina, Y. & Shiga, K., (1982) A resonance Raman study on the nature of charge-transfer interactions in butyryl CoA dehydrogenase. FEBS LETTERS 138 (1) : 29-32.

Nishina, Y., Shiga, K., Watari, H., Miura, R., Miyake, Y., Tojo, H. & Yamano, T. (1982) Resonance Raman study on the purple intermediates of the flavoenzyme D-amino acid oxidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 10 (3) : 818-822.

志賀暁子, 松本修一, 上田 宏, 志賀 潔, 二科安三, 亘 弘 (1982) 8-メトキシソラーレンとリポフラビン結合蛋白の結合様式について. 日本皮膚科学雑誌 92 : 865-869.

Nishina, Y., Shiga, K., Tojo, H., Miura, R. & Yamano, T. (1982) A study of D-amino acid oxidase-inhibitor complexes by resonance Raman spectroscopy. Developments in Biochemistry 21 : 550-553.

Miura, R., Nishina, Y., Shiga, K., Tojo, H., Watari, H., Miyake, Y. & Yamano, T. (1982) Resonance Raman study on the reaction intermediates of D-amino acid oxidase. Developments in Biochemistry 21 : 179-183.

Tojo, H., Horiike, K., Shiga, K., Nishina, Y., Miura, R., Watari, H. & Yamano, T.

(1982) Thermodynamic studies on self-associating system of D-amino acid oxidase. *Developments in Biochemistry* 21 : 175-178.

Shiga, K., Nishina, Y., Horiike, K., Tojo, H., Yamano, T. & Watari, H. (1982) A new material for flavoprotein researches-purification and properties of hog kidney quasi D-amino acid oxidase. *Developments in Biochemistry* 21 : 188-191.

Tojo, H., Horiike, K., Shiga, K., Nishina, Y., Miura, R., Watari, H. & Yamano, T. (1982) Thermodynamic characterization of hog kidney D-amino acid oxidase apoenzyme in concentrated guanidine hydrochloride solution and the molecular weight of the monomeric unit. *J. Biochem.* 92(12) : 1741-1752.

二科安三, 志賀 潔, 亘 弘 (1982) 熱分析. 内分泌実験講座第4巻内分泌化学実験法 (矢内原 昇, 宇井信生, 中島暉躬編) 講談社サイエンティフィック (東京) : 300-305.

志賀 潔, 二科安三, 亘 弘 (1982) 円偏光二色性および磁気円偏光二色性スペクトル. 内分泌実験講座第4巻内分泌化学実験法 (矢内原 昇, 宇井信生, 中島暉躬編) 講談社サイエンティフィック (東京) : 233-251.

亘 弘, 志賀 潔, 二科安三 (1982) FT-NMR による測定. 内分泌実験講座第4巻内分泌化学実験法 (矢内原 昇, 宇井信生, 中島暉躬編) 講談社サイエンティフィック (東京) : 251-263.

《細胞内代謝部門》

Akira Shimatsu, Yuzuru Kato, Norio Matsushita, Hideki Katakami, Noboru Yanaihara, and Hiroo Imura. (1982) Effects of glucagon, neurotensin, and vasoactive intestinal polypeptide on somatostatin release from perfused rat hypothalamus. *Endocrinology* 110 (6) : 2113-2117.

E.E. Daniel, T. Gonda, T. Domoto, M. Oki, and N. Yanaihara. (1982) The effects of substance P and Met⁵-enkephalin in dog ileum. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60 (6) :

830-840.

Yoshio Ikeda, Kazuwa Nakao, Takaaki Yoshimasa, Noboru Yanaihara, Shosaku Numa, and Hiroo Imura. (1982) Existence of Met-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ with Met-enkephalin, Leu-enkephalin and Met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ in the brain of guinea pig, rat and golden hamster. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 107 (2) : 656-662.

Shozo Kito, Eiko Itoga, Takenobu Kishida, Masanori Togo, Noboru Yanaihara, and Norio Ogawa. (1982) Morphological studies on neuropeptides. neurotransmitters and their receptors. In *Neurology* (eds. S. Katsuki, T. Tsubaki, and Y. Toyokura, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton) : 274-288.

Minoru Hoshino, Haruko Sato, Toshimitsu Suzuki, Chizuko Yanaihara, Yasuhiko Okaru, Koichi Ogino, Yoshio Hioki, and Noboru Yanaihara. (1982) Biosynthesis of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in human neuroblastoma cells. *Neuroscience Letters* (Suppl. 9) : S96.

Tadashi Kamimura, Koichi Ogino, Chizuko Yanaihara, and Noboru Yanaihara. (1982) Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) specifically stimulates adenylate cyclase activity in a human neuroblastoma cell line. *Neuroscience Letters* (Suppl. 9) : S97.

Noboru Yanaihara. (1982) Gastrin releasing peptide (GRP). In *Endocrinology International Congress Series No. 598* (eds. K. Shizume, H. Imura and N. Shimizu, Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton) : 151-155.

Noboru Yanaihara, Tohru Mochizuki, and Chizuko Yanaihara. (1983) Chemistry of Avian Peptide Hormones. In *Avian Endocrinology : Environmental and Ecological Perspectives* (eds. S. Mikami et al., Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin) : 135-146.

T. Mochizuki, Y. Yamamoto, M. Tanaka, C. Yanaihara, Y. Katsumaru, K. Tatemoto, V. Mutt, and N. Yanaihara. (1983) Synthesis of hexatriacontapeptide

amide corresponding to the proposed structure of peptide YY (PYY). In *Peptide Chemistry 1982* (ed. S. Sakakibara, Protein Research Foundation, Osaka) : 59-64.

Yoshio Hioki, Minoru Hoshino, Chizuko Yanaihara, Koichi Ogino, Haruko Sato, and Noboru Yanaihara. (1983) Characterization of VIP-like immunoreactivity in a human neuroblastoma cell line. In *Peptide Chemistry 1982* (ed. S. Sakakibara, Protein Research Foundation, Osaka) : 263-266.

矢内原 昇 (1982) Brain-Gut Peptide の化学. 医学のあゆみ 120(11) : 1057-1064,.

矢内原 昇, 矢内原千鶴子, 望月 徹 (1982) 免疫原の作製法. 病態生理 1(8) : 844-851.

矢内原 昇, 矢内原千鶴子, 望月 徹, 岩原邦宏, 井口和明, 松林 直, 大久保正士, 山下 裕一, 島崎英樹 (1982) 脳-腸管ペプチドの生理的意義. 日本内分泌学会雑誌 58(11) : 1451-1460.

矢内原 昇, 望月 徹, 矢内原千鶴子 (1982) ペプチドホルモンの RIA における基礎的問題と解析. ホルモンと臨床 30(11) : 1193-1199.

矢内原 昇 (1982) Brain-Gut Hormone の最近の進歩. 日本小児科学会雑誌 86(10) : 1571-1575.

《生 体 膜 部 内》

Kukita, F. (1982) Properties of sodium and potassium channels of the squid giant axon for below 0°C. *J. Membrane Biol.* 68, 151-160

Sugiyama, H., Yamagishi, S. & Yamashita, Y. (1982) Characterization of acetylcholine receptor precursors and related components in cultured rat muscle cells. *Proc. J. Academy* 58, Ser. B (2), 40-43

Sugiyama, H., Yamashita, Y. & Murakami, F. (1982) Multiple molecular forms of

acetylcholine receptors in cultured skeletal muscle cells: Subcellular localization and characterization. J. Neurochem. 39, 1038-1046

Yamagishi, S. & Furuya, K. (1982) Effects of intracellular Ca, Mg, and Mn ions on membrane currents of squid giant axons. J. Physiol. Soc. Jap. 44, 346

Sugiyama, H. (1982) Effects of tunicamycin on the metabolic regulation of ACh receptors in cultured skeletal muscle cells. J. Physiol. Soc. Japan, 44, 411

Warashina, A. & Fujita, S. (1982) Effect of sea anemone toxin on the sodium inactivation in crayfish axons. J. Physiol. Soc. Japan 44, 341

Furuya, S. & Furuya, K. (1982) Large membrane particles increase with the development of excitability in neuroblastoma x glioma hybrid cells. J. Electron Microscopy 31, 304

Hirano, H., Nishiyama, F., Fukuda, M., Baba, S., Yamagishi, S. & Furuya, K. (1982) Cationized ferritin (CF) binding on the inner surface of the plasma membrane as revealed by SEM and TEM. J. Electron Microscopy 31, 344

久木田文夫 (1982) 興奮性膜のイオンチャネル. 日本物理学会誌 37, 495-500

杉山博之 (1982) 神経筋相互作用における細胞認識: 「細胞認識と動物レクチン」 大沢利昭編, 講談社サイエンティフィク, 148-159

杉山博之 (1982) 分子レベルでの認識: 「脳と認識」, 伊藤正男編, 平凡社, 49-70

山岸俊一, 古家喜四夫 (1982) 神経膜電流に対する細胞内 Ca その他の 2 価イオンの作用, 生物物理 22, S 186

古家喜四夫, 山岸俊一 (1982) イカ巨大神経線維膜内表面に結合した荷電ポリアミノ酸の興奮性への影響. 生物物理 22, S 186

藁科 彬, 藤田省三 (1982) イソギンチャク毒により修飾された Na 不活性化過程の性質.
生物物理 22

古家園子, 古家喜四夫 (1982) 神経グリアハイブリッド細胞の興奮性獲得過程の解析. 解剖
学雑誌 57: 224

杉山博之, 山下幸子, 福本哲夫 (1982) シビレエイ・アセチルコリン受容体に対する単クロー
ン性抗体. 神経化学 21: 285-287

藤田省三, 山岸俊一 (1982) ザリガニ神経に対するイソギンチャク毒素の結合の性質とその
経時変化. 神経化学 21: 405-407

Sugiyama, H. and Yamashita, Y. (1983)
Synthesis and differentiation of acetylcholine receptors in cultured skeletal musc-
le cells. in "Muscular dystrophy; Biomedical aspects" S. Ebashi and E. Ozawa, eds.
(Japan Scientific Societies Press, Tokyo, and Springer-Verlag, Berlin, pp.109-117.

Warashina, A. & Fujita, S. (1983)
Effect of sea anemone toxins on the sodium inactivation process in crayfish axons, J.
Gen. Physiol. (in press)

Fujita, S., Warashina, A. & Satake, M. (1983)
Binding characteristics of a sea anemone toxin from *Parasicyonis actinostoloides* with
crayfish leg nerves, Comp. Biochem. Physiol. (in press)

杉山博之 (1983) アンテルコリン受容体の代謝回転. 蛋白質核酸酵素 28: 511-520.

《機能協関部門》

Watanabe, A. (1982). Change in optical activity of nerve fibers with excitation. J.
Physiol. Soc. Japan 44: 349.

Terakawa, S. and Watanabe, A. (1982). Electrical responses to mechanical stimulation of the membrane of squid giant axons. *Pflügers Arch* 395: 59.

渡辺 昭 (1982). 神経興奮に伴う旋光性変化, 生物物理 22: S188.

渡辺 昭 (1982). 興奮性膜生理学, 日本物理学会誌 37: 516.

Nakayama, T. and Terakawa, S. (1982) A rapid purification procedure for tetrodotoxin derivatives by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 126: 153.

寺川 進 (1982) 興奮性膜と膜下の線維性タンパク 膜 (Membrane) 7: 258.

Terakawa, S. (1982) Ca-K bi-ionic action potential in squid giant axons. *J. Physiol. Soc. Japan* 44: 353.

寺川 進 (1982) 興奮に伴う細胞内圧の変化, 生物物理 22: S188.

Terakawa, S. and Watanabe, A. (1982) Hyperpolarizing response in squid giant axons induced by stretching of the membrane. *J. Physiol. Soc. Japan* 44: 349.

《能 動 輸 送 部 門》

中尾 真 (1982) 細胞骨格序論, 日本医学会 11 月 22 日, シンポジウム細胞骨格 (オーガナイザー).

中尾 真 (1982) 油脂化学会講演; 天然界面活性剤と人工界面活性剤 11 月.

中尾 真 (1982) 細胞膜の構造と機能に関する研究の新動向. *化学と工業*, 12: 836~838.

浦山 修, 中尾 真 (1982) 細胞膜. 低温医学, (隅田幸男, 阿曾弘一編) 朝倉.

中尾 真 (1982) 細胞膜の認識機能と裏打構造. 人工細胞へのアプローチ (土田他編) 化学同人.

神部芳則, 佐藤真悟, 中尾 真 (1982) 赤血球 83: 531-542. 蛋白・核酸・酵素.

中尾 真 (1982) 細胞骨格, Medical Technology 11: 123-124.

中尾 真, 向畑恭男 (1982) 生体におけるエネルギー転換機構, 学術月報 35: 392-398.

M. Nakao, T. Nakao, Y. Komatsu, K. Sano and S. Sasakawa (1982) Isoosmotic sucrose adenine-inosine media for preservation of blood, Biomedica Biochim A.: 842.

T. Nakao, F. Nagai, M. Nakao (1982) Posttransfusion viability of rabbit erythrocytes preserved in a medium containing inosine, adenine, and isosmotic sucrose; Vox Sang. 42: 217-222.

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

Y. Jinbu, M. Nakao, M. Otsuka and S. Sato (1982), Two steps in ATP-dependent shape change of human erythrocyte ghost; Biochem. Biophys. Res. Commun in press.

《神 經 情 報 部 門》

Yang, X. L., Tauchi, M. & Kaneko, A. (1982) Quantitative analysis of photoreceptor inputs to external horizontal cells in the goldfish retina. Jpn J. Physiol. 32 (3): 399-420.

Kaneko, A. (1982) Coupling between horizontal cells of the carp retina revealed by dye-diffusion. Neuroscience, 7, Suppl.: S238.

Kaneko, A., Yang, X.L. & Tauchi, M. (1982) Interaction between signals converging onto L-type horizontal cells of the retina of the goldfish (*Carassius auratus*). Neurosci. Lett., Suppl. 9: S121.

Tauchi, M., Yang, X.L. & Kaneko, A. (1982) Identification of the types of photoreceptors onto L-type external horizontal cells in the goldfish retina. Neurosci. Lett., Suppl. 9: S121.

Kaneko, A., Yang, X.L. & Tauchi, M. (1982) Interaction between red-sensitive and green-sensitive cones in the goldfish retina: an observation made in L-type external horizontal cells. Biomed. Res., 3: 15-20.

Nishimura, Y., Shimai, K., Tauchi, M. & Kaneko, A. (1982) Some synaptic aspects of the outer plexiform layer in the carp retina. Biomed. Res., 3: 45-49.

Ohtsuka, T. & Kouyama, N. (1982) Rod input to luminosity-type horizontal cells in the turtle retina. Biomed. Res., 3: 1-7.

Nishimura, Y., Shimai, K., Tauchi, M. & Kaneko, A. (1982) Three-dimensional reconstruction of carp cone pedicles. Jpn J. Ophthalmol., 26: 85-86.

MacLeish, P., Tachibana, M. & Townes-Anderson, E. (1982) Morphological and electrophysiological properties of dissociated retinal neurons. In Advances in pharmacology and therapeutics II. Edited by Yoshida, H. Hagihara, Y. & Ebashi, S., Pergamon Press, Oxford and New York, 2: 245-253.

Ohtsuka, T. (1982) Response of rods and luminosity-type horizontal cells in dark-adapted turtle retina. Jpn J. Ophthalmol., 26: 126.

Ohtsuka, T. (1982) Isolation of rod-originating components in the response of luminosity-type horizontal cells in the retina of the turtle (*Chinemys reevesii*). J. Physiol. Soc. Japan, 44: 420.

Kouyama, N. & Ohtsuka, T. (1982) Interconnection between photoreceptors and luminosity-type horizontal cells in the retina of the turtle (*Chinemys reevesii*). J. Physiol. Soc. Japan, 44 : 419.

Yamada, M. & Tauchi, M. (1982) Oscillatory photoresponses of rods in the light-adapted bullfrog retina. Biomed. Res., 3 : 143-147.

Tanaka, I., Nakatani, K. & Tauchi, M. (1982) Spatial properties of photoresponse and dark noise in rods. Biomed. Res., 3 : 149-153.

Kretz, R., Ishida, A.T. & Stell, W.K. (1982) Ratfish retina intracellular recordings and HRP injections in an isolated, superfused all-rod retina. Vision Res., 22 : 857-861.

Ishida, A.T. (1982) Selective potentiation of retinal horizontal cell responses to L-glutamate by D-aspartate. Comp. Biochem. Physiol., 72C : 241-247.

Ishida, A.T. & Fain, G.L. (1982) D-aspartate potentiates the effects of L-glutamate on horizontal cells in goldfish retina. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (9) : 5890-5894.

Ishida, A.T. (1982) Potentiation of retinal horizontal cell responses to L-glutamate by D-aspartate. Biomed. Res., 3 : 35-39.

Ishida, A.T. (1982) Potentiation of horizontal cell responses to L-glutamate by D-aspartate. J. Physiol. Soc. Japan, 44 : 422.

Yang, X.L., Tauchi, M. & Kaneko, A. (1982) Effects of prolonged dark-adaptation on the sensitivity of L-type external horizontal cells. J. Physiol. Soc. Japan, 44 : 421.

Tauchi, M., Yang, X.L. & Kaneko, A. (1982) Inputs from red-sensitive cones to L-type external horizontal cells identified by chromatic adaptation. J. Physiol. Soc. Japan, 44 : 421.

Yamada, M., Tauchi, M. & Shigematsu, Y. (1982) Oscillatory photoresponses of rods

in light-adapted bullfrog retina. J. Physiol. Soc. Japan, 44 : 418.

Kouyama, N. & Ohtsuka, T. (1982) Rod and cone pathways to luminosity horizontal cells in the turtle retina. Proc. 4th Ann. Meeting Jpn. Soc. Gen. and Comp. Physiol. : 23.

金子章道 (1982) Lucifer yellow の拡散を利用した水平細胞間の結合様式の検討. 日本生理誌 44, 3 : 104.

金子章道 (1982) 細胞内記録からみた網膜細胞の電気現象. 日本眼科学会雑誌, 86 : 104.

立花政夫 (1982) 金魚網膜より単離した水平細胞の電気生理学的特性. 第 29 回生理学中部談話会予稿集 : 20.

《液 性 情 報 部 門》

浜 清 (1982) シナプスの構造, 現代化学 (1982) 11 月 : 36-41

細井 純, 浜 清 (1982) エネルギー・アナライザーによる培養細胞の厚みの測定, 組織培養 8(14) : 512-517.

Saito, K. & Hama, K. (1982) Structural Diversity of Microtubules in the Supporting Cells of the Sensory Epithelium of Guinea Pig Organ of Corti. J. Electron Microsc., 31 : 278-281.

Hirosawa, K. & Hama, K. (1982) High voltage electron microscope autradioigraphy II. A study of the resolution of Semithin sections. J. Electron Microsc., 31 : 405-409.

Kosaka, T. & Hama, K. (1982) Structure of the mitral cell in the olfactory bulb of the goldfish (*Carassius auratus*). J. Comp. Neurol., 212 : 365-384.

Kosaka, T. & Hama, K. (1983) Synaptic organization in the teleost olfactory bulb. J.

Physiol. Paris., (in press).

Kosaka, T. (1983) Gap junctions between nonpyramidal cell dendrites in the rat hippocampus (CA1 and CA3 regions). Brain Res., (in press).

Kosaka, T. (1983) Neuronal gap junctions in the polymorph layer of the rat dentate gyrus. Brain Res., (submitted).

《高次神経機構部門》

Tsukahara, N. (1982) Brain plasticity: the themes and case studies of neurobiophysics. Adv. Biophys. 15: 131-172.

Tsukahara, N., & Kawato, M. (1982) Dynamic and plastic properties of the brain stem neuronal networks as the possible neuronal basis of learning and memory. in Competition and Cooperation in Neural Nets, Eds. by Amari, S. and Arbib, M.A., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York: 430-441.

Tsukahara, N. (1982) Plasticity and specificity in the red nucleus. EEG. Suppl. No. 36, Kyoto symposium, Eds. by Buser, P.A., Cobb, W.A. and Okuma, T.: 153-157.

Kosar, E., Waters, R.S., Tsukahara, N. & Asanuma, H. (1982) Characteristics of projections to motor cortical neurons from VL abd area 2 of sensory cortex as studied by intracellular recording. Abstr. Soc. Neurosci. 8: 410.

Tsukahara, N., Kitayoshi, T., Nakamura, M. (1982) The analysis of synaptic plasticity using the red nucleus slice. Neuroscience Lett. Suppl. 9: s38.

Lichtman, J.W., Feng, T.P., Jansen, J.K.S., Katz, B., Martin, J.B., Muller, K.J., Nicholls, J.G., Raisman, G., Sanes, J.R., Schniter, J., Shooter, E.M., Thoenen, H., Tsukahara, N., & Wiesel, T. (1982) Factors involved in the restoration of specific neural connections. Repair and regeneration of the nervous system, Ed. by Nicholls,

J.G., Delem Konferenzen, Springer : 343-379.

Oda, Y., Kuwa, Y., Miyasaka, S. & Tsukahara, N. (1982) Modification of rubral unit activities associated with classical conditioning in the cat. J. Physiol Soc. Jap., 44 : 404

Taniguchi, I. & Saito, N. (1982) Plastic reorganization after transection of the commissure of the inferior colliculus. Proc. Japan Acad. 58 : 181-184.

Taniguchi, I., Niwa, H. & Suga, N. (1982) A possible mechanism for facilitation of FM-FM sensitive neurons in the auditory cortex of the mustached bat. (*Pteronotus parnellii rubiginosus*). Neurosci. Lett. Suppl. 9 : 116.

Katsumaru, H., Murakami, F. & Tsukahara, N. (1982) Actin filaments in dendritic spines of red nucleus neurons demonstrated by immunoferritin localization and heavy meromyosin binding. Biomed. Res. 3 : 337-340.

Murakami, F., Katsumaru, H. & Tsukahara, N. (1982) Formation of new corticorubral synapses in the cat following cross-innervation of flexor and extensor nerves : an electron microscopic study. J. Physiol. Soc. Japan 44 : 337.

Murakami, F., Katsumaru, H., Saito, K. & Tsukahara, N. (1982) A quantitative study of synaptic reorganization in red nucleus after lesion of the nucleus interpositus of the cat : an electron microscopic study involving intracellular injection of horseradish peroxidase. Brain Res. 242 : 41-53.

Kubota, M., Sakaguchi, H. & Tsukahara, N. (1982) A pharmacological study of cat red nucleus neurons using slice preparations. Neurosci. Lett. S9 : s85.

Bando, T., Yamamoto, N., Kakimoto, S. & Tsukahara, N. (1982) Antidromic activation of Clare-Bishop cortical neurons to lens accommodation from the thalamic lateral posterior nucleus and the dorsal midbrain. Neurosci. Lett. S9 : s11.

Bando, T., Yamamoto, N. Kakimoto, S. & Tsukahara, N. (1982) Further study on the Clare-Bishop cortical neurons related to lens accomodation. J. Physiol. Soc. Japan 44 : 387.

塚原仲晃 (1982) 脳の可塑性 解説講演。生物物理 22.

塚原仲晃 (1982) 神経発生の基礎 特集によせて。生体の科学 33 : 176.

小田洋一, 塚原仲晃 (1982) 中枢神経系の可塑性。臨床科学 18 (6) : 714-722.

塚原仲晃 (1982) 脳障害の機能回復のメカニズムについて。リハビリテーション医学 20 : 11-15.

塚原仲晃 (1982) 脳と記憶。現代思想 3 : 128-134.

塚原仲晃 (1982) 脳と記憶。電子通信学会誌 65 : 760-762.

塚原仲晃 (1982) コンファレンス・ディナー研究集会 脳と人間。生体の科学 33 : 243-244.

藤戸 裕, 村上富士夫, 塚原仲晃 (1982) 小脳中位核慢性破壊ネコにおける頭頂連合野一赤核および後索核一赤核シナプスの可塑性。日本生理学雑誌 44 : 206.

谷口郁雄, 丹羽英人, 菅乃武男 (1982) ヒゲコウモリ大脳皮質聴覚領における標的距離の情報処理。日本音響学会講演論文集 : 231-232.

丹羽英人, 菅乃武男, 谷口郁雄 (1982) ヒゲコウモリ大脳皮質聴覚領における wing beat 情報の表示。Audiology Japan 25 : 281-282.

村上富士夫, 勝丸博信, 塚原仲晃 (1982) 猫の赤核細胞の空間分布パターンと大脳皮質入力 of 分布について—HRP 細胞内注入による解析—。解剖学雑誌 57 : 210.

《高次神経性調節部門》

Trautwein, W., Taniguchi, J. & Noma, A. (1982) The effect of intracellular cyclic nucleotides and calcium on the action potential and acetylcholine response of isolated cardiac cells. *Pflügers Archiv.* 392 : 307-314.

Kokubun, S., Nishimura, M., Noma, A. & Irisawa, H. (1982) Membrane currents in the rabbit atrioventricular node cell. *Pflügers Archiv.* 393 : 15-22.

Kurachi, Y. (1982) The effects of intracellular protons on the electrical activity of single ventricular cells. *Pflügers Archiv.* 394 : 264-270.

Matsuda, H., Noma, A., Kurachi, Y. & Irisawa, H. (1982) Transient depolarization and spontaneous voltage fluctuations in isolated single cells from guinea pig ventricles. *Circulation Research.* Vol. 51 : 142-151.

Noma, A., Kokubun, S. & Taniguchi, J. (1981) Ionic mechanism underlying muscarinic acetylcholine response in the rabbit sinoatrial node. *J. Physiol., Paris*, 77 : 1073-1076.

Kameyama, M. (1982) Electrical coupling between ventricular paired cells isolated from guinea-pig heart. *J. Physiol.* 336 : 345-357.

Irisawa, H. & Noma, A. (1982) Pacemaker mechanism of rabbit sinoatrial node cells. Cardiac rate and rhythm. *Physiological, Morphological and Developmental Aspects.* Edited by Lennart N. Bouman and Habo J. Jongsma. *Developments in Cardiovascular Medicine* 17 : 35-51.

野間昭典, 谷口淳一, 入沢 宏, (1982) 細胞内注入法による単一心筋細胞電気活動の検討 : Ca 電流の ATP 依存性。第3回心臓, 血管平滑筋細胞の組織培養に関するセミナー(抜刷)。

倉智嘉久, 谷口淳一, 入沢 宏, (1982) 微量注入による心筋虚血時活動電位変化へのアプローチ。医学のあゆみ第 122 巻第 11 号 : 985-992.

入沢 宏, 野間昭典, 国分真一郎, (1982) ウサギ房室結節細胞の自発性活動。心臓 14 巻 4 号 : 566-577.

入沢 宏, (1982) 講座「虚血の基礎と臨床」各研究発表のまとめ。医学のあゆみ第 123 巻 第 6 号 : 682-684.

入沢 宏, (1982) 心臓の生理学 : 348, (岩波書店)

入沢 宏, (1983) 心筋細胞興奮のモデル, 病態生理, 2 (3) : 221-226, (永井書店)

《高次液性調節部門》

Oomura, Y., Shimizu, N., Miyahara, S. & Hattori, K. (1982) Chemosensitive neurons in the hypothalamus - Do they relate to feeding behavior? The Neural Basis of Feeding and Reward. Edited by B.G. Hoebel & D. Novin, Haer Institute for Electrophysiological Research : 551-566.

Aou, S., Oomura, Y. & Nakagawa, T. (1982) Neuronal activities of the monkey prefrontal cortex during motivated behavior and the effects of drugs. FUKUOKA ACTA MEDICA 73 : 308-327.

Aou, S., Oomura, Y., Nishino, H., Ono, T., Yamabe, K., Sikdar, S.K., Noda, T. and Inoue, M. (1983) Functional heterogeneity of single neuronal activity in the monkey dorsolateral prefrontal cortex. Brain Res. 260 : 121-124.

Aou, S., Oomura, Y., Nishino, H., Inoue, M., Inokuchi, A. & Mizuno, Y. (1982) Role of catecholamine in the monkey orbitofrontal cortex neurons during feeding behavior. J. Physiol. Soc. Japan. 44 : 379.

Inoue, M., Oomura, Y., Nishino, H. Aou, S., Sikdar, S.K., Hynes, M. & Katafuchi, T. (1982) Cholinergic mechanism in the monkey prefrontal cortex during operant feeding behavior. J. Physiol. Soc. Japan. 44 : 379.

Yoshimatsu, H., Aou, S., Katafuchi, T. & Oomura, Y. (1982) Neuronal activity of the hypothalamus during sexual behavior in the male monkey. J. Physiol. Soc. Japan. 44: 380.

Aou, S., Oomura, Y., Nishino, H. & Inoue, M. (1982) Motivational and noradrenergic modulation of neuronal activity in the monkey orbitofrontal cortex. Neurosci. lett. Abstr. Suppl. 9: 61.

Yoshimatsu, H., Aou, S. & Oomura, Y. (1982) Neuronal activity of the hypothalamus during sexual behavior in a male monkey. Neurosci. lett. Abstr. Suppl. 9: 67.

Oomura, Y., Nishino, H., Ono, T., Aou, S., Inoue, M., Yamabe, K., Sikdar, S.K., Hynes, M., Katafuchi, T., Mizuno, Y. & Inokuchi, A. (1982) Cholinergic and catecholaminergic mechanism in the monkey orbitofrontal cortex neurons during feeding behavior. Soc. Neurosci. Abstr. 8: 391.

大村 裕, 井之口昭 (1982) 摂食行動の中枢性制御—やせとの関係—, 医学と薬学 8: 7-16.

大村 裕, 服部希一 (1982) 食欲を物質レベルで考える—摂食行動の神経調節機構—現代化学: 54-59.

大村 裕, 吉松博信 (1982) 霊長類の性行動—その脳内メカニズム—科学: 714-722.

《組織培養標本室》

古家園子, 古家喜四夫, (1982) 神経グリアハイブリッド細胞の興奮性獲得過程の解析 解剖学雑誌 57: 224-225.

Furuya, S. & Furuya, K. (1982) Large membrane-particles increase with the development of excitability in neuroblastoma×glioma hybrid cells. J. Electron Microscopy 31: 304.

学 会 報 告

《神 經 化 学 部 門》

S. Ebashi : Calcium Ions as a Basis of Pharmacological Actions. 3rd Southeast Asian and Western Pacific Regional Meeting of Pharmacologists (1982. 5. Bangkok).

S. Ebashi : Muscle and Calcium, 5th International Congress on Neuromuscular Diseases. (1982. 9. Marseille).

S. Ebashi : Ca Ion in Physiology. 75th Annual Meeting of Formosan Medical Association. (1982. 11. Taipei).

S. Ebashi : Diversity of Calcium Regulation Mechanism in Contractile Systems. XI th NIBB Conference. (1983. 3. Okazaki, 日米セミナー).

江橋節郎 カルシウムイオンと生命現象 第55回日本生化学会招待講演 (1982・10・大阪).

江橋節郎 脳と筋肉—無機イオンを回って, 東京都神経科学総合研創立10周年記念講演会 神経科学の今日の問題 (1982・5・東京).

江橋節郎 筋収縮のメカニズム, 高分子学会群馬地区特別講演会 (1982・11・群馬大学工学部, 桐生).

江橋節郎 Caによる生体制御と薬理学 第56回日本薬理学会総会 (1983・3・大阪).

広瀬宣郎, 大室弘美, 三川 隆 ショウジョウバエ・ミオシンの解析生物物理 (1982・10・大阪).

江橋節郎 カルシウムと筋収縮 東京医学会 (1983・3・東京).

《超微小形態生理部門》

村上政隆, 今井雄介, 瀬尾芳輝, 亘 弘 (1982) 灌流イヌ顎下腺の ^{31}P -NMR 測定. 第 63 回 近畿生理学談話会 (大阪), 日本生理誌 44 (5): 210.

亘 弘, 志賀 潔, 二科安三, 市川 修, 池田明聡 (1982) 一酸化炭素ヘモグロビン光解離後のスペクトル. 昭和 57 年度日本分光学会春季講演会, (東京), 同講演要旨集: 57.

Watari, H. & Shimoyama, Y. (1982) Studies on oriented multibilayer lipid membranes by saturation transfer ESR. 第 59 回 日本生理学会大会 (東京) J. physiol. Soc. Japan 44 (8,9): 311-311.

Sogami, M., Nagaoka, S., Inoue, H., Era, S., Watari, H., Shiga, K. & Akasaka, K. (1982) High resolution ^1H NMR studies on the N-F transition of bovine plasma albumin in 0.10 M NaCl. 第 59 回 日本生理学会大会 (東京) J. Physiol. Soc. Japan 44 (8, 9): 312-312.

Nishina, Y., Shiga, K., Watari H., Tojo, H., Yamano, T. & Miura, R. (1982) The structures of the charge transfer complexes in the flavoenzyme D-amino acid oxidase 第 59 回 日本生理学会大会 (東京) J. Physiol. Soc. Japan 44 (8, 9): 314-314.

Murakami, M., Imai, Y., Seo, Y. and Watari, H. (1982) Assays of phosphorus compounds in perfused salivary gland by ^{31}P -NMR. 第 59 回 日本生理学会大会 (東京) J. Physiol. Soc. Japan 44 (8, 9): 334-344.

下山雄平, 亘 弘 (1982, 10) 飽和移動 ESR 法による配向脂質膜の物性. 第 20 回 日本生物物理学会年会 (大阪) 生物物理 22: S 43.

亘 弘, 志賀 潔, 二科安三 (1982, 10) 一酸化炭素ヘモグロビン光解離の温度依存性. 生物物理 第 20 回 日本生物物理学会年会 (大阪) 22: S 102.

瀬尾芳輝, 吉崎和男, 森本武利, 村上政隆, 亘 弘 (1982, 10) ^{31}P -NMR 法による pH

測定の問題点。第 20 回 日本生物物理学会年会（大阪）生物物理 22：S 95.

長岡俊治, 恵良聖一, 井上 洋, 曾我美 勝, 亘 弘, 志賀 潔, 赤坂一之 (1982, 10) ^1H -NMR によるアルブミン構造転移の研究。第 20 回 日本生物物理学会年会(大阪)22：S 175.

吉崎和男, 瀬尾芳輝, 西川弘恭, 森本武利, 亘 弘 (1982, 10) カエル筋肉の ^{13}C NMR スペクトル。第 20 回 日本生物物理学会年会（大阪）生物物理 22：S 202.

村上政隆, 瀬尾芳輝, 亘 弘, 中張隆司, 今井雄介 (1982, 10) 灌流イヌ顎下腺の ^{31}P -NMR の測定。第 20 回 日本生物物理学会年会（大阪），生物物理 22：S 215.

二科安三, 志賀 潔, 亘 弘, 三浦 洸, 三宅可浩, 東城博雅, 山野俊雄 (1982, 10) D-アミノ酸酸化酵素の Purple Intermediates の共鳴ラマン分光法による研究。第 55 回 日本生化学会（大阪），生化学 54 (8)：916.

村上政隆, 今井雄介, 瀬尾芳輝, 森本武利, 亘 弘 (1982, 10) 灌流唾液腺の ^{31}P -NMR 測定。第 21 回 NMR 討論会（名古屋），同講演要旨集：145-148.

吉崎和男, 瀬尾芳輝, 西川弘恭, 森本武利, 亘 弘 (1982, 10) 生体同一組織筋肉における ^{31}P , ^1H および ^{13}C -NMR スペクトル。第 21 回 NMR 討論会(名古屋), 同講演要旨集：153-156.

亘 弘, 肥塚 泉, 高田宗春, 矢内原 昇, 永山国昭 (1982) CCK-PZ オクタペプチドの 360 プロトン NMR。第 21 回 NMR 討論会（名古屋），同講演要旨集：157-160.

亘 弘, 高田宗春, 肥塚 泉, 志賀 潔, 二科安三, 成瀬昭二 (1982, 10) TMR による生体試料の測定。第 21 回 NMR 討論会（名古屋），同講演要旨集：161-164.

瀬尾芳輝, 吉崎和男, 西川弘恭, 森本武利, 村上政隆, 今井雄介, 亘 弘 (1982, 10) リン酸イオンの解離平衡におよぼす各種イオンの影響。第 21 回 NMR 討論会(名古屋), 同講演要旨集：165-167.

下山雄平, 亘 弘 (1982, 10) 飽和移動 ESR 法による生体膜の動的構造。第 21 回 ESR 討論会 (筑波), 同講演要旨集: 19-20.

亘 弘, 志賀 潔, 村上政隆, 今井雄介, 瀬尾芳輝, 森本武利 (1982, 10) NMR による唾液分泌機構の研究。第 29 回 生理学中部談話会 (浜松), 同予稿集: 11.

《細胞内代謝部門》

日置善雄, 星野 稔, 佐藤晴子, 矢内原昇, 大軽靖彦, 矢内原千鶴子. 神経芽細胞腫培養細胞系 (NB-OK-1) における VIP の生合成とその放出。日本薬学会第 102 年会 (昭和 57 年 4 月 3 日~5 日).

松本智明, 望月 徹, 矢内原千鶴子, 神村 匡, 矢内原昇. 臍灌流法によるアルギニン刺激放出グルカゴンの分子型。日本薬学会第 102 年会 (昭和 57 年 4 月 3 日~5 日).

Noboru Yanaihara, Minoru Hoshino, Yoshio Hioki, Toshimitsu Suzuki, Haruko Sato, Yasuhiko Okaru and Chizuko Yanaihara. Production and release of VIP-like immunoreactivity in a human neuroblastoma cell line in the presence of $(\text{But})_2$ cAMP. The 7th World Congress of Gastroenterology (Stockholm, June 14-19, 1982).

星野 稔, 矢内原昇, 日置善雄, 荻野晃一, 矢内原千鶴子, 岡本 宏. ヒト神経芽細胞腫培養細胞における VIP の生合成。第 55 回日本生化学会大会 (昭和 57 年 10 月 10 日~13 日).

松林 直, 岩原邦宏, 山本栄仁, 合瀬友季子, 矢内原千鶴子, 勝丸由美子, 矢内原昇. 体液中ならびに組織内 Substance P 免疫活性について。第 55 回日本生化学会大会 (昭和 57 年 10 月 10 日~13 日).

島崎英樹, 星野 稔, 矢内原昇, 岩原邦宏, 井口和明, 矢内原千鶴子, 上野敏男, 竹田亮裕. ラット胃灌流における GRP の放出動態。第 24 回日本消化器病学会 (昭和 57 年 10 月 14 日~16 日).

望月 徹, 山本栄仁, 樫本和久, 田中昌子, 小林浩幸, 井上 実, 矢内原千鶴子, 勝丸由美子, K. Tatemoto, V. Mutt, 矢内原昇. Peptide YY (PYY) の液相法と固相法による合成と同定。第 20 回ペプチド化学討論会 (昭和 57 年 10 月 25 日~27 日)。

日置善雄, 星野 稔, 荻野晃一, 矢内原千鶴子, 佐藤晴子, 矢内原昇。ヒト神経芽細胞腫培養細胞中の VIP について。第 20 回ペプチド化学討論会 (昭和 57 年 10 月 25 日~27 日)。

松林 直, 合瀬友季子, 岩原邦宏, 山本栄仁, 矢内原千鶴子, 島崎英樹, 勝丸由美子, 矢内原昇。体液ならび組織内 Substance P 免疫活性について。第 9 回神経内分泌分科会 (昭和 57 年 10 月 27 日)。

星野 稔, 日置善雄, 佐藤晴子, 鈴木利光, 矢内原昇, 荻野晃一, 矢内原千鶴子。神経芽細胞腫培養細胞において産生・放出される VIP 免疫活性成分について。第 6 回神経科学学会 (昭和 58 年 1 月 18 日~19 日)。

島崎英樹, 星野 稔, 矢内原昇, 望月 徹, 岩原邦宏, 矢内原千鶴子。ガストリン放出ペプチド (GRP) とガストリンの放出動態。第 6 回神経科学学会 (昭和 58 年 1 月 18 日~19 日)。

《生 体 膜 部 門》

福本哲夫, 内藤真明, 木村広光, 杉山博之「ラットの肝細胞に対する単クローン抗体, 特にリンパ球と交叉反応をする抗体について」日本免疫学会総会 (1981. 12. 東京) 抄録集 11: 607-608.

藁科 彬, 藤田省三「イソギンチャク毒素による Na 電流不活性化過程の阻害」第 59 回 日本生理学会 (1982. 3. 東京)。

古家園子, 古家喜四夫「神経グリアハイブリッド細胞の興奮性獲得過程の解析」第 78 回 日本解剖学会総会 (1982. 4. 岐阜)。

古家園子, 古家喜四夫「神経グリアハイブリッド細胞の興奮と膜内粒子」日本電顕学会 第 38 回講演会 (1982. 5. 東京).

平野 寛, 西山文朗, 福田 稔, 馬場幸枝, 山岸俊一, 古家喜四夫「ヤリイカ神経膜内表面の走査像一カチオン化フェリチン分布の検討」日本電顕学会 第 38 回講演会 (1982. 5. 東京).

福本哲夫, 山下 昭, 杉山博之「ラット肝細胞の膜表面抗原の単クローン性抗体による解析 (第二報)」日本生化学会大会 (1982. 10. 大阪).

浦山 修, 中尾 真, 杉山博之, 山岸俊一「脳 Na, K-ATpass の二型」日本生化学会大会 (1982. 10. 大阪).

藁科 彬, 藤田省三「イソギンチャク毒により修飾された Na 不活性化過程の性質」第 20 回日本生物物理学会年会 (1982. 10. 大阪).

山岸俊一, 古家喜四夫「神経膜電流に対する細胞内 Ca その他 2 価イオンの作用」日本生物物理学会第 20 回年会 (1982. 10. 大阪).

古家喜四夫, 山岸俊一「イカ巨大神経線維膜内表面に結合した荷電ポリアミノ酸の興奮性への影響」日本生物物理学会第 20 回年会 (1982. 10. 大阪).

杉山博之, 山下幸子, 福本哲夫「シビレエイ・アセチルコリン受容体に対する単クローン性抗体」第 25 回日本神経化学会 (1982. 11. 東京).

藤田省三, 山岸俊一「ザリガニ神経に対するイソギンチャク毒結合の性質とその経時変化」第 25 回日本神経化学会 (1982. 11. 東京).

《機能協関部門》

渡辺 昭「神経興奮に伴う旋光性変化」第 20 回 生物物理学会大会 (1982. 10. 大阪).

寺川 進「興奮に伴う細胞内圧の変化」第 20 回 生物物理学会大会 (1982. 10. 大阪).

寺川 進「Ca-K 双イオン性活動電位 第 59 回 日本生理学会大会 (1982. 3. 東京).

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

寺川 進, 渡辺 昭「イカ巨大神経の興奮に伴う細胞内圧変化」文部省科研費総合 A「興奮チャネルの動態と膜構築」班会議 (1982. 9. 箱根).

渡辺 昭「興奮チャネルの動態の光学的方法による検出」文部省科研費総合 A「生体膜分子の運動と機能に関する光学的研究」班会議. (1982. 12. 東京).

《能 動 輸 送 部 門》

神部芳則, 中尾 真, 佐藤眞悟, 大塚美恵子, 月田早智子, 石川春律 (1983) 赤血球裏打ち構造の ATP による変性; 生体エネルギー研究会第 8 回: 69~70.

中尾 真, 中尾順子, 大野知子, 前木吾市, 石川春律 (1983) 活性を有する馬腎 NaK-ATPase のサブユニット構造; 生体エネルギー研究会第 8 回: 126~127.

神部芳則, 佐藤眞悟, 中尾 真 (1983) ヒト赤血球 ghost 及び Triton Shell の ATP による形態変化; 生化学 54: 728

佐藤眞悟, 神部芳則, 中尾 真 (1982) ヒト赤血球のスペクトリンリン酸化酸素について; 生化学, 54: 729.

完倉孝子, 小林定喜, 中尾 真 (1982) ラット尿中 cAMP 及び cGMP 量に対する X 線全身照射の影響; 生化学 54: 786.

佐野紀代子, 金森きよこ, 中尾 真 (1982) Coomassie Brilliant Blue G 250 を用いた微量蛋白定量の自動化法の開発; 生化学 54: 857.

中尾順子, 大野知子, 佐藤かな子, 中尾 真 (1982) 低角レーザー光散乱計と G-4000 SW による Na^+ , K^+ -ATPase の分子量; 生化学 54: 951 (1982).

浦山 修, 中尾 真, 杉山博之, 山岸博之, 山岸俊一 (1982) 脳 Na, K-ATPase の二型 ; 生化学 54 : 950.

中尾 真 ; 赤血球形態変化と細胞骨格, 第 66 回日本医学会シンポジウム (2 月 15 日東京, 1983).

太田英彦 ; 種々の組織からの Na^+ , K^+-Na^+ , K^+-ATPase の簡易部分精製法。日本生化学会 第 55 回大会 生化学 54 (8) : 950

太田英彦 ; Na^+ , K^+-ATPase のトリニトロベンゼンスルホン核 (TNBS) による阻害。生体エネルギー研究会 第 8 回討論会 : 167-168

《神 經 情 報 部 門》

Kaneko, A. "Structure and function of retinal neurons" The First World Congress of the International Brain Research Organization. (1982. 3. Lausanne).

Kaneko, A. "Structure and Function of Retinal Interneurons." Thirteenth Symposium of the Center for Visual Science. Relating physiology to morphology in the visual system. (1982. 6. Rochester. N. Y., USA).

金子章道 「細胞内記録からみた網膜細胞の電気現象」 第 86 回日本眼科学会総会 (1982. 5. 京都).

神山暢夫, 大塚輝彌 「カメ網膜 L 型水平細胞と視細胞のシナプス結合」 第 59 回日本生理学会大会 (1982. 3. 横浜).

大塚輝彌 「カメ網膜の L 型水平細胞の応答」 第 59 回日本生理学会大会 (1982. 3. 横浜).

田内雑規, 楊 雄里, 金子章道 「L 型外水平細胞の脱分極性応答について」 第 59 回日本生理学会大会 (1982. 3. 横浜).

楊 雄里, 田内雅規, 金子章道「暗順応に伴なう L 型外水平細胞の感度変化」第 59 回日本生理学会大会 (1982. 3. 横浜).

Tachibana, M. "Ionic currents of retinal horizontal cells" The Fifth Symposium. Retinal Neurocircuitry with Special Reference to Cellular Interaction. The Taniguchi Foundation International Symposia on Visual Science. (1982. 11. Katata).

Ishida, A.T. "Responses of solitary horizontal cells to putative neurotransmitters with special reference to L-glutamate" The Fifth Symposim. Retinal Neurocircuitry with Special Reference to Cellular Interaction. The Taniguchi Foundation International Symposia on Visual Science. (1982. 11. Katata).

Kouyama, N. and Ohtsuka, T. "Rod and cone pathways to luminosity horizontal cells in the turtle retina."第 4 回 日本動物生理学会 (1982. 8.中津川).

立花政夫「キンギョ網膜より単離された水平細胞のイオン電流」;第 6 回神経科学学術集会 (1983. 1. 京都).

Ishida, A.T., 金子章道, 立花政夫「キンギョ網膜から単離培養した水平細胞に対する L-グルタミン酸の作用」;第 6 回神経科学学術集会 (1983. 1. 京都).

《液 性 情 報 部 門》

広沢一成, 浜 清, ワニ網膜の微細構造;第 87 回 日本解剖学会総会 (1982. 4. 岐阜).

斉藤宏学, 浜 清, モルモット・コルチ器有毛細胞シナプスの微細構造;第 87 回 日本解剖学会総会 (1982. 4. 岐阜).

Saito, K. & Hama, K. Cell junction between type I hair cells and calyx type of nerve endings in the vestibular sensory epithelium of guinea-pig inner ear. The Thirty-eighth annual Meeting of the Japanese Society of Electron Microscopy (1982. 5. Tokyo).

Kosaka, T. & Hama, K. Synaptic organization in the teleost olfactory bulb. Gif 7th Conference in Neurobiology. (1982. 10. France).

《高次神経機構部門》

Tsukahara, N. "Sprouting and the neuronal basis of learning." Society for Neuroscience annual Meeting, Special Lecture, 1982.

塚原仲晃「脳の可塑性」 生物物理夏の学校, 1982.

丹羽英人, 菅乃武男, 谷口郁雄「ヒゲコウモリ大脳皮質聴覚領における wing beat 情報の表示」第27回 日本オージオロジー学会, (1982, 10. 東京).

村上富士夫「神経系の可塑性と学習の素過程」動物学会—神経系の発生遺伝学シンポジウム, (1982, 11. 東京).

川人光男, 塚原仲晃「シナプス可塑性の機構としての樹状突起棘の形態変化」第6回 神経科学学術集会, (1983, 1. 京都).

窪田道典, 坂口博信, 塚原仲晃「ネコ赤核領域からの GABA の放出」第6回 神経科学学術集会, (1983, 1. 京都).

谷口郁雄「キクガシラコウモリの発声と聴覚の連関」第6回 神経科学学術集会, (1983, 1. 京都).

《高次神経性調節部門》

亀山正樹, 入沢 宏。「解離心筋細胞の電気的結合」第59回 日本生理学会大会, (1982, 3. 横浜).

入沢 宏, 倉智嘉久, 野間昭典「家兔房室結筋細胞塊への Na 塩注入の効果」第59回 日

本生理学会大会。(1982, 3. 横浜).

谷口淳一, 野間昭典, 入沢 宏「心筋の膜興奮性に対する細胞内 ATP の影響」第 59 回 日本生理学会大会。(1982, 3. 横浜).

倉智嘉久, 野間昭典, 入沢 宏「単一心筋細胞電気活動への細胞内 pH の影響」第 59 回 日本生理学会大会。(1982, 3. 横浜).

国分真一郎, 入沢 宏「単一心室筋緩徐内向き電流と細胞内カルシウムイオン」第 59 回 日本生理学会大会。(1982, 3. 横浜).

松田博子, 野間昭典, 倉智嘉久, 入沢 宏「単一心室筋細胞における一過性脱分極と微小電位変動」第 59 回 日本生理学会大会。(1982, 3. 横浜).

入沢 宏「歩調取り機転—ペースメーカー細胞に関する最近の知見」ペースメーカー学会。(1982, 5. 長崎).

野間昭典, 入沢 宏「心筋ペースメーカー電位に関与する膜電流系」第 29 回 生理学中部談話会。(1982, 10. 浜松).

入沢 宏, 野間昭典, 国分真一郎「分離心筋細胞内の ATP 濃度と活動電位」第 6 回 神経科学学術集会。(1983, 1. 京都).

亀山正樹, 清末達人, 副島道正, 野間昭典「分離心室筋細胞の Inward Rectifier Channel」第 6 回 神経科学学術集会。(1983, 1. 京都).

野坂昭一郎, 村田敬子, 入沢 宏「食用蛙における迷走神経心臓枝起始細胞の延髄内分布様式」第 6 回 神経科学学術集会。(1983, 1. 京都).

中山敏夫, 倉智嘉久, 野間昭典, 入沢 宏「遊離単一ペースメーカー細胞の自動能」日本循環器学会総会。(1983, 4. 大阪).

亀山正樹, 清末達人, 副島道正, 野間昭典, 入沢 宏「分離心筋細胞の内向き整流 K チャ

ネル」第 60 回 日本生理学会大会。(1983, 4. 大阪).

清末達人, 副島道正, 野間昭典, 入沢 宏「心筋各部の内向き整流 K チャネル」第 60 回 日本生理学会大会。(1983, 4. 大阪).

加計正文, 野間昭典, 入沢 宏「ウサギ房室結節細胞の外向き K 電流のパッチクランプ法による検討」第 60 回 日本生理学会大会。(1983, 4. 大阪).

野間昭典, 副島道正「心筋 Ach 依存性 K チャネルのパッチ電極内灌流法による解析」第 60 回 日本生理学会大会。(1983, 4. 大阪).

《高次液性調節部門》

栗生修司, 大村 裕, 西野仁雄, 井上真澄「サル前頭眼窩野ニューロンにおけるアセチルコリンの役割」第 29 回 生理学中部談話会。(1982, 10. 浜松).

山本智矢, 大村 裕, 栗生修司, 中野保彦, 古賀友行, 根本清次「サル前頭眼窩野の情動行動時のニューロン活動」第 29 回 生理学中部談話会。(1982, 10. 浜松).

中野保彦, 大村 裕, 西野仁雄, 栗生修司, 南 武嗣, 三崎久好「サル前頭眼窩野のブドウ糖負荷および満腹時のニューロン活動」第 29 回 生理学中部談話会。(1982, 10. 浜松).

栗生修司, 大村 裕, 西野仁雄, László Lénárd, 南 武嗣, 三崎久好, 井之口昭「オペラント摂食行動時のサル視床下部ニューロン活動と関連する生理活性物質」第 6 回 神経科学学術集会。(1983, 1. 京都).

古賀知行, 宮澤多恵子, 石川友衛, 栗生修司, 大村 裕, 西野仁雄「サル前頭眼窩野ニューロン活動の消去操作による変化」第 6 回 神経科学学術集会。(1983, 1. 京都).

中野保彦, 大村 裕, 西野仁雄, 栗生修司, 山本智矢, 根本清次「内的及び外的環境に対応するサル前頭眼窩野ニューロン活動の長時間変化」第 6 回 神経科学学術集会。(1983, 1. 京都).

栗生修司, 大村 裕, 西野仁雄, 井上真澄, 中野保彦「自律系下位中枢による前頭前野の機能的調節機構」第 60 回 生理学会大会. (1983, 4. 大阪).

大村 裕, 西野仁雄, 栗生修司, 南 武嗣, 三崎久好, László Lénárd「サル視床下部化学感受性ニューロンの摂食行動時の活動様式」第 60 回 生理学会大会. (1983, 4. 大阪).

堀 哲郎, 清原寿一, 大村 裕, 西野仁雄, 栗生修司「体温調節行動及び摂食行動時のサル眼窩前頭野ニューロンの活動」第 60 回 生理学会大会. (1983, 4. 大阪).

山本智矢, 大村 裕, 西野仁雄, 栗生修司, 中野保彦, 根本清次「情動行動時のサル前頭眼窩野ニューロンの活動様式について」第 60 回 生理学会大会. (1983, 4. 大阪).

栗生修司, 大村 裕, 西野仁雄, 南 武嗣, 三崎久好, László Lénárd「サル摂食中枢グルコース感受性ニューロンの摂食行動時の活動とその調節物質」第 3 回 肥満研究会. (1982, 12. 東京).

《超高圧電子顕微鏡室》

松田 強, 有井達夫, 遠藤潤二, 長我部信行, 外村 彰「走磁性細菌の電子顕微鏡的観察」日本物理学会第 38 回年会. (1983, 3. 東京).

《組織培養標本室》

古家園子, 古家喜四夫, 「神経グリアハイブリッド細胞の興奮性獲得過程の解析」第 87 回 日本解剖学会. (1982, 4, 岐阜).

古家園子, 古家喜四夫, 「神経グリアハイブリッド細胞の興奮と膜内粒子」第 38 回 日本電子顕微鏡学会. (1982, 5. 東京).

《動物実験施設》

稲田和久, 尾崎 毅, 津島由彦「岡崎国立共同研究機構(生理学研究所基礎生物学研究所)における水生動物飼育室の概要と諸問題について」日本実験動物技術者協会 第16回大会。(1982, 4. 札幌).

小野 哲, 和田 攻, 内菌耕二, 山岸俊一, 尾崎 毅「亜鉛の生理的意義に関する研究(IV) 海馬の染色亜鉛結合物について」日本衛生学会大会。(1983, 4. 大阪).

心筋内高エネルギー磷酸の代謝に関する研究

井上 通敏 (大阪大学・医)・亘 弘・入沢 宏 (生理研)
 楠岡 英雄 (大阪大学・工)・常岡 豊 (大阪大学・医)

磷 31 核磁気共鳴法 (^{31}P -NMR) は、生体内の磷化合物の非破壊的かつ連続的な測定法である。本研究は、摘出灌流心での高エネルギー磷酸動態を ^{31}P -NMR を用いて観測し、灌流液の酸素運搬能が、虚血とその回復過程における心筋内エネルギー代謝に及ぼす影響について検討を行った。



図1 虚血によるラット摘出灌流心の ^{31}P -NMR スペクトルの変化。(KH液灌流時)

データは45秒毎に連続して収集している。No.7は対照時である。No.8より灌流を停止し、虚血状態にしている。この時、クレアチン磷酸(CP)は減少・消失し、無機磷酸(Pi)は増加するとともに、そのピークはCP側へシフトし、細胞内アシドーシスを認める。No.19は虚血9分時のスペクトルである。No.20より灌流を再開したが、CP, Piいずれも速やかに対照時の状態に回復している。

心標本は、体重180~200gのwister種雄性ラットより摘出した心臓に、大動脈より逆行性にカニューレを挿入し、Langendorff式に作製した。灌流液は、通常用いられる電解質であるKrebs-Henseleit変法液(KH液)と、その2倍の酸素運搬能を有する人工血液FC-43(ミドリ十字社製)を用いた。いずれも、 O_2 95%、 CO_2 5%混合ガスにて酸素化し、灌流圧は100 cmH₂Oを保った。灌流心標本は、外径15 mmのNMR試料管に納め、NMRスペクトル測定を行った。この時、心標本より流出した灌流液をポンプにて吸引し、冠灌流量として30秒毎に測定した。NMR測定には、Bruker社製WM 360を使用し、自由誘導減衰信号(FID)収集時間0.085秒で512回のFIDを加算して1データとした。したがって、1データあたりの収集時間は約44秒である。

この系を用い、虚血が心筋内高エネルギー磷酸動態に及ぼす影響について、KH 液灌流時と FC-43 灌流時とで比較した。ラット摘出心の灌流を 9 分間停止し虚血状態とし、その後灌流を再開して虚血からの回復をはかった。その結果、対照時における心筋内のクレアチン磷酸 (CP) と無機磷酸 (Pi) の量には両灌流液間には差を認めなかった。虚血状態にすると、いずれの灌流液を用いても、CP 量の減少と Pi 量の増加、ならびに、細胞内 pH の低下が認められたが、その進行過程は、FC 群では、KH 群に比し遅れる傾向にあった。再灌流により、CP 量、Pi 量、細胞内 pH は速かに対照時のレベルに回復したが、その回復過程は両群間に差を認めなかった。また、心筋内の ATP 量には、対照時、虚血時、虚血回復時を通じて、著明な変化を認めなかった。

対照時の平均冠灌流量は、FC 群では 2.68 ml/分/g 心重量と KH 群 (5.68 ml/分/g 心重量) の 47%を示した。虚血回復時には、いずれの群においても一過性の反応性充血によると考えられる冠灌流量の増加が観察されたが、その最大冠灌流量増加率(虚血回復時の最大冠灌流量) / (対照時の冠灌流量) $\times 100$ (%) は、FC 群 (193%) と KH 群 (186%) とで差を認めなかった。すなわち、冠灌流量は FC 群では常に KH 群の約 50%を示したが、これは FC-43 が血液とはほぼ同様の、電解質液の約 2 倍の酸素運搬能を有するためと考えられる。

以上の結果より、灌流液の酸素運搬能は、対照時、ならびに虚血からの回復過程における心筋内高エネルギー磷酸動態には差を生じせしめないが、虚血の進行過程には影響を及ぼすことが示唆された。

現在、摘出灌流心の NMR 測定と同時に左室内圧の測定が可能となっており、今後、心筋内エネルギー動態と心筋の機能的仕事との関連について検討を加えていく予定である。

文献

- 1) 楠岡英雄, 常岡 豊, 井上通敏, 阿部 裕, 亘 弘 (1982) 燐核磁気共鳴法 (^{31}P -NMR) による心筋内高エネルギー磷酸動態の解析, NMR 医学 2 (1): 41-54。

生 体 膜 の 流 動 性 と 機 能

— 磁気共鳴法による解析 —

下山 雄平 (北海道教育大・物理)

亘 弘 (生理研)

飽和移動 ESR 法 (Saturation Transfer ESR: ST-ESR) は、安定な常磁性分子をスピ

ラベルとして生体膜に挿入し、ラベルの位相おくれスペクトル成分の解析より、比較的ゆっくりしたゆらぎを検出する手段として、生体膜の動的構造の解明に広く応用されている⁽¹⁾。生体膜中の脂質分子や膜内在性蛋白質の運動は 10^{-7} sec よりも遅く、通常の ESR スペクトルは粉末と同様のものが得られる。ST-ESR 法は、この粉末スペクトル中のスピンの飽和移動を観測することにより、遅い分子運動の強度とその相関時間を決定する手法を与える。本研究では合成磷脂質の dipalmitoyl lecithin (DPL) と dimyristoyl lecithin (DML) の配向膜を作製し、膜中に少量挿入したスピンラベルの第二次高調波吸収スペクトルの 90° 位相おくれ成分 (V_2') を観測することにより、脂質膜の相転移にともなうゆらぎの解析を行った。膜中に多く含まれる中性脂質のコレステロールの生体膜に対する効果についても、十分遅い time scale にて解析を行った。さらに V_2' の積分強度が分子運動の特定時に対する精度のよい測度として用いることができる事実が見出されたので、これについても応用を含めて報告する。

DPL と DML の各々に 3-spiro-deoxyl-5 α -cholestane (CSL) をスピンラベルとして 0.5 Mol% で挿入し、湿った N_2 gas 雰囲気中でガラス面上に配向積層膜を調整する。このような配向膜の V_2' スペクトルは膜面と外部磁場のなす角度に依存して、その線型が変化する⁽²⁾。平行 ($\parallel$) と垂直 ($\perp$) の二方向について $-40^\circ\text{C} \sim +60^\circ\text{C}$ の温度域の測定を行った。 V_2' のスペクトルは 12 bit AD converter にて digitize され、同時に 0.1 Gauss の精度にて数値積分を行い、積分強度 $I_\parallel$, $I_\perp$ が求められた。コレステロール添加膜についても同様に測定を行った。

配向脂質膜の各温度における超微細分離 (hfs) 巾は、gel-液晶相転移にともない急激な変化を示す⁽²⁾。スピンラベルである CSL の hfs テンソルの異方性より、脂質分子は膜面に垂直に配向していることがわかる。又 hfs の角度変化より、コレステロールを含まない膜の pretransition 以下の温度域での脂質分子の傾斜角をも評価することが可能である。Fig. 1 は DML 配向膜における V_2' の積分強度の温度変化である。これより、 25° 付近の main transition と 18° 付近の pretransition が観測できた。一方、 V_2' スペクトルの $m_1 = +1$ と $m_1 = -1$ シグナルの変曲点近傍の高さ比より、液晶相では $10^{-6} \sim 10^{-8}$ sec, ゲル相では、 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ sec と、それぞれのゆらぎの相関時間が決定された。分子運動のゆらぎが 10^{-3} sec に近くなると、 V_2' スペクトルは吸収スペクトル (第 0 次高調波: V_0) に近似が可能である。他方、運動がはげしく、 10^{-7} sec になると V_2' は 2 次微形の線型をとる⁽³⁾。このことは V_2' の積分強度はスペクトル拡散の大きさ、すなわち分子運動の相関時間に逆比例する物理量となるはずである。Fig. 1 の B と C 図にみられる如く、積分強度はゲル相の低温域と液晶相において一致する傾向をもつ。しかし、中間領域のゲル相では平行と垂直方向に顕著な差が認められる。これは分子運動が異方的であり、しかもそのゆらぎの相関時間にも違いが

INTEGRATED AREA

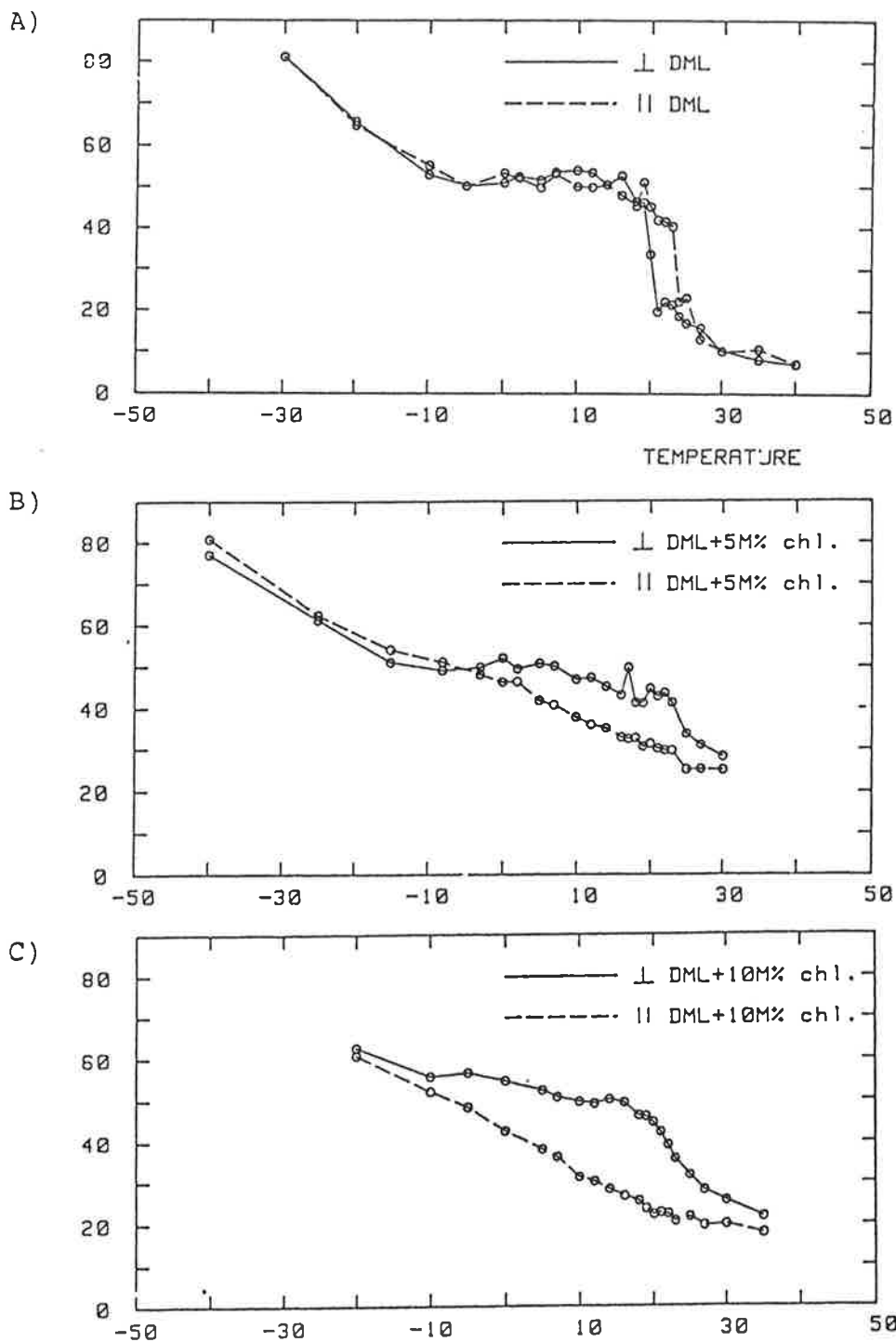


Fig. 1 Temperature variations of integrated area of V_2' display from CSL incorporated in DML films containing cholesterol.

あることが示されている。Fig. 1 の B と C はコレステロールを添加することによる異方性の変化であるが、一方 A のコレステロールを含まないときには、ゲル相における異方性は顕著でなくなる。これから、コレステロールの配向効果⁽²⁾が相関時間にも影響することが明確になった。さらに垂直成分スペクトルの I の温度変化より、回転運動の活性化エネルギーについても知見が得られた。以上より生体膜のゆらぎにともなう流動性が精密に議論でき、生体膜の機能についての基礎的知見が得られた。

文献

- 1) D. Thomas et. al., J. Chem. Phys. 65, 3006 (1976)
- 2) Y. Shimoyama et. al., Biochim. Biophys. Acta 508, 213 (1978)
- 3) A. Evans, J. Magn. Reson. 44, 109 (1981)

生体膜系酵素の構造と活性調節機構に関する分子生理学的研究

三宅 可浩・三浦 洵・坂元 寛志 (国立循環器病センター)

堀池喜八郎 (滋賀医科大), 東城 博雄・山野 俊雄 (大阪大学・医)

志賀 潔・亘 弘 (生理研)

生体膜系酵素として、ブタ腎ペルオキシゾームの D-アミノ酸酸化酵素、牛副腎皮質ミトコンドリアの NADPH-アドレノドキシン還元酵素、ウサギ肝ミクロゾームのチトクローム P-450 を用い、本研究においては、主として酸化還元反応を中心とした分子的性質について検討した。

腎臓やその他組織のペルオキシゾームに局在する D-アミノ酸酸化酵素は、現在もなお、その生理的意義が不明である。その手がかりを得るために、本共同研究では、共鳴ラマンスペクトルの測定によって、リボフラビンとその誘導体、および、アポ蛋白質結合状態における微細構造について検討してきた。今回は、本酵素と基質 (D-アラニン、D-プロリン) の反応で観察される“紫色中間体”のラマン線が、基質中間体であるイミノ酸の C=N 伸縮振動と還元型フラビン由来のものであり、一方、¹³C, ¹⁵N で置換したフラビンを用いた同位体効果の実験から、紫色中間体における還元型フラビンのラマン線の帰属が明らかとなった (図 1)。したがって、紫色中間体は還元型 D-アミノ酸酸化酵素と基質由来のイミノ酸の複合体であることが結論された。

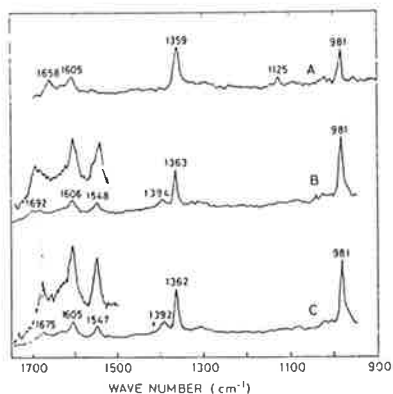


図1 D-アミノ酸酸化酵素紫色中間体の共鳴ラマンスペクトル。(A) D-プロリンを基質したとき。(B) D-アラニンを経質したとき。(C) ^{15}N -DL-アラニン, ^{15}N -硫酸を用いたとき。

本酵素の正確な分子量の測定について、熱力学的基礎のはっきりした、光散乱法、および、沈降平衡法から、アポ酵素単量体の分子量として、それぞれ、 $39,600 \pm 1,700$ 、および、 $38,000 \pm 1,200$ の値が得られた。これらの値は、経験的方法である SDS-ポリアクリルアミド電気泳動、6 M 塩酸グアニジン中でのゲル透過により推定したものとよく一致するものであり、したがって、経験的方法を用いて、Quasi-D-アミノ酸酸化酵素の単量体分子量が推定された。

アドレノドキシニン還元酵素は NADPH により 2 電子還元され、アドレノドキシニンを 1 電子還元するフラビン酵素である。従来、本酵素は NADPH による嫌氣的還元で、2 電子還元状態のみが生成するとされてきたが、還元条件によって、また、EDTA, NADP⁺ 存在下の光還元によって、フラビンがセミキノン型の酵素や還元型酵素と NADP⁺ の charge transfer complex の生成すること、しかも、酸化型酵素も含めて、これらの状態の間で平衡状態の存在することが示された。このことは本酵素の 1 電子還元について、セミキノン型酵素の生成をする可能性を示唆するものである。本酵素の活性中心について、p-ヒドロキシフェニルグリオキサールによるアルギニン残基の修飾実験から、NADP (H) の 2'-リン酸基とアルギニン残基の結合が必須であり、本酵素の NADP (H) に対する特異性発現に寄与していることが示唆された。

肝ミクロゾームのチトクローム P-450 については、p-ニトロアニソールの O-脱メチル化反応について検討した。この活性には、チトクローム P-450 に対して 2 電子の供与が必要であり、そのひとつにチトクローム b_5 が関与することが示唆されてきた。本研究では、チトクローム b_5 のヘムをプロト-C₀ で置換したものやアポチトクローム b_5 では O-脱メチル化反応はおこらず、チトクローム b_5 が第 2 電子供与体として働いていることが示唆された。また、チトクローム P-450 とチトクローム b_5 が複合体を形成することも判明した。一方、肝ミクロゾームに、O-脱メチル化反応を触媒するチトクローム P-450 で、極低濃度のシアンで阻害されるものの存在を見出し、精製に成功した。

文献

- 1) Nishina, Y., Shiga, K., Watari, H., Miura, R., Miyake, Y., Tojo, H., & Yamano, T. (1982, 6) 。 Resonance Raman study on the purple intermediates of the flavoenzyme D-amino acid oxidase. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 106, p.818
- 2) Miura, R., Nishina, Y., Ohta, M., Tojo, H., Shiga, K., Watari, H., Yamano, T., & Miyake, Y. (1983. in press). Resonance Raman study on the flavin in the purple intermediates of D-amino acid oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
- 3) Tojo, H., Horiike, K., Shiga, K., Nishina, Y., Miura, R., Watari, H., & Yamano, T. (1982. 12). Thermodynamic characterization of hog kidney D-amino acid oxidase apoenzyme in concentrated guanidine hydrochloride solution. Preferential interaction with the solvent components and the molecular weight of the monomeric unit. *J. Biochem.* 92, p.1741
- 4) Sakamoto, H., Ohta, M., Miura, R., Sugiyama, T., Yamano, T., & Miyake, Y. (1982. 12) 。 Studies on the reaction mechanism of NADPH-adrenodoxin reductase with NADPH. *J. Biochem.* 92, p.1941
- 5) Nonaka, Y., Sugiyama, T., & Yamano, T. (1982. 12) 。 Arginyl residues of adrenodoxin reductase as the anion recognition site for 2'-phosphate group of NADP⁺. *J. Biochem.* 92, p.1693
- 6) Sugiyama, T., Miki, N., Miyake, Y., & Yamano, Y. (1982. 12). Interaction and electron transfer between cytochrome b₅ and cytochrome P-450 in the reconstituted p-nitroanisole O-demethylase system. *J. Biochem.* 92, p.1793
- 7) Miki, N., Miura, R., Sugiyama, T., Yamano, T., & Miyake, Y. (1982. 10). Purified cyanidesensitive cytochrome P-450 of untreated rabbit liver microsomes, cytochrome P-450_{CN}. *Biochem. Intern.* 5, p.511

虚血脳の障害および回復過程におけるエネルギー代謝

森本 一良・田川 邦夫 (大阪大学・医)・亘 弘 (生理研)
最上平太郎・橋本 忠雄・早川 徹 (大阪大学・医)

砂ネズミ (Mongolian gerbil) は、先天的に脳底 Willis 環の發育不全を有し、一側頸動脈を結紮することにより、その約半数に脳虚血発作 (脳卒中) を呈することが知られ、広く脳虚血モデルとして使われている。その症状は、虚血の程度すなわち低下する脳血流に相関するものと思われ、寡動、片麻痺、意識障害、けいれんと種々の形態を呈する。したがっ

て砂ネズミは脳虚血時の生化学的病態を検討するのに非常に有用である。

表 1

time	AMP	ADP	ATP	Crp
(μmol/g tissue)				
0 min	0.10	1.04	3.39	3.56
1 min	0.36	1.16	2.19	0.74
2 min	3.39	0.85	0.20	0.03
3 min	3.05	0.47	0.26	0.01

表 1 は両頸動脈結紮 (すなわち完全脳虚血) 後の脳内の ATP および Creatine 磷酸 (CrP) などの energy 関連物質の変化を高速液体クロマトグラフィーで測定したものである。これをみるとまず CrP の消耗した後に ATP の減少がおこなっていることがわかる。

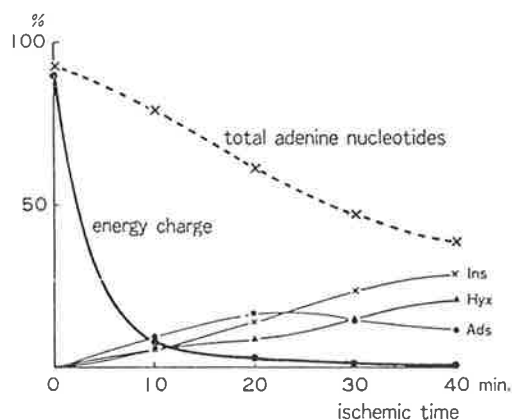


図 1 右側頸動脈結紮後の右半球脳皮質内アデニン化合物の変化

次に、脳虚血症状を呈した一匹の同一個体で経時的な変化をみたのが図 1 である。total adenine nucleotide の減少が時間の経過とともにみられるが、やはりサンプル採取という侵襲による変化を完全に除外することは困難である。そこで、これら energy 関連物質の変化を in vivo で経時的に測定するために TMR を用い、生化学的データと比較検討し、虚血による細胞障害とその回復過程を分子レベルで追跡することを目的とした。実験方法は、まず脳虚血時の細胞内 adenine nucleotide と CrP の変動を TMR を用いた³¹P NMR で測定した。その後、同一個体より得られたサンプルを過塩素酸液にて抽出し、高速液体クロマトグラフィーを用いた生化学的測定をおこなった。脳虚血の実験モデルとしてケタミン麻酔下で右側頸動脈を結紮した砂ネズミを 1.5 cm 直径の磁場内に頭部を固定し、1 cm 直径の surface coil を設置し、頭上よりの resonance signal を 10 μsec のパルス、1 秒間隔で 1,000 回スキャンした。この条件で、NMR スペクトルは、鮮明な ATP, CrP のピー

クを描く。しかし同時に採取した虚血脳組織より得られた生化学的データは CrP の著明な減少を呈していた。これは ^{31}P -NMR が虚血状態にない頭皮内筋肉組織の ATP, CrP をも測定している為であった。そこで砂ネズミの頭皮下筋肉を剥離して測定すると、頸動脈結紮とともに CrP は急激に減少し、その後 ATP の減少がそれに続くことが示された。しかし、この実験動物の脳組織より生化学的測定で得られた ATP 値は左右大脳半球とも低下しており、control 値の 40% であり、期待された右大脳半球のみの低下は認められなかった。

過去に私たちが蓄積した生化学的データとの対比は、これらの実験からは検討し難く、今後に問題を残す結果となった。

核磁気共鳴装置と用いた心筋内高エネルギー磷酸化合物の代謝と心筋収縮能との関連

豊岡 照彦・木原 裕・中山 敏夫・細田 瑤一 (自治医科大学)
永山 国昭 (東京大学・理), 亘 弘 (生理研)

体表面コイルを用いた局所核磁気共鳴法 (topical magnetic resonance 以下 TMR と略す) は、動物体内深部に存在する臓器の中の化学成分を非侵襲的に知ることが出来る画期的な方法である。今回は、この方法を、心筋症自然発症シリアンハムスター (以下 CM と略す) Bio 14.6 系と、そのコントロール系を用いて、TMR 測定を繰り返した。

この系は、その動物全例に心筋症を発症し、又その病態の変化は既に良く調べられている。動物をペントバルビタール (35 mg/kg i.p.) で麻酔後、プラスチックの台にのせた。この台は表面コイル (1.5 mm ϕ 銀メッキの銅線を巻いて作製) を入れる為中央部に穴を開けた。一方コイルの空間分解能と感知する領域を求めるために、アクリルブロックに 4 mm 間隔に縦 6 列、横 7 列の穴を開け、中に 5 M の磷酸溶液を 1 回 1 回入れて ^{31}P -TMR 測定を行った。

その後、コイルの中央部に上記ハムスターの心尖拍動部を当てて、 ^1H -及び ^{31}P -TMR 測定をそれぞれ 80、及び 32 MHz で Oxford 社 TMR-32 を用いて行った。NMR 信号は熱や心拍動に伴って変動する為、 ^1H -及び ^{31}P -TMR についてそれぞれ 4 回、及び 300 回測定加算して平均値を用いた。

^1H -TMR は 0 p. p. m. に大きな水のピークと -3.5 p. p. m. に小さな脂質のピーク

を呈し、後者は脂質の中のメチレン鎖に由来することがわかった。又 ^{31}P -TMR では 0 p. p. m. にクレアチンリン酸, -2 から -17 p. p. m. に無機リンのピークを認めた。2つの TMR は同一のハムスターで同時に同じ感知領域で得た。一般に TMR 法では局所の化学物質の絶対量を求めることが難しく、各成分の比を用いた。

縦軸に脂質/水の比を、横軸にクレアチンリン酸/ATP の比をとると、CM のハムスターは両方ともコントロール群より小さかった為、はっきりと 2 分された。この測定を、30 日後に同一の動物を用いて繰返し行ったら追試できた。

詳しく経時変化を追った結果、脂質/水の比は、生後 72 日目の CM ハムスターで既に減少していてその比は 155 日迄変わらなかった。一方クレアチンリン酸/ATP の比は、72 日目では両群の間に有意差が認められなかったが、124 日目のうっ血期が始まると共に、コントロール群より減少し始め、155 日目ではこの比は更に減少した。最後の TMR 測定後動物を汚血して殺し、その心臓を取り出して化学的に分析した。まず水分は、60℃のオーブンで乾燥前後の重量の差を用いて測定した結果 CM 群で有意に水分量が増加していた。一方脂質は、クロロホルム、メタノール (2 : 1) でホモジナイズ後、抽出測定したが、両群間に有意差がなかった。

今回心臓を分離、液体窒素内で固定するまでの時間がかかり、不安定なクレアチンリン酸を正確に定量することは難しかったが、その代り比較的安定なクレアチンリン酸キナーゼを測定した結果、CM 群の方が有意：6%程低かった。今回得られた結果は、先にカナダのグループが一匹一匹動物を犠牲にして心筋内リン酸化化合物を測定して得た結果と良く一致しており、今回の TMR 法による測定法の正しさを示していた。

なお、動物の体内にジメンションゲージを埋め込み心筋収縮能を測定しようと試みたが動物と測定器をつなぐリード線が FM 波を拾い、正確な TMR 測定が難しく、今回は心機能と TMR との同時測定は断念した。今後は雑音除去法をいくつか試みる予定である。

^{31}P -NMR による唾液腺の分泌時エネルギー代謝の研究

今井 雄介・村上 政隆 (大阪医科大学)

瀬尾 芳輝 (京都市市立医科大学)・亘 弘 (生理研)

唾液腺の産熱測定および酸素消費の測定により、分泌時にエネルギー代謝が数倍から十

倍にも亢進することを従来より報告してきた。今回、 ^{31}P -NMR を用いて、灌流下の犬顎下腺の高エネルギー磷酸化合物の時間的な経過を測定することにより、腺分泌時のエネルギー代謝の研究を行った。

Krebs-Ringer 液による腺灌流条件下では、腺組織の ATP とクレアチン磷酸 (以下 CP と略記) は組織重量当り (kg) にして各々、 0.42 ± 0.11 (SD) mM, と 0.62 ± 0.16 mM と測定された。この値は報告されている化学分析の値 (各約 1 mM) より低いが、人工灌流条件であることを考慮すれば妥当な値である。灌流液はよく酸素を飽和したものをを用い、定流灌流法によったもので組織への酸素供給はほぼ正常に行われているものと考えている。

灌流を停止すると、腺組織の ATP および CP は著明に減少し、ADP と無機構 (P_i) は増加する。殊に P_i の増加は著明なものである。 P_i はさらに化学シフトを起すが、このシフトの方向は酸性側である。このシフトの程度より腺組織の pH が推定される。灌流を再開すると ATP, CP および pH は上昇して元のレベルに復帰し、ADP および P_i は減少して、これも元のレベルに復帰する。

灌流液に 10^{-6}M のアセチルコリン (Ach) を加えると、腺から著明な唾液分泌が観察できる。このような分泌状態にある腺では ATP, CP および pH の低下と ADP, P_i の上昇がみられる。灌流液より Ach を抜くことにより、各種の濃度および pH は正常のレベルに復帰し、また唾液分泌も停止する。このように Ach による分泌刺激は ATP, CP の消費と ADP, P_i の産生を促進するもので、エネルギー代謝が亢進するものであることを示す。

灌流液の Na^+ を完全に Li^+ で置換した灌流実験では、腺組織中の ATP および CP のレベルは減少しないだけでなく、僅かながら上昇する傾向にある。この Li^+ 灌流液に Ach (10^{-6}M) を加えて、腺を刺激すると、一過性の唾液分泌がみられ、後分泌は停止する。このときの腺組織の ATP および CP レベルは変化しない。ATP, CP レベルが減少しないことは、 Na^+ のない条件下では Ach による刺激もエネルギー代謝を亢進しないことを示すもので興味深い。 Na^+ を含む灌流液に戻すと刺激がないにもかかわらず、僅かな唾液分泌と共に、組織の ATP, CP レベルの低下がみられた。この Na^+ 置換灌流実験の NMR スペクトラムの結果の一部を第 1 図に示す。

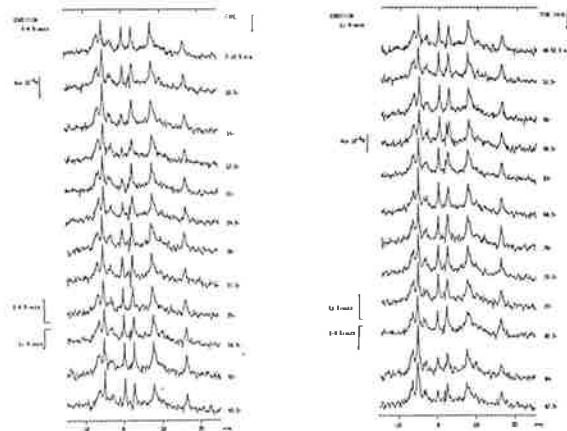


図1 灌流犬顎下腺の ^{31}P -NMR スペクトラム。正常灌流液では Ach により CP, ATP の濃度の低下, P_i , ADP の上昇がみられる。 Na^+ のない Li^+ 灌流液では Ach の刺激によっても、燐化合物の濃度変化はみられない。

発表

Phosphorus Nuclear Magnetic Resonance of Perfused Salivary Gland. BBA in press, 1983. M. Murakami, Y. Imai, Y. Seo, T. Morimoto, K. Shiga and H. Watari. ^{31}P -NMR, Salivary gland, Na^+ free effect.

以上の結果は、 NaCl および水の輸送を主機能とする唾液腺上皮膜組織における燐代謝には Na^+ は必須のイオンであり、 Na^+ を Li^+ で完全に置換すると ATP, CP 等の消費は抑制されることを示し、分泌機構の解明に役立つ情報となる。

平滑筋における ^{31}P 核磁気共鳴を応用した エネルギー代謝の測定

富田 忠雄・高井 章 (名古屋大学・医)
亘 弘 (生理研)

モルモットの結腸紐は縦走筋が帯状に肥厚したもので、平滑筋の標本として一般的に用いられている。この摘出標本を Ca^{++} を除き、 Na^+ を K^+ で置換した液に入れ脱分極させておくと外液に Ca^{++} を再投与することによって、何度でもほぼ一定の収縮を起こすことができる。この実験で、外液に glucose を加えないと、収縮は次第に弱く、しかも一過性になる。

てくる。1～2時間後、殆んど緊張性の収縮が消失した時点で、glucoseを再投与すると数分以内に非常に良い回復がみられる。同様の回復は pyruvate でも、 β -hydroxybutyrate でもみられ、収縮の維持に細胞内の高エネルギー磷酸が重要な働きをしていることが示唆される。

生化学的に、luciferin-luciferase 法を用いて細胞内の ATP および creatine 磷酸を測定すると、glucose の除去により高エネルギー磷酸の含有量が低下し、エネルギー基質の投与で増加するという結果が得られた。これらの点をさらに厳密に調べ、しかも張力発生を調べる生理的実験と同様の条件下で、高エネルギー磷酸の濃度の変化を時間を追って分析するため、 ^{31}P 核磁気共鳴 (NMR) の実験を行った。

初期の実験では、出来るだけ大きいシグナルを取り出し、短い加算時間で分析が可能になるように 50 匹のモルモットから約 5 g の結腸紐を摘出し、径 30 mm の試料管内に固定し、Bruker WM 360 の装置により ^{31}P の NMR スペクトルを測定した。その結果、ATP および creatine 磷酸に対応する明確なシグナルが 3～4 分の加算時間で記録でき、NMR 法が平滑筋にも充分応用可能なことが明らかとなった。

しかしながら、glucose を除くと高エネルギー磷酸が減少し、同時に、平行して無機磷が増加することは認められたが、生化学的実験から予測されるのに反して、glucose を再投与しても回復の傾向は全くみられなかった。高エネルギー磷酸が回復しないのは、5 g という多量の標本に充分酸素の供給ができないためとも考えられたので、径 15 mm の試験管に変え、平滑筋の量を 1.5～2 g と少なくして同様の実験を行なった。正常 Krebs 液中での無機磷の含有量が殆んど検出できないようになったことから、標本の状態についての改善はなされたと考えられるが、やはり glucose の再投与による高エネルギー磷酸の含有量の回復は殆んど観察されなかった。

Glucose 除去の処理時間を短くし、しかも高エネルギー磷酸の減少を促進させるため、酸化的磷酸化過程を阻害する目的で 2 mM の CN で処理したところ、creatine 磷酸および ATP は殆んど完全に消失し、CN を除いた後に加えた glucose によって両者とも明らかな回復をみることができた。しかしながら、CN で処理しないときに高エネルギー磷酸が回復しないのは、生化学的方法で測定した結果、あるいは収縮反応とも矛盾していて、現在のところ説明不可能である。この点を含め、今後 glucose 以外の pyruvate や β -hydroxybutyrate などの基質の投与によるエネルギー産生なども検討を重ね、平滑筋における代謝過程の特殊性を明らかにしていきたい。

骨格筋や心筋に対する NMR の応用は数多くなされているが、現在のところ平滑筋についての研究は殆んどなく、子宮平滑筋の正常 Krebs 液中での ^{31}P 核磁気共鳴のスペクトルが 1972 年 11 月の英国生理学会 (Dawson, M. J. & Wray, S.) で報告されているに過

ぎない。この結果は我々のものと基本的には同じであるが、無機リンの含有量が多く、標本の状態が悪い可能性を示しているものと考えられる。

動物を用いた脳硬塞モデルにおける 脳組織内エネルギー代謝の研究

三宅 英則・上田 徹・小林 映・安里 令人
滝 和郎・米川 泰弘・半田 肇 (京都大学・医)・亘 弘 (生理研)

我々は、急性期脳梗塞血行再建術の理論的背景を検討するために、ネコ一過性局所脳虚血モデルを用いて、無機リン (Pi), クレアチンリン酸 (PCr), ATP の変化をリン NMR により経時的に観察した。まずあらかじめ、ネコに経眼窩的に中大脳動脈起始部に occlusive device を埋め込み、脱血後中大脳動脈を2時間閉塞することにより、脳虚血を作成した。Oxford Research System 社製 TMR-32/200 を用いて、直径 1.6 cm の関心領域についてリン NMR スペクトルを in vivo で経時的に測定し、Pi, PCr, ATP の変化を観察すると共に、水素クリアランス法を用いて、関心領域内の脳虚血部の局所脳血流量 (rCBF) を測定した。

その結果、① Pi, PCr, ATP は脱血操作にては変化しなかった。②中大脳動脈閉塞により、rCBF は正常値の 10~20% に減少し、PCr, ATP が著しく低下し、Pi が高値となった。又 Pi の chemical shift 値は、虚血脳組織が、Acidosis となっていることを示した。③血流再開後、rCBF は、ほぼ正常に回復したが、PCr, ATP は、低下したままで、Pi が高値となっている状態が続き、数時間後に死亡した。④剖検時に中大脳動脈領域の著しい swelling を認め、同部に明らかな Evans blue の漏出を認めた。⑤正常半球では、虚血前から虚血後にかけて、Pi, PCr, ATP の値に変化を認めない傾向にあった。

以上の結果より、ネコ脱血後2時間中大脳動脈閉塞による一過性局所脳虚血モデルでは、虚血時、中大脳動脈領域の PCr, ATP は著しく低下し Pi が高値となったが、血流再開後 rCBF がほぼ正常値に回復したにもかかわらず、PCr, ATP の回復は認められなかった。また血流再開後早期に死亡し、このことは Brain swelling に起因するものと考えられた。結果の詳細については、現在分析中である。

NMR 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・恵良 聖一・井上 洋 (岐阜大学・医)
亘 弘・志賀 潔 (生理研)・赤坂 一之 (京都大学・理)

牛血漿アルブミン (BPA) は酸性側で N-F 転移 (0-10 MNaCl, pH 4.5~3.7) と呼ばれる構造変化を示す。結晶 BPA 中には, F 型状態に於てのみ特異的に BPA を加水分解する plasma protease が非常に微量含まれている。NMR 試料作製の際, pD 4.0 (BPA は F 型), 3℃で約 2 日間ペプチド鎖の交換可能な H を D (重水素) にする。この試料作製中および F 型状態で測定中に, S-S 結合した CYS-390 と CYS-434 の間のペプチド鎖のみが 1~2 個所上述の plasma protease により加水分解され BPA* と呼ばれるものになる¹⁾。BPA* は, pD 5.3 に於て, N 端を含む domain は N 型様, C 端を含む domain は F 型様である。もちろん, BPA* の比率は小さい。

(1) 今回, SE-sephadex を用いて, plasma protease を全く含まぬ BMA (bovine mercapt albumin) を精製し, T_1 (縦緩和時間), T_{1s} (交叉緩和時間)²⁾ を 360 MHz ^1H -NMR を用いて測定し, N 型, F 型状態の分子の固さを比較した。スピン拡散測定は赤坂の方法²⁾を用い, $f_2 = -7.18$ ppm または 2.40 ppm に presaturation pulse を $0.001 \sim 4.00$ sec にわたって加えた。表 1 に示すように, 何れの f_2 の場合も T_{1s} は F 型が大きい。

	T_{1s} (sec), $f_2 = -7.18$ ppm				T_{1s} (sec), $f_2 = 2.40$ ppm		
	CH_3	LYS	AROM	HIS	CH_3	LYS	HIS
N 型 (pD 5.32)	0.45	0.55	0.44	0.75	0.32	0.39	0.57
F 型 (pD 4.03)	0.53	0.68	0.86	3.85	0.46	0.53	0.88

即ち, スピン拡散測定から, N 型は F 型に比し固い領域の多いことを示唆している³⁾。

(2) BMA を用い, N 型, F 型状態における HDO の T_1 を測定し, 水和量 (結合水) を比較した。BMA 重量分率, x における T_1 測定値は 1 式に従う^{4,5)}。 T_{1b} , T_{1f} は結合水と自由水

$$1/T_1 = C (1/T_{1b} - 1/T_{1f}) x / (1-x) + 1/T_{1f} \quad (1)$$

の縦緩和時間, C は BMA 1 g 当りの結合水量(g)である。 T_{1b} を BMA 側鎖の T_1 値の平均と仮定すると, N 型, F 型の水和量 (結合水量) は, それぞれ 1.32 g/g, 0.99 g/g である。N 型の水和量は, Grösch ら⁶⁾ の T_1 値の分散から求めた値に近い。

文献

1) W.D. Wilson & J.F. Foster, Biochemistry 10, 1772 (1971)

- 2) K. Akasaka, J. Magn. Reson. 45, 337 (1981)
- 3) 曾我美勝, 長岡俊治, 井上 洋, 恵良聖一, 亘 弘, 志賀 潔, 赤坂一之, 生理学研究
所年報 2, 141 (1982)
- 4) E.D. Finch & A.S. Schneider, Biochim. Biophys. Acta 406, 146 (1975)
- 5) E. Gogelli, N. Niccolai & G. Valensin, Biophys. J. 37, 559 (1982)
- 6) L. Grösch & F. Noack, Biochim. Biophys. Acta 453, 218 (1976)

CCK の脳と膵に及ぼす効果, その TMR による解析

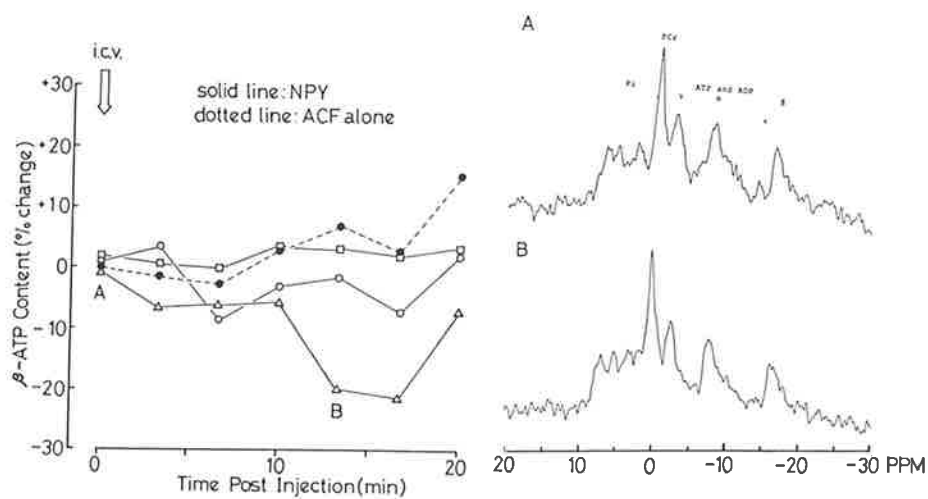
菅野 富夫 (北海道大学獣医) ・ 斎藤 篤志 (帯広畜産大学)

松本 武久 (北海道大学獣医)

Neuropeptide Y (NPY) はブタの脳より抽出された 36 個のアミノ酸残基から成るペプチドである。このペプチドのアミノ酸配列は Gastrointestinal peptide hormones のひとつである Pancreatic polypeptide のそれと良く類似しており, Gut-brain peptides の新しい一員として, 注目を浴びて来ており, 中枢および末梢における生物学的作用が多数の研究者们によって報告されている。また当教室でも, ウシガエル脳の血管灌流標本を用いて, NPY によって脳内のチトクローム系諸酵素の還元レベルが変化したことを報告しているが, 他の Gut-brain peptides でも同様の結果を得ている。そこで今回は, NPY の脳における作用の特異性を探求するため, ラット (Sprague Dawley 系, Wistar 系, 雄 200-250 g) の側脳室内に NPY を注入することによる脳への影響を TMR を用いて解析した。

NPY (1×10^{-10} moles/rat) を側脳室内に注入後, 10 分間は, ATP および ADP レベルは, ほとんど変化しないが, その後, 減少する傾向が見られたが, その大きさは個体ごとに異っていた。そのなかでも特に β -ATP については図に示すように, 顕著に減少する例も見られ, 20 分後には元のレベル近くまで戻っている。また NPY の溶媒として用いた人工脳脊髄液を側脳室内に注入すると, 逆に β -ATP は増加する傾向を示した。しかし, クレアチン・リン酸, 無機リン酸およびグルコース 6 リン酸含量には大きな変化は見られず, ほぼ一定の値を保ち続けており, 一見矛盾する結果を得た。これについては, ATP および ADP から解離した無機リン酸が脳細胞から血中へ移行してしまったものと思われるが, 実

際に血中の無機リン酸濃度の時間的変化を測定する必要がある。また、これらの作用が NPY の特異的作用であることを確かめるためには、他の Gut-brain peptides との比較が今後必要である。



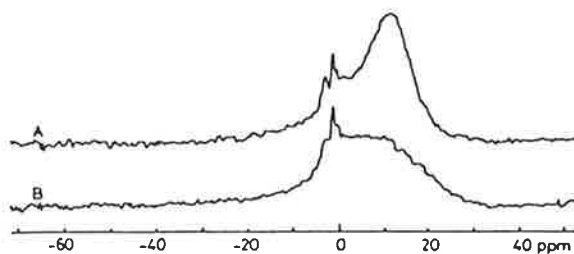
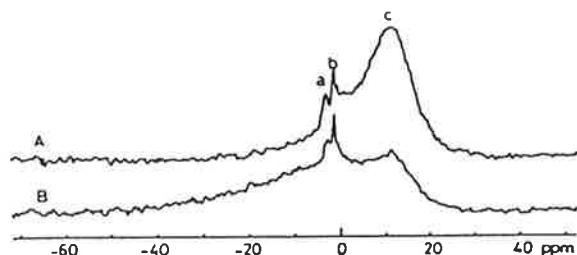
生体膜構成脂質極性部位の動態の核磁気共鳴法による解析

西川 弘恭 (京都府立医科大)

〔はじめに〕 リン脂質極性基部位のリン-核磁気共鳴法 (^{31}P -NMR) において, その共鳴線の形は ^{31}P の chemical shift anisotropy と ^{31}P - ^1H dipolar interaction に依存する。chemical shift anisotropy に関わる chemical shielding tensor 値は NMR 静磁場 (H_0) とリン脂質回転軸のなす角度 (θ°) により表わされる¹⁾。本研究では上記理論を生体膜で最も秩序的構造をもつミエリンに適用し, リン脂質極性基の生体膜における動態を ^{31}P -NMR を用いて解析した²⁾。

〔試料と方法〕 神経線維をうずまき状にとりまき, 線維が一方に並ぶウシ脊髄白質部分を, 一辺 7 mm の立方体に切り, 試料とし, 10 mm ϕ -NMR 試料管に入れた。

NMR 装置は JEOL-PET-100 NMR (^{31}P で 40.29 MHz) で, 通常 proton noise decoupling を用いた。スペクトル幅は 5 kHz, データポイントは 4096 であった。測定温度は通常 24°C であった。化学シフトの外部基準として正リン酸を用いた。



〔結果と考察〕 1) ウシ

脊髄白質ミエリンリン脂質の秩序的方向性。白質切片を $\theta = 90^\circ$ で ^{31}P -NMR 測定すると, +11.1 ppm にピークをもつスペクトル (図上-A) が得られ, $0^\circ \leq \theta \leq 180^\circ$ で θ が分散する場合は +11.1 ppm のピークが平坦となり, 0 ppm より低磁場側の信号強度が増加し (図上-B), 両者のスペクトル面積は等しかった。化学シフト値 +11.1 ppm は人工扁平多重層リン脂質膜に一致した³⁾。白質 homogenate では上記スペクトルの角度依存性はみられなかった。故に, このスペクトルの角度依存性は脊髄ミエリンリン脂質の秩序的方向性を示すものである。2) ミエリンの秩序的方向性への温度の影響。濃度の増加に伴い +11.1

ppm の共鳴線が減少し、-3.5 ppm 付近での信号強度の増加がみられた。この変化は 50℃ ~80℃ の間で強くみられた。これはリン脂質が熱振動の増強により秩序的方向性に乱れが生じ、chemical shift anisotropy の平均値が生じたためである。3) ミエリンリン脂質の NOE。 ^{31}P - ^1H interaction を示す NOE は proton noise decoupling 時のスペクトル (図下-A) と non-decoupling 時のスペクトル (図下-B) より算出し、1.24 であった。NOE は種々の緩和機構や分子運動にも依存し、リン脂質の人工 aqueous dispersion では約 1.4 である。これらより、ミエリン中での ^{31}P は比較的人工膜に近い ^{31}P - ^1H interaction をもつといえる。4) ミエリンリン脂質の NMR 緩和時間。 $T_1=0.40$ sec, $T_2=1.2$ msec であった。 T_1 値は T_2 値の約 300 倍である。これはミエリン中のリン脂質が固体に近い粘性状態であることを示している。

おわりに、試料を提供下さいました京都食肉衛生検査所に謝意を表します。

文献

- 1) J. Seeling, Biochim. Biophys. Acta, 515, 105, 1978.
- 2) 西川弘恭ら, 第 21 回 NMR 討論会講演要旨集: 149, 1982.
- 3) J. Seeling et al., Biochemistry, 15, 5199, 1976.

先天性無神経節腸管とペプチド (Substance P, Enkephalin, VIP) 性神経

沖 充・権田 辰夫 (島根医科大学)
亘 弘・尾崎 毅・矢内原 昇 (生理研)

これまでの研究では、消化管神経叢、自律神経節、脊髄神経節に存在するペプチド (Sub-P, ENK, VIP) 性ニューロンの機能と構造について考察を重ねてきた。

本研究では、ラットの無神経節部の腸管の運動とペプチド性神経との関係について知ろうとするものである。

浅井ら (動物繁殖研究所) によって関与され、国立生理研・動物実験施設で継代維持中の congenital aganglionosis rat はヒトの先天性腸閉塞のモデル動物であるが、このラットの腸管の narrow segment には神経細胞が認められない (図 1)。Sub-P, ENK, あるいは VIP に特異的な抗体を用いて免疫組織学的に染色すると、これらのペプチドを含む神経線

維は正常腸管壁には認められるが (図 2), narrow segment では検出されない (図 1)。Ach E 陽性線維の場合も同様である。しかし肛門より口側 3 cm までの narrow segment では、無神経節部であっても個体によってはペプチド性神経線維が散見される。正常ラットの腹腔神経節にはペプチド産生細胞は存在しないが、多数のペプチド性神経終末が認められる。この神経終末は aganglioneosis rat では極めて少ない。Sub-P 産生細胞は脊髄神経節に、VIP 産生細胞は交感神経幹神経節内に認められる。一方、ネコとイヌの正常な腸管壁には Sub-P, VIP, ENK などのペプチド産生ニューロンが存在する。この両動物の腸管膜内の神経を結紮しておく、結紮部の両端に VIP や Sub-P の蓄積像が認められる。従って消化管には外来性のペプチド性線維のほかに、消化管神経叢に起始し、腹腔神経節や遠隔神経節に向かう求心性のペプチド性線維が存在すると考えられる。また大内臓神経の結紮部近位端 (=中枢端) には Sub-P と VIP が蓄積する。これらは遠心性のペプチド性線維であろう。

以上の成績をもとにして、無神経節部腸管 (=narrow segment) の運動不全 (特に弛緩不全) の発生機構を知るために、腹腔神経節、骨盤神経節、消化管神経叢を反射中枢とするペプチド性神経の役割について電気生理学的に検討を進めている。

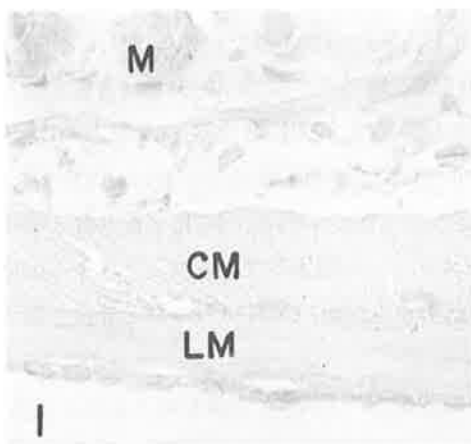


図 1 無神経節腸管部 (narrow segment) にはコリン性、アドレナリン性、ペプチド性神経は認められない。

M: 粘膜 CM: 内輪筋層
LM: 外縦筋層

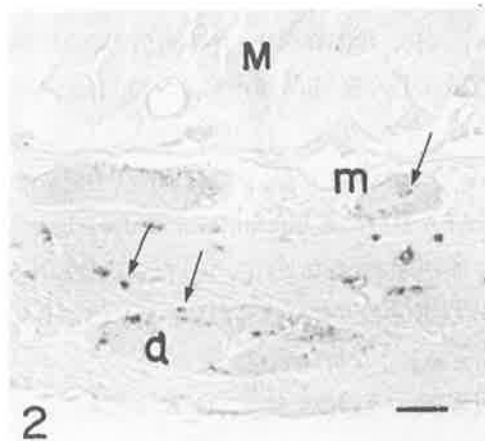


図 2 近位正常腸管部

ペプチド (VIP) 性神経終末 (矢印) が、Auerbach's(a), Meissner's(m)神経叢、筋層に認められる。

両図とも酵素抗体法によりペプチド染色をし、核染色をおこなっていない。スケールは 10 μ m を示す。

アミノ酸神経伝達物質候補に対する, CCK-8 脳内投与の影響

貝谷 壽宣・竹内 巧治 (岐阜大学・医)

矢内原 昇 (生理研)

コレチストキニンは脳内に大量に存在し, 特に大脳皮質に含量が高い。その精神神経系に及ぼす作用が現在注目を集めている。我々は CCK-8 をマウスの脳内に投与し, アミノ酸神経伝達物質候補に対する影響を検討した。

〔実験材料〕 ddr 系雄マウス, 体重 25~30 g

〔方法〕 CCK-8 1 μ g を 10 μ l の 7% sodium-bicarbonate に溶解し, マウスの大脳縦裂に注射針にて直接注入した。対照群には同量の溶媒のみを注入した。投与 15 分後又は 60 分後に断頭し, 脳を摘出し直ちに凍結した。低温下での脳の各部位を切り出し, 除タンパク, ホモジュナイズの後, アミノ酸の分析を行った。各アミノ酸の定量には酵素蛍光法を用いた。

〔結果〕 グルタミン酸濃度は, 脳の各部位 (前頭葉皮質, 視床下部, 線条体, 辺縁一線条体, 海馬, 中脳背側部, 中脳腹側部) で対照に比し, 変化がなかった。アスパラギン酸は, CCK-8 投与後 15 分後の測定で, 前頭葉, 中脳背側部, 腹側部で統計学的有意に含量が増加した。中脳背側部では 40% 増加していた。GABA 含量は, CCK-8 投与 15 分後と 60 分後のいずれの測定でも, 中脳背側部で有意に減少していた。他の脳部位では変化がなかった。GABA 合成酵素 glutamic-acid-decarboxylase 活性も測定したが, CCK-8 投与群と非投与群の間に有意な差はなかった。GABA トランスアミナーゼ阻害剤であるアミノオキニ酢酸を CCK-8 投与後に腹腔内に注射し, GABA の蓄積をみたが, CCK-8 投与群と非投与群で有意の差はなかった。

〔考察〕 今回の実験で, CCK-8 投与により中脳背側部で GABA 含量が低下したことは, 黒質網様体から上丘, 中脳水道周辺灰白質などの中脳背側部へ向かう GABA 性神経細胞の活動が CCK-8 により抑制されることを示唆するものと思われる。この系は線条体の過ドーパミン状態が動物の種々の行動変化を起こす機序として考えられており, 故に CCK-8 は線条体の過ドーパミン状態に拮抗するものと考えられる。アスパラギン酸の増加の意義は不明だが, GABA とアスパラギン酸が拮抗しているとも考えられる。

脳と消化管の生理活性ペプチドに関する研究

—特に GRP について—

矢内原 昇・島崎 英樹・佐藤 晴子 (生理研)

山下 裕一・大久保正士・岩原 邦宏・矢内原千鶴子 (静岡科薬大学)

GRP はガストリン放出活性をもつペプチドとして、ブタ上部胃組織から単離、構造決定されたものである。その C 末端デカペプチドは C 末端より 8 位アミノ酸残基を除き、カエル皮膚より単離されたボンベシンと共通の構造である。GRP とボンベシンは生理活性においても多くの共通点を持ち、平滑筋収縮作用、ガストリン、インスリンなどのホルモン分泌刺激作用、膵外分泌刺激作用、循環系に対する作用、中枢作用など多彩な作用を示す。著者らは天然ブタ GRP (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) を用いて確立した RIA 系により哺乳動物消化管、膵、脳などの組織中の免疫活性 GRP を検討した。消化管では胃体部および前庭部の粘膜を除き、すべて筋層に局在し、免疫組織化学的にも消化管では神経が陽性であった。免疫活性 GRP は膵組織において消化管より高濃度で検出され、免疫組織化学的にも多量の陽性線維が膵内神経節に認められた。GRP は哺乳動物において、ガストリン、CCK、腸管 GLI、PP、インスリン、ソマトスタチンなどの分泌を刺激する。

本研究では pGRP を用い、イヌにおける胃・腸・膵ホルモンの影響を検討した。すなわち、ネンブタール麻酔下の雑種成犬に上肢肘静脈内留置カテーテルから pGRP を急速静注にてそれぞれ 30 pmol/kg および 60 pmol/kg を投与し、ガストリン、インスリン、グルカゴン、腸管グルカゴン、セレクトイン、VIP の免疫活性の変動を検討した結果、60 pmol/kg の投与群で末梢血中ガストリンのほか、インスリンおよび腸管 GLI の明らかな放出が認められた。血中インスリン濃度はガストリンと類似の傾向で上昇し、30 pmol/kg 投与群では pGRP 投与 5 分後に僅かな上昇傾向を示すが有意ではなく、60 pmol/kg 投与群では投与前 $8.2 \pm 2.5 \mu\text{u/ml}$ であったが、投与 5 分後には $22.4 \pm 5.0 \mu\text{u/ml}$ と速かに上昇し、以後漸減する反応であった。一方、本実験では VIP、セレクトイン、膵グルカゴンの血中濃度の変化はみられなかった。なお、血中ガストリンの放出は GRP 投与後直ちに上昇するのに対し、60 pmol/kg 投与群で腸管グルカゴンの放出は 15 分で頂値に達した。McDonald と著者は pGRP とボンベシンの胃・腸・膵ホルモンへの影響を比較検討したところ、0 ~ 600 pmol/kg/h の持続注入でイヌにおいて、ガストリン、PP、腸管グルカゴン、インスリンおよび免疫活性グルカゴンが用量反応的に上昇した。この投与量の範囲では pGRP とボンベシンの

作用は全く変らなかった。

また、ラット胃灌流実験から、ラット胃において GRP ニューロンが節後ニューロンとしてガストリン分泌の調節に強く関与している可能性が示唆された。

AVP 中枢性分泌調節機構に関する研究

—特に中枢性ドーパミン作働性機構の関与について—

沖 隆・相原 康之・大郷 勝三
吉見 輝也 (浜松医科大学)

バゾプレッシン (AVP) の中枢性分泌調節に対する中枢性ドーパミン (DA) 作働性機構の関与を知る目的で、wistar rat を用い、絶水または高張食塩水 (4.5% NaCl) 腹腔内投与時において、種々の検討を加えた。まず 3 日間絶水群と自由飲水群を比較すると血漿浸透圧は、それぞれ 304 ± 4.9 と 276 ± 4.8 mOsm/L で絶水群で明らかな上昇が認められ、下垂体後葉の AVP 含量は、それぞれ 0.13 ± 0.03 と 0.55 ± 0.15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein で絶水群で明らかな減少が認められた。また下垂体後葉の DA 含量は、それぞれ 3.90 ± 0.81 と 1.58 ± 0.80 で、絶水群で明らかな増加が認められた。視床下部の AVP、DA およびノルエピネフリン (NE) 含量は、両群間で差はなく、また下垂体後葉の NE は測定感度以下であった。

次に高張食塩水投与時の AVP 分泌亢進におよぼす α -メチルチロシン (α -MT 250 mg/kg) とハロペリドール (HLP 1 mg/kg) の影響を検討した。 α -MT 前投与群、HLP 前投与群と非投与群と比較すると、高張食塩水投与 30 分で、血漿浸透圧は、それぞれ 329 ± 5.5 , 331 ± 2.0 と 323 ± 3.5 mOsm/L で、各群間に差は認められなかった。また、血漿 AVP 濃度は、それぞれ 96.4 ± 9.7 , 63.1 ± 3.5 と 77.8 ± 13.2 pg/ml で HLP 前投与群で α -MT 前投与に比し明らかに減少しているが、他の群間では差が認められなかった。さらに高張食塩水投与 120 分で α -MT 前投与群と非投与群を比較すると、血漿浸透圧はそれぞれ 299 ± 2.2 と 297 ± 4.4 mOsm/L で明らかな差は認められなかった。また血漿 AVP 濃度は、それぞれ 7.9 ± 1.3 と 6.3 ± 0.6 pg/ml で明らかな差は認められなかった。また下垂体後葉 AVP 含量は、それぞれ 0.57 ± 0.06 と 0.36 ± 0.04 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein であり、0.9% NaCl 投与群の 0.58 ± 0.02 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein と比較し、 α -MT 投与群では、下垂体後葉の AVP 含量の減少は認められなかった。0.9% NaCl 投与時には α -MT、HLP いずれも AVP に影響しなかった。以上の成績より、DA は AVP の合成に抑制的に作用している可能性もあるが、AVP の分泌には促進的に作用している可能性が示唆された。しかし、 α -MT の投与で

は NE の影響も否定できず、また高張食塩水としての 4.5% NaCl は最大刺激濃度以上である可能性も強く、中等度の高張食塩水刺激など、今後の検討が必要と思われる。

新生ラット脳への薬剤投与法

林 纈治 (東京都神経科)

性機能に関与する脳の発生には、臨界時期が存在すると考えられている。例えば、出生後約 10 日以内の雌ラットに性ステロイドホルモンを投与することによって、成熟後の脳下垂体からのホルモン分泌の様式や、性行動の様式を、脱雌性化したり、雄性化したりすることができるが、このような現象を惹起できるのは、出生後比較的短時間内に限られている。この臨界時期の実体は何かを解明する手段の一つとして、出生直後のラットについての脳内手術法を開発した。

軟 X 線で新生ラットの頭部を透視しながら手術する装置 (ソフテックス脳定位装置) を用いる。この装置は、実験者にとって有害な軟 X 線の漏洩を防ぐために、装置全体を鉄箱内に入れ、前部扉を閉じなければ軟 X 線を発生することができないようになっている (図 1)。冷却麻酔した新生ラットの頭部を合成ゴムで作った固定台に虫ピンで固定し、装置中央にある回転円盤上に固定する。この円盤は、90°回転できるようになっているので、固定台上のラット頭部を前後・左右の 2 方向から観察できる。また、回転円盤上にはレールが固定されているので、レール上に装着したマイクロマニプレータは、固定台上の動物との位置関係を変えることなく、90°回転することができる (図 2)。回転円盤およびマイクロマニプレータは、装置の前扉を閉じた状態で遠隔操作することができる。ビデオ画面上には、ビデオスケーラーを用いて座標を示し、電極等の位置を画面上の座標を見ながら操作することができる。

本装置を用いて、①脳内神経切断、②熱凝固破壊、③薬剤投与を、かなりの精度で行うことができるようになった。このうち、薬剤投与実験は開始したばかりなので、今回は方法の紹介のみに留める。

2 本の独立に操作できる電極を脳内に挿入した時の X 線像を図 3 に示す。頭骨の像から、脳内の神経核の位置を高い精度で示すことができる。後方の電極先端は視床下部弓状核に位置し、下垂体の直上である。また、第 3 脳室内に X 線造影剤を注入後撮影した像を

図 4, 5 に示す。第 3 脳室および側脳室の形状が明瞭に表現されている。

性機能の発現に重要な意味を持っている視床下部神経細胞の最終分裂は、胎生 17 日にはほぼ終了していることは、 ^3H -チミジンを用いた研究ですでに示されている。しかし、ラット視床下部の機能発現のための臨界時期は生後数日間続く。この事実は、神経細胞間の結合様式の決定が、成熟後の機能発現に重要な意味を持つことを示唆している。神経線維網の形成に、活性ペプチドを中心とした生体内に存在する物質がどのように関与しているかについての検討は、未だ手をつけられていないのが実情である。この方面での新しい知見を得たいと考えている。

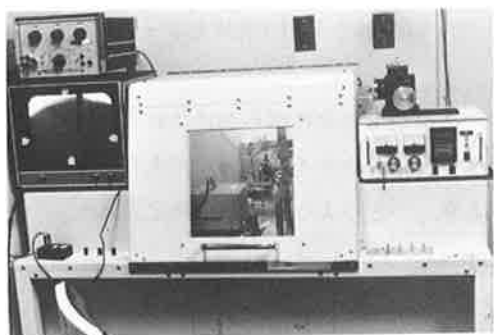


图 1

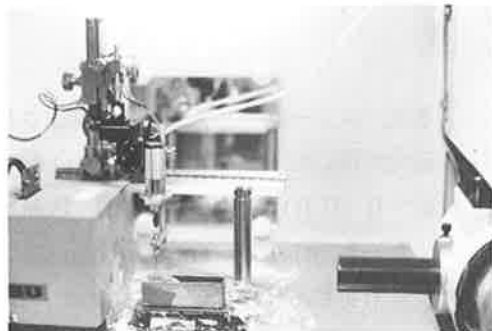


图 2



图 3



图 4

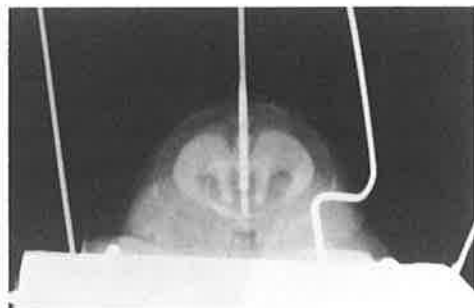


图 5

ウロテンシンIIと飲水

小林 英司 (東邦大学・理)

最近、ニューロペプチドが多数見出され、その一次構造も急速に明らかにされてきた。本研究に用いたハゼ (*Gillichthys milabilis*) の尾部下垂体のホルモンの一つであるウロテンシンII (U II) も1980年に、D. Pearsonらにより、つぎのように構造が決定された。

すなわち、Ala-Gly-Thr-Ala-Asp-Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys-Valである。このU IIを矢島治明らが合成した(1982)ので、これを用い飲水との関係をみた。

ネズミでは、U IIの0.5-5.0 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ の腹腔内注射、2.5-250 ng/個体の脳室内注射で飲水は促進されなかった。ウズラでは0.3-1.0 $\mu\text{g}/\text{個体}$ の腹腔内注射で飲水は直線的に増加した。筋肉内注射、皮下注射でも0.5 $\mu\text{g}/\text{個体}$ で飲水を促進した。しかし、脳室内注射では0.5 μg でも促進しない。U IIのリセプターが脳にはなくて、peripheralの組織にあるのであろう。潜時は、50 $\mu\text{g}/\text{個体}$ の腹腔内注射で 5.5 ± 0.5 分 ($n=8$)である。U IIは50 μg (最小有効量の170倍)を腹腔内注射してもdepressionを起さないが、アンギオテンシンIIでは最小有効量の30倍の100 μg を注射すると強いdepressionを起こす。このことは、脳にU IIのリセプターがないことと一致する。鳥の中でもジュウシマツではU IIにより飲水は促進されなかった。爬虫類では *Tachydromus septentrionalis* を用いたが、U IIは飲水を促進しなかった。魚類では淡水魚のキンギョと海産魚のコバルトスズメを使用しU IIの腹腔内注射をしたところ、何れにおいても飲水は抑制された。U IIはウズラとコリンウズラの一種で血圧を上昇させるが、ハトでは上昇させないといわれている (Woo and Bern, 1978)。このことから考えると、U IIがウズラで飲水を促進したり、血圧を上昇させる作用は薬理的な作用と思われる。しかし、U IIが魚類より高等な動物の神経系に存在するかどうかを調べてみる必要がある。

文献

- 1) Kobayashi, H., Okawara, Y., Uemura, H. and Yajima, H. Neuroendocrinology Letters 1982 Dipsogenic action of urotensin II in birds.

視床下部弓状核のシナプスにおける老化に伴う 有芯性シナプス小胞の増加の意味

新井 康允 (順天堂大学・医)

加齢に伴い神経内分泌系に変調が見られることが知られている。視床下部弓状核 (ARCN) は下垂体前葉ホルモン、主としてゴナドトロピンとプロラクチンの分泌調節に重要な役割を果たしていると考えられる。最近我々は老化に伴って、ARCN のシナプス数が有意に減少することを報告した (Matsumoto & Arai, 1982)。この結果は、この神経核の加齢に伴う情報処理能の変動と神経内分泌機能の変調との関連性を考えるのに興味深いものである。今回は ARCN のニューロピルに見られるシナプスのシナプス小胞の形態の加齢に伴う変化に注目して電子顕微鏡的解析を行った。

その結果、軸索終末の内部構造に普通に見られる直径 50 nm の無芯性シナプス小胞 (SSV) だけでなく、大型の中空性小胞 (LSV, 直径 100 nm) を多数含む神経終末の数が増える傾向が見られた。さらに直径が 100~300 nm の大型有芯性顆粒 (LGV) を含む終末の数が老令ラットで増加する傾向が見られた。

18,000 μm^2 の面積当たり、SSV のみで LGV を含まないシナプスの数は、老令ラットにおいて有意に減少し、($P < 0.05$)、一方、LGV を 1 個以上有するシナプスの数は、老令と若齢の間で差異を見出せなかった。この結果は老令ラットのシナプス数が全体として減少しているため、老令ラットのシナプスポピュレーションの中で LGV を含むシナプスの割合が高いことを示す。LGV はペプチド性の物質を含むと考えられ、ARCN に多種のオピオイドを含むニューロンが存在することが知られているので、老令ラットに LGV を多数含むシナプスの増加した結果は、老化に伴って、ARCN ニューロンにおけるオピオイド合成や放出が若令ラットの場合と異った状態にあることを暗示するものである。さらに、免疫組織化学や生化学的な検討が必要と思われる。

文献

Exp. Neurol. 78, 583, 1982. Synaptic changes in the hypothalamic arcuate nucleus of old male rats.

トリのゴナドトロピン分泌の比較生理

和田 勝 (東京医科歯科大学・医器材研)

トリのゴナドトロピンにも、哺乳類と同様、黄体形成ホルモン (LH) と卵胞刺激ホルモン (FSH) の2種ある。FSH の分泌と LH の分泌がどのように調節されているかは、必ずしも明らかになっていない。一般的には両ホルモンの分泌はゴナドトロピン放出ホルモンによって制御されており、これが2種あるのではないかと、形態学的差異によって分泌調節が異なるのではないかと、フィードバック機構の違いによって差異が生じるのではないかと考えられてきた。これらは主にラットを用いた研究で、トリでの研究はほとんどなかった。今回、ニワトリ FSH を用いた homologous FSH のラジオイムノアッセイ系が確立されたのを機会に、この点について研究した。

ウズラの下垂体を medium 199 中で 20 時間培養し、medium 中に放出された FSH, LH および下垂体中に残った FSH, LH を測定した。LH は小脳抽出物を加えた対照群ではほとんど放出がおこらず、視床下部抽出物を添加して始めて顕著な分泌がおこった。放出された量は対照群の 6 倍だった。これに対して FSH は対照群でさえも一定の分泌がおこっており、その放出量はもともと下垂体中にあった含量の 3 倍にも達した。視床下部抽出物を加えると、さらに放出される量は増すが、その量は対照群の 1.8 倍にすぎなかった。一方下垂体中の両ホルモンの含量を培養の初めと終りで比べてみると、LH の含量は 20 時間後にはあきらかに減少し、視床下部抽出物を加えた群では半分以下になった。これに対して FSH はどちらの群でも培養前後で変化はなかった。この点と FSH が medium 中に初めの下垂体含量の 3 倍も放出された事を考え合わせると、FSH はゴナドトロピン放出ホルモンの刺激がなくても常にある程度は合成され放出され続けている事を示している。これに対して LH の方はゴナドトロピン放出ホルモンの刺激がないと、下垂体含量の 1% しか放出されず、放出ホルモンがきて初めて、含量の 10% が放出される。すなわち LH は、視床下部からの支配がかなり強い事がわかる。

次に FSH の自発的な放出が、ゴナドトロピン放出ホルモンによる放出のように Ca^{2+} 依存性であるかどうかを調べた。FSH の自発的な分泌も Ca^{2+} 濃度を下げると低下し、 Ca^{2+} を加えると元にもどった。このことは、上に述べた対照群での FSH 分泌は、単なる漏出ではなく、自律的に分泌がおこっているためだということがわかる。

in vitro でのこのような両ホルモンの合成と放出に関する違いが、何らかの形で生体内の FSH と LH 分泌の制御に関与しているのではないかと考えられる。

生殖腺刺激ホルモンとその受容体の結合の 温度依存性と熱力学的特性

石居 進 (早稲田大学・理)

恒温動物においてはホルモン作用は40℃近い高温で生じていて、in vitroの実験系では低温にするとたいいてい反応は生じない。ところが変温動物ではホルモンは低温でも作用を現し、動物種によっては0℃近い温度でもホルモンが作用していると考えられる場合もある。そこで我々は生殖腺刺激ホルモンの一つ、ラットの濾胞刺激ホルモン (rFSH) を用い、その受容体に対する結合の物理化学的特性が温度によってどう変化するかを、3種の動物の受容体を用いて調べた。予備実験では十数種の動物を用い、結合量が、恒温動物では低温になると著しく低下するが変温動物ではそれほど影響を受けないこと、ことに両生類のイモリではある温度範囲では低温の方が結合量が高くなることを確めた。そこで本研究では恒温動物の代表としてラットの精巢の受容体を、変温動物の代表としてはクサガメとイモリの精巢の受容体を用いた。rFSHは ^{125}I で標識、受容体としては精巢の粗膜分画を用いた。ラットにおいては結合の親和性 (平衡定数: K_a) は35~40℃が最も高かった。イモリではその繁殖温度である15~20℃が最も高かった。クサガメでは0~40℃の範囲では K_a はほとんど一定であった。結合部位の数はどの動物でも温度によってほとんど影響されなかった。すなわち、FSH受容体は動物によってその物理化学的特性が異なり、温度環境に対する適応を示していることが明らかとなった。また、 K_a の温度に対する関係から平衡についての熱力学的解析が可能となり、FSHと受容体の結合反応は系外からのエネルギーを必要としない、発エルゴン反応であること、また、至適温度以下ではエントロピー依存反応であるが、至適温度以上になるとエンタルピー依存の割合が生じ高温ほどその割合が増大することがわかった。またこれらの特性から結合には疎水結合の関与が推察された。

イソギンチャク毒素による Na-チャンネルの解析

佐武 明 (新潟大学・脳研), 藁科 彬 (新潟大学・医)

山岸 俊一・杉山 博之 (生理研)・藤田 省三 (特定領域奨励研究員)

イソギンチャク毒素はサソリ毒素とともに、膜電位依存性 Na チャンネルの不活性化を抑制する作用をもつことで知られている。Barhanin ら (J. Biol. Chem. 256, 5764-5769, 1981) は、イソギンチャク毒素の一種である ATX-II (*Anemonia sulcata* toxin II) について、種々の修飾剤の毒性と結合活性に対する影響について調べ、興味ある結果を報告している。すなわち、毒素のすべてのカルボキシル基 (3 ケ) をグリシンエチルエステルでアミド化した誘導体の結合活性は、ATX-II とほぼ等しいが毒性が非常に低下してきた。このことが事実なら、毒素の作用は結合及び反応の二段階を経ていると考えられる。そこで我々は別種のイソギンチャク (*Parasicyonis actinostoloides*) の毒素 PaTX 及び ATX-II についてアミド化を行い得られた毒素誘導体の性質を調べた。毒素と¹⁴C-グリシンエチルエステルを水溶性カルボジイミド (EDC) 存在下で 24 時間反応させ、SP-又は CM-セファデックスカラムで、反応物を分画した。ATX-II は 3 個のカルボキシル基をもつが、得られた誘導体三種は¹⁴C 比放射活性からそれぞれ毒素 1 分子あたり 1, 2, 2 個のグリシンエステルを含み、3 つのカルボキシル基すべてが修飾された誘導体は得られなかった。PaTX は 2 個のカルボキシル基をもつと予想されているが、得られた誘導体は一種のみであった。各誘導体についてザリガニ巨大神経に対する作用を膜電位固定下に観察した。ATX-II, PaTX とともに 3-アミノピリジン存在下において Na 電流の不活性化を抑制するが、ATX-II の誘導体は ATX-II にくらべ作用が弱く不活性化の抑制は不完全であった。しかし、この状態で ATX-II を加えると不活性化の抑制は進行するので、ATX-II 誘導体が Barhanin の報告のように毒性を示さずに毒素結合部位を占有していた可能性はほぼ否定できる。Barhanin らとの結果の相違は、とりこまれたグリシンエステルの量の差もしくはアッセイに使用した神経の違い (neuroblastoma とザリガニ巨大神経) にあると考えられる。PaTX の誘導体についても調べたが、ATX の場合とほぼ同様に毒性は弱く、また毒素結合部位の占有を示唆するような結果は得られなかった。

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

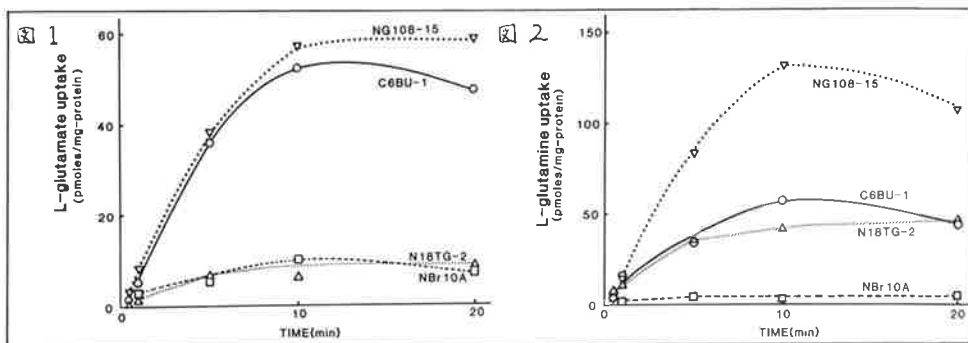
永田 豊・安藤 正人・難波 経篤・奥谷 正人 (名古屋保健衛生大学・医)

杉山 博之 (生理研)

〔研究目的〕 昨年度我々は、グルタミン酸 (GA)・グルタミン (GM) 代謝回路について glutamine synthetase (GS) と glutaminase (GMase) の活性を、ニューロンおよびグリア細胞の特性をもつ培養神経系腫瘍細胞株について検索した結果、glioma は GS 活性を高く示すが、neuron モデル細胞には GMase 活性が高いことを、報告した。今回これらの培養細胞株のグルタミン酸 (GA) またはグルタミン (GM) の取り込み過程を調べ比較検討した。

〔方法〕 1) 細胞培養：4 種の細胞株の培養方法は、本年報第 3 巻ですでに述べた。2) GA および GM の取り込み： $[^{14}\text{C}-\text{u}]$ L-GA または、 $[^{14}\text{C}-\text{u}]$ GM (ともに $1\ \mu\text{M}$, $2\ \mu\text{Ci}/\text{ml}$) を含む Krebs-Ringer bicarbonate 液中に細胞を浮遊させ 37°C で incubate しながら、経時的にその一部をとり、membrane filter (東洋汙紙 TM-1 孔径 $0.65\ \mu\text{m}$) 上のにせて吸引しながらリン酸緩衝液で充分洗滌した。その filter を Bray のシンチレーション液中に溶かして、その放射活性を測定して細胞内へ取り込まれた GA または GM の量を求めた。

〔結果ならびに考察〕 GA と GM とが、培養細胞内へ取り込まれる経過を比較すると、図 1, 2 の如く C6-glioma は、GA ならびに GM をかなり活発に取り込むことから、神経末端から刺激によって遊離された active な GA は、周囲の glia が積極的に取込んで不活性化するのみならず、GM をも細胞内に蓄積しうることを示唆している。しかし、neuroblastoma (N18TG-2) 細胞は、GA よりも GM をより多く取込み、GMase により



GA に変換して、伝達物質として利用するものと考えられる。一方, cholinergic neuron の特徴を明瞭に保持している NG108-15 hybrid 細胞は, GA も GM も共に活発に取込むことから, 刺激による GA の遊離と取込みと glia 内で GS により, GA から生成された GM をもニューロン内へ積極的に, 蓄積することが示唆される。NBr10A cell の GA と GM の取込み蓄積能力は低く, glutaminergic neuron としては機能しえないと思われる。

生物毒によるイカ巨大シナプスにおける伝達物質同定の試み

川合 述史・斉藤 光義 (東京都神経研)

山岸 俊一・古家 喜四夫 (生理研)

イカ星状神経節シナプスは, 太い径のシナプス前線維, 後線維から成る構造のため, 微小電極の刺入が容易であり, シナプス伝達の基本的な事項の多くはこの標本によって得られている。しかしこの部の伝達物質は未だ確定されていない。L-グルタミン酸が有力な候補物質として挙げられているが, 反論もある。例えば, R. Miledi はシナプス後電位とグルタミン酸電位の平衡電位 (逆転電位) が一致しない事を主張している (Miledi 1969)。最近川合ら (Kawai et al. 1982) はクモ毒よりグルタミン酸作動性シナプスを特異的に遮断する成分 (JSTX) を得たので, 山岸らとの共同実験により巨大シナプスに対するこの毒素の作用をしらべた。実験は 1983 年 2 月, 京都府伊根町, 伊根漁協加工場における実験室で行った。得られた結果は以下の通りである。

1) ヤリイカ星状神経節において, シナプス部に 2 本の微小電極を刺入し, シナプス前, (pre) 及びシナプス後 (post) 軸索の電位を記録し, これに JSTX を与えた。シナプス後電位は, ほぼ不可逆的に完全に抑制されたが, シナプス前活動電位は不変であった。また毒の作用後, post 軸索刺激による逆向性活動電位は, 投与前と変わらず, 毒の作用部位は, シナプス後膜部と考えられる。

2) L-グルタミン酸 (10 mM) を灌流適用すると, post の膜電位は脱分極し, 活動電位およびシナプス後電位は抑圧される。これは, グルタミン酸によるシナプス後膜の脱感作に基づくと考えられ, 正常人工海水で洗う事によって回復する。この後 JSTX を与えて, シナプス電位を完全に抑制したあとに, グルタミン酸を与えても, 膜電位の変化は生じなかつ

た。

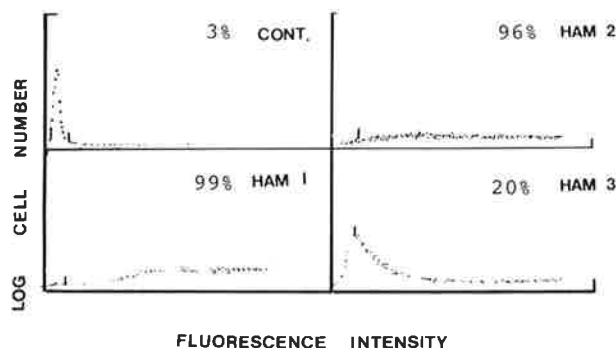
3) 上の結果などから, JSTX は, 巨大シナプスにおける, シナプス後電位及びグルタミン酸の作用をブロックする事が明らかになり, この部の伝達物質がグルタミン酸である事を強く示唆するものと思われる。

細胞膜受容体分子の単クローン性抗体による解析 (報告 2)

山下 昭・宮本 愛・福本 哲夫 (浜松医科大学)

杉山 博之 (生理研)

(I) 細胞膜受容体分子を含む各種細胞膜表面蛋白或は糖蛋白分子の性状の解析並びに各分子の細胞全体に果たす役割を解明するために, 各種膜分子に対する単クローン性抗体(以下略して mAb) を作製し, その抗体を用いて受容体分子の性状を検索することが可能となった。今回の研究では, 主として, 得られた mAb を用いて, 種々の細胞分化段階における細胞の細胞膜抗原の発現を, 成熟正常細胞のそれと比較検索し, 細胞膜表面抗原の発現が, どのように調節されているかを解析した。ラットの正常肝細胞に対する3種の mAb (HAM-1, HAM-2, 及び HAM-3) を用いて, 各抗体に反応する膜抗原が, 胎仔期に既に発現しているのか, 或は腫瘍化細胞の場合にはどのような発現様式を示すかという点を検索した。HAM-1 及び HAM-3 抗原は胎生末期に既に肝細胞に局限して検出され始めているのに対し, HAM-2 抗原はほとんど検出されなかった。腫瘍化細胞については, Flow cytography (FACS II, 岡崎国立共同研究機構) を用いて, 各種ラット肝癌細胞体 (AH13, AH44, AH66F など, 佐々木研, Dr 佐藤より分与) について検索したところ, HAM



-1 及び HAM-2 抗原は強陽性に発現していたが、HAM-3 抗原は全ての細胞株で検出されなかった (図 1)。以上の所見より、細胞表面抗原に対する mAb を用い、Flow cytography を使用して、細胞膜 (抗原) の分化・発現を解析しうることが明らかになった。

(II) 同様にラットの胸腺細胞膜に対する種々の mAb を用いて、各抗体に反応する膜抗原の胎生期と成熟期でその発現を比較検索したところ、OX 8 及び W 3/25 という胸腺細胞と T 細胞に特異的な膜抗原は、胎生の末期には既に胸腺に局限して強く発現していることがわかった。免疫応答において、主役を演じる免疫担当細胞の亜群である Helper T 細胞-W 3/25 ⊕ 細胞並びに Suppressor T 細胞-OX8 ⊕ 細胞へ分化する前駆細胞において、それぞれの特異的な膜抗原が既に胎仔期に胸腺に局限して発現しはじめていることが示唆されたことは興味深い。

音声情報の受容の分子機構と神経活動

柳沢 慧二・浅沼 厚・塩沢 光一 (鶴見大学・歯)

田中 康夫 (独協医科大学) ・谷口 郁雄・山岸 俊一 (生理研)

聴覚研究の究極の目標は人間の言語理解の仕組みの解明にあるが、そのためにはまだまだ未知のことが多い。本研究では末梢受容器での音受容の仕組みを分子レベルで解明する手がかりをつかむとともに、その神経活動への転換の過程をいくつかの方向から検討した。

有毛細胞の受容部位が不動毛の先端にあるということは、いくつかの研究から確実視されるようになってきた。この先端部ではどのような分子的機構でイオンチャンネルが形成されているかが問題であるが、われわれはイノシトールリン脂質が交換チャンネルを形成していると考えている。イノシトールリン脂質の代謝と音受容の関係を調べてみると、その代謝産物であるホスファチジン酸 (PA) が特に受容と関係しているようである。カナマイシンによって聴力障害を人工的に生ぜせしめたモルモットと正常のモルモット、さらに音を 30 分間 (90 db, 1 ~ 3 KHz) 負荷したものについて比べてみると、音負荷により PA の生成は上昇し、カナマイシンを投与して聴覚障害を起したものでは著明に減少した。この現象と変換チャンネルの関係については更に検討していきたい。PA は視細胞においても受容器電位発生に関係しているものとして注目されているし、Ca²⁺の担体になるともいわれて

いる。

蝸牛有毛細胞の機能を障害するものとしてシスプラチンも知られている。シスプラチン投与によってプライエル反射の消失したものでは、NBT還元能低下を指標にしてみると外有毛細胞が強く障害されたが、内有毛細胞では障害されていないようである。この動物で、正常動物でみとめられた Ca^{2+} による -SP の増大がみとめられなかった。外有毛細胞の機能や変換過程での Ca^{2+} の役割を知るために有効な手段であると思われる。

刺激音の作製、負荷、校正に音響実験室及び附属装置を用いた。

海馬の亜鉛に関する研究

小野 哲・和田 攻 (群馬大学・医)

山岸 俊一・尾崎 毅・内菌 耕二 (生理研)

〔目的〕 脳内では海馬においてジチゾンや Timm 法により染色される亜鉛 (染色亜鉛) の多いことが知られているが、その存在状態や役割について未だ定説はない。Timm 染色法による電子顕微鏡写真もこれまで発表されてきたが、いずれも微細構造がかなり壊れた像であった。その理由は、これまでの Timm 法において染色液の pH が 2 ~ 3 と著しく低かったためと推測されたため、染色操作をすべて生理的条件に近い pH で行なう Timm 改良法の開発を試みた。また染色亜鉛の存在状態を知るため染色亜鉛と結合する相手物質の探索を行なった。

〔方法〕 Timm 改良法開発のために、硫化水素飽和、2.5% グルタルアルデヒド、0.2 M リン酸 buffer pH 7.3、を含む溶液を固定液として用い、ラットの生体固定を行なった。固定後海馬をとり出し、1 ~ 2 mm のスライス作成、リン酸 buffer で硫化水素除去後、海馬スライスおよび 2 ml リン酸 buffer を内液とし、0.2 M リン酸 buffer pH 7.3、2 mM クエン酸、10% 硝酸銀 3 滴を含む 300 ml の内外液に対し、26°C、暗室で 24 時間透析した。透析後スライスをとり出し、電子顕微鏡試料とした。染色亜鉛の相手物質探索材料としてウシ海馬の凍結乾燥物を用いた。また染色亜鉛検出には岡本らのジチゾンを用いる方法、亜鉛の定量は無炎原子吸光によった。凍乾海馬より 50% エタノール抽出、アセント沈殿、10% 酢酸抽出、Ponceau S 処理などを経て、凍乾海馬 1 g 当たり約 0.5 mg の白色粉末を得た。

〔結果および考察〕 Timm 改良法のための電顕試料は、肉眼および弱拡大光顕レベルで

は、これまで報告された位置に銀が析出した Timm 染色像が観察され、電子顕微鏡による観察は目下実験中である。染色亜鉛は操作を進めるに従ってジチゾンで染色される粒状の物質が濃縮された。10%酢酸に溶解した段階でゲル漿過を行なうと、分子量数百〜千と思われる位置に亜鉛および N 末のピークが観察された。得られた試料は薄層クロマトにおいてペプチドと思われるシングルスポットを示すが、これを 6 N 塩酸で加水分解すると、アビゼル薄層上で Ala, Gly, Glu, Asp, His, Leu, Val など約 10 スポットのアミノ酸が検出された。またダンシル化法による N 末アミノ酸をポリアミド薄層を用いて同定を試みたが、Ser および His に非常に近い位置に 2 スポットが観察された。しかし、コクロマトの結果上記アミノ酸ではないことが判明した。今後さらに精製を進めると共に N 末の末知スポットの同定および生体内における役割りを解明したい。

神経繊維の興奮と伝達におけるホスホリパーゼ C の作用

池沢 宏郎・中島 正博 (名古屋市立大学・薬)

山岸 俊一・杉山 博之 (生理研)

Bacillus thuringiensis 菌の精製ホスファチジルイノシトールホスホリパーゼ C (PIase) 及び *Bacillus cereus* 菌の精製スフィンゴミエリナーゼ (SMase, スフィンゴミエリン分解型ホスホリパーゼ C) を、ヤリイカの巨大神経繊維に作用させて、その興奮と伝達にどのような影響が現れるかを調べた。

巨大神経軸索内灌流液としては、内液 I (25 mM KF を含む 1 mM K-Hepes buffer, pH 7.4 にグリセロールを加えて外液と等張にしたもの) あるいは内液 II (25 mM K-glutamate を含む 1 mM K-Hepes buffer, pH 7.4 にグリセロールを加えて外液と等張にしたもの) を用い、外液としては、NaCl 510 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 50 mM, 20 mOsmolar Na-Hepes bufer の組成のものを用いた。この場合、神経軸索内側からのホスホリパーゼ処理は、次のように行なった。すなわち、内液 I 5 ml に PIase 58 units あるいは SMase 5 units, 内液 II 5 ml の場合は PIase 4.8 units を加え、これらの溶液で軸索内を灌流した。一方、神経軸索外側からのホスホリパーゼ処理は、次のように行なった。外液 5 ml に PIase 20 units あるいは SMase 5 units を加えて、神経に作用させてみた。以上の酵素処理に基づく、巨大神経の活動電位および静止電位を経時的に追跡したところ、外

液および内液 I に PIase や SMase を加えて神経に作用させた場合には、活動電位、静止電位ともに変化は見られなかった。しかし、内液 II に PIase を加えて神経に作用させた場合には、PIase 作用後 5 分間で活動電位が約 60% のレベルにまで低下し、静止電位も約 80% にまで減少した。その後、神経内部を内液 II で洗ったが、活動電位、静止電位はともに減少し続け、最終的には、活動電位が当初の 10% に、静止電位が 60% にまで減少した。その後、灌流液を内液 I に変えたところ、かなりもとの状態に近い活動電位、静止電位にもどった。

以上のことより、巨大神経の膜構造が、PIase の作用によって、K-glutamate の灌流液では正常な状態とならず、KF の灌流液で正常な状態に保てるような膜構造に変化したものと思われる。また、巨大神経において、イオンチャネルと膜ホスファチジルイノシトールとの間に何らかの相互関係があることも予想される。

非筋（刷子縁）細胞の微細構造と機能

大澤 一爽（東京大学・医）

山岸 俊一・内菌 耕二（生理研）

小腸刷子縁細胞の terminal web より microvilli 上部にかけて actin, myosin 分子が細胞質骨格構造をもっていることが Heuser ら (J. Cell Biol., 91, 399, (1981), J. Cell Biol., 94, 425 (1982)) により、彼らが開発した quick-freeze, deep-etch, rotary-replication method を用いた実験により明らかになった。actin core bundle から約 100 Å の microfilament が banded filament として brush border membrane に接着している。actin からの cross-linked filament は 37.5 nm のピッチをとって actin core bundle をラセン状にとりまき、brush border membrane の極性を維持している (J. Cell Biol., 92, 657 (1982))。

Terminal web を含む小腸刷子縁細胞分画からは actin, myosin (軽鎖, 重鎖共にある), Villin, fimbrin, calmodulin, troponin 分子が SDS ポリアクリルアミドゲルの電気泳動を用いて同定された (J. Cell Biol., 95, 943 (1982))。一方、干渉と位相差光学顕微鏡により、terminal web の contraction がビデオ・カメラに記録された。同じく刷子縁細胞の脱膜標本を用いて actin と myosin のみに分離しても低濃度の Ca^{2+} と ATP 溶液を付加して

terminal web 部分に contraction が起こり、生化学的には phosphorylation も証明されたことから、terminal web は機械運動を行ない、contraction をしている可能性が強くなった。その他に brush border microvilli は actin bundle により retraction を起こすことも報告され、平滑筋と同様な運動をしていて、然も、energy を多く必要としない catch 機構又は latch 機構を用いて、微動していることが明らかにされつつある。次の EM の課題は生体中の amorphous の物質構造を如何にとらえるにかかっている。

contraction や retraction が非筋細胞で発生すると、それを記録する機械曲線はどうなるのか。従来の主な機能の 1 つである細胞膜吸収機構との関係はどうなるのか。E-C coupling のような機構があるのかどうか等の解明が必要となる。動物は動く機構をもっているから動物と名付けられたのであろうが、動くための energy を吸収させる最先端 (微絨毛) に contraction と retraction が存在していることは、動くという単純な機構をみただけでも驚くべき発見の 1 つであろう。今後、機能と構造の関係を明らかにするように実験を続けている。

細胞膜内外の表面に結合するリガンドによる 形態変化とイオンチャンネルの修飾

平野 寛, 西山 邦昭 (杏林大学・医)

山岸 俊一, 古家 喜四夫 (生理研)

〔はじめに〕 通常フェリチン分子 (native ferritin, NF: $pI \approx 4.6$) をカチオン化した陽性荷電フェリチン (cationized ferritin, CF: $PI = 8.0 \sim 9.0$) を用いて、細胞表面の荷電状況を生理的な pH やイオン強度のもとで電顕的に検索することができる。CF が細胞表面に結合すると、レクチンや抗体など多価性リガンドを作用させた場合と同様、細胞膜外表面に沿って結合部位が移動し、クラスター (cluster) や集塊を形成、細胞内へ急速に取り込まれることは良く知られている。しかし細胞膜内表面における CF 結合様式については殆んど知られていない。一方 CF 結合により顕著な形態変化がひきおこされるにも拘わらず、膜機能に及ぼす CF の作用もまた依然解明されていない。本研究では神経膜内表面に CF を直接結合させ、電顕的及び電気生理学的観察とを同一標本で平行して行い、CF が細胞膜内表面に結合した結果を検討した。

〔材料と方法〕 ヤリイカ (*Doryteuthis bleekeri*) 巨大神経線維をとりだし、ローラー法で細胞質成分を外側に排出し、pronase (Calbiochem, 最終濃度 0.01%) を含む細胞内灌流液

(50 mM KF, Hepes, pH 7.4) で神経膜内表面を露出させ、洗浄 (250 mM KF, Hepes, pH 7.4) 後、CF 又は NF (0.5 mg/ml, pentex-Miles, 250 mM KF, Hepes pH 7.4) を 0℃又は 10℃にて 1-30 分間神経膜内表面に直接作用させた。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、洗浄、アルデヒドとオスミウム酸による二重固定を経て通常のエポン包埋薄切標本を作製、透過型及び走査型電子顕微鏡にて観察した。

〔結果〕 巨大神経線維外側はシュワン細胞や結合組織により被覆されているが、神経膜内表面は機械的及び酵素処理により露出している。CF 投与 3 分後には既に膜用表面に瀰漫性に CF が結合している (約 3,000 個/ μm^2)。一方膜活動電位は、duration (2.8 msec) が 2 倍程度に延長される。静止電位 (-58 mV) 及び活動電位 (130 mV) の大きさには殆んど変化がなかった。膜電位固定法 (voltage clamp) によると、10 mM tetraethylammonium 存在下で内向き電流の幅は CF 投与に伴い延長するが、0.5 μM tetrodotoxin 存在下で外向き電流には変化がみられなかった。

〔結論〕 1) 細胞膜内表面においても CF は結合する。即ち、細胞膜内表面も外表面の場合と同様陰性に荷電していることが電顕的に直接観察され、*in situ* で確認された。

2) CF 分子は細胞膜内表面に沿って単層をなして一様に結合した。但し細胞膜外表面における場合と異なり、クラスター化 (clustering) や集塊形成、或いは膜の陥入内在化 (internalization) に相当する現象は認められなかった。

3) CF 結合に伴い、神経膜活動電位の duration は 2 倍程度延長されたが、静止電位及び活動電位の大きさには殆んど変化が認められなかった。膜電位固定法により、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ことが確認された。

4) 神経膜内表面に結合した CF は膜を構成する高分子を架橋し、ひいては Na channel inactivation の過程を抑制する方向に作用すると考えられる。

甲殻類における神経分泌機構の研究

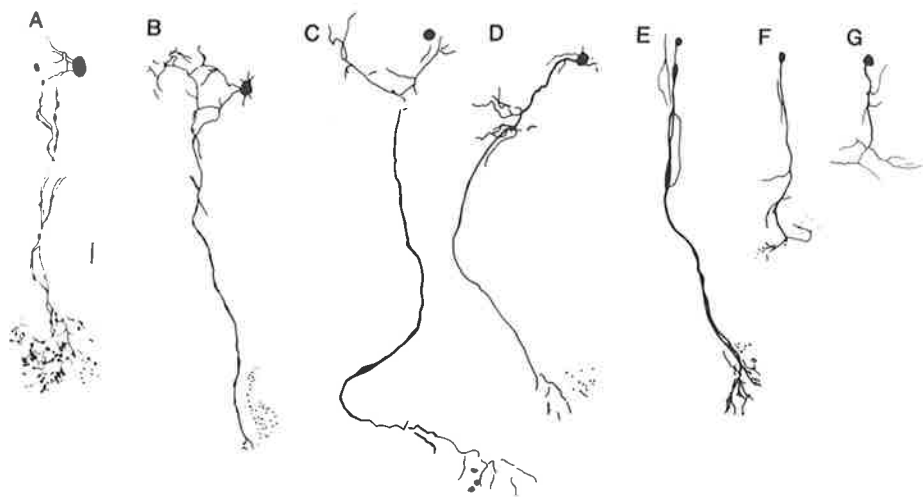
長野みさ子 (東京医科歯科大学・難研)

甲殻類の眼柄にある x-organ-sinus gland system (XOSG) は数種のペプチドホルモンを分泌する神経分泌器官であることが知られている。一般にホルモンの分泌の調節には神経分泌細胞の自発性の活動電位が影響を与えると言われているが、この系において、時間

的、また空間的に作用を異にしている数種のホルモンがどのような機構で分泌されるか、詳細は不明である。本研究では微小電極を用いて蛍光色素 Lucifer yellow (L. Y.) を細胞内注入する方法で、数種の甲殻類の XOSG の神経分泌細胞の形態を比較検討した。

実験材料としてはスクリーニングの意味で、ザリガニ、ガザミ、シャコ、クルマエビあるいはイセエビを用いた。その中でザリガニ Procambarus clarkii とガザミ Portunus trituberculatus の XOSG において、以下のような一定の結果を得ることが出来た。3% L. Y. (1M LiCl 溶解) を詰めた微小電極は電極抵抗約 100 MΩ であり、L. Y. は 0.1 Hz, 1 秒, 0.5 nA 以下のパルスで約 30 分～1 時間、電気泳動的に注入した。標本は L. Y. 注入後、直ちに 4% フォルマリンで固定し、冷暗所に保存し、数時間～1 日後に落射型蛍光顕微鏡で写真撮影した。図の A～C はガザミ、D～E はザリガニの XOSG に L. Y. を注入したものである。図 B, D, G, は細胞体に (図の上側)、他は軸索に微小電極を刺入した。図 A では、2 度、軸索に L. Y. の注入を試みたため、2 つの unit が観察されるが、他は、すべて、一度の注入で、一つの細胞体と長く伸びる一本の軸索、そして、軸索の末端では、分枝した多数の分泌終末が見られる。また、軸索の所々に分泌終末様の脹み (Varicosity) が観察され、分泌が分泌終末に限局しないという報告と一致する。ガザミでは、特に、細胞体の近くに多くの線維の枝分れが見られ、中枢神経からの情報を伝達し、また、細胞体相互の情報を交換し合う可能性を示唆している。しかし、この実験においては、Dye-coupling はほとんどの標本で観察されず、図 E において、わずかに細胞体側に 2 つの細胞体様の構造を認めるのみである。

図:スケールは 100 μm。詳細は本文に示す。



神経毒を用いた神経興奮発生機構の研究

瀬山 一正 (広島大学・医)

種々の Toxin を用い発生する Na チャンネル機構の変化を通じて神経興奮発生機構を解明する目的で実験を行なっている。今回は主として二つの実験を企画した。即ち (i) Na チャンネルを特異的に開放状態とするグラヤノトキシン (GTX) の作用機構を明確にする事と (ii) 新たに抽出されたクラゲ由来の天然毒と蛙の皮膚由来の天然毒の作用機構について調べる事であった。(i) については従来の結果より次の様な作業仮説として実験

$C \rightleftharpoons O \rightleftharpoons I$ を進めている。この内今回は特に $C^* \rightleftharpoons O^*$ (GTX の改変した Na チャンネルの閉鎖状態から開放状態への変化) を強調する実験条件とこの間の $C^* \rightleftharpoons O^*$ kinetics の変化を明らかにした。又, GTX のレセプターとの結合の電位依存性についても調べた。(ii) についてはアンドンクラゲ触手の粗抽出液の神経作用を調べた。25 $\mu\text{g/ml}$ の粗抽出液は心拍停止を起こすといわれる。この粗抽出液を細胞内及び外から各々投与した。濃度範囲は 25 $\mu\text{g/ml}$ から 400 $\mu\text{g/ml}$ であった。その結果 Na 電流及び K 電流系いずれにおいても部分的ブロックが発生する事が明らかになった。次いで蛙皮膚由来の Trypargin (TRG) について細胞内投与を行なった。1 μM TTX 存在下では K チャンネルに対しては TRG を $1 \times 10^{-6}\text{M}$ から $1 \times 10^{-4}\text{M}$ の濃度範囲で投与しても何んら影響しなかった。これに対し Na 電流は TRG $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 存在下で Na チャンネルの開放毎に閉鎖を起こした。その際 m 及び h ゲートの時定数の減少が生じた。 $1 \times 10^{-4}\text{M}$ においてはこの傾向は一層顕著になり 1 秒 1 回の脱分極で第三回目刺激の時完全閉鎖された。この濃度において m 及び h ゲートは開閉が促進された。しかし、今回の機器の解像力では時定数を正確に決められなかった。ともあれ TRG は細胞内から Na チャンネルにのみ作用し m 及び h ゲートの閉鎖時間及び開放時間を短縮する様にする。このため h ゲートの閉鎖時間が短縮された結果 Na チャンネルは閉じられるのではないかと推測される。TTX とは異なる機構での Na チャンネルの閉鎖が起こっていると考えて差し支え無いであろう。

膜輸送 ATP ase に対する二価陽イオンの作用—Ca—ATPase と Na—K—ATPase における比較研究

藤井 順逸・山田 真平・片山 一 (静岡大学・理)

中尾 真・福島 義博 (生理研)

生体膜における陽イオンの能動輸送は膜に組み込まれている ATP ase によって触媒されており、ATP の加水分解に共役している。この膜輸送 ATP ase の反応に二価陽イオンが必要であり、重要な作用を行なっている。一つは ATP と複合体を形成して基質として ATP ase に作用するものである。他はこれとは別の二価陽イオン作用が知られ注目されているが、その作用機作について明らかになっていない。陽イオン能動輸送の機構を明らかにするために一価陽イオン輸送 ATP ase としてよく知られ、代表的なものである $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP ase}$ と $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP ase}$ の反応における二価陽イオンの作用様式を明らかにし、さらに両者について比較検討が必要である。

ウサギ骨格筋から通常の方法で筋小胞体膜分画を抽出し、さらに Ikemoto の方法で Triton-X-100 によってソルビライズした後精製した Ca—ATP ase 標品について ATP ase の反応を行なった。その結果、全反応 (overall reaction) に対して高濃度 Mg^{2+} は Ca^{2+} (約 10^{-3}M) と Ca^{2+} (約 10^{-4}M) による障害が明らかになった。従来高濃度の Mg^{2+} は Ca^{2+} 輸送部位に対して抵抗的に障害する事が知られているが、ここで測定されたものは全反応に対してのもので輸送部位に対する抵抗障害は反応速度の速いリン酸化中間体 (E~P) 形成過程で現われるものである事から、別の素過程に対する Mg^{2+} の障害である。E~P 分解過程を直接測定した場合も同様の結果が得られ、 Ca^{2+} に対して非抵抗的であった。この結果、① E~P 分解過程 (E^2P の分解過程) に Mg^{2+} の障害部位が存在する。② E~P から Mg^{2+} が遊離する過程が存在する。など考えられるが、この点を明確にするためさらに、くわしい素反応に対する二価陽イオンの影響について調べ、Na—K—ATP ase での測定結果との比較研究が必要である。

腎耐塩細胞のナトリウムポンプと耐塩適応機序

佐藤 温重・小沢 和子・甫井 康宏・坂寄 雅美 (東京医科歯科大学・歯)

中尾 真・福島 義博 (生理研)

腎髄質部は体液の数倍の高浸透圧となっており、髄質細胞は耐浸透圧、耐塩機構を有していると考えられる。本研究は耐塩機序を明らかにするために佐藤らがウサギ腎髄質部より分離し継代培養している KNG 3 細胞系の高塩適応時における塩類特異性、 $\text{Na} \cdot \text{K} \cdot \text{ATPase}$ 活性の変化について検討した。

KNG 3 細胞を 0.25%トリプシン、0.02%EDTA で単離し、仔牛血清 30%漿加した改変 Ham F 12 培地 (以下等張培地) を用い、プラスチックフラスコ中、37℃で単層培養し、confluent になった時に (1) 塩類特異性を調べるために培地に KCl を適量加え最終浸透圧を 370, 450, 600 mOsm/l とした培地と交換し、2 日間培養した後の細胞の生存を位相差顕微鏡で調べた。また (2) $\text{Na} \cdot \text{K} \cdot \text{ATPase}$ 活性の変化を明らかにするために等張培地及び NaCl を添加し浸透圧を 600 mOsm/l とした培地に移して 1, 2, 4, 8 時間後に細胞をラバーポリスマンで基材より剝離し、0.32 M Sucrose 0.5 ml 中でホモジナイズした。

ATPase 活性は MgCl_2 5 mM, Imidazole 25 mM, Hepes 25 mM, H_4EDTA 0.1 mM, NaCl 130 mM, KCl 14 mM, Na_2ATP 5 mM の混合液 0.25 ml, 50 mM Na_2ATP 50 mM ^{32}P -ATP 溶液 0.05 ml, ホモジネイト 0.2 ml を 37℃, 20 分インキュベートして遊離 ^{32}P を測定し、各 3 例の平均 $\mu\text{mole Pi/mg 蛋白質/hr}$ で表わした。 $\text{Na} \cdot \text{K} \cdot \text{ATPase}$ 活性は Ouabain 0.5 mM 存在下で Ouabain 不感受性 ATPase を測定し、全 ATPase 活性との差から求めた。

KNG 3 細胞は等張培地に NaCl を加えて作成した 600 mOsm/l 培地中ではその形態、生存において等張培地中でのそれと同じであった。KCl を加えて作成した 370 mOsm/l 培地では等張培地と差が認められなかったが、450 mOsm/l 培地では 3 時間後から形態が線維芽様であったものが多角形に変わり、一部細胞は変性した。600 mOsm/l 培地では、1 時間後にすでに細胞の収縮があり、24 時間後にはすべての細胞が変性した (図 1)。KNG 3 細胞の $\text{Na} \cdot \text{K} \cdot \text{ATPase}$ 活性は等張培地に移し 2 時間後に増加したが、4 時間以後は減少した。一方 600 mOsm/l 培地に移した細胞の $\text{Na} \cdot \text{K} \cdot \text{ATPase}$ 活性は 1 ~ 2 時間後では等張培地群と差がなかったが、4 ~ 8 時間後も減少せず、等張培地群に比し高い活性を有していた (図 2)。

KNG 3 細胞は NaCl 351 mM, KCl 3 mM を含む高張培地中で生存できるが, NaCl 136

mM, KCl 231 mM を含む高張培地で生存不能であり、高塩耐性機序として Na ポンプの役割が示唆された。また、等張培地中の細胞は 4 ~ 8 時間後に Na・K-ATP ase 活性の著しい低下が認められるが、NaCl 高張培地中の細胞では低下はなく高い活性が維持されていた。しかしその活性は等張培地に 1 ~ 2 時間インキュベートした時の水準であり、この細胞の高塩適応の機構として Na・K-ATP ase 活性以外の機構の存在を示唆している。

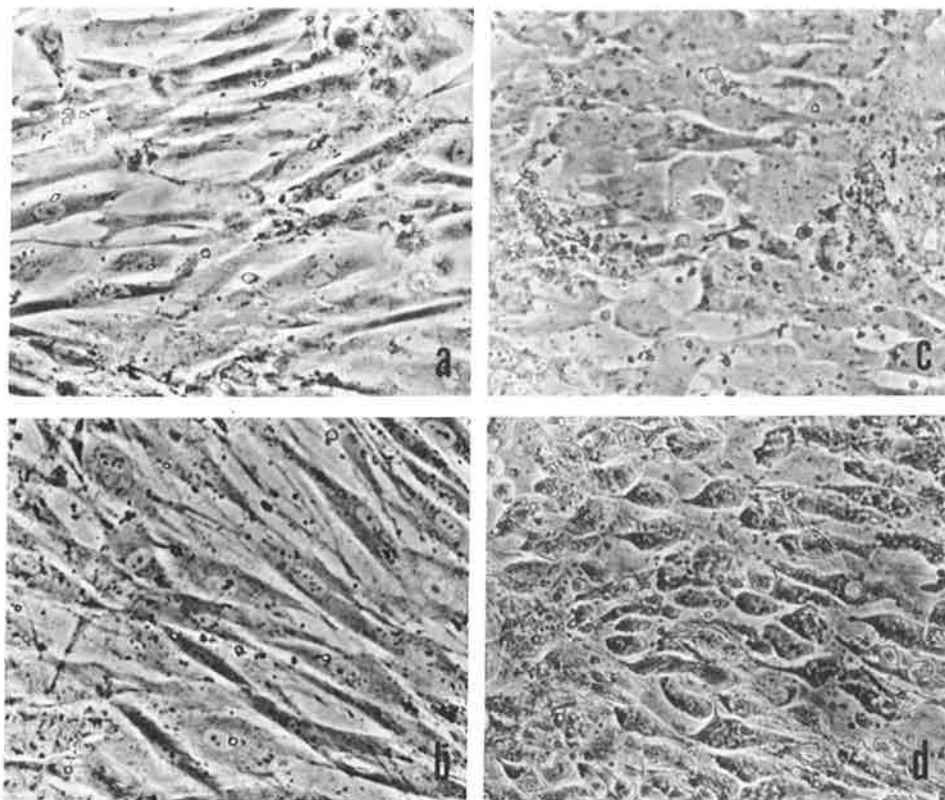


図1 KNG 3 細胞の位相差顕微鏡写真 a:NaCl を加え 600 mOsm/l とした培地中 48 時間中 48 時間培養 b:KCl を加え 370 mOsm/l とした培地 24 時間培養 c:KCl を加え 450 mOsm/l とした培地 7 時間培養 d:KCl を加え 600 mOsm/l とした培地 7 時間培養。

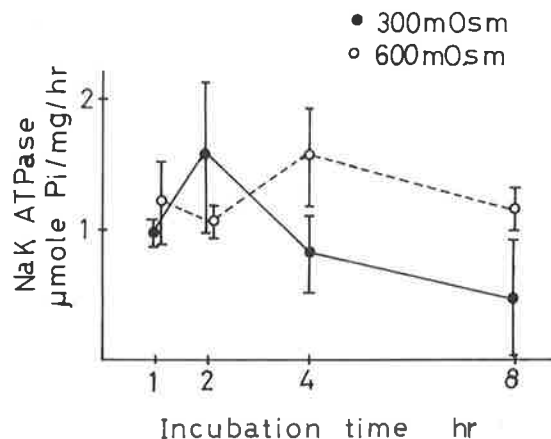


図2 等張および高張培地における KNG 3 細胞の Na・K-ATPase 活性。

神経芽種および神経膠腫培養細胞のナトリウムポンプ

浦山 修 (東京医科歯科大学・医)
中尾 真・杉山 博之 (生理研)

〔目的〕 高等動物脳のナトリウムポンプ Na, K-ATPase には酸素反応の動力学とリン酸化中間体の大きさからみて脳にのみ局在する分子種と他組織にもみいだされる分子種 (共通型) の二種類がある。私達は神経培養細胞においてこれら二種のアイソザイムの分布を系統的に調べている。昨年度はマウス神経芽腫 N 18 TG 2 とラット膠腫 C 6 BU 1 がともに上記二種の酵素を含むことを明らかにした。今年度は N 18 と C 6 のハイブリドーマである NG 108-15 について、デブチル cAMP を添加培養した分化型細胞と非添加の未分化型細胞からそれぞれ膜分画を調整し、それらの Na, K-ATPase の酵素学的性質を調べた。

〔方法〕 NG 108-15 神経芽腫はウシ胎児血清 (10%) およびヒポキチンサン・アミノプテリン・チミジン添加の培地 DMEM でデブチル cAMP の有無でそれぞれに培養した。Na, K-ATPase 活性を、デブチル cAMP 添加細胞では低張処理後核分画に、非添加細胞では等張でホモジナイズ後核分画、あるいはミクロソーム分画に回収した。活性測定は

(α - ^{32}P) ATP の分解によった。Na, K-ATP ase の脳時有型と共通型の区別は昨年度と同様 (1) ウアバイン感受性 (2) 酵素を (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を行ない, そのリン酸化中間体 E- ^{32}P の泳動位置をオートラジオグラフィーで観察することより行なった。

〔結果・考察〕 (1) ウアバイン感受性: デブチル cAMP 添加細胞の Na, K-ATP ase 活性は 4000 μM ウアバインで完全阻害されるが, 1 μM および 100 μM でそれぞれ 25% および 55% 阻害でウアバインの作用は一次阻害にはならず, 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。非添加系でも一次阻害にならなかった。(2) リン酸化中間体の泳動位置: デブチル c-AMP 添加系で 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分子量 100,000 付近に二本 (分子量の 2,000 ほど大きい方が脳時有型の, 小さい方が共通型の触媒活性サブユニット) 観察された。非添加系では比較的比活性の高い酵素標品ではじめて 2 つのリン酸化中間体が観察された。

キングヨ網膜におけるシナプスの機能と微細構造

金子 章道 (生理研)・井上 芳郎 (北海道大学・医)

寺島 俊雄 (北海道大学・医)・井上 馨 (北海道大学・医)

川野 晃一 (慶応大学・医)・田内 雅規 (生理研)

網膜のアマクリン細胞は内顆粒層の内側に位置する神経細胞であり樹状突起の拡がり直径 1 mm に達する。細胞内記録によってこれらのアマクリン細胞は脱又は過分極性電位を示す持続型と光照射の点滅時のみに一過性の脱分極を示す過渡応答型に分類されている。ゴルジ法 (渡銀法) によってアマクリン細胞は双極細胞と他のアマクリン細胞から入力を受け, 又再び双極細胞, アマクリン細胞そして神経節細胞へ出力信号を送ると考えられている。そこで本研究では 2 種の双極細胞 (on 型と off 型) とこれらのアマクリン細胞がどのようなシナプス結合を有するのかを形態学的に解析するため, 光応答を記録したアマクリン細胞に HRP 細胞内染色を行ない, 標識したアマクリン細胞と双極細胞とのシナプス結合を検索した。

HRP 細胞内注入を終えた後、網膜をグルタルアルデヒドとパラフォルムアルデヒドの混合液で1時間固定しDAB法によってHRPを発色させた。細胞を光顕下で観察した後、型通り脱水、包埋した。

包埋した網膜標本は網膜の接線方向に連続切片を切り、標識された細胞体と樹状突起を同定し、画像解析装置によって全体像の復構を試みて、細胞体と樹状突起の位置を決めた。このための連続切片として2つの方法を試みた。(1) 光顕用厚切り切片 ($0.5\mu\text{m}$ 厚) を作った後、電顕用超薄切片 ($0.1\mu\text{m}$) を5枚作り、ミクトローム (MT-5000 型) の送りを $1\mu\text{m}$ 単位に、光顕切片と電顕切片を連続的に作製した。光顕切片より1,000倍の顕微鏡写真を作り、ニューロンの復構にあてた。もう1つの方法として(2) $0.1\mu\text{m}$ 厚の電顕用超薄切片を作り、そのうち $1\mu\text{m}$ 毎 (10枚毎) に低倍電顕像と高倍電顕像を得て、低倍像は画像解析装置で復構し、高倍像でシナプスを検討した。電顕切片はすべて1mm径のフォルムバール支持膜を張った単孔メッシュを用いた。

今回はエポン包埋の網膜標本の全体像が光顕下で観察出来なかったので、光顕像と電顕像の組み合わせによってアマクリン細胞の復構を行なった。アマクリン細胞の樹状突起野は直径1mm以上あるため、全体像を電顕で解析するのは極めて困難であったが、HRPを注入したアマクリン細胞膜に接着するシナプス終末の保存は良好で、シナプス終末の分析に十分耐え得ることが分かった。

本年度は予備実験の段階に終始したが、今後この結果を基に、エポン包埋の網膜標本を光顕下で詳細に観察した後、アマクリン細胞の全体像の超薄切片を作製し、入出力シナプスの同定と定量化を進めたい。

脊椎動物網膜の杆体・錐体経路の形態学的 及び電気生理学的研究

神山 暢夫 (東京女子医科大学)・大塚 輝彌 (生理研)

脊椎動物網膜の視細胞には光感度の異なる杆体と錐体があり、 10^{12} に渡る広範囲な光強度の変化を検出し2次ニューロンに暗所・明所の視覚情報を送っている。これらの視細胞と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視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。

われわれは昨年、クサガ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 (杆体と 3 種の錐体) 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、2 次ニューロン的一种である 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。本研究ではこの研究成果をさらに発展させるべく L 型水平細胞の細胞体と軸索終末から光応答を記録し、杆体及び錐体由来の成分を解析した。さらに形態学的に視細胞入力を調べるため、杆体・錐体とのシナプス結合を検索した。

杆体応答を記録するため実験には暗順応したクサガメの眼球盂標本を用いた。HRP をを詰めたガラス微小電極で杆体及び L 型水平細胞の光応答を記録した後、電気泳動的に HRP を細胞内注入した。DAB 法によりこれらの細胞の形態学的観察を光顕下で行なった。視細胞と L 型水平細胞のシナプス結合の検索のため、視細胞の同定は有色油滴と光顕用 ($1\ \mu\text{m}$) 及び電顕用 ($0.1\ \mu\text{m}$) 連続切片像の 3 者を比較して行なった。

図 1 は暗順応した網膜から得られた杆体と L 型水平細胞軸索終末の光応答である。杆体の光応答の最大振幅は、緑色光照射 ($520\ \text{nm}$) によって得られ、その閾値は 1 フラッシュ当たり $280\ \text{光子}/\mu\text{m}^2$ であった。一方、L 型水平細胞の光応答の閾値は約 10 倍高いが応答振幅の極大はやはり $520\ \text{nm}$ にあった。杆体の応答は光強度を増大させても振幅の極大は常に $520\ \text{nm}$ にあったが、L 型水平細胞の光応答は照射光強度の増大に伴って長波長側へ移行するのが見られた。

このように L 型水平細胞軸索終末の光応答は $520\ \text{nm}$ に応答極大を有する杆体由来と考えられる緩慢な過分極電位と錐体 (主に赤感受性錐体) 由来の一過性の過分極電位の 2 つの成分から成っていた。一方、細胞体の光応答からは杆体由来の緩慢な過分極電位は見られなかった。

さらに形態学的にこの問題を確めるため、L 型水平細胞と視細胞とのシナプス結合を電顕切片で検索した。L 型水平細胞は細胞体と軸索終末から成り、両者は細い軸索で結ばれている。この軸索は細胞体と軸索終末間を電氣的に絶縁することが分かっているので細胞体・軸索終末・各々 2 例ずつ視細胞間のシナプス結合を検索した。この結果、細胞体の樹状突起が杆体及び錐体とシナプス結合していた数は、杆体/錐体数で $1/62$ と $3/43$ であり 2 例の軸索終末では $2/25$ と $2/19$ であった。実験に用いたクサガメ網膜の背側中央部の杆体/錐体数の比は約 10% であるから、L 型水平細胞は選択的により多くの錐体とシナプス結合し錐体からの信号を受けていることが分かる。このため軸索終末の光応答に見られるように杆体成分が極めて小さいのであろう。また、細胞体から杆体由来の光応答が記録されない理由としては結合している杆体の数が少なく光応答では記録されないためであろう。

このように光応答の解析と形態学的な検索から L 型水平細胞は杆体及び錐体と 2 種の

結合をしていることが明らかになった。今後さらにこのように L 型水平細胞への入力数の少ない杆体が網膜における明暗の視覚情報にどのような役割を果しているのか解析してゆきたい。

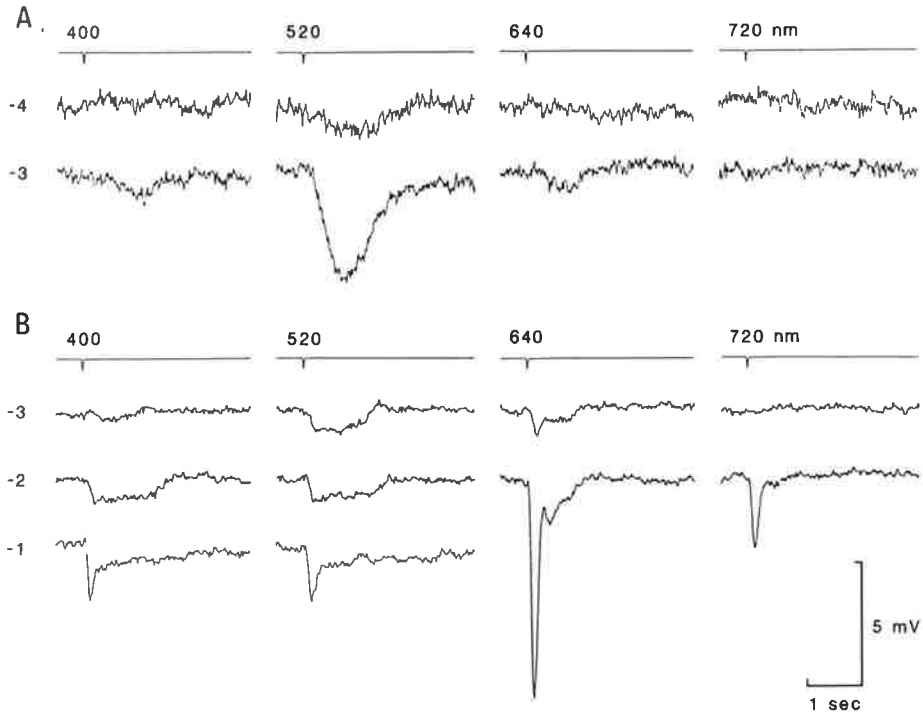


図1 暗順応したカメ網膜の杆体 (A) と L 型水平細胞軸索終末 (B) の光応答。光刺激は数字で示されている単色光を用い, 20 msec のフラッシュ光を網膜全体に与えた。各単色光は等光量子数に調節されており, 左端の数字は光量対数値を示す。対数値 0 は 1 フラッシュ当たり $280 \text{ photons}/\mu\text{m}^2$ に相当する。杆体と L 型水平細胞は光照射に対して過分極性応答を示し (A) (B) と同じ電圧校正値である。

網膜における桿体応答の空間特性と Dark Noise の分析

—特に異種視細胞間の機能的結合について—

田中 一郎 (国立身障者リハビリセンター研), 田内 雅規 (生理研)

山田 雅弘 (電総研・応用光学), 金子 章道 (生理研)

中谷 敬 (東京女子医科大学・生理)

近年数種の脊椎動物の網膜において桿体細胞間の電気的結合の存在が認められ、桿体内節間結合を示唆するような電子顕微鏡所見も報告された。更に *Chelydra serpentina* の網膜においては広面積の長波長光照射に対する桿体応答が周辺の錐体応答の影響を受けている可能性が示された¹⁾。また光受容細胞にみられる光依存性の膜電位変動 (dark noise) についての分析も進み、受容器レベルにおける情報伝達が従来考えられてきたものより複雑なことが明らかになってきた²⁾。

我々もこれまでに *Rana catesbiana* の網膜における単一桿体 (red rod) の光応答電位の面積効果が直径 150–200 μm におよぶことや、dark noise にも面積効果が存在することなどの実験結果を得た。この応答電位は空間的に“principle of univariance”に従わない傾向がある事も見出した。

桿体応答の空間特性および dark noise については最近別に報告²⁾したので、今回は一つの桿体が網膜上においてどのような種類の受容細胞と機能的に結合しているかを明らかにする目的で、種々の波長の単色光刺激に対する桿体 (red rod) の細胞内応答電位を比較検討した結果について報告する。結果を要約すると、長波長側においても異なる波長に対する刺激強度-応答振幅曲線の波形は一致せず、かつ異なる波長に対して同一振幅を持つ応答の潜時や波形も異なることが明らかになった。これらのことから細胞間の機能的結合が同種の桿体間のみでなく cone/green rod にもおよんでいることが示唆される。

〔方法〕 暗順応下にある食用ガエル *Rana catesbiana* の剝離標本は視細胞側を上にして、95%O₂, 5%CO₂混合ガスを飽和したリングル液灌流液槽中に置いた。3 M KCl を満したガラス管微小電極 (電気抵抗 100–200 M Ω) により、各波長光刺激に対する桿体 (red rod) の応答電位を誘導、記録した。

刺激光としては 400 nm から 655 nm まで 51 nm 毎の単色光を用い、視細胞側より持続 50 msec の flash 全面照射を行なった。刺激光強度は equal quantum とした各単色光毎に、校正した ND フィルターにより 0.25 log ステップで 6 log 単位の範囲とした。尚、0 log 単位の flash 強度は $2.61 \times 10^4 \text{ photon} \cdot \mu\text{m}^{-2}$ であり、これは今回用いた red rod については 502 nm に換算すると $3.39 \times 10^5 \text{ Rh}^* \cdot \text{flash}^{-1}$ に相当する。

実験は春季－夏季に行い、実験時の室温は約 20℃とした。

〔結果〕 各波長毎に光強度を低い方から順次高め、持続 50 msec の flash 全面照射に対する暗順応下の red rod の応答電位を記録した。この際静止電位約 30 mV、最大応答電位の振幅が 20 mV 以上であり、静止電位および応答電位ともに安定なものについて光強度と応答電位との関係を求めた。同一の桿体から得られた応答の peak における振幅 (R) を光強度 (I) の対数に対してプロットした例を図 1 (上) に示す。図に見られるごとく、各波長毎の $\log I$ —R 曲線は形状が異なり、I 軸にそって平行移動することにより互に重ね合わせることはできない。即ち 451, 502 および 553 nm に対する曲線はおよそ一致するが、400 および 604 nm に対するものは特に低い刺激強度の範囲で曲線の波形が異なる。更に 655 nm に対する曲線はこの傾向が著しい。

応答振幅について 1 mV、6 mV および 11 mV の criterion voltage を設定して得られた 3 本のスペクトル感度曲線を見ると、いずれもロドプシンの吸収曲線における $\lambda_{\max}$ (502 nm) と一致し、それより短波長側では各曲線が重なったが、長波長側では明らかな差異が見られた。即ち長波長側では予想される値より感度が高く、これは特に criterion voltage が小さい場合に著しかった。

各波長について強度の異なる刺激光に対する応答電位のうちから同一振幅のものを選びそれらの波形を比較すると、451 から 553 nm のものはいずれもほぼ一致した。しかしより短波長および長波長に対する同一振幅の応答は波形が一致せず、502 nm に対する同一振幅の応答に比べて peak 到達時間が減少し、過分極率が増加した。例えば 400, 502 および 655 nm の刺激に対してそれぞれ振幅 6 mV の応答の peak 到達時間を見ると 290, 330 および 300 msec であった。応答波形の比較の例として 400 および 655 nm に対する応答を振幅の等しい 502 nm に対する応答と重畳して比較したものをそれぞれ図 1 (下) の左および右に示す。

〔考察〕 以上の結果は広面積照射に対する単一 red rod の応答が光波長に関して “principle of univariance” に従わないことを意味する。この現象は単一の桿体に局限した光刺激では認められない。桿体のこのような性質に関しては現在までに長波長光刺激に際して *Chelydra serpentina* の桿体においてのみ報告されている¹⁾。今回の *Rana catesbiana* についての結果を加えて考えると、このような桿体の性質が脊椎動物に一般的なものである可能性も存在する。また今回は長波長側のみでなく短波長側においても同様の現象が認められ、“principle of univariance” に従わない波長の範囲は著しく広いことが示された。このことは red rod を周辺の視細胞との機能的結合が同種の桿体のみでなく cone/green rod にも及んでいることを示唆し、網膜における初期情報処理機構を解明する上で重要であり、今後より詳細な実験が必要である。

尚, 現在 Co^{++} 添加リング液灌流下で同様の実験を試みているが, ここで問題としている結合が Co^{++} により遮断され, univariant な応答が得られている。このことは rod と他の種類の受容器との機能的結合が rod 間の電氣的結合²⁾と質的に異なることを示唆するが, 未だ Co^{++} による実験は例数が少ないので明確な結論は述べられない。

文献

- 1) Schwartz, E. A. (1975) Cones excite rods in the retina of the turtle. J. Physiol., 246, 639-651
- 2) Tanaka, I., Nakatani, K. and Tauchi, M. (1982) Spatial properties of photoresponse and dark noise in rods. Biomed. Research, 3, Suppl., 149-153

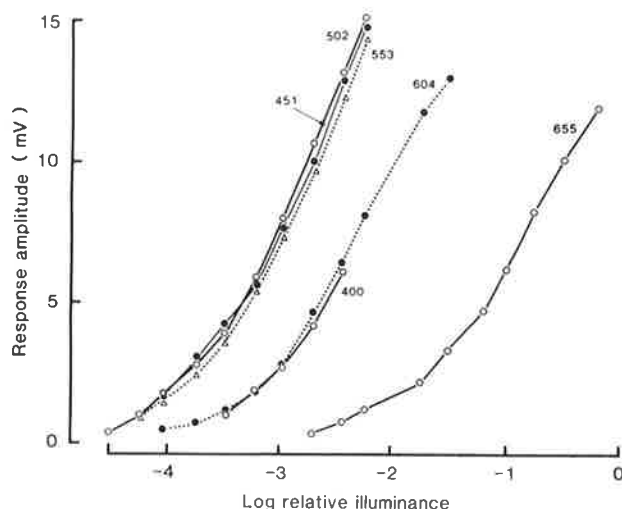


図1 各波長における光強度と桿体応答振幅との関係
横軸: 相対刺激強度 (対数目盛), 0 は $2.61 \times 10^4 \text{ photon} \cdot \mu\text{m}^{-2} \cdot \text{flash}^{-1}$ または $3.39 \times 10^5 \text{ Rh}^* \cdot \text{flash}^{-1} \cdot \text{rod}^{-1}$ (502 nm) に対応する。
縦軸: 持続 50 msec の単色光全面照射に対する暗順応下の桿体応答電位の振幅 (mV)。各曲線に対する数値は刺激光の波長 (nm) を示す。

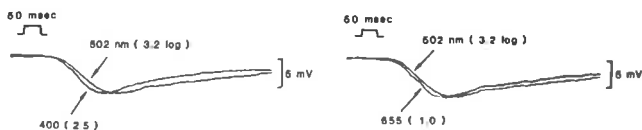


図1 刺激光波長による桿体応答波形の差
左: 400 nm と 502 nm の単色光刺激に対する同一振幅の応答を重畳したもの, 右: 655 nm と 502 nm の単色光刺激に対する同一振幅の応答を重畳したもの。いずれも持続 50 msec の全面照射に対する同一桿体の応答であり, 刺激時点を基準に重畳してある。

高次感覚器における受容細胞・求心神経間の伝達物質

小原 昭作・梅北 峻一・岡野 桂樹 (帝京大学・医)

金子 章道 (生理研)

概 要

高次感覚における求心性シナプス伝達物質の同定を目的として、数種の生物由来の活性物質を検討してきた。これらは全て、聴・側線器系のゴンズイ電気受容器で、その求心神経放電を指標とする生物検定により判定した。今回は、従来、集積を進めてきたゴンズイ血漿中の促進性因子における二、三の化学的性質と、新しい材料 (ナマズ血漿中の活性因子) について報告する。なお、この系では従来、グルタミン酸 (Glu) などの興奮性アミノ酸との識別が常に問題となってきた。有効なブロッカの候補として、二種の生物由来の伝達阻害因子を得たので、合わせて報告する。

研究方法・結果。

1, ゴンズイ血漿中の促進性因子:血漿を数段の限外濾過により分画すると、高分子画分 ($6,000 < MW < 30,000$) に抑圧性因子を、また低分子画分 ($MW < 1,000$) に促進性因子を生物的検定により検出できる。前年度は、図1のやや簡略化した限外濾過系列により、約600 mlの血漿を処理して促進性の粗画分を得た。これをさらにゲル濾過 (セファデックス G-10, D. W.), 脱塩のためのイオン交換などにより分画した後、凍結乾燥として、保存可能な試料とした。これは既報の TLC 上で伝達物質と類似する画分に相当する。

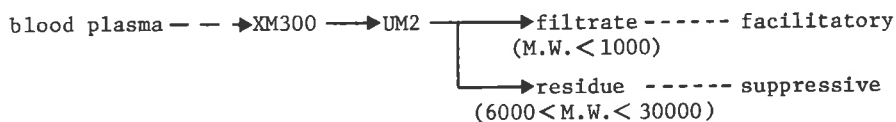


図1 血漿中活性因子の限外濾過による分離。この濾過系列では抑圧性粗画分は $1,000 < M.W. < 300,000$ となる。図中の表示は既報の分子量推定による。

a). このゲル濾過後の促進性因子はプロテアーゼ処理 ($30^{\circ}\text{C} \cdot 15 \text{ hrs}$) によっては失活せず、したがってこれがペプチドである可能性は低い。

b). この促進性因子をさらに精製するために、アミノ酸分画法に準じて、イオン交換クロマトグラフィ (アンバーライト IR-120, IR-50) により再分画を試みた。促進性の生物活性は主に強酸性物質を含むべき画分 (図 2, 画分 I) で回収された。なお、この画分の Glu 含量は蛍光酵素法による検出限度以下 ($<10^{-6}\text{M}$) であり、生物検定により Glu が促進効果を示す有効濃度 ($>10^{-4}\text{M}$) に比して十分に低い。

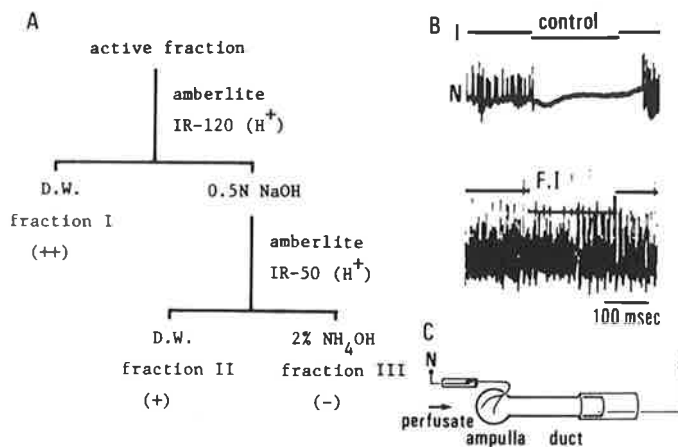


図 2 ゴンズイ血漿の促進性因子。A:イオン交換法による分画。試料は限外濾過, ゲル濾過後の活性画分。B:記録例 (検定法は C を参照)。促進性因子は主に画分 I (FI) に検出される。抑圧性通電刺激 (I) 中の求神経放電 (N) の増加に注意。検液は血漿換算で 5.6 倍に濃縮されている。

c). この強酸性画分の生物活性をさらに精査するため、電気泳動的投与 (20 mg/ml, pH 8 に調製) を試みた (長井)。三連電極により Glu 有効部位に投与した結果, Glu 応答に比して, (1) はるかに短い潜時, (2) 早い立上りと減衰を示す応答を得た。これは促進性因子が Glu とは異なる受容体を介して作用することを示唆する。より定量的な生物検定と化学的同定のために、現在さらにこの試料の集積, 濃縮を続けている。

2. ナマズ血漿中の活性因子: 前年度に続き海水魚ゴンズイの大量入手が困難で、血漿約 80 ml を得たに過ぎない。既に初期の予備実験で、哺乳類を含む多数の動物種を検索し、魚類、特にナマズ目の血漿に活性をみている。

今年度は淡水のナマズ目として、ニホンナマズ、ビワコオオナマズ、イワトコナマズ、ギギなどを検討して、粗分画でいずれも同様な活性を得た。このうち商業ベースで入手が

可能なナマズ (*Parasilurus*) について、血漿約 270 ml を採取し、限外濾過、ゲル濾過を行ない、ゴンズイと類似した溶出パターンと活性画分を得た。その促進性因子については上記ゴンズイ試料と同様の処理を進めており、一部は次項の検討にも使われている。

3. 生物由来の阻害因子: 従来, Glu が伝達物質として示唆された系で、選択的阻害剤として認められるものはない。次の予備実験はこの種の阻害剤の可能性を示唆する。

a) ナマズ目血漿の高分子画分: 上記ナマズの血漿も、ゴンズイと同様に、高分子の抑圧性画分を示す。限外濾過による粗画分をゲル濾過 (G-200, 100 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 7.3) で再分画して抑圧性画分を溶出後半に得た (図 3)。M. W. 10,000 前後と推定される。今後、透析の後、電気泳動パターンを検討する予定である。この阻害因子はシナプス伝達と Glu の促進効果を共に可逆的に阻害する点で、次の JSTX と異なる。むしろ、伝達物質の作用後の不活化などに関与している可能性もあり、今後、さらに精製して、その作用後機序を検討してゆく予定である。

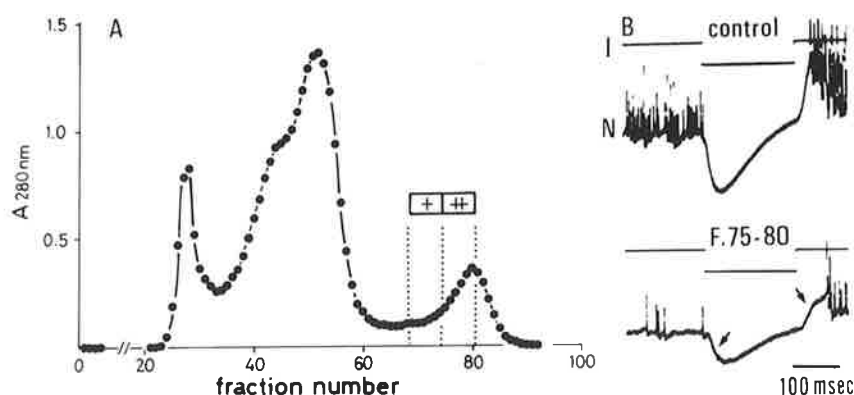


図3 ナマズ血漿の阻害因子。A:ゲル濾過パターンと活性域 (+)。試料は粗画分 (図 1) を凍結乾燥後、溶出液に溶解。(セファデックス G-200 fine, 2.5×90 cm. 100 mM NaCl, 5 mM HEPES, pH 7.3. 18 ml/hr, 6 ml/画分)。B:検定記録例 (F-No. 75~80)。血漿換算で 11 倍濃縮 (670 μ g 蛋白質/ml)。求心神経放電頻度と刺激 ON・OFF 時の PSP (矢印) の減少に注意。

b) JSTX (川合ら): ジョロウグモ毒腺より抽出された JSTX は Glu 作動性シナプス

で Glu 応答を選択的にブロックする。以下の実験は川合、長井との共同による。

JSTX 投与後、電気泳動的に与えた Glu およびカイニン酸の促進効果は指数関数的な時間経過で阻害され、非可逆的に消失する。しかしこの間、順向性刺激および泳動電極先端での局所刺激によるシナプス伝達は影響されない。さらにこの時、上記ナマズ血漿の促進性因子は灌流液中に投与して有効であることが確かめられた。

以上の結果は、既報の刺激・放出実験と同様に、聴・側線器系の求心性伝達物質が Glu と異なることを示す。さらに、血漿中の促進性因子が伝達物質受容体に作用している可能性を示唆する。今後、この因子の集積、精製を計り、その化学的同定を行なうと共に、上記の阻害因子を併用して、伝達物質との異同を追求する。

文献

- 1) 川合述史 (1982) : 生物毒の神経作用ークモの神経毒。生体の科学, 33:402-409.
- 2) Obara, S., Umekita, S. & Matsumoto, Y. (1981) : Stimulus-induced release experiments disprove L-glutamate as the afferent neurotransmitters in ampullary electroreceptors of marine catfish, *Plotosus*. VIII Internat. Congress Pharmacol., Tokyo, Abstr., 555.
- 3) 竹本常松・中島 正 (1977) : キノコの生理活性アミノ酸ーハエトリシメジとイボテングタケの殺バエ成分。名取信策他編“天然物有機化合物実験法ー生理活性物質の抽出と分離”pp. 172-189 講談社。
- 4) Umekita, S., Okitsu, S., Matsumoto, Y. & Obara, S. (1979) : Fractionation of biphasic effects of the blood plasma on the afferent synapses in a specialized lateralis receptor of the marine catfish, *Plotosus*. *Neurochem. Res.*, 4: 675.
- 5) Umekita, S., Matsumoto, Y. & Obara, S. (1981) : The afferent neurotransmitter in the ampullary electroreceptor; Examination of the facilitatory factors in *Plotosus* blood plasma. *J. Physiol. Soc., Japan*, 43: 296.

脳切片標本による視覚中枢の可塑性の研究

外山 敬介 (京都府立医科大学)

〔研究目的〕 視覚領の特徴抽出機構について分析の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。

〔研究内容および成果〕 大脳皮質視覚中枢の切片標本を用い、白質に電気パルスによって条件刺激を加えると (2 Hz, 1 時間), 刺激後 30 分から 10 数時間にわたって試験刺激に

よってひき起される電場電位が2-5倍に増大することが前年度までの研究により明らかにされている。更に電流源密度解析の手法により、1) この電場電位の増大は視覚中枢シナプス伝達の増強によること、2) シナプス伝達の増強はIV層の白質線維-視覚中枢細胞間のシナプスとII層の中枢細胞間シナプスにおいて起り、特に前者のシナプスで著しいこと、3) シナプス伝達の増強は先ずIV層の白質-視覚中枢細胞間のシナプスで起り、次いでII層のシナプスに移行すること、4) IV層のシナプス伝達の増強は条件刺激数時間で減衰するが、II層の増強は十数時間にわたり持続することが明らかにされている。これらの実験結果は入力経路を電氣的に興奮させると視覚中枢のシナプス結合が可塑的に増強されることを示している。またこのシナプス伝達の増強は生後4週間前後の幼若ネコだけに生じるが、この時期は視覚中枢細胞の反応性が視覚体験により最も影響され易い時期(感受性期)に一致する。したがって脳切片標本で証明された視覚中枢のシナプス結合の可塑性が幼若ネコの視覚中枢細胞の反応性の可塑現象の基礎になっていると考えることが出来る。しかしながら脳切片標本の実験においては電気刺激を白質に与えているので、外側膝状体からの視覚の入力経路に加え、さまざまな経路(視覚中枢より他の中枢に向う遠心性経路、他の中枢から視覚中枢に向う求心性経路など)が活性化される。このため条件刺激によってひき起された可塑的变化が視覚の入力経路を経由して生じたと直ちに断定することが出来ない。

この問題点を解決するために、本年度の研究では、ケタラール麻酔下の全動物標本を用い視覚経路(外側膝状体と視神経)を電氣的に刺激し、これによってひき起された電場電位について電流源密度解析を行うことを試みた。

図1はこのような手続の下に行った外側膝状体の電気刺激によりひき起された電場電位の電流源密度解析の例である。条件刺激の前では電場電位(FP)はIII層からIV層にかけて大きい。これに対応して流れこみ(current-sink)の電流源(CDの上向きの変位)はIII-V層に分布している。流れこみの電流は局所の神経細胞のシナプス電流と活動電流の和を表わしているが、視覚中枢では神経細胞が比較的小さいため、流れこみ電流の大部分はシナプス電流であると考えられる。したがってこれをシナプス伝達の指標とすることが出来る。外側膝状体刺激により生じたシナプス電流は潜時の短い単シナプス性電流と潜時の長い多シナプス性電流からなる(CDの点線により区分される)単シナプス性電流は主にIV層に分布するが、これは外側膝状体-視覚中枢細胞間のシナプスに由来すると考えられるので、外側膝状体からの視覚求心線維が主としてIV層に終るとする組織学的研究の知見によく一致する。多シナプス性電流はII, III, V層に局在するが単シナプス性興奮を受けた細胞と上位の細胞の間のシナプスに由来するものと思われる。

条件刺激後2時間で電場電位の振幅は2-3倍に増大する。振幅の増強は特にII層にお

いて著しい。電場電位の増強に対応してII層の多シナプス性電流とIV層の単シナプス性電流が2～3倍に増大している。他の層のシナプス電流には特に著明な増強は認められない。

図2は条件刺激後さまざまな時間隔で、電場電位の電流源密度解析を行い、単シナプス性電流と多シナプス性電流の増強の時間経過を調べたものである。単シナプス性電流は条件刺激後約20分で既にある程度増加し、1～2時間で最大となり、その後わずかに減少する。多シナプス性電流は条件刺激20分ではむしろ減少しており、その後ゆるやかに上昇し、6時間後に最大となる。

これらの実験結果から、1) 視覚の入力経路を電氣的に刺激することにより、視覚中枢の神経回路のシナプス伝達が持続的に増強されること、2) シナプス伝達の増強はIV層の外側膝状体視覚中枢細胞間のシナプスとII、III層の視覚中枢細胞間のシナプスに局限されること、3) シナプス伝達の増強は先ずIV層の外側膝状体-視覚中枢細胞間シナプスで起り、次いで視覚中枢細胞間のシナプスで起ることが明らかとなった。全動物標本の外側膝状体刺激で得られたこれらの所見は脳切片標本で得られたものにほぼ一致するが、1) 全体としてシナプス伝達の時間経過が全動物標本で早いこと、2) 外側膝状体-視覚中枢細胞間のシナプス伝達の増強が全動物標本に比してより持続的であることなどの相違が見出される。

以上のようにケタラール麻酔下の全動物標本で外側膝状体を刺激することにより視覚中枢のシナプスの伝達の持続的増強が起ることが証明された。これは視覚入力により視覚中枢のシナプス結合が可塑的に変化することを示すものである。脳切片標本とケタラール麻酔下の全動物標本という全く異なる実験条件下でシナプス伝達の可塑的変化が引き起されたことは極めて興味深い。両者の標本はそれぞれ長所と短所を持っているので、これを併用することが視覚中枢の可塑性の研究に有効であると考えられる。

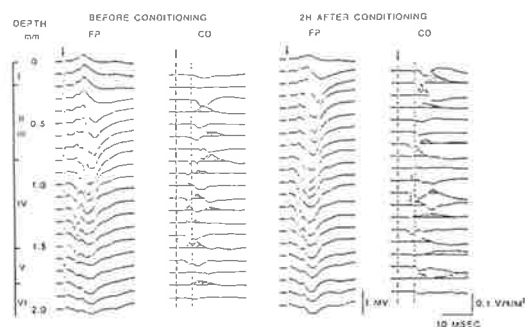


図 1

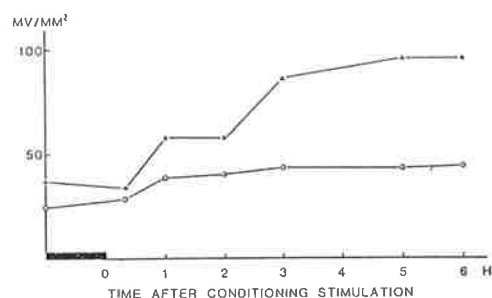


図 2

猫の赤核における GABA 作動性ニューロンの研究

勝丸 博信・村上富士夫 (生理研)・J.-Y.Wu (Texas Med. Center)

松田 友宏 (名古屋市立大・医)・塚原 伸晃 (生理研)

本研究の目的は脳幹赤核内における GABA 作動性介在ニューロンの存在を免疫組織化学的方法を用いて示すことである。生化学的な研究によってネコの赤核内には GABA やその合成酵素の GAD (glutamic acid decarboxylase) が存在することが以前より知られており、薬理学的研究によって錐体路刺激によって赤核脊髓路細胞に発生する IPSP が GABA によって生ずることが示唆されている。また Golgi 法などによる形態学的研究は赤核内に小型の、核内に軸索終末を有する細胞の存在を報告している。そこで我々は GABA の合成酵素であり、これまで脳内の多くの部位で GABA 作動性ニューロンに特異的に見

出されてきた GAD に対する抗体を作製し、免疫組織化学的方法を用いて GABA 作動性ニューロンの核内分布を調べることにした。

GAD 抗体はマウスの脳から精製したものをウサギに注射することによって得た。一方、猫の脳を 0.1% グルタルアルデヒド及び 4% パラホルムアルデヒドを含む固定液で灌流固定し、赤核を含む領域を 50~100 μm の厚さにビブラトームを用いて切り出した。これに GAD によって免疫したウサギの抗血清又は対照としてウサギの正常血清を反応させ、以下 PAP (peroxidase anti-peroxidase) 法によって切片の処理をおこない、最後にオスミウムによる後固定をおこなったのちエポキシ樹脂に包埋して光学顕微鏡による観察をおこなった。また一部の切片については厚さ 2 μm の切片を作製して観察をおこなった。



写真は赤核内で観察された GAD 免疫陽性細胞の例である。GAD 陽性細胞は核内にはほぼ均一に分布し、その大きさはほぼ 10.5 μm (短径の平均) であった。この大きさ及び分布は Golgi 法による研究で示唆されている内在性介在ニューロンのものと一致する。また HRP の逆行輸送によって調べられた赤核脊髄路細胞や下オリーブ核に投射するニューロンよりも小型である。以上のことから本研究で示された GAD 陽性細胞は赤核脊髄路細胞に

軸索を投射して IPSP を生じさせる内在性介在ニューロンであることが強く示唆される。もしこの結論が正しければ赤核脊髄路細胞上に GAD 陽性シナプス終末が見出される筈であるが、その存在も確められた。(この結果については部門の研究活動のページを参照されたい。)

感覚神経細胞の栄養因子に関する研究

久野 宗 (生理研) 宮田 雄平 (生理研)

本間 信治 (富山医科薬科大学・医) 小川 正晴 (高知医科大学)

〔研究目的〕 従来の実験において、筋紡錘から由来する Ia 感覚神経の中樞シナプス伝達機能が、筋から感覚神経細胞に供給されるある栄養因子に依存することが示唆された。胎

生期の後根神経節細胞は神経成長因子 (Nerve Growth Factor: NGF) によって維持されているが、この栄養因子効果は胎生期にだけ見られ、生後の動物の感覚神経細胞の維持には NGF は関与しないと考えられている (Levi-Montalcini & Angeletti, 1968)。しかし、最近、生後の動物においても、後根神経節の substance P の量は NGF の投与によって増加することが見いだされている (Kessler & Black, 1980)。本研究では、Ia 感覚神経刺激によって発生する脊髄運動ニューロンの EPSP が NGF に依存する可能性を検討する。

〔方法〕 NGF は雄マウスの顎下腺から、Bocchini & Angeletti (1969) の方法によって抽出した。ラットの下肢の Medial gastrocnemius (MG) 神経を、出生の翌日切断し、術後、毎日あるいは隔日に NGF ($2 \mu\text{g/g}$) を投与した。生後 4—5 週間の時期に Lateral gastrocnemius-soleus (LGS) 及び MG の脊髄運動ニューロンから細胞内電位を記録し、これらの筋肉神経の刺激に対する単シナプス性 EPSP を観察した。

〔結果〕 (1) NGF 投与ラットは同年齢の無投与ラットと比較して 10—15% の体重の低下が見られた。

(2) 切断した MG 神経刺激に対する LGS 運動ニューロンの EPSP は、NGF 投与ラットで、0.4 mV、無投与ラットでは 0.1 mV であった。この差は有意であった。

(3) LGS 神経刺激に対する LGS 運動ニューロンの EPSP は、NGF 投与ラットで、3.5 mV であった。この値は、無投与ラットの EPSP (2.6 mV) より有意の亢進を示した。

(4) 運動ニューロンの、静止電位、活動電位、入力抵抗には、NGF 投与、無投与のラットにおいて差が見られなかった。

(5) これらの結果から、NGF は、Ia 感覚神経の中樞シナプス機能の維持に参与する可能性が示唆される。

〔考察〕 生後の動物において NGF の逆向性軸索運搬を示すのは交感神経節細胞と後根神経細胞だけである (Stockel, Guroff, Schwab & Thoenen, 1976)。交感神経節細胞では、その軸索を切断すると、数日の中に EPSP の低下が見られ、この低下は NGF 投与によって阻止されることが知られている (Njå & Purves, 1978)。本研究の結果は、これと、現象的には類似しているが、両者は、後シナプスニューロンと前シナプスニューロンの点で異なっている。したがって、両者の NGF の作用機構も相違していると考えられる。NGF は、切断した MG 神経からの EPSP も、正常の LGS 神経から EPSP も同様に亢進された。この結果は、投与した NGF が単に軸索流を介して作用しているだけでなく、後根神経節細胞に血流を介して直接作用していることを示唆する。作用機構は不明であるが、NGF が Ia 感覚神経の中樞シナプス機能に対する栄養因子である可能性が高い。

文献

1. Levi-Montalcini, R. & Angeletti, P.U. (1968). *Physiol. Rev.* 48: 534.

2. Kessler, J.A. & Black, I.B. (1980). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 649.
3. Bocchini, V. & Angeletti, P.U. (1969). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 64: 787.
4. Stoeckel, K., Guroff, G., Schwab, M. & Thoenen, H. (1976). *Brain Res.* 109: 271.
5. Nja, A. & Purves, D. (1978). *J. Physiol.* 277: 53.

細胞内注入法による虚血代謝産物の単一心筋 細胞活動電流に及ぼす効果

有田 真・清末 達人 (大分医科大学)

入沢 宏・野間 昭典 (生理研)

心筋細胞活動電位は虚血状態では、そのプラトー相が短縮する。膜電位固定法でイオン膜電流の変化を調べると、その際外向き電流が著しく増加している事がわかっている。この変化と細胞内代謝産物との関係を調べるため、コラゲナーゼ処理で得られる単一心室筋細胞に刺入した微小電極より、ATP、ADP、AMP、アデノシン等を細胞内に微量注入し、活動電位と膜電流の変化を記録した。

実験にはモルモットの心臓を0.04%コラゲナーゼを含む無カルシウム液で灌流し、心室より単一細胞を分離し、正常タイロード灌流下、35~37℃で記録した。

微小電極内液として0.5 M ATP液を用いると、僅かにATPが細胞内に拡散するため、プラトー相が200~400 msecの活動電位が、30分以上安定して記録できた。定常状態を確認した後、電極内に1-3 kg/cm²の圧を加え、ATP液を注入すると、活動電位は急速に50~100%延長するのがわかった。逆に細胞内ATP量を減少させる目的で、外液にCN⁻を5 mM加えた無ブドウ糖タイロード液を用いると、5~20分でプラトー相は短縮した。約20%位に短縮した時、微小電極よりATPを注入すると、活動電位は急速に回復するのがわかった。ATP注入の効果がATPのカルシウムキレート効果に基づくものでないことを検証するため、ATPの代わりにEGTAの注入を試みたが、CN⁻下抑制された活動電位の回復は見られなかった。

ADP+AMPの注入でも同様に活動電位の延長が見られた。しかし、細胞内呼吸、解糖系によるATP産生を抑制した状態では、ADPの作用は弱くなり、AMPの作用はむしろ抑制効果となった。そこで、これ等の物質は正常タイロード液中では、ATPに変換され、促進効果を発現したと考えられた。アデノシン注入では極めて低濃度で抑制が見られた。

モルモット単一心房筋細胞のイオン電流

飯島 俊彦 (東北大学・医)

亀山 正樹・入沢 宏 (生理研)

モルモットの心臓をランゲンドルフ法を用いて灌流し、コラゲネース処理することによって単一心房筋細胞を得た。37℃タイロッド液中で単一電極を用いて膜電位を記録したところ、生体内の心房活動電位と同様なものを記録することが出来た。つづいて膜電位固定法を適用して膜電流-膜電位関係を調べた。内向き流として i_{Na} と i_{Ca} , 内向き整流性 K 電流及び遅延整流が認められた。またアセチルコリンの作用は K の外向き流を大きくする事と i_{Ca} を抑制する作用があったが、後者の作用は極めて僅かであることをみた。さらにアドレナリンの作用についても合わせて検討を加えた。この報告は日本生理学会 (大阪) において発表された。

筋ジストロフィーマウス心筋の電気生理学的研究

田中 弘允・加計 正文 (鹿児島大学・医)

入沢 宏 (生理研)

心臓房室結節細胞の外向き電流がペースメーカー機転に重要な働きをしていることは、すでに知られているが、カルシウムチャンネルを通して流入する細胞内カルシウムにより、影響を受けているとの報告もある。そこで、単一チャンネルの解析をすることにより、外向きカリウム電流の性質を研究した。単一チャンネルのコンダクタンスは、細胞外のカリウム濃度が 5.4 mM の時、15 pS であった。コンダクタンスは、細胞外のカリウム濃度に依存して増加したが、膜電位にも依存していた。パッチ膜を強く脱分極すると、内向き整流特性がみられた。各々のカリウム濃度の時に得られた、電流電圧曲線から測定された逆転電位は、Nernst の式より得られるカリウムの平衡電位に一致していたことより、このチャンネルは、カリウムイオンのみに選択性があることがわかった。チャンネルが開く確率は、膜電位に依存し、-60 mV ~ -40 mV で最低の値を示し、脱分極とともに上昇し、+20 mV

の所で、最大値を示した。次に細胞内カルシウムの影響を検討するために、Inside-out patch を使い、細胞内カルシウム濃度が、 10^{-8} 、 5×10^{-6} 、 $10^{-4}M$ の時で、チャンネルが開く確率を測定した。 $10^{-8} \sim 5 \times 10^{-6}M$ の範囲では、チャンネルが開く確率は影響受けなかったが、 $10^{-4}M$ に増やすと、減少した。以上より、このチャンネルは、時間及び、膜電位に依存したカリウムチャンネルであり、細胞内カルシウムには依存していないことが、結論された。

摂食行動における消去と分化の研究

石川 友衛・古賀 知行・宮澤多恵子 (日本大学・医)

栗生 修司・大村 裕・西野 仁雄 (生理研)

サル前頭眼窩野 (OBF) の一部は摂食条件行動の動機づけに関与し、その破壊によって消去抵抗の生じることが明らかになっている。そこで OBF が条件結合の場として機能しているか否かを調べるため、このオペラント条件行動の消去を行ない、その時の OBF 単位ニューロン活動の変化を追究した。

強化として、手がかり光刺激 (陽性条件刺激, 図:白丸) の呈示によりレバー押し (図:黒横棒) を開始し、高 fixed ratio 条件下 (30 回レバー押し) で食物報酬がえられる (図:黒三角) という行動課題を遂行させる。記録できた大部分の OBF ニューロンは、光刺激後活動が上昇し、レバー押し期に低下し、ついで報酬期に一過性に上昇するパターンを示した (図 A 参照)。条件行動の動機づけを抑制する目的で、外抑制を引き起こす強度の通電刺激を頸部皮膚上に与えた。これは、光刺激の前後またはレバー押し行動中の一定時点に、外抑制となる陰性条件刺激を、数回の摂食条件行動の強化中に 1 回の割で与えることで、慣れを防ぎながら、外抑制による効果をもたせた。この条件下での OBF 細胞活動の観察をした。ついで、陰性条件刺激を繰返す消去操作を行なうことで今まで生じていたニューロン活動パターンの消失が認められる過程を確認した。しかしこれらの反応も 10 回近い陽性条件行動の強化ですぐに回復した。

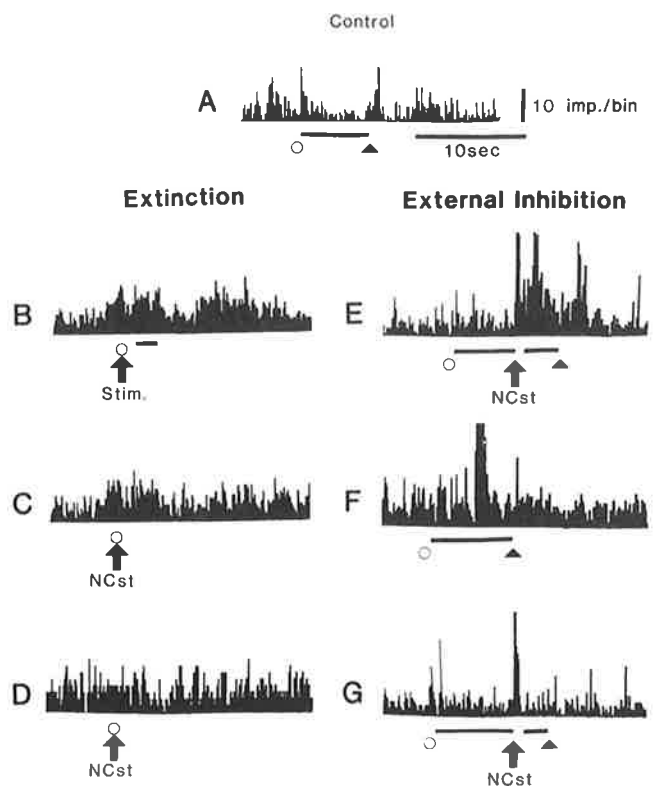


図1 “消去(B, C, D)と外抑制(E, F, G)による OBF 細胞活動の変化”
A, B・C・D, E・F・G は各々別のユニット；加算回数は3回。加算
のためのトリガー信号は, A, F では▲, 残りは stim および NC st.

外抑制となる通電刺激を光刺激に5～10秒先行して与えても、陰性条件反射は形成されにくく、OBFニューロンの発射パターンもほとんど変化しなかった。しかし2秒前の通電刺激で最も効果的な反応パターンの消失が起こり、平坦なパターンとなった。同様の効果は光刺激と通電刺激の同時刺激でも起こった(図B, C, D)。通電刺激を光刺激の後、すなわちレバー押し期の中間点で与えると、陰性条件反射は最も形成されにくかったが、レバー押し行動では跳ね返り(誘導)現象がみられた(E)。またその後の強化時に、刺激が与えられる予定の時点でユニット活動の乱れがみられるようになった(F)。予測時刻にこのようなニューロン活動の変化がみられるのは、動機づけの変化に関連する反応と考えられる。さらにこの反応も無強化の数回の繰返しで慣れによる消去が起こった(G)。

以上のことから、摂食行動を指標としたOBFニューロンの活動パターンは、行動に対応した陽性・陰性過程があり、動機づけの場であると考えられる根拠がえられた。

レバー押し行動による環境温および体温認知の中枢機構

—体温調節行動および摂食行動時の前頭眼窩野のニューロン活動—

堀 哲郎・清原 寿一 (佐賀医科大学)

大村 裕・西野 仁雄・栗生 修司 (生理研)

最も基本的な環境適応行動の1つである体温調節行動は、内外環境の温熱因子の認知、快、不快感、情動、動機づけ、報酬の認知など高次の機能要素を含んでいる。これらの少なくとも一部は視床下部温度ニューロンによる情報処理と統合、及び視床下部・前頭葉間の相互連絡により営まれることが想像されている。一方、サルの前頭眼窩野 (OBF) は摂食行動などの動機づけ行動を合目的に遂行する上で重要な役割を果たしていることが確立している。そこでサルの求冷行動及び摂食行動における OBF ニューロン活動を調べた。

サルの頭部を慢性埋込した固定具を介して固定し、前方 20 cm に手がかり刺激として求冷行動用の緑ランプ、摂食行動用の赤ランプ、レバー、報酬箱を備えたパネルを置いた。手がかりランプがついている時だけのレバー押しを有効とし、FR 30 で求冷行動、摂食行動の課題を遂行させた。前者ではモーターの切り換え音とともに冷風を、後者ではフィーダーの回転音とともにパンの小片を報酬として与えた。

求冷行動下で 63 個の OBF ユニット中、49 個 (77.8%) が活動変化を示した。バー押し期またはバー押し期から報酬期にかけ持続的に活動抑制される型 (I 型) が最も多く、29 個 (全体の 46.0%)、活動が増強する型 (F 型) は 18 個 (28.5%) あった。これらのうち、12 個は持続性変化に加えて手がかり光刺激にも相動的に反応した。この他、手がかり光刺激にのみ反応する型 (P 型) が 2 個 (3.2%) 見られた。63 個のうち 34 個のユニットについて、摂食行動下の活動を観察した。求冷行動下で、I 型、P 型及びバー押し期のみ活動増強する型を示す 22 個のユニット中、17 個 (77.3%) が摂食行動でもほぼ同様の反応パターンを示し (図 1)、異なった反応を示すユニットは 3 個に過ぎない。一方、求冷行動でバー押し前から活動が漸増し、報酬期に最高に達し、その後減少していく反応パターンのユニット 14 個中 8 個について摂食行動下の反応を調べると、求冷行動時と同じ反応を示すユニットは皆無で、4 個が無反応、3 個が I 型、1 個がバー押し期のみの F 型であった。またこれらのユニットはサルがバー押しをしないで、実験者が求冷行動時と同様の温度変化をさせても反応しない。両行動下で相似た反応を示すユニットは従来の報告と考え併せると、両行動に共通して動機づけの維持、報酬状況の認知などに関与する可能性がある。また、求冷

行動時に特異的反応を示したユニットは摂食行動とは異なった求冷行動に際しての温度刺激に対応した動機づけあるいは情動という内的状態に関係していることが想像できる。

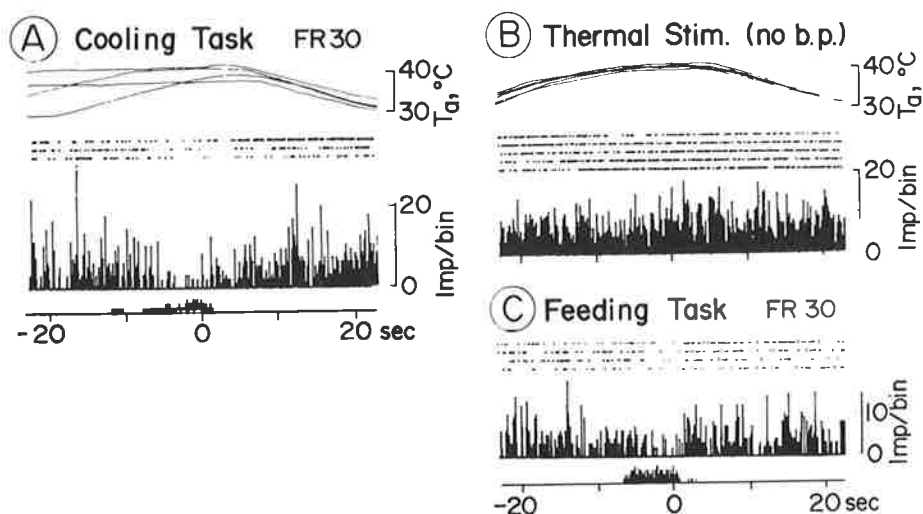


図1 サル OBF ニューロンの求冷行動 (A), 温度刺激 (B) および摂食行動 (C) における反応。各々, 上段より環境温 (T_a), ユニットのラスタ表示, 加算ヒストグラム (報酬の手がかり音刺激の時点を中心とする), バー押しのヒストグラムを示す。B ではバー押しをしていない。

摂食行動における化学感受性ニューロンの役割*

—神経ペプチド及び内因性有機酸の関与—

井之口 昭・大村 裕・清水 宣明・三崎 久好・南 武嗣 (九州大・医)

László Lénárd (Pécs 医科大), 西野 仁雄・栗生 修司 (生理研)

視床下部外側野 (LHA) および腹内側核には体液性情報を感知する化学感受性ニューロンが存在することが知られており, これらのニューロンが摂食の調節に重要な役割を果たしていると考えられている。本研究では慢性サルを用いてレバー押し摂食行動時の LHA ニューロンの活動と化学感受性との関係を解析した, まずサルに摂食行動課題を遂行させ, その遂行期を手がかり光刺激呈示期, レバー押し期, 手がかり音刺激期および摂食期の 4

期に分類し、各期における活動様式の変化を記録した。また同時に各種化学物質（ブドウ糖、ノルアドレナリン (NA)、ドパミン、モルフィン、CCK、ソマトスタチン、グルカゴン、摂食に關係する内因性有機酸である 2-DTA (摂食抑制) および 3-DPA (摂食促進) を多連微小電極を用いて直接ニューロンに投与し、その反応性を調べた。

1. LHA ニューロンの薬物感受性。 総数 180 個の LHA ニューロンの活動を記録した。モルフィン (45 個) は 48% が抑制性に 2% が促進性に、2-DTA (52 個) は 13% が促進性に 6% が抑制性に作用した。CCK (11 個)、ソマトスタチン (10 個) はいずれも効果を示さなかった。グルカゴン (12 個) は 25% が抑制性に作用した。モルフィンで抑制されるニューロン 21 個中 11 個はブドウ糖感受性ニューロンであり、13 個は NA に対して抑制性に反応した。2-DTA で抑制を受けるニューロン (10 個) の半数はブドウ糖感受性ニューロンであったが、3-DPA で促進を受けるニューロン (7 個) はすべて非ブドウ糖感受性であった。また 2-DTA あるいは 3-DPA に感受性を持つニューロンのうち、75% が NA 投与によって抑制された。

2. 薬物感受性と摂食行動時の活動様式との対応。 モルフィンで抑制されるニューロンのうち 20 個について活動様式との相関を検討した。20 個中 16 個が活動様式の変化を示し、うち 15 個が 2 つ以上の期にわたって変化した。主な変化はレバー押し期および摂食期にみられた。レバー押し期には 14 個が反応し、6 個が活動上昇を、8 個が活動低下を示した。摂食期には 10 個が変化を示し、7 個が活動上昇を、3 個が活動低下を示した。また手がかり光刺激呈示期に活動上昇を示すもの 5 個、手がかり音刺激呈示期に活動低下を示すもの 3 個も存在した。2-DTA で抑制されるニューロン (10 個) はその 70% が活動様式に変化を示した。最も特徴的な変化はレバー押し期および摂食期における活動低下である。また 3-DPA で促進されるニューロン (6 個) もその 70% が活動様式に変化を示し、その変化は 2 期以上にまたがるが多かった。摂食期に活動上昇を示す例が多い傾向にあった。

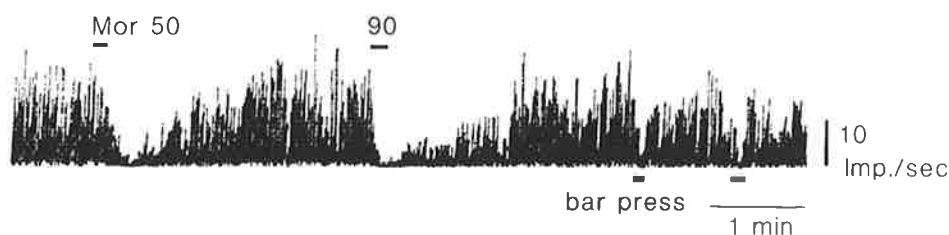


図 1 モルフィン投与により用量一反応性に抑制される LHA ニューロン。このニューロンはレバー押し期に活動低下を示した。

3. まとめ

慢性サルでの各種神経ペプチドや内因性有機酸の作用は麻酔下ラットで得られた結果とはほぼ同様であった。特にモルフィンと 2-DTA で抑制されるニューロンの半数がブドウ糖感受性ニューロンであったことは、これら物質の摂食行動に対する作用を考え合わせると興味深い。またこれらのニューロンはレバー押し期および摂食期に高率に活動様式が変化することから、内因性オピエートや 2-DTA は動機づけや報酬といった事象と何らかの関係をもち、摂食活動を調節していることが考えられた。

破傷風毒素の運動系に対する作用

—特にその問題点について—

昭和56年8月14日

高野 光司 (ゲッティンゲン大学)

破傷風毒素 (TT) は主として運動終板から取り込まれ, axonal transport により中枢神経に達し, その部の後シナプス抑制 (Eccles グループその他) 及び, 前シナプス抑制 (Curtis グループその他) を興奮性シナプスを侵さずに, 選択的に遮断することにより, 例えば, 運動系の過活動をおこすと考えられていた。

我々の所見によれば, 局所破傷風において脊髄運動神経細胞 (MN) は, 逆行性に興奮させ得るが, 単シナプス反射は, TT により遮断される。さらに MN 内記録により, TT 量の少い時には, EPSP も IPSP に引き続き消失する。また相当広い TT 量範囲において我々の実験では, 後根電位も, 前シナプス抑制も見られた。致死量の TT 静注後の重症全身性破傷風において拮抗性抑制, 自原性抑制, 伸筋に対する屈筋反射性抑制が侵されていないこと等から, 破傷風の運動性過活動の原因については, 再考を必要とする。また我々の実験により赤筋運動終板の方が白筋のそれより TT に侵されやすいという Duchene の所見の逆が正しいことが証明された。その他ガンマー運動系の破傷風における役割りについて述べた。

小脳とカテコールアミン系との構造的・機能的関連

昭和57年4月13日

Ray S. Snider (コロンビア大学)

小脳には筋の固有覚の他にも全ての感覚が入力して中枢神経系における調節器として働いていることは, 吾々が過去に発表したところであるが, 最近吾々は神経解剖学的方法を用いて, 1) 小脳と青斑核, 2) 小脳と黒質並びに被蓋腹側部との間にはそれぞれ両方向性の連絡があり, 前者はノルアドレナリン (NE) 系として青斑核より背側縦束, 内側前脳束を介して大脳皮質までの広い範囲に広がり, 後者はドパミン系 (DA) 系として黒質より線条体に連なり, さらに小脳と線条体よりの経路が視床の腹側核及び髄板内核に収斂して絡っていることを明らかにした。又電気生理学的方法により小脳及び尾状核への電氣的刺激により尾状核と小脳でそれぞれ誘発電位が生じ, 小脳—尾状核—小脳間には機能的環状

回路があることを解明した。

さらに生化学的方法を用いて、1)一側室頂核を破壊すると同側の前脳における NE, DA が減少する、2)一側歯状核を破壊すると対側の前脳における DA が減少する、3)一側小脳虫部皮質を破壊すると前脳の NE, DA が増加する、4)小脳核を限局性に加温又は電氣的刺激を与えると前脳における NE 及び DA が増加することを明らかにした。

以上の結果を総合すると小脳には従来からいわれている太い線維による遠心性経路の他に細い線維による NE 系及び DA 系への連絡があり、小脳はこれらの系統への調節にも関与していると考えられる。

『感覚情報受容変換の分子機構』

昭和 57 年 6 月 2 日～6 月 3 日

大沢 文夫 (阪大基礎工；名大理)

生物のもつ特徴のひとつとして、外界からの種々の刺激 (化学物質, 光, 熱, 振動など) を受容し、その情報に基いて行動を変化させるという、刺激一応答系の存在がある。刺激の受容から応答の発現までには、多数の分子が働いている。この研究会では、高等生物からバクテリアに至る生物種の刺激一応答系の研究者を一堂に集め、分子レベルでの研究に重点をおいて、それぞれの系について明らかにされて来たこと、これからの問題についての情報を交換した。参加者はアセチルコリン受容体の生化学、リン脂質代謝膜小胞のイオンチャンネル、遺伝解析をもとにした情報伝達回路の解析、原生動物、バクテリア等の走化性の解析など、材料・方法について広い範囲をカバーしていた。参加者の多くが、何らかの刺激を受けたと思われる。今後の分子レベルの研究の一層の発展を期待したい。なお、この会合にはたまたま訪日中の外国人科学者 3 名にも参加を願った。

- | | |
|---------------------------|-------------------------------|
| 1. 骨格筋アセチルコリン受容体の合成と分化 | 杉 山 博 之 (生理研) |
| 2. 筋小胞体膜のイオンチャンネル | 葛 西 道 生 (阪大) |
| 3. リン脂質代謝とリンパ球の活性化 | 豊 島 聡 (東大) |
| 4. 神経グリアハイブリッド細胞の興奮性と膜内粒子 | |
| | 古 家 喜四夫・古 家 園 子・山 岸 俊 一 (生理研) |
| 5. ショウジョウバエ光受容機構の遺伝解析 | 堀 田 凱 樹 (東大) |
| 6. 化学興奮の分子機構 | 木 島 博 正 (九大) |

- | | |
|--|-------------------------------------|
| 7. 細胞膜受容機構とセカンドメッセンジャー | 高 井 義 美 (神戸大) |
| 8. イノシトールリン脂質と感覚受容 | 吉 岡 亨 (横浜市大) |
| 9. 細胞の迅速応答とリン脂質代謝 | 野 沢 義 則 (岐阜大) |
| 10. 大腸菌の走化性とタンパク質メチル化反応 | 林 博 司 (名大) |
| 11. 神経軸索膜と細胞骨格 | 月 田 承一郎 (東大) |
| 12. 音受容のイノシトールリン脂質 | 柳 沢 慧 二 (鶴見大) |
| 13. 大腸菌の温度感覚機構 | 今 栄 康 雄 (名大) |
| 14. ゴウリムシの温度感覚 | 中 岡 保 夫 (阪大) |
| 15. Thermotaxis and phototaxis in the cellular mold, <i>Dictyostelium discoideum</i> . | Kenneth Poff (Michigan State Univ.) |
| 16. 赤外線受容器の自発発射の規則性について | 寺 島 真 一 (東医歯大) |
| 17. 視細胞におけるエネルギー変換機構について | 三 木 直 正 (金沢大) |
| 18. Photosensory transduction mechanism in stentor. | Pill-Soon Song (Texas Inst. Tech.) |
| 19. Photomovement in blue-green algae. | Donat-Peter Häder (Phillips Univ.) |
| 20. カエル視細胞外節膜の超微細構造 | 白 倉 治 郎 (東大) |
| 21. 学習の神経機構 | 小 田 洋 一・塚 原 伸 晃 (阪大) |

1. 骨格筋アセチルコリン受容体の合成と分化

杉山 博之 (生理研)

骨格筋のアセチルコリン受容体は、筋細胞の分化・神経筋接合の形成・成熟とともに、その性質（たとえば、その等電点）が変わることが知られている。我々は、培養骨格筋細胞を用いてそのアセチルコリン受容体を検討し、これまでに次のような知見を得たので、それらについて報告し、考察する。

- (1) ラット骨格筋細胞表面には、等電点の異なる2種類のアセチルコリン受容体が存在する。しかし、それら両者の代謝回転速度にはほとんど差が見られない。
- (2) 細胞内の受容体前駆体には、等電点的に1種類の成分しか見い出せない。
- (3) 糖鎖の添加を阻害する条件下で合成された細胞表面の受容体は、等電点的に主とし

て1種類のものしか見られなくなる。これらの結果は、骨格筋のアセチルコリン受容体が、1種類の細胞内前駆体を経て合成され、それが糖鎖の添加・修飾によって2種類の表面受容体に分化する、という仮説を示唆する。

- (4) 細胞内には、上記前駆体の他にそれより分子量の小さい(半分以下)受容体関連成分が見い出される。このものは、前駆体の更に1ステップ前の、「前駆体の前駆体」である可能性が示唆される。

2. 筋小胞体のイオンチャンネル

葛西 道生・布垣 一幾 (大阪大学・基礎工)

筋小胞体ベシクルは、アニオン、カチオンに対して高い透過性を示し、それぞれのイオンに対するチャンネルが存在することが示唆されている。特にカチオンチャンネルは、人工膜に筋小胞体ベシクルをうめこむことにより、電氣的に測定され、膜電位依存のチャンネルで、単一チャンネルコンダクタンスが0.1 MK⁺中で120 pSであることがわかっている。このチャンネルがもし膜小胞各に1個存在するとすれば、透過の時定数は1.85 msecであることが期待される。このような速い反応を直接測る方法として、蛍光消光法を適用した。膜小胞内に pyrene tetra sulfate を充填し、Tl⁺イオンの流入による蛍光消光速度をストップフロー法で測った。Tl⁺はK⁺とよく似ているが、その結果、5.5 msecの成分が55%，180 msec 16%，3 sec 26%であった。これは電氣的な測定とよく合っている。アニオンの速い流入速度もI⁻イオンの流入から求められた。これらのチャンネルの生理学的意味はまだ分かっていないが、筋小胞体のす早いCa⁺イオンのとり込みや放出時におこる電氣的な負荷を減らす役割が考えられる。

3. リン脂質代謝とリンパ球の活性化

豊島 總 (東京大学・薬)

リンパ球は、特異的(抗原)、非特異的(mitogenic レクチン等)刺激により分裂増殖あるいは細胞性免疫のメディエーター(lymphokines)の産生を誘起される。この外的刺激の細胞膜を介した情報伝達には、細胞膜リン脂質代謝が重要な役割を有すると考えられる。1

つは PI 代謝の促進という現象である。リンパ球活性化の初期に PI 代謝の促進がみられる, PI 代謝の阻害剤である γ -BHC はリンパ球の活性化を抑制する, リンパ球活性化の阻害効果を有するコルヒチンは PI 代謝も抑制する, PI 代謝過程で存在する DG と Ca^{2+} によって制御される蛋白質リン酸化酵素がリンパ球に存在することなどが PI 代謝の重要性を支持している。一方リンパ球活性化の初期には, リン脂質メチル化の一過性の増大もみられる。この反応もメチル化の阻害剤により, リンパ球の活性化, Ca^{2+} 透過性の増加, 膜流動性の上昇などが抑制されることからその重要性が示唆された。またリン酸メチル転移酵素の精製過程から本酵素が mitagenic レクチンに対するレセプターホスホリパーゼと association を有することが示唆された。さらにリンパ球活性化の 2 つの重要なステップの解析の結果, PI 代謝の促進とリン脂質メチル化反応は, リンパ球活性化の異なったステップに関係することが示唆された。

4. 神経-グリアハイブリッド細胞の興奮性と膜内粒子

古家 喜四夫・古家 園子・山岸 俊一 (生理研)

ニューロブラストーマ N 18 とグリオーマ C 6 のハイブリッド細胞である NG 108-15 を用いて神経の分化の過程での興奮性の発達と膜内粒子の関連を調べた。

NG 108-15 細胞は通常の培養条件下 (DMEM, 5 % 牛胎児血清, 10% CO_2 , 37°C) では興奮性を示さないが, ジブチルサイクリック AMP (dBcAMP) 1 mM を含む液で培養すると 2 ~ 3 日で突起を伸ばしはじめ, ゴルジや滑面小胞体等が増加し, 7 日でミクロチューブル, ニューロフィラメント, デンスコアド小胞等をもった完成された神経細胞となる。この時の活動電位は Na 及び Ca の 2 成分のスパイクからなる。また TEA 及び 4 AP で抑制される K と, Ca の流入によって活性化される K の成分があると思われる。通常の培養液 (152 mM Na, 1.8 mM CaCl_2) と Na-free 培養液 (152 mM cholineCl, 10 mM CaCl_2) で活動電位とその最大立上がり速度を経時的に測定し Na スパイクと Ca スパイクの発達の経過をみた。Ca スパイクは 2 ~ 3 日で出はじめ 5 日で完成 (平均約 10 V/s) しその後ほぼ一定に保たれている。又 Na スパイクは少し遅れて 4 ~ 5 日で出はじめ 7 ~ 8 日で完成し (平均約 55 V/s) やはりその後一定であった。

フリーズフラクチャー法を用いて調べた膜内粒子は分化に伴って数が P 面で 1,500/ μm^2 から 2,600, E 面で 260/ μm^2 から 560 と倍増した。イメージアナライザーで粒子の大きさの分布を分析すると直径 7.5 nm 以下の小さな粒子の数はほとんど変わらず, 大きな粒子 (と

くに 10 nm 以上) の増加が著しく P 面, E 面ともほぼ 3 倍に増加していた。一方親株の C 6 細胞では dBcAMP 処理によっても興奮性は現われず膜内粒子の数, 大きさの分布に変化はなく, N 18 ではわずかに興奮性を示すようになり, 膜内粒子は全体にわずかの増加傾向がみられた。

成熟した NG 108-15 細胞を ConA で 2 時間処理すると P 面に 10 nm 以上の大きな粒子の凝集がみられた。E 面の分布には大きな変化はみられなかった。又活動電位にも変化はみられなかった。colcemid (0.01~0.1 μ g/ml), CytB (1~10 μ g/ml) で処理した細胞は突起の消失など大きな形態的变化を示したが興奮性に質的な変化はみられなかった。この時 P 面では小さな粒子が増加したが E 面での分布は大きな変化を示さなかった。

5. ショウジョウバエ光受容機構の遺伝解析

堀田 凱樹 (東京大学・理)

光受容の初期過程の分子機構については, レチナールの光吸収過程とその分子変化については, これまでの研究でかなり詳しい理解が得られている。しかし, オプシンの構造変化・transduction の機構およびイオンチャンネルの開口に到る分子機序については, 中間に介在する“役者”の割り出しもまだ十分には行なわれていない。われわれは, 光受容の初期過程に異常をおこす突然変異を多数 (可能ならすべて) 分離・同定し, その分子機構を調べることによって, 正常の機構に関する新しい解析法を開発することができるのではないかと考えて, ショウジョウバエを実験材料に選び, 成虫および幼虫期の視覚系の遺伝解析をすすめている。

ショウジョウバエを用いることの利点は, 蓄積された遺伝技術を広く応用しうる点にある。特に遺伝的モザイク法を用いて, 光受容の初期過程に真の異常をおこす遺伝子と, みかけ上視覚異常を生じる場合でもその原因が身体の他の部位に存在する遺伝子とを明確に識別して解析しうる点が重要である。また, 通常は, 遺伝子の産物が体内に大量に存在する場合であっても, 極く微量にしか存在しない場合であっても, 遺伝子の数は同じ 1 個であるから, 微量にしか存在しない重要な“役者”をも公平に同定できるという点も遺伝解析法の特徴である。

本日の討論では, 特に光受容膜の微細形態・生理学的性質・蛋白およびリン脂質などに異常をおこす突然変異を中心にその解析結果を解説する。また, 幼虫の視覚系と成虫の視覚系の遺伝子支配の異同に関しても言及する。

さらに、最近の発展が著しいモノクローン抗体法、遺伝子クローニングなどの手法を今後の研究に応用していく可能性について述べるつもりである。

6. 化学的興奮の分子機構 (速度論的研究)

木島 博正・榎原 康博・大沢 芳夫・木島 祥子 (九州大学・理)

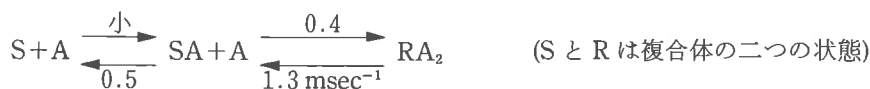
アセチルコリン受容膜の化学的興奮はレセプター・イオノフォア複合体にアゴニストが結合して誘起されるイオンチャンネルの開口である。これには複合体を構成するサブユニット間 ($\alpha_2\beta\gamma\delta$) の相互作用が主役を演じていると考えられる。この複合体のカイネティックスの研究は平衡論と速度論とに別けられる。

〔A〕平衡論は膜興奮の定常状態 (複合体の環境としては平衡に近い) における用量応答関係やその電位依存性等を調べる。膜コンダクタンス変化について正確な用量応答曲線を求めることは脱感作の存在のために非常にむづかしいが、正の協力性の存在は確かである。Hill 係数の最大値がアセチルコリン (Ach) の場合に 2.7 に達するというデータ (Dreyer ら) と 2.0 以下だというデータがある。複合体のモノマー中にはアゴニスト結合部位は 2 つしかない (α_2) ので、2.7 が正しければ複合体間にも相互作用があることになる。用量応答曲線は、サブユニットが二つの状態をとると仮定した二状態模型で説明されるが、二状態模型には取りうる Hill 係数に制限がある¹。二状態模型が成立つかどうかはまだ確かめられていない。複合体は結合ユニットから考えて二量体とみなせるが、二状態模型で考えても、状態とアゴニスト結合数の異なる 10 コの成分 (複合体の状態) が考えられる。協力性が強ければ成分の数は 6 である。

〔B〕速度論 (Transient Kinetics) は、興奮時の複合体のとり成分間の遷移を解析する。現在のところ興奮の定常状態では複合体はほぼ平衡にあり、外からエネルギーの供給は無いので詳細釣合の原理が成立しているとして解析されているが、最近これが破れている場合もあることが報告されている。実験法としては (1) EPC や MEPC の減衰過程をみる。 (2) 定常状態の電流のゆらぎをみる。 (3) 電位ジャンプ後のコンダクタンスの緩和をみる。 (4) 単一チャンネルの開閉の直接観測がある。 (4) はイ) 開状態が decay する過程と閉状態が decay する過程が別々に解析できる、ロ) 非定常状態の解析ができる、ハ) 周波数特性が良い方法が (ギガシール) みつかった等の特徴があるが、各方法はそれぞれある程度相補的である。

我々はカエルの終板の Ach に対する応答を (2) と (3) の方法で解析し、少なくとも 2 つの緩

和時間を分離した。最もおそい2つが観測されていると考える近似法²を用いるとその結果は、



である。

文献

- 1) Kijima, H. and Kijima, S. Cooperative response of chemically excitable membrane I, II, III. *J. Theor. Biol.* 71 567 (1978), 82 425 (1980), 83 131 (1980).
- 2) Kijima, H. and Kijima, S. 'Steady/equilibrium approximation' in relaxation and fluctuation I. Recipe to simplify first-order reaction. *Biophys. Chem.* *in press*.

7. 細胞膜受容機構とセカンドメッセンジャー

高井 義美 (神戸大学・医)

一般に Ca^{2+} をセカンドメッセンジャーとする細胞外シグナルは細胞膜のイノシトールリン脂質 (PI) の代謝回転を促進させることが知られている。私共は Ca^{2+} とこのリン脂質の代謝回転を介する受容伝達機構を見出しその解析を行っている。この機構では細胞外シグナルがその受容体に作用すると、PI が速かに加水分解されてジグリセリド (DG) が生成される。DG は Ca^{2+} と共にセカンドメッセンジャーとして作用して、セリンリン脂質の存在下にある種の蛋白質リン酸化酵素 (C 酵素) を活性化する。活性化された C 酵素は種々の蛋白質をリン酸化し、その結果細胞外シグナルの生理作用が発現される。この受容機構は生体内の組織に広く分布しており、血小板をモデルとして解析した結果実際にトロンビンやコラーゲン刺激に反応して作働していることを確認している。また、多くの組織においてこの受容機構は cyclic AMP や cyclic GMP によって抑制される。その抑制機序として cyclic AMP と cyclic GMP はそれぞれの蛋白質リン酸化酵素を介して PI の加水分解反応を阻害し、C 酵素の活性化に必要な DG の生成を抑制することを明らかにしている。今回は、細胞膜受容機構における Ca^{2+} 、DG-C 酵素系の役割とその環状ヌクレオチド系との相互関係について報告する。

8. イノシトールリン脂質と感覚受容

吉岡 亨 (横浜市立大学・医)

刺激受容に伴うイノシトールリン脂質 (PI) の代謝回転やリン酸化については、血小板、赤血球、脳、神経等によく調べられている。感覚受容細胞については、専ら、機械的刺激を受容する有毛細胞を含む組織 (有毛細胞だけを単離することが困難なる故) について、調べられ、聴覚障害をひき起すネオマイシン等アミノグルコシド化合物がホスホイノシタイド (DPI, TPI など) と特に強く結合することが、難聴をもたらすのではなかろうかと考えられるに至っている。このような考えは、 ^{31}P -NMR による TPI とネオマイシンの結合状態の研究の結果により更に強く支持されるようになった。

次に光受容器についてはイカ、タコ、ショウジョウバエなど無脊椎動物の視細胞を中心に研究が進展して来た。網膜電位 (ERG) に影響を与える薬物としてはイソブチルメチルキサンチン (IBMX) が知られているが、IBMX 存在下ではイノシトールリン脂質リン酸化も大きく影響を受けることが判明した。これだけでは PI のリン酸化と ERG との関係を明らかにすることは困難であるが、ERG を発現しないようなショウジョウバエ突然変異体の眼でも PI のリン酸化のモードが異なっていることが判明した。これにより ERG の発生と PI リン酸化の間には極めて密接な関係のあることが示唆されるに至った。

9. 細胞の迅速応答とリン脂質代謝

今井 篤志, 野沢 義則 (岐阜大学・医)

外来刺激に対して迅速な反応を呈する細胞系において、刺激の受容とカップルした膜現象が数多く報告されている。特にホスファチジルイノシトール (PI) を中心とした膜リン脂質の変動は、主要な初期反応として注目されている。Michell によって PI 代謝回転が細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇→細胞機能発現の引き金になっていることが提唱されて以来、細胞の受容応答機構におけるリン脂質代謝の重要性がクローズアップされてきた。

そこで、われわれは迅速応答を示す細胞系のモデルとして血小板を中心として、また他に肥満細胞および肝細胞において、刺激応答の過程における膜リン脂質代謝の比較検討を試みたところ、それぞれの細胞機能発現とリン脂質代謝がなんらかの様式で連繫している

ことが示されたが、その反応様式は細胞や刺激の種類によって必ずしも一定したものではないことが明らかにされた。なお、これらのリン脂質代謝応答の特異性に加えて、 Ca^{2+} 動態についても若干の知見を報告する。

10. 大腸菌の走化性とタンパク質メチル反応

林 博司 (名古屋大・理)

大腸菌の走化性を突然変異株を用いて解析することにより、走化性の発現には化学受容体の可逆的なメチル化、脱メチル化反応が密接に結びついていることが明らかになった。受容体、メチル化因子、脱メチル化因子は特定の遺伝子の産物として同定された。受容体、メチル化因子、脱メチル化因子のいずれの機能を欠いても走化性は欠失する。受容体のメチル化、脱メチル化反応は、無細胞系を用いても研究できるようになった。受容体は1分子に2分子以上のメチル基を受けとり、そのメチル基の数は、受容体の信号特性を変化させる。即ち、メチル化の度合いの低い受容体は直進のシグナルを出しやすくメチル化の進んだ受容体は方向転換のシグナルを出しやすい。走化性の情報変換器のもついくつかの特性；時間微分（濃度の）がとれること、適応現象があること、短期間の記憶又はヒステリシスのあること、等が、メチル化反応、脱メチル化反応が逐次的に起こるサイクリックな反応であるという事実からうまく説明できることを論じる。

11. 神経軸索膜と細胞骨格

月田 承一郎 (東京大学・医)

神経軸索内における細胞骨格の構築、およびそれら細胞骨格と軸索形質膜との関係について、おもに急速凍結エッチングレプリカ法により検討した。その結果、無固定の軸索内には、長軸方向に走るニューロフィラメント、微小管、およびそれらを横に連結する糸状構造よりなる細胞骨格の密な網目が存在することが示された。また、軸索内を両方向性に5~10 μm /秒の速度で輸送され则认为られている細胞内膜構造も、微小管やニューロフィラメントと糸状により結びつけられていた。

軸索形質膜直下には、細い線維状構造からなる網目が存在し、この網目を介して、形質

膜と細胞骨格が連結されていた。この網目構造は、赤血球の裏打ち構造として我々が解析を進めているスペクトリン-アクチンの網目によく似ており、興味深い。その分子構築を詳細に検討していくことが、膜の裏打ち構造一般の構築と機能を理解する上で重要であると思われる。

12. 音受容とイノシトールリン脂質

柳沢 慧二 (鶴見大学・歯)

高等動物における音受容は蝸牛有細胞で行なわれるが、その分子機構については不明の点が多い。Hudspeth は有毛細胞の毛の表面における電流の大きさを微小部分で測定して、不動毛の先端部に変換機構が存在することを示唆している。このことは浜の電子顕微鏡的研究における毛の先端部の構造物の所見とも一致してきわめて興味深い。われわれは側線器有毛細胞の刺激受容に対して Ca^{2+} とネオマイシンが拮抗的に作用すること、イノシトールリン脂質 (PI) が Ca^{2+} に親和性が高いことから、有毛細胞の変換部に PI が関与しているものと考えている。抽出した PI を用いて Ca^{2+} 、ネオマイシンの結合による NMR スペクトルのピークの移動についての林らの報告は、この考えを裏づけている。PI の代謝過程と受容器との関係は視覚器でも注目されているが、蝸牛組織のリン脂質分画中への ^{32}P -ATP のとりこみ、それに対するネオマシンの音刺激の影響をみると、TPI, lyso-TPI において音刺激によるとりこみの増大、ネオマイシンによるその抑制がみとめられた。

13. 大腸菌の温度感覚機構

今栄 康雄 (名古屋大学・理)

大腸菌に温度刺激を与えると、泳ぎのパターンの変化という形のレスポンスが起る。このレスポンスの定量的解析から、温度刺激は温度変化の速度であり、閾値は $0.02^\circ\text{C}/\text{秒}$ であること、刺激の大きさの対数に対してレスポンスが直線的に変化すること、 29°C 附近の温度変化に最も感度が高いこと、などが明らかとなった。また、温度レスポンスがセリンで特異的に抑制されること、セリンの感覚伝達機構の変異株ではレスポンスが小さくなっていることなどから、温度の感覚伝達機構がセリンの感覚伝達機構と密接な関係にあること

がわかった。適応反応系に欠損を持つ変異株では、温度変化の速度ではなく、温度の絶対値で泳ぎのパターンが決ることが見出された。これらの結果の最も単純な説明は、温度の感覚受容がセリン感覚受容蛋白質の温度による構造変化により起る、というものである。

14. ゾウリムシの温度感覚

中岡 保夫 (大阪大学・基礎工)

ゾウリムシは、温度勾配のついた容器中に入れられると、彼らが培養されていた温度附近に集まるような走熱性を示すことが古くから知られている。このような走熱性を示している時の泳ぎを調べてみると、培養温度に向かって泳ぐ時は方向変換する頻度が低く、反対にこれから遠ざかる向きに泳ぐ時は、方向変換頻度が高いことが分った。すなわち、温度勾配に依存して方向変換頻度を変化させることで、ゾウリムシは培養温度附近に集まる。それでは、ゾウリムシはいかにして温度の勾配を感知するのか？ ゾウリムシは、温度勾配中をランダムに泳ぎ回りながら、温度の時間変化を感知すると考えられる。実際に、ゾウリムシに温度を急に变化させる刺激を与えると、1分ほどの間、方向変換頻度が増減する反応がみられる。培養温度に向かって温度を変えた時は、頻度が一時的に減少し、遠ざかる向きに変えた時は頻度が増大する。

これら泳ぎでの反応にともない、細胞膜がどう変化しているかを調べるために、ゾウリムシに微小電極を刺した状態で外液の温度を急激に変化させてみた。培養温度から温度を急に下げた時は、膜電位は、一時的に数ミリボルト脱分極し、1分ほど後にもとのレベルにもどる。反対に、培養温度に向けて温度を上げた時には、一時的な過分極がみられる。脱分極向きの変化に際しては、これに上乗せして短い脱分極スパイクが発生する。このスパイクに対応して、ゾウリムシの泳ぎの方向変換が起こると考えられる。過分極向きの変化に際しては、スパイクの発生頻度が減少している。したがって、ゾウリムシは温度の急変にともないこの刺激に対する受容電位を発生し、この電位に依存してスパイク発生頻度が増減し、これと平行して泳ぎの方向変換頻度が増減することで、温度刺激に反応し、走熱性を示すと考えられる。受容電位が、どのイオンに対する膜の透過性変化によって発生するのか、現在のところ明らかではない。ただ、ゾウリムシの変異株で、電位依存性のCaチャンネルに欠陥のあるものでも、受容電位は正常に発生しているので、このCaチャンネルは受容電位の発生に関与していないことだけは分る。

ところが、一方、ゾウリムシを界面活性剤、トリトン X-100 で処理して細胞膜を破壊し

ておき、外から ATP を加えるとセン毛打のみは回復させることができるが、このセン毛打の頻度が、温度の急変によって一過的に増減する。すなわち、温度を急に上げるとセン毛打頻度は、いったん増大した後、少し減少してもとのレベルよりも高い値に落ちつき、反対に温度を下げた時には、頻度が減少した後少し増大して落ちつく。このような現象は、温度の急変によって運動に関与する蛋白が一過的に変化している可能性を示していると思われる。運動性蛋白が温度変化を感知し、これが膜の興奮性を変えるということも考えられる。

16. 赤外線受容器の自発発射の規則性について

寺嶋 眞一 (東京医科歯科大学)

マムシ類の赤外線受容器 (ピット器官) 中には厚さ 15μ のピット膜 (受容器膜) がある。このピット膜中に分布する温線維から記録される自発発射の頻度は、膜の温度により変化し、その最高値 ($20\sim 30/s$) は 25°C 付近で得られる。又、その発射間隔は正規分布になることが多い。

発射間隔をかなり小さく、しかも一定に保つ為には一定の大きさの起動電位が必要であると推測されるが、ピット膜から記録される順応の遅い起動電位は、これらの発生過程に深い関係があるものと思われる。

順応の遅い起動電位を大きく、しかも常時、発生し続ける過程には、大量のエネルギーが必要と考えられるが、ピット膜中の神経終末塊 (直径 40μ) 中に見られる多数のミトコンドリアは、このエネルギー供給に役立っているものと思われる。

17. 視細胞におけるエネルギー変換機構について

三木 直正 (金沢大学・がん研)

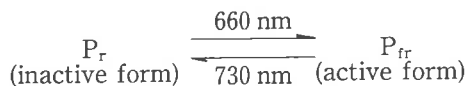
脊椎動物の網膜杆体細胞において、どのような機構で光エネルギーが電気エネルギーに変換されるかは不明であるが、現在、カルシウム説とサイクリック GMP 説が提案されている。サイクリック GMP 説では、光刺激により cyclic GMP ホスホジエステラーゼが活性化され、cyclic GMP 濃度が急減し、Na チャンネルの閉鎖がひきおこされる。cyclic GMP

は蛋白キナーゼを介して作用すると考えられているが、杆体細胞外節での cyclic GMP 依存性蛋白キナーゼ活性は、他の cyclic GMP 系酵素に比べてずっと低い。そこで、今回、網膜の ribonuclease 活性への cyclic GMP の影響について調べた。基質として $0.67 \mu\text{M}$ の $[\text{}^3\text{H}]\text{poly (U)}$ を使用した。 0.3 mM cGMP で活性は約 50% 阻害されたが、cAMP では 20% 以下の阻害であった。cGMP 感受性 ribonuclease 活性は、色素上皮細胞に高く、網膜や杆体細胞外節では低くかった。cyclic GMP の生理作用の一つとして蛋白合成の調節などにも関係しているかも知れない。

18. The Photosensing Pigment (Phytochrome) of Algae and Higher Plants

Pill-Soon Song (Texas Institute of Technology)

Phytochrome acts as the major photoreceptor for red-light induced responses in algae and higher plants. The red light responses triggered by phytochrome include activation of gene expression (enzyme induction, protein synthesis, etc.) , germination, flowering, and chloroplast movement. Phytochrome is activated by red light, as written in the following scheme



The mechanism of the above activation process and the molecular basis of the physiological activity of phytochrome (P_{fr}) have been studied, yielding the main result that the $P_r \rightarrow P_{fr}$ phototransformation involves a reorientation of the chromophore and the generation of a hydrophobic surface on the P_{fr} protein. The latter is suggested as the site of interaction with phytochrome receptor (s) in the primary event of red-light responses in plants.

19. Photomovement in blue-green algae.

Donat-Peter Häder (Phillips University)

The filamentous blue-green algae *Phormidium uncinatum* undergoes photophobic responses upon sudden changes in light intensity. The photoreceptors for this response are identical with the photosynthetic pigments. In light protons are transported into the thylakoid vesicles and are released into the cytoplasm in darkness. The resulting light-induced potential changes control voltage-dependent cation-specific gates in the cytoplasmic membrane which allows a massive influx of cations (Ca^{2+} ?) along a previously established gradient built up by pumps. This model is supported by the inhibitory action of ionophores (A23187) and in channel blocker (lanthanum, ruthenium red). A computer model was designed to simulate the behavior observed under experimental conditions.

20. カエル視細胞外節膜の超微細構造

臼倉 治郎 (東京大学・医)

カエル網膜を液体ヘリウムで急速凍結後、凍結置換法、および、凍結切断エッチングレプリカ法により、観察した。凍結置換法により作製した切片では、従来の切片法とは異なり、外節円板膜はゆらぎのない扁平な袋として観察された。そして、その円板腔は辺縁部をのぞいてほとんど閉ざされていた。これらの円板は約 280 Å の周期で、非常に規則正しい配列しており、それら円板相互を結ぶ細いフィラメントも観察された。

一方、凍結切断エッチングレプリカ法では、円板膜の割断面 (P,E 面) に加え、細胞質に接した真の表面にも、多くの粒子状物質のあることが観察された。しかし、P 面にあらわれる粒子にくらべ、その分布密度は約半分であった。E 面には小数の膜内粒子の他 P 面の粒子に相対すると思われる小穴が認められた。腔に面した真の表面には特別の構造は観察されなかった。分布密度を参考にすると、視物質は P 面の粒子に相当し、それらは円板膜を貫通していると思われる。また、細胞質側の真の表面に認められる粒子は外在性の膜周辺蛋白と推測している。

21. 学習の神経機構へのアプローチ

小田 洋一・塚原 伸晃 (大阪大学・基礎工)

動物の行動が外部環境から与えられる感覚情報によって変化することは学習の一つの典型である。一般に神経系内のニューロンや神経回路内に何か物理的変化がおこり、系の伝達特性が変わって学習が成立すると考えられている。これまでの学習の神経生理学的研究の方法は、まず行動の変容を解析し、次に行動を担う神経回路及び行動の変容に伴う変化部位を同定し、最終的に細胞機構を解明しようというものであった。KANDEL (1976) らはこのアプローチにより、軟体動物 (アメフラシ) の比較的単純な学習について行動レベルから細胞レベルまでの精力的な研究を行なっている。ところが一般に高度の学習を行なう哺乳動物の中樞神経系の回路構成は複雑で同定が困難である。学習に対する別のアプローチとして、まず神経系内の可塑的要素について詳細に調べ、次にその可塑的要素を含む神経回路によって生じられる学習行動を検討する方法が考えられる。猫の中脳赤核細胞は後者のアプローチにとって次のような利点をもつ。①赤核細胞は大脳皮質感覚運動野と小脑中位核より単シナプス性興奮結合を受け、運動制御に重要な出力細胞である。赤核細胞の軸索は赤核脊髓路となって四肢の屈筋伸筋運動ニューロンに2シナプス性に投射する。②皮質-赤核シナプスは周波数増強やテタヌス後増強というシナプス伝達の可塑性や、小脑中位核破壊後皮質-赤核線維が発芽しシナプスを新生する事が定量的に解析されている。皮質-赤核シナプスの発芽はこのような脳損傷後だけでなく、前肢の屈筋と伸筋の支配神経の交叉縫合というより生理的な条件下でもおこることが示されている。我々はこの皮質-赤核シナプスが学習行動に関係するか否かを古典的条件付けのパラダイムを適用し検討した。中脳が逃避行動の古典的条件付けに重要な働きを成している事は既に知られている (SMITH 1970)。我々は皮質遠心路を赤核の直下で切断し出力系を皮質-赤核脊髓路系に限定し、条件刺激 (CS) を皮質赤核路へ、無条件刺激 (UCS) を対側前肢の皮膚に各々電気パルスで与え、前肢肘関節の屈曲を条件付ける事を試みた。2つの刺激を組合せ7~8日間訓練を行なうと、CSに対し次第に屈曲応答を示すようになった。条件応答の上腕二頭筋筋電図の潜時は8ミリ秒でこれは条件刺激部位から赤核脊髓路を伝播する最短潜時に相当する。CSとUCSの時間間隔をランダムにして組合せたりUCSを単独で与えても訓練効果は得られなかった。又CSのみを与えたり、CSとUCSの順序を逆転して与えると一旦獲得された条件応答が5~8日間で消去される。即ちこの行動変化はCSとUCSをこの順序で一定時間間隔で組合せたときにおこる連合学習と考えられる。赤核脊髓路以下を共有

する小脳核—赤核脊髓路系の伝達効率は学習の前後で変化していない故、この条件付けに伴う神経系内の変化部位は皮質—赤核シナプスではないかと推定された。この事は皮質赤核路刺激に対する赤核細胞の発火活動が条件付け訓練を行なった標本では対照群に比べて有意に上昇している事によっても示唆された。我々は皮質—赤核シナプスでの変化は構造変化を伴うような効果が長期間維持されるものを想像している。

『睡眠促進物質研究会』

昭和 57 年 6 月 10 日～昭和 57 年 6 月 12 日

(参加者)

井 上 昌次郎	(東京医科歯科大学)	第 6 回 ECSR の動向
内 菌 耕 二	(生理学研究所)	SPS 研究の過去・現在・未来
山 岸 俊 一	(〃)	
東 晃 史	(〃)	マウス・スクリーニング・システム
入 来 正 躬 (欠席)	(山梨医科大学)	
長 崎 紘 明	(〃)	SPS-A 活性
石 川 正 幸	(東京医科歯科大学)	
菰 田 泰 夫	(〃)	SPS 精製
本 多 和 樹	(〃)	SPS-B 活性

概要

睡眠促進物質 (SPS) の研究は、1971 年暮から始まった。内菌の提唱で入来と井上とが共同研究に合意したのがそれである。井上はただちに断眠装置の開発にかかり、翌年東京医歯大医器材研に制御機器部門が新設されると、本多らとともに自動大量生産式の装置を完成した。同年東京都老人研が発足すると入来研究室の長崎らは、断眠ラット脳から有効物質を抽出することに成功した。第 1 報 Nagasaki et al.¹⁾ の出版は 1974 年 3 月であった。

本会は、10 年に及ぶ SPS 研究の発展をふりかえり成果をとりまとめることを第 1 の目的とする。4 つのサブグループがそれぞれ確立した手法と最新のデータとを持ち寄って厳密な評価を試みた。SPS 精製については菰田が、SPS の 2 つの有効成分のうち SPS-A については長崎が、SPS-B については本多が、スクリーニングシステムについては東が、それぞれ報告した。これらは別紙に記してある。

第 2 の目的は、世界各国で急速に進展しつつある睡眠誘発物質研究と SPS 研究との対比を試みることである。本年 3 月の欧州睡眠学会議の動向と各国の睡眠ペプチド研究の現況について、井上が話題提供をした。詳細は近刊の総説にまとめている²⁾。

第 3 の目的は、今後短期間に SPS の化学的同定と生理効果解明を達成するには、何をどのように進めるかという将来計画を十分に検討することである。懇親会を含め、全員で最も時間をかけ熱心な討論が行われたのはこの面であった。

[研究発表]

1. Nagasaki, H., Iriki, M. Inoué, S. and Uchizono, K. Proc. Japan Acad. 50: 241-246 1974
2. Inoué, S., Uchizono, K. and H. Nagasaki Trends Neurosci. 5: in press 1982

1. 睡眠促進物質の精製

菰田 泰夫・石川 正幸 (東京医科歯科大学)

1. 断眠ラット脳幹抽出物に含まれる睡眠促進物質の精製

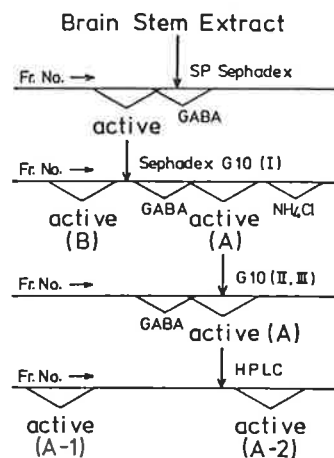
断眠ラット脳幹抽出物は右図に示した方法で精製した。最初に SP Sephadex を担体とするイオン交換カラムクロマトグラフィーに掛け、 γ -アミノ酪酸 (GABA) の直前に溶出する画分に活性を見出した。この活性画分を Sephadex G 10 を担体とするゲル濾過カラムクロマトグラフィーで精製し、GABA より前に溶出する画分 (B) および GABA の直後から NH_4Cl より前に溶出する画分 (A) の 2 活性画分を得た。

2. 活性画分 (A) の精製

活性画分 (A) を G 10 を担体とするが溶出溶媒が前記と異なるゲル濾過カラムクロマトグラフィーに掛け、GABA の直後に溶出する活性画分を得た。ついで高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) で精製した結果、2 活性画分 (A-1) および (A-2) に分離することができた。(A-2) を pronase で処理したところ、有意の失活は認められなかった。(A-2) をさらに精製する実験は量的な問題もあり、現在中断している。

3. 活性画分 (A-1) の性質

活性画分 (A-1) を pronase で処理すると有意の失活が認められたので、500 匹分に相当する (A-1) をさらに精製し、加水分解後アミノ酸分析を行ったが、有意と考えられる分析値は示さなかった。(A-1) の pronase 処理で失活した活性物質がペプチド様の化合物であるかどうかは今後の検討すべき問題である。



4. 活性化合物 (A-11) の精製

活性画分を前記とは異なる HPLC 条件で分析したところ、254 および 280 nm による検出で数本のピークを認めたが、そのうちの 1 本のピークに活性が見出された。現在、2,937 匹分から HPLC 的に純粋な化合物 (A-17 と仮称) を単離する実験を行っているが、(A-11) は活性画分 (A-1) に含まれる活性成分のひとつであると考えられる。

5. 活性画分 (B) の精製

活性画分 (B) に相当する各サンプルの活性を検討し、活性を示したサンプルを合一した後、再度 Sephadex G 10 カラムクロマトグラフィーで精製した。GABA より前に溶出する 2 活性画分をさらに Sephadex G 15 でそれぞれ精製し、現在生物試験により活性画分を検索している。

2. 睡眠促進物質 SPS-A の活性についての報告

長崎 紘明・入来 正躬 (山梨医科大学)

睡眠は約 24 時間の周期的交代現象であり、徐波睡眠と逆説睡眠とから構成される。この研究では、ピエロン、パペンハイマー、モニエーらの実験成果に基き、すなわち、脳の睡眠機構には体液性の調節因子が関与しているであろうという仮定に基き、睡眠調節因子の単離を目的としている。

〔材料〕ラット(雄)を床電気刺激によって断眠した。断眠後、脳を取り出し氷中で脳幹を切り出した。脳幹をホモゲナイズした後、透析して透析外液を凍結乾燥したものを出発材料とした。東京都老人総合研究所において、約 4,000 匹分の脳幹抽出物をえた。

〔方法〕粗抽出物の効果はラットの全睡眠量と全活動量を指標とした。脳波の積分値の表示により、全睡眠時間と全覚醒時間を求め、活動量の測定にはアニメクスを用いた。活性分画 SPS-A の効果は純系マウスの徐波睡眠量と逆説睡眠量を指標とした。24 時間中の睡眠量を基準として、正常値よりの増加分が、逆説睡眠の場合 30 分を超えた場合に有効とした。また徐波睡眠の場合 100 分を超えた場合に有効とした。

〔結果〕

1. 粗抽出物の効果：すでに発表してあるので、省略する。

2. SPS-A の効果。

- ① SPS-A はマウスの腹腔内に投与すると、投与量に依存して、逆説睡眠と徐波睡眠が増加した。SPS-A の至適量は逆説睡眠と徐波睡眠で異なる。

- ② SPS-A は、クロラムフェニコルによって生じる逆説睡眠の阻害効果を、拮抗的に解除した。SPS-A による拮抗作用は、短期 (2 時間) と長期 (24 時間) と 2 種類の作用があると思われる。
- ③ SPS-A によるクロラムフェニコルへの拮抗作用の時間経過と、縫線核のセロトニン量の変動の時間経過とは、類似したパターンを示すことから、SPS-A はセロトニン代謝に影響する可能性がある。
- ④ SPS-A は、さらに SPS-A 1 と、SPS-A 2 とに分離された。SPS-A 1 の効果はプロナーゼで失活したが、SPS-A 2 の効果は失活しなかった。
- ⑤ SPS-A 1 はさらに SPS-A 1' とバルクに分離された。SPS-A 1' は標準物質の活性と類似した効果を示したので (逆説睡眠の増加効果)、現在確認している。
- 〔結論〕睡眠促進物質 SPS-A は、いくつかの化合物を含んでおり、現在単離する実験が行われている。SPS-A は、逆説睡眠と徐波睡眠の調節因子を含んでいると考えられる。

3. 睡眠促進物質の効果—SPS-B の活性

本多 和樹・井上 昌次郎 (東京医科歯科大学)

材料、24 時間断眠したラットの脳幹部をホモジナイズし、水に対して透析した透析外液を凍結乾燥して粗抽出物を得る。この粗抽出物を SP sephadex で分画し、GABA の直前に溶出する活性分画について sephadex G 10 カラムで精製すると GABA をはさんで前後に SPS-B, SPS-A の 2 つの活性分画が溶出してくる。

方法、脳波、筋電用の電極を植込み、第三脳室内に植込んだカニューレからは $20 \mu\text{l/h}$ で生理食塩水のみを連続的に注入しておくと、正常雄ラットは明瞭な睡眠—覚醒の日周リズムを示す。また 1 日の睡眠量はほぼ一定である。このようなラットの脳室内へ夜間 10 時間 (1900—0500) 連続して生理食塩水に溶かした SPS を注入する。その効果は SPS 注入当夜と生理食塩水のみを注入した前夜の睡眠量を比較し検討する。

結果、SPS-A 5 匹分を $200 \mu\text{l}$ の生理食塩水に溶かして脳室内へ注入すると、注入当夜の睡眠量は SWS: $331 \pm 17 \text{ min}$ (N: 7), PS: $23 \pm 3 \text{ min}$ (N: 4) となり、前夜の SWS: $198 \pm 13 \text{ min}$ (N: 7), PS: $23 \pm 2 \text{ min}$ (N: 4) と比較すると SWS は 67% の増加 ($P < .001$) を示すが、PS はほとんど増加しない。また翌日夜はいくらかの効果を残すが回復してくる。

SPS-B 2 匹分を生理食塩水に溶かし脳室内へ注入すると、注入当夜の睡眠量は SWS:

335±14 min, PS : 38± 6 min (N : 14) となり, 前夜の生理食塩水のみを注入したときの睡眠量 SWS : 220± 7 min, PS : 29± 4 min (N : 14) と比較すると SWS は 53% の増加 ($P < .001$) を示し, PS は 31% の増加を示す。また注入翌日の睡眠にも強く影響を与えており, SWS に関しては翌日の夜にも 21% の増加 ($P < .01$) がみられ, PS では翌日の昼間は 30% 減少するが夜にはそのリバウンドがおこり 99% の増加 ($P < .01$) がみられた。しかし翌々日 (Affter-2) では SWS, PS ともにほぼ回復した (Table. Bioassay-1)。上記のように SPS-B の活性が確認された後, 分画して活性のピークについて検討した。まずバッジの異なる 6 種のサンプルの中で活性の有る 4 種についてまとめ 301-1 として, 活性の有ることを確認した (Bioassay-2)。次に 301-1 を 6 分画 L 307-1'~6' としたとき 307-1'~5' に活性が有った (Bioassay-3)。次にさらにこまかく 18 分画 L 307-36~53 としたとき, 3 回ずつの Assay の結果では活性のピークが 3 カ所に認められる。それは 36~38, 41~46, 51~53 である (Bioassay-4)。以上の結果より 307-36~53 を 3 分画したのが 307-1~3 である。307-1, 2 とともに強い活性を示したが, 307-3 は活性を示さなかった (Bioassay-5)。今度は 307-1 と 307-2 を sephadex G 15 カラムでそれぞれ 333-1~5 に 5 分画, 331-1~6 に 6 分画した。333 シリーズに関しては 333-1 と 333-3 に活性があり他には活性がない。331-1 シリーズは 2 回の Assay からは活性が 1~6 に広がっておりはっきりしない (Bioassay-6)。今後この SPS-B 活性のピークを見つけることが必要であるのでさらに Bioassay による検討を続けて行きたい。

4. マウス・スクリーニング・システム

東 晃史 (生理研)

マウス脳波の δ 波領域の信号とマウスの頭上に設置した BM トランスデューサー (加速度検出) 出力信号の 2 つの入力系を用いて, マウスの状態 (睡眠期・覚醒期及び覚醒はしているが静止している時期) を 10 秒毎に判定するリアルタイム・オンラインシステムは既に完成されている。マウスの REM 期は本システムのロジック中では睡眠期以外に分散されて検出不能であった。

一方 REM 期に発生する微小な体動を BM トランスデューサーによって, 連続的な一定振巾を有した特徴的パターンとして検出し得ることが明らかになった。

今回, この特徴的パターンのみを抽出する REM 睡眠様パターン判定ロジックを設け, 従来のロジックによる判定結果と重ね, 睡眠期の直後に出現する REM 睡眠様パターンのみ

を REM 期と判定し，覚醒中に出現する REM 睡眠様パターンと区別した。

これらの自動判定による REM 期と記録紙から読みとった REM 睡眠の発生時刻・持続時間との一致率を確かめているところである。

『心節の自動性・伝導性に関する研究』

昭和 57 年 6 月 14 日～昭和 57 年 6 月 15 日

- 1) M. Kameyama and H. Irisawa (National Institute for Physiological Sciences) : Cell-to-cell coupling in ventricular cells.
- 2) D. Pelzer (Homburg) : Single adult cardiac myocytes ; electrical responses to external ion change and neuro transmitters.
- 3) Y. Tsuda (Kyushu Univ.) Intracellular Na^+ and Ca^+ regulation.
- 5) M. Hiraoka (Tokyo Medical and Dental University) : Arrhythmogenic effects of low K^+ solution in ventricular muscle fibers.
- 6) B. Surawicz (U.S.A.) : Cycle length and action potential duration in mammalian Purkinje and ventricular fibers : The resolved and the unresolved problem.
- 7) M. Arita and T. Kiyosue (Ohita Medical College) : Effects of transient changes in external K^+ concentration on the maximum rate of rise of action potentials and conduction velocity in guinea-pig ventricular muscle.
- 8) K. Hashimoto (Yamanashi University) : Canine effective plasma concentrations of antiarrhythmic drugs.
- 9) T. Iijima (Tohoku University) : Effects of calcium-antagonists on spontaneous action potentials of the canine atrioventricular node cell.
- 10) I. Seyama (Hiroshima University) : Mechanism of increased K^+ current in Na^+ -loaded SA node cells.
- 11) K. Nishi (Kumamoto University) : Effects of hypoxia on electrical activity, high-energy contents and mitochondrial morphologh in cardiac muscle.
- 12) I. Imanaga and A. Uehara (Fukuoka University) : Indirect sympathomimetic action of TEA on the canine myocardium.
- 13) T. Sawanobori (Tokyo Medical and Dental University) : Optical demonstration and computer simulation of re-entrant tachycardia.
- 14) F. I. M. Bonke (Netherlands) : Conduction properties of the sinus node and the influence of autonomic transmitters and drugs on it.
- 15) S. Weidmann (Switzerland) : General comments (Hypoxia on demarcation) .

本研究会は東京で開かれた第9回世界心電学会 (9 th International Congress on Electrocardiology ;1982年6月8日-11日) に出席した海外からの研究者のうち, 本研究課題に関連する研究に従事している国際的にも著名な5人の研究者と, 国内での第一線の研究者10数名の参加を得て行われた。討議された主な内容は; (i) 分離心筋細胞を用いての細胞間電気結合の性質 (亀山・入沢; 生理研), 分離方法・イオン機序と自律神経ホルモンの作用 (Pelzer ;ザール大), (ii) snail neuron での Ca^{2+} 電流の分析 (津田; 九大), (iii) イオン感受性電極を用いての細胞内 Na^+ や Ca^{2+} の測定と, それによる Na^+ - Ca^{2+} 交換機構の検討 (Fozzard ;シカゴ大), (iv) 外液 K^+ 変化による異常自動能 (平岡; 東医歯大) や伝導性の変化 (有田・清末; 大分医大), 頻度依存性の活動電位持続時間の変動の問題 (Surawicz ;インディアナ大) や光を用いた旋回性頻拍の分析法とそのコンピューター・シミュレーション (沢登; 東医歯大), (v) 抗不整脈剤の血中濃度とその効果の検討 (橋本; 山梨医大), 房室結節細胞に対する Ca^{2+} -拮抗剤の作用 (飯島; 東北大) や TEA の交感神経刺激を介する心筋への作用 (今永・上原; 福岡医大), (vi) 洞結節細胞の Na^+ チャネルの調節 (瀬山; 広島大) や洞結節の伝導特性とホルモン・薬剤の効果 (Bonke ;リンバーグ大); (vii) 酸素欠乏による洞結節細胞の機能・形態変化 (大西; 熊本大), 酸素欠乏による心筋間の境界領域の形成 (Weidmann ;ベルン大), などについてであった。

このように本研究会では, 分離単一心筋標本の作製法やイオン感受性電極などの新しい研究方法, イオン電流の諸問題, 異常ないし病態時の自動・伝導性の変化, など広範な問題で活発な論議がくりひろげられたことは, 各出席者にとって将来の研究指針に示唆を与える有意義な会となったと思われる。同時に, この討論を通じて現在主に海外で行われている新しい研究方法の国内研究者へのより広い普及とその応用を促進する必要性が感じられた。

Arrhythmogenic effects of low K^+ solution in ventricular muscle fibers

平岡 昌和

(東京医科歯科大学・難治疾患研)

生理的条件下では自動能を示さないとされる心室固有筋は, ある異常な条件下になると自発興奮を発生してくることが言われている。本報告では, 犬・モルモット心室筋を用い

て、外液 K^+ 濃度を減少させると 3 つのタイプの異常自動能の発現がみられたので、その性状について検討した。

まず、犬の心室固有筋を K^+ -free, Ca^{2+} -free 液下におくと、54 例中 9 例で静止電位が -45 mV 付近にまで脱分極し、緩徐拡張期脱分極とともに遅い立上り速度 (<20 V/sec) をもつ自発興奮がみられた。この自動能は刺激により一時的に抑制される性質を示し、外液 Na^+ の低下や verapamil の投与により容易に抑制された。

これらの標本を K^+ -free, high- Ca^{2+} ($Ca^{2+}=3.6-7.2$ mM) 液下におくと、静止電位は約 -95 mV を示した。これらにトレーン刺激を与えると、刺激に駆動された活動電位の再分極後に振動性後電位の発現が全例にみられた。刺激の様式を変えることにより振動性後電位の振巾が増大し、閾値に達すると新たな異常興奮の発現がみられた (triggered-automaticity)。この異常自動能は先行刺激に依存性で、期外刺激により誘発されやすく外液 Ca^{2+} や Na^+ に依存性であった。

モルモット心室筋を $K^+=1$ mM, $Ca^{2+}=1.8$ mM 液下におくと振動性後電位の発現がみられ、さらに頻拍が単一又は連続刺激により容易に誘発された。その際、活動電位の再分極相の途中から abortive spike やその反復出現が観察された。これらは外液 Na^+ 増加によりその発現頻度が増強された。

以上、低 K^+ 液下では心室固有筋に 3 つの異なるタイプの異常自動能の発現がみられ、これらは頻拍性不整脈の成因として重要な役割りを演じると考えられた。

イヌ房室結節細胞に対する Ca^{2+} 拮抗薬の作用

飯島 俊彦 (東北大学・医)

イヌ摘出房室結節交叉灌流標を用いた実験では、ノルアドレナリンを選択的に房室結節動脈より房室結節へ投与すると、用量依存性に房室伝導時間が短縮し、大量では房室結節性頻脈が出現した。この房室結節性頻脈の出現は Mn^{2+} では抑制されたが、Verapamil では抑制することができなかった。この結果から房室結節細胞の歩調取り電位に対し、 Mn^{2+} は強く抑制的に作用するのに、Verapamil は抑制作用が極めて弱いことが示唆された。(Europ. J. Pharmacol., 37: 55, 1976) この房室結節細胞の自動能に対する二価金属イオンと有機性 Ca^{2+} 拮抗薬の作用の差異を検討するために以下の実験を行った。

雑種成犬 (6 ~ 10 kg) をペントバルビタール麻酔後開胸、心臓を酸素飽和した低温タイロード液中に摘出。その摘出心より房室結節部を切出し、37°C、酸素飽和したタイロード

液中で房室結節微小標本 (約 $0.3 \times 0.3 \times 0.3$ mm) を作成した。この標本は自動能を有し、房室結節細胞より記録した自発性活動電位は、最大拡張期電位 -70 mV, オーバーシュート $+15$ mV, 最大立ち上り速度 ($\dot{V}_{\max}$) 12 v/sec そして発生頻度は $50 \sim 100$ 回/分であった。

Mn^{2+} ($0.1, 0.3, 1$ mM) は用量依存性に自発性活動電位を抑制し、 $\dot{V}_{\max}$ は減少、緩徐脱分極相 (4 相) はゆるやかとなり活動電位発生頻度は減少した。1 mM の Mn^{2+} 存在下では強く $\dot{V}_{\max}$ と 4 相が抑制され、1 ~ 2 分後には活動電位は消失した。 $\dot{V}_{\max}$ が測定不可能となった時点でも膜電位の振動は見られ、その間隔は Mn^{2+} 投与前より約 150% 増加していた。より選択的な slow inward current blocker と考えられている Co^{2+} でもほぼ同様な結果が得られた。

Diltiazem ($0.1, 0.3, 1 \mu\text{M}$) も用量依存性に自発性活動電位を抑制、 $\dot{V}_{\max}$ は減少した。しかし、4 相に対する作用は Mn^{2+} ほど著明ではなく、 $1 \mu\text{M}$ の Diltiazem で活動電位が強く抑制され、 $\dot{V}_{\max}$ が測定できなくなった時点での膜電位の振動の間隔は、Diltiazem 投与前より約 70% 増加したにすぎなかった。

以上の結果より、二価金属イオンの Ca^{2+} 拮抗薬は (Mn^{2+} Co^{2+}) は pacemaker potential の形成に slow inward current が重要な役割を果していると考えられているにもかかわらず、無機および有機性 Ca^{2+} 拮抗薬の間に大きな差異が存在することは pacemaker potential のイオン機序を考える上で極めて興味深い点である。

外液 K^+ 濃度を増加、減少する経過中にみられる心室活動電位の最大立ち上り速度と伝導速度の変化

有田 真・清末 達人 (大分医科大学)

実験的急性心筋梗塞においては、梗塞巣中心部の間質 K^+ 濃度が最初の 10 分以内に最高 $15 \sim 17$ mM に達し、この時期に一致して不整脈が生じる。また異型狭心症においては傷害電流の指標として、一過性の心電図 ST の上昇が認められるが、心室性不整脈の発生は、ST 上昇相よりむしろ下降相で出現頻度が高いとの報告があり、実験的冠動脈閉塞実験においても灌流再開時に著しい不整脈が出現すると言われている。本研究では、異型狭心症や閉塞冠動脈再灌流時の reentry 型不整脈の発生機序を明らかにするため、モルモット摘出心室乳頭筋の灌流液を、正常 K^+ 濃度 (5.4 mM) から 40 mM へ一旦増加し再び元の濃度に戻す際にみられる $\dot{V}_{\max}$ と伝導速度の変化を検討した。

実験方法：長さ $4 \sim 5$ mm の心室乳頭筋を 0.1 Hz で電気刺激しながら、長軸に沿い微小電極を 2 本刺入し、それぞれの活動電位と最大立ち上り速度 ($\dot{V}_{\max}$) を記録した。伝導速

度は電極間距離を $\dot{V}_{\max}$ 間の時間差 (伝導時間) で除して求めた。lowK⁺ (5.4 mM) から HighK⁺ (40 mM) への変更 (lowK⁺ → highK⁺ と略記) は、それぞれの液槽からの導管をコックで切換えて行った。Valinomycin K⁺ 感受性電極で筋槽内の K⁺ 濃度の変化を調べた。切換え後、K⁺ は 3 分間で 40 mM に達するが、その後 5 分間 highK⁺ に保った後 lowK⁺ に切換えると (highK⁺ → lowK⁺ を略記)、同じく 3 分間で 5.4 mM に戻った。

結果と考察：(1) 静止電位 (Em) と $\dot{V}_{\max}$ の関係。lowK⁺ → highK⁺ への過程において $\dot{V}_{\max}$ -Em 関係を求めると逆 S 字状曲線が得られるが、ひき続き highK⁺ → lowK⁺ の過程で得られる曲線は、前者に比し約 8 mV 過分極側に偏移した。すなわち K⁺ を増加するときより、一旦増加の後減少するときのほうが同一膜電位における $\dot{V}_{\max}$ の抑制が顕著であった。(2) Em と伝導速度 (θ) の関係。lowK⁺ → highK⁺ の際には Em の減少にも拘らず、 θ の減少は僅少で θ -Em 曲線は著しく脱分極側に偏移した。一方 highK⁺ → lowK⁺ における θ -Em 関係は、これを normalize すると $\dot{V}_{\max}$ -Em 関係を表す曲線に一致した。すなわち lowK⁺ → highK⁺ 時の θ -Em 関係は highK⁺ → lowK⁺ のそれに比し約 15 mV 脱分極側に偏位した。このことは K⁺ を一旦増大して後減少する場合、同じ Em において著しい伝導速度の抑制が生じることを意味する。(3) 異った K⁺ 濃度の定常状態における $\dot{V}_{\max}$ -Em 関係。外液 K⁺ 濃度を 2.7, 5.4, 8.1, 10.8, 13.5, 16.2 mM と段階的に変化させ、各定常状態における $\dot{V}_{\max}$ -Em 関係を求めると、これは highK⁺ → lowK⁺ で得られる曲線に一致した。

結論：(1) 外液 K⁺ 濃度を一過性に変化させる場合、K⁺ の増加過程に比し一旦増加の後減少する過程で伝導速度が著しく抑制される。(2) この抑制の少くとも一部は $\dot{V}_{\max}$ -Em 曲線が過分極側に移動したためと考えられ、この移動は高濃度 K⁺ が速い Na channel の不活性化を増大し、その効果が正常 K⁺ 液に戻した後もしばらく持続することによるらしい。(3) 以上の事実は冠閉塞開始時より、再灌流時に、より著明な伝導遅延が生じ、Reentry 発生の可能性が高まることを示唆する。

Indirect sympathomimetic action of TEA on the canine myocardium

上原 明・今永 一成 (福岡大学・医)

TEA は、それが細胞内に投与されたとき、outward K current を抑制し、活動電位の再分極を遅らせ結果として活動電位の持続時間 (APD) を延長させる効果を示すことは、nerve axon, cardiac muscle で観察されている。しかし、細胞外に投与されたときには、

活動電位には全く影響を与えない (guinea pig papillary muscle, Ochi & Nishie, 1974; sheep, calf ventricular muscle, Weingart, 1974; canine Pukinje fiber, Ito & Surawicz, 1981) と報告されている。

私共は TEA (Eastman Kodak 社製) を canine trabecular muscle, papillary muscle に細胞内より投与 (cut end method) したとき, 明らかに APD の延長を観察した。このとき収縮の大きさ, dT/dt , TPT には変化はみられなかった。ところが細胞外に投与したとき, 活動電位の plateau 電位の上昇, 再分極相の速さの増大, APD の短縮, 収縮力の増強, dT/dt の増加, TPT の減少が観察された。これはまさしく catecholamine 類似効果であった。

TEA によるこの反応は, 濃度依存性を示し, ED 50 は plateau 電位上昇に対し 1×10^{-3} M, 陽性変力に対し 1×10^{-3} M であった。またこの反応は β -receptor 遮断剤 (propranolol, carteolol) で消失し, reserpine 前処置動物からの標本においてみられなかった。

これらの結果は TEA は, sympathetic nerve terminal から catecholamine の遊離を促したものと考えられる。

一方 catecholamine 遊離作用が強いと言われている Tyramine と比較すると, Tyramine の ED 50 は活動電位 plateau 電位上昇に対し 10^{-6} M, 陽性変力に対し 3×10^{-6} M であり, いずれも TEA の作用より 1000 倍程強い。

しかし, Tyramine には tachyphylaxis がみられるのに対し, TEA には観察されなかった。さらに, TEA の陽性変力作用は, 細胞外 Ca^{++} 濃度に依存性を示した。

これらの結果は, TEA は細胞外に投与されたとき, sympathetic nerve terminal から catecholamine の遊離を促すこと, しかし Tyramine の作用と異なること即ち Tyramine とは作用する catecholamine pool (store) において異なっている可能性を示唆する。

膜電位の光学的検出法により示された旋回性頻拍と そのコンピューターシミュレーション

沢登 徹 (東京医科歯科大学 難研)

心臓における興奮旋回現象は複雑であるが, 旋回波の軌跡は少くとも閉じた興奮伝導経路である。このことは経路を規定したモデル実験としての輪状標本は生体现象の理解の上重要である。最近心筋に応用されてきた膜電位の光学的検出法を用い, 蛙心房で作成されたリング状標本の 8 ケ所より同時記録し, 興奮旋回性頻拍を生じさせその発生条件を検討した。頻拍発生に期外刺激を用い, 動きを抑制するため実験を Ca^{2+} -free 液下で行った。

detector が検出する領域は直径 $800\ \mu$ 内の活動細胞からで、シグナルはそれらの平均されたものである。同期して興奮している場合、活動電位波形と光学的シグナルとは良く一致した。興奮到達時点の判定は困難であるが、ノイズを少なくするため low pass filter の使用から、我々の方法では立ち上り最急峻時相より、onset がより活動電位の upstroke に近いので、onset を興奮到達の目安とした。 Ca^{2+} -free 液下では活動電位持続時間は延長し、光シグナルの持続時間は $500\sim 600\ \text{msec}$ を示した。この状態での伝導速度は約 $0.3\ \text{M}/\text{秒}$ であり、興奮が巡回すれば約 $15\ \text{cm}$ の経路が必要となる。標本の大きさは $1.5\times 1.0\ \text{mm}$ 程度、普通では巡回は困難である。また Ca^{2+} -free 下ではシグナルの持続時間はほぼ均一であり、基本刺激と同一場所からの刺激では巡回性不整脈は生じなかった。標本で持続時間に差を認めた例で、刺激電極をその差を認めた領域に置き、期外刺激により頻拍が生じた。そこで活動電位持続時間を短縮させ、不応期のばらつきを起し、不整脈を促進する Ach ($5.5\times 10^{-10}\sim 5.5\times 10^{-8}\text{M}$) を使った。Ach 投与後光シグナル持続時間は著明に短縮し、持続時間のばらつきがみられた。wash out 後も個々の持続時間は伸びるが、ばらつきは継続した。微小電極法を用い、活動電位持続時間を Ca^{2+} -free 液、Ach 滴下後、Ach wash out 後で比較した。それぞれの平均値は $520\pm 16\ \text{msec}$, $160\pm 32\ \text{msec}$, $248\pm 52\ \text{msec}$ を示し、持続時間のばらつきは Ca^{2+} -free に比べ、Ach 及びその washout 後に有意に変化した。これらの異なる条件下の頻拍 (4 拍以上) の発生頻度はそれぞれ 16%, 56%, 60% で Ach 使用後とその washout 後に高かった。この発生初期状態をみると、大部分光学的シグナル終了時点に差を認める領域に置かれた刺激電極から期外刺激が与えられていた。この事実は Van Capell & Durrer のモデルを使い、100 個の素子を用いたリングを作り、持続時間の差や結合抵抗の高い部分をリング一部に作り、その部位に刺激を与えることで頻拍を発生させることができたことから支持される。

以上のことは巡回性頻拍の発生に少くとも不応期の短縮と共に不応期のばらつき、伝導遅延が関与しているが、この標本では持続時間のばらつきが大きな要素をしめ、この膜電位の光学的検出法はこれらの状態を知り得ることができると点有効な方法といえる。

イヌ不整脈モデルにおける抗不整脈薬の有効血中濃度

橋本敬太郎 (山梨医科大学)

抗不整脈の電気生理学的作用機序を研究するにあたり、薬の有効性や有効血中濃度のデータを、臨床データから推論するのは種差の関係もあり問題であろう。そこで、抗不整脈薬

の作用機序を摘出標本で検討する場合、最もよく使われる動物の一つであるイヌを用いて、抗不整脈薬の定性的・定量的な薬効の判定を、イヌの三種の心室性不整脈モデルを用い、有効血中濃度を経時的に測定しながら行った。不整脈モデルには、冠動脈二段結紮不整脈、ハロセン・アドレナリン不整脈とジギタリス不整脈を用い、血中濃度は、それぞれの薬物につき特異的な化学的方法を用いて測定した。薬物は、クラス I のものとしてプロカインアミド・ジリピラミド・リドカイン・アプリンジン・メキシレチン・フェニトイン、他に β 遮断薬とベラパミルを用いた。リドカイン・ β 遮断薬、ベラパミルを除いて、これ等薬物は冠結紮不整脈に有効で、最小有効血中濃度は、イヌの $\max dv/dt$ を抑制する温度とほぼ一致したが、プロカインアミドの有効血中濃度は、ヒトで報告されているものより数倍高かった。アドレナリン不整脈には、 β 遮断薬、ベラパミルは有効で、他の多くのクラス I の薬物も有効であったが、プロカインアミドと、ジリピラミドの数例では、不整脈を悪化させ、心室細胞を誘発した。ジギタリス不整脈には、クラス I の薬物は、他の不整脈より低い濃度で抑制を示したが、フェニトインが特に有効というデータは得られなかった。 β 遮断薬のプロプラノロールは有効だったが、大量を必要としたので、 β 遮断作用によるとは考えられなかった。イヌの摘出標本を用いた電気工学的な実験をするには、イヌの有効血中濃度を参考とした人工栄養液中の薬物濃度を用いることにより、より正確な作用機序を検討出来ると考えられる。

Dr. U.S. von Euler セミナー

昭和 57 年 6 月 16 日

U.S. von Euler 博士はかつてスウェーデン、カロリンスカ研究所の薬理学および生理学の教授であり、ノーベル賞委員会委員ならびにセクレタリーさらにノーベル財団理事長をもつとめられた。また国際生理科学連合副会長を二期つとめられた。1930 年にはサブスタンス P, 34 年にはプロスタグランدينを共同研究者とともに発見され、46 年には交感神経系の伝達物質がアドレナリンでなくノルアドレナリンであることをあきらかにされたが、来日を機に“Some aspects of chemical transmission”について昭和 57 年 6 月 16 日講演された。

Prof. Zdenek Votava, セミナー

昭和 57 年 6 月 17 日

Pharmacology, Charles University, Prague. の Votava 教授が来所され, Studies on EEG and Behavioral Effects of Apomorphine in Rabbits and Rats について報告された。

Dr. H.A. Bern セミナー

昭和 57 年 6 月 23 日

Howard. A. Bern 博士 (Department of Zoology, Univ. of California U.S.A) は “Prolactin and ion transport in the vertebrates.” について昭和 57 年 6 月 23 日講演された。

Dr. D. Wilkie セミナー

昭和 57 年 7 月 3 日

Dr. Wilkie 博士 (Univ. Coll. London) は ^{31}P -NMR study on muscle について昭和 57 年 7 月 3 日に講演された。

『虚血心筋の機能構造と病態生理』

昭和 57 年 8 月 26 日～昭和 57 年 8 月 27 日

虚血心筋とは	春 見 建 一 (昭和大, 医)
心筋の微細構造と虚血	柴 田 洋三郎 (九大, 医)
虚血性心筋障害の病体生化学 一特に壊死との関係について一	片 桐 敬 (昭和大, 医)
心筋収縮蛋白の動態と発生張力の相関	松 原 一 郎 (東北大, 医)
虚血心の機械特性	篠 山 重 威 (京大, 医)
心筋の Ca^{2+} transport 機構とその破綻	多 田 道 彦 (大阪大, 医)
灌流心での酸素代謝	田 村 守 (北大, 応電研)
虚血心筋のエネルギー代謝	永 野 允 (慈恵医大)
低酸素下における心筋細胞の電氣的活動と 薬物に対する反応性の変化	西 勝 英 (熊本大, 医)
イヌ心筋梗塞不整脈に対する抗不整脈薬の 作用	橋 本 敬太郎 (山梨医大)

概 要

春 見 建 一 (昭和大学)

心筋虚血研究の基礎的立場からの意見を臨床側が聴き、討論を通じて基礎、臨床の理解を深める形式で研究会がすすめられた。

心筋細胞の分子レベルの形態、虚血心筋の細胞レベルの代謝過程からのアプローチ等新しい技術を駆使しての開発的研究が披露されたが、一方組織片、丸ごと心臓について電気生理学的、電顕的、代謝的アプローチが示された。本研究会を通じて言えることは、虚血の概念が研究者により微妙に異なり、つきつめた討論の際、意見のくい違いが見られる原因にこれに関与していることが示唆された。

虚血とは(1)ある組織への血流の遮断、(2)ある組織への血流の減少又は途絶、(3)ある組織への血流の減少、(4)冠血管動脈抵抗がまして灌流域の心筋細胞への酸素供給が不十分、(5)組織の正常機能を維持するに必要な血流量が供給されない。(6)細胞レベルの虚血、細胞内 PO_2 低下等の答を出席者より得た。基本概念は近似しているとはいえ血流を主体にみる立場と、血流遮断の結果生じた組織の乏酸素状態を重視する立場に分れるように思われた。研究の方法論はいづれの場合でも、血流低下内至は遮断によって生じた組織の諸変化を

種々な技術を用い、検討していくことでは一致していた。

基礎に対して臨床側から、臨床の研究者に対しては基礎側から活発な討論が行なわれ、相互の理解が充分なされたものと信ずる。

心筋の微細構造と虚血

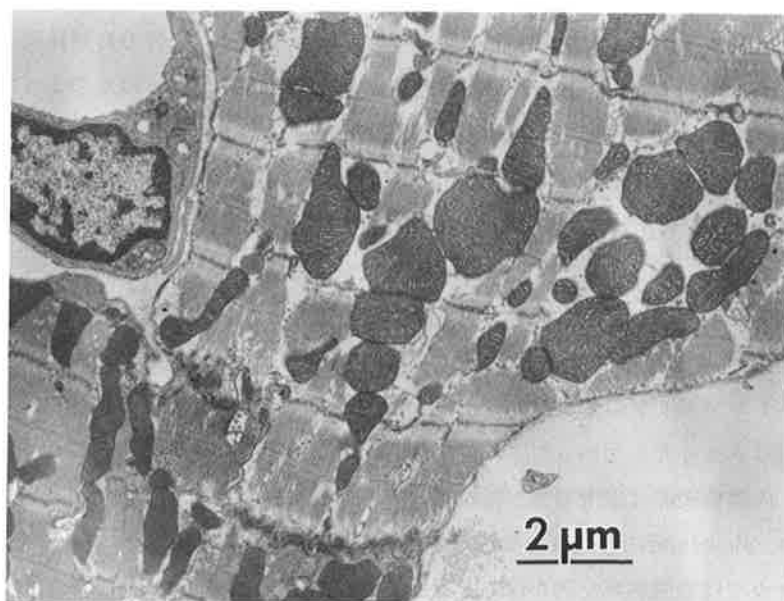
柴田洋三郎 (九州大学・医)

心筋細胞は収縮弛緩の周期を絶えず繰り返えし、活発な好氣的代謝を行っている。しかし通常の微細構造観察では、化学固定や脱水包埋の操作のため、一定の時間経過が避けられず、観察する構造はこれらの処理を経た最終産物の像となる。我々はこのような固定による変化をなくすため、化学固定液を用いず、瞬間的に液体ヘリウム温度に冷した銅ブロックを心筋に直接圧着することによって急速凍結を行い、生理活動時の正常を周期変動と種々の実験条件下での微細構造の変化とを電子顕微鏡下で比較観察することを試みてこの研究を行っている。

無処置のラット心筋を急速凍結し、凍結置換法と切断レプリカ法によって試料作製したものは、通常のものに比べて心筋細胞表面膜の膜内粒子がP面とともにE面にも数多く出現した。ミトコンドリアの基質は非常に電子密度が高くクリスタ内腔は明調で、ミトコンドリア顆粒はあまり多くなかった。クリスタ膜の基質側表面には15 nm位の粒子が多数みられるが、内腔側表面は平滑であった。クリスタ内腔とミトコンドリア内外膜間腔とは連続しており、Sjostrandの言うような狭窄や不連続は存在しなかった。深いエッチングをかけたレプリカでは筋原線維配列が深みをもって観察でき、filamentの間を規則的に横に連絡する細線維様構造が認められた。筋小胞体と表面膜や横細管との接合部は、10 nm程に近接しその間を連絡する線維状構造を認めるが、膜の直接の連続やgap結合など電気的な低抵抗通路の存在を示唆する構造はなかった。収縮弛緩に伴う構造変動の解析が、今後の課題である。

虚血心筋のモデルとして、摘出ラット心臓をランゲンドルフ法により大動脈から灌流し、左心室前壁の心筋細胞を切片法と凍結切断レプリカ法で観察した。コントロールとしてKrebs-Henseleit液を酸素95%炭酸ガス5%の混合ガスで飽和し灌流圧150 cm水柱で灌流したものでは、120分まで拍動が続き微細構造に著変は認めなかった。一方約15 cm水柱で灌流した低灌流状態では、細胞質の浮腫状膨張や、マトリックスが濃縮しクリスタが膨大した濃縮型ミトコンドリアの出現、グリコゲン顆粒の減少や消失、筋原線維配列の乱れ、

核染色質の淡明化など、虚血性変化の微細構造所見を呈する心筋細胞が散在性に班状に出現してきた。これらの細胞は、介在板を介し正常構造を示す細胞と隣接している（図1）。凍結切断レプリカでは、細胞表面膜に膜粒子のない領域や膜粒子の凝集を認めた。灌流液に5 mMの2, 4-ジニトロフェノールを加えたものでは、筋原線維配列の乱れや核の淡明化などは認めたが、ミトコンドリアの変化は濃縮型ではなく明調型だった。虚血心筋細胞を急速凍結法で観察する試みは、これらの細胞が良好な凍結試料の得られる凍結表面から20 μm 以内より、かなり深部で散在性に出現するなどの困難のため、いまだ満足な結果を得ていない。（図1、虚血変化を示す心筋細胞が正常構造の細胞と介在板で隣接している。1万倍）



虚血心の局所心筋機能

篠山 重威（京都大学・医）

局所心筋の収縮動態を臨床例で量的に評価することは方法論的に非常に問題が多い。我々は計算機による画像処理の手法を用い、この問題を解決することを試みて来たのでここに紹介する。

1. X線映画法による左室壁運動の解析

診断的左心カテーテル法において、形通りの心血管造影を行ったが、左室造影はX線映画法によって右前斜位30度で秒60枚の速度で35mmのフィルムに撮影した。各フィルム上の連続した画像はflying spot scannerを通して量子化され計算機に入力される。このデジタル画像は8ビット(256Vベル)の濃度値を持った128×128の画像より構成される。ここで左室の辺縁を決定することになるが、濃度の変化率が他のいずれの部位より大きいことを利用して、まず全画像の濃度値を空間微分して、その最大値を追跡することにした。この追跡法はヒトの目による辺縁の追跡状況を模擬したもので、左室輪郭の追跡中、その方向が急激に変化しないことと、数点先の微分情報を常に参考にすることをアルゴリズム内に取り込んでいる。さらに連続したフレームの画像は、お互いに強い関連があることを前提として辺縁情報を修飾した。このようにして計算機によって自動的に求められた辺縁は原画像と重ねてもよく一致する。

1心周期に得られた各々の像を体外においたマークを基準にして重ね合せた。次に左室壁は求心性の運動をすることを前提として、駆出期の筋短縮はすべて内腔の幾何学的重心に向かうと仮定し、この点から左室外線に向かって128本の放射線を引き、1心周期における各々の放射状グリッドの長さの変化で該当する壁の運動を表現した(図1)。図1は3枝狭窄を有する患者で得られた代表例を示すが、全体的なポンプ機能としては心係数は3.2 L/mjn/m²の拍出量を有し、心不全症状は全く認めない。左図(A)は拡張終期と収縮終期像を重ね合せたもので下壁の運動が著明に障害されているのがわかる。右図(B)は代表的な3つの放射軸を選んで瞬時セグメント長を時間軸に対してプロットしたものである。前壁(1)と心尖部(2)では収縮率は各々48%と54%で下方に向う正常の収縮が見られるが、下壁(3)では活動性収縮はほとんど消失している。

ここで、各々の局所機能を圧一長さループで解析するために、カテ先マノメーター付アンジオ用カテーテルで高周波左波形の測定と同時に左室造影を行ない。造影中の各シネフィルムと関連させた。この方法によって左室圧を共通のパラメーターとして各セグメントの短軸と伸展とを比較することが出来る。

2. 虚血心における局所圧一長さループ

拡張終期像の重心より引いた放射軸の長さを横軸に、左室圧を縦軸にとって圧一長さループを求めると図2の如くなる。虚血心では各セグメントでループの形態は大きく異なり、正常灌流を維持している下壁のループは圧一容積ループと本質的に同一の形態を示すが、虚血部ではその同期性が失なわれている。活動性収縮を維持している前壁と下壁のループは反時計回転を示すが、心尖部のそれは時計回転を呈し、セグメントの仕事量は負となる。全体心の圧一容積ループは比較的直立した形態を呈するのに対して、虚血心の局所セ

グメント圧一長さループは、それぞれ個有の傾きを示す。特にこの傾斜は等容性弛緩期に著明で、虚血状態にある前壁と心尖部ではこの時期にも筋の短縮が持続しループは右方に傾く。一方下壁では同じ時期に筋の伸展が生じ、ループは左方に傾斜する。つまり、虚血部と正常部の傾斜は全く対称的で鏡像を呈することになる。以前、我々は動物実験で虚血の進行していく過程を、正常部、境界部、虚血部の心筋で圧一長さループを求めて解析し、冠動脈閉塞直後に正常部心筋が減負荷状態におかれ収縮後期に過収縮を行なうとき、その他の部位では伸展が生じ、圧一長さループには鏡像をなす変形が生じることと、後に安定した虚血状態に達すると、正常部心筋は等容性に伸展してループは右へ傾き、虚血部と境界部のループはこれと対称的に左に傾くことを報告した。今回の臨床例で見られた所見は、この実験の結果と矛盾するものではない。このようにループが虚血部と正常部で対称的な傾きを呈する理由は正確には説明出来ないが、虚血により心筋内張力の再配分が起こることに1つの原因があるように思われる。また、虚血部で stress-relaxation が遅延するのに対して、正常部ではサルコメアの長さを短縮した状態で等容性に維持するだけのエネルギーが十分でない可能性もある。したがって、正常部心筋では、Frank-Starling 機序によって筋の短縮の程度は増大するが、外的仕事量はそれに比例した増加を示さない。

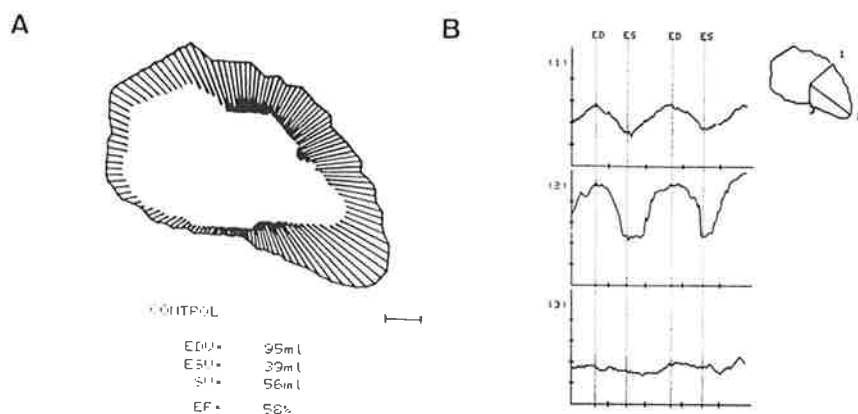


図1 A: 拡張終期像と収縮終期像を重ね合せ、一心周期の局所壁運動を幾何学的重心より広げた放射軸の長さで表現した。
B: 前壁、心尖部、下壁より代表的な1セグメントを選んで、その経時変化を示す。

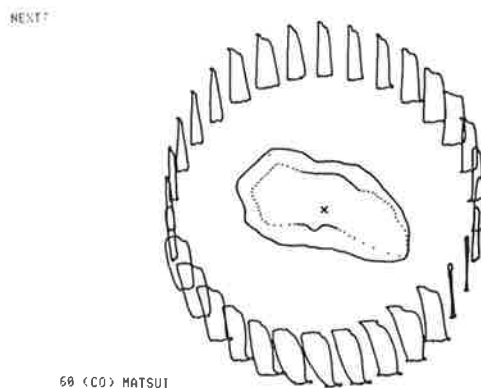


図2 一心期における各放射軸の長さを同一時点の左室圧と対応させて、圧—長さループを全周で求めた。

イヌ心筋梗塞不整脈に対する抗不整脈薬の作用

橋本敬太郎 (山梨医科大学)

心筋の虚血性疾患に伴って、不整脈が出現することはよく知られている。特に心筋梗塞では不整脈治療が救命的な治療になりうることが多いし、またその治療は、適切な抗不整脈薬の使用による。心筋梗塞のモデルには、いろいろな方法があるが、イヌの左冠動脈前下行枝の二段結紮を行い、手術後24時間以上たったときにみられる。いわゆるハリスの不整脈に対して、各種の抗不整脈薬の有効性を検討したので、他のイヌのモデル不整脈である、ハロセン・アドレナリン不整脈とジギタリス不整脈に対する作用とも比較して報告した。冠結紮不整脈は、結紮後、24および48時間後に、無麻酔下に発生したもので、多源性の心室性期外収縮が、全心拍のほとんどを占める不整脈である。この不整脈に対して、ジリピラミド、プロカインアミドは、非常に有効で、不整脈をほとんど消失させた。またアプリンジン・メキシレチン・フェニトインも、期外収縮の数を有意に減少させた。このときに同時に測定した薬物血中濃度から決定した最小有効血中濃度は、イヌの心室プルキン工線維または心室固有筋の活動電位の最大立ち上り速度を有意に減少させた最小濃度と、極めて良く一致した。血中薬物濃度は、血漿蛋白に結合した薬物とフリーに存在し、薬理

作用を示す薬物の総和を測定しているので、さらに実験が必要かもしれないが、一応、二段結紮不整脈の抑制には、正常心室の Na チャンネルを抑制するのが、必要条件と結論した。臨床的に心筋梗塞不整脈には、リドカインが著効を示すと言われているが、イヌの正常心筋の Na チャンネル抑制には、10 $\mu\text{g/ml}$ の濃度が必要とされているのに対し、静注で、極めて大量の 10 mg/kg を投与しても、血中濃度は、10 $\mu\text{g/ml}$ には達しないことがわかり、イヌでは、この量では、Na チャンネルを抑制しないために、抗不整脈作用を示さないと結論した。また、各種の β 遮断薬は、いわゆる β 遮断濃度では、この不整脈は抑制されないし、Ca 拮抗薬も、Ca チャンネルを抑制する濃度では、抗不整脈作用を示さなかった。またイヌの最小有効血中濃度は、ヒトでの心室性不整脈を抑制すると報告されている血中濃度と、プロカインアミドでは、大分異なっていたことから、動物の摘出標本を用いて抗不整脈薬の作用機序を検討する場合は、その動物における有効血中濃度のデータを必要とすると考えられた。また、ジギタリス不整脈も、ほぼ、Na チャンネル抑制により薬物が抗不整脈作用を示すと考えられた。臨床上、フェニトインが、ジギタリス不整脈に特に有効であると言われているが、イヌで、三種の不整脈に対する最小有効血中濃度の比較からは、ジギタリス不整脈に選択的に有効とは結論されなかった。ハロセン・アドレナリン不整脈に対しては、Ca チャンネル抑制、または β 遮断作用が、不整脈を消失させ、いわゆる抗不整脈薬では、プロカインアミド等は、かえって増悪させた。

虚血心筋の機能構造と病態生理

春見 建一 (昭和大学)

虚血の定義が研究者によって異なるため、出席者による虚血の定義のアンケート方式により求めた結果について。

本研究会の話題提供者および討論者に、最終日の討論の間にアンケートの提出を求めた。予告なしのお願いであったので、御迷惑をおかけしたが、それだけ生の声が集ったものと考えられる。

次に各アンケートの記載をそのまま所載し参考に供したいと思う。

虚血の定義

(1)ある組織 (心筋組織) に対して、血液の供給が完全にとだえた状態と理解している。したがって組織周辺には、低酸素状態、血流 (赤血球の移動) の停止、細胞内からの低酸素状

態によっておこる代謝産物の蓄積，心筋細胞の代謝に必要な基質の欠乏等の状況であるものと考えている。

(2)虚血とは，血液で灌流されている心筋の血流が遮断されたことを指すと思います。低酸素状態等，虚血のモデルにはなるとはいますが，実験条件等をはっきりさせる意味で，それぞれの条件がわかる名前と呼べば，混乱はなくなります。ヒトで，心筋への血流が遮断されるのが虚血で，それに近い実験条件のみを虚血とすればよいのではないのでしょうか。

(3)その組織の血管系への血流配分がなくなること。

(4)虚血とは，酸素分圧が正常に保たれている血流ないし灌流液の動脈流量の減少あるいは停止により，組織の好氣的代謝が障害された状態をいう。

心筋虚血についていえば，冠動脈流量（血流あるいは灌流液）の減少にともなう好氣的代謝障害のみをいい，灌流実験等における酸素分圧の低い灌流液を正常の冠動脈流量で灌流するような実験は低酸素 (hypoxia) として虚血の範ちゅうにはいたくない。

(5)「ある臓器に対する血液供給の減少ないし途絶」従って酸素供給不全と clearance (Wash out) 低下が起こり，低 pH，高 K，代謝産物の貯留，さらに二次的変化へと続く。

(6)正常の細胞機能の障害を生じせしめる，血流の減少又は停止と考えます。

(7)組織への血流低下ないし杜絶により，酸素欠乏・栄養物の不足と組織の中間代謝産物ならびに K^+ イオンの蓄積とにより電氣的及び機械的機能に低下を生じた状態。

(8)組織への血液供給量が正常以下に減少すること。従って血流が完全に遮断される必要はない。Severity は千差万別でありうる。なお Working heart model, Langendorff 灌流などで，赤血球を含まない人工溶液を使用する場合は「虚血」という言葉を使うのは適当でないと思う。「低灌流状態」とでもすべきか？

(9)臓器への酸素需要及び代謝産物の搬出に応じた血流が低下した状態。

(10)生体において冠血管動脈低抗がまして，灌流域の心筋細胞への酸素の供給が不十分になった場合をいう。この状態をシュムレイトする種々の実験状態が考えられている。

(11)心筋がその機能を充分行うにたる血液を供給できなくなった状態。おそらく hypoxia + α と思われる。現在の所，各自の実験条件をはっきりさせて，個別に評価する以外ないと思われる。特に hypoxia の実験は（血液を用いての）他の条件 (PaO_2 , PH, perfusion Pressure 等)を一改させることが非常に困難で事実上不可能のように思われる。

(12)心筋虚血とは心筋に対する血流の障害と考える。従って冠動脈の一部が完全に閉塞していても，側副血行路により心筋血流が維持されていて機能が正常であれば虚血状態とは考えない。運動や頻脈による負荷で冠血流予備力が追従できなくなって機能異常が生じる場合は，負荷時に虚血状態に致るのであって，安静時は虚血状態とはいえない。（潜在的な虚血とは考えられる）。

(13)組織の正常活動を維持するのに必要な血流量が供給されていない状態をいう。この必要な血流量とは、酸素や代謝基質の運搬と代謝産物の洗い出しに最低必要な流量の血液の流れという意味である。

(14)狭義には組織への血液の減少。

広義には、心筋における冠血流量の需要と供給の不均衡の状態をいう。この状態は組織における O_2 , Substrate, energy の減少を起こすのみならず, lactate, carbon dioxide, protein 等の toxic metabolite の washout 能力が欠如する。

(15)冠血流量の絶対的～相対的不足により、細胞～組織の代謝が好気性から嫌気性に替り、ついには死に至る状態。但し、灌流血液の PO_2 を減らして生じる hypoxia は ischemia と区別して考えるべきと思う。低圧灌流による灌流量不足の場合は、ischemia に入ると思う。(組織の血流が完全に遮断されなくとも同意)

(16)冠血流量の減少により、心筋酸素需要量に見あうだけの酸素供給量が不足し、さらに代謝産物の wash out が不十分で蓄積し、これらの要因により心筋細胞の代謝障害を生じた状態をいう。

(17)細胞レベルの虚血。細胞内 PO_2 低下。それが細胞機能 (metabolic, electrical contractility) の障害をもたらした状態。

(18)Hypoxia-Anoxia, Flow がある時。真の意味での Anoxia は O_2 が“Zero”。通常 10^{-6} 以下は Anoxia ではない。従って Hypoxia が良い。Ischemia, Flow が zero の時、この時 Tissue O_2 tension も定義する必要がある。⇒低酸素による代謝変化と flow stop による変化と区別すべき。

(19)虚血は酸素と基質の供給に基づく障害であるが、基質の供近不足は生体に Deposit されている物質によってある程度の時間はカバー出来るが、酸素不足はそれが不可能なために、その障害として出てくるものは Hypoxia の型が全面に出てくる状態と考えたい。

Prof. T. Narahashi セミナー

昭和 57 年 8 月 31 日

シカゴ、Northwestern 大学薬理学の樽橋敏夫教授が来日され、生理学研究所において、ニューロプラストーマ細胞の Na チャネルおよび K チャネルの活動の最近発達したパッチクランプ法にもとづく分析について報告された。

Dr. E. Simon セミナー

昭和 57 年 9 月 2 日

Prot. Eckhart Simon はマックスプランク研究所、所長で“Osmoregulation in birds-control of salt and water balance”について昭和 57 年 9 月 2 日講演された。

中枢神経系のアミンとコリン神経

昭和 57 年 9 月 13 日

木村 宏 (滋賀医科大学)

中枢神経系の構築を神経伝達物質の面から眺め、筆者らの成績を中心に最近の知見を紹介した。

(1) ノルアドレナリン (NA) : 前脳とくに大脳皮質、海馬、嗅球などは豊富な NA 神経終末が比較的びまん性に分布する。これら NA 終末は脳幹に位置する青斑核 NA 細胞群から投射されるが、少数の NA ニューロンは異なる皮質 (新, 旧, 原始皮質) に divergent axon を送ることが認められた。

(2) ドーパミン (DA) : 大脳皮質では、NA 終末とは異なり、前頭葉皮質および嗅脳薄皮質に限局性に分布する。この DA 線維の分布を受ける前頭皮質は視床背内側核からの投射を受ける部位に一致し、霊長類の前頭前野に相応すると考えられる。これら DA の起始細胞は黒質緻密帯の内側部からそれに続く腹側被蓋野の外側にかけて同側性に存在し、また逆に前頭前野は中脳 DA 細胞に対し線維を送り軸索一樹状突起シナプスを形成する。この皮質の起始細胞は V 層の錐体細胞に一致し、軸索一細胞体シナプスによる DA 線維の支配を受ける。以上により大脳前頭皮質—中脳 DA 細胞群の間の相互的神経回路網が明らかとなった。

(3) セロトニン (5HT) : ウシ血清アルブミンに結合した 5HT を抗原とし家兎を免疫し 5HT 抗体を作製した。この抗体を用いて免疫組織化学的に脳内 5HT 神経の分布を観察した。細胞体の分布は、従来の蛍光組織化学で観察される縫線領域の他に、脳幹の外側部位に広く散在性に認められた。更に 5HT 神経線維は、予想以上に豊富にかつ広汎な領域に分布することが観察され、5HT 神経路について再検討の必要性が示された。

(4) アセチルコリン (ACh) : 現在最も信頼できるコリン神経のマーカーである ACh 合成酵素コリンアセチル基転移酵素 (ChAT) を人脳から抽出精製し、これに対する抗体を家兎で

作製した。これを免疫組織化学に適用し、はじめて中枢神経系コリン神経の分布を明らかにした。ネコ脳では、コリン神経細胞体は脊髓前角運動ニューロンや脳神経の運動あるいは副交感神経の核をはじめとして、約 40 の領野にわたり前脳から脊髓まで広く散在性に分布する。コリン神経核として最大のものは新線条体で、大型の神経細胞から成る。次に顕著なコリン神経の集団は、前脳では無名質核、後脳では脚傍核として認められる。前者は大脳皮質へのコリン性入力の主と考えられるが、個々のコリンニューロンの皮質内支配領域は限局性である。また無名質内のコリン細胞は、ほぼ投射皮質領域に対応した配列をするように見受けられた。一方、脚傍核のコリン細胞の存在部位は、よく知られる NA 細胞の存在部位に近似しているので、両者の相関について検討した。その結果、NA と Ach が同一の細胞に含有される可能性は否定されたが、Ach の分解酵素 AchE は両者の細胞ともに含まれることが明らかとなった。

Pallidal and amygdalar catecholaminergic mechanisms in the organization of hunger and thirst motivated behavior

昭和 57 年 9 月 17 日

László Lénárd (Institute of Physiology, University Medical School, Pécs, Hungary)

摂食行動におけるカテコラミン系の関与を明らかにするため黒質一線状体ドーパミン (DA) 線維系の主な終末部位の一つである淡蒼球に 6-hydroxydopamine (6-OHDA) を注入してこの系を化学的に破壊してその効果を検討した。また中脳一辺縁系ドーパミン線維系の一つでノルアドレナリン (NA) 線維系の入力もある扁桃核でも同様に検討した。

淡蒼球に 6-OHDA を注入すると無食無飲および体重減少が生じた。その効果に雌雄差があり、雄の方が重症で死に至りやすかった。

扁桃核に 6-OHDA を注入すると体重増加と軽度の過食過飲が生じた。desmethylinipramine (DMI) を同時処理することにより DA 系だけを選択的に破壊できる。この場合体重減少、摂食飲水の低下が起こった。DA/NA 比を計算すると、NA 低下がより大きいと体重増加、DA 低下がより大きいと体重減少であった。

これらの結果は体重調節機構の一端を神経伝達物質レベルで示すものであろう。

Spreading depression in isolated chick retina

昭和 57 年 9 月 27 日

H. Martins-Ferreira (Instituto de Biofisica, Universidade
Federal do Rio de Janeiro)

Spreading depression have been discovered in the cerebral cortex by Leão (1944) . Since then it has been described in many other structures of the C.N.S., including the retina, where it was seen first by Gouras (1968) in the frog eye.

After using isolated retinas immersed in Ringer solution we soon found that chick retinas were, for several reasons, much better material for SD studies. Using several types of preparations we succeeded to obtain reproducible SDs for a long period of time. The main advantage to use chick retinas is the fact that we can see the reaction propagation, as a whitish patch of increasing diameter invading the retinal tissue as a slow wave ; this is due, not to color changes but results of the increase of intensity of the light scattered in the tissue, each point of an invaded area acting as a "light electrode"

Microphotometric records of the light scattering changes (LSC) show 2 maxima, the first relates to field potentials and ion translocations (see later) and the second, prolonged one, more influenced by the "metabolic state" of the preparation. We demonstrate by photometric and histologic methods that these LSC are predominant the inner plexiform layer.

SD in chick retina is accompanied by field potentials (negative shifts of 15-25 mV amplitude and 1-2 min. duration), concomitantly with increase of electrical impedance as well as mechanical movements of the retinal tissue. However, when low-Cl Ringer solutions are used, there are negative shifts but only small decreases of impedance, no movements of tissue, and the reaction is no more visible. Lamina depth profiles with extracellular microelectrode have shown negative shifts of higher amplitude in the inner plexiform layer and smaller positive shifts in the distal part of the retina.

Using ion exchange resin filled double-barrel microelectrodes it was shown that K^+ increases and Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- decreases in the extracellular space. Such ionic movements are reversible and their peak amplitudes of variation are maximum in the

region of the inner plexiform layer. Metabolic studies have shown that chick retinal SD does not need O_2 to propagate but the preparation requires large amounts of glucose to produce successive SDs.

To study the propagation, without interference of triggering stimuli, we developed a preparation where the reaction is put to spread in a circular ring of retina and it keeps circling during several hours at almost constant velocity (3-4mm/min at 30°C) .

Such circling SD allowed the study of the influence of chemical substances in its propagation. It was found that each one of the constituents of the Ringer solution can alter, to plus or minus, the velocity of propagation, depending on its concentration and there are interactions of effects among them, e.g. K^+ , Mg^{2+} and Cl^- .

As far as neurotransmitters involved we have already demonstrated liberation of ACh and GABA, but not of glutamate.

At present we like to include SD, an "all or none reaction", as an biological example of dissipative phenomena, as defined by Prigogine and our working hypothesis is to consider SD as a possible latent property of neuronal networks that can be unravel under appropriate conditions of the extracellular milieu.

Biochemical parameter underlying neuroplasticity in the red nucleus and ventrolateral thalamus after cerebellectomy in adult cats.

昭和 57 年 10 月 2 日

Dr. Andre Nieoullon (Département de Neurophysiologie
Générale, C.N.R.S., Marseille, France)

視床 VL 核や赤核において、対側の小脳破壊後におこる伝達物質の候補の変化の生化学的測定をおこなうことによってこれらの核で起るであろうシナプス結合の可塑的变化を捉えたという報告をおこなった。

Auerbach 神経叢の機能について

昭和 57 年 10 月 27 日

横山 正松 (福島県立医科大学 名誉教授)

消化管の全長にわたり縦走筋と輪走筋の間に、網目を形成して分布している神経叢は、1864 年 Auerbach によって始めて記載されたが、この神経叢の生理学的研究はなされていなかった。ただ 1899 年 Bayliss と Starling が蠕動発現にこの神経叢が関係しているだろうと推定した。筆者は小腸管から縦走筋を剥離すると、縦走筋層に Auerbach 神経叢が附着することを知り、この神経叢の電気生理学的研究を始め(1966)、かつその生理機能を追究した。家兎剔出小腸管を伸展すると口側から肛門側に伝播する蠕動が発生する。この蠕動は Auerbach 神経叢自体で起る反射であることがわかった。求心性刺激は腸管伸展であり、伸展受容器の興奮により求心性ニューロン、介在ニューロン、運動ニューロンの興奮が起り、刺激部より口側の小腸筋に促進、肛門側筋に抑制が起る。Bayliss らの提唱する腸管の法則を支持する統一された反射として蠕動が起ることが示された。

Physiological properties of crayfish photoreceptor membranes

昭和 57 年 11 月 11 日

H. Fernandez (Division of Regulatory Biology and Biophysics, Wayne State University)

ピロアンチモン酸カリウムを用いてザリガニ視細胞におけるカルシウムの動態を組織化学的に検索した。暗時にはカルシウムが rhabdome の microvilli の内側に存在し、光照射によってそれが microvilli の外側に移動した。この方法によって検出された顆粒は electron microanalyzer によってカルシウムイオンであることを確認した。

S. F. Sammarrai

昭和 57 年 11 月 13 日

Scientific Status in Today's Baghdad, Especially in Electron Micrography. S. F. Sammarrai (College of Medicine, Baghdad University, Iraq.)

演者は日本において、山田教授、内菌教授の下で電子顕微鏡を用いた研究を行ない、母国イラクで電子顕微鏡の pioneer として、研究、教育、医療に努力されており、その状況について説明された。

Dr. K. Thureau セミナー

昭和 57 年 11 月 25 日

Prof. Klaus Thureau (Institute of Physiology München University) は腎臓生理学者として国際的に名高い研究者で、IUPS の financial secretary としても活躍しておられたが、来日を機会に当研究所を訪門され、“Renal hemodynamics and filtration dynamics.”について昭和 57 年 11 月 25 日講演された。

Application of Engineering to Biomedical Research

昭和 57 年 11 月 29 日

R.F. Rushmer (ワシントン州立大学・医学部)

Rushmer 教授は無麻酔非侵襲動物を用い生体内にあるかまゝの状態に器官の機能をみようとした歴史について話されそのまとめとして以下の様な話をされた。

『私は過去において、摘出器官の研究しかなかった時代に、生体内にあるかまゝの状態に器官をみようとし、さらにそれを人の診断法に応用しようと試みてきました。私の経験を言いますと、1 人の力では僅かの仕事しかできず、色々な背景をもつ研究者が相互に協力しうる体制をとることが大切だったように思います。過去 30 年の間に心臓病の診断法は大きく進歩しましたが、不幸にも病気の診断の方が治療法よりも先行してしまいました。こ

れは病因についての基礎知識が欠乏していたためで、将来の医学は僥倖でなく理論で治療できるような治療を指向しなければなりません。岡崎では種々の背景をもつ研究者が基礎的な細胞生理学を研究しているのを見ましたが、これこそ現在の治療学の弱点である病気の問題点を明らかにし、これを解決できる唯一の途なのです。今日、生理研をごく短時間まわっただけですが、そこでは多くの異なる接近法、別々の技術があり、私には全部はともわかりません。しかし微細構造の研究は、私達の研究室ではそこにある物質の研究につながっていますし、電気生理や光学的方法、NMR, Isotope の利用、イオンセンサー分子ラベリングなど、多くの代謝過程の研究法があって、これらは皆、細胞の機能を目指し、かつ細胞を超えてその微細構造の機能へ向かっているのです。生理研がその様な道を歩いていることは、私にとっては興奮させられ胸踊る感じがします。そして研究者が各々異なる学問的背景をもち、異なる視野をもって、これらの問題に焦点をあてているのを見ることができました。この方向は必ずや、細胞の微細構造の代謝機転を制御している機構を解きほぐすでしょうし、究極的には疾患の治療を助けることになると思います。』

Retinal neurocircuitry, with special reference to Cellular interaction

昭和 57 年 12 月 6 日

N.W. Daw (Department of Physiology and Biophysics, Washington University School of Medicine)

G.L. Fain (Jules Stein Eye Institute, University of California at Los Angeles)

E.V. Famiglietti, Jr. (Department of Anatomy, Wayne State University School of Medicine)

R.H. Steinberg (Department of Physiology, University of California at San Francisco, School of Medicine)

P. Witkovsky (Department of Ophthalmology, New York University School of Medicine)

Dr. Daw はウサギ網膜神経節細胞の特徴抽出機構に ACh とドーパミンという 2 種類の神経伝達物質が関与していることを報告した。Dr. Fain はカエルの桿体において外液のカルシウムイオン濃度を変えると、膜電位レベルと桿体の光感度に変化するが、これら 2 つの間には直接の関係がないことを報告し、視細胞内伝達物質としてカルシウムイオンと

cGMP との関係を討論した。Dr. Famiglietti はウサギ網膜中に存在する独特な形態を有するアマクリン細胞 (starburst amacrine cell) は choline を特異的に取り込むアマクリン細胞と形態が一致しているので、この細胞はコリン作働性であろうと推論した。Dr. Steinberg は視細胞の活動に伴うカリウムイオンの動態と、網膜色素細胞の機能とを論じた。Dr. Witkovsky は 2 デオキシグルコースを用いて視細胞のエネルギー代謝を検討したところ、光照射に伴うエネルギー代謝の変化は少なく、むしろシナプス末端部におけるエネルギー消費が最大であることを見出した。

Development of the visual system, Comparison of monkey and man

昭和 57 年 12 月 23 日

Prof. L. Garey, ローザンヌ大学・解剖。

Prof. L. Garey は神経発生学の権威であるが、本セミナーは人及び猿の視覚系発生過程に伴うシナプス分布頻度の変化の話が主であった。生後におけるシナプス発生の経時的変化及び aging による変化を電顕レベルでの形態計測結果から論じた興味深い発表であった。

培養副腎クロム親和性細胞での小胞の放出の光学顕微鏡的観察

昭和 58 年 1 月 7 日

Charles Edwards

(Neurobiology Research Center, State University of New York at Albany)

副腎細胞の小胞が開口放出を行うことについての証拠をうる目的で、培養クロム親和性細胞を用いて光学顕微鏡的な観察を行った。ウシの副腎髄質をコラゲナーゼおよびヒアルウロニダーゼで処理し、2 週間培養した。ドーパミン- β -ヒドロキシラーゼ (DBH) をウサギに注射し、抗 DBH 抗体を作り、ヒツジまたはヤギに抗 DBH 抗体を注射して、抗ウサギ抗体をえて、これに FITC を結合させた。この第 2 次蛍光抗体により培養細胞を染色した。静止時の細胞表面は全く染色されなかったが、これに Ba^{++} イオンを与えると分泌が起り、細胞表面はパッチ状に染色された。この表面の染色は 2 時間にわたって続いたが、細

胞内には侵入しなかった。これは抗体分子が DBH 分子と強く結合するためと考えられる。蛍光抗体をババインで処理すると、Ba⁺⁺で活性化した細胞の表面は染色されたが染色状況はより一様となった。そして蛍光は次第に細胞内に侵入し、30 分で細胞の中心にまで到達した。これらの蛍光顕微鏡のイメージはビデオで録画され、セミナーで供覧された。

『細胞生理の諸問題』
—— 分子から膜レベルでの理解をめぐる ——

昭和 58 年 1 月 21 日～昭和 58 年 1 月 22 日

入 交 昭 彦 (高知医大)

亘 弘 (生理研)

蛋白と低分子の相互作用について

志 賀 潔・二 科 安 三・亘 弘 (生理研)

Topical Magnetic Resonance

亘 弘 (生理研)

HPLC と低角光散乱法によるヒト血清アルブミンの研究

曾 我 美 勝・長 岡 俊 治・恵 良 聖 一 (岐阜大・医)

擬似雑音法による生体高分子の誘電分散の測定

南 方 陽 (浜松医大)

ミトコンドリアの誘電解析 —— 外膜と内膜の性質

浅 見 耕 司・入 交 昭 彦 (高知医大)

マレイミド試薬によるミトコンドリアの選択的スピンラベル

辻 本 毅・熊 沢 紀 之 (和歌山医大)・三 宅 可 浩・

三 浦 洌・金 城 勝 (国立循環器病センター)

神経膜リン酸基に対する Ca 細胞の作用 —— ラマンスペクトルによる解析

会 沢 勝 夫・坂 井 朗 子・大 畑 進 (東京医大)

血液の CO₂ 平衡と活性カルシウム

上 田 至 宏・中 馬 一 郎 (大阪大・医)

赤血球の機能に及ぼす Dehydroepiandrosterone Sulfate (DHAS) の影響

昆 和 典・前 田 信 治・志 賀 健 (愛媛大・医)

線維芽細胞の Receptor-mediated Ca²⁺ チャンネルと Ca²⁺-activated K⁺ チャンネル

岡 田 泰 伸・矢 田 俊 彦・小 作 隆 子・老 木 成 稔・

土 屋 和 光 (京都大・医)

ピレスロイドによるイオンチャンネル閉鎖の修飾

村 山 公 一・北 里 宏 (滋賀医大)・尾 松 正 人 (京都大・農)

軸索輸送の光学顕微鏡による研究とその理解

竹 中 敏 文 (横浜市大・医)

HeLa 細胞膜の K^+ 能動輸送機構

宮 本 博 司 (徳島大・医)

初期胚における心ペースメーカー細胞群の体制化

神 野 耕太郎・藤 井 志 郎・広 田 秋 彦・酒 井 哲 郎

(東京医歯大・医)

発癌プロモーターによる細胞間連絡の抑制とその生物学的意義

柴 芳 樹・菅 野 義 信・(広島大・歯)

微小区画と微小環境

田 代 裕・(関西医大)

オーバーシュート・アップテイク

品 川 嘉 也 (京都大・医)

連結機構の回路網表現について

今 井 雄 介 (大阪医大)

クロールプロマジンとビタミン B_2 の蛋白への拮抗的結合について

志賀 潔・二科 安三・亘 弘 (生理研)

クロールプロマジン (CPZ) とリボフラビン (Rf) の蛋白 (リボフラビン結合蛋白, RBP) への拮抗性を分光学的方法により検討した。

CPZ は RBP と 1 : 1 の割合で可逆的に結合し、その解離定数は $3.8 \times 10^{-5} M$ (pH 7.0, 25°C) であった。又この結合は Rf と拮抗する事が明らかとなった。

CPZ が生体内で示す作用の内ある種のものは、ビタミン B_2 と CPZ との拮抗性により説明できると思われる。

Topical Magnetic Resonance

亘 弘・志賀 潔・二科 安三 (生理研)

磁場焦点核磁気共鳴法は動物を静磁場の中に入れ、局所的に磁場を罫する事によってこの局所にある燐化合物を検出するものである。脳においてはラット頭部、犬頭部、猫頭部

を用いて実験的脳虚血および脳硬塞時の脳内エネルギー代謝の変化を経時的に観測した。脳虚血は両側椎骨動脈電気凝固および両側総頸動脈結紮によって作製した。虚血前の ^{31}P -NMRにおいては α - β - γ -ATP, phosphocreatine (PCr), phosphodiesterase 又は 2, 3-DPG, 無機リン (Pi), sugar phosphate を示すピークが認められた。動脈の血流を遮断すると, PCr と ATP のピークの急激な低下, Pi のピークの上昇が見られた。また組織内 pH も正常時の 7.27 から 6.52 へと急速に酸性化する事が Pi の chemical shift より算出された。30 分後に両側総頸動脈を基開通させると Pcr, ATP のピークは急速に回復し Pi のピークは減少した。そして 30 分~1 時間後にスペクトルは正常パターンに戻った。1 時間虚血後の再開通では半数が正常パターンに回復したが 2 時間虚血後の再開通群では可逆性変化を示さなかった。

HPLC と LOW-ANGLE LASER LIGHT-SCATTERING によるヒト血清アルブミンの研究

曾我美 勝・長岡 俊治・恵良 聖一 (岐阜大学・医)

血清アルブミンは安定性の異なる分子集団よりなり、その機構は(1)1次構造の差異、(2)合成後の流血中における変化等によると考えられている。最近、遺伝子工学を用い、ヒト血清アルブミン (HSA) の合成が計画され、機構(1)の研究が容易になりつつある。このため、手始めに HSA の高速液クロ (HPLC) による研究を始めた。HPLC (カラム: ASAHI MED. Co., PGP 2000, 0.10 M Na Phosphate buffer, 0.30 M NaCl, pH 6.86) と Low-ANGLE LASER LIGHT-SCATTERING を用い、HSA を SH 基を持つ HMA (human mercaptalbumin) と SH 基のない HNA (human nonmercaptalbumin) に分離することに成功した。

擬似雑音法による生体高分子の誘電分散の測定

南方 陽 (浜松医科大学)

蛋白質、多糖類等の誘電分散の測定は生体高分子に吸着したイオンの分極についての知見を得るのに有用な手段である。このイオン分極は理論的には吸着イオンのゆらぎに関連する量として理解される。分子固有の双極子能率も観測されるが、その寄与は従来考えら

れていた程大きくない。ここでは通常の4量体にならないとされるヤツメウナギのヘモグロビン (HbL) 溶液と紅藻類多糖のうち最も多く硫酸基を含む Funoran 溶液の誘電分散について報告する。手段としては擬似雑音法 (雑音を試料に印加し、その応答をフーリエ変換して周波数スペクトルを求める方法) を用いた。HbL は oxy^- , deoxy^- 両型で誘電分散曲線に変化がなく、高等動物の4量体におけるデータと必ずしも一致しない。濃厚ショ糖溶液中での誘電率の減少、緩和時間の増加の定量的取り扱いにより、誘電分極の主因は HbL に吸着したイオンの分極とみなされる。Funoran の場合は鎖状分子のまわりの吸着した Na^+ , K^+ イオンのゆらぎによる主鎖方向への分極と理解される。対イオン種の置換等により、この場合は SO_3^- 基をもつ強酸型高分子と COO^- 基をもつ弱酸型高分子の中間の性質を示すことが判明した。

ミトコンドリアの誘電解析

—— 外膜と内膜の性質 ——

浅見 耕司・入交 昭彦 (高知医科大学)

ラット肝より単離した intact のミトコンドリアで観測される誘電挙動は、内・外膜の低電導性を仮定した“double-shell”モデルで説明できる (本年報 3, 269)。この仮定は内膜については十分成り立つが、外膜については明らかでない。この仮定の適否を検討するために、分離・精製した外膜ベシクルの誘電解析を行った。130 mM KCl 中に懸濁したベシクルは顕著な誘電分散を示し、緩和周波数は約 50 MHz であった。そこで、外膜の低電導性の仮定の下に実測パラメータより計算される懸濁液の体積分率の値と形態計測から求めた値とを比較すると、よい一致を示したので、上記の仮定は妥当であり、しかも外膜の電導率は塩溶液のその 0.03% 以下であることがわかった。これを用い、外膜上に直径 2 nm の pore を仮定して計算すると、有孔率は 100 個/ μm^2 以下となるから、アカパンカビや植物のミトコンドリア外膜での値 ($4 \sim 6 \cdot 10^4$ 個/ μm^2) に比してはるかに少い。肝ミトコンドリア外膜の電顕像で pore が検出されない理由の一つと考えられる。

マレイミド試薬, N-(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolidinyI) maleimide によるミトコンドリアの選択的スピンラベル

辻本 毅・熊沢 紀之 (和歌山医大・1生理)
三宅 可浩・三浦 洵・金城 勝 (国立循環器病センター)

Maleimide 試薬は, mitochondria 膜の NEM と反応するが pCMB と反応しない SH 基に選択的にラベルされ, ラベルされた NO-radical は in situ で高度に還元され, その還元には mitochondria の SH 基への結合が必要であることなどを示した。また Maleimide 試薬は ADP による呼吸刺激を抑制するが, 電子伝達活性には影響しなかった。

神経膜リン酸に対する Ca^{2+} の作用 —— Raman スペクトルによる解析 ——

会沢 勝夫・坂井 朗子・大畑 進 (東京医科大学)

ザリガニ腹部神経線維膜の $\text{O}-\overset{\text{I}}{\underset{\text{I}}{\text{P}}}-\text{O}^-$ 運動は K^+ 脱分極に伴い asymmetric mode (1207 と 1217 cm^{-1} の Raman line) から symmetric mode (1088 と 1255 cm^{-1}) に変る。この変化はリン酸基に隣接する炭素鎖の骨格運動を増大させる。その運動はコリン基に伝わり, N^+-CH_3 の Symmetric deformation に帰属する 1355 cm^{-1} の Raman line の増大や, $\text{N}^+-(\text{C})_3$ asymmetric stretching vibration の Raman line が 878 cm^{-1} から 888 cm^{-1} に移動する事によって, コリン基は疎水状態から親水状態に変る。 K^+ 脱分極状態で細胞外液に 40 mM Ca^{2+} を添加するとリン酸基は静止状態と同じ様な asymmetric mode にもどった。しかしコリン基はあまり変化しない。以上のごとく神経膜の変化を Raman スペクトルによって解析した。

血液の CO_2 平衡と活性カルシウム

上田 至宏・中馬 一郎 (大阪大学・医)

血中のイオン化 Ca 量, 赤血球内外の pH 較差, MCHC 等は plasma の pH で変化する。そこで我々が開発した炭酸ガス平衡曲線測定装置に Ca 電極を組み込み, これらの点を酸

塩基平衡との関連で検討した。血液における上記各値の変化は pH の変動を炭酸ガス滴定で行なった場合 ($dpCa/dpHpl = -0.145$, $dpHi/dpHpl = 0.785$, $dMCHC/dpHpl = 0.32$) より強酸強塩基で行なった場合 ($dpCa/dpHpl = -0.35$, $dpHi/dpHpl = 0.748$, $dMCHC/dpHpl = 8.29$: これらの値は $pCO_2 = 40$ mm Hg で測定) の方が大きく影響する。すなわち代謝性因子の変動の方が、呼吸性因子による変動よりも、赤血球においても急激な変化を与えること、特に活性 Ca イオンの変化とドナン平衡との関連で注目される必要性を明らかにした。

赤血球の機能に及ぼす dehydroepiandrosterone sulfate (DHAS) の影響

昆 和典・前田 信治・志賀 健 (愛媛大学・医)

DHAS は血中に高濃度で存在するステロイドホルモンであり、その陰性荷電とコレステロールとの構造類似性のため赤血球の機能に及ぼす影響は興味深い。①赤血球への DHAS の取り込み (3H -DHAS による解析) : 分配により取り込まれた。赤血球と ghost 膜に対する取り込みはよく一致し、DHAS が膜に局在 (膜リン脂質 100 分子当り最大 4 分子) することを示す。血漿蛋白は DHAS の取り込みを著しく抑制した。②陰イオン輸送能 ($^{35}SO_4^{2-}$ の “self-exchange” rate) : DHAS は陰イオン輸送を非拮抗的に阻害した ($K_i = 70 \mu M$)。Band 3 蛋白を阻害すると DHAS の取り込みは抑制された。DHAS-band 3 蛋白相互作用が陰イオン輸送を抑制していると考えられる。③流体力学的性質 : DHAS 濃度を増すと赤血球浮遊液の粘度は上昇し、その程度は DHAS 処理による赤血球の有棘化 (echinocytosis) と平行していた。レオスコープ法で観察した赤血球の変形態は低下し、高ずり応力下でも赤血球表面に棘状物を残していた。脂肪酸スピラベル法で観察した DHAS 処理赤血球膜の流動性は脂質二重層の中央部で増加していた。④酸素放出能 (stopped flow 法) : 赤血球の脱酸素化速度は赤血球内 DHAS 量の増加とともに遅延し、赤血球の有棘化の程度と相関していた。

赤血球膜内に取り込まれた DHAS は赤血球の有棘化をおこす。その棘状物による赤血球周辺の stagnant layer の増大は流体力学的有効容積を増して粘度を上昇させる。さらに、赤血球から放出された酸素の平均的拡散距離を増し、変形能の低下による赤血球内容物の攪拌の低下が相まって、赤血球からの酸素放出を減少させているものと思われる。

Kon, K., Maeda, N. and Shiga, T. (1982) *Pflüger Arch.*, 394, 279-286.

線維芽細胞の Receptor-mediated Ca^{2+} チャンネルと Ca^{2+} -activated K^{+} チャンネル

岡田 泰伸・矢田 俊彦・少作 隆子・老木 成稔・土屋 和興 (京都大学・医)

線維芽細胞 (L cell, Flow 1000 cell) はリポ蛋白・補体・ATP に対するレセプターをもち、これらの刺激により Ca^{2+} チャンネルが開口し、細胞内 Ca^{2+} を増大させる。その結果、 Ca^{2+} 依存性の K^{+} チャンネルが開き、一過性の過分極応答を発生する。これら両チャンネルは、本細胞の生理的機能に深く関わっている。

ピレスロイドによる ion channel 開閉の修飾

村山 公一・北里 宏 (滋賀医科大学)
尾松 正人 (京都大学・農)

合成ピレスロイドは代表的な神経作用性の殺虫剤である。神経のイオン機構に対する作用を調べたところ (今回は特に $\text{p-SO}_2\text{Me}$ と $\text{O-SO}_2\text{Me}$ について報告した), これら化合物は、 Na チャンネルの活性化及び不活性化過程に影響を与え、その作用様式は置換基の種類及び位置の差で種々異なることが解った。それゆえ、この化合物は Na チャンネルの活性化及び不活性化過程の関係の分子機構を追究するための tool となりうる。

軸索輸送の光学顕微鏡による研究とその理解

竹中 敏文 (横浜市立大学・医)

軸索輸送における微小管の役割りを光学顕微鏡により研究した。軸索輸送の研究法には、光学顕微鏡によるものと放射性同位元素をもちいる方法があるが、AVEC (ビデオ・エンハンス) をもちいる事により昨年後半より前者の研究法が盛んになってきた。ここでは、colchicine の作用を光学顕微鏡で調べた。colchicine 投与により、軸索輸送される物質量が減少するが、最後までその輸送速度は変化しない。このことは、微小管が軸索輸送のレールの役目をしている事をものがたる。そして輸送物質は微小管の連結部位に留っていくこ

とを見出した。

HeLa 細胞膜の K^+ 能動輸送機構

宮本 博司 (徳島大学・医)

K^+ の analog である Rb^+ を用いて ouabain 感受性 (能動) K^+ 輸送機構に関する研究を行ない、 Rb^+ influx と細胞内液・外液中の各 1 価陽イオンとの関係式を求めた。この式によれば、1 価陽イオンポンプは外液側に 2 個の Rb^+ 結合部位をもち、外液の Na^+ は Rb^+ と競合するが、内液の K^+ は Rb^+ 輸送にほとんど影響しないこと、および Na^+ と Rb^+ は consecutive mechanism によって交互に輸送される可能性が示された。

初期胚における心ペースメーカー細胞群の体制化

神野耕太郎・藤井 志郎・広田 秋彦・酒井 哲郎 (東京医科歯科大学・医)

The propagation of spontaneous action potentials in the 7-9 somite embryonic pre-contractile chick hearts was measured optically using a potential sensitive merocyanine-rhodanine dye. Spontaneous optical action signals from 8-16 different sites of the primitive embryonic heart were recorded simultaneously. Short delays were observed in the time of occurrence of optical signals obtained from the different regions. Therefore, we have found (i) *switching phenomena*: the site exhibiting a pacemaking priority was first situated in the right pre-atrium, thereafter it switched over to the left pre-atrium, or *vice versa*, and (ii) *double pacemakers*: two different pacemaking areas were situated independently in the right and left pre-atrial portions of the heart. Such behaviors resemble that the regional priority of the pacemaking activity is flexible. Therefore, we concluded that during the early phases of cardiogenesis, there exists a labile stage of regional priority of pacemaker function, and with the development of the regional gradient of rhythmicity, a single pacemaking area is eventually organized and localizes at the left pre-atrial tissue by the later period of the 9 somite stages.

REFERENCES

- Fujii, S., Hirota, A. & Kamino, K. Action potential synchrony in embryonic precontractile chick heart: optical monitoring with potential sensitive dyes. *J. Physiol. (London)* 319 (1981), 529-541.
- Kamino, K., Hirota, A. & Fujii, S. Localization of pacemaking activity in early embryonic heart monitored using voltage-sensitive dye. *Nature (London)* 29 (1981), 595-597.
- Fujii, S., Sakai, T., Hirota, A. & Kamino, K. Pacemaking activity of congenital double hearts in early chick embryo as indicated by optical methods. *Develop. Growth and Differ.* 25 (1983) in press.
- Sakai, T., Hirota, A., Fujii, S. & Kamino, K. Flexibility of regional pacemaking priority in early embryonic heart monitored by simultaneous optical recording of action potentials from multiple-sites. *Jap. J. Physiol.* 32 (1983) in press.

発癌プロモーターによる細胞間連絡の 抑制とその生物学的意義

柴 芳樹・菅野 義信 (広島大学・歯)

細胞間連絡の細胞増殖制御への関与が強く示唆されている。この機序を明確にする為に発癌プロモーション過程での細胞間連絡の果たす役割について研究を進めている。発癌プロモーターの1種である 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) は低濃度でヒト由来 FL 細胞の電氣的細胞間連絡の機能を可逆的に抑制した。細胞間連絡を介して細胞増殖が制御されているならば、TPA は細胞増殖を変化させる筈である。しかし、TPA は細胞形態を変化させるが、細胞増殖に対して大きな影響を与えなかった。用いた細胞の細胞間連絡を介する増殖制御がもともと弱いためで、細胞間連絡を介する増殖制御が強い細胞系を用いれば、発癌プロモーターによる細胞間連絡抑制と増殖の変化が観察される可能性もあろう。

微小区画と微小環境

田代 裕 (関西医科大学)

細胞内には種々の小器官が存在し、多数の微小区画を形成している。これを膜 M と空間 S に分け、細胞の外から中に向って順番に M1, M2, M3 ; S1, S2, S3, S4 と名付ける。細胞膜は M1, 細胞質ゾルは S2, 1 重膜細胞小器官内腔は S3, 2 重膜小器官の膜間空間は S3, マトリックスは S4, チラコイド膜内腔や閉鎖されたクリスタ膜内は S5 となる。このとき $S1 \rightleftharpoons S3 \rightleftharpoons S5$, $S2 \rightleftharpoons S4$ という法則が成立することに気付いた。細胞微小区画の概念は細胞の機能, たとえばタンパク質の局在化 (protein topogenesis), 細胞内イオン環境, 代謝プールなどを考えるときに極めて重要で, 細胞生理学における基本的な概念の 1 つと考える。

オーバーシュート・アップテイク

品川 嘉也 (京都大学・医)

細胞や顆粒への各種物質の uptake に際して, 平衡値の何倍ものオーバーシュートがしばしば観察される。そのメカニズムについては諸説があったが, 品川らがヒト赤血球で見出した体積流のオーバーシュートから, 体積流と溶質流の連絡により解析できることを示した。

連結機構の回路網表現について

今井 雄介 (大阪医科大学)

熱力学システムとしての生体系は, 各種のパワーの散逸, 変換伝達および自由エネルギーの変化の諸過程を示す素子でもって回路化される。各々抵抗体, 変換体および容量体をもって表現し, これら一般化された素子の因果律の考察から接続法が規定されること, またそのことにより合理的な回路モデルができることを示した。

『自律神経中枢機構』

昭和 58 年 1 月 28 日～1 月 29 日

熊 沢 孝 朗 (名大)	痛みと自律神経調節
的 場 恒 孝 (久留米大)	循環器病からみた自律神経の役割
広 重 力 (北大)	ホルモン概日リズムの個体発生
山 下 博 (産業医大)	神経内分泌と自律神経系の連関
本 間 生 夫 (慈恵医大)	呼吸リズム形成機構と吸息興奮及び抑制反射
野 坂 昭一郎 (三重大)	自律神経中枢ニューロンの同定
水 野 昇・野 村 巖 (京大)	

脳神経領域の自律神経中枢について一形態学的研究

大 村 裕 (九大)	連合野と自律系
熊 田 衛 (筑波大)	動脈圧受容器は血圧の長期的調節に関与するだろうか？
二 宮 石 雄 (循環器病センター)	心臓交感神経と心拍数の変動について
宮 川 清 (信州大)	血圧振動発生の中枢機構
後 藤 昌 義 (九大)	心筋におけるカテコールアミンの作用 (第二報) 外向き電流への効果
北 村 憲 司・陶 山 晶 子・栗 山 熙 (九大)	血管平滑筋の α -adrenoceptor に対する cocaine の作用
三 浦 光 彦 (群馬大)	循環調節とトランスミッター
富 田 忠 雄 (名大)	胃平滑筋に対するカテコールアミンとプロスタグランディン
入 内 島十郎 (広島大)	循環調節における副腎髄質の重要性
佐 藤 昭 夫 (都老人研)	副腎髄質機能の反射性調節

痛みと自律神経機能調節

熊澤 孝朗 (名古屋大学・環医研)

ともに、神経系の進化の初期段階にでき上ったと考えられる、侵害受容系と自律系機能

調節系の密な連関の追求を試み、1)ポリモーダル受容器のユニット放電活動を in vitro 標本で記録し、化学刺激反応が、閾値下の温度上昇、および PGE_2 、5-HT 投与により増強すること、2)筋ポリモーダル受容器の化学刺激により、濃度依存性の呼吸促進、および、内因性オピエイトを介する呼吸抑制がひき起こされることを明らかにした。

循環器病からみた自律神経の役割

的場 恒孝 (久留米大学・医)

効果器としての心臓への交感神経は、心筋肥大に促進的に働いていた。chain saw 操作による振動と騒音負荷によって、心拍数の増加、ACTH、Cortisol、Ad、NA の増加がみられた。視床下部を抑制する sulpiride 前処置によって、これらの増加は抑制されたが、propranolol の前処置では、ACTH、Cortisol の変化はなかったが、Ad、NA の上昇はやや抑制された。以上の所見から、心臓には、高位中枢を含めた自律神経系による制御機構が、強く働いていることがわかった。

ホルモン概日リズムの個体発生

広重 力・本間 研一・本間 さと (北海道大学・医)

ラット血漿コルチコステロンの概日リズムは生後3～4週で出現する。この事実、ホルモン概日リズムを駆動する振動体の振動がこの頃に開始することを必ずしも意味しない。振動開始の個体発生を追究する目的で、出生後直ちに両眼を除去して盲目にした仔ラットのホルモン概日リズムのフリーランの位相解析を行った。その結果、仔ラットのホルモンリズム振動体は出生前にすでに振動を始め、母親によって胎生期に同調されることが分った。

呼吸リズム形成機構と呼吸興奮及び抑制反射

本間 生夫 (昭和大学・医)

呼吸運動は吸息、呼息の規則正しい繰り返しであるが、正常な呼吸リズムを生みだすには多くの反射系や、感覚性フィードバック・ループが存在し、呼吸リズム形成機構を調節しなくてはならない。実験ではネコの中枢性化学受容野を局所冷却ブロック法にて段階的にブロックし、その時の横隔神経放電量がいかに変化するかを調べ、呼吸リズム形成機構における化学性入力とその他の入力の相互作用を調べた。その結果、末梢性化学受容器からの入力は“additive”に、気道の急速順応型受容器からの入力は、“multiplicative”に働くことが判明した。

脳神経領域の自律神経中枢について

—— 形態学的研究 ——

水野 昇・野村 巖 (京都大学)

ネコの叢索、舌咽神経ないし迷走神経の末梢枝を切断して、その中枢端を HRP 溶液に浸漬し、それぞれの神経枝が含む求心性および遠心性要素の中枢内分布を逆行性および順行性 HRP 法によってしらべた。自律神経系に関係の深い新知見のうちで次の3点がとくに重要である。

1. 上唾核、下唾液核および疑核のニューロンの軸索は、はじめ背内方に走り正中線付近で第四脳室底近くまで達し、“膝”を形成して反回し、腹外方へ走って脳幹を去る。

2. 頸動脈洞神経には遠心性要素は発現できなかった。求心性要素の神経細胞体は上神経節と下神経節の両方に分布する。これらの求心性線維は迷走神経背側核のレベルで孤束の背側亜核、背外側亜核、交連亜核に終止する。

3. 迷走神経耳介枝は求心性線維だけを含む。これらは三叉神経核群 (主感覚核腹側亜核、中間亜核、尾側亜核)、楔状束核、脊髓後角 (第1頸髄から第三頸髄上部にかけて) のほか、孤束核 (間質核、背側核、背外側核、交連核) にも終止する。

循環調節とトランスミッター

三浦 光彦 (群馬大学)

循環調節神経回路における伝達物質の同定は、高血圧症の病態解明とその治療の上で重要な意義をもつ。頸動脈神経反射の孤束核における伝達物質については、従来、P物質説とグルタメート説とがあった。オピエートの特異的なアンタゴニストであるナロキソンを孤束核に与えると頸動脈神経刺激による誘発電位と減圧・心拍緩徐反射との両方が抑制される。この実験的事実から、我々は新たにオピエート説を提唱したい。

胃平滑筋に対するカテコルアミンとプロスタグランジン

富田 忠雄 (名古屋大学・医)

モルモット胃輪走筋は胃底部および幽門前庭部とも noradrenaline (NA) に対し、 10^{-6} M では主に収縮、 10^{-5} M では主に弛緩という反応を示す。indomethacin (10^{-6} M) は静止時の筋緊張を消失させ、NA の反応を収縮のみの反応に変化させる。prostaglandin (PG) E は膜電位に強い影響を与えず、弛緩作用を示す。膜電位に対する NA の作用は膜抵抗の減少を伴った過分極、自発性の電位変動 (slow wave) の退縮、slow wave の上に現われるスパイク要素の増強である。この電気現象は収縮および弛緩、あるいは indomethacin の作用とあまり相関を示さず、弛緩現象は NA による PGE の産生の結果である可能性は考えられる。

副腎髓質の循環調節における重要性

入内島十郎 (広島大学・医)

無麻酔のラットを新しい環境に移して興奮させると、内臓領域から骨格筋への血流配分の変更が起こるが、このとき主役を果たすのは副腎髓質から放出されたアドレナリンであり、その α -作用による内臓血管の収縮、 β -作用による骨格筋の血管の拡張が血流の再配分に大きな役割を果している。骨格筋に限り β -レセプターが豊富である。ことの機能的意義はアドレナリンという一種類の物質で、2種類の神経あるいは中枢における相互性ニューロン機構に匹敵する効果を起こすことにあると理解される。

『筋電図の口腔領域への適用』
—— 筋電図の各種処理方法から臨床応用へ ——

昭和 58 年 1 月 31 日～2 月 1 日

歯科領域の筋電図応用における問題点

三 浦 不二夫・大 山 肇 (東京医科歯科大学・歯・歯科矯正)

日本における筋電図のあゆみと将来

河 村 洋二郎・森 本 俊 文 (大阪大学・歯・口腔生理)

最近の歯科医学関係の筋電図使用による研究の研究手法記載についての問題点

津 留 宏 道・岡 根 秀 明・菅 野 義 信・柴 芳 樹
(広島大学・歯・歯科補綴・口腔生理)

歯の咬合接触と咀嚼筋筋電図

三 谷 春 保・藤 井 弘 之 (大阪歯科大学・歯科補綴)

筋ジストロフィー症における筋電図の累年変化について

清 水 賢 二 (九州大学・歯・歯科矯正)

筋電図の顎関節症診断治療への応用

船 越 正 也 (岐阜歯科大学・口腔生理)

Silent period についての一知見

塩 沢 光 一 (鶴見大学・歯)

種々な咬合位における咀嚼筋活動の様相

河 野 正 司 (東京医科歯科大学・歯・歯科補綴)

筋電図の自動解析について

山 鹿 卓 郎・石 岡 靖 (新潟大学・歯・歯科補綴)

ME 学会専門別研究会を世話しての経験からの問題点

石 岡 靖 (新潟大学・歯・歯科補綴)

世話人 亘 弘

筋電図の口腔領域への適用

津留 宏道 (広島大学・歯)

菅野 義信 (広島大学・歯)

概 要

筋電図は顎運動及び咀嚼の機能を表示する 1 指標として近時口腔領域で広く汎用されている。これはエレクトロニックスの発達による使用機器の経済性に著しい改善をもたらした長所であろう。一方最近は検査項目のひとつとして保険適用が可能になった反面、安易な使用による情報の歪曲化の怖れがないといえない状況が生じている。本研究会は歯学部基礎教室の研究者と臨床で筋電図を利用することの多い補綴学教室、矯正学教室、口腔外科学教室の研究者が一同に会し、筋電図の歴史、基礎から、応用例、データー処理の仕方までを討論した。少くとも筋電図の記録には一定条件が必要で、これによって得た情報のみが後段の各種分析に耐えられるものであることが確認された。検査機能によって分析方法が異なるのは当然であるが、今後の研究と討論によって、検査目的による最良分析方法を確立できる可能性について論じられた。

歯科領域の筋電図応用における問題点

三浦不二夫 (東京医科歯科大学・歯)

昭和 25 年、咀嚼筋の活動様式を把握すべく筋電図の研究に着手したが、当時は、この方面に関心を持つ研究者が少なく、関連器機さえ全て自家製であった。そこで、これらの研究が相互に情報交換する場として筋電図研究会を持った。以来、30 余年の日時が経過した現在では、これは学会にまで発展し、臨床医学にも広く活用されている。歯学の分野でも補綴学をはじめ矯正学、口腔外科学等の臨床領域で積極的に活用され、それだけに筋電図学的研究も数多く発表されていることは大変喜ばしい。しかしながら、それらは、各研究者相互間の理解がないままに個々に発展してゆく傾向もあるやに感ぜられるので、早急に基礎側、特に口腔生理学者と臨床側のこの方面に関与する研究者との間で十分な討議を行ない、互いの理解のもとに研究を発展させることが望まれる。さらに、筋電図をはじめとする臨床検査方法が歯科領域において確立されることを期待するものである。

日本における筋電図研究のあゆみと将来 (I)

河村洋二郎 (大阪大学・歯)

歯科領域における筋電図研究は、内外共に 1949 年頃から始まった。基礎学領域では顎顔面及び口腔の筋活動とその脳、神経機序の解明に有効な手段である。しかし、歯科臨床の実際応用となると筋活動の側面しかつかまえていないので、筋電図のみで判別しうることには限度があり、他の方法との併用が適正な診断には欠くことができない。何をその臨床検査で知りたいのか明確にする必要がある。下顎安静位の測定、咀嚼時の筋活動などが従来主な対象であったが、現在は Silent Period の分析、誘発筋電図の活用、MPD 症候群の診断に多くの試みが行われている。しかし、身障者の顎機能障害への治療法の選択などにも今後益々の活用が期待される。筋電図のように、測定機器を主体に発達した学問の進展には進歩改善が大切で、機器の簡便、軽量、精度化と共に、筋電図から色彩脳波に見られる如く、血流、代謝、温度、化学物質等が把握できるようなトランスホームの開発が必要であろう。

日本における筋電図研究のあゆみと将来 (II)

森本 俊文 (大阪大学・歯)

EMG は被検筋を支配する運動神経細胞の活動や中枢神経系の活動の指標と見なし得るので咀嚼の神経調節機構を解明するのにも便利な手段となる。以下に三叉神経知覚枝を切断した場合の咀嚼筋 EMG の変化を記す。ウサギを用いニンジン咀嚼中の左右咬筋の活動を慢性的に記録した。咀嚼側咬筋活動のピークは反対側のそれに比して 28 ± 5 ms の遅れが生じたので、動物が左右いずれで咀嚼しているかは EMG より容易に判定できた。三叉神経知覚分枝を広汎に切断すると咀嚼側は健側に偏った。さらに、咀嚼時の咬筋 EMG バーストの間隔を測ることによって咀嚼リズムを調べると患側咀嚼時にリズムの遅れが著明であった。しかし、バーストの持続時間や活動量の変動係数には神経切断前に比して有意な変化は認められなかった。したがって、三叉神経入力に咀嚼時の咬筋活動の持続時間や活動量の調節に対してよりも咀嚼側やリズムの決定に重要な役割を持つと云える。

歯科医学領域の筋電図を応用した研究における 研究方法記載内容に関する検討

津留 宏道・岡根 秀明 (広島大学・歯)

菅野 義信・柴 芳樹 (広島大学・歯)

咀嚼筋筋電図は顎口腔機能を評価するうえで有用であり、従来より多くの研究がなされてきた。ところが近年、筋電図の記録、分析法が多様化し、研究結果の比較検討あるいは追試験を行うことが困難になりつつある。装置の相違あるいは研究目的の相違によって、記録、分析条件が異なるのは当然としても、これらのある程度の規格化及び研究方法の記載は必要であろう。また、筋電図を臨床診断に応用する場合にも、このような規格化及び研究方法の記載は重要となる。そこで今回、我われは上記の問題を検討するための第一歩として、歯科医学領域における、筋電図を用いた主な文献 35 編を選択し、被験筋、電極、増幅器、記録器、記録条件、分析内容、データ処理装置について調査した。その結果、筋電図の記録、分析法は各研究者間で大きく相違していることが確認されるとともに、記載内容が不十分と思われる文献が多いことが明らかになった。

歯の咬合接触と咀嚼筋筋電図

三谷 春保・藤井 弘之 (大阪歯科大学)

咀嚼筋 EMG の一分析法を提案した。咀嚼および tapping 運動時の閉口筋 EMG burst は歯の咬合接触を境にして主に筋の等張性収縮の様相を表現する前半部と等尺性収縮に相当する後半部とに 2 分できる。歯の接触は burst 中に発現する silent period (SP), 顎運動曲線, あるいは咬合音を指標にして知ることができる。そこで SP を指標にして burst を前後に 2 分したとき、前半部の持続時間と積分値をそれぞれ DPSP (Duration Preceding SP) および APSP, 後半部の当該値を DOSP (Duration Outlasting SP) および AOSP とし、歯の接触信号 (TC) を指標にしたときのパラメーターを順に DP TC, AP TC および DOTC, AOTC と名付けた。EMG の誘導は両側性で、mover として側頭筋後部, worher として咬筋浅部中央を被検筋としている。咬合十渉, 早期接触, 犬歯誘導の付与および骨格性下顎前突症に対する外科的矯正手術などの効果を上述したパラメーターの平均値, 変動, 比, 4 筋の coordination pattern を用いた分析結果を報告し, 本法の有用性を示唆した。

筋ジストロフィー症における咬筋と顎二腹筋筋電図の年次変化

清水 賢二 (九州大学・歯)

進行性筋ジストロフィー症患者にしばしば開咬が認められ、経年的に増悪する傾向が認められる。そこで 14 名の同症患者について閉口筋である咬筋と開口筋である顎二腹筋のそれぞれ最大かみしめ時と最大開口時の表面筋電図を双極誘導し、オーバーバイトとの関連と年次変化について検討した。筋電図はパワースペクトラムによる分析をおこない、500 Hz までのパワーの中央値となる周波数を指標とした。オーバーバイトは模型上で計測した。

その結果、オーバーバイトと両筋の中央値との間に危険率 5 % のレベルで相関が認められ、開咬が増大すると両筋の中央値が小さくなる傾向が認められた。また、opening group と not opening group とに分けて中央値の平均値の差の検定をおこなったところ、前者の咬筋の平均値は有為に小さく年次的に差が大きくなる (危険率 0.5%~0.1%) 傾向が認められたのに対して、顎二腹筋のそれは経年的に差が認められなくなる傾向があった。

顎関節症の診断と治療に対する筋電図の応用

船越 正也 (岐阜歯科大学)

Schwartz ら、Laskin らによれば、顎関節症は咬合異常や精神的ストレスなどが原因で発生する咀嚼筋の緊張亢進のために Myofascial pain を生じ、そのために顎運動障害や顎関節痛を誘発したもので、Myofascial Pain Dysfunction (MPD) Syndrome と呼ぶべきであるとされている。

顎関節症の診断に当たっては、したがって、先づ咀嚼筋の緊張亢進の有無、 α 型か γ 型かなどを鑑別する必要がある。それには、 γ 系を介して誘発される緊張性顎反射を利用した咀嚼筋の筋電図法が優れていることを実例を示して検証した。

すなわち、上下歯の早期接触などの咬合異常があると咀嚼筋の顎反射は異常側が増大または異常パターンを示す。精神的ストレスによる咀嚼筋の緊張亢進は、EMG を指標した Bio-feedback Training により MPD 症状を軽減することができる。また、 γ -系筋弛緩剤 (Tolperisone-HCl) の投与 (1 日 300 mg) も有効であることが EMG 検査で実証された。

Silent period についての一知見

塩沢 光一 (鶴見大学・歯)

歯肉表面への電気刺激によって、かみしめ時の閉口筋筋電図中に出現する Silent period (SP) について調べた。電気刺激 (10 V) で出現する SP とオトガイ部叩打での SP を比較すると電気刺激での SP の潜時は叩打での SP 潜時の約 2 倍の値を示した。一方 SP の持続時間は電気刺激の方が短い傾向が認められた。刺激電圧を増大していくと第 1 の SP に引き続いて第 2 の SP が出現してくる。第 1 の SP の閾値は圧覚に類似した感覚の閾値と一致し、また第 2 の SP の閾値は痛覚閾値以下であった。刺激電圧の増大に伴い第 1 の SP の潜時は短縮し、持続時間は逆に延長したが、第 2 の SP についてはこのような変化は認められなかった。今回試みた歯肉への電気刺激で SP を出現させる方法は刺激のコントロールが容易で、また SP と被験者の知覚する感覚とを同時に検索することが可能であるので、口腔内からの感覚と SP との関係を調べる上での有用な手段と考えられる。

種々の咬合位における咀嚼筋の活動様相

河野 正司 (東京医科歯科大学・歯)

補綴物を口腔内に装着して顎口腔系の機能回復を図る場合、患者に新たに与える咬頭嵌合位の位置決定が一義となる。この下顎位の保持、決定に、作動源である咀嚼筋の活動がどの程度に関与しているかを明らかにする目的で、正常機能を営む個体における咀嚼筋活動を、表面 EMG 振幅値の 2 乗値を半積分処理し定量測定して、種々の咬合位における咬筋、側頭筋前腹および後腹の power coordination pattern を求めた。また、咀嚼筋 6 筋の振幅値を独立変数にとり、咬合位の前後、左右方向の要素をそれぞれ、咬合位 $= a^0 + \sum a_i \cdot EMG_i$ と表わし、最小自乗法により自己回帰式を求めた。次いで、この回帰式を使い咀嚼筋活動値より咬合位の推定を試みた。被験者 3 名における測定顎位合計 405 について推定した値の実測値に対する誤差の絶対値の平均値は、咬合位の前後方向要素について 0.22 mm、左右方向要素について 0.37 mm であった。

筋電図の自動解析について

山鹿 卓郎・石岡 靖 (新潟大学・歯)

咀嚼筋の筋電図分析は、顎口腔系の機能異常診断における有効なる検査法と評価されている。しかし、分析は手作業によるところが多く、過大なる時間と労力を必要とした。当教室ではミニ・コンピュータによる筋電図の自動解析について研究を行っており、これまでにリズム分析を含む4筋4区間 Coordination Pattern 分析法、筋電図波形を確率過程より分析する統計的波形分析法などを開発し、臨床データによる検討を行ってきた。その特徴は、原データを A/D コンバータを通して直接コンピュータに入力・処理しているため、分析項目を多元化しているにもかかわらず、精度の高い分析 (0.2 msec) を短時間に行なうことができる。また、分析数値結果は各種診断に便利なグラフとしてただちに表示でき、臨床応用に有効である。同時に最終結果はフロッピーディスクに記憶保存しており、各種の統計処理を容易に行うことができる。

ME 学会専門別研究会を世話しての経験からの問題点

石岡 靖 (新潟大学・歯)

下顎運動機能と EMG 研究会は日本 ME 学会の専門別研究会として昭和 57・58 年の 2 年間において設置されたものである。本研究会は下顎機能の運動論的分析と生理学的分析を一体として、臨床検査に有効なるパラメータの設定とその表示法及び臨床に適した分析器機の開発に必要な資料を得て、今後の臨床診断の発展に寄与することを目的としている。本研究会の昭和 57 年のメインテーマは顎口腔系機能異常—下顎運動機能に関する実験的又は臨床例の分析—とし、臨床の立場から問題点を明確にして、できるだけ目標をしぼってゆく考えをとった。刺激と筋電の応答・分析及び顎関節異常、咬合・顎位、咀嚼機能のそれぞれの筋電図に関するものが主であった。本研究会は上記 4 項目について電子工学を活用した測定分析法と情報処理法によって、下顎運動機能に関する臨床検査法の確立を目的としているが、下顎運動機能を筋電図から、どこまで解明できるかが問題である。

『生理学における数学的方法』

1983年2月10日・11日

下記のプログラムにより開催された数学者の側から、具体的な生理学的実験法の提案や、実験値の解析法についての提案があり稔り多い会合となった。

視覚情報系（眼球運動系）における学習

東大・工・計数工学 甘 利 俊 一

多オートマン系の進化

京大・理・生物物理 西 尾 英之助

膜振動におけるリミットサイクルの可能性

京大・医・生理 品 川 嘉 也

Wiener 展開

名大・理・数学 飛 田 武 幸

ポアソン過程の汎関数

名大・医療技術短大 伊 藤 嘉 房

粘菌細胞の運動機構

京大・理・生物物理 寺 本 英

脈管系のコンプライアンス

京府医大・生理 磯 貝 芳 徳

神経回路における線形、非線形信号伝導

基礎生物学研究所 中 研 一

生理学と連続系シミュレータ

豊橋技術科学大 白 井 支 朗

反応拡散系における空間周波数同調

東大・工・計数工学 倉 田 耕 治

Hodgkin-Huxley 方程式とカオス

東大・工・計数工学 合 原 一 幸

討論参加者

寺 本 英(京大・理・生物物理) 久 保 泉(名大・理・数)

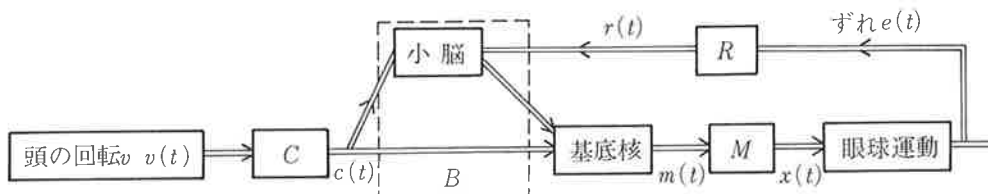
久 野 宗(京大・医・生理) 安 井 湘 三(基生研)

嶋田 晋(東大・工・計数工学) 品川 泰子(京大・医・生理)
 小島 比呂志(京大・医・生理) 小山 誠次(京大・医・生理)
 亘 弘(生理研) 志賀 潔(生理研)
 代表者 品川 嘉也(京大・医学部・生理)
 世話人 亘 弘, 志賀 潔(生理研)

視覚情報系(眼球運動系)における学習

甘利 俊一(東京大学・工)

前庭動眼反射(VOR)は、頭の運動を半規管において検知し、基底核を経由する信号によって眼筋を駆動し、もって頭運動と反対方向に眼球を回転して注視点が目標からずれるのを事前に防ぐ先まわり制御系である。この開ループ系は小脳を経由する系で修飾されるが、筋肉の特性の変化や眼球の変化さらに眼鏡等による特性の変化は小脳の可塑性によって学習的に補償されることが生理学実験によって明らかにされた。ここではこのような適応制御系の神経モデルを作り、その能力を考察する。



上図で頭の回転速度ベクトル $v(t)=[v^i(t)]$ は半規管を通してベクトル信号 $c(t)=[c^i(t)]$ となり、これが小脳および基底核を経て運動信号 $m(t)$ となり、最終的に眼球運動速度 $x(t)$ となる (m と x もベクトル)。*を線形フィルタによるコンバリューションとして、これらの関係は

$$x = C * B * M * v$$

と書ける。一方、I を網膜に至る光学系の特性とし、 $x = -Iv$ のときに運動の補償が行なわれるものとし、 $e(t) = x(t) + Iv(t)$ を網膜上のずれ信号とする。ずれ信号をフィードバックした $r = R * e$ を教師信号として小脳が学習し系の特性 B を変えるとする。このとき、 $\|\cdot\|$ を適当なノルムとして

$$\|e\|^2 = \|C * B * M * v + Iv\|$$

を最小化できるかという問題である。ここで $v(t)$ はある定常強混合確率過程とし、上式は

v についての時間平均で評価する。

明らかに眼筋等の特性は時間遅れを含むから、Bはこの分を取り戻す予測機能を持たなければならず、その学習はKalman-Bucy フィルターの如き方式を採用していることを示唆する。この系の神経学習方程式をたて、学習可能性についての具体的考察を行なう。

多オートマトン系の進化

西尾英之助・斉藤 隆 (京都大学・理)

1. まえがき

神経系 (脳) は多オートマトン (あるいは多素子系) とみなすことができる。神経系は素子であるニューロンから成るが、これを例えば McCulloch-Pitts のニューロンと考えるよりも、一般に有限オートマトンと考える方が現実を反映している。というのはニューロンの中でも下等動物のそれは、多様な働きをしているからである。

他方神経系は単純な生物のそれから進化して現在の複雑かつ高度なものに到達した。複雑な系を直接研究することは困難であり、より単純な系から進化してくる過程を研究する方が適している場合がある。また個体発生の過程も重要であるが、ここでは系統発生のみを取扱かう。このように発生 (生成) の過程を問題にするのは、言語の生成理論と軌を一にしている。

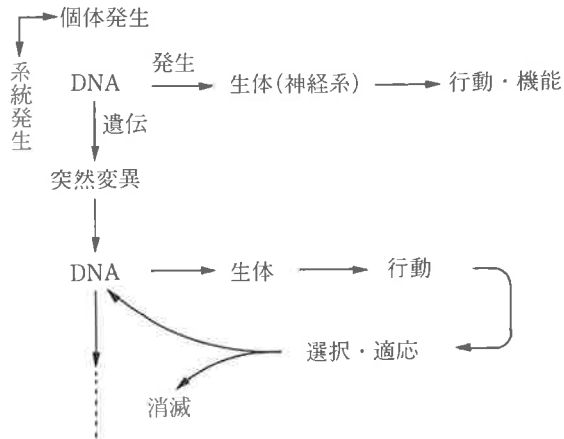
冒頭に述べたように、ここでは、多オートマトン系を考えているので、問題は、複雑で高度な情報処理をする多オートマトン系がどのようにして単純な系から進化してくるかということである。この間に応えるモデルを提案し、多オートマトン系および神経進化の研究に寄与したい。

ここで参考までに実際の神経系の進化の時間スケールを書いておく。

年 代	事 象	最 初 の 例
30 億年前	生命の誕生	DNA, バクテリア
6 億年前	神経系を持つ生物	腔腸動物 (ヒドラ, イソギンチャク)
5 億年前	脊椎動物	ナメクジウオ, サメ
1 億年前	哺乳類	ハリネズミ
300 万年前	人	オーストラロピテクス

進化の元は遺伝であり、それは DNA (デオキシリボ核酸) が司さどる。DNA はまた、個

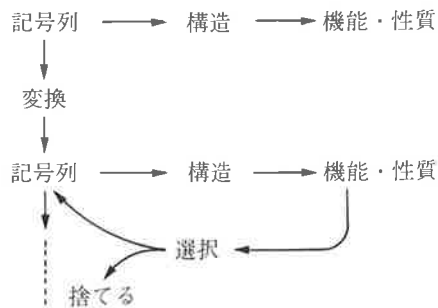
体発生の不可欠な要素である。これらのことを図式にすると下図のようになる。



進化の過程は遺伝によって同一の生体をつくと同時に突然変異によって少し異なった生体をつくり、環境に適応したものが選択されて残り、より高等なものをつくり出す。

この時、生体の構造の全情報はDNAの4記号から成る一次元記号列によって表わされる。神経系を符号化している部分やその仕方など現在のところ殆んど解っていないが、DNAの上に何らかの形で符号化されている。

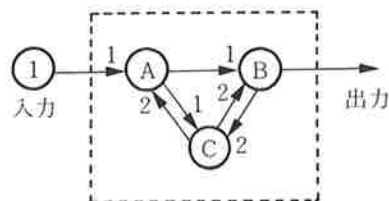
上の図式を多オートマトン系にあてはめると下図のようになる。



2. 記号列と多オートマトン系の構造

例 $\omega = \# 01101001.1, 010 * 10010110, 11, 01 \# 11110000, 110, 11$

回路網 $M = \varphi(\omega)$



素子のオートマトン A, B, C

記号列が回路網を表現するための構文

以下素子は2状態であると仮定する。

(i) アルファベット $\Sigma = \{0, 1, \#, *, \cdot, \cdot, (\cdot)\}$

ω を Σ 上の記号列とする

(ii) $\omega ::= \langle \# \alpha, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k \rangle \langle * \alpha, \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k \rangle$

ここで α の次の $\cdot$ は $\cdot$ でも良い

$$\alpha \in \{0, 1\}^+ \quad \beta_i \in \{0, 1\}^+$$

(iii) $\omega ::= \omega \langle \# \alpha, \beta_1, \dots, \beta_k \rangle \mid \omega \langle * \alpha, \beta_1, \dots, \beta_k \rangle$

ただし $\omega = x, \alpha(y)Z$ は $x\bar{\alpha}$ 個 z と同一視する

$\bar{\alpha}$ は α が表わす (2進数)

(iv) $\#$ (又は $*$) と次の $\#$ ($*$) の間をブロックという。 ω が n ブロックから成り β_{ij} が第 i ブロックに属するとき、 $\beta_{ij} \equiv 0\gamma_{ij}$ なら γ_{ij} は $n-i$ 以下で、 $\beta_{ij} \equiv 1\gamma_{ij}$ なら γ_{ij} は $i-1$ 以下であること。

構文に従う記号列の持つ意味

ω は一般に次の形をしている。

$$\omega \equiv \# \alpha, \beta_1, \beta_2 \dots \beta_k \# \alpha', \beta_1' \dots * \alpha'' \dots$$

(i) 1 ブロックは1素子を表わす。従って ω が、 n ブロックから成るとき、系は n 素子から成る。

(ii) $\#$ で始まるブロックは内部素子、 $*$ で始まるブロックは出力素子を示す。

(iii) α (第1番目の0-1系列) は素子の内容を示し、 β_i は素 α の第 i 入力がいずれの素子から来るかを示す。 k は α の入力線の本数である。

(iv) 素子が下表の様に表わされるとき、記号列 α は

$$\alpha \equiv a_1 a_2 a_3 \dots \quad a_i \in \{0, 1\}$$

と書かれる。

$\dots$	x_3	x_2	x_1	Q	Q'
	0	0	0	0	a_1
	0	0	0	1	a_2
	0	0	1	0	a_3
			$\vdots$		$\vdots$

x_i は第 i 入力

Q' は次状態

$|\alpha|$ を α の長さとする、 $|\alpha| \geq 2^{k+1}$ の時は 2^{k+1} より右を無視する。 $|\alpha| < 2^{k+1}$ の時は 2^{k+1} ま

で 0 を補う。

(v) 素子の出力は素子の状態と同一視する。

(vi) $\beta_i = 0\gamma_i$ のとき第 i 入力はそのブロックの右方 γ_i 番目のブロックが表現している素子から来る。 $\beta_i = 1\gamma_i$ のときは左方 γ_i 番目のブロックの素子から来る。すなわち入力線の源は相対番地で示される。

(vii) $\# \alpha, \beta_1, \dots, \beta_i \dots$ のとき β_i に続く β_i は外部入力線番号を示す。例えば $\dots, 10, \dots$ なら外部入力 2 番から入ってくる。

以上の構文と意味によって、記号列 $\omega \in \Sigma^*$ と多オートマトン系 $M = \varphi(\omega)$ の対応がつけられる。

回路網を表現している記号列の全体を W とし、多オートマトン系の全体を M とすると上記の構文と意味は

$W \xrightarrow{\varphi} M$ なる写像 φ を定める。

φ は一般に多対 1 である。

多対 1 の例

先に示した例に対して

$\omega' \equiv \# \alpha_1, 1, 01 \# \alpha_3, 11, 01 * \alpha_2, 110, 11$ ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3$ は対応する 0, 1 系列)

とすれば, $\varphi(\omega') = \varphi(\omega)$

3. 記号列の変換

進化の源は DNA 上に起る突然変異である。

これにならって記号列の変化を考える。記号列 $\omega \in \Sigma^*$ の一部に変化が生じ、別の記号列 ω' に変換される。その単位変化として以下の操作 (rearrangement) を採用する。

x, y, z などは Σ^* の元である。 a, b は Σ の元である。

(i) duplication D

$xuyvz \longrightarrow xyuyvz$ が $xuyvyz$

(ii) deletion L

$xyz \longrightarrow xz$

(iii) substitution S

$xaz \longrightarrow xbz$

(iv) insertion I

$xz \longrightarrow xyz$

(v) translocation T

$xyuz \longrightarrow xuyz$

(vi) inversion V

$$xyz \longrightarrow xy^Rz$$

記号列 ω に上記操作を施すことを $D(\omega)$ とか、一般に $f(\omega)$ とかで表わす。

命題 1 任意の $\omega \in \Sigma^*$ から, D, L, S のみを繰返して施すことにより, 任意の $v \in \Sigma^*$ をつくることができる。とくに I, T, V は D, L, S の組合せでつくることができる。

$\omega \in W$ に対して一般に $f(\omega) \in W$ とは限らない。

$f(\omega) \in W$ のとき

$$W \ni \omega \xrightarrow{\varphi} \varphi(\omega) \in M$$

$\downarrow f$

$$W \ni f(\omega) \xrightarrow{\varphi} \varphi(f(\omega)) \in M$$

ω に繰返し操作 f を施すとき,

$$\omega \rightarrow f(\omega) \rightarrow ff(\omega) \rightarrow \dots$$

途中のすべての $f^i(\omega)$ が W に属するときのみ $f^*(\omega) \in W$ とする。

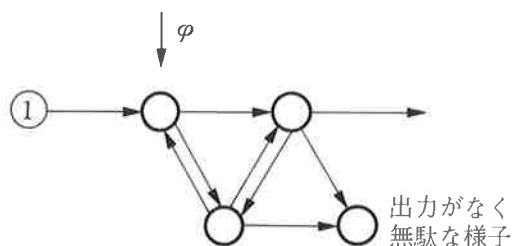
命題 2 ある $\omega_0 \in W$ から任意の $\omega \in W$ へ, W 中の元だけをたどりながら到着することができる。

$$\omega_0 \xrightarrow{f} \omega_1 \xrightarrow{f} \omega_2 \rightarrow \dots \xrightarrow{f} \omega_i \xrightarrow{f} \dots \rightarrow \omega$$

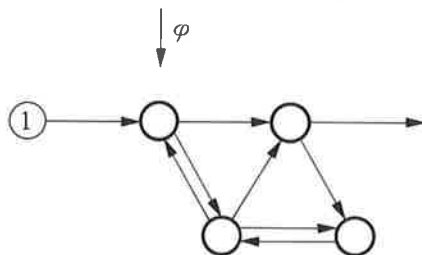
4. Rearrangement の例

$\omega_0 = \# \alpha, 1, 010 * \alpha, 11, 01 \# \alpha, 110, 11$ ここで α は適当な素子である。

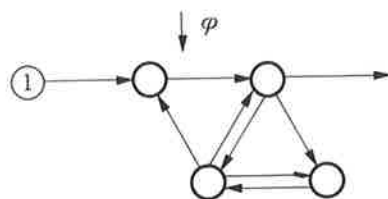
$\omega_1 = D(\omega_0) = \# \alpha, 1, 010 * \alpha, 11, 01 \# \alpha, 110, 11 \# \alpha, 110, 11$



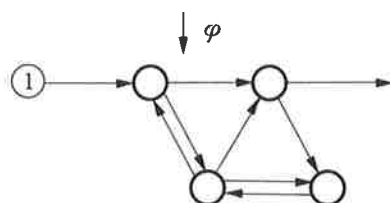
$\omega_2 = SD(\omega_0) = \# \alpha, 1, 010 * \alpha, 11, 01 \# \alpha, 110, 01 \# \alpha, 110, 11$



$\omega_3 = D(\omega_0) = \# \alpha, 1, 010 * \alpha, 11, 01 \# \alpha, 11, 01 \# \alpha, 110, 11$

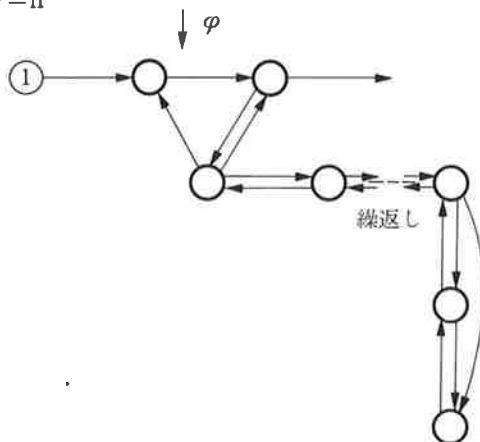


$$\omega_4 = I(\omega_3) = \# \alpha, 1, 010 * \alpha, 11, 01 \# \alpha, 110, 01 \# \alpha, 110, 11$$

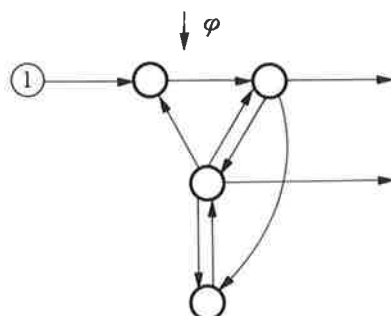


$$\omega_4 = \omega_2 \text{ 従って } \varphi(\omega_4) = \varphi(\omega_2) \omega_5 = \# \alpha, 1, 010 * \gamma(\alpha, 11, 01 \# \alpha, 11, 01 \# \alpha, 110, 11$$

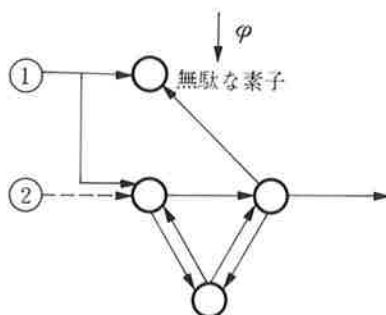
$$\bar{\gamma} = n$$



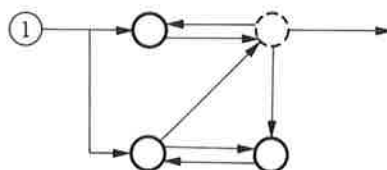
$$\omega_6 = \alpha, 1, 010 * \alpha, 11, 01 * \alpha, 11, 01 \# \alpha, 110, 11 = D(\omega_0)$$



$$\omega_7 = D(\omega_0) = \# \alpha, 1, 010 \# \alpha, 10, 010 * \alpha, 11, 01 \# \alpha, 110, 11$$



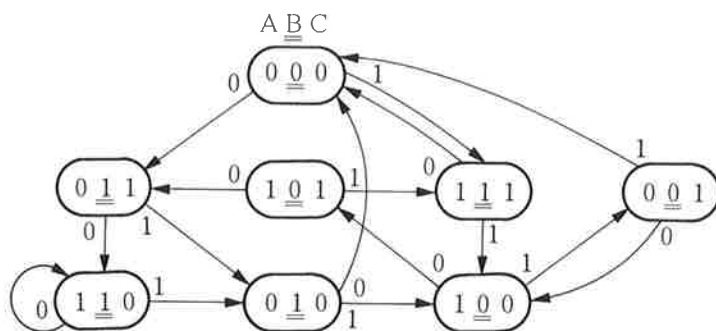
$$\omega_s = DL(\omega_0) = \# \alpha, 1, 010 * \alpha, 11, 01 \# \alpha, 1, 01 \# \alpha, 110, 11$$



5. 多オートマトン系の機能、性能行動と選択

状態遷移図は多オートマトン系の機能や性能を殆んど完全に表現しているが、素子数が多くなると把握不可能になる。

例としてあとページにあげた最初の例 $\varphi(\omega) = M$ の遷移図を描く。



さて実際の神経系はそれを持つ生物が環境に適応したときに保存される。すなわち何らかの基準で "良い" 回路が残ってゆく。

ここで "良い" 多オートマトン系とは何か？という選択の基準が問題になる。これは見方によって種々様々なものがある。

ここで1例として出力に影響を与える状態数が多いものを取り上げる。出力に影響を与える状態の集合を K と書く。

$s \in K \Leftrightarrow \{\exists s' \mid s \text{ は初期状態から到達可能で}$

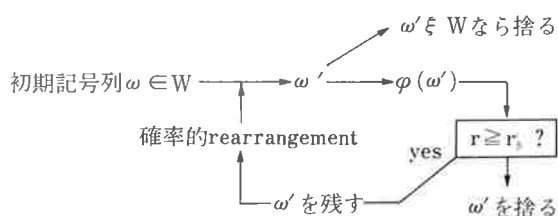
$s' \text{ は } s \text{ から到達可能で, かつ}$

$s \text{ の出力} \neq s' \text{ の出力} \}$

系の素子数を N とするとき, (2 状態素子だから) 率 $r = |K|/2^N$ を良さの基準とする。

ここで $0 \leq r \leq 1$. 上の例では $N = 3|K| = 8$ だから $r = 1$, 3 ページの ω_1 については $\varphi(\omega_1)$ の r は $1/2$ 以下である。

6. 進化の過程



この過程を繰返すことにより記号列の群が出来て r の大きいものになってゆく。

$\varphi(\omega)$ について他の機能に着目すれば, その機能について良い ω が残されてゆく。

7. むすび

- (i) ω_0 に f を繰返し施こして良い ω を得るが f の回数を考慮する必要がある。
- (ii) 多オートマトン系の一次元符号化の他の可能性
- (iii) 素子の進化と回路の進化の関係
- (iv) 生物学とオートマトン理論

膜振動におけるリミットサイクルの可能性

品川 嘉也 (京大・医)

小腸刷子縁膜小胞, 赤血球などにみられる D-Glucose のオーバーシュート・アップテイクが, 膜振動の一種とみなせることを示し, 非電解質の膜透過に際して膜振動がおりうることを, リミットサイクル振動のおこる可能性があることを報告した。

初めに, 2・コンパートメント-2 流束系では overshoot uptake は不可能であることを示した。従来, 膜振動として知られているのは 2・コンパートメント-3 流束系であるが, 3・コンパートメント-2 流束系でも膜振動がおりうることを示した。

赤血球の D-Glucose uptake に伴って著明な容積増加がみられることを筆者らは見出し
ているが、これは容積流と溶質流の連結を示している。この二つの流束と、膜相と、細胞
内外の液相の三相により 3・コンパートメント-2 流束系が構成される。この系は微分方程
式

$$\left. \begin{aligned} \frac{dv}{dt} &= L \left(\Delta P - c_n + \frac{X}{V} + \sigma \frac{S}{V} - \sigma C_e \right) \\ \frac{ds}{dt} &= \omega \left(\frac{C_e}{K + C_e} - \frac{S/V}{K + S/V} \right) + \bar{C}_s (1 - \sigma) \frac{dv}{dt} \end{aligned} \right\}$$

で表わされる。膜内の平均溶質濃度 $\bar{C}_s$ が大きいときリミットサイクル振動の可能性がコ
ンピュータ・シミュレーションによって示される。

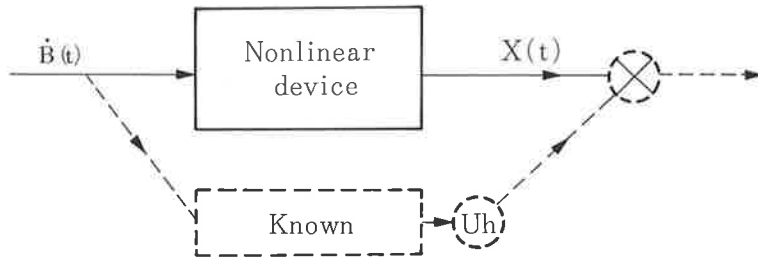
本報告に対して久保泉 (名大・理・数学) より「コンピュータの補助による数学的証明法」
によりリミットサイクルの存在が数学的に証明できるはずであるとのコメントがあり、 $\bar{C}_s$
が定数である場合、 $\bar{C}_s$ の適当な大きさに対して平衡点から拡って行く解があることが数学
的に証明できる。これに対して、外側から巻き込んで来る軌道の存在がコンピュータによっ
て示されれば、内側から拡がる軌道は外側の軌道によって制限されるので、同じリミット
サイクルに巻きつくことになる。よって、この型の微分方程式にリミットサイクルが存在
することが証明される。

尚わこの型の非線型連立微分方程式は、 S/V および $1/V$ という簡単な非線型項を持つ
だけで非線型振動を示し、リミットサイクルを持つことは興味深い。

Wiener 展開

飛田 武幸 (名大・理・数学)

次の図のような単純な非線型システムのモデルを考える (実線による図)。



ここに $\dot{B}(t)$ はホワイトノイズ input で $X(t)$ は output である。モデルの性格から

$$X(t) = f(\dot{B}(s); s \leq t, t)$$

とかける。

$\{\dot{B}(t)\}$ を与え $\{X(t)\}$ が観測されたとして、未知の nonlinear device を同定することを考える。**Wiener 展開**はその一つの有力な方法を提供している。

1) まず $X(t)$ を

$$X(t) = \sum_n X_n(t), \quad X_n(t) \in H_n,$$

と分解する。ここに H_n は n 次重複 Wiener 積分からなる空間である。

2) 一般に H_n の要素には対称な n 変数の関数 (kernel) が対応する。従って $X_n(t)$ をきめるには、 t に依存した kernel を具体的に求めればよい。

3) kernel の求め方は、上図のように、既知のシステムを用意し、破線で示したように設置して correlation を求めることに帰着される。

これが標題に言う Wiener 展開の方法である。

普通は定常の場合は扱うので、 $X_n(t)$ に対応する kernel は

$$F(u_1 - t, u_2 - t, \dots, u_n - t)$$

と表わされ、さらに $X_n(t)$ が $\dot{B}$ の t 以後の値に関係しないことから、

$$\text{ある } u_j > 0 \text{ なら } F(u_1, u_2, \dots, u_n) = 0 \text{ となる。}$$

以上は理論的な考察であるが、具体例に応用する場合には次のようなことに留意しなければならないであろう。

i) 上記 3) の段階で、必要とする既知の非線型システムは無限個必要である。実際に無限個を論ずるのは意味がない。従って、何かある定性的、あるいは経験的な理由から有効な有限個を指定することが大切である。

ii) 理想的な (数学的な) input である $\dot{B}(t)$ は flat なスペクトルをもつ、これも実際には不可能なことであり、有界な band で flat スペクトルをもつもので代用することになる

う。たとえば, band が $[-W, W]$ なざば, 時間間隔 $\frac{\pi}{W}$ 毎に独立な情報が出現することになる。W が大きく, F が滑らかなら十分良い近似が得られるであろう。

Wiener 展開は Hermite 多項式に依存した話である。すなわち input がガウス型であることによって。B(t) の近似には, band のみならず, 分布がガウス分布に近いか否かにも関係するので, この点留意する必要がある。

ポアソン過程の汎関数

伊藤 嘉房 (名古屋大学・医療技術短大)

非線形ブラウン汎関数の Wiener-Itô (伊藤 清) 分解はいまや生物学・物理学・工学などの広い分野で一般的に取り入れられた方法となっている。非線形ポアソン汎関数についてもほぼ同様である。Wiener-Itô 分解の各項の核は Lee-Schetzen の方法, すなわち Cross-Correlation によって決定されるがこれは唯一の方法ではない。実用化には若干の問題があるが Wiener 自身 Laguerre Net-work による方法を提唱している。ここではさらに別の方法があることを示したい。

飛田は Hida-Ikeda (1960) によって導入された T-変換を通じて, 非線形ブラウン汎関数のブラウン運動による偏微分概念を導入した (Hida (1978) Analysis of Brownian functionals)。同様の方法で非線形ポアソン汎関数の偏微分を導入することができる。

$$\frac{\partial}{\partial P(t)} = U^{-1} \frac{\delta}{\delta e^{i\epsilon}} U.$$

ここに U-変換は T-変換を若干変更したものである。ところがこの微分作用素は飛田の方法を忠実に見習って導入されたにもかかわらず, ポアソン過程の特殊事情が反映して差分作用素になっている:

$$\frac{\partial}{\partial P(t)} \varphi(P) = \varphi(P + \delta_t) - \varphi(P).$$

非線形ポアソン汎関数 φ の Wiener-Itô 分解の第 n 次の項 φ_n に対して, 核 $F_n \in \hat{L}^2(R^n)$ があって

$$(U\varphi_n)(\xi) = f \cdots f F_n(u_1, \dots, u_n) \prod_{j=1}^n (e^{is(u_j)} - 1) du, \dots du_n$$

となる。逆に F_n が与えられれば φ_n が求まる。 F_n は上記の微分作用素を用いて

$$F_n(u_1, \dots, u_n) = \frac{1}{n!} E \left[\frac{\partial^n}{\partial P(u_1) \cdots \partial P(u_n)} \varphi \right]$$

によって得られる。右辺は実験的に求まる量である。

この方法による Wiener 核の決定は実用上経済的と思われる。以上はポアソン過程の言葉を用いて述べられているが、ブラウン汎関数についてもほぼ同様のことが云える。

生物集団社会に共通してみられる分布

寺本 英 (京都大学・理)

正規分布以外で広い対象について共通してみられる分布関数といえば、ある国における個人所得の分布に関する経済学での Pareto-Lévy の法則, Auerbach のある国での都市の人口の分布, Condon らによって議論されてきた単語の使用頻度分布, 属に含まれる生物種の数の分布 (Willis, Yule), 種に属する個体数の分布 (Fisher, 元村ら) などが挙げられるがこれらは対象は全く違うけれども極めて似た性質をもった分布である。

とくに社会現象に関連してみられるこれらの分布パターンについて, Zipf は「Human Behavior and the Principle of Least Effort」という著書の中で一般的な議論を試みている。こうした分布の一般的にみられるという事実を, Zipt の法則とよぶ場合がある。

こうした分布の一般性を, 正規分布に対する中心極限定理の様に, 確率論的基礎を探索しようという試みがいろいろなされているが, ここでは生長する集団のコロニーに対する確率過程を考えて, 主として生物社会現象にみられる共通したメカニズムとして, この分布が導かれることを示した。

脈管系のコンプライアンス

磯貝 芳徳 (京都府立医科大学)

脈管内への輸液あるいは輸血は, 血圧および血液の膠質浸透圧の変化を惹起し, ひいては毛細血管における水分の有効濾過圧の平衡を崩して血液-間質液間に水分移動を起こす。この水分移動量の連続的な観測とその理論的な解析から, 1981 年の当研究集会において, 我々は脈管系のコンプライアンス, 特に delayed compliance の持つ意味について報告した。このとき提唱した delayed compliance を表現する方程式を拡張し, より広い現象に適用できるようにしたので, 今回はその結果について報告する。

これまで我々は犬を用いた循環血液量，血液膠質浸透圧，動脈圧および静脈圧の連続測定法の開発，さらにこの測定法を用いた一連の実験結果について報告してきた。これら実験結果中最も特徴的な事柄を図-1に破線で示す。図-1(a)は時間0より10分間，一定の速度で輸液を行った場合の循環血液量，中心静脈圧および血液膠質浸透圧の時間変動の様子を示す。図-1(b)には同じ条件下での循環血液量と中心静脈圧の変動の相関を示す(P-V図)。循環血液量と中心静脈圧の変動にヒステリシスが見られる点は注目に値する。これは血管壁の力学的性質として弾性のみならず粘性をも考慮しなければならないことを示唆している(Delayed compliance)。Delayed complianceを持つ血管壁の力学的性質の表現にはレオロジーの分野で用いられるMaxwell要素を借用し，血管系と間質系の間の水分移動はスターリングの仮説に従うものとして系の挙動を一連の連立微分方程式で表現し，simulateした結果を図-1の実線で示す。(文献(1)参照)

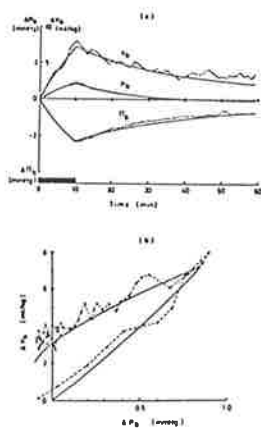


図 1

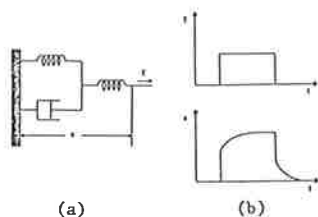


図 3

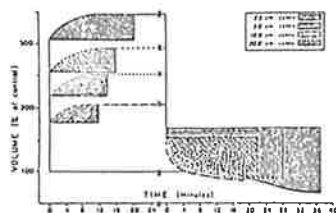


図 2

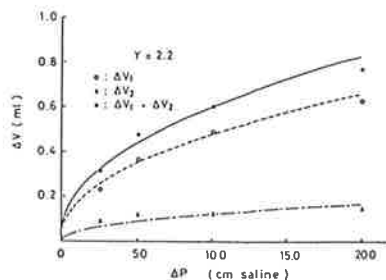


図 4

同じように血管系の delayed compliance を調べた Porciuncula ら²⁾の結果を図-2 に示す。彼らは血圧の急速な変動に対する血液量の変化を追跡し (上記の我々の系では逆に血液量が入力で血圧が出力であった点に注意), 図に示すような緩和現象を観測し, delayed compliance の重要性を示した。我々が delayed compliance を表現するモデルとして採用した Maxwell 要素では, 圧力を入力とし体積を出力とする彼らの実験結果を説明することはできない。圧力を一定に保つ限り Maxwell 要素の dashpot は伸び続け決して定常値に落ち着かないからである。

図-3(a)はこの矛盾を解消すべく新たに導入した delayed compliance のモデルである。(b)には血圧を入力とし血液量を出力とした場合の入力と出力の様子を示す。図-3(b)は Porciuncula らの結果 (図-2) と良く似ている。このモデルが定量的にも彼らの結果を良く表現していることを図-4 に示す。この図には急速な血圧上昇に伴う血液の増加量 (ΔV_1) とその後粘性によって増加した血液量 (ΔV_2) およびそれらの和 ($\Delta V_1 + \Delta V_2$) を血圧上昇量の関数としてプロットしてある。図中の各曲線は図-3(a)のモデルの示す挙動である。理論と実験は良い一致を示している。ただしこの simulation の際, 図-3(a)に示す各バネは非線型のバネであり変位の巾乗 (2, 2 乗) に比例する張力を発生するものとした。

以上より図-3(a)に示す系は血管系の delayed compliance を表現するモデルとして適当なものであると考えられる。さらに血管壁の伸長に伴う張力の発生には非線型の要素を考慮しなければならないことを示したものとする。

文献

- 1) Isogai, H. Nose, K. Miki and T. Morimoto, J. Theor. Biol. (1983) 100, in press.
- 2) C.I. Porciuncula, G.G. Armstrong, Jr., A.G. Guyton and H.L. Stone, Am. J. Physiol. 207, (1964) 728.

神経回路網における線形, 非線形信号伝導

中 研一 (基生研)

櫻永 昌徳 (日本医科大学)

神経回路網は信号の複雑な処理装置である。これまで, この神経回路網の研究は2つの時期を経て来た。それらは, 回路内の信号処理を, EPS 及び IPSP の単純な組み合わせにより説明しようとした時期であり, それに続くのは, これらの EPS 及び IPSP に関与する伝導物質の研究から主流となった時期である。伝導物質及びその機構は薬理学上からも重要

であり、臨床にも応用されている。然し、神経回路網内の信号処理から伝導物質により説明されると考えるのは、EPSP 及び IPSP の単純な組合わせにより、精神を説明しようとするのに似た単純化に過ぎない。回路内の情報処理は、回路が電算機にせよ、神経回路にせよ、信号伝導の問題として取り扱われるべきである。神経生理学は、研究方法・測定技術の進歩とともに進歩して来た。ガルバノメーター、オシロスコープなどはその良い例である。現在、最も技術的に進歩しているのは情報処理である。今日利用出来る最新の信号解析技術を用いて、これまでの古典的な生理学上の考えにわずらわされることなく、神経回路内の信号伝導様式を数学的又は、工学的な方法・概念上より表現することは、神経生理学の新しい分野ではなかろうか。

この様な立場から、我々は 1968 年以来、脊椎動物網膜内の感覚処理情報機構を研究して来た。材料はアメリカナマズ、*Ictalurus punctatus* である。この材料は年間を通して安定し、網膜は簡単な構造を有し、また我々が視覚生理の材料として、独占的に使用して来たものである。この網膜内細胞の構造、機能に関しては、光受容器を除いては、最も綿密に研究されたと考えている。方法は、入力と出力の相関により伝導関数を求める。これもまた、我々のグループが、ほぼ独占的に用いている方法である。この様に 10 数年にわたり、独占的な材料と方法を用いて研究を行った例は、生理学でも稀であろう。方法は、Wiener 非線形解析と呼ばれ、一般には、Winer/Volterra 法とも云われる。近年各分野で応用され始め、これに関する教科書も数編あらわれた。本日は、これに関する最近の結果を報告する。

生理学と連続系シミュレータ

臼井 支朗 (豊橋技術科学大学)

生体の複雑で高度なメカニズムを解明・記述する上でシミュレーション技術の果たす役割は大きい。とくにその動的神経機構の基本的特徴はフィードバックを含む非線形な時変系にあると考えられ、種々の生理実験を通して得られる分析的研究だけではなかなか解明し難く、少くとも筆者の思考レベルをはかるかに越えていると云わざるを得ない。そこで、実験データをもとに関連する種々の知識や情報とほのかなひらめきを総合しながら、それらを合成していく手法が考えられる。

H-H 等のするどい、深い洞察力とたくみな技法により神経興奮膜生理は数理的現象論モデルとして記述され、生理学に著るしい進歩発展をもたらした。彼らが 30 年前 (./), ど

んな経過をたどってそこまで到達したかよく知らないが全く美事としか云いようがない。

さて、こうした研究を進めていく上で、チラチラ浮ぶおぼろげな対象のモデルを何とか数理的に記述し、動かしてみ確認しながら試行錯誤的に改良発展させていくことが大切であろう。ここでは、こうした背景の下に開発した会話形連続系シミュレータ^{1,2)}の概要を簡単に述べ、網膜生理研究への適用例を示す。

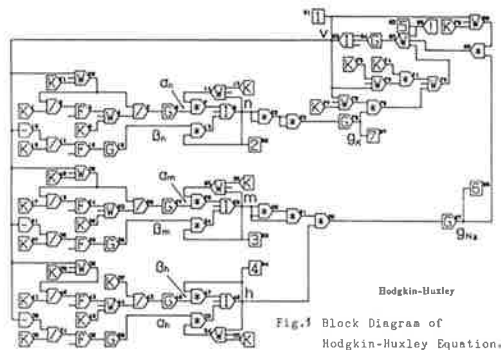
会話形連続系シミュレータ：Σ

Σはいわゆるアナログ・コンピュータをソフト的に実現した Fortran プログラム (約 13,000 ステップ) であり、とくに会話形使用に重点をおいて開発された。要は思ったことがすぐ記述入力でき、結果をすぐグラフィックにより見せてくれるものである。演算はすべて数値計算により行なわれ非線形な時変動的多次元システムまで適用できる。

例 1. H-H 方程式

図 1 は H-H の神経興奮モデル³⁾をΣで記述したもので式中のパラメータ、変数間の関係、モデルの構造などがトポロジカルに把握できる。図中 G は係数器、I は積分器、K は定数、W は重みつき加算器、* は乗算器、/ は割算器、四角の番号は観測スコープである。同図がそのまま画面上に表示され接続を変更したりパラメータを変えたり会話的にできる。

図 2 にシミュレーション結果の一例を示す。



$$I = C_m \frac{dV}{dt} + g_{Na} m^3 h (V - V_{Na}) + g_{K} n^4 (V - V_K) + g_{L} (V - V_L)$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n (1-n) - \beta_n n$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m (1-m) - \beta_m m$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h (1-h) - \beta_h h$$

$$\alpha_n = 0.01(10 - V) / \left[\exp\left(\frac{10 - V}{10}\right) + 1 \right]$$

$$\beta_n = 0.125 \exp(-V/80)$$

$$\alpha_m = 0.1(25 - V) / \left[\exp\left(\frac{25 - V}{10}\right) + 1 \right]$$

$$\beta_m = 4 \exp(-V/18)$$

$$\alpha_h = 0.07 \exp(-V/20)$$

$$\beta_h = 1 / \left[\exp\left(\frac{30 - V}{10}\right) + 1 \right]$$

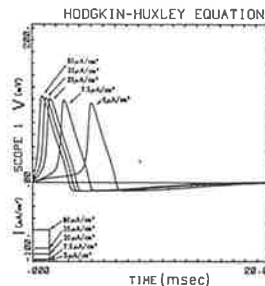


Fig.2 Output for Fig.1,

例 2. 網膜 L 型水平細胞の時空間モデル⁴⁾

従来、網膜 L 型水平細胞はほぼ線形であり、相互の電氣的結合により空間加重特性を示すと云われている。一方、鯉網膜のそれは面積効果 (図 3)、光強度効果 (図 4) に見られるような明確な非線形性を示す。これに対し図 5 の 2 次元離散型減算モデルを考え Σ によりシミュレーションした (図 6)。ここで細胞間結合抵抗 R_c は相互の電位差に依存して切り換わると仮定した。結果は実験データの基本的特徴をよくとらえており、現在この生理学的検証が進められている。

モデルにおいて電流源 I は視細胞からの信号を表わし、光入力 $L_i(t)$ に対し次式で与えられるとした。

$$\frac{d^2}{dt^2} I_i(t) = -a \frac{d}{dt} I_i(t) - b I_i(t) + L_i(t).$$

また円形スポット光刺激の場合、中心水平細胞から等キョリにある細胞群は全ての同一の応答をもつとしモデルを 1 次元化した。その時、各細胞群間の電位関係は次式で与えられる。

$$\frac{dV_n}{dt} = \frac{1}{C} I - \frac{1}{CR} V_n - \frac{1}{CR_c} (V_n - V_{n-1}) - \frac{n+1}{n} \frac{1}{CR_c} (V_n - V_{n+1}),$$

$$\frac{dV_0}{dt} = \frac{1}{C} I - \frac{1}{CR} V_0 - \frac{6}{CR_c} (V_0 - V_1)$$

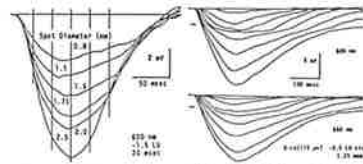


図 3. 面積効果: on-off 応答
フェーズが一致する。

図 4. 光強度効果: 光点のレベル
にくびれが見られる。

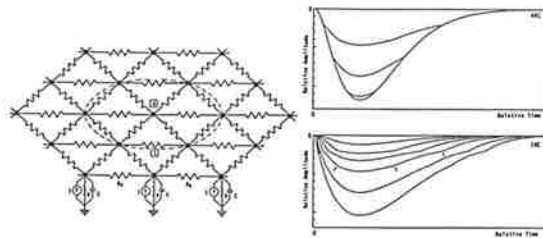


図 5. 水平細胞の 2 次元離散型空間計算モデル。図 6. モデル応答: 面積効果 (上)、光強度効果 (下)

文献

- 1) 臼井他：会話形グラフィック連続系シミュレータ，情報処理 Vol.19(11)，1072-1078 (1978)。
- 2) 松田・臼井：ミニコンによる会話形連続系シミュレータ，一生物システムモデリングへの応用一，信学技報 MBE 81-57，75-82 (1981)。
- 3) 松本：神経興奮の現象と実体（上），丸善 (1981)。
- 4) Usui et al：Discrete nonlinear reduction model for Horizontal cell Response in the Carp Retina, Vis. Res. (in press)。

反応拡散系における空間周波数同調

倉田 耕治 (東京大学・工)

1. はじめに

2 個の自励振動子を結合した時に，振動子の周期がほぼ同じであると，相互作用のため，位相差が固定され，その結果周期がぴったり等しくなってしまう事がある。これは位相同調又は周波数引き込みと呼ばれ，生体内の様々な場所に見られる現象である。

筆者は，一様で定常な場に生ずる定常空間周期解や周期進行波解についても同様に空間的な周波数引き込みの現象が起こるのではないかと考え，2 個の反応拡散系が弱く結合された場合に周期進行波解が相互に及ぼす影響について研究した。

2. 位相方程式

Ermentrout (1981) は，2 個の弱く結合した自励振動子を，マルチスケール摂動法を用いて研究し，位相のゆるやかな変化を近似的に記述する位相方程式を求めた。筆者は，同様の方法を反応拡散方程式の周期進行波解に対して適用する事により次の結果を得た。

2 個の反応拡散方程式，

$$\frac{\partial}{\partial t} U_i(x, t) = D_i \frac{\partial^2}{\partial x^2} U_i + F_i(U_i), \quad i=1, 2$$

が，それぞれ速度 C の安定な周期進行波解を持っていたとする。(以後速度 C の動座標系をとる)。

$$D_i \Phi_i''(x) + C \Phi_i' + F_i(\Phi_i) = 0, \quad \Phi_i(x+L) = \Phi_i(x),$$

$$i=1, 2 \quad (2, 1)$$

2 個の系を弱く結合して，

$$\frac{\partial}{\partial t} U_i = D_i \frac{\partial^2}{\partial x^2} U_i + F_i(U_i) + C \frac{\partial}{\partial x} U_i + \varepsilon H_i(U_1, U_2),$$

$$i=1, 2, |\varepsilon| \ll 1,$$

とした時の解が、(2, 1) 式の Φ_i を使って、

$$U_i = \Phi_i(x + \varphi_i(\xi, \tau; \varepsilon)) + \varepsilon \tilde{U}_i(x, \tau; \varepsilon),$$

$$i=1, 2$$

と表わされたとする。ここに $\xi = \varepsilon x$, $\tau = \varepsilon t$ で、それぞれゆっくり変化する空間変数、時間変数である。 $\varphi_i(\xi, \tau; \varepsilon)$ は位相の変化、 $\tilde{U}_i(x, \tau; \varepsilon)$ は Φ_i からの波形の歪みを表わしている。このとき、 $\tilde{U}$ が x に関して近似的に L 周期関数である事を用いると、次の形の位相方程式を導く事ができる。

$$\frac{\partial}{\partial t} \varphi_i(\xi, \tau) = k_i \frac{\partial}{\partial \xi} \varphi_i + G_i(\varphi_i - \varphi_2), \quad i=1, 2 \quad (2, 2)$$

ここに $G_i(\theta)$ は L 周期関数である。この方程式は、解の位相のゆるやかな変化を記述している。

3. 大域的位相同調解

(2, 2) 式は $a = G_1(\Psi) = G_2(\Psi)$ が成立つ時、その時に限り

$$\varphi_1 = a\tau, \quad \varphi_2 = a\tau - \Psi \quad (3, 1)$$

の形の解を持つ、この解は、どの場所で見ても2個の系の解の位相差が一定である。これを大域的位相同調解と呼ぶ事にする。この解の安定性について、次の定理を得た。

定理 1

$$k_1 \neq k_2, \quad G_1'(\Psi) < 0 < G_2'(\Psi)$$

ならば、解 (3, 1) は安定である。

4. 位相差のパルス状進行波解

位相差が、パルス状に伝わって行き、パルスの前後で、位相差がちょうど1周期ずれる解の速度を、定理1の条件下で調べた。(2, 2) 式は速度 C_p の動座標系で書くと、

$$\frac{\partial}{\partial t} \varphi_i = (k_i - C_p) \frac{\partial}{\partial \xi} \varphi_i + G_i(\varphi_i - \varphi_2), \quad i=1, 2 \quad (4, 1)$$

パルス状進行波解は、上式の解のうち、次の形をしたものである。

$$\varphi_i = a\tau + v_i(\xi), \quad i=1, 2$$

但し $v_1(\xi) - v_2(\xi) \rightarrow L + \Psi (\xi \rightarrow \infty)$

$$v_1(\xi) - v_2(\xi) \rightarrow \Psi \quad (\xi \rightarrow -\infty)$$

この解の進行速度 C_p は、

$$C_p = \frac{k_2 G_1'(\Psi) - k_1 G_2'(\Psi)}{G_1'(\Psi) - G_2'(\Psi)}$$

で与えられ、

$$\min(k_1, k_2) < C_p < \max(k_1, k_2)$$

が成立つ事がわかった。また、パルス状進行波解の存在については、次の定理を得た。

定理 2

次の 2 つの条件が満たされる時、パルス状進行波解が存在する。

i) ある Ψ について $G_1(\Psi) = G_2(\Psi) = a$

ii) $\frac{G_1(\theta) - a}{C_p - k_1} \geq \frac{G_2(\theta) - a}{C_p - k_2}, 0 \leq \theta < L$

但し、等号成立は $\theta = \Psi$ の時に限る。

5. 位相差の周期進行波解

位相差の変化が、一定の間隔で、次々と伝わって行く形の解を調べる。そのような解は (4, 1) 式の解として次のように表わされる。

$$\varphi_i = b\tau + v_i(\xi), i=1, 2(5, 1)$$

但し $v_1(\xi + L_p) = v_1(\xi) + L + \alpha,$

$$v_2(\xi + L_p) = v_2(\xi) + \alpha.$$

この形の解の存在に関して次の定理を得た。

定理 3

$$\frac{G_1(\theta) - b}{C_p - k_1} > \frac{G_2(\theta) - b}{C_p - k_2}, 0 \leq \theta < L$$

ならば、速度 C_p の周期進行波解が存在する。

6. おわりに

ここでは、反応拡散系に限って話を進めたが、同様の現象は他の多くの一様で定常な系で存在すると思われる。さらに一般的な系について、この理論を拡張する事は今後に残された課題である。また、第 4 節第 5 節で示した解の安定性についても研究を進めたい。

文献

G.B. Ermentrout "m : n Phase-locking of weakly coupled oscillators" J. Math. Biol. Vol. 12 (1981) 327-342

Hodgkin-Huxley 方程式とカオス

合原 一幸 (東京大学・工)

神経膜の膜電位は、環境 (膜内外液のイオン組成など) に応じて、自励発振状態¹⁻²⁾や多重定常状態³⁾等、様々な挙動を示す。本研究は、自励発振状態にある神経膜に、外部から周期的な電流刺激を加えた際の、膜電位の挙動について解析したものである。⁴⁻⁵⁾解析には、Hodgkin-Huxley 方程式⁶⁾を使用し、また、刺激は正弦波電流 $A \sin(2\pi ft)$ とした。

振幅 A 及び入力周波数 f の変化に伴ない、種々の非線形振動を生じる。入力周波数 f が $N \cdot f_n$ (但し、 N : 自然数, f_n : 自然発振周波数 = 174.6 Hz) に近い場合、 $1/N$ 分数調波の引き込みを生じる。入力周波数 f を、 $N \cdot f_n$ より離していくと、ある臨界周波数で引き込みがはずれ、多重周期振動及び chaotic な振動を生じる。 $1/N$ 分数調波の引き込み、多重周期振動及び chaotic な振動は、 $1/f$ 毎のストロボ写像の ω 極限集合が、各々、 N 点、不変閉曲線及びストレンジアトラクタから成ることにより区別される。ストレンジアトラクタの 1 例を図 1 に示す。図 1-(b)より、図 1-(a)の曲線が、実は微細な構造を持つことがわかる。カオスに至る分岐には、周期倍分岐及びヘテロクリニック点の形成による分岐が観察されている。⁵⁾また、実際のヤリイカ (*Doryteuthis bleekeri*) 巨大軸索膜を用いた実験においても、同様に、chaotic な振動を生じる。⁷⁾

文献

- (1) K. Aihara & G. Matsumoto, J. Theor. Biol. 95, 697 (1982) .
- (2) G. Matsumoto, K. Aihara & T. Utsunomiya, J. Phys. Soc. Jpn. 51, 942 (1982) .
- (3) K. Aihara & G. Matsumoto, Biophys. J. (in press) .
- (4) K. Aihara, T. Utsunomiya, G. Matsumoto & H. Hoshino, Proc. World Congress on MPBE, 2. 34 (1982) .
- (5) K. Aihara, G. Matsumoto & Y. Ikegaya, submitted to J. Theor. Biol.
- (6) A.L. Hodgkin & A.F. Huxley, J. Physiol. 117, 500 (1952) .
- (7) G. Matsumoto, K. Aihara, M. Ichikawa & A. Tasaki, submitted to J. Theor. Neurophysiol..

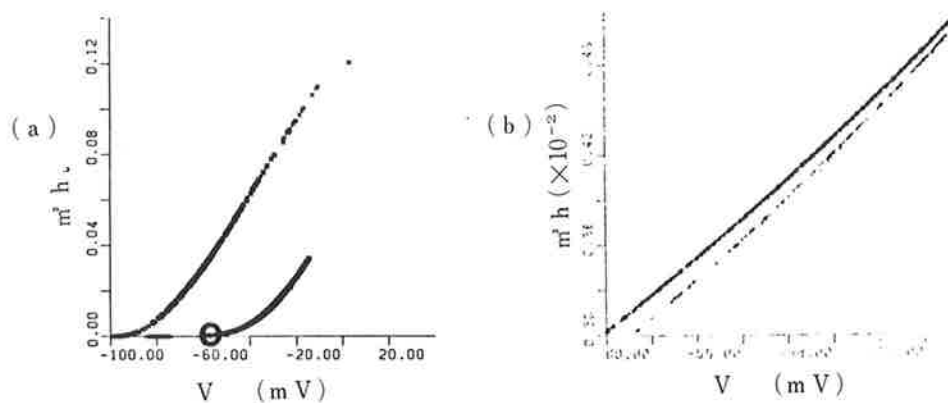


図1 Hodgkin-Huxley 方程式におけるストレンジアトラクタ ($A=100.0 \text{ MA/cm}^2$, $f=300.3 \text{ Hz}$). 但し, (b)は(a)の丸印内を拡大したもの. V : 膜電位, m^3h : 正規化した Na コンダクタンス.

『脳一腸軸の生理学』

昭和 58 年 2 月 22 日

小 林 繁：脳腸ペプチド分泌細胞の形態
矢内原 昇：免疫活性 Met-Enkephalin-Arg-Gly-Leu について
斎 藤 篤 志・斎 藤 敏 之・松 本 武 久・菅 野 富 夫
： Gut-brain peptide としての CK と bombesin
山 下 博：神経分泌細胞の電気生理学的性質とペプチド感受性
菅 野 富 夫：腸一脳軸：血液内液性情報の中樞神経への伝達

世話人 亘 弘

脳腸ペプチド分泌細胞の形態

小林 繁 (山梨医科大学)

「脳腸ペプチド分泌細胞の形態」に関連して、イヌ十二指腸の Mo 細胞と、小脳 Purkinje 細胞および下垂体中間葉の内分泌細胞に検出されるモチリン様免疫活性について組織化学的に詳しく検討した。

Bouin 液で固定した組織を用い非標識酵素抗体法で免疫組織化学反応を行なった。抗モチリン血清は矢内原昇教授らがブタモチリンで感作したウサギから得た 3 種類 (R 1104, R 1105, R 1106) と、同様にモルモットで作製した 1 種類 (GP 2803) である。倍々希釈法を使った吸収試験法を開発して、モチリン様免疫活性の吸収に必要な抗原の最少量の決定を試みた。なおこの実験ではことわらないかぎり磷酸緩衝食塩水を用いた。

十二指腸 Mo 細胞 R 1104, R 1105 および R 1106 による陽性反応は、1000 倍希釈ではそれぞれ 0.1×2^{-11} , 0.1×2^{-9} , 0.1×2^{-11} mg/ml のモチリン (1—22) で吸収される。C 端分節 (7—22) では 0.1×2^{-8} , 0.1×2^{-6} , 0.1×2^{-4} mg/ml で吸収されるが、N 端分節 (1—17) の添加では変化しない。GP 2803 (1/1000) による陽性反応はモチリン (1—22, 0.1×2^{-5} mg/ml) と N 端分節 (1—17, 0.1×2^{-5} mg/ml) で吸収されるが C 端分節 (7—22) では変化しない。**小脳 Purkinje 細胞** 小脳 Purkinje 細胞の陽性反応は濃い抗モチリン血清 (1/100) で出現する。R 1105 で最も強い。またトリス塩酸緩衝液の使用で増強される。

小脳 Purkinje 細胞のモチリン様免疫活性はモチリン (1-22) およびその分節 (1-17, 7-22) で吸収されない。

下垂体中間葉の内分泌細胞 下垂体中間葉の内分泌細胞は R 1105, R 1104 および R 1106 で着色する。このうち R 1105 を高濃度で使用した場合に陽性反応は最も強い。R 1105 (1/1000) の陽性反応は 0.1×2^{-10} mg/ml のモチリン (1-22) および 0.1×2^{-14} mg/ml の C 端分節 (7-22) で吸収されるが、N 端分節では変化しない。

以上の所見に基づいて、それぞれの細胞が含むモチリン様免疫活性を評価した。“Immunohistochemically demonstrable motilin-like material” の概念を導入し、免疫組織化学反応の “Characterization” の有効さと必要性を主張した。

ここで紹介した実験は内田隆，大橋正，下瀬川徹の協力の下でなされた。

免疫活性 Met-Enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸-OH について

矢内原 昇 (生理研)

CDNA ヌクレオチド構造の解析により明らかにされた。ウシおよびヒト副腎髄質 preproenkephalinA は、7つの Met-あるいは Leu-Enkephalin アミノ酸配列を含む特徴ある構造である。この大分子型前駆体のプロセッシングにより生成する内因性 Enkephalin 類として、Met-Enkephalin, あるいは Leu-Enkephalin のみならず、Met-Enkephalin の C 端に Arg-Phe を延長したヘプタペプチドや Arg-Gly-Leu をもつオクタペプチドの存在することが明らかにされている。本研究は、preproenkephalinA のプロセッシングを免疫化学的手法により解明することを目的とし、Met-Enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ オクタペプチドにつき合成品をもちいて特異ラジオイムノアッセイ系を確立し、ラット組織内免疫活性の分布および存在様式を検討した。

本研究で用いた Met-Enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸-OH およびその関連ペプチドは液相法により合成した。抗血清は合成 Met-Enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸-OH をハプテン抗原とし、水溶性カルボジイミド存在下、アスカリスたんぱくと結合したものを抗原として、家兎に注射免疫し作製した。標識抗原は Met-Enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸-OH をクロラミン T 法により ¹²⁵I 化し、ゲル濾過にて精製した。

RIA は標準希釈溶液として 0.5% BSP, 25 mM EDTA, 0.14 M 食塩を含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用い、48 時間反応後、デキストラン炭末法によって B/F を分離する方法により行なった。なお、本研究でえられた抗血清 R-0171 は、最終希釈濃度 56,000 倍

で RIA に使用可能であった。最小検出限界は 2.5~5 pg/tube であった。抗血清 R-0171 は Met-Enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸-OH の 4~6 位を認識部位とし、Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin のいずれとも交差反応しない。オクタペプチド配列に特異性の高いものであった。すなわち、本 RIA により生体内に存在する他の各種 enkephalin, endorphin 同族体との分別定量が可能であることを示した。

つぎに、本 RIA 系をもちいて組織内 Met-Enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸-OH 様免疫活性を測定した。ラット組織内の免疫活性の分布について検討した結果、免疫活性は消化管に広く分布し、特に十二指腸粘膜抽出物が最も高値を示し、次いで空腸および回腸粘膜抽出物もかなりの高値の免疫活性が認められた。また、中枢神経系では視床下部、脊髄が高値であった。

組織中、免疫活性の分子存在様式を検討するため、最も高免疫活性を示した十二指腸粘膜および筋層抽出物を Sephadex G 50 superfine にてゲル濾過を行なった結果、粘膜、筋層抽出物ともに分子量約 5,000 および約 2,000 に相当する溶出位置に免疫活性の鋭いピークが認められた。一方、視床下部についても同様にゲル濾過を行なったところ、分子量約 5,000 の溶出位置に免疫活性の鋭いピークその他、分子量約 2,000 の位置のピークは認められず、¹²⁵I-Met-Enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸-OH に相当する溶出位置に小さなピークがみられた。以上の免疫活性のゲル濾過による検討から、消化管と中枢神経系における preproenkephalinA のプロセッシングの相違が示唆された。すなわち、ラット十二指腸では Met-Enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸-OH オクタペプチドの生成はなく、むしろこれを C 末端とする 5 K ダルトンのペプチドが生成することをはじめて明らかにした。また、オクタペプチドを C 端、あるいは N 端とする 2 K ダルトンペプチドの生成が示唆された。一方、ラット視床下部においては、5 K ダルトンのペプチドが主成分であるが、明らかに Met-Enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸-OH オクタペプチドも生成することを示した。なお、十二指腸にみられた 2 K ダルトン成分の生成は全く認められず、そのプロセッシングの相違が明らかであった。

以上、本研究において確立した Met-Enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸-OH オクタペプチドアミノ酸配列に特異的なラジオイムノアッセイは、生体内微量成分測定にも充分な高感度を持ち、その高い特異性により preproenkephalinA のプロセッシングの過程を追跡するに有用な測定系であることを証明するとともに、本測定系により Enkephalin 類は共通の大分子型前駆体から各臓器において特異的なプロセッシングを受けて生成することを示唆する結果を得、特異性の高い RIA がペプチド生合成過程の追求に重要な手段となりうることを示した。

Gut-brain peptide としての CCK と bombesin

斎藤 篤志 (帯広畜産大学・獣医)

斉藤 敏之・松本 武久・菅野 富夫 (北海道大学・獣医)

Cholecystokinin (CCK) と bombesin は、消化管にばかりでなく、中枢神経系にも存在することが明らかにされているペプチドであることから、brain-gut peptide 或は gut-brain peptide と呼ばれている。中枢において、これらのペプチドは、中枢神経の特定部位に存在し、脱分極性の刺激により Ca 依存性に放出され、特定の部位に特異受容体を持ち、種々の中枢作用を持つばかりでなくこれらペプチドを分解する酵素の存在することもしだいに明らかにされてきていることから、これらのペプチドは神経伝達物質、或は神経調節因子としての役割をになっている可能性が十分に予想される。本研究は、末梢血流中のこれらのペプチドが、末梢における作用の他に中枢神経系にも作用することを明らかにしたものである。

ウシガエル脳灌流標本をアラビノース (300 mM) で 30 秒間灌流し blood-brain barrier を開かせておいて、CCK-8 (0.1~30 nM) 或は bombesin (3~100 pM) を灌流すると、ウシガエル大脳半球のチトクローム a (a_3), b 及び c+c₁ の redox state (scanning spectrophotometry 法で測定) は、著明に還元方向へ変化するとともに NAD (P) H 蛍光量 (fluorometry 法で測定) にも増加がみられた。また、大脳半球における酸素消費量も増大した。更に、大脳半球の ATP 含量は、CCK-8 (30 nM) 或は bombesin (3 pM) 投与によりそれぞれ対照群 (非投与群) の 155% ($P<0.005$) と 146% ($P<0.001$) に増加したが、灌流停止による窒息状態では対照群の 89% ($P<0.05$) に低下した。

これらの実験結果は、末梢血中の CCK-8 と bombesin が血流を介して、中枢神経系に作用して中枢神経の細胞内呼吸を賦活させることを示すものであり、本来消化管から分泌された gut-peptide が末梢における作用の他に、液性に中枢神経系の機能に関与する "gut-brain axis" の存在することを示唆するものかもしれない。

視床下部一下垂体系におけるペプチドの生理機能

山下 博・河南 洋・稲永 清敏 (産業医科大学)

免疫組織学的研究によって、バゾプレッシンあるいはオキシトシンを含む視床下部室傍核 (PVN) 神経細胞は直接、下部脳幹や脊髄へ投射していることが知られている。我々はこれら PVN からの下行性投射系を電気生理学的に調べた。ラット迷走神経背側核群へ投射する PVN 神経細胞と下垂体後葉へ投射する PVN 神経分泌細胞の比率はほぼ 1 : 1 であること、またネコ脊髄側角へ投射する PVN 神経細胞は非常に少数であることが分った。

脳一腸軸の生理学

菅野 富夫 (北海道大・獣医)

今日、約 20 種のペプチドが、中枢・末梢神経と胃腸膵内分泌細胞とに含まれていることがわかっている。このようなペプチドを脳・腸ペプチドと呼んでいる。これらペプチドの抽出、アミノ酸構造と局在についての研究は急速に進歩してきているが、それらの生理的な役割についての研究は著しく遅れている。脳・腸ペプチドの作用は、中枢・末梢神経の伝達物質候補としての作用、胃腸膵ホルモンとしての作用および中枢神経と胃腸膵の間の情報伝達物質としての作用の三種に大別して考えることができる。これらのうち、第 3 の作用にたいして脳一腸軸という表現が与えられている。これまでの研究によって、胃腸膵ホルモンとしての作用が比較的良好にわかっているため、これらの知見の延長線上で、中枢神経内と脳一腸軸の情報伝達物質としての作用機構を推定してゆこうというのが私の発想である。

胃腸膵ホルモンの作用機構には、古典的な全身性ホルモンとしての作用機構のほかに、下垂体門脈や膵門脈における作用機構、隣接する標的細胞への傍分泌 (panacrine secretion) 作用機構などが含まれている。傍分泌は、ニューロンの化学的情報伝達と区別できない。ニューロンと、胃腸膵ホルモン分泌細胞とは、それらの分泌物質と分泌機構において類似性を示すことから内分泌パラニューロンと呼ばれている。ニューロンの諸性質をパラニューロンの諸性質から類推することができよう。これら細胞の化学的情報伝達形式 (出力) に類似性が認められることは、既に述べた。これら細胞への情報入力形式にも類

似性が想定される。すなわち、ニューロンの基本的入力形式である EPSP と LPSP 発生に加えて、cAMP を介する機構、ミトコンドリアを介する機構、mRNA を介する機構、DAN を介する機構などが想定される。

共同研究者、斉藤の報告にもあるように、我々はウシガエル脳灌流標本の血管灌流液中に胃腸脾ホルモンを加えると、脳のチトクロームが還元方向に移り、酸素消費量が増大することを確認している。このような redox effect は、ミトコンドリアを介する作用を反映しているものと考えられる。さらにこの実験は、血流中の胃腸脾ホルモンが、中枢神経に影響を及ぼす、すなわち腸-脳軸の存在を示唆している。

呼吸中枢における中枢のパターン発生 の機能的構成について

昭和 58 年 3 月 31 日

Curt von Euler

(The Nobel Institute for Neurophysiology, Karolinska Institute)

肋間筋、活動時のアルファ・ガンマー連合、運動抑制におけるガンマーループ等についての全般的な話をされると共に、呼吸運動制御機構を通して従来の呼吸中枢の概念を更新する仮説を提出された。同教授は、日本医学会の招待講演の途次、岡崎によられたものであった。

索引

【ア】

アセチルコリン受容体	15
—モノクロナル抗体	15
アセチルコリン灌流 (胃血管)	10
アセチルコリンチャンネル	70, 77
アミノ酸	64
アミノ酸化酵素	5
アンギオテンシン	152

【イ】

イオン流	
—房室結筋の	71
—心室細胞の	73
—イカ巨大神経の	13
イカ	13, 22, 26
—巨大神経細胞内圧	26
イカ巨大神経線維	17
—と荷電ポリアミノ酸	17
胃血管灌流	10
イソギンチャク毒	19
イノシトールリン脂質	160
イモリ	155
飲水, ウロテンシンIIと	152

【ウ】

裏打ち構造	
—赤血球膜	38
ウロテンシン	152
運動ニューロン	187

【エ】

栄養因子	69
エネルギー代謝	132

【オ】

大型有芯性顆粒	153
音受容	160
オピオイド	8, 153
オブティカルファイバー	
—内圧測定	26
温度依存性	155

【カ】

化学感受性ニューロン	193
顎関節症	265
顎口腔系機能障害	267
覚醒自動分析システム	6
核磁気共鳴 (TMR 参照)	3, 133, 141
確率過程による学習	269
ガストリン放出ペプチド (GRP 参照)	8
可塑性	
—視覚中枢の	182
荷電ポリアミノ酸	17
カメ	49
カルシウム電流	72, 74
肝細胞膜抗原	159
桿体応答	176

【キ】

ギャップ結合 (電気シナプス参照)	55, 74
嗅球	55

求心性シナプス伝達物質	179
胸腺細胞膜抗原	160
共鳴ラマン	5
巨大シナプス	
—Iカの	158
—クルマエビの	33
巨大神経	
—クルマエビの	33
—Iカの	26
キンギョ	45
筋電図	
—歯科領域の	262
—筋電図応用の問題点	262
—筋電図研究の将来	263
—咀嚼筋	263, 264
—研究方法	264
—自動解析	267
筋紡錘	
—出生時ラットの	68
【ク】	
クサガメ	155
クモ毒 (JSTX)	158
グラヤノトキシン	167
グルコース負荷	80
グルタミン酸レセプター	158
クルマエビ	33
【ケ】	
結合水量	140
結合様式	19
血漿	179

【コ】	
高エネルギー磷酸	126
高塩耐性	169
口顎機能障害	263
硬骨魚	55
咬合位	266
咬合接触	264
酵素反応中間体	130
興奮性膜	22
—旋光シグナル	22
興奮膜	31, 33
コレステロール効果	128
【サ】	
細胞構築	55
細胞内分子動態 (核磁気共鳴による)...	3
細胞内圧	26
細胞内 H^+ 濃度 (H^+ 濃度参照)	72
細胞内 ATP (ATP 参照)	74
細胞内 Ca	
—巨大神経への	13
細胞内 Ca 濃度 (Ca 濃度参照)	73, 76
細胞培養	169
細胞膜	3
細胞膜表面抗原	159
サイレントピリオット (筋電図参照)	264, 266
ザリガニ	19, 29
ザリガニ神経	19
サル	78~81
酸化還元反応	130
【シ】	
歯科	267

歯科医学	264
視覚中枢	182
時空間モデル	286
視細胞間結合	176
脂質極性部位	143
視床下部	78, 153, 193
紫色中間体	5, 130
下顎運動機能	267
自動解析 (筋電図参照)	267
シビレエイ	15
シナプス	33, 55, 68, 187
—mixed	56
シナプス可塑性	269
シナプス小胞 (視床下部の)	153
肉肉電気刺激	266
情動刺激	
—サル, ニューロン活動との関係	81
小脳の学習機能	269
心筋活動電圧	188
心筋虚血	126, 228
心筋症	134
神 経	
—ペプチド	8
—回路網	283
—芽細胞	8
—グリアハイブリッド細胞	84
—VIP の生合成と放出量の代謝	8
—系の学習	269
—成長因子	187
—分泌	165
進行性筋ジストロフィー症	265
腎細胞	169
腎上皮細胞	40

心室筋細胞	74
心不全	134

【ス】

水平細胞	45, 49
睡眠	213
—マウス	6
睡眠促進物質	213
砂ネズミ	132
スピン拡散	140
スフィンゴミエリナーゼ	162

【セ】

生合成	8
生殖腺刺激ホルモン受容体	155
生体膜	13
—裏打ち構造	36
—流動性 磁気共鳴法による	127
生体膜系酵素	130
赤核	61, 66, 185
赤核細胞	
—ネコの	61, 64, 66
赤血球	38
摂食行動 (サルの)	78, 81, 190, 193
旋光性	22
前庭動眼反射 (VOR)	269
前頭眼窩野	80, 81, 190

【ソ】

相転移	128
組織培養	84
咀嚼筋	261~267
—活動	263

一筋電団 (筋電図参照)	263, 264
ーリズム	263

【タ】

体温調節行動	192
単一カリウムチャンネル	189
単一心室筋細胞	72~76, 188
単クローン性抗体 (mAb)	159

【チ】

中枢性ドーパミン作動性機構	148
注 入 (細胞内注入法)	72
聴・側線器	179
聴側線感覚上皮	55
跳躍伝導	33
鎮痛作用	12

【テ】

テトロドトキシン (TTX 参照) ...	27~32
一AV 結節と	71
電気シナプス形態 (ギャップ結合参照)	55
電氣的結合 (ギャップ結合参照)	74
電子スピン共鳴	3
伝達物質	45

【ト】

洞房結節	75
ドブラー変換	61
トリパルギン ーカエル皮膚毒	167

【ナ】

内因性 GABA (GABA 参照)	66
内在性介在細胞	186

内部環境	80
ナトリウム・チャンネル ー不活性化	32

【ニ】

ニホンキクガシラコウモリ	59
ニューロトキシン	158
ニューロプラストーマ	171

【ネ】

ネコ	61~67, 185
熱 力 学	155

【ノ】

脳 硬 塞 (NMR による研究) ...	4, 139
脳スライス	66
脳切片	64
脳切片標本	182, 64
脳 卒 中	
一虚血脳, エネルギー代謝	132
能動輸送	36
脳内活性物質	6

【ハ】

馬腎髄質外帯	37
バゾプレッシン	148
パッチクランプ	189
発電器官 (シビレエイ参照)	15
反響定位 ーコウモリの	59

【ヒ】

光 散 乱	37
非線形解析	283
非線形ブラウン汎関数	280

非線形ポアソン汎関数	280
ヒト神経芽腫培養細胞 (神経芽細胞参照)	8
非破壊的手法 (膜分子の測定)	3

【フ】

複屈折性	22
—と神経興奮性	22
ブ タ	11, 141, 147
—Neuropeptide	141
—ガストリン	147
ブドウ糖感受性ニューロン	78
ブラウン運動による微分	280
フラビン酵素	5
プレプロエンケファリン B	11

【へ】

平滑筋と核磁気共鳴	137
平均学習方程式	269
ペースメーカー電流	75
ペプチド	162
ペプチドホルモン	165
変換過程	160

【ホ】

ポアソン過程による微分	280
房室結節	189
放 出	66
飽和移動	3
飽和移動 ESR	127
ホスファチジルイノシトール ホリホリパーゼ C	162
ホスファチジン酸	160

【ム】

ムスカリン性 アセチルコリンリセプター (リセプター参照)	15, 20, 77
---	------------

【メ】

免疫組織化学	61
--------------	----

【モ】

網 膜	44~54, 284
—神経網	44
—水平細胞	286
モノクローナル抗体	15, 43

【ヤ】

ヤリイカ巨大神経軸索 (イカ参照) ...	162
-----------------------	-----

【ラ】

ラット	153, 155
—の筋紡錘	68

【リ】

リセプター	155
—アセチルコリン	15, 20, 77
リドカイン	26
磷核磁気共鳴法...3, 126, 130, 135~139, 143 (³¹ P-NMR 参照)	
リン酸化酵素	42
臨床検査	263
—方法の確立	262
—法	267

【ル】

ルシファーイエロー —X 器官への	166
----------------------------	-----

ークルマエビ神経	33
ー水平細胞の	104
【レ】	
連続系シミュレータ	285
【ロ】	
老化	153

【A】	
actin	163
ADP	188
Aganglionosis	86
ー節細胞欠落ラット 腸管神経支配の研究	58
AMP	188
Aspartate	146
ATP	38, 41, 188
ー細胞内	74
ATPase	
ーNa, K-	36, 168~172
ー(Na ⁺ , K ⁺)	41
ATP 阻害	41
A-V 結節	71

【B】	
brush border membrane	163

【C】	
Ca	72
Ca 電流	71
calmodulin	163
cAMP	72, 74
Ca 濃度	
ー細胞内	73, 76
ー心室細胞への	76
CCK-8	146
Cerebral ischemia	139
cGMP	72
Chemical modification	156
Chiriquitoxin	31
Chromatic univariance	176
Contraction and retraction	164

Cross-correlation	280
Cs の作用	76
Cultured glioma	157

【D】

Dithizone	161
-----------	-----

【E】

EGTA	72
External inhibition (外制止)	190
Extinction (消去)	190

【F】

Feeding behavior (摂食行動)	78, 81, 190, 193
(摂食行動参照)	
FSri	155

【G】

GABA	61, 146, 185
一内因性	66
GAD glutamic acid decarboxylase	61, 146
(ネコ赤核参照)	
Glutamate	45, 146
Glutamate & glutamine uptake	157
GRP (ガストリン放出ペプチド)	8
GRP-ラット胃血管系における	10

【H】

Hippocampus	161
Hirschsprung's disease (ヒルシュスプリング氏病)	86
(Aganglionosis 参照)	
¹ H-NMR	140
H ⁺ 濃度	

一細胞内	72
Hodgkin-Huxley 方程式	284
HRP	61

【K】

Kalman-Bucy フィルター	270
K チャンネル	13, 29
K 電流	70

【L】

Lee-Schetzen の方法	280
leumorphin	8
ブタ leumorphin	11
Lucifer Yellow	33, 104, 166
(ルシファーイエロー参照)	

【M】

Mg ²⁺ 保護	41
Motivated behavior (動機付け行動)	190
Myosin	163
Myenteric plexus	87

【N】

Na チャンネル	13, 167
Na チャンネル不活性化	17, 156
Na ⁺ free effect	135
Na, K-ATPase	36, 168~172
(AT Pase 参照)	
(Na ⁺ , K ⁺) ATPase	41
(ATPase 参照)	
neuroblastoma & hybrid cells	157
(神経芽細胞参照)	
N-F 転移	140

NG108-15	171	—nor TTX	29
(ニューロブラストーマ参照)		—結合タンパク質の単離	31
nor TTX	29		
(TTX 参照)			
		【U】	
【O】		U-変換	280
Orbitofrontal cortex (前頭眼窩野)			
..... 80, 81, 190		【V】	
(前頭眼窩野参照)		VIP	8
【P】		【W】	
³¹ P 核磁気共鳴 (³¹ P-NMR 参照)		Wiener-Itô 分解	280
³¹ P-NMR	3, 126, 130, 135~139, 143		
Power coordination pattern	266	【Z】	
Pr BCM	20	Zinc	161
【Q】			
QNB	20		
【S】			
S-A 結節	76		
Salivary gland	136		
Sea anemone toxins	156		
SPS-A	215		
SPS-B	216		
【T】			
T. D.	73		
Terminal web	163		
T 管-心筋	58		
T-変換	280		
T. I.	73		
Timm method	161		
TMR (核磁気共鳴参照)	3, 133, 141		
TTX	71		

生理学研究所年報 第4卷

印刷 昭和58年6月20日
発行 昭和58年6月25日

編集者発行 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

