

岡崎国立共同研究機構

生理学研究所年報

第 5 卷



1984

巻頭言

次なる飛躍に備えて

生理学研究所は最後の予定部門であった生体システム研究部門の設置を終えて、その創設計画は一応形をととのえることになります。初期5ヶ年計画ですべての創設事業を完了する予定でありましたが、諸般の事情は必ずしも我々にくみしませんでした。しかし人事充足率が50%をわずかにこえた段階にすぎない点をのぞけば、創設の目的は一応満足すべき段階に達したと思います。

岡崎は生理科学研究者のパラダイスだとまで賞嘆した著名なノーベル賞受賞者 U. S. von Euler 博士の言葉が思い出されます。環境、外観、研究設備等、欧米の一流研究所に比しても遜色のない形が出来上りました。教官人事においても岡崎には生理学の quality people を集めていると外国人訪問者の目にうつる程の陣容になったのだとひそかに自負しております。

当研究所の最大の弱点は若い研究者の導入が困難なことであります。国内外の若い共同研究者の各種の受け入れ体制は設定されておりますが、それを通しての研究者の流動性は未だ極めて不十分だといわざるを得ません。大学の研究室に比して不足していると考えられる点は、研究室に満ち満ちた若者の切磋琢磨のきびしい空気であります。我々は次なる飛躍に備えて、若いすぐれた後継者の養成に常に心を砕く必要があります。組織や人事の硬直化が起らぬよう様々な手だてを真剣に模索しなくてはなりません。

目下、内外の研究所で必死になって innovation が計られております。Innovation の中には設備や建物もありますが、中でも最も重要なのが人事の innovation であります。研究所には旺盛な探究心に溢れた若ものが常に満ちあふれていなくてはなりません。

岡崎の機構の中に automatic な innovation の出来る研究体制の確立を目指して、独立大学院の計画が練られているのは正にそのためであります。研究は建物や設備によってではなく、人によって行われるものであります。

先般当研究所を訪問したノーベル賞受賞者の Eccles 博士が、岡崎を離れるに当って残した言葉によりますと、彼のノーベル賞に連なる研究が1950年から60年にかけて行われたのですが、当時彼のまわりには内外、特に日本からの俊秀が蟄集しておりました。彼はその研究の最もドラマチックな展開を、彼をとりまく若い熱気の中で完成したということです。その若ものとは大学院の学生であり、post doctoral fellows であります。

私はわが生理学研究所の次の飛躍に備えて、このことを特に銘記したいと思います。

昭和59年6月

所長 内 藺 耕 二

主 な 職 員 (昭和58年度)

所 長 内 菌 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

機能協関研究部門

教 授 渡 辺 昭
助 教 授 寺 川 進
助 手 中 山 孝
" 木 村 能 章

生体情報研究系

神経情報研究部門

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

高次神経機構研究部門

客 員 教 授 塚 原 伸 晃
客員助教授 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
助 手 樫 原 康 博

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 栗 生 修 司

生 理 機 能
研 究 施 設

生体機能検査室

助 手 星 野 稔
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
技 官 大 市 川 修
" 池 田 明 聡
" 勝 丸 由 美 子
" 山 下 幸 子
" 小 原 る り
" 勝 丸 博 信
" 前 橋 寛
" 細 野 道
" 畑 口 吉 弘

技 官 小 原 正 裕
" 永 田 治
" 伊 藤 昭 光
" 稲 田 和 久
" 加 藤 勝 巳
" 藤 原 文 治
" 小 川 良 斎
" 松 本 利 明
" 桜 井 律 子

非 常 勤 講 師

中 沢 隆
松 田 博 子

特 定 領 域
奨 励 研 究 員

広 野 力
八木沢 仁

特別協力研究員

安井章裕

成瀬達

GRILL, H. J.

VAN DIJK, B. W.

柴崎享

LÉNÁRD, L.

SOEGianto, R. R.

SAMARRAI, S. F.

文部省
外国人研究員

WOODY, Charles Dillon

GADSBY, D. C.

KOSAR, Eva Marie

学術振興会
外国人招へい
研究者

徐科

PICHON, Yves

DASS, C. M. S.

昭和58年度 生理学研究所年報

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	19
生体情報研究系	53
生体調節研究系	77
生理機能研究施設	92
動物実験施設	96
技 術 課	102

研 究 活 動

発 表 論 文	115
学 会 報 告	143

共同研究報告	165
--------------	-----

研究会報告	231
-------------	-----

超高压電子顕微鏡共同利用実験報告	433
------------------------	-----

索 引 (Key words)

研究報告

(第 1 期)

【 研 究 概 要 】

研究目的と意義

研究の背景と動機

研究の目的と意義

研究の範囲と対象

研究の方法

研究の成果と結論

研究の限界と今後の課題

研究の意義と貢献

研究の結論と今後の展望

研究の意義と貢献

研究の成果と結論

研究の限界と今後の課題

研究の意義と貢献

研究の成果と結論

研究の限界と今後の課題

研究の意義と貢献

研究の成果と結論

研究の成果と結論

研究の限界と今後の課題

研究の意義と貢献

研究の結論と今後の展望

分子生理研究系

神経化学部門

概要

細胞の機能が神経・ホルモン・薬物等の情報に応じて調節される場合、Ca イオンが細胞内のメッセンジャーとして機能するタンパク系に働きかけている。Ca イオンによる細胞機能調節は一般的・普遍的であるのに比べて、個々の機能タンパク系が Ca イオンによって調節される分子機構は多種多様である。Ca イオンの働きが最初に明らかになった筋収縮制御の分子機構は骨格筋については詳細な研究がなされたが、他の細胞での Ca イオンによる制御機構については今なお不明な点が多い。筋収縮の原型とも考えられる平滑筋について Ca イオンによる収縮制御機構の研究を進めている。

また筋の一つの特徴は、機能に応じた特異タンパクを同定しやすいことであるが、これを利用し、タンパクを基盤とした細胞分化の問題も追求している。

平滑筋収縮の Ca イオン調節機構

江橋節郎, 三川 隆, 古賀律子

平滑筋収縮の Ca イオン調節の分子機構は従来知られていた骨格筋・心筋とは全く異なる。後者においては、収縮タンパクであるアクチンとミオシンの相互作用は本来活性化状態にあり、制御タンパク（トロポニン）が Ca イオンを結合していない時に、このアクチン・ミオシンの相互作用を抑制する。Ca イオンはトロポニンに結合し、その抑制を除去し収縮をおこさせる。平滑筋のアクチン・ミオシン反応はそれ自体非活性化状態にあり、制御タンパクに Ca イオンが結合することによって活性化（収縮）がおこる。

現在平滑筋の制御タンパクに対し、アクチン結合性タンパクがその制御の主要な役割をになっているという考えと、ミオシンのサブユニットの Ca イオン依存性リン酸化が主要であるとする説がある。特にアクチン結合性制御タンパクの立場から研究を進めている。leitonin と名付けられたアクチン側の制御タンパクおよび Ca^{2+} 依存性ミオシン軽鎖リン酸化酸素の相互の働きの生理的意義を明らかにするために、個々の因子の高純度の精製が必要で各種の分離方法を試みている。高速液体クロマトグラフィーを用いた短時間の高分解能分画により、失活しやすいこれらの因子の分離が進みつつある。また両因子の polyclone 抗体および monoclonal 抗体の作製も進めている。これらを用いて各因子の存在様式を明らかにし、実際の収縮反応において各因子の活性阻害をおこない

生理的意義を検討することを進めている。

Ca イオン受容タンパク検出のためのスクリーニング法

丸山 敬, 三川 隆, 江橋節郎

従来 Ca イオン調節の分子機構の研究は, Ca イオン受容タンパクが, 個別的, 任意的に分離, 同定されるのを待たねばならなかった。Ca イオン受容タンパクの精製過程で手軽に粗精製分画中のどれが Ca イオン結合性を有するかを推定できる方法があれば, 分離, 精製の有用なマーカーとなる。さらに細胞全体の Ca イオン結合タンパクを全て検出できれば Ca 調節機構の理解を一層深めることが出来ると考え, 検出方法を研究検討した。

多種のタンパクを分解能良く分析するには現在 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動あるいは等電点電気泳動 (IEF) を組合せた 2 次元電気泳動が最も平易でかつ高解像力を有している。粗精製分画あるいは細胞の全タンパクをこれらのゲル電気泳動で分離展開する。ゲル内のタンパクを分解能を維持したまま垂直方向の電気泳動でニトロセルロース膜に転写する。これによってタンパクは後の処理中に拡散することがなくなり, SDS の大部分が除かれる。タンパクを転写したニトロセルロース膜を30分程度60mM KCl, 5mM MgCl₂, 10mM Imidazole, pH6.8で洗浄後, 4 mCi/l の⁴⁵CaCl₂を含む同じ溶液の中でインキュベートする。その後5分間蒸留水あるいは50%エタノールで過剰の⁴⁵Ca²⁺を洗浄除去し, 乾燥後オートラジオグラフィーにより Ca イオン結合タンパクを検出同定する。ニトロセルロース膜に転写することには①ゲルに比べ操作が容易なこと, ②平衡化の時間が非常に短縮されること, ③オートラジオグラフの為の乾燥時間も短くなるといった多くの利点がある。全過程は24時間で終了することができた。⁴⁵Ca²⁺との平衡化の時間は5分から30分の間でほとんど得られるオートラジオグラフィーに差を与えなかった。最後の洗浄が重要で短かければ非特異的な結合が見られ, 長すぎると全く検出されなくなってしまった。従来から知られている10⁶M⁻¹で Ca イオンに対する結合性を示すタンパクは上記の方法で検出することが確かめられた。そこで各種細胞の全タンパクを本検出法でスクリーニングした結果, 幾つかの新しい Ca イオン結合性タンパクの検出・同定が行なえた。特に興味を引いたのは軟体動物一般に, 膜分画の分子量約20万という大きなタンパク分子が Ca イオン結合性を示したことである。このタンパクは SDS 存在下においても Ca イオンによって構造変化するらしいことが確かめられた。

〔発表〕 J. Biochem, 95:511-519 (1984).

初期胚単一割球由来子孫細胞群の分離法

三川 隆, 古関千寿子, 江橋節郎

単一割球である受精卵は分裂をくり返し多細胞化する。発生初期の多細胞化の特色は増殖ではなく自分の細分にある。受精卵を細分することによって卵球体上に割球が配列される。最近の細胞系譜の研究から胚球面上の割球の占める位置と、それから由来する細胞群が個体のどの位置を形成し、どのような組織に分化してゆくかという対応関係が明らかになりつつある。しかし特定の割球あるいはその子孫細胞群にいつどの様に個性が獲得されるのかという問に対する研究はほとんどなされていない。個々の割球から由来する子孫細胞群は、胚の中で複雑な空間配置をとり、これを個別的・選択的に分離し、分子的变化を解析する事がこれまでほとんど不可能であったためである。本研究で、単一割球を標識することにより、これから由来する子孫細胞だけを初期発生の任意の時期に選択分離することが可能となった。

アフリカツメガエルの初期胚(256細胞期まで)の単一割球に(1) gap junctionから他に拡散しない、(2) 細胞毒性がない、(3) 代謝をあまりうけない(第40期程度まで)(4) 検出が容易な tracer として FITC で標識したウシ血清アルブミン (BSA) を注入した。FITC-BSA の注入をうけても細胞分裂は異常なくおこり発生が進んだ。第40期程度までの胚で FITC-BSA を有する細胞を区別でき、また FITC-BSA は注入をうけた割球の子孫細胞にだけ検出された。

胚をキレート剤により 2 価イオンを除いた溶液に移し、ビテリン膜を除き、胚の全細胞を一旦遊離細胞とした。胚の全細胞から FITC-BSA で標識された細胞群だけを分離できれば、単一割球由来細胞群の選択分離が可能となる。細胞にレーザーを照射することにより細胞の大きさおよび蛍光量の 2 次元の情報に基づいて細胞を分画するセルソーター (FACS-Ⅱ) を用いる事により、効率よく FITC-BSA で蛍光標識されている細胞群を分離することができた。

以上の方法により初期発生期の胚から任意の時期に単一割球由来子孫細胞群を選択分離することが可能となり、発生の非常に早い時期における最初の細胞間の分子的变化のスイッチの解析が可能となろう。

超微小形態生理部門

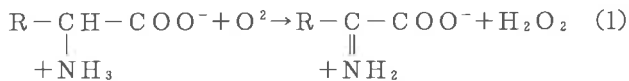
概要

分子生理研究系・超微小形態生理部門は昭和52年度創設されました。昭和58年末の構成員は亘弘，志賀 潔，東 晃史および二科安三の教官と，技術課より派遣されている市川 修および池田明聡の技官ですが，志賀 潔は昭和59年4月16日熊本大学医学部に昇進しました。また中澤 隆は昭和58年4月1日より博士研究員として在籍しましたが，昭和59年1月1日奈良女子大学理学部助手として採用されました。研究内容はフラビン酵素を用いた分子間相互作用の研究，生理活性物質の構造と機能との関連，分泌機能とエネルギー代謝との空間的および時間的な関連，および飽和移動電子スピン共鳴による相関時間測定から磷脂質配向膜の動的解析に関して成果を挙げました。これらは本研究系の研究目的『生理機能を発現する生体分子の特徴的な構造を分子あるいは電子レベルで解明』に沿って行なわれ，研究所内外の方々との共同研究がほとんどで大学共同利用機関の特徴を生かしております。研究内容の概略は次の通りです。

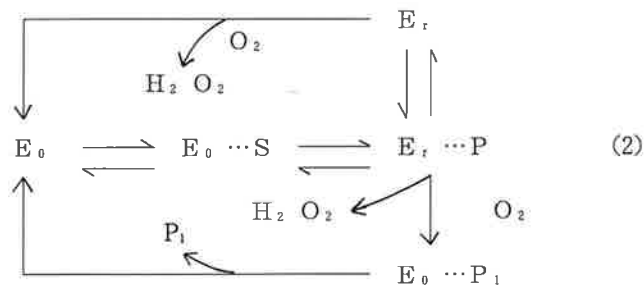
D-アミノ酸酸化酵素の反応中間体の構造について

二科安三，志賀 潔，亘 弘

FADを補酵素するとD-アミノ酸酸化酵素はひろくD型アミノ酸を基質とし，イミノ酸にする（式(1)）。このイミノ酸は非酵素的に



加水分解してケト酸になる。D-プロリンのような環状の2級アミンの場合にはイミノ酸でとどまっている。この酵素の反応サイクルは式(2)で書くことができる。ここでE₀，



E_r…P，そしてE_rは，酸化型酵素，550nmに吸収をもつ中間体，遊離の還元型酵素をそれぞれ示している。この中間体は“紫色中間体”と呼ばれている。この中間体が酵素と直接反応して，

もとの酸化型酵素にもどるのが主要な経路になっている。紫色中間体はこのように触媒機構の上で大切な成分なので、いろいろな方法で構造が研究されている。しかし明確な実験的証拠をもって構造決定するにはいたっていない。我々の目的はこの中間体の構造を実験的に明らかにし、フラビン、アポタンパク、基質間の相互作用の実体をつかむことである。ここでは共鳴ラマン分光法を用いて研究した。この方法は巨大な生体分子の中の発色団の振動スペクトルを感度よく選択的に測定できる特徴をもち、発色団の構造を研究するのに有力な手段である。

酸化型酵素と紫色中間体の可視部吸収スペクトルを図1に示した。He-Ne レーザーの632.8nmの光照射の紫色中間体（D-アラニンを経質にしたとき）の共鳴ラマンスペクトルを図2に示した。同位体置換したアラニンを用いた結果も示してある。フラビン環を ^{13}C 、 ^{15}N で特異的にラベルしたFADで再構成した酵素および基質としてプロリンを用いた中間体の測定も行った。

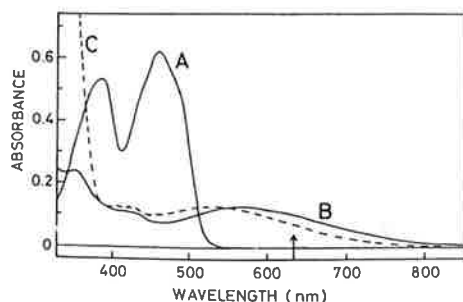


図1. D-アミノ酸酸化酵素の可視吸収スペクトル。(A) 酸化型 (B) 紫色中間体 (基質, D-プロリン) (C) 紫色中間体 (基質, D-アラニン)。

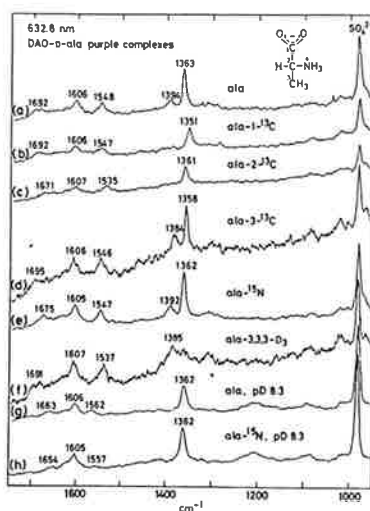


図2. D-アミノ酸酸化酵素紫色中間体の共鳴ラマンスペクトル, 種々の同位体置換アラニンを用いた結果。

～1606 cm^{-1} のバンドは重原子置換したFADで再構成した酵素で低波数シフトしたので、フラビン由来のバンドである。このバンドはすでに報告のある酸化型およびセミキノン型フラビンではみられないバンドであり、 $[4\text{ a}-^{13}\text{C}]^-$, $[4, 10\text{ a}-^{13}\text{C}_2]$ FADで低波数シフトするので、還元型フラビンの $\text{C}(10\text{ a})=\text{C}(4\text{ a})-\text{C}(4)=\text{O}$ の領域に関係したバンドと結論できる。

アラニンでの1692 cm^{-1} のバンドは ^{15}N -アラニン、 $2-^{13}\text{C}$ -アラニンで低波数シフトし、プロリンでの1658 cm^{-1} のバンドは ^{15}N -プロリンで低波数シフトした。このことはこれらのバンドが基質由来の $\text{C}=\text{N}$ を含む化合物、すなわちイミノ酸（それぞれ α -iminopropionate, Δ^1 -pyrrolidine-2-carboxylate）の $\text{C}=\text{N}$ 伸縮振動に関係していることを示している。またこれらのバンドは重水中で低波数シフトするので、イミノ基のチッ素はneutralではなく、プロトンが付加したカオチンになっていることがわかった。

カルボキシル炭素を ^{13}C でラベルした基質でシフトする、イミノ酸の CO_2^- に関係したバンドが1300–1400 cm^{-1} に観測された。プロリンの場合の1359 cm^{-1} のバンドが重水中で大きく変化することなどから CO_2^- 基は遊離した状態ではなく、プロトンを経由してアポタンパクのアミノ酸残基と相互作用していることがわかった。

以上の結果、この紫色中間体は還元型酵素と基質由来のイミノ酸との複合体であり、550nmあたりのブロードな吸収帯はそれらの間の電荷移動相互作用に基づくものであり、また還元型フラビンの $\text{C}(10\text{ a})=\text{C}(4\text{ a})-\text{C}(4)=\text{O}$ とイミノ酸の $\text{N}=\text{C}-\text{CO}_2^-$ の領域での相互作用が大きいことがわかった。アポタンパクと基質の CO_2^- とが相互作用していることがわかったが、この相互作用はこの酵素の基質特異性、反応特異性を発現するために重要なはたらきをしていると考えられる。

〔研究発表〕

- 1) Miura, R., Nishina, Y., Ohta, M., Tojo, H., Shiga, K., Watari, H., Yamano, T. and Miyake, Y. (1983) Biochem. Biophys. Res. Comm. 111: 588–594.
- 2) Nishina, Y., Shiga, K., Miura, R., Tojo, H., Ohta, M., Miyake, Y., Yamano, T. and Watari, H. (1983) J. Biochem. 94: 1979–1990.

CCK-8の立体構造

中沢 隆（奈良女子大・理），亘 弘，志賀 潔，二科安三

Cholecystokinin (CCK)は33個のアミノ酸残基からなり、消化管ホルモンとして単離され構造決定されたが、そのC末端オクタペプチド（CCK-8）が脳内にも多量に存在し、中枢神経系でneuromodulatorとしての機能を持つことが明らかになった。CCK-8の構造は $\text{H}-\text{Asp}^1-\text{Tyr}^2(\text{SO}_3\text{H})-\text{Met}^3-\text{Gly}^4-\text{Trp}^5-\text{Met}^6-\text{Asp}^7-\text{Phe}^8-\text{NH}_2$ でチロシンのフェノール性水酸基が硫酸

エステル化され、C末端がアミドになっていることが特徴的で、かつ活性発現に必須である。また、グリシンからC末端まで8個のアミノ酸配列はガストリン（胃液分泌促進作用を持つ消化管ホルモン）の末端構造と一致している。さらにC末端テトラペプチド（CCK-4）とCCK-8とは膵消化酵素に関して異なる放出活性を示す。このようなCCKとそのフラグメントの多様な生理作用は、主として異なる種類の受容体の存在によるものとして説明されているが、各々の受容体に識別されるべき安定な部分構造がCCKにいくつか存在することも考えられる。したがってCCK-8についての立体構造と上に示した多様な生理機能との相関を探ることが必要である。

そこで、CCK-8とそのアナログの溶液内での構造を解明するために、二次元スピネコー相関¹H-NMR (SECSY) と二次元 NOE 相関¹-NMR (NOESY) を用いてCCK-8の全シグナルの帰属を行った。さらにN末端あるいはC末端を欠いた数種のアナログについても同様にシグナルの帰属を行ない、CCK-8の結果と比較した。

その結果、活性の著しく低いアナログがかなりランダムなコンフォメーションをとるのに対し、CCK-8のみにTyr²のアミドプロトンとMet⁶のカルボニル基との間に分子内水素結合をもつ環状構造を取ることが結論された。このモデルによれば、Met³ Trp⁵ 及びMet⁶のHydrophobicな側鎖が分子内に集まり、極性側鎖がその周辺をとり囲む構造をとることが可能である。C末端のPhe⁸はこのrigidな部分からつき出ている。これによってAsp⁷のアミドプロトンについて観測された水分子との強い相互作用が、近傍の解離性基の影響によるものとして説明することができる。特に、CCK-7 ([Des-Asp¹] -CCK-8) との比較から、この相互作用にN末端のAsp¹が関与し、環状構造の安定化にも寄与していると考えられた。また水の存在によってこの構造が大きく影響を受け、NMRスペクトル上ではGly⁴のC^αプロトンの非等価性に顕著にあらわれる事が見出された。

以上の知見は、CCKに対するレセプターの相互作用部位の構造を示唆するばかりでなく、新規の生理活性のあるCCKアナログを合成したりNMRによって検索する際の有力な手がかりとなることも期待できる。

〔研究発表〕

中沢 隆, 肥塚 泉, 亘 弘, 志賀 潔, 矢内原昇, 永山国昭

「CCK オクタペプチドとそのアナログの二次元 NMR による構造研究」

第22回 NMR 討論会。(1983. 11. 京都)

リボフラビンとリボフラビン結合蛋白の相互作用について

志賀 潔, 二科安三, 亘 弘

食物として摂取されたリボフラビンは血液中にとり込まれ、体の各部（または胎児）へと輸送

されるが、その時リボフラビン蛋白と結合した状態で運搬される。その役割をする蛋白のひとつとしてリボフラビン結合蛋白 (RBP) が存在し、この蛋白は一分子当り一分子のリボフラビンを結合する事が知られている。

一方生体はリボフラビンと分子構造の類似した物質 (analogue) をも摂取するから、もしもこれらの analogue が RBP に結合すればリボフラビンの輸送に影響を与える事になる。そこで analogue として 8-メトキシソラーレン (8-MOP) およびクロールプロマジン (CPZ) を用いて RBP への結合を検討した結果、これら analogue は RBP と 1 : 1 の割合で結合し、しかもその結合はリボフラビンと拮抗する事が明らかになった。この機構に基づけば Pinto 等の動物実験 (ラット) の結果 (CPZ の投与により尿中へのリボフラビンの排泄が増加する。および妊娠ラットにおいてはリボフラビンが欠乏すると奇形児が産まれ、この奇形に似たものが CPZ 投与により発生する。しかもこの奇形発生はリボフラビン投与により抑制される。) をよく説明できると思われる。

〔研究発表〕

Shiga, A., Matsumoto, S., Ueda, H., Shiga, K., Nishina, Y., Watari, H. and Horiike, K. (1983) A study of the interaction between chlorpromazine and riboflavin binding protein. J. Dermatology, 10: 461-467.

核オーバーハウザー効果を利用した生態組織におけるエネルギー貯留の研究

亘 弘, 志賀 潔

心臓、唾液腺にあっては摘出後灌流しつつ、また脳、腎臓において生きたまま麻酔しつつ無侵襲計測法である ^{31}P -NMR 法によって、無酸素状態への導入時とこれより好気条件への復帰時におけるエネルギー代謝の研究を行ってきた。これら臓器において ATP, ADP, クレアチン磷酸および無機磷酸や磷酸化合物などの消長を観測して来たが、血流再開時にクレアチン磷酸の回復は急速であった。また唾液腺の場合、唾液分泌後、クレアチン磷酸の回復が急速に起る事が観測された。これらの反応はクレアチンキナーゼにより触媒されるローマン反応であり、この平衡定数は ATP 合成側にかたよっているため、上記の観測は理解しがたい。そこでこれら臓器におけるエネルギー代謝磷酸化合物の動態を時間分解を短かくして正確に求める必要がある。ラット心臓のランゲンドルフ標本を口径 15mm の NMR 試料管に設置し、灌流を停止後再開した時の ^{31}P -NMR スペクトルを求め、エネルギー代謝磷酸化合物の時間変化を測定した。灌流再開にあたってクレアチン磷酸は 30 秒の時定数で正常レベルに復帰した。イヌ顎下腺は口径 30mm の試料管に設置し灌流した。静止時とアセチルコリン投与 ($5 \times 10^{-6}\text{M}$, 2 ml) による分泌刺激時における腺組織の磷酸化合物の変化および pH を測定した。アセチルコリンを灌流液に注入すると 0.6 ml の唾液が分泌し、30

分後再び刺激すると0.7ml分泌した。分泌に対応してATPは約50%減少、クレアチン磷酸は約70%減少し、ADPは増加し、またpHは一過性に約0.4pH単位低下した。分泌終了後クレアチン磷酸などの磷化合物およびpHの静止レベルへ30秒の時定数で復帰した。この反応はクレアチンキナーゼにより触媒されるローマン反応であり、この平衡定数がATP合成側にかたよっているため、上記の観測が理解しがたい。

生化学的に知られているローマン反応は当然生体内部においても同じ物理定数を持つのは当然であるが、生理的状态によってどのように影響を受けるのかを検索する必要がある。このため核オーバーハウザー効果(NOE)を利用する。ATPの γ 位の磷とクレアチン磷酸の磷の磁化のふるまいは交換のある時のブロッホ方程式で記述され、飽和移動法を用いることにより交換反応の化学的緩和時間およびフラックスを求めることができる。基礎的なデータを求めるために、筋肉におけるローマン反応の解析を行なった。試料としてカエル縫工筋をもちい口径15mmの試料管内に設置しリンゲル液を外灌流し ^{31}P -NMRスペクトルを測定した。ATPの γ 位の磷とクレアチン磷酸の磷とはクレアチン・キナーゼを介して互いに化学交換しており静止筋においては反応は平衡状態にあり、クレアチン磷酸は 24mmol/kg 、ATPは 5mmol/kg であった。クレアチン磷酸からATP合が生成される反応(正反応)をみるには、ATPの γ 位の磷の信号を選択的に照射しその磁化を飽和する。その時間を延長して行くとクレアチン磷酸の信号が減少して行くが、この減衰は縦緩和時間および化学的緩和時間の逆数の和($1/\tau$)となっている。また充分飽和したのちの信号強度と平衡磁化との比は τ を縦緩和時間で除したものとなっている。4個の筋について求めた τ は2.9で、飽和時の信号強度比は 0.66 ± 0.05 であった。逆の場合、すなわちATPからクレアチン磷酸生成される反応(逆反応)では、クレアチン磷酸の磷の信号を選択的に照射しATPの γ 位の磷の信号の減衰を測定すると、 τ は1.0で飽和時の信号強度比は 0.48 ± 0.12 となった。以上の結果より、ATPの γ 位の磷とクレアチン磷酸の磷の正確な縦緩和時間を求めてフラックスを計算すると正および逆反応では夫々2.9および 2.6mmol/sec/kg であった。これらより反応速度が得られて、平衡定数として14が得られた。これは生化学的に求められたものとかかなり一致している。このような基礎データをもとに唾液腺での検討を行なう。

本研究は科学研究費補助金(試験研究)によって今井雄介(大阪医科大学)、森本武利、平川公義(京都府立医科大学)、松永享、井上通敏(大阪大学医学部)、下山雄平(北海道教育大学)との共同で行なわれた。

〔研究発表〕

- 1) Murakami, M., Imai, Y., Seo, Y., Morimoto, T., Shiga, K. and Watari, H. (1983) Phosphorus Nuclear magnetic resonance of perfused salivary gland. *Biochim. Biophys. Acta*, **762**: 19-24.
- 2) Naruse, S., Takada, S., Koizuka, I. and Watari, H. (1983) In vivo ^{31}P -NMR studies on experimental cerebral infarction. *Jap. J. Physiol.*, **33**: 19-28.
- 3) Seo, Y., Murakami, M., Watari, H., Imai, Y., Yoshizaki, K., Nishikawa, H. and

Morimoto, T. (1983) Intracellular pH determination by a ^{31}P -NMR technique. The second dissociation constant of phosphoric acid in a biological system. J. Biochem., 94: 729-734.

磷脂質積層配向膜の飽和移動電子スピン共鳴

亘 弘, 志賀 潔, 二科安三

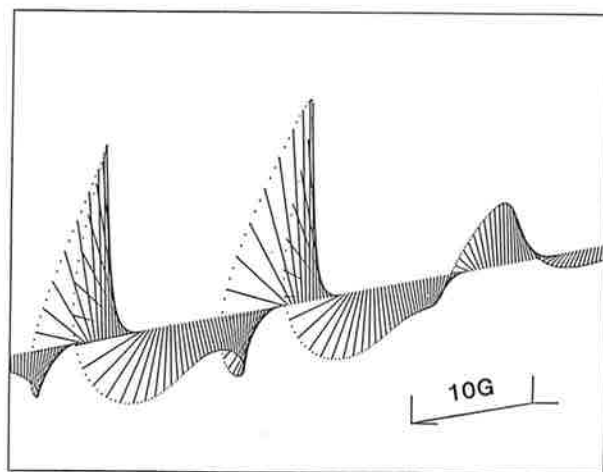
I. 電子スピン共鳴スペクトルへのベクトル概念の導入 (ベクトル ESR)

吸収スペクトルはスカラー量として記述されるのが通例である。しかし強いマイクロ波を使用した時の電子スピン共鳴 (ESR) スペクトルはベクトル的な考え方を導入する必要がある現象が見出された。

ESR の測定では磁場変調して得た信号を位相検波しているため、一次および二次高調波を問わず前置増幅機からの信号はすべて正弦波である。したがって特定の磁場での信号の値は位相検波器の角度の変化にともなって正弦波的に変動する。強いマイクロ波を使用した場合 (例えば飽和移動電子スピン共鳴: ST-ESR), 弱いマイクロ波の場合に得られる二次高調波スペクトルとは異なっている。また二次高調波 ESR スペクトルは 1 回の積分値は零であるにもかかわらず、この場合積分値を持ちしかも全磁場にわたって積分すると一次高調波のスペクトルとはならない。さらに吸収のピーク値および積分値は位相角度と共に正弦波的に変動するが、相異なった位相を持つが位相差は 90° でない。

周波数が同じで異なった振幅と違った位相を持つ正弦波の和は、これらの幾何学的関係より求める振幅と位相とをもった同じ周波数の正弦波に合成される。このように強いマイクロ波を使用した ESR 測定の場合、磁場が変ると振幅と共に位相が変化していることを示唆している。つまり ESR スペクトルは振幅と位相、つまりベクトル、が磁場の関数として表示するとよい事がわかった。

常温において TEMPOL のグリセリン-水 (85:15) 混合溶液の ESR スペクトルを位相検波器の角度 10° 毎に変化させて求め、これらを重量させてプロットすると包らく線が形成される。強いマイクロ波の場合 (164mw) 包らく線の内部に網目模様が見られるのに対して、弱い場合 (0.64mw) には網目模様はない。このことは強いマイクロ波の場合各磁場において位相が変動していることの証拠である。このデータからベクトル的に表示したスペクトルを計算出来、これを図にしめす。



Ⅱ．生体膜のゆらぎ現象

生体膜の流動性は生理機能の発現に大きな役割を演じている。その流動性を観測する手段としては飽和移動電子スピン共鳴 (Saturation transfer ESR:ST-ESR) が最適である。これはスピン束の飽和移動を観測するものであるが、 $10^{-3} \sim 10^{-7} \text{sec}$ の遅い分子運動の検出を可能にする特徴をもっている。生体膜は種々の状態が複雑に混り合っており解析が困難のため、本研究では生体膜の異方的構造と物性をきわだたせる積層配向膜を用いた。

合成磷脂質 Dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) にスピンラベル 3-spiro-doxyl-5 α -cholestane (CSL) を0.5M%の濃度で混合し、適当な水和条件のもとで、石英基盤上に積層配向膜を作成した。この膜を温度変化させて ESR スペクトルをベクトルの的に測定した。

V_2 の積分強度は遅い運動領域での分子運動の相関時間を精度良く反映する。スペクトルの積分値と相関時間の較正曲線よりゲル相において $10^{-3} \sim 10^{-5} \text{sec}$ 、液晶相で $10^{-6} \sim 10^{-8} \text{sec}$ の揺ぎの速さが決定された。これにともない脂質分子の長軸まわりの軸回転運動 (axial rotation) と首ふり運動 (wobbling motion) の二つの運動のモードが確定され、しかも驚くべきことに相関時間に異方性が認められた。これは慣性モーメントからの考察によって説明できるが実験的証明は本研究がはじめてである。

DMPC積層配向膜の膜面が磁場に垂直である時、各温度におけるベクトル強度スペクトルのピーク比の変化から膜分子の wobbling motion が検出でき、各温度での二次元の自由度をもつ膜シート内の分子ゆらぎを推論できた。L $_{\beta}$ (ゲル相) から L $_{\alpha}$ (液晶相) への大きな転移が25℃付近に観測された。興味あることに、この主転移にともない critical slowing down が観測された。18℃近辺の小さな転移は L $_{\beta}$ から L $_{\beta'}$ (tilted gel phase) への変化で前駆転移に対応している。この

ピーク比は透磁率に比例する物理量とみなせるが、協同的 (cooperative) な相転移にともなう分子ゆらぎを敏感に反映している。コレステロールの存在下で、転移幅が増加し転移の協同性が減少することは積分値より得た結果と良い一致を見ている。これは生体膜がコレステロールにより流動性が低下することの分子論的な示唆である。

本研究は下山雄平（北海道教育大学）と共同で行なわれた。

脳内活性物質の探索システムにおける標準データの作成—chrolpromazine

東 晃史

動物個体の精神機能の昂揚の程度（脳の活動度）を単位時間毎に分類して数量化する解析法を stage 分析といい、各 stage は EEG 等のポリグラムを観察することにより類型化されている。この手法は経験豊かな観察者によってのみ可能な、一種のパターン認識に基づく A/D 変換であり、単位時間 (epoch time) を変更することによって、結果が著しく異なるか、または複数の記録像間の相関に関する基準 (Rechtschaffen らのテキスト) に一致しなくなる性格を有している。元来、臨床上の国際的共通認識を得るための便宜的な慣行に準じた方法であり、睡眠相と覚醒相が頻繁に交替する小動物の脳の活動度を科学的に分析する手法としては必ずしも適切とはいえない面がある。この点を考慮して、東¹⁾ はマウスの脳の活動度を目動判定するユニークな方法論を考案した。その一般的出力例については既に生理学研究年報第 4 巻に発表した。

動物行動学や行動薬理学と称される分野では、動物の覚醒期の動態のみが注目され、また睡眠研究の分野では、動物の睡眠量 (SWS と PS) のみが計量化される傾向にある。松本 (Impact Sci. (1978) 28 No. 1, 27-37 や Crick et al. (Nature (1983) 304 14 111-114) 等の仮説に示されているように、覚醒相と睡眠相の脳の機能は不可分の相互作用を有しており、向精神作用物質の作用機序に関する研究においては、両相の同時解析による比較検討が極めて重要な要素になろう。この様な観点から、上記方法論に基づく目動計測・処理システムを用いて、向精神作用薬の 1 つである chrolpromazine (CPZ) 投与 (ddy, 雄マウス, 生後 10 カ月) の実験を行った。その出力例の一部を図 1 に示す。A は活動持続時間 (上向き) ならびに睡眠持続時間 (下向き) とそれらの発生時刻を示し、上段は 19 時に 0.2mg の CPZ を腹腔投与 (ip) した例であり、下段は Control である。上段および下段の睡眠持続時間の下側の短い縦線は REM 睡眠 (ps) の出現を示している。B は投与例および Control の個々の睡眠 (A の下向き) に含まれる深睡眠の量 (上向き) と浅睡眠の量 (下向き) を示し、上段と下段は A のそれぞれの睡眠に対応している。照明は 12 時間 dark, 12 時間 light スケジュール (照明時間: 7:00-19:00) で行なわれた。実際には各種パラメータ毎に数百枚の図表が出力されるが、今後各パラメータに対する各種向精神薬に関する標準データを作成し、未知の脳内活性物質探索の指標にする予定である。

〔文献〕

- 1) Higashi, A. Methods of dynamic behavioral stage analysis in the mouse. (投稿中)

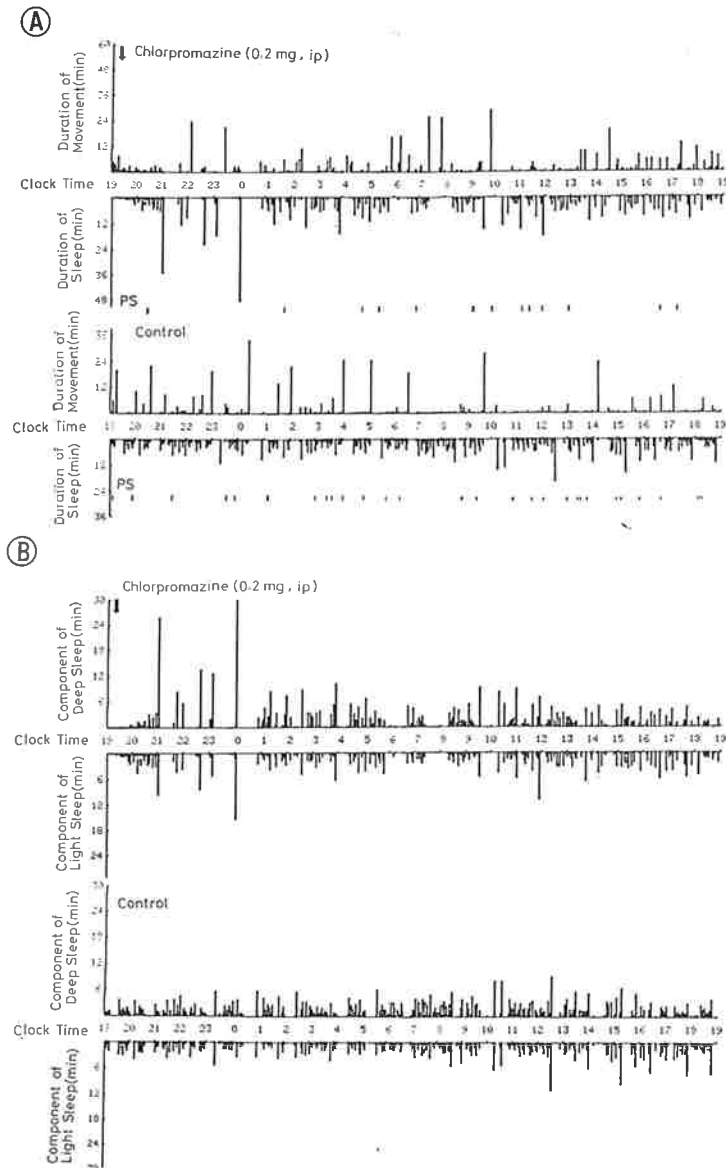


図1. クロルプロマジン (cpz) の効果：①：マウスの運動（上向き）および睡眠（下向き）の持続時間。上段：cpz 投与例。下段：コントロール。ps：REM睡眠の出現。②：深睡眠（上向き）と浅睡眠（下向き）の割合。上段：cpz投与例。下段：コントロール，それぞれのBarは睡眠および運動の開始時刻を示し，②の上段および下段は①の上段および下段の睡眠持続時間に対応する。

細胞内代謝部門

概要

各種神経ペプチドを化学合成し、特異抗血清を用いたラジオイムノアッセイおよび免疫組織化学により、それらの組織内分布および細胞内プロセッシングについて研究している。それらのなかで、VIP と PHI の同一細胞内での共存を明らかにし、同一前駆体から生成することを、はじめて証明した。また、遺伝子構造解析により推定された前駆体構造にもとづきデザインした特異抗血清を用い、前駆体の細胞内プロセッシングを追求し、プレプロエンケファリンについてはそのプロセッシングを解析した。

ヒト神経芽細胞腫培養細胞における VIP/PHM の産生

星野 稔, 佐藤晴子, 鈴木利光, 矢内原昇 (生理研)

萩野晃一, 井口和明, 矢内原千鶴子 (静薬大)

ヒト神経芽細胞腫培養細胞 NB-OK-1 において VIP 免疫活性が大分子型前駆体から生成されることはすでに明らかにしたが、本研究では NB-OK-1 細胞における VIP と PHM の産生について検討した。

PHI (peptide histidine isoleucine) は、はじめにブタ小腸から単離同定されたペプチドで、27 アミノ酸残基から成り C 末端はアミド化されている。そのアミノ酸配列は、VIP と類似しており、セクレチン/VIP 族のひとつと考えられる。しかも、ラットやブタ小腸において VIP と PHI が同一の神経細胞に共存することを免疫組織化学的に明らかにした。

一方、ヒト神経芽細胞腫培養細胞において VIP 前駆体 mRNA 解析の結果、VIP 前駆体のアミノ酸配列が推定された。VIP 前駆体分子には、PHI のアミノ酸配列に類似した配列が存在し、それは PHI とわずか 2 アミノ酸残基異なるのみであり、C 末端はメオニンアミドであると予想された。この新しく存在が推定されたペプチドを PHM (peptide histidine methionine) と命名した。直ちに PHM を化学合成し、抗 PHM 血清を作製しラジオイムノアッセイ系を確立することにより、NB-OK-1 細胞における PHM の産生を追求することが可能になった。

細胞培養についてはすでに57年度に述べたとおりである。VIP および PHM の産生促進のため 1 mM dibutyryl cAMP を添加した。また、大量抽出のため、NB-OK-1 細胞をヌードマウスに移植して腫瘍を形成させた。培養細胞および腫瘍中のペプチドの抽出は、0.1M 酢酸で行ない、熱処理 (100°C, 5 分間) を加えた。

VIP のラジオイムノアッセイは抗ブタ VIP 血清 (R502) を用いた。PHI/PHM に対するラジ

オイムノアッセイ系は、抗 PHI (1—15) 血清 (R8403), 抗 PHM (13—27) 血清 (R8502) および抗天然 PHI 血清 (T33) を用いた。アフィニティクロマトグラフィは、抗血清 R502 から IgG を精製しセファローズ 4 B に結合したものをを用いた。

まず、NB-OK-1 細胞において産生される VIP 免疫活性のうち 3 K ダルトン成分をペプチド化学的にヒト VIP そのものであることを同定した。ヌードマウスに移植した腫瘍から抽出した粗抽出物をアフィニティクロマトグラフィで精製したのち、HPLC で分離した。NB-OK-1 細胞中の 3 K ダルトン VIP は、溶出位置がヒト VIP と一致し、しかもアミノ酸組成は全く同じであった。さらに³⁵S-PITC を用いて固相シーケンサーでアミノ酸配列を解析した。本腫瘍から得られたヒト VIP のアミノ酸配列は、ブタ VIP のそれと一致した。また、C 末端はアスパラギンアミドであった。以上の結果、ヒト VIP の一次構造は、ペプチド化学的にブタ VIP と同一であることを明らかにした。

次に、PHM の産生について検討した。細胞抽出物を HPLC で分画し、3 種類のラジオイムノアッセイ系で、PHI/PHM 関連ペプチドを調べた。PHM-27C 端部に特異的な抗血清 R8502 および PHI-27 中央部に特異的な抗血清 T33 によって、合成 PHM-27 と同一の溶出位置に免疫活性が認められた。合成 PHI-27 は PHM-27 よりややおくれて溶出するので、この免疫活性は PHI-27 によるものではない。したがって、NB-OK-1 細胞は PHM-27 免疫活性を産生することが明らかになった。このことは、免疫組織化学的にも確認した。すなわち、PHM 陽性細胞は、VIP 陽性細胞と一致した。

一方、PHI-27N 端部に特異的な抗血清 R8403 は、上記の溶出位置には免疫活性をほとんど検出しないが、それよりもわずかに早い位置に免疫活性を検出した。この溶出位置は、VIP-28, PHM-27 および PHI-27 のいずれとも一致しないものであった。さらに、合成 PHM-27 の位置に溶出した PHI/PHM 免疫活性の濃度は、VIP のその 1/2 以下であった。VIP 前駆体には、VIP および PHM 配列が 1 分子ずつ存在するにもかかわらず、細胞には VIP と PHM 免疫活性は等モルでは存在しなかった。これには、1) VIP 前駆体が他にも存在し、それが PHM 配列を含まないこと、あるいは、2) VIP 前駆体はすでに報告されているものだけが存在するが、プロセッシングにおいて PHM の生成が抑制されていることの可能性が考えられる。VIP 前駆体において、VIP 配列は両端ともに塩基性アミノ酸対が存在するが、PHM の場合、N 端側には 1 個の塩基性アミノ酸が存在するのみであった。一般には生理活性ペプチドは前駆体分子上において塩基性アミノ酸対に連結され、これがプロセッシング部位と考えられているが、N 端側における塩基性アミノ酸対の欠落が PHM の生成低下の原因である可能性が考えられた。また、抗血清 R8403 で検出された免疫活性は、VIP 前駆体から VIP および PHI/PHM とは異なるペプチドが生成されている可能性を示唆した。

	NB-OK-1 Tumor	Porcine/Human
Asp	4.8 (5)	5
Thr	1.8 (2)	2
Ser	1.9 (2)	2
Glu	1.4 (1)	1
Ala	2.1 (2)	2
Val	2.0 (2)	2
Met	1.2 (1)	1
Ile	1.1 (1)	1
Leu	3.0 (3)	3
Tyr	1.9 (2)	2
Phe	1.0 (1)	1
Lys	3.2 (3)	3
His	0.9 (1)	1
Arg	2.3 (2)	2
N-Terminal	HisSer	HisSer
C-Terminal	Asn amide	Asn amide

図1. NB-OK-1より単離した3 KダルトンVIPの氨基酸組成および末端氨基酸残基。数字はモル数を示す。

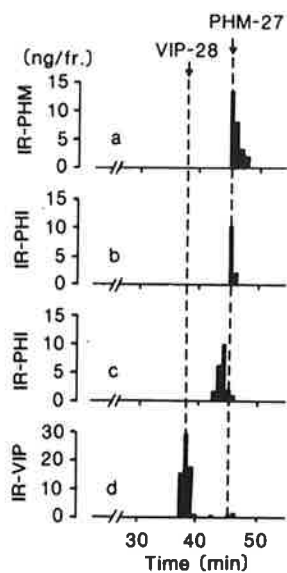


図2. NB-OK-1細胞抽出物中のPHM/PHIおよびVIP免疫活性のHPLC溶出パターン。

HPLCは、ODSカラムにて塩酸/アセトニトリル系で展開。各々下記の抗血清で測定。a. R8502, b. T33, c. R8403, d. R502。

プレプロエンケファリンBに含まれる新しいオピオイドペプチド leumorphin の化学合成と生物化学的性質

山本栄仁, 勝丸由美子, 矢内原昇 (生理研), 矢内原千鶴子,
合瀬友季子 (静岡薬大), 沼 正作, 井村 裕夫 (京都大・医)

遺伝子構造解析からブタおよびヒトプレプロエンケファリンBの全アミノ酸配列が提出されたが, そのC末端部には29アミノ酸残基のオピオイドペプチド類似の leumorphin が存在していた。本研究はヒト leumorphin およびその関連ペプチドを固相法により合成し, 生理活性を検討し, さらに合成ヒト leumorphin を抗原として用い, 特異抗血清の作製およびラジオイムノアッセイ (RIA) 系の確立を行い, 脳組織に免疫活性 leumorphin が明らかに存在することを示し, leumorphin が内因性の新しいオピオイドペプチドの一つであることを示唆したものである。

leumorphin の合成研究では, ベックマン自動ペプチド合成機モデル990Bを用い, 固相法によりヒト leumorphin および leumorphin の (1—13) 位に相当する rimorphin の合成を行なった。確立した合成計画にもとづき合成したペプチドについては, 酸分解物および酵素分解物のアミノ酸分析, トリプシン分解によるアミノ酸配列の決定により, 合成ペプチドのアミノ酸配列を確かめ, さらに逆相 HPLC において2種類の溶媒系で単一ピークを与えたことから, 各合成ペプチドはいずれも高純度であることを証明した。

leumorphin の生理活性は, モルモット回腸収縮阻害によるオピエート活性およびマウス鎮痛効果により比較検討した。合成 leumorphin 活性は, β _k-endorphin のその約4倍, dynorphin の約1/10の活性であり, 一方, 鎮痛効果は, dynorphin (1—13) の約2倍, β _k-endorphin の約1/10の活性を示し, 明らかにオピオイドペプチドとしての活性を示した。また, ヒト leumorphin はブタ leumorphin に比し, 僅かに高い活性であった。その活性部位は leumorphin の N 末端 1—13 配列に相当する rimorphin 部に存在した。

つぎに, 本研究の合成ヒト leumorphin を抗原として用い, 家兔に産生した抗血清 R—0014 は高力価であり, これを用い, leumorphin 特異 RIA 系を確立した。本抗血清の抗原認識部位は各種 enkephalin および endorphin 関連ペプチドの交差反応性から, そのC末端 (14—29) 配列内に存在することを明らかにした。したがって, 本抗血清を用いる RIA 系ではヒト leumorphin と rimorphin を免疫化学的に区別できることがわかった。本 RIA 系を用い, 哺乳動物脳における leumorphin 様免疫活性を検討した結果, その用量反応曲線は標準合成ヒト leumorphin のそれに一致し, 両者は免疫化学的に区別できないことを示した。その免疫活性は橋と中脳にもっとも高濃度であり, ついで視床, 視床下部, 延髄, 大脳前頭葉などにも免疫活性が検出された。これらの結果は脳に明らかに leumorphin またはその関連ペプチドが存在することを示している。すなわち, プレプロエンケファリンBのプロセッシングにより leumorphin またはその関連ペプチドが生

本研究において、オピオイドペプチドの前駆体の一つであるプレプロエンケファリン B 分子のアミノ酸配列にもとづき、推定された leumorphin について、化学合成、生理活性の検討および免疫化学的方法によって、それが新しい内因性オピオイドペプチドであり、生体内に存在することを証明し、さらに新しい研究展開がみられようとしている。今後、新しく発見されるであろう前駆体についても、同様なアプローチで研究が進められると考えられ、本研究はその基礎を確立したものと云えよう。

Porcine:

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr-Arg-

-Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Asn-Ala-Tyr-Ser-Gly-Glu-Leu-Phe-Asp-Ala-OH

Human:

H-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr-Arg-

-Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Asn-Ala-Tyr-Ser-Gly-Glu-Leu-Phe-Asp-Ala-OH

Peptide	IC ₅₀ (nM)
human Leuomorphin	2.49 (1.81 - 3.41) ^{a)}
porcine Leuomorphin	4.70 (2.95 - 7.50)
Leuomorphin(1-13) (Rimorphin)	4.26 (2.84 - 6.39)
Leuomorphin(15-29)	> 1000
Dynorphin	0.34 (0.11 - 0.98)
Dynorphin(1-13)	0.38 (0.14 - 1.00)
β _h -Endorphin	18.2 (8.02 - 32.0)

18

細胞器官研究系

生 体 膜 部 門

概要

生体膜部門は興奮膜およびシナプス膜のイオンチャネルが細胞膜上にいかに形成され、どのような基本的機能を発現するかを解明することを目標に、生理的、生化学的、形態学的アプローチをつとめて一体化させる方向で研究を進めてきた。昭和58年度は各種の2価カチオン、多価カチオンによるイオンチャネル制御の特異性、膜を横切る水の流れによるイオン流とチャネルに対する効果の解析、ニコチン性およびムスカリン性AChリセプターの同定、シビレエイから抽出したメッセンジャーRNAのアフリカツメガニル卵細胞注入によるAChリセプターの発現などの実験をすすめ、見るべき成果をあげた。

細胞内Ca, Mg その他2価イオンによる興奮チャネル制御の共通性と特異性

山岸俊一, 古家喜四夫

〔研究目的〕Caイオンは、細胞内に常時 10^{-8} ~ 10^{-7} Mのイオン化状態で存在し、エネルギー代謝、筋収縮、生理活性物質の放出、膜興奮の制御など多方面の生理機能の発現に重要な役割を担っている姿が次第に明らかにされつつある。本研究では興奮膜の内面から作用してNaチャネルとKチャネルの活動状態を制御するCa, Mgイオンがその作用様式において2価イオンとしての共通の性質を基盤とする面と個々のイオン特異性に立脚する面を明らかにするため、10種の2価イオンおよび3価のLaイオンについて比較検討を行った。

〔研究方法〕切り出したヤリイカ巨大神経線維からローラーで細胞質を押し出したのち、神経を人工海水に浸し、細胞内を25~250 mM K^+ 溶液で灌流し、標準の活動電位と膜電流を記録した。これに0.1~20 mMの濃度範囲で各種2価イオンを加え、膜電位と膜電流の変化を比較検討した。

〔結果および考察〕神経膜内表面に作用する2価イオンの効果の共通の性質としては、膜電位測定で、①活動電位の大きさの減少と、②興奮閾値の一過性の著しい減少が見られる。閾値の減少が著しい場合には電気的刺激なしに、静止膜状態から突然自発興奮が起るようになる。③静止膜には明瞭な一定方向の膜電位変化はないが、膜抵抗は時間とともに減少する。膜電位固定法による膜電流の計測では、① I_{Na} 開始の膜電流の低電位側へのシフト（3~20 mV）、② I_{Na} 値の抑制、③ I_K 値の抑制、がおこる。活動電位の減少や I_{Na} 、 I_K 値の抑制は当然ながら2価イオン濃度の増大と共に大きくなるが、同じ濃度の2価イオンについては標準溶液として灌流している細胞内

Kイオン濃度が増すほど抑制効果は少なくなっている。一方、 I_{Na} の低電位側へのシフトは必ずしも2価イオン濃度には比例せず、 $[Me^{++}] / [K^+] = 1/25$ の濃度比のところで最大のシフトを示した。

一方、個々の2価イオンの特異的效果としてあらわれる性質は、① I_{Na} および I_k 抑制の大きさの違い、および抑制の比率 I_{Na}/I_k の違い、② I_{Na} I_k カイネティクスへの効果、特にNa不活性化過程への効果が挙げられる。

I_{Na} および I_k 抑制の大きさにより、2価イオンは図1に示すように3つのパターンに大別することができた。即ち、(A) I_{Na} , I_k 軽度抑制群；Mg, Ca, Mn, Sr, Co, (B) I_{Na} 軽度抑制・ I_k 強度抑制群；Ba, Zn, Ni, (C) I_{Na} , I_k 強度抑制群；Be, Cd, および3価イオンLaである。Na不活性化過程に対しては(A)殆ど影響を与えない群；Ca, Sr, Co, Ba, Mg(軽度の延長)と(B)大きく不活性化過程を延長させる群；Zn, Ni, Be, Cdの2群に分れた。 I_{Na} , I_k カイネティクス効果については、 I_{Na} 開始の膜電位が低電位側へシフトするものの I_{Na} ピーク値までの立上り時間は変化しない群；Mg, Ca, Mn, Sr等と I_{Na} 立上り時間を延長させる群；Be, Cd, Znに大別することができた。

〔考察〕細胞内2価イオンのイオンチャネルに対する効果はチャネル近傍でのイオン濃度に依存しながら精妙に作用していると推測される。実験の結果としてCa, Mgイオン等が細胞内にあってチャネル制御に機能していると考えられることは、興奮発現の閾値の低下、膜抵抗値の減少である。これは膜が興奮しやすい状態、不安定な状態に変動することであり、外液Caの膜安定化作用とは逆の働きである。だが、もし、細胞内2価イオン濃度が高くなりすぎると I_{Na} , I_k は抑制され、一方膜のリーク電流は大きくなり膜機能そのものが障害をうける結果となる。

2価イオン種により、 I_{Na} および I_k カイネティクスに対する効果が個々に異なるのは、NaチャネルとKチャネルに対する結合の親和性がそれぞれ独立のもので、且つチャネル蛋白の修飾ないし変型の様式も異なることを示唆している。

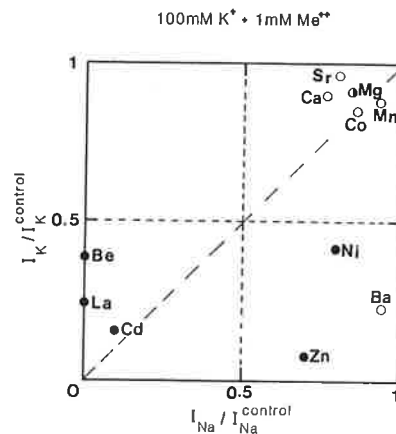


図1. 各種2価イオンによる I_{Na} 抑制比, I_k 抑制比の特徴を示す2次元展開図。

水の流れのKチャンネルに対する作用

久木田文夫, 山岸俊一

〔研究目的〕神経膜イオンチャンネルの構造に関する情報を得るために、水の流れを神経膜に作用させた際のイオンチャンネルの性質の変化を調べる。この方法が薬理学的方法とは異なる情報を与える、イオンチャンネルの「力学的修飾法」となる可能性を検討する。

〔方法〕細胞内灌流したイカ巨大神経線維の細胞内外液の浸透圧を変化させ、神経膜を通して定常的な水の流れを長時間保つ。この条件下でイオンチャンネルの性質を電気生理学的方法で解析する。

〔結果及び考察〕浸透圧差により外向きの水の流れを神経膜に与えると、Kチャンネルの性質が次のように変化する。1)活動電位は大きな後過分極をとまうようになる。2)外向きのK電流に対する E_k が過分極方向にずれ、K電流が大きくなる。3)外液Kイオンに対する感受性が増大する。4)K電流の内向きtail電流は、時間経過が変化することなく、大きさが減少する。5)開いたKチャンネルは外向きの整流性をもつ。

このような変化はKチャンネルのみで観察され、Naチャンネルでは観察されない。

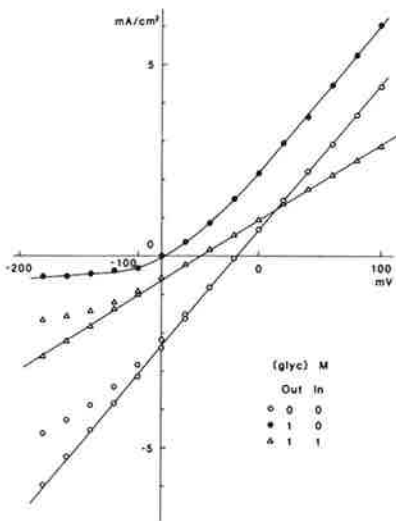


図1. 外向きの水の流れによるKチャンネルの整流性。K電流のinstantaneous電流—電圧特性を示す。外向きの水の流れがある場合は、外向きの整流性があるが(●), 細胞内外液の浸透圧差がないと整流性がない(○, △)。右下の数字は等張内外液に加えたグリセリンの濃度(M)を示す。

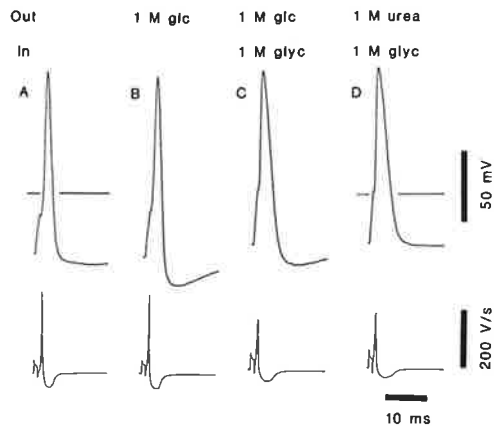


図2. 非電解質による作用の差違。外液に1Mのブドウ糖を加えた場合の活動電位(B)は大きな後過分極をとまなっている。内液に同じ濃度のグリセリンを加えても、外向きの水の流れの効果は完全には消失しない(C)が、外液に尿素を加えた場合の変化は完全に消失する(D)。Aは細胞内外液とも等張溶液の場合の活動電位である。

この変化は細胞内外液をもとの等張溶液に戻しても、すぐには消失しないが、逆向きの水の流れを起こす操作を経ることにより、速やかに除去できる。つまり本現象には履歴現象がある。従って本現象はイオンチャネルの力学的な変形に起因すると考えられる。この変形は浸透圧の値そのものとは関係なく、神経膜を通しての浸透圧差による水の流れが原因となっている。

分子量や親水性の異なる非電解質を用いて、同様の実験を行なうと、膜透過性の高い非電解質ほどKチャネルの性質を変化させる力は弱い。細胞内外液に異なる種類の非電解質を用いると、両非電解質のKチャネルに対する透過性の差違を本現象を通じて、測定できる。

この方法はKチャネル細孔の大きさや細胞膜の厚み方向の構造を知るための手段として期待できる。

荷電ポリアミノ酸のカリウムチャンネルへの影響

古家喜四夫, 山岸俊一

正電荷をもったポリリジンなどの分子をイカ巨大神経線維の内側から作用させるとその興奮性に大きな影響を与える。これらの荷電分子は細胞内表面の負電荷に結合し表面電荷を正側にシフトさせる。しかし興奮性への影響はそのような膜のいわゆる表面電荷の変化は関係せず、イオンチャンネル周辺あるいは内部の電荷に直接作用することによって起っていると考えられる。例えばカチオン化フェリチンはナトリウムチャンネルの不活性化にのみ作用しその時定数を20倍以上延長する。ポリリジン (PLL) などは、ナトリウムチャンネルの不活性化の電圧依存性にもっともよく作用し最大60 mV のシフトをもたらす。一般にカリウムチャンネルに対するこのような電荷の作用は小さいが詳しく解析した結果特異的な作用が見い出された。

ヤリイカ巨大神経線維を細胞内灌流し1〜2分プロネースを作用させ膜内表面を露出させた。外液は人工海水に0.5 μ MTTX を加え、内液は250 mM KF, pH 7.4を用い、0.05 mg/ml のポリリジンなどを添加した。

ポリリジンを作用させた場合外向きカリウム電流は静止電位では半減するが保持電位を-100 mV にすると回復する。その時のカリウムチャンネルのコンダクタンスや最大電流の半値に達するまでの時間などの電圧依存性に大きな変化はみられなかった。図1には tail 電流に対するポリリジンの作用を示す。tail 電流から求めたカリウムチャンネルのコンダクタンスや平衡電位も大きな変化はみとめられなかったが、tail 電流の減衰は著しく遅くなっていることがわかった。図2にその時定数 (τ_{tail}) の電圧依存性を示す。 τ_{tail} は、ポリリジンによって約2倍に延長する。あるいは電圧軸に対して35 mV 以上シフトしているとも考えられる。以上のことからポリリジンはKチャンネルの開く ON の kinetics には、影響しないが、それが閉じる OFF の kinetics に特異的に作用することが明らかになった。

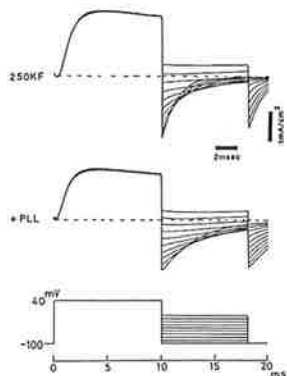


図1. tail 電流に対するポリリジンの作用。

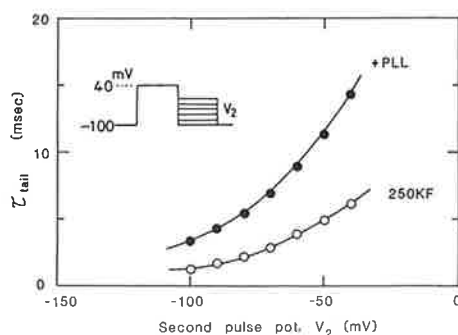


図2. tail 電流の減衰の時定数に対するポリリジンの作用。

ラット胎児脳のニコチン結合部位の発生

杉山博之

脊椎動物の骨格筋や、電気魚の発電器官など、末梢組織におけるニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)については、近年モノクローナル抗体法や遺伝子工学的手法等の適用によってその分子の特徴が極めて詳細に理解されるようになって来た。これに比べて、中枢神経系のnAChRについては余り知見が進んでおらず、依然として不明の点が多い。その理由のひとつは、末梢性nAChRに対して劇的な有効性を発揮した α -ブングロトキシンが、中枢性nAChRの場合には必ずしも有効に作用しないように思われる点にある。そこで最近、中枢性nAChRの識別法として α -ブングロトキシンではなくニコチンやアセチルコリンそのものを用いて、その結合部位を検討し直そうとする試みが行われるようになった。我々も、 $[^3\text{H}]$ ニコチンを用いてラット脳におけるニコチン結合部位の性質を、特にその胎生期における発生過程に注目して検討した。

胎生ラット脳のニコチン結合部位は、成熟ラットのそれと比較すると量的にはずっと少ないが、その性質は極めて類似していることが次の諸点から明らかとなった。

- (1) $[^3\text{H}]$ ニコチンに対する結合親和性が同程度である(図1)。成熟ラットの場合、 K_D (解離定数)はおおよそ20 nMと測定された。胎生ラットの場合、量が少ない等の理由のため、正確な測定が極めて困難であったが、図に示すようにほぼ同程度の K_D 値をもつことが分った。
- (2) $[^3\text{H}]$ ニコチンの結合はいずれの場合も、生理的濃度のアセチルコリンやカルバミルコリンと拮抗し合う。
- (3) α -ブングロトキシンは、1 μM の濃度(末梢性nAChRに対する有効濃度の1000倍以上)においても、成熟ラット・胎生ラット脳のいずれの $[^3\text{H}]$ ニコチン結合に対しても有意の影響を与えない。

胎生期における $[^3\text{H}]$ ニコチン結合部位は、図2に示すような経過で発生して行くことが分った。すなわち、胎生15~16日目頃から特異的結合部位が検出されるようになり、出生時期までに数倍増加する。出生後は、成熟までの間に更に数倍増加する。この発生パターンは、既に知られているムスカリン性アセチルコリン受容体の脳における発生パターンと極めて類似しており、 $[^3\text{H}]$ ニコチンによって識別している部位がnAChRであるとの考えを支持する結果である。

以上の諸結果から、 $[^3\text{H}]$ ニコチンは成熟・胎生いずれのラットにおいても中枢性nAChRを識別する有効な手段であると考えられること、これに対し α -ブングロトキシンは中枢においては必ずしも末梢における程明確にアセチルコリン受容部位を識別するとは考えられないことが示唆された。(尚、本課題は米国テキサス州立大学、萩野信義教授との共同研究として実施したものである。)

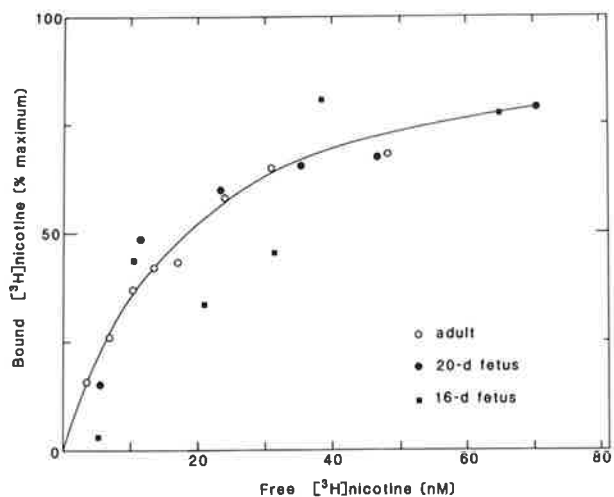


図1. ラット脳粗膜分画への $[^3\text{H}]$ ニコチンの特異的結合を表わす結合曲線。○, 成熟ラット; ●および■, 胎生20日および16日のラット胎児。

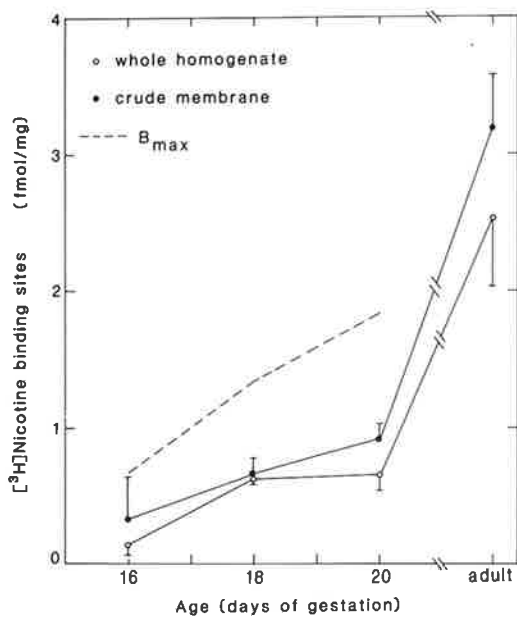


図2. 胎生ラット脳における $[^3\text{H}]$ ニコチン結合部位の発生。
20 nM の $[^3\text{H}]$ ニコチンによって全ホモジェネート (○) または粗膜分画 (●) 中に検出される特異的結合部位数を、脳湿重量1 g 当たりの量で示す。破線は K_D が20 nM と仮定したときの最大結合部位数を表わす。

ブタ脳ムスカリン性アセチルコリン受容体の部分精製および生化学的解析

八木沢仁（特定領域奨励研究員），杉山博之，山岸俊一

ムスカリン性アセチルコリン受容体（mAChR）はニコチン性アセチルコリン受容体（nAChR）に比べて生化学的側面からの研究が著しく遅れている。これは活性を保持した状態での可溶化が後者に比べて極めて困難であること、後者の場合における適当な材料組織（電気魚発電器官）やアフィニティークロマトグラフィーに利用できるリガンド（ α -ニューロトキシン）に相当するものが見当たらないことなどの理由によるものである。

膜タンパクは多くの場合糖鎖の添加をうけている。近年、nAChRなどいくつかの神経伝達物質受容体が糖タンパク質であることが判明し、またこれらの糖鎖が受容体の代謝回転に重要な役割を果たしているらしいことなど糖鎖の生理学的意味にも注目が集まりつつある。我々はブタ脳に存在する mAChR について、この受容体が糖タンパク質であるかどうかを検討した。その結果、mAChR がおそらく複合型糖鎖をもつこと、この糖鎖の性質を利用してアフィニティークロマトグラフィーによる受容体精製純度の向上をもたらすことができることが判明した。また、ある種の界面活性剤では可溶化した mAChR には、糖鎖に関する不均一性が存在することを示唆する結果を得た。さらに、糖鎖がリガンド受容機能に果たす役割を検討し、レクチンの添加によって、膜状態における受容体のアンタゴニストに対する結合親和性が上昇するという結果を得た。

ブタ脳ホモジェネートより粗シフトソーム画分を調整し、放射標識したムスカリン性アンタゴニスト（ $[^3\text{H}]$ QNB:quinuclidinyl benzilate または $[^3\text{H}]$ PrBCM: propylbenzilylcholine-mustard）を加えて前標識し、非イオン性の界面活性剤で可溶化した。遊離のリガンドをゲルろ過で除き、各種レクチンを固相化したセファロースレジンを加えると、一定時間後上清に残る放射活性を測定することによって mAChR とレクチンとの結合を調べることができる。図 1 に示すように、種々のレクチンのうち小麦胚レクチン（WGA）が顕著に可溶性 mAChR と結合し、この結合は WGA の阻害糖である N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）で完全に阻害されることが示された。また、界面活性剤として Lubrol-PX を用いた場合、可溶化受容体画分には WGA と結合しないポピュレーションが約 1/3 程見いだされた。これまで薬理的解析によって mAChR には機能的側面からみてサブクラスが存在することが指摘されているが、この結果は構造的側面からも受容体に不均一性が存在することを示唆している。mAChR の少なくとも一部のポピュレーションが WGA と結合することから、同受容体の精製に WGA-セファロースによるアフィニティークロマトグラフィー法を導入した。WGA-セファロースカラムに結合させた mAChR を GlcNAc の濃度勾配によって溶出させると、このステップだけで約 12 倍の精製を達成することができ、この操作が同受容体の精製に有効であることが示された。さらに、調整用 SDS ポリアクリルアミド電気泳動によって分子量によるふるいをかけることにより、最終的に推定純度 1～5 %

の mAChR を調整することが可能となった。

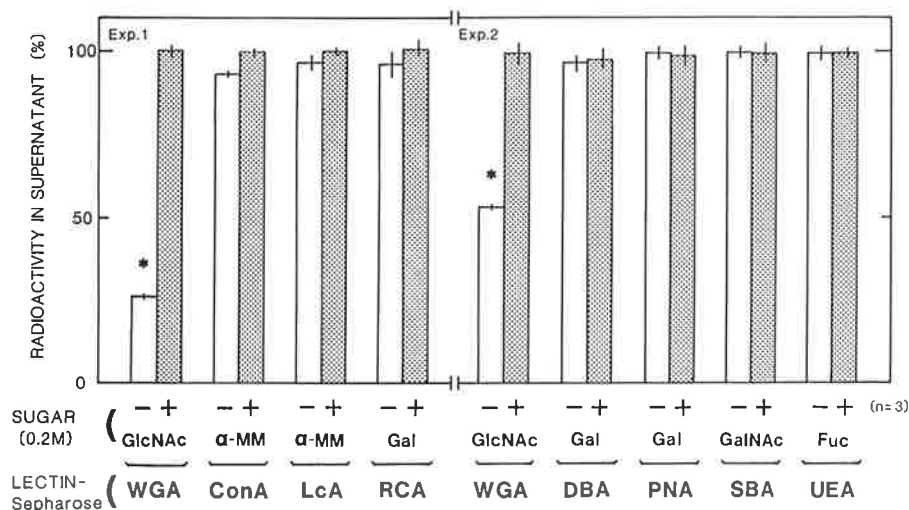


図1. 可溶性 mAChR と各種レクチンの結合反応。

粗シナプトソーム画分を $[^3\text{H}]$ QNB で前標識し、1% Lubrol-PX で可溶化した。超遠心上清より遊離のリガンドを除き、各レクチンセファロースを阻害糖の存在下・非存在下で加えた。インキュベーション (4℃, 4時間) ののち遠心し、上清に残る放射活性を測定した。Exp. 1: ゲル・レジンのレクチン結合量=7.5 mg/ml gel, Ca^{2+} 及び Mn^{2+} (共に 0.4mM) を含むトリス緩衝液使用。Exp 2: ゲル・レジンのレクチン結合量=1.0 mg/ml gel, リン酸ナトリウム緩衝液使用。

レクチンは種々の細胞の膜表面糖鎖と結合することによって細胞の生理応答の変化を惹起せしめることが知られている。特に mAChR が糖タンパクであることが判明したのでそのリガンド結合能に対するレクチンの影響を検討した。レクチンとしては WGA とコンカナバリン A (ConA) を用いた。いずれのレクチンの存在下 (10~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) でも、粗シナプトソーム画分に対する $[^3\text{H}]$ QNB の結合は添加レクチンの濃度上昇にともなって上昇した (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ レクチンで 1.5~2 倍)。この結果をスキッチャード解析すると (図2), レクチンは $[^3\text{H}]$ QNB の最大結合数 (B_{max}) を変えずに親和性を上げている (K_d 値の減少) ことが明らかになった。一方、粗シナプトソーム画分に対する $[^3\text{H}]$ CD: *cis*-methyl dioxolane (ムスカリン性アゴニスト) の結合はレクチンによる影響を受けなかった。さらに粗シナプトソーム画分をジギトニンで可溶化した受容体画分に対して $[^3\text{H}]$ QNB の結合を調べると、両レクチンともにその添加によって結合が減少する傾向を示した。スキッチャード解析から、最大結合数には変化はなく、親和性が低下することが判明した。以上から、膜状態で存在する mAChR は可溶化状態とはことなり、自身を含めてレクチン結合性の分子と相互作用を持ち、レクチンは膜上での分子間相互作用をとおして受容体分子の、おそらくコンホメーション変化に起因するアンタゴニスト結合能の変化 (親和性の増

大)を引き起こすが、これに対して可溶化状態では、レクチンは受容体—レクチンコンプレックスを形成し、おそらくは立体障害に起因する受容体のアンタゴニストに対する親和性の低下をもたらすものと考えられる。

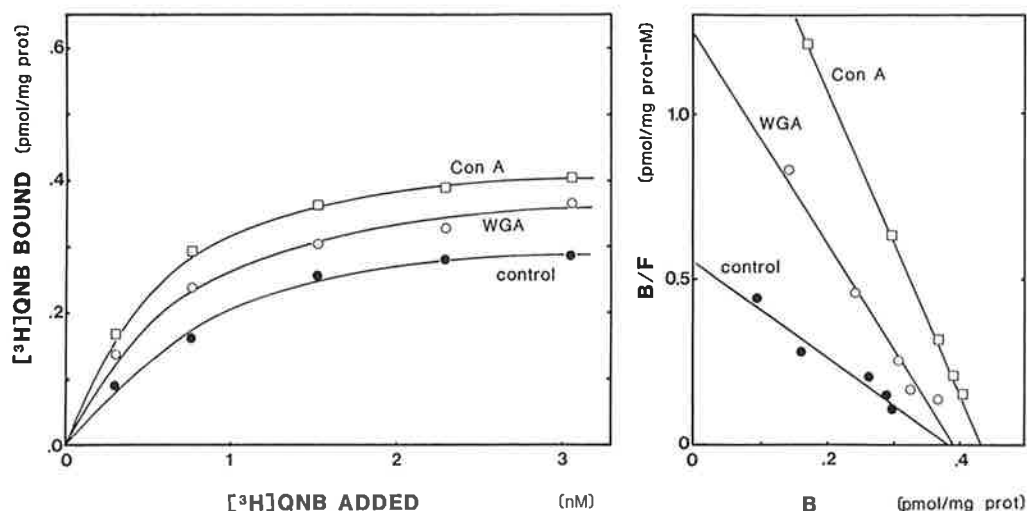


図2. mACHR(膜状態)のアンタゴニスト結合能に対するレクチンの影響
粗シナプトソーム画分を Ca^{2+} 及び Mn^{2+} を含むトリス緩衝液にけん濁し、0.3~3 nMの $[^3\text{H}]\text{QNB}$ を WGA, あるいは ConA (各 $20 \mu\text{g/ml}$) 存在下・非存在下で加えた。インキュベーション (25℃, 45分) ののちガラスろ紙上に膜画分を回収し、 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ の結合 (特異的結合) を測定した。左は結合曲線、右はそのスキッチャードプロット。

シビレエイメッセンジャー RNA の注入によるアフリカツメガエル 卵母細胞でのアセチルコリン受容体の翻訳発現

広野 力 (特定領域奨励研究員), 杉山博之, 山岸俊一

〔研究目的〕組織に組み込まれたままでは電気測定が困難なイオンチャネルを、それらのメッセンジャー RNA (mRNA) をカエル等の卵母細胞内に注入することによってその表面に翻訳発現させ、容易に測定できるようにした後、それらのイオンチャネルの機構を解明することを目的とした。その第一段階として、シビレエイの発電器官から抽出した mRNA を注入した卵母細胞表面にニコチン性アセチルコリン受容体の機能が発現するという報告¹⁾を追試し、更にその受容体チャネルに関して新しい知見を得ることを試みた。

〔材料及び方法〕mRNAはシビレエイ *Narke japonica* の発電器官からグアニジン・熱フェノール法

とオリゴ (dT) カラムを用いて poly (A)⁺ RNA として抽出・精製した。コラゲナーゼ処理で濾胞細胞を剥したアフリカツメガエル *Xenopus laevis* 卵母細胞に mRNA の水溶液 (OD₂₆₀ 約 10) 60 nl を注入し, 2, 3 日 Barth の medium 中で培養した後アセチルコリンに対する応答をガラス微小電極を用いて測定した。

〔結果〕コラゲナーゼ処理後の卵母細胞は Barth の medium 中での静止膜電位が約 -50 mV で通電により +60 mV 程度に脱分極させると興奮するが, アセチルコリンに対する明確な応答は観測されなかった。mRNA を注入した卵母細胞は 2 日後で約 70% が生存しており, この内の大部分にアセチルコリンに対する明確な応答がみられた。膜電位固定法により膜電位を様々な値に保った場合のアセチルコリンに対する電流応答から, この受容体チャネルを通るイオン電流の逆転電位は -10 mV と求められた。更にこの受容体チャネルに関して以下のような知見が得られた。

- (1) 比較的大きな電流応答が得られた卵母細胞のアセチルコリンに対する dose-response 曲線は図 1 のようであった。
- (2) アセチルコリン 10 μ M 以上に対する電流応答には脱感作がみられた。
- (3) 10 μ M アセチルコリンに対する応答の d-tubocurarine による inhibition 曲線が得られた。これを図 2 に示す。

〔文献〕

- 1) E. A. Barnard, R. Miledi and K. Sumikawa Proc. R. Soc. Lond. B 215, 241-246 (1982)

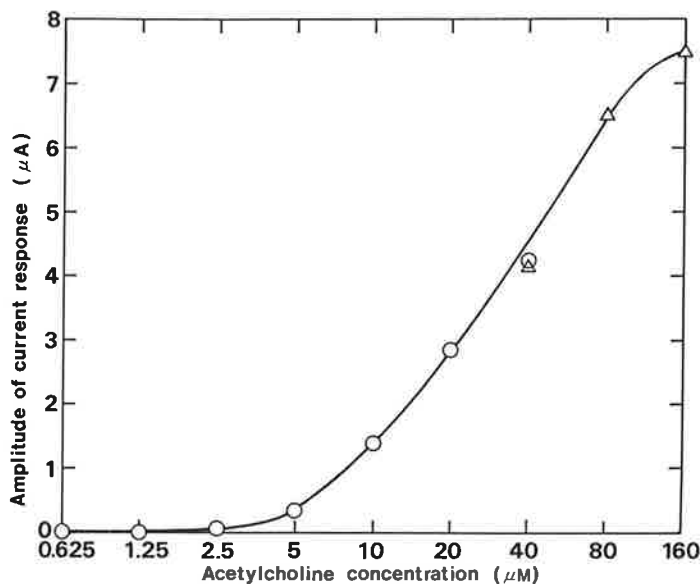


図 1. 膜電流応答のアセチルコリンに対する dose-response 曲線. 膜電位 V_m を -40 mV に固定し, 各濃度のアセチルコリンを含む Barth の medium を細胞の外側に灌流したときの内向き電流のピーク値を測定した。○と△は別々の細胞から得られたデータ。

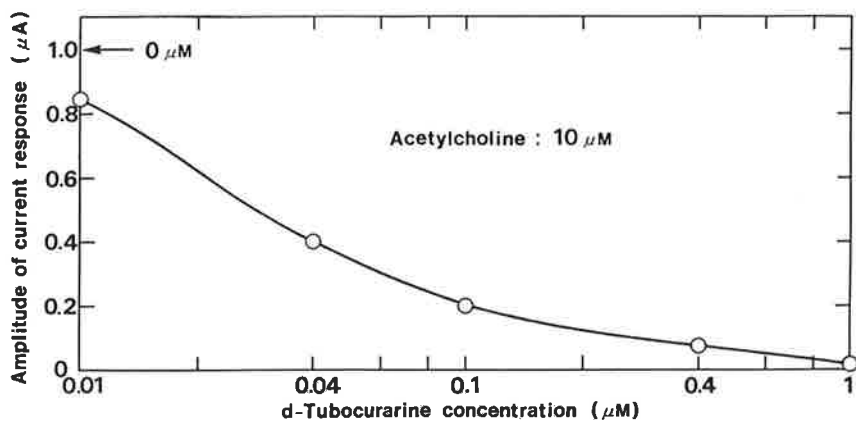


図2. $10\mu\text{M}$ アセチルコリンに対する膜電流応答の d-tubocurarine による inhibition 曲線. あらかじめ各濃度の d-tubocurarine を含む溶液中に置いた卵母細胞に同濃度の d-tubocurarine と $10\mu\text{M}$ のアセチルコリンを含む Barth の medium を灌流したときの内向き電流のピーク値を測定した. V_m は -40 mV に固定した. 矢印は d-tubocurarine が $0\mu\text{M}$ のときの応答の平均値を示す.

機能協関部門

概要

本研究部門の研究目標は、興奮性膜のチャンネルの活動を電気生理学から独立した方法で検出することに主力が注がれている。このため、興奮に伴う光学的変化および力学的変化を検出・記録すると同時に、その物質的基礎となるチャンネル蛋白の抽出を行っている。昭和58年度には、旋光性の変化をよいS/Nで記録することに成功し、直線二色性変化のシグナルを検出し、イカ巨大線維の細胞内骨格と興奮性との関係を明らかにした。また、チャンネル蛋白をアフィニティクロマトグラフィーにより一挙に精製することにも成功した。

光弾性モジュレータによる神経の旋光性・直線二色性変化の検出

渡辺 昭

神経線維は、興奮にさいしてその光学的性質を変化させる。現在までに、散乱・吸収・複屈折・蛍光の変化が報告されている。これらの変化のシグナルのうち、蛍光・吸収・複屈折のシグナルについては、特に精細な検討が行われ、膜電位変化にかなり忠実に追従することが認められている。この事実から、細胞内電極の刺入が困難な小細胞の膜電位の誘導に光学シグナルを用いる方法が開発されて成果をあげている。一方、膜高分子の興奮に伴う変化を光学的手段により観測しようという試みには、今まで成功を見ていない。高分子のコンフォメーション変化を検出する手段の一つとして、旋光性があるので、神経の興奮に伴う旋光性変化の検出を試みた。光弾性モジュレータを用いることにより、シグナルのS/Nを改善し、シグナルの特性について詳細な検討を行うことができた。

〔方法〕図1に検出装置の概要を図示した。光源から出た光は、干渉フィルタ(I)によって単色光となり、鏡で方向をかえたのち、円偏光子(CP)および光弾性モジュレータ(PEM)をへて、光学用チェンバー(Ch)の中の神経に当たる。光弾性モジュレータの作用により、入射光は、方位角が $+45^\circ$ の直線偏光から、 -45° の直線偏光へと周期的に変化する(変化の周期は50 KHz, 図2を参照)。この光は検光子を経て光検出器に入る。もし、検光子の透過軸の方位角が、光弾性モジュレータの振動方向に並行または垂直であれば、サンプルに旋光性や複屈折性のないとき、光検出器の出力はDC成分のみとなる(図2のA-C参照)。しかし、サンプルに旋光性があれば、光検出器の出力には50 KHzの交流成分を生ずる(図2, GおよびK)。この交流成分をロックインアンプにより整流してとり出すことによって、旋光性の大きさや方向を知ることができる。このシステムは、サンプルに複屈折性があっても50 KHzの交流成分を発生するので、複

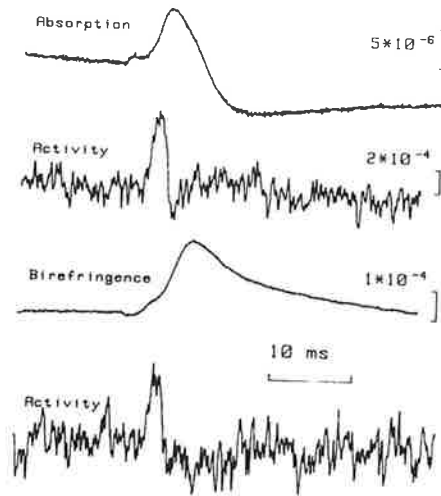


図3. 旋光シグナルの例。材料はエビの歩脚神経。外液は自然海水で33 μ MのMerbrominを含む。上のトレースはロックインアンプを通さずにえられたシグナルで吸収変化を示す。次のシグナルは、ロックインアンプの出力変化のシグナル(Lーシグナル)。3番目のトレースは、光弾性モジュレータを止め、検光子を45°回転し、チェンバーの下に直線偏光子を入れて検光子との間の角度を90°にして記録した複屈折性シグナル。4番目のトレースは、複屈折性シグナルを記録したあとで記録したLーシグナル。1番目と3番目のトレースでは、較正は背景光との比で示され、上向きのフレは光の減少を示す。2番目のトレースの較正は4番目のトレースにも適用でき、ロックインアンプのDC出力と変化との比を示。上向きのフレは左旋性の増大を示し、較正は約 2×10^{-4} 度の変化に相当する。波長は570nm。18℃。

方向)での散乱光の変化との合成で、減光(extinction)シグナルと呼ぶべきものである。二番目のトレースがロックインアンプの出力を増巾したもので、旋光変化が主要成分と考えられるが、かりにこれをLーシグナルと呼ぶ。Lーシグナルの特徴の一つは、その時間経過が速やかであることで、5ms以内に終わってしまうことが多い。これは、複屈折性変化のシグナル(第三のトレース)と比較すれば明らかである。複屈折性のシグナルは、光弾性モジュレータをとめ、チェンバーの下に直線偏光子を挿入し、神経に対し45°の方位角とし、検光子も神経に対して45°の方位角として、ロックインアンプを使用せず、光の強度変化を測定する、という標準の方法によっている。この例では、複屈折性のシグナルの上昇期にLーシグナルは終了しており、むしろ差の著しい例であるが、どの例をとってもLーシグナルの時間経過は速やかなのが普通であった。このことは、Lーシグナルが複屈折性変化とその起源をことにすることを物語るものである。複屈折性のシグナルは、膜電位依存性であるとよくいわれるが、このことはエビの神経などでは決して正しくなく、活動電位のあとに長い尾をひいていることが知られているので、おそらくLーシグナルは複屈折性変化のシグナルより密接に活動電位の発生と時間的に同期しているものと考えられる。

L-シグナルの今一つの特徴は、検光子を 90° 回転させると、その方向が逆転することである。図4にその例を示す。このような逆転は、神経の興奮にさいしての光学的変化が、光の偏光

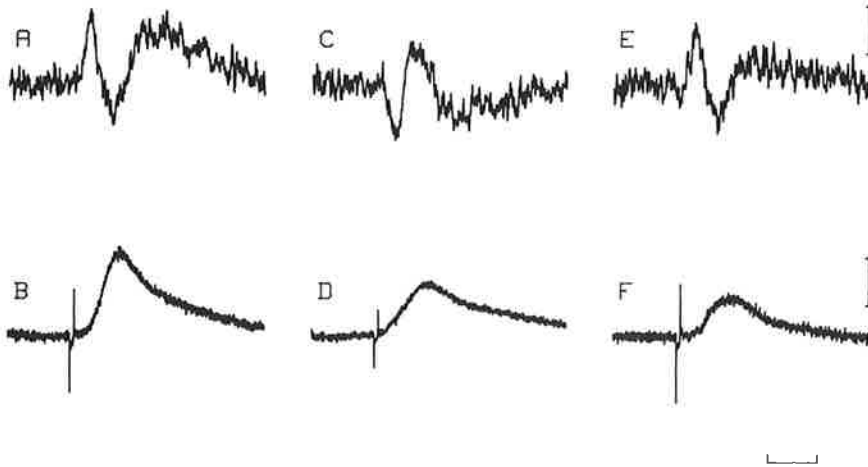


図4. 検光子の方位角を 90° 回転させた時のL-シグナルの変化。A—EはL-シグナルで、B—Fはロックインアンプを通さないで記録した吸収シグナル。AとB, CとD, EとFは、それぞれ同時に加算平均を行って得たシグナル。材料はエビの歩脚神経。外液は自然海水で $10\mu\text{M}$ の Merbromin を含む。上の較正は旋光にして約 5×10^{-5} 度（ロックイン出力の 8×10^{-5} ）。下の較正は背景光の 10^{-5} ，時間は10ms，それぞれの記録は512回の平均加算の結果である。上のトレースの上向きのフレは右旋性の増加を示し，下のトレースの上向きのフレは光の減少を示す。検光子の方位角は，A, Bで 0° ，C, Dで 90° ，E, Fで 0° 。神経の方位角はいつも 0° 。570nm。16℃。

の状態を変化させた時にのみ起る。したがって、L-シグナルは、旋光性の変化か、複屈折性の変化によって起っていることになる。偏光状態の変化を伴わない単なる強度変化、または光学的現象に関係のない変化（たとえば、刺激によるアーテファクト、興奮に伴う神経の体積変化）によっては、この現象は生起しない。直線二色性の変化は、偏光状態の変化を伴うので考慮すべきであるが、検光子を 90° 回転させても反転しないことが理論的にいえるので一応否定しうる。これについては図6で論ずる。L-シグナルが吸収シグナルの副産物でないことは、図3のトレース1と2の時間経過の差からも結論できる。また、量の上でも、L-シグナルはロックイン出力のDC分との比が 10^{-4} 以上であるのに対し、吸収のシグナルはしばしば 10^{-5} 以下であるので、現在の精度ではその影響はほぼ無視できる。

これに対して、複屈折性のシグナルの関与は、必ずしも無視できない。この2つのシグナルを区別する簡単な方法は、チェンパーを回転させてL-シグナルの変化を見ることである。この操作によって、旋光のシグナルはその大きさをほとんど変化させないが、複屈折性のシグナルは、 1° 程度の回転で大きさや方向をかえることが理論的に結論できる。図5は、そのような実験の

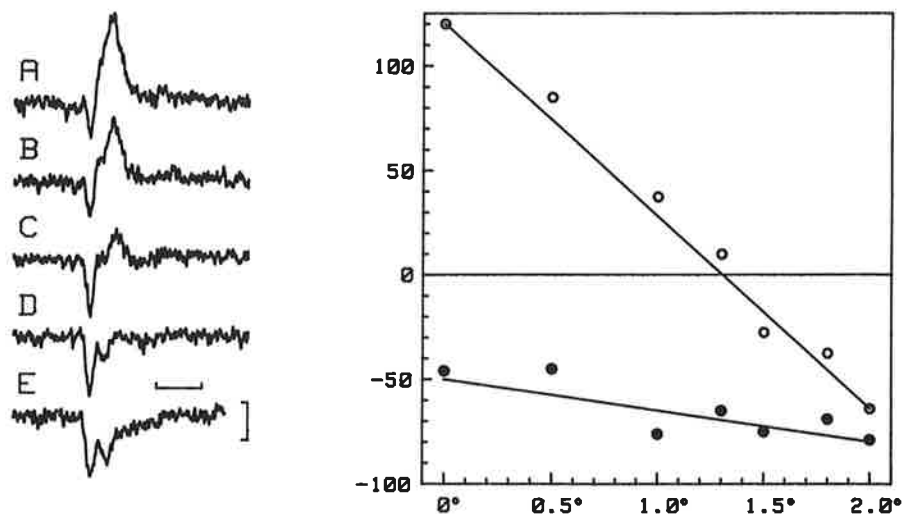


図5. 神経の方位角の変化によるLーシグナルの変化。AーE Lーシグナル。検光子の方位角は 0° , 神経の方位角は, A, B, C, D, E でそれぞれ 0° , 0.5° , 1° , 1.5° , 2° (反時計方向への回転を正にとる)。時間は10ms, 較正は, ロックインアンプの出力を電流電圧変換器の出力で割った比で, 5×10^{-5} を示す。上向きのフレは右旋性の増大。グラフは, Lーシグナルの第1のピーク (黒丸) と第2のピーク (白丸) を神経の方位角に対してプロットしたもの。縦軸はロックインアンプの出力を, 電流電圧変換器の出力で割って 10^6 倍したもの。外液は自然海水。570nm。18℃。

一例であって, Lーシグナルの第一相は, 回転によってほとんど変化しないのに。第二相が大きく変化していることがわかる。このことは, 第一相が旋光性シグナルであり, 第二相が複屈折性シグナルを含むことを示す。複屈折性シグナルは, 標準的な方法で記録できるので, これとLーシグナルの1つとを加えあわせることにより, 他のLーシグナルを再構成することも可能である。すなわち, Lーシグナルには, 神経の方位角により, 複屈折性シグナルが混入することがあるので, おそい成分が現われた時には, 神経を回転させて検討しなければならない。

直線二色性の関与を検討するために, チェンバーを 45° 回転させてLーシグナルの誘導を行った。記録の一例を図6に示す。第一のトレースは直線二色性のシグナルで, かなりよいS/Nで誘導することができる。しかし, その波形は, チェンバーを回転しないでえられたLーシグナルとは全く時間経過を異にし, 現在の精度では, 旋光シグナルに対する直線二色性のシグナルは無視しうることがわかる。チェンバーの方位角を ρ とすると, 直線二色性のシグナルは, $\sin 2\rho$ に比例することが理論的に結論できるので, 第二のトレースを記録したさいの方位角の誤差を 1° と考えると, 第一のトレースに0.035を乗じたものが, 第二のトレースに影響を与えられられるが, その影響は, おそい相にわずかに認められるにとどまる。直線二色性のシグナルは, 複屈折性のシグナルより時間経過はおそく, しばしば 5 ms 程度の不応期をもって現われた。吸収の

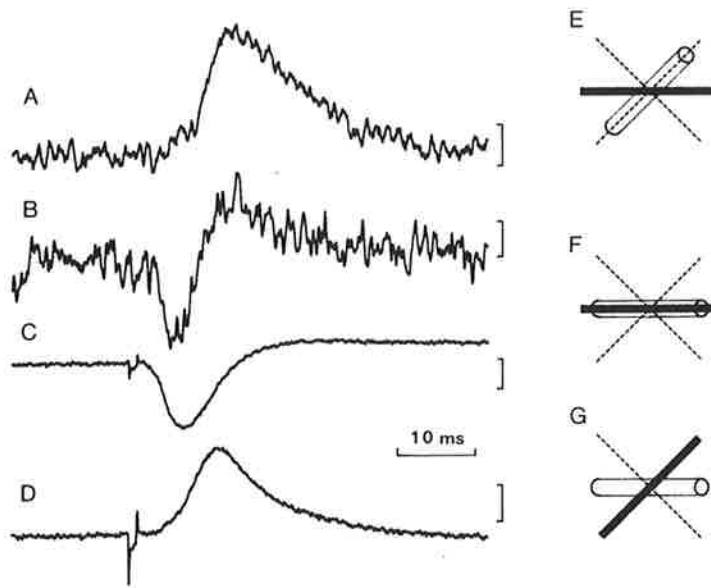


図6. 直線二色性シグナルと、同じ神経から誘導した他の光学シグナルとの比較。A, 直線二色性のシグナル。較正は、ロックインアンプ出力の変化分を、光強度（電流電圧変換器の出力）で割った比で 5×10^{-5} を示し、上向きのフレは、神経の長軸方向の吸収の増大を示す。B, 旋光性シグナル。上向きのフレは右旋性の増大を示す。較正はロックインアンプの変化分を光強度で割った比で、 2×10^{-5} を示す。C, B と同時描記した吸収のシグナル。較正は背景光の 10^{-4} , 上向きのフレは光の減少。Dは、複屈折性のシグナル。較正は背景光の 10^{-4} , 上向きのフレは光の減少。時間は10ms。波長は570nm。15℃。Eは、Aを記録した時の方位角の関係を示す。2つの点線は20 μ sごとに交代する2つの入射光の方位角。円筒は神経の長軸方向を示す。太線は検光子の方位角を示す。Fは、BとCを記録した時の方位角の関係を示し、神経の方位角がゼロである以外はEと同じ。GはDを記録する時の方位角の関係で、光弾性モジュレータを止めて直線偏光子を挿入したため、入射光のベクトル（点線）は1つだけ示されている。

シグナルには早い相が存在するが、これに同期した直線二色性のシグナルが小さいことは興味深い。

〔討論〕旋光性のシグナルについて現在直面している最大の疑問は、その方向が一定しないことである。ある神経は、興奮にさいして右旋性の上昇を示し、他の神経は左旋性の上昇を示す。この解釈として、(a) 神経線維の膜に、興奮によって右旋性の増大する成分とがあり、これらが競合しているのではないか？ (b) 旋光性を示す要素に直列に複屈折性を示す要素が存在し、複屈折性が 90° を超えるとき、旋光はその方向を逆転させることが理論的に示される。そのような光学的な効果ではないか？ などの可能性が考えられる。

(a) については、旋光性のシグナルの中に鋭い二相性の時間経過を示すものがあるので、この可能性を考える一つの根拠となる。(b) については、神経の複屈折性を測定すると 90° を超える値がえられることがあるので、可能性は除外できない。イカの巨大線維についての実験が成功すれば、この問題も解決されるものと思われる。

細胞骨格の興奮膜に対する機械的支持補強作用

寺川 進, 中山 孝

興奮現象の分子機構を解明するのに、興奮性維持に必要な分子を同定し、それぞれがどのような役割を担っているかを調べるのは重要なことである。最近、細胞骨格と興奮性膜の関係について様々なことがいわれているが、実験結果とその解釈には色々な問題点があり、研究者間の意見の一致はみられていない。我々は、この問題を解くため、イカの巨大神経の細胞骨格が興奮性膜に対してもつ機能を多角的に調べた。そして細胞骨格は興奮膜を機械的に支持補強していること、興奮の分子機構には直接関与していないことの2つを明確にした。

ガラス管をイカ巨大軸索の両端から挿入する方法によって細胞内灌流を行った。流入側のガラス管にポリ管を介して注射筒をつなぎ、注射筒の中に灌流液を入れ、この高さを変えることにより細胞内圧を制御した。細胞内電極を灌流部分の中央におき活動電位記録、静止電位記録および膜電位固定を行い、灌流液を種々に変えて細胞内圧の興奮性に対する効果を調べた。細胞内液の塩が主としてKFである場合には、十数 cm H_2O の内圧の上下は活動電位と静止電位の大きさにあまり影響を与えない。膜電位固定法で測定される内向き電流とコンダクタンスは圧が高いときに約20%減少するが、圧を高いままに維持してもそれ以上減少していかない。一方灌流液中の塩をKClまたはKBrに変えると細胞内圧の効果は著しく大きくなる。即ち、十数 cm H_2O の圧をかけておくと15分から30分のうちに活動電位の大きさが減少し、脱分極が起って、遂には全く興奮しなくなる。しかし、細胞内圧を0にすると(内外の圧差を無くすと)再び興奮性はもどってくるのである。この様子を図1に示す。しばらくして圧を上げると今度は急速に興奮性は失われる。圧をかけなければ、KClが細胞内にあっても100分以上完全な興奮性が保たれる。

細胞内灌流液中のアニオンが細胞骨格に及ぼす影響を電顕的に調べた。軸索の興奮性を調べたのち、グルタルアルデヒドと OsO_4 で固定し、エチルアルコールで脱水、臨界点乾燥して走査電顕により、また一部はSpurrレジンに埋め込んで透過電顕により観察した。灌流液中の塩がKFの場合には、膜近傍数 μm の領域の微小管やニューロフィラメントは、その形態をよく維持している。しかし、KCl(またはKBr)の場合には15分~60分以内に完全に溶解、消失してしまう(図2)。

5~10 mM のコルヒチンを含む溶液を細胞内に流すと、膜電位固定法によって測定される内向

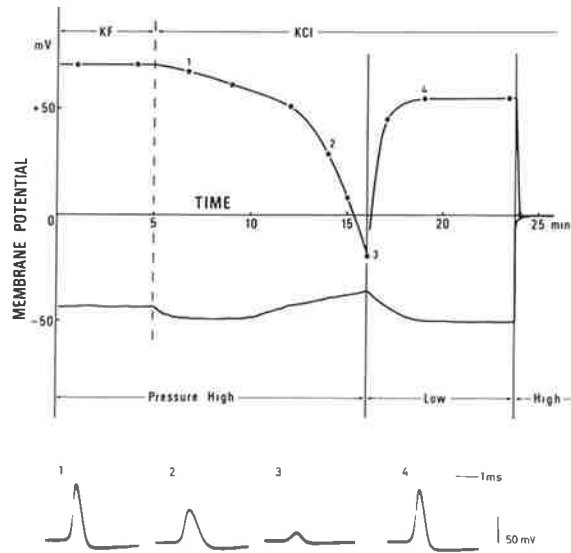


図1. 細胞内液が400 mM KClを主として含むときの、活動電位のピーク値（黒丸）と静止電位（実線）に対する細胞内圧の効果。圧力は約15 cm H₂O (High)と0 cm H₂O (Low)とにしている。縦軸の0は細胞外液の電位レベルを示す。活動電位の記録にそえられた数字はグラフ中でその記録が得られた時点を表わす。

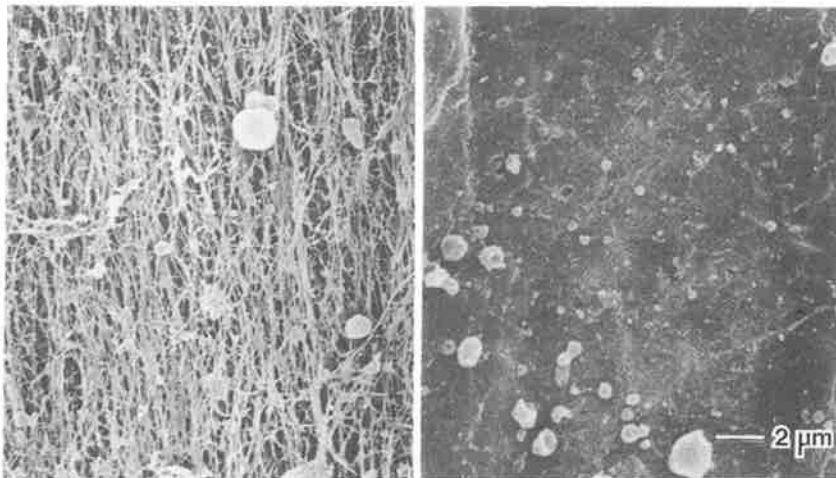


図2. 細胞内灌流した軸索の内表面の走査型電子顕微鏡写真。左 400 mM KF 溶液にて1時間灌流後のもの。右 400 mM KCl 溶液を1時間細胞内においたもの。

き電流は10分で対照の半分に減少し、以後一定の値となる。このコルヒチンの効果も細胞内圧に依存する。即ち、コルヒチン導入後に細胞内圧を0にしておくと一時的に内向き電流は減少するが、その後回復してしまう（図3）。細胞内をコルヒチンで処理後コルヒチンを除くと内向き電流

の回復が見られ、細胞内圧を下げるとこの回復が促進されてはじめてのレベルに完全にもどってしまう。

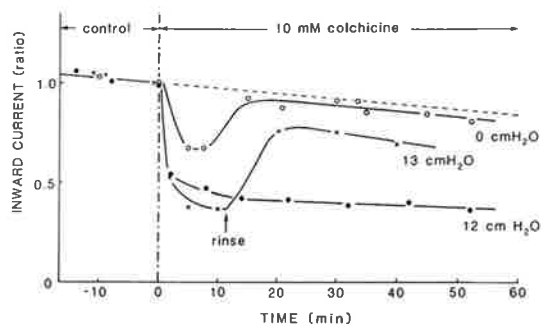


図3. 膜電位固定法によって測定される内向き電流に対するコルヒチンの効果。100 mM KFで細胞内灌流してあり、時刻0で細胞内に10 mMコルヒチンを導入した。×印の記録のみrinseの時点でコルヒチンを除去した。○印の記録では時刻0より3分間細胞内圧を約8 cm H₂Oに上げてコルヒチンを導入した。

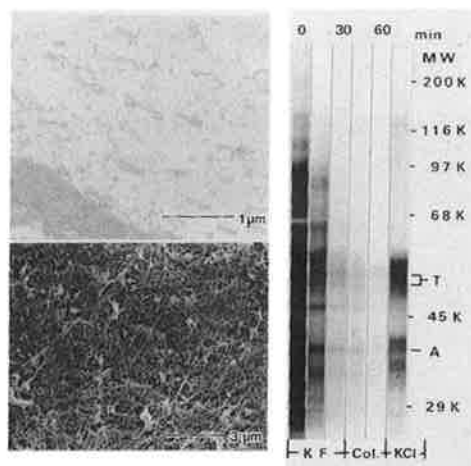


図4. 10 mMコルヒチンを30分間細胞内に作用させた後も軸索膜内面の近傍に残る細胞骨格と、細胞内灌流液中に溶出してくる蛋白のSDS-PAGEパターン。左上、透過型電子顕微鏡写真。左下、走査型電子顕微鏡写真。右、灌流開始10分後より15分間毎に軸索から出て来た灌流液を集めて蛋白を分析したもの。コルヒチンを作用させてもチューブリン(T)、アクチン(A)の増加は認められないが、400 mM KClを作用させると突然多量の細胞骨格蛋白が溶出する。

一般に、コルヒチンは微小管を脱重合させるといわれているが、このことはKFで細胞内灌流されたイカ軸索については成り立たない。10 mMコルヒチンを30分間作用させた場合にも、細胞骨格、特に微小管は形態学的には対照と区別できない程よく維持されている(図4左)。また、灌

流液を15分毎に集め、その中に溶出してくる蛋白を分析しても、コルヒチンによる微小管破壊の証拠は得られず、微小管を溶解する力はKClの方がはるかに強いのがわかる(図4右)。コルヒチンは微小管を直接破壊しないが、おそらく、微小管と膜とその間にある何らかの分子との正常な結合を防げるのであろう。

以上の実験結果より、細胞内骨格が消失するか、またはその正常な機能が阻害されたとき、興奮膜は細胞内圧の増大に非常に敏感になり、細胞内骨格が膜近傍に正常に保たれるとき、細胞内圧にはあまり左右されないということがいえる。細胞内の圧を高めることは軸索膜を伸展拡張するような力をかけるということであって、細胞内骨格が膜をこのような外力から保護する働きをしていることは明白である。さらに、KClで細胞骨格を溶解してしまっても、細胞内圧を0に維持して外力を膜にかけなければ興奮性は保たれるのであるから、微小管をはじめとする細胞内骨格はチャンネルの機能そのものには直接関係していないということも明白になった。

西洋ワサビペルオキシダーゼによるランヴィエ絞輪の染色

寺川 進, 中山 孝

ランヴィエ絞輪は興奮伝導のために著しく特殊化した部位であると考えられる。したがって、この部分に特異的に見られる構造や反応には興奮伝導維持のために何らかの意味があるであろう。我々は、組織化学の分野で分子マーカーとしてよく使われる西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)が、他のリガンドと結合させていない単独の形で、カエルのランヴィエ絞輪部に高い親和性をもって結合することを見出した。このことは絞輪部に何か特殊な分子が存在していることを示し、興奮性維持の仕組みについて、何らかの情報をもたらすものと思われる。

カエルの坐骨神経をとり出し、周囲の結合組織を取り除いて神経束を機械的にほぐし、約1cmの長さの標本とする。これを1mg/mlのHRPを含んだリンゲル液に10~15分浸す。次に、リンゲル液で5分洗浄し、2.5%グルタルアルデヒドを用いて15分固定する。さらに、50mM Tris緩衝液(pH 7.3)で15分洗浄したのち、0.2mg/mlのジアミノベンチジン液に漬け、20分後にH₂O₂を0.005%になるように加えて発色させた。このように処理すると図1左の写真のように絞輪部に強い染色が見られる。HRPに1時間浸した場合にも染色は軸索長軸方向へ広がっていかないで、endocytosisと軸索輸送のメカニズムは関与していない。発色後、樹脂埋めし切片をつくって絞輪部の断面を調べると、図1中央(矢印)のように軸索内部は染まっていないことがわかる。HRPを用いなければこのように染色されない。また過沃素酸ナトリウムで糖鎖を処理したHRPを用いると染色されない(図1右)。

ランヴィエ絞輪部にレクチンのような糖を認識する分子が存在しHRPを結合しているように思われるが、実際にどのような分子が存在するのか、さらに研究していきたい。

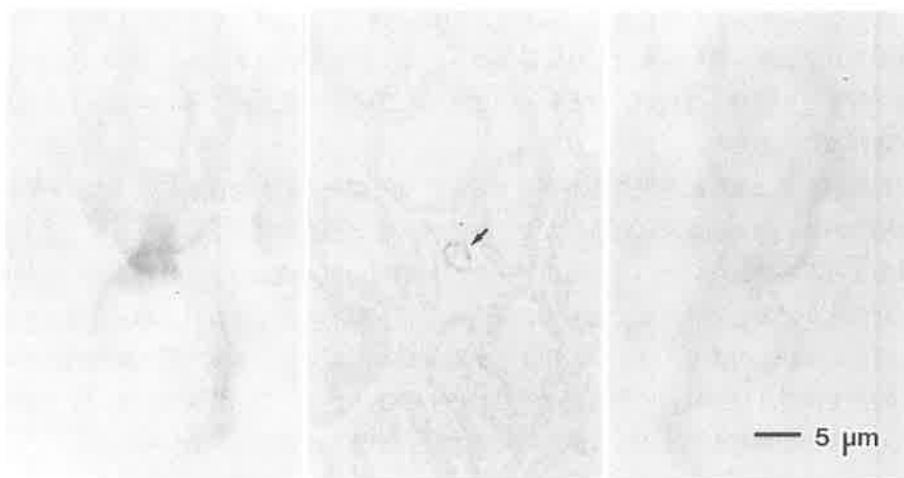


図1. HRP によるカエルのランヴィエ絞輪の染色。

Na チャンネルの精製

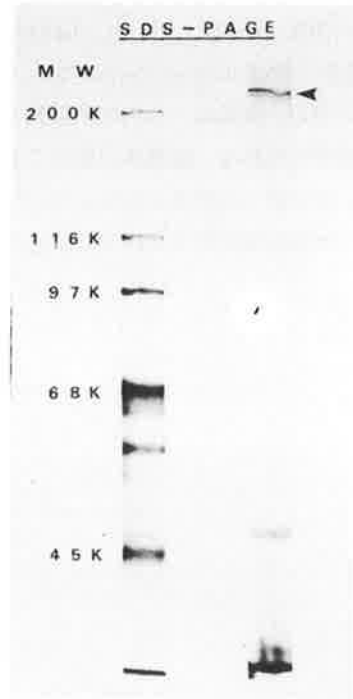
中山 孝, 寺川 進

Na チャンネルのタンパク質としての性質を明らかにするために、興奮膜からチャンネルタンパク質の可溶化と精製を試みた。従来報告されている方法では、チャンネルタンパク質の可溶化から精製にいたるまで数種類の方法を組み合わせることが必要であり、そのため2～3日間という長時間を要していた。また、これらの方法によって精製されたNaチャンネルタンパク質の人工膜への再構成が試みられており、Na イオンの流入の機能は再構成されることが確められてはいるが、生体膜上での複雑な現象を再現できるものではなく、精製の過程に長時間を要したための失活か、また別のタンパク質がサブユニットとして必要であるためかの結論が出されていない。以上の問題を解決するための手段としてアフィニティ・クロマトグラフィーにより、迅速に Na チャンネルを精製することを試みた。

アフィニティ・クロマトグラフィーのために、テトロドトキシン (TTX) とアビジンの結合体を合成した。アビジンは、ビオチンと解離定数 10^{-15} M という強い結合をするタンパク質であり、膜タンパク質の可溶化に必要な界面活性剤の存在下でもビオチンを結合させた樹脂により、TTX-アビジンの結合体を容易に回収できる。また、この TTX-アビジン結合体をザリガニ巨大神経線維に作用させたところ、作用の時間経過は異なっていたが TTX と同じく、Na イオンの流入を抑制した。

TTX-アビジン結合体と、ビオチン-アガロースを用いて電気ウナギ発電器官よりNaチャンネル

ルの可溶化・精製をおこなった。精製したチャンネルタンパク質を SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析したところ、図に示した様に分子量約26万のタンパク質が主に回収されており、従来の精製法とよく一致している。



図．電気泳動のパターン。

興奮性膜蛋白質の脂質 2 層膜への再構成

木村能章

筆者は、これまで、高度好塩菌の産出する紫膜が、膜内に局在するイオンを持ち、そのイオンの有無に伴い、構造や光学的性質が変化する事を示し、更にその機能である光エネルギーを使ったプロトン能動輸送の機能中間体が生成・消滅する事を示してきた。

現在は、支持体上に作製した脂質 2 層膜中に膜蛋白質を取り込み、その機能再構成を目指している。その最初の試みとして、興奮性膜蛋白質等を取り込み、興奮現象等の再構成を行おうとしている。作成する 2 層膜は、2 層個別に作成し、各層の脂質種・流動性・表面電荷及びそれらの差がコントロールでき、従来のリボソーム膜で再現できなかった点が明らかになるものと思われる。これに先立ち、牛脳より 7 種の脂質を抽出・精製し、純粋標品を得た。又、これらの脂質流

動性を、蛍光偏光解消法により調べた。脂質の中でも、リン脂質は、疎水的なアルキル鎖と、親水的な極性部分を持つが、この疎水性部位の蛍光試薬として 1, 6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene (DPH) を用い、又、親水性部位の蛍光試薬として、脂質頭部に dansyl 基を組み込んだ L- α -dansyl-phosphatidylethanolamine (DPE) を合成し用いた。DPH は、脂質 2 層膜及び生体膜の疎水性部位に入り、制限角内揺動運動 (Wobbling-in-cone) をしている事が知られているが、DPE も同様の運動をしている事が示され、制限角・角内回転運動共に疎水性・親水性部の差が明らかにされた。又、親水性部位の誘電的性質は、誘電率の極めて低い疎水部と水相との間に位置し、注目されるべきものであるが、全く調べられていなかった。今回 DPE を用いた蛍光測定で、蛍光スペクトルのストークスシフトから誘電的性質及びその変化の様相が明らかにされた。

能 動 輸 送 部 門

概要

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能動輸送といわれる 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 消費をともなう膜の隣接現象をとり上げている。

昨年度より本年度にかけて「生体膜研究部門」の杉山助教授と共同で Na ポンプ (Na, K-ATPase) に対するモノクロナール抗体を作製するのに成功した。東京医科歯科大学、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行った。

昨年度馬腎 Na, K-ATPase について、はじめてトリマー構造を示唆したが、更にヘキサマー構造も示され、それぞれ Na 型、K 型が反映されている事が明らかになった。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。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態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、ひきつづき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事を補強する多くの事実が見出された。

中尾は東京医科歯科大学医学部長に就任したので、9 月当部門を辞任した。

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、藤谷知子
前木吾市 (郡衛生研)、石川春律 (東京大・医)

膜結合の Na, K-ATPase については詳細な研究がなされているが、界面活性剤で可溶化した酵素についての報告は少ない。昨年度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、分子量の性格な測定を行った。 C_{12}E_8 で可溶化した Na, K-ATPase 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、また最少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。本年度は、この実験事実を補強する実験を行った。

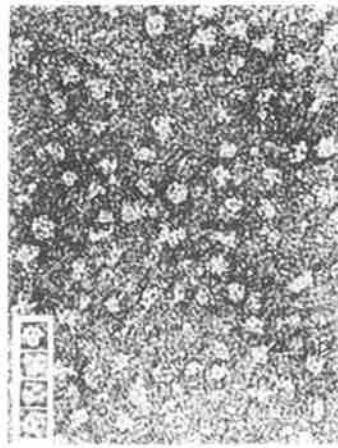
〔材料および方法〕馬腎髄質外帯から Na, K-ATPase の精製は Jørgensen に従った。buffer は、Histidine-Cl buffer で 2 mM の EDTA を含むものを用いた。SDS 処理は 1.4mg のタンパク当たり、0.9mg の SDS を用いた。34~45 μ mole Pi/mg prot/min の活性を持つ ATPase は、0.5% Sucrose, 2M Histidine 1mMEDTA に suspend し、タンパク濃度は 2-4 mg/ml とした。このものに $C_{12}E_8$ solution を徐々に加えて、わずかに混濁した状態にした。 $C_{12}E_8$ とタンパクの比は 0.7-5 まで、この混液は直ちに、32万×G, 1hr 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、Esmann 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 100 mM Tes-Tris pH 6.8 に 0.01% $C_{12}E_8$ と 25 mM NaCl または 10-25mM KCl で平衡化したものを用いた。 $C_{12}E_8$ はヘキサソール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。280 nm でモニターし、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, 633 nm) 東洋ソーダ製の Model LS-8 を用いた。レフraktometer RI-8 (東洋ソーダ製) を用い、室温 25°C $\pm$ 0.5°C 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。

$$\frac{(\text{out put}) \text{ LS}}{(\text{out put}) \text{ RI}} = N_0^2 \left(\frac{dn}{dc} \right) K' M$$

ここに N_0 , dn/dc , LS, RI, K' および M は refractive index of the solvent at 633nm refractive increment of the protein, light scattering, refractive intensity, instrument constant および molecular weight を示した。サイクログロブリン, 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〕 $C_{12}E_8$ で溶解した Na, K-ATPase の比活性は 51 μ 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。SDS-PAGE では、 α と β バンドのみで γ バンドはない。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 はボイド容量に近く、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 (dn/dc) の値の差が 10% 以下であった。それ故、ここでは Na, K-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 1.7×10^5 となり、この結果からの $\alpha \beta$ のモノマーと推定され、Na-2 は $\alpha \beta$ のトリマーで 5×10^5 であり、K-2 はヘキサマーと推定され、 8.7×10^5 であった。モノマーについては UV 280 nm 吸収と示差屈折計 RI の読みに開きがあったため Craig の glycerol density 法で余分の $C_{12}E_8$ を除去して測定した結果、UV 吸収 RI の読みが一致し、分子量は 1 : 3 : 6 の結果となる事を確認できた。又、馬腎よりのみでなく、豚腎から得た Na, K-ATPase 標品もモノマー型、トリマー型、ヘ

キサマー型の三つとなり, Na中ではモノマーとトリマー, K中ではモノマーとヘキサマーとなる事が確認された。又, $C_{12}E_8$ の濃度をあげ, 1 mg/ml以上にすると溶離液中ではATPase活性が失われ, 失活した標品はモノマーとダイマーが出現した。



〔文献〕

- 1) Nakao, T., Ohno, T., Nakao, M., Maek, G., Tsukita, S., and Ishikawa, H. (1983). Biochem, Biophys, Res. Commun. 113 : 361-367.
- 2) Nakao, T., Ohno-Fujitani, T. and Nakao, M. (1983) J. Biochem 94 : 689-697.

腎臓上皮細胞の能動輸送機構成分の単離と生合成

太田英彦 (生理研), 福本哲夫 (浜松医大)

〔目的〕 上皮細胞は形態学的にも機能的にも, 極性をもっている。この極性は, Na^+ , K^+ -ATPaseの側底部細胞膜への局在に明瞭にあらわれており, 株化した腎臓上皮細胞もそのような性質を保っている。このような分化は上皮細胞の行なう transcellular な能動輸送の基礎となっている。従って管腔側と側底部膜の輸送機構成分との間には機能上の関連の存在を予想することもできよう。このような極性が生合成と生分解をたゆみなく続ける上皮細胞の中でいかにして保たれているのかを明らかにすることを目標として, Na^+ , K^+ -ATPase の生合成と分解を研究するため, この酵素に対する抗体を作製することを試みた。

〔方法と結果〕 ラット腎臓の髄質外側部から得たミクロソーム画分を, SDS で2回処理し, ショ糖密度勾配遠心により分画し, 比較的高純度の Na^+ , K^+ -ATPase 標品を得た。これを抗原として, Köhler-Milstein の方法により, 単一クローン抗体を産生するハイブリドーマを4株とり, 夫々を腹水化した。抗体測定は, ニトロセルロースフィルターを用いるドットアッセイ法を主に

使い、抗原の検出は、SDS-PAGE 後、western blotting したサンプルを抗マウス 1 gG-HRP を用いる二重抗体法で行なった。

4 種類の抗体の性質を表 1 に示す。O-1-33 はラット腎臓の他、ラットの脳、小腸、心臓、イヌ

	MW (Antigen)	Subclass
O-1-33 E3/C7	50K	IgG 1
O-1-41 D5	50K	IgG 2a
O-2-23 B8/C12/H9	100K	IgM
O-2-88 C11/A9	100K	IgG 1

腎臓、マウス腎臓、小腸の膜画分の成分とも反応した。O-1-41 は、ラット腎臓の他、ラットの脳、小腸、心臓とは交叉反応したが、イヌやマウスの標品とは殆んど全く反応しないか、あるいはごく弱い反応性しか示さなかった。O-2-23 はラットの腎臓、心臓、肝臓、小腸、精巣と反応し、O-2-88 も同様の反応性を示した。又、O-2-23 と O-2-88 は共にイヌ腎臓やブタ腎臓の比活性 1,000 以上の酵素標品の分子量約 10 万のタンパク質と強く反応した。

免疫組織化学的染色では、O-1-41 はラット腎臓の髄質の尿細管の反管腔側細胞膜と主に反応し、皮質でも同じような反応性を示した。ラット脳では、O-1-41 は第三脳室周辺部で歯状回部分の突起をもった細胞と反応したが、皮室の神経細胞等との反応は示さなかった。他の抗体についてはまだ観察が不十分である。

分子量約 5 万及び約 10 万の抗原を認識する抗体は、夫々同一の抗原決定基を認識しているのではないことが、ELISA を用いて推定できたが、抗原の一次元ペプチドマップでは、夫々よく似たパターンを示した。従って、夫々ポリペプチド鎖の上で近接した部位を認識している可能性が示唆されている。

これらが Na^+ , K^+ -ATPase のサブユニットを認識しているのかどうかについて、次の評価基準を用いた。(i) リゾフォスファチジルコリンで可溶化したラット腎の Na^+ , K^+ -ATPase を二重抗体法で沈降するか、又は阻害する。(ii) 認識する抗原の分子量が妥当か。(iii) 腎臓組織内の抗原の分布が、報告されている Na^+ , K^+ -ATPase の分布とあっているか。(iv) 認識される抗原のトリプシン分解の結果が、 Na^+ , K^+ のいずれかの存在で異なるか。(v) Cu-o-フェナンスロリンで架橋される様子。O-1-41 については、(i), (ii), (iii), (v) が、O-2-23, O-2-88 については、(i), (ii), (iv) が、夫々陽性結果であった。従って、これら単クローン性抗体は、 Na^+ , K^+ -ATPase を認識するといえそうである。

(Na⁺, K⁺) ATPase と(Ca²⁺) ATPase の ATP 低親和性部位

福島義博 (生理研), 中尾 真 (東京医歯大・医)

カチオン・ポンプATPaseは輸送エネルギー源としてのATPとの相互作用のほかに, 反応回転の調節因子としてのATPとも相互作用のあることが知られている。本実験では, 調節性ATP (低親和性ATP) 結合の特性を調べるために, ポンプATPaseのリン酸化酵素分解におよぼすATPの影響を調べた。

(Na⁺, K⁺) ATPaseのK⁺-感受性リン酸化酵素(E₂P)の加水分解が, 高濃度のATPで阻害されるのに対し, (Ca²⁺) ATPaseのそれは促進された。半阻害または半促進のATP濃度は, 0.2~0.4mMと高い値が求まった。この値は, 報告されている調節性ATPの結合定数に一致している。調節性ATPの結合部位はATPase反応経路中, E₂Pですでに存在するのかもしれない。

(Na⁺, K⁺) ATPaseにおいては, ATPと等モル以上のMg²⁺および生理的細胞内濃度のK⁺の存在下では, ATP阻害は消失した。したがって, 生体中ではATPのE₂P分解反応への関与はない。脱リン酸後のE₂にはじめて調節性ATPは結合し, すでに知られているE₂からのK⁺遊離を促進すると考えられる。一方, (Ca²⁺) ATPaseにおいては, Mg²⁺およびK⁺存在下でもなおATPによるE₂P分解促進があった。したがって, 筋細胞中においては調節性ATPがE₂Pに効果的に作用すると考えられる。これらE₂P上にある低親和性部位は, ATPに対する特異性も低い。ATP類似体のみならずポリリン酸なども作用しうる。

一般に(Na⁺, K⁺) ATPaseのE₂Pを阻害する物質は, (Ca²⁺) ATPaseのE₂P分解を促進した。

(Na⁺, K⁺) ATPaseにおいて無効なものは, (Ca²⁺) ATPaseにおいても無効であるか, むしろ阻害した。反応機構の類似性が知られている(Na⁺, K⁺) ATPaseと(Ca²⁺) ATPaseにおいて, 高濃度ATPがそれぞれのE₂Pに対して, なぜ阻害的または促進的に作用するのかは不明である。

赤血球裏打ち構造のATPによる変形

神部芳則 (東京医歯大・医), 中尾 真 (生理研)

佐藤眞吾 (東京医歯大・医), 月田早智子 (東京大・解剖)

細胞の形や変形性についてCa²⁺とATPが重要な役割を果す事が明らかにされている。しかしCa²⁺の赤血球についての作用は報告によって異っていた。或る者は10⁻⁶, 10⁻⁷MのCa²⁺で変形がおこると述べ, 或る者は10⁻³Mのような大濃度が必要と主張していた。一方, 中尾等をはじめ赤血球内のATPが形の維持に関係している事を見出して以来, 赤血球の形, 表面積, 変形性が

ATP濃度に関係がある事が報告されている。又、このATPaseの作用はスペクトリンのリン酸化の他、フォスファチジルイノシトールやフォスファチジン酸のリン酸化に関与しているとの異説もあり、一定していなかった。昨年度来我々はゴーストの変形に対するATPの作用に二つのステップがある事を見出し、又、脂質二重膜をはずしたトリトンセルが Ca^{2+} に反応し、且つ、ATPに反応する事を見出した。本年はこの間の事情を詳細に検討した。

〔方法〕 5日～15週の保存血を3回生食で洗い、10 mM Tris-Cl (pH 7.4) 緩衝液で溶血する(1 : 50) 18000 rpm 20分 4℃で遠沈してゴーストを集め直ちに用いる。 Ca^{2+} は小川のEGTA- Ca^{2+} 緩衝液を用いた。トリトンセルは新鮮赤血球、もしくはアデニンとイノシンを加えて37℃においた。赤血球からゴーストをとり、或るいはゴーストにしてから2 mMのMg ATPと37℃20分おいたもの1 mM MgCl_2 で洗い、これらを材料として0.5%トリトンX-100、0℃5分処理した。形は暗視野で観察し、オリンパスOSMD 2マイクロメーターを用いて径を計測した。収縮度は $\{(c-a)/c\} \times 100$ であらわした。Cは1 mM Mg-EGTA, aは Ca^{2+} 緩衝液中のトリトンセル径。

〔結果〕

1) ゴーストの変形に対する Ca^{2+} とMg-ATPの影響

ゴーストをpH 7.4のTris-Clで作ると多くは球状に見える。 $10^{-7} \sim 10^{-6}$ 遊離 Ca^{2+} のカルシウ

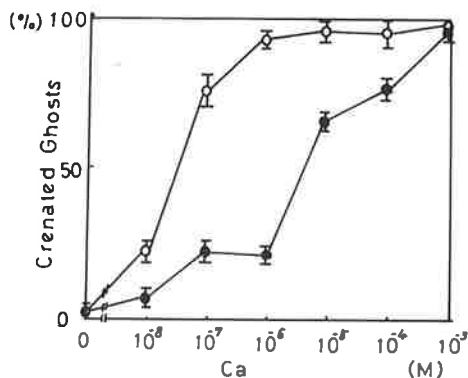


図1. 5日保存血(○), 10日保存血(●)から調製したghostを Ca^{2+} -EGTA buffer中にsuspendし, crenated ghostをカウント。

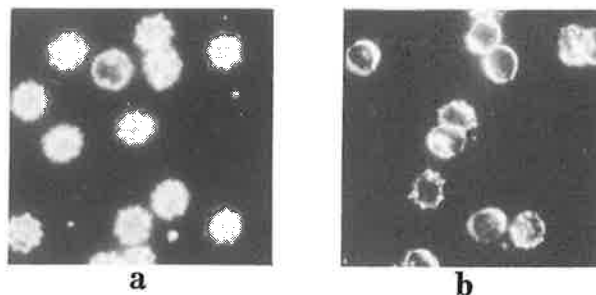


図2. 5日保存血(a), 10日保存血(b)から調製したghostの $10^{-6}\text{M } \text{Ca}^{2+}$ -EGTA buffer中での形態。

ム緩衝液に浮べると低張のときでも星状に変形する。新鮮赤血球からとったゴーストと異り、10週間保存の赤血球からとったゴーストは $10^{-7} \sim 10^{-6} \text{M}$ Ca^{2+} では反応しない。球状或いは舌状のままである。 $K_{0.5}$ は前者 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ 後者 $8 \times 10^{-6} \text{M}$ と大変異なる。ゴーストにしてから0℃に60分放置すると Ca^{2+} に対する $K_{0.5}$ は後者のレベルまで大きくなる。もしゴーストをATPと37℃20分おくと2 mM MgCl_2 で洗った後、 $K_{0.5}$ は前者 $5 \times 10^{-6} \text{M}$ まで小さくなる。この中1段階での Mg-ATP 特異性は高く1 mM Mg-ADP , Mg-GTP , Mg-UTP , Mg-ITP , Mg-AMPPNP , Mg-AMPPCP は効果がない。10週間保存血はさきに述べたように Ca^{2+} に対する感受性の低いゴーストを生ずるが、無傷赤血球の段階でアデニンとイノシンを添加し、37℃に3時間おくとATPの細胞内レベルは平常化する。このような赤血球を用いると、新鮮な赤血球の場合と同様に Ca^{2+} に対する感受性は高くなり $K_{0.5}$ が 10^{-6}M 台のゴーストを生ずる。これ等のゴーストを1 mM MgCl_2 で洗い Mg-ATP を除いた後更に $10^{-7} \sim 10^{-6} \text{M}$ Ca^{2+} を加えると星状になっているのであるが、更に Mg-ATP を添加すると直ちに円盤状に変化する。これは中2段階と考えられる変化である。

2) フォスファターゼ処理

第1段階の変化が膜のリン酸化であろうという事を補佐するため次の実験を行った。新鮮血に大腸菌のアルカリフォスファターゼ (Sigma Type III-R) を作用させると Ca^{2+} 感受性は低くなる。この時アルカリフォスファターゼの阻害剤として無機リン酸を添加しておくとは低くはならない。又、一度フォスファターゼを作用させたものに再び Mg-ATP を添加し、37℃に2時間おくと Ca^{2+} 感受性は高くなる。

3) トリトンシエル

ゴーストをトリトン処理するとSDS-PAGEでバンド3と4.2が減少する。又、電顕で観察すると陰染色で $0.08 \sim 0.02 \mu\text{m}$ の小さな小胞が一面に繊維状の網にはりついているだけなのがある。この標品は高張の処理にも大きさをかえない。つまり浸透圧バリアは消失している。この標

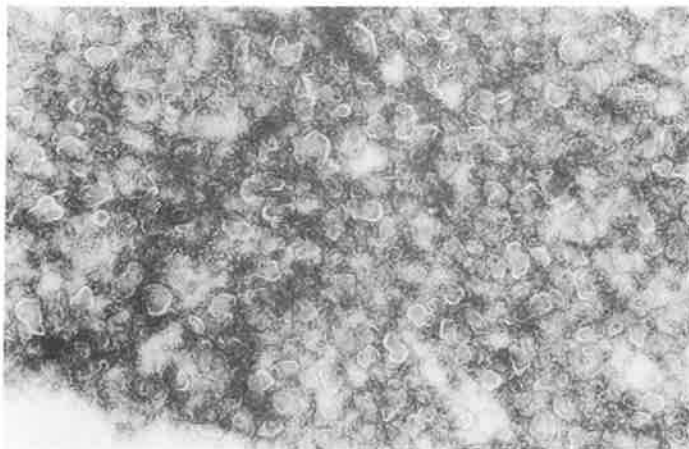


図3. 0.5% Triton shellのネガティブ染色像。

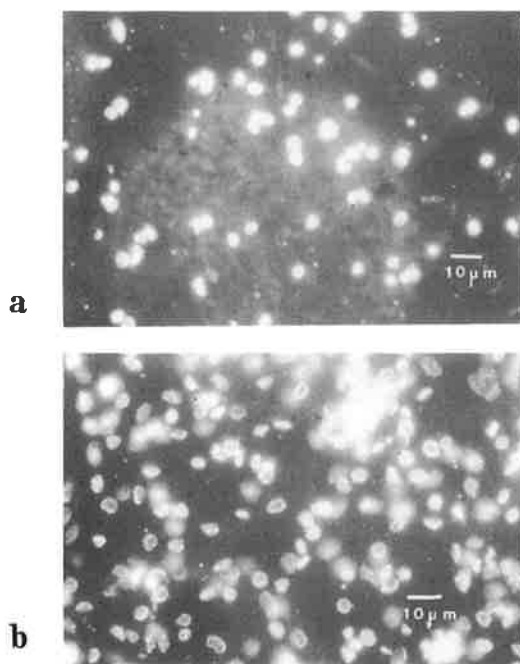


図4. 新鮮血から調製した Triton shell の 10^{-6}M Ca^{2+} (a) 及び $10^{-6}\text{M Ca}^{2+} + 1\text{mM Mg-ATP}$ (b) 中での形態。

品は低張のまま 10^{-6}M Ca を添加するとちぢみ、はじめより $\text{Ca } 10^{-6}\text{M}$ を一緒に加えて作製したゴーストと同様に小さい形をとる。このような shell をあたえる赤血球は ATP レベルの高かった新鮮血、或いは保存血ならばアデニン+イシンによる ATP レベルを再び上げてあるものに限る。又、ゴーストを得てから Mg ATP を加えると再び広がる。このステップは Mg-UTP , Mg-GTP , Mg-ITP , Mg-AMPPNP , Mg-AMPPCP のいずれも無効で、ゴーストの時の第1, 第2段階の特異性とはほぼ同じである。 $K_{0.5} \approx 0.5\text{ mM}$. Ca^{2+} による収縮時に ATP を添加しておくとも阻害される。しかし、この ATP の効果は Ca^{2+} とキレートする事によるとは考えにくい。何故ならば Ca^{2+} の効果はカルシウム緩衝液の濃度を加えても、同じように生ずるからである。

〔考察〕この実験によって無傷赤血球の Ca^{2+} 及び ATP による変形が、ゴースト段階での Ca^{2+} , ATP に相応し、更にシェルの Ca^{2+} と ATP による変形に相応する事が強く示唆された事になる。つまり細胞の形の維持、或いは変形に対する抵抗性等が裏打ち構造によって作られているのであって、リポド二重層は縦の役割しかになっていないようにみえる。この結果は細胞、ゴーストシェルの粘度測定によっても裏づける事が出来た（東京医科歯科大学医学部生化学部等）。従って、いわゆる変形性においても主役割は裏打ち構想、つまり細胞骨格の一部と考えられる網状構造にもとづくものという事が強く示唆されている事になる。問題点としては、ゴースト段階の変化は低張時におこっているものであり、 KCl の 0.154M では大変みにくい点であるが、この矛盾は今後の課題である。

生 体 情 報 研 究 系

神 経 情 報 部 門

概要

神経情報研究部門は視覚の基礎的なメカニズムを明らかにすることを部門としての共通研究課題として、脊椎動物網膜における光受容と情報処理機構の研究を行っている。網膜には6種類の神経細胞が3層に配列されており、細胞間にはフィードバックを含む複雑な連絡が存在する。部門発足当時は剔出網膜を用いて、細胞内記録法や細胞内染色法により各細胞の応答様式の解明に努力を集中して来た。その結果、完全とはいえない迄も、網膜内の6種類の細胞の特徴や神経ネットワークの中における役割などを理解することが出来るようになった。

網膜神経細胞の多くは活動電位を発せず、緩電位のみによって応答する局所回路ニューロンである。従って伝達物質の放出もgradedに行なわれる。こうした特徴の起源を理解することはこれまでの実験技術をもってしては不可能であった。また網膜ニューロンの伝達物質を明らかにしようとする試みも従来の実験方法では極めて間接的な回答しか得られていない。

昨年度から本研究部門では回路網から単離した網膜ニューロンを用いる新しい実験技術を取り入れこれらの問題に挑戦している。更に、パッチクランプの技術の採用と相俟って水平細胞の電位依存性膜電流の解析やL-グルタミン酸に対する感受性の検索を行って来た（これらの項目については昨年度報告した）。今年度はこの方針を更に押し進め、立花は電圧固定下で水平細胞におけるL-グルタミン酸によって生じるイオン電流の解析を行ない、また金子は双極細胞の電位依存性膜電流の解析を行った。これらの結果から水平細胞や双極細胞の光応答を理解する上で直ちに役立つ豊富な情報が得られた。

網膜組織全体を用いた従来の研究方法も organization を持つ網膜組織の機能を知る上では重要な方法である。大塚は視細胞の油滴のあるものが自家蛍光を発するという新発見を行ない、近紫外光受容の新機構を提唱した。特別協力研究員として滞在した van Dijk と金子は水平細胞と神経節細胞の連絡に関する研究を行ない新知見を得た。

キングヨ 網膜から単離・培養した双極細胞の膜電流

金子章道，立花政夫

網膜双極細胞は視細胞と神経節細胞をつなぐ情報伝達路の中間に位置し、網膜内視覚情報処理機構の中心となる細胞である。双極細胞は約-40mVの静止電位を持ち、光照射に対し持続性の緩

電位応答を示す。活動電位は記録されない。双極細胞はその樹状突起部において視細胞から tonic なシナプス入力を受け、軸索終末部では神経節細胞へ出力を送ると共に、アマクリン細胞と両方向性のシナプスを有する。しかし、後者の生理学的機能は不明である。双極細胞の応答の性質を理解するためにはこうしたシナプス入力を解析すると共に、シナプス入力を修飾する作用を持つ電位依存性の膜電流系を明らかにしなければならない。これを本研究の目的とした。

他のニューロンからの干渉を避けるため今回の実験では既に報告されている方法（1～3）によりキンギョの網膜にパバインを作用させて双極細胞を単離し、それを10℃で1～7日培養して実験に供した（図A）。単離双極細胞から“Giga-seal”の吸引電極を用いた電圧固定法により膜電流を記録した。単離双極細胞を静止電位附近（-30mV）に保持し、そこから種々のレベルの膜電位に2秒間固定し、電流-電圧特性を求めた（図B-D）。-20mVと0mVの範囲では僅かな内向き電流が見られた。この電流は外液中の Co^{2+} により消失し、Na-freeの条件には影響を受けないことなどからCa電流であると同定した。Ca電流は膜を-30mV以上脱分極すると活性化され、+10mV附近で最大値を示した。2秒間の脱分極状態中にはCa電流の不活性化は見られなかった。

膜電位を0mVより脱分極すると大きな外向き電流が観察された。この電流は+50mV附近で極大値を示した後、更に脱分極するとかえって減少した（図D）。この外向き電流は外液中に4mVの Co^{2+} を加えたり、 Ca^{2+} を Ba^{2+} に置換すると消失した。また30 μM のquinineによっても阻害を受けた。これらの性質からこの外向き電流はCaにより活性化されたK電流、 $I_{\text{K(Ca)}}$ 、であると同定した。

-60mV以下に保持しておいた細胞を脱分極すると第2の外向き電流が観察された。この外向き電流は膜を脱分極状態に長時間保持すると不活性化してしまうので、保持電圧が-30mVの図の条件下では観察出来ない。この外向き電流は活性化、不活性化が遅く、そのtail電流の反転電位はKの平衡電位に一致することから、この電流は遅延整流性K電流、 $I_{\text{K(V)}}$ 、であると同定した。 $I_{\text{K(V)}}$ は35mM TEAによってブロックされた。

膜を-70mV以下に過分極すると極めて遅い時間経過（ $\tau \approx 8 \text{ sec}$ ）と強い内向き整流を示す電流が観察された（図C）。この内向き電流は外液のK濃度に依存して増減するが、Na濃度にも依存した。また、10mM Cs^+ によってブロックされるが、0.2mM Ba^{2+} には影響を受けなかった。またその活性化は膜電位のみに依存し、Kの平衡電位とは直接の関係を持たなかった。またtail電流の反転電位は約-20mV（ $[\text{K}^+]_o = 10\text{mM}$ ）であった。このような性質からこの内向き電流は心洞房結節細胞(4)などで報告されている h 電流、 I_h 、であると同定した。

このように双極細胞は脱分極により活性化される3種の電流、 I_{Ca} 、 $I_{\text{K(Ca)}}$ 、 $I_{\text{K(V)}}$ と過分極により活性化される I_h とを持つことが明らかになった。静止電位はおそらく $I_{\text{K(Ca)}}$ と I_h とのバランスで決定されていると思われる。また定電流刺激に対する細胞の電位応答もこれらの電流の電位、時間特性からその概略が説明出来た。今後更に、単離細胞を用いて双極細胞の化学伝達物質に対する感受性などを解析したい。

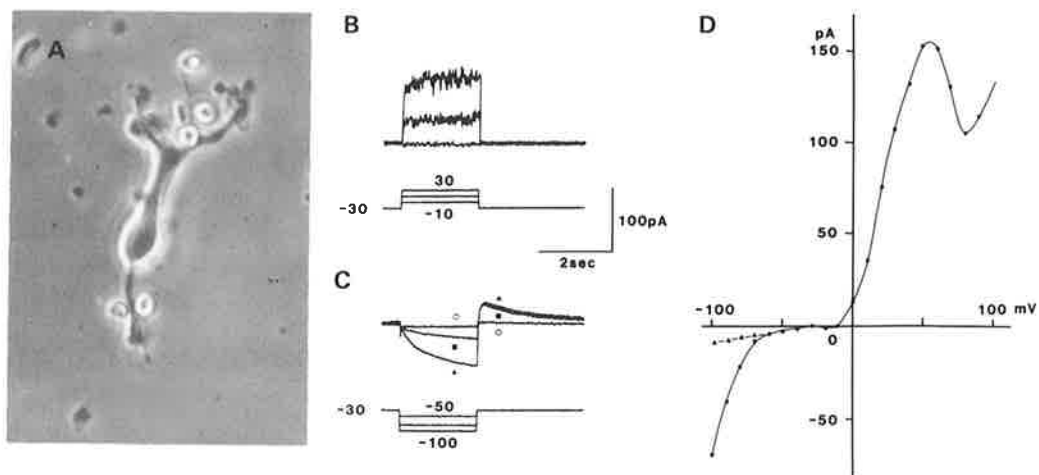


図. A. 単離双極細胞の光学顕微鏡写真。B. 脱分極（下段）によって発生する単離双極細胞の膜電流（上段）。C. 過分極（下段）によって発生する膜電流（上段）。D. 電流－電圧曲線。

〔文献〕

- 1) Bader, C. R., Bertrand, D. & Schwartz, E. A. (1982) Voltage-activated and calcium-activated currents studied in solitary rod inner segments from the salamander retina, *J. Physiol.* **331**: 253-284.
- 2) Tachibana, M. (1983) Ionic currents of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina. *J. Physiol.*, **345**: 329-351.
- 3) Ishida, A. T., Kaneko, A. & Tachibana, M. (1984) Responses of solitary retinal horizontal cells from *Carassius auratus* to L-glutamate and related amino acids. *J. Physiol.*, **348**: 255-270.
- 4) Yanagihara, K. & Irisawa, H., (1980) Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell, *Pflügers Arch.*, **385**: 11-19.

キンギョ網膜から単離した水平細胞におけるグルタミン酸電流の解析

立花政夫, 金子章道

脊椎動物網膜の視細胞から放出される化学伝達物質の有力な候補としてL-グルタミン酸が考えられている。しかし、シナプス後膜に対するグルタミン酸作用の解析は、網膜細胞間の複雑な相互干渉に影響されて非常に困難であった。近年、網膜から第2次ニューロンである水平細胞を

単離し培養することが可能となり¹⁾、また、この単離水平細胞はグルタミン酸により脱分極することが判明した²⁾。そこで、膜電位固定法を単離水平細胞に適用してグルタミン酸応答の解析を行った。

〔方法〕成熟したキンギョ (*Carassius auratus*) から得た網膜にタンパク質分解酵素パパインを作用させて水平細胞を単離した¹⁾。1～10日間培養した単離水平細胞にパッチクランプ用吸引電極を押しあてて細胞膜との間に $G\Omega$ -シーลを作り、膜電位固定下で①パッチ膜を通過する電流（単一チャンネル電流）を記録し、あるいは、②パッチ膜を破って細胞膜全体を通過する電流を記録した。L-グルタミン酸は、①の条件下では吸引電極内灌流法によりパッチ膜外面に、また②の条件下では細胞近傍に置いた先端直径約20 μm のガラス管ピペットから圧力により細胞全体に与えた。

〔結果〕単離水平細胞全体を静止膜電位（ -57mV ）に電位固定した条件下で100 μM のL-グルタミン酸を投与すると、約100pAの内向き電流が発生した（図1）。膜電位を脱分極させるに従い、内向きのグルタミン酸電流は小さくなり、約 -3mV で消失し、さらに脱分極させるとグルタミン酸電流は反転して外向きとなった。一方、膜を静止膜電位付近より過分極させた状態ではグルタミン酸によって発生する内向き電流はかえって小さくなった。この過分極側でのグルタミン酸電流の減少は、①CsやBaで異常整流性K電流³⁾を阻害しておくことと消失すること、また、②その膜電位及び $[\text{K}^+]_o$ 依存性が異常整流性K電流の性質と同じであることから（図2）、グルタミン酸による異常整流性K電流の阻害によるものであると考えられる。従って、水平細胞に対するグルタミン酸の作用は①コンダクタンスを増大させる成分と②コンダクタンスを減少させる成分からなることが示唆された。

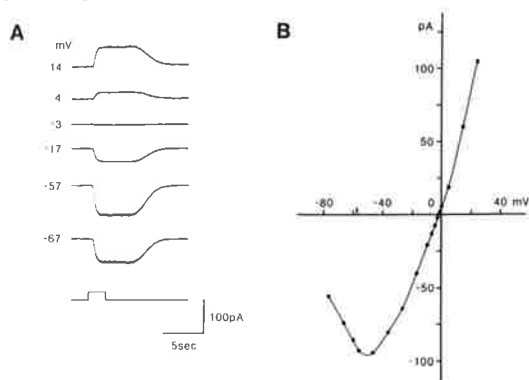


図1. 膜電位固定下での単離水平細胞のグルタミン酸電流。A. 種々の膜電位に固定して100 μM L-グルタミン酸を投与した時に発生する電流。膜電位は各電流波形の左側に示す。最下段にはグルタミン酸投与のタイミングを示す。反転電位は -3mV であった。この細胞の静止膜電位は -57mV 。 -67mV では -57mV の時に比べて電流の振幅は小さくなった。B. グルタミン酸電流と膜電位の関係。Aで得られた電流の振幅を膜電位に対してプロットしたもの。V字形の非線形な特性が認められる。

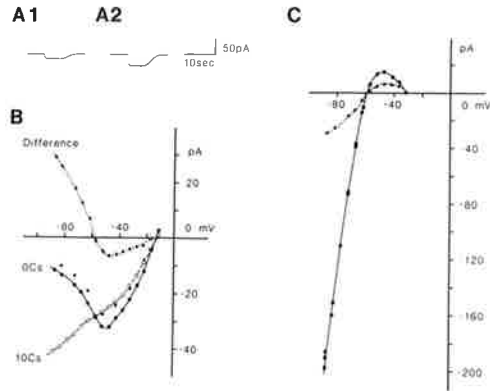


図2. L-グルタミン酸によって阻害される電流成分。A. 膜電位を -72mV に保持し、 $100\mu\text{M}$ グルタミン酸を投与した時に発生した電流。A 1. コントロール液中 (81mM Na^+ , 10mM K^+)。A 2. Cs液中 (10mM Cs^+ , 81mM Na^+ , 10mM K^+)。B. コントロール液中 (黒丸), Cs液中 (白丸) で $100\mu\text{M}$ のL-グルタミン酸を投与して得られたグルタミン酸電流と膜電流との関係。異常整流性K電流がCsで阻害されている状態では、単調なグルタミン酸電流-電圧関係が得られた。グルタミン酸によって阻害される成分を黒丸と白丸の差から求め、黒三角でプロットした。過分極側でグルタミン酸投与によって発生するこの外向き電流 (黒三角) は、実際には過分極によって生じた内向き電流 (異常整流性K電流) がグルタミン酸によって阻害されたものと考えられる。C. グルタミン酸によって阻害された電流と異常整流性K電流の膜電位依存性。前者の電流はBに示した黒三角から極性を反転してプロットした。

1) L-グルタミン酸によるコンダクタンスの増大

グルタミン酸の最少有効濃度は数 μM であり、約 $100\mu\text{M}$ ではほぼ最大の応答が発生した。この応答の反転電位は約 -3mV であった。外液のイオン組成を変えた時のグルタミン酸応答の反転電位からイオン透過性を調べたところ、陽イオンに対しては透過性が認められたが陰イオンに対しては認められなかった。 Na^+ , K^+ 以外にも Ca^{2+} や Mg^{2+} も透過し、また Tris^+ や Choline^+ もある程度透過することから、この陽イオン選択性チャネルの孔はAChチャネルのように大きなものであると思われる。なお、 Ca^{2+} は Na^+ の透過を妨げる作用も示した。

2) L-グルタミン酸によるコンダクタンスの減少

この作用はグルタミン酸 $30\mu\text{M}$ で認められ、 $100\mu\text{M}$ 以上で最大となった。この時、過分極によって活性化された異常整流性K電流を15~30%阻害した。なお、 Mg^{2+} の関与は認められなかった。

さらに、パッチクランプ法を適用して、グルタミン酸の阻害作用を単一チャネル電流のレベルで解析した。まず、記録した単一チャネル電流が異常整流性K電流であることは、①Kの平衡電流よりも膜を過分極させると矩形波状の内向き電流の振幅は大きくなったが、脱分極側では電流はノイズレベル以下となり観察できなかったこと (内向き整流作用)、②単一チャネル電流-電圧

関係から外挿して求めた反転電位は $[K^+]$ を変えると K の平衡電位にはほぼ一致して変化したこと、③単一チャネルコンダクタンス ($30\text{pS} : 124\text{mM } K^+$) は $[K^+]$ を減少させると減少したこと、④ Cs や Ba で単一チャネル電流の阻害が生じたこと、から同定できた。この異常整流 K チャネルはグルタミン酸依存下ではコントロールに比べて、有効チャネル数が減少したが(図3)、単一チャネルコンダクタンス、有効チャネルの平均開時間、閉及び開状態の時定数には変化が認められなかった。グルタミン酸によって、有効な異常整流 K チャネルの数が減少したという知見はチャネル数そのものが減少した、あるいは、非常に遅い Kinetics をもつ阻害状態が生じたと解釈できる。

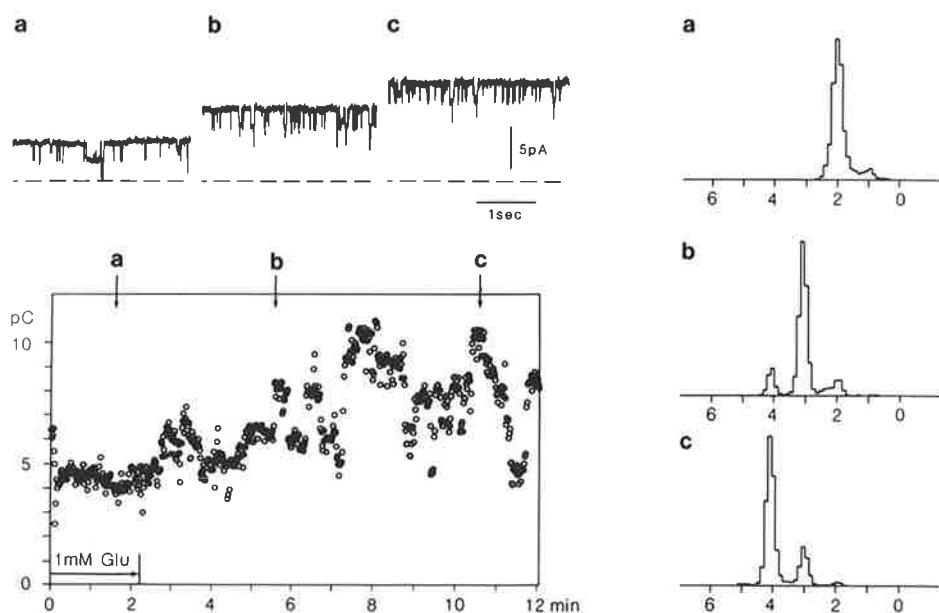


図3. 異常整流 K チャネル電流に対するグルタミン酸の阻害作用。パッチ電極内には $138\text{mM } K^+$ が含まれており、パッチ膜は -80mV に電位固定した。左上欄。パッチクランプ法により記録された単離水平細胞の異常整流 K チャネル電流。単一チャネル電流の振幅は約 2pA 。破線は 0pA のレベルを示す。電流は内向きが上になるように示してある。a. 1mM L -グルタミン酸存在下での記録、bとc. 吸引電極内のグルタミン酸を洗い流してから約3.5分後と約9分後の記録。左下欄。吸引電極下のパッチ膜を通過する電気量。左上の電流波形を1秒ごとに積分してプロットした。グルタミン酸を洗い流すとパッチ膜を通過する電気量が増えた。a, b, cは各欄の記録に対応する。右欄。左上欄に示したような電流波形を30秒間記録して得た振幅ヒストグラム。横軸はチャネル数としてプロットした。 1mM グルタミン酸存在下では2個のチャネルが同時に開いている頻度が高かった(a)が、グルタミン酸を洗い流すにつれ、3個(b), 4個(c)のチャネルが開く頻度が高くなった。

以上の実験から、L-グルタミン酸は、①陽イオンに対してコンダクタンスを増大させ、また、② K^+ イオンに対してコンダクタンスを減少させることにより、水平細胞に脱分極をひきおこすと結論した。

〔文献〕

- 1) Tachibana, M. (1981) Membrane properties of solitary horizontal cells isolated from foldfish retina. J. Physiol. 321: 141-161.
- 2) Ishida, A. T., Kaneko, A. & Tachibana, M. (1984) Responses of solitary retinal horizontal cells from *Carassius auratus* to L-glutamate and related amino acids. J. Physiol. 348: 255-270.
- 3) Tachibana, M. (1983) Ionic currents of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina. J. Physiol. 345: 329-351.

カメ網膜の無色油滴を含む錐体視細胞の色光感度

大塚輝彌

爬虫類・鳥類の網膜の錐体視細胞内節には、直径数ミクロンの油滴と呼ばれる構造がある。外界の光は油滴に含まれているカロチノイドによって一部吸収されてから外節へ到達する。このために油滴は色フィルターとして働き、色の弁別に役立っていると考えられている。油滴には数種の色があり、油滴の色と錐体細胞の色光感度との対応関係が一義的に対応づけられるものとされて来た。すなわち、アカミミガメ (*Pseudemys scripta elegans*) では赤色と橙色の油滴は赤感受性錐体に、黄色と無色は各々緑及び青感受性錐体に含まれているとされた。しかし、今回の研究によってこの対応づけに修正を要することが明らかになった。本研究では無色油滴を有する錐体から細胞内記録によって色光感度を記録し、さらに蛍光色素 (Lucifer yellow CH) の細胞内注入によって油滴と色光感度との対応関係を解析した。この結果、従来青感受性錐体と考えられていた無色油滴を含む錐体の2/3は赤感受性錐体であった。さらに、この赤感受性錐体に含まれる無色油滴は近紫外光照射によって自家蛍光を発することが見出された。類似の自家蛍光を発する油滴は鳥類の錐体にも見出された。

〔研究方法と結果〕

(1) 蛍光性と非蛍光性無色油滴

アカミミガメの剝離網膜を蛍光顕微鏡下で観察すると近紫外励起光 (330-380nm) によって自家蛍光の点がモザイク状に現われた (図1A)。この自家蛍光は最初の数秒間暗橙色であるがすぐに強い緑色に変わり、約1分間蛍光を発した後消失した。消失した蛍光は網膜を暗所に数時

間置いた後にも回復しなかった。この自家蛍光の発光色や消失するまでの時間経過などは可視光や熱（60℃，5分間）によって影響を受けなかった。しかし網膜を2%グルタルアルデヒド溶液（2時間）で固定すると自家蛍光が顕著に低下した。

図1 Aに示すように光源を可視光に切り換えて網膜を観察すると，自家蛍光を発していた点は無色油滴であることが観察された（図1 B）。近紫外光源と可視光源での2種の観察を比較した結果，無色油滴は自家蛍光を発するものと発しないものの2種類に分類出来ることが明らかであった。さらにこの2種の無色油滴について，①蛍光性油滴は薄緑色を示し，非蛍光性油滴は無色・透明である，②蛍光性油滴は非蛍光性油滴に比べて直径が大きい，又，③無色油滴の2/3が蛍光性を有していることなどが明らかになった。

このような2種の無色油滴を有する錐体は網膜の全域に見られた。カメ網膜では背-腹軸方向に視細胞の形態学的分化が見られる。そこで網膜の中央部を視線条に直角に切り出し，1mm間隔ごとに2種類の無色油滴の直径と密度を調べた（図2）。視線条では無色油滴の直径は最少（約2.3μm）であるが，視線条から背又は腹方向に離れるに従って直径が増大した。t-検定を用いて2種類の無色油滴の大きさの差異を調べた結果，網膜の全域において蛍光性油滴と非蛍光性油滴は99%以上の有意水準で異なる群に属することが明らかになった。視線条から3mm背側部では2種の無色油滴の平均直径の差はさらに大きく，有意水準は99.99%以上であった。これによって蛍光性と非蛍光性の2種の油滴は直径の大小によっても同定出来ることが明らかになった。又，これら2種の無色油滴の密度は視線条において3400個/mm²と8000個/mm²で蛍光性油滴の方が2.4倍多い。網膜周辺部でもこの比率は変わらず，細胞内記録を行った背側部（例えば視線条から約2mm）では非蛍光性と蛍光性油滴は各々340個/mm²と860個/mm²であった。このように網膜の全域で蛍光性油滴が約2.5倍多かった。

（2）2種の無色油滴と錐体視細胞の色光感度

2種の無色油滴の存在が明らかになったのでこれらの油滴を含む錐体の色光感度を調べた。アカミミガメ（甲長19～20cm）の眼球杯標本を用いて視線条から1～3mm背側部にある錐体から細胞内記録を行い色光感度を記録した。さらに記録電極から蛍光色素（Lucifer yellow CH）を電気泳動的に細胞内注入して油滴との対応関係を直接調べた。この結果，蛍光性無色油滴を有する7個の錐体の色光感度は全て感度極大が620nmにあり，赤感受性錐体であった。この錐体の一例を図1 C-Eに示した。電極から注入したLucifer yellowの強い蛍光にマスクされて油滴の自家蛍光は観察出来なかった。そこで蛍光性無色油滴の同定は色（薄緑色）と直径の大小（蛍光性油滴 > 非蛍光性油滴）によって行った。2種の無色油滴の直径は背側の網膜では統計学的にも大きな差があるので，直径による蛍光油滴・非蛍光油滴の判定は高い信頼性がある。一方，蛍光性を有しない無色油滴を含んだ錐体（3例）は460nmに感度の極大があり青感受性錐体であった（図3）。

同様の方法を用いて日本の淡水産カメ，クサガメ（*Geoclemys reevesii*）の網膜を調べた結果，2種類の無色油滴が存在し，密度の比や直径の大小はアカミミガメと同様であった。さらに，細

胞内記録と蛍光色素の注入を行った結果、蛍光性無色油滴を含んだ錐体は感度極大が620nmにある赤感受性錐体であり(12例)、非蛍光性無色油滴を含んだ錐体は460nmに感度極大のある青感受性錐体であった(4例)。さらにトリ(ニワトリとハト)の網膜にも近紫外励起光によって強い緑色の自家蛍光を発する薄黄緑色の油滴を見出した。この油滴を含んだ錐体外節には黄色(570nm)に吸収極大のある視物質が存在することは既に顕微分光測定によって報告されている。

〔考察〕クサガメ網膜の無色油滴に2種類あることは既に1957年に藤本ら(Jap. J. Physiol. 7:339-346)によって報告された。しかし薄緑色は顕微鏡の色収差による人工産物ではないかと疑われ、以後30年間に亘って無視されて来た。また錐体の油滴と色光感度との対応関係も実験的な根拠も薄弱なまま無色油滴を有する錐体が青感受性錐体であろうという推定が10年来信じられてきた。しかし本研究では蛍光顕微鏡、錐体視細胞からの細胞内記録と蛍光色素の注入によって2種の無色油滴とこれらの油滴を含んでいる錐体の色光感度が青及び赤感受性錐体であることを明らかにした。

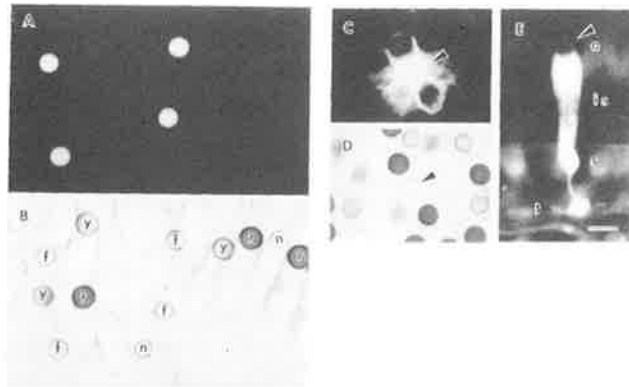


図1. A: 蛍光顕微鏡下で観察したアカミミガメの剝離網膜。網膜は視細胞側を上にしてスライドガラスに載せた。図の白点は緑色の自家蛍光。励起光にはuV フィルター(330-380nm)を通した高圧水銀ランプ光源を用い、遮断フィルター(460nm)を接眼に入れた。

B: Aと同じ標本を通常の光学顕微鏡下で観察した。自家蛍光は直径の大きい無色油滴(f)から発している。他の有色油滴や直径の小さい無色油滴(n)は自家蛍光を示さない。r, yは各々赤色, 橙色油滴。C-E: 色光感度を記録した錐体。記録電極から錐体(矢印)に蛍光色素を注入し蛍光顕微鏡で観察した(C)。白色光源に切り換えると蛍光色素を注入した錐体に無色油滴が含まれていた(D)。この油滴は色と直径から蛍光性無色油滴と同定された(本文参照)。この錐体の縦断像を示す。脱分・包埋によって錐体内節(is)の最外部にある油滴が流出し空胞(o)(矢印)を呈している。s, tは錐体の細胞体と軸索終末を示す。A-Eは全て同倍率でEの横棒は10 μ m。C-Eの錐体の色光感度は図3に示してある。

錐体の色光感度すなわち赤・緑・青の3種の錐体を形態学的に同定することは錐体と2次ニューロンとの神経連絡を解析し網膜における色情報の抽出機構と統合過程を知る上に重要な手掛り

となる。例えばカメラ網膜では油滴の色や直径の違いを利用して3種の錐体を同定し2次ニューロンの一種である水平細胞とのシナプス結合が調べられている。しかし本研究の結果から無色油滴を有する錐体は青感受性であるという前提のもとに解析された従来の研究報告を根本的に修正する必要がある。

さらに蛍光性油滴の発見は今まで解明されていなかった鳥類の近紫外光の受容機構の理解にも重要な貢献をするであろう。鳥類は行動学的研究により近紫外光を識別することが知られているが、紫外光に吸収極大を示す視物質が見つかっていない。そこで鳥類にも見出された蛍光性油滴がこれに関っていると考えられる。つまり外界の近紫外光はまず油滴に吸収され、これから発する自家蛍光（2次光）が錐体外節の視物質に吸収されるという仮説である。今後蛍光油滴の収光・蛍光分光を測定し、量子効率などを精しく調べる必要があろう。

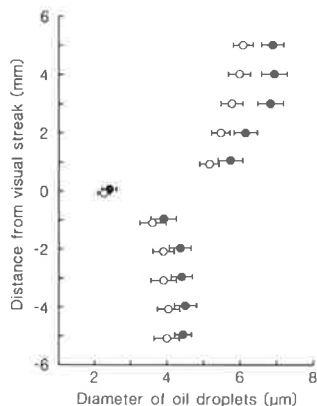


図2. 蛍光性（黒丸）と非蛍光性（白丸）の2種の無色油滴の直径。カメラ網膜の中央部を視線条（縦軸の0）から1mm間隔毎に背腹軸に沿って2種の無色油滴の直径を測った。各点は0.3mm四方の枠内に存在する2種の油滴（30～80コ）の平均と標準偏差を表す。縦軸の+は背側、-は腹側。

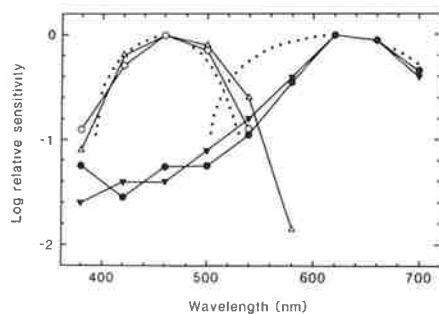


図3. 蛍光性（黒丸）と非蛍光性（白丸）の2種の油滴を含む錐体の色光感度。これらの錐体は蛍光色素の細胞内注入によって油滴の同定を行った。蛍光性と非蛍光性の2種の無色油滴を含んだ錐体（各々2例）は620又は460nmに感度極大を有する赤及び青感受性錐体である。2つの点線はノモグラムから得た視物質P460とP620の吸収分光を示す。

液 性 情 報 部 門

概要

当研究部門では現在中枢ニューロパイルにおける介在ニューロンを中心とした局所回路網の解明を主なテーマとして研究を行っている。このためゴルヂ法により形態学的に同定されたニューロンおよび伝達物質の免疫細胞化学法によって化学的に同定されたニューロンの超高圧電子顕微鏡による立体観察、超薄連続切片法による立体再構築を行い、特にシナプス結合の解析およびその定量化を行っている。また電気生理学的に同定され、標識されたニューロンについて同様の解析を行い、これらの三種類の所見から局所回路網の総合的な解明を計画している。本年度に於ては特に伝達物質の免疫細胞化学的な方法の確立に力を注ぎ電子顕微鏡レベルでのシナプス解析、特に超薄連続切片による立体再構築にはじめて成功したことは特筆すべき成果であるといえる。

これらの研究と平行に中枢ニューロン機能と密接な関りをもつグリヤ細胞の局所的分化を解明するため GFAP 免疫細胞化学およびゴルヂ染色を行った星状グリヤ細胞について超高圧電顕による立体観察、超薄切片による微細構造解析を行い、星状グリヤ細胞の立体構成を極めて具体的に明らかにすることができた。また従来、主としてニューロンの特殊染色法として用いられていたゴルヂ染色がグリヤ細胞、特に星状グリヤ細胞の優れた染色法であることが証明された。Freez Fracture 法によるグリヤ細胞膜の研究も中枢グリヤ細胞の構造理解に役立っている。

大学院受託研究生の研究テーマとして

- 1) Aganglionosis rat 腸管の神経支配（長浜真人）が完成し、順天堂大学に学位論文として提出された。
- 2) 顔面形成時における神経の関与に関する研究（小坂克子）は、両側鼻突起癒合の細胞機構に関する研究が昭和59年4月、日本解剖学会総会に発表された。
- 3) 心筋の微細構造に関する研究（中村栄男）

入沢研との共同研究である分離心筋細胞の微細構造の観察および超高圧電子顕微鏡による心筋 T-tubules の立体計測を行っており、後者の一部は日本電子顕微鏡学会総会（1983年5月）で発表された。

Rat 海馬及び齒状回における介在ニューロン間のギャップ結合

浜 清，小坂俊夫

ギャップ結合は intercellular communicating junction とも呼ばれ、中枢神経系では電気シナプスあるいは電気的カップリングに対応する構造と考えられている。このようなニューロン間のギ

ギャップ結合は、例えばニューロン活動の同期等の重要な機能をもっていると考えられている。我々はrat 海馬・歯状回の局所回路網の解明を進めているが、介在ニューロン間に高頻度でギャップ結合が存在することを発見した。

Wister 系雄ラット（5週令及び3月令）を心臓より灌流固定後、一部は通常の電顕標本とし、一部はGolgi 鍍銀を行なった後100~150 μ mのスライスとして塩化金によって金置換を行なった。

通常の電顕標本の超薄切片観察では varicosity を示す微細形態的に介在ニューロン由来と思われる樹状突起間にギャップ結合が見られた。またいくつかの例では樹状突起が細胞体まで追跡できた。

しかしながら、ニューロンの同定は従来、Golgi 鍍銀標本に基づいており、ギャップ結合をつくっている樹状突起の起源を明確にするにはGolgi 電顕法が不可欠である。Golgi 鍍銀一金置換標本で光顕的に介在ニューロンと同定したニューロンを電顕的連続切片法で検索した結果、8例中7例において合計22個のギャップ結合が細胞体から70~230 μ mの樹状突起上に観察できた。ギャップ結合は切片ではある方向（垂直方向）に切れた時のみに確認できること、及びGolgi電顕法では、数百 μ m程度の、従って樹状突起の拡がりの一部しか観察できないことを考慮すると、介在ニューロン間のギャップ結合はかなり高頻度に存在すると考えられる。

海馬の介在ニューロンはGABA系の抑制ニューロンと思われ、それらの間のギャップ結合は、錐体細胞で記録される大きなIPSPに寄与していると考えられる。最近、生理学的方法により、海馬錐体細胞間にギャップ結合による電気的カップリングが存在し、それが同期したケイレン様burst発生し関与し、一方、介在ニューロン間にはそのようなカップリングがないとする所見が出された。しかし我々は、錐体細胞間にはギャップ結合を認めることができなかったが、介在ニューロン間には構造的に明確に同定できるギャップ結合を認めるという上記の生理学的所見とは逆の結果を得た。我々の所見は上記の生理学的研究が適正な実験条件下で行なわれていない可能性を示唆し、ギャップ結合が従って電気的カップリングが存在すると思われる介在ニューロン間のカップリング証明できる実験条件下で、錐体細胞間のカップリングの有無を検討すべきであると考えられる。

脊椎動物中枢神経系において、光顕的に同定できたニューロン上にギャップ結合を示すことはGolgi 錐体一金置換標本がギャップ結合を検討できるレベルに至らない等の理由で現在まで行なわれていなかったが、今回我々は良好な標本の作製に成功し、ギャップ結合を作っている突起の起源、そのニューロン上でのギャップ結合の存在位置を明確にすることができた。更に、このようなギャップ結合を作っている介在ニューロンが確かにGABA系の抑制ニューロンであることの証明が、GABA合成酵素 glutamate decarboxylase (GAD) に対する抗体を用いた免疫細胞化学により進行中である。

グリア細胞特に星状グリア細胞の三次元構造解析

浜 清, 小坂俊夫

グリア細胞は常にニューロンと伴って存在し、古来神経組織の構成、機械的支持、神経細胞に対する栄養、又神経細胞間の絶縁などの機能をもつものと考えられている。最近ではニューロン周辺のKイオン濃度調節およびCO₂除去、神経伝達物質の分解、解毒を行なうことも明らかにされ、その重要さが注目されている。然しながら、グリア細胞の形態についての研究は意外に少なく中枢神経内におけるグリア細胞特に星状グリア細胞の三次元的な形態については殆んど知られていない。その理由の1つは各種グリア染色所見を統一的に理解する研究方法がなかったことおよびグリア細胞突起があまりに複雑繊細なため電顕レベルで立体的に理解できなかったことによると考えられる。

我々はGolgi染色標本の光顕、電顕および超高压電顕による観察、GFAPの光顕および電顕免疫組織化学法などの所見を比較検討した。

Cajalのグリア染色がグリア繊維束を染めることは森らの研究により明らかにされているがGFAP免疫組織化学の像はCajalのグリア染色の像と極めて類似しており、電顕レベルで反応産物は主としてグリア繊維束上に見られ、一部は附近の細胞質内に分散していることが分った。一方、Golgi染色標本の超高压電顕立体観察を行なうと灰白質における細胞質性星状グリア細胞も、白質に見られる繊維性星状グリア細胞もその終末分枝は扁平で細かな木の葉状となり神経性要素の間に介在しており、その基本的形態に差は見られない。小脳顆粒細胞層、海馬歯状回顆粒細胞層のように神経細胞体の密集部では星状グリア細胞突起は扁平で広い板状となり神経細胞を包む蜂の巣状のコンパートメントを形成している。同様の構造は網膜の内外顆粒層におけるMüller細胞にも見られた。小脳プレキンエ細胞の場合にはグリア細胞は薄いベール状となって細胞体および大型樹状突起を蔽っているのが見られた。金置換されたGolgi染色標本の超薄切片電顕法により、Golgi法により染色された細胞がグリア繊維束をもつこと、および扁平な終末分枝において金粒子が三層構造をもつ細胞膜に囲まれたグリア細胞質内に局在することが確認された。またこの際グリア細胞および周辺ニューロンの微細構造を極めて良好に保存することに成功した事は中枢における細胞同定研究分野での画期的な成果と考えている。

以上の結果からCajal染色およびGFAP免疫染色は主としてグリア繊維の染色によって表現された星状グリア細胞の形態を示し、Golgi染色は細胞質染色によって表現された星状グリア細胞の形態を示すことが明らかにされた。また星状グリア細胞の突起の形態はその存在する部位における神経性要素のタイプによって決められるがその基本的な構造は共通であることが分った。同時に、星状グリア細胞の形態解析にはGolgi標本の超高压電顕による立体観察が極めて有効であることが示された。稀突起グリア細胞の形態解析には異ったアプローチが必要であると考えられる。

先天性 aganglionosis ラット腸管の Auerbach 神経叢に関する病理組織学的研究

長浜真人, 浜 清, 尾崎 毅

ヒト Hirschsprung 病は先天的に下部消化管の腸蠕動運動が欠如し, 組織学的には腸壁内神経節細胞を欠くことが知られている。しかしながらヒト Hirschsprung 病解析のための検索材料は比較的限定されるため, この疾患の全体像は十分に把握されていない。最近, 筏井らによって発見された先天性 aganglionosis (ag) ラットはヒト Hirschsprung 病類似の症状を示し, 同疾患のモデル動物として適当であると考えられている。今回この先天先 ag ラット腸管の Auerbach 神経叢 (A-神経叢) を, 伸展標本を用いた組織化学的及び免疫組織学的染色, 通常切片による光学顕微鏡的観察, 走査電顕及び透過電顕観察により検索した。

全ての検索した先天性 ag ラットは腸管内容物を充満し異常に拡張した腸管を有していた。拡張した腸管に続いて狭小腸管を必ず有しており, 狭小部はヒト Hirschsprung 病に比べて著しく長いのが特徴であった。対照ラット腸管では A-神経叢は十二指腸から直腸まで比較的規則正しい格子状像を示したが, 先天性 ag ラットでは, 肉眼的に全く異常が認められない十二指腸でも A-神経叢は不整な配置をとっており, ganglion strand は平均して短小で, 対照ラットのそれと比べ明らかに差異があった。拡張した部位では, A-神経叢は肛門側に向かうに従い徐々にその密度を減らし狭小部に移行する以前に消失していた。結腸においては, 対照ラットでは見られない径大小不同の不規則な神経線維束からなる神経線維網が存在したが, 神経節細胞は認められなかった。

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・解説し、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行っている。主な研究課題として、(1)中枢神経系における神経回路の解析、(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行っている。本年度は、当部門でモデル実験系として集中的に研究を行ってきた大脳一赤核系シナプス伝達で、短期可塑性である長期増強を見出し、これについて研究を行うと共にこれらの解析の基礎として、赤核を含む脳切片を用いて、膜のイオンチャンネルの調査を行った。さらに赤核に含まれる抑制ニューロンの免疫組織化学的同定およびこれを用いた抑制ニューロンの可塑性の予備的研究を行った。また発芽促進物質同定のアッセイ系として組織培養を用いた予備的研究を行った。また新たに昨年より着手した聴覚中枢の情報処理の研究を続けた。

未成熟ネコにおける大脳一赤核シナプスの可塑性

塚原 伸晃 (大阪大・基礎工；生理研), 村上富士夫 (生理研),

Eva Kosar (ロックフェラー大学)

〔目的〕成熟ネコの大脳一赤核シナプスは顕著な可塑性を示すことが知られているが(4, 5), 仔ネコの大脳一赤核シナプスでは一層著しいシナプス結合の可塑的变化が起ることが知られている。塚原らの電気生理学的研究によると(2, 3), 生後17日から150日目に大脳感覚運動領を片側で除去すると、正常では同側性に限られる大脳脚の刺激によって赤核細胞に生ずる単シナプス性 EPSP が、対側の大脳脚の刺激によっても生ずるようになると報告されている。このことは同側性の大脳の支配が失われた結果、対側の大脳皮質の細胞から新しい対側性の投射が生ずることを示唆している。このような変化は、生後150日以上経過したネコでは殆んど起こらない。本研究では①上記の結果が初期に両側性であった大脳皮質からの支配のうち、対側性のものが正常な発生では除去されるが、発生途上で大脳皮質を片側で破壊したため、その除去が阻害されたために生じたものなのか、あるいは元来存在していなかった対側性の投射が新たに生じたことによるのか、を解剖学的方法を用いることによって明らかにし、②正常に発達した動物では見られない対側性の投射シナプスがどのような信号伝達の可塑性を有しているかを電気生理学的方法を用いて明らかにすることを目的とした。

〔方法〕1)解剖学的実験：生後16日から21日目の仔ネコ3匹及び体重210g(生後2週未満と推定される)の仔ネコを用いて片側の大脳感覚運動領にHRPをハミルトンシリンジで注入し(0.2 μ l

×3,30%), 注入後2日から5日後に脳を灌流固定したのち赤核を70 μ mの厚さに切り出し、TMD法(1)によって反応をおこなわせた。反応ののち脱水、包埋後暗視野顕微鏡及び偏光顕微鏡を用いて切片の観察をおこなった。また生後3～5週に左側の大脳感覚運動領の除去手術を施した仔ネコ2匹に、皮質除去後3～4ヶ月後に右側の大脳感覚運動領へHRPを注入、上記と同様の方法で順行性にラベルされる線維及び終末の検索をおこなった。

2)電気生理学的実験：生後32～39日目に左側の大脳感覚運動領を除去した生後116～223日目の9匹(うち2匹の生後日数は推定)の仔ネコ、及び生後31～40日目(6匹のうち3匹の生後日数は推定)に大脳感覚運動領を破壊し、同時又はその後13～243日目に右側の中位核を破壊したのち22日から118日経過した仔ネコ6匹を用いた。左側の赤核より細胞内及び細胞外記録をおこない、左右の大脳脚の刺激によって発生するEPSPを記録した。EPSPの振幅の測定は、膜電位、膜抵抗などの変動によって大きく影響を受けるため細胞外電場電位の解析も併用した。中位核の破壊をおこなったのは、元来樹状突起部に限られる大脳からの投射をこれによって細胞体部にも生ぜしめ(4, 5)、細胞外電場電位を容易に観察できるようにするためである(図1のA参照)。記録した電位は計算機による加算平均をおこない、加算中に活動電位が発生した場合は自動的にそれが除去されるようにし(大阪大学・前田純がこのソフトウェアを製作した)、また記録中は常に膜電位のモニターをおこなった。

〔結果及び考察〕

1)解剖学的実験

HRPを注入した皮質と同側の大脳脚や赤核にラベルされた線維が見出された。赤核内には終末と思われたふくらみ(varicosity)をともなった線維が多く見られた。しかし、対側の大脳脚や赤核にはラベルされた線維や終末と思われるものは殆んど見出されなかった。このことは生後3週間以内の仔ネコでも大脳感覚運動領から赤核への対側性の投射は存在しないことを示唆する。

電気生理学的実験によれば、大脳皮質除去によって生ずる対側性の投射はもともと存在する同側性のものよりも少ないことが知られている。したがって上記の結果によっても、対側性の投射は存在するが、それが十分に多くないために我々が用いた方法では検出できないのではないかという疑問が生ずる。そこで我々は電気生理学的研究によって対側性の投射の存在が見出されている仔ネコ、即ち生後3～5週に左側の大脳感覚運動領を除去したのち3～4ヶ月経過したネコを用いて同様な実験をおこなった。

その結果、このような動物では確かに同側性の大脳―赤核投射のみならず、対側性の大脳―赤核投射も明確にラベルされた。

以上の結果は、塚原、藤戸らによる生理学的研究によって見出された大脳皮質片側除去仔ネコにおける対側性の大脳―赤核投射は、生後間もない頃は存在していた対側性の投射が発生段階で除去される筈であったものが、皮質除去によって阻害されたことによって生じた、という仮説を支持しない。したがって、もう一つの可能性、即ち同側性の投射の除去によって新たに対側性の投射が生じたという考えを支持する。

2) 電気生理学的実験

同側の大脳脚の刺激によっても EPSP が発生する動物があったため（大脳感覚運動領が充分に除去されていなかったためと考えられる），これを用いて同側性の大脳—赤核投射の可塑性を調べる実験をおこなった。図 1, A に示したのは実験に関する神経回路と記録電極の配置を示すシェーマである。B の上段は大脳脚の刺激によって細胞外記録電極 R_1 で記録された細胞外電場電位であり，下段は R_2 によって記録された細胞内電位（EPSP）である。大脳脚に 100Hz で 3 分間連続して刺激を与えると，刺激前（B 左列）に比べて細胞内外の電位共に大幅な増強がみられる（B 中列）。この増強は刺激後数十分持続したのち，もとに戻る（B 右列）。ここに示したような細胞外電位をテタヌ刺激後の時間の関数として，50Hz，100Hz，200Hz のテタヌ刺激に対してプロットしたものが C であり，100Hz で刺激を与えた時が最も著しい増強が観察された。

対側の大脳脚の刺激によって赤核に発生するシナプス電位に関しては，今のところこのような増強は見出されておらず，対側大脳から赤核への投射シナプスは同側性のものとは異なった短期的可塑性を有しているのではないと思われる。

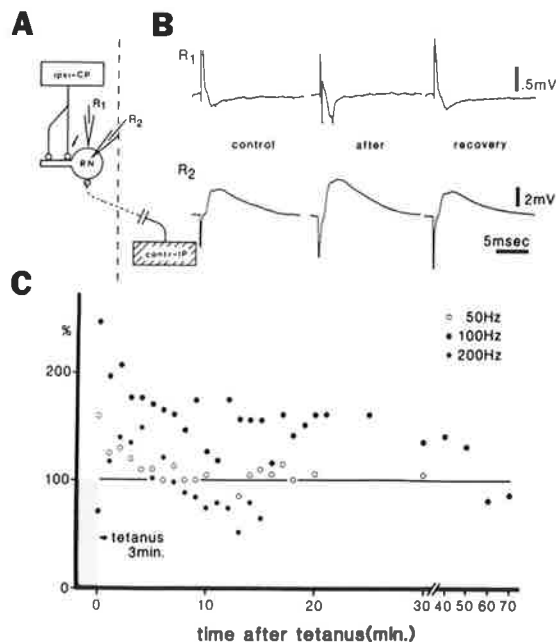


図 1. 仔ネコの大脳—赤核シナプス伝達の増強。A：実験の配置図，ipsi-CP: 同側大脳脚，RN: 赤核，contr-IP: 対側赤核， R_1 : 細胞外記録電極， R_2 : 細胞内記録電極。矢印は中位核破壊によって新しく生じた結合を示す。B： R_1 （上段）と R_2 （下段）によって記録された大脳脚刺激による細胞外電場電位（上段）及び細胞内電位（下段），左端は刺激前，中央はテタヌ刺激後，右端はその後の電位の回復を示す。C：3 種類の異なる周波数によるテタヌ刺激によるシナプス伝達の増強。横軸はテタヌ刺激後の時間，縦軸は大脳脚刺激による電場電位のテタヌ刺激前のコントロール値に対する割合を示す。

〔参考文献〕

- 1) Mesulam, M-M. (1978) Tetramethyl benzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry: a non-carcinogenic blue reaction-product with superior sensitivity for visualizing neural afferents and efferents. *J. Histochem. Cytochem.* **26** : 106-117.
- 2) Tsukahara, N. & Fujito, Y. (1981) Neuronal plasticity in the newborn and adult feline red nucleus. In: *Lesion-induced plasticity in sensorimotor systems*. eds. by Flohr, H. & Precht, W., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, 64-74.
- 3) Tsukahara, N., Fujito, Y. & Kubota, M. (1983) Specificity of the newly-formed corticorubral synapses in the kitten red nucleus. *Exp. Brain Res.* **51**: 45-56.
- 4) Tsukahara, N., Hultborn, H. & Murakami, F. (1974) Sprouting of cortico-rubral synapses in red nucleus neurons after destruction of the nucleus interpositus of the cerebellum. *Experientia* **30**: 57-58.
- 5) Tsukahara, N., Hultborn, H. Murakami, F. & Fujito, Y. (1975) Electrophysiological study of formation of new synapses and collateral sprouting in red nucleus neurons after partial denervation. *J. Neurophysiol.* **38**: 1359-1372.

赤核細胞におけるカルシウム依存性電位と内向き整流

窪田道典, 中村 真, 塚原伸晃

これ迄 *in vivo* で行われた電気生理学的な実験によって、赤核細胞にどのような電氣的活動が生ずるかが調べられてきたが、その電氣的活動の基となるイオン機構についてはほとんど分からなかった。しかし、脳スライスの方法によって赤核細胞からも *in vitro* で記録できるようになり、外液のイオン環境を容易に変えることができるようになった。そこで、脳スライスの方法を用いて、モルモット赤核細胞の電氣的活動に關与するイオンコンダクタンスについて調べた。

まず、赤核細胞の活動電位に続いて生ずる後過分極電位について調べた。赤核細胞の後過分極電位には、速い成分と遅い成分とが存在する。灌流液に 5—10 mM のテトラエチルアンモニウム (TEA) を加えると、活動電位の立ち下がりの部分がゆっくりとなり、活動電位の持続時間が延びた。これと同時に、後過分極電位の速い成分が消失した。遅い成分は、この時ほとんど変化しなかった。灌流液の Ca^{2+} 濃度を 1.2 mM にし、3 mM の Co^{2+} を加えると、今度は後過分極電位の遅い成分が消失した。この時、速い成分には変化が見られなかった。この結果は、後過分極電位の遅い成分が生ずるためには、外液の Ca^{2+} イオンが必要であることを示している (図 1)。

一方、後過分極電位に対する膜電位の影響を調べると、膜電位を脱分極させた時には後過分極



図1. 後過分極電位に対する Co^{2+} の効果。1.2 mM Ca^{2+} , 3 mM Co^{2+} を含む波で灌流すると後過分極電位の遅い成分が可塑的に消失した。

電位の振幅は増大し、膜電位を過分極させた時にはその振幅は減少した。また、今回の実験では 3M KCl を詰めた電極を使用しているが、細胞内に刺入している間に後過分極電位が減少するようなことは見られなかった。従って、後過分極電位は K^+ イオンによって生ずるのであろうと予想された。そこで、これを確かめるために灌流液の K^+ イオンの濃度を変えて、遅い後過分極電位の逆転電位に対する影響を調べた。膜電位を変えてから活動電位を発生させるという通常の方法では、後過分電位の正確な逆転電位を求めることは困難であることが判明したので、ここでは活動電位を発生させた直後に、過分極電流パルスを送るという方法を用いた。その結果、3 mM K^+ を含む液の時には、遅い後過分極電位の逆転電位は -109mV となり、6 mM K^+ を含む液の時には -88mV となった。この差は 21mV となり、ネルンストの式から得られる値 18.3mV とほぼ一致した。従って、遅い後過分極電位は、 Ca^{2+} によって活性化される K^+ コンダクタンスによって生じているものと考えられる。

上記のように、赤核細胞には Ca^{2+} によって活性化される K^+ コンダクタンスが存在することが示唆されたので、電位依存性の Ca^{2+} コンダクタンスが存在する可能性が考えられる。このことを確かめるために、 Ca^{2+} スパイクが生じるかどうかを調べた。 Na^+ スパイクを消失させるために $0.5\mu\text{g/ml}$ のテトロドトキシン (TTX) と外向き K^+ 電流を抑制するために 10mM の TEA を加えておいて、比較的大きな脱分極電流パルスを送ると、持続時間の長いスパイクが生じた。さらに灌流液から Ca^{2+} を取り除き、 4mM の Co^{2+} を加えると、このようなスパイクは消失した。従って、この持続時間の長いスパイクは、 Ca^{2+} スパイクであると考えられる (図2)。

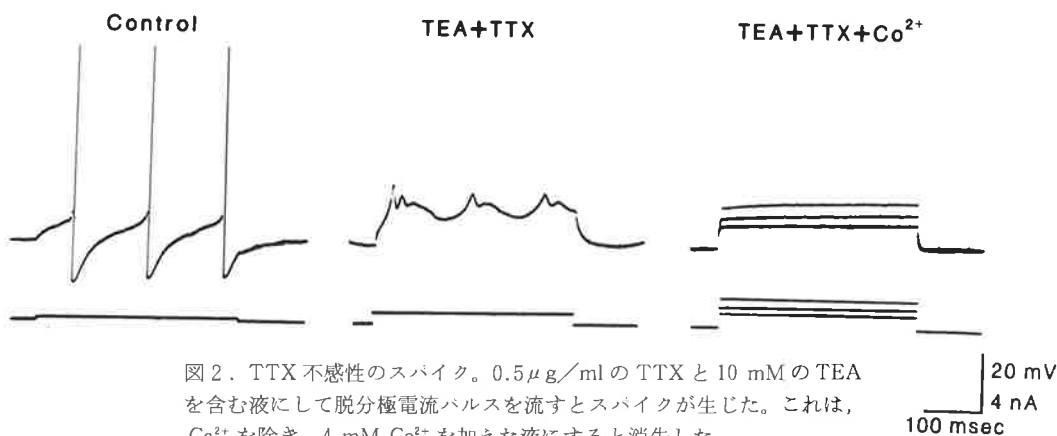


図2. TTX 不感性のスパイク。 $0.5\mu\text{g/ml}$ の TTX と 10mM の TEA を含む液にして脱分極電流パルスを送るとスパイクが生じた。これは、 Ca^{2+} を除き、 4mM Co^{2+} を加えた液にすると消失した。

一方、過分極電流パルスを送ると、電位にはサグが現われ、電流を切った直後にはオーバーシュートが現われた。つまり、時間依存性の内向き整流が観察された。灌流液に 1—5 mM の Cs^+ を加えると、この内向き整流は抑制された。しかし、TTX, TEA, Co^{2+} あるいは Ba^{2+} によっては抑制されなかった。このことから、ここに見られた内向き整流は h コンダクタンスによって生じているのであろうと推測される (図 3)。

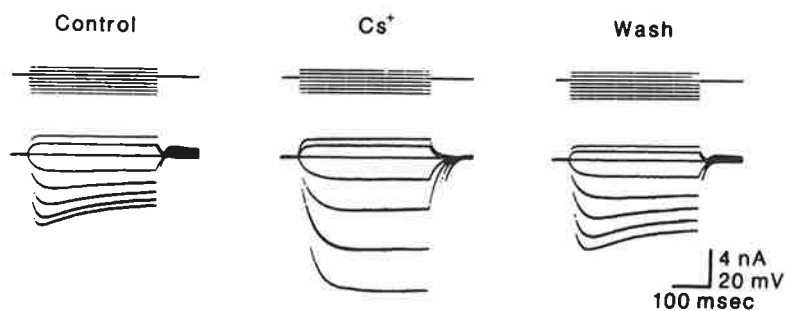


図 3. 内向き整流。Control で見られるように過分極電流を送ると電位にはサグが現われ、電流を切った後にはオーバーシュートが現われた。これは、5 mM Cs^+ によって抑制された。

結論として、モルモット赤核細胞において、速い後過分極電位は TEA によって消失し、遅い後過分極は Co^{2+} によって消失した。どちらの成分も外液の K^+ イオンの濃度に依存することから、後過分極電位のうち速い成分は電位依存性の K^+ コンダクタンス、つまり遅延整流性コンダクタンスによって生じ、遅い成分は Ca^{2+} によって活性化される K^+ コンダクタンスによって生ずるものと考えられる。また、TTX によって消失しないスパイクが生じ、このスパイクは Co^{2+} によって消失したので、赤核細胞にも電位依存性の Ca^{2+} コンダクタンスが存在するものと考えられる。さらに、膜電位を過分極にすると、時間依存性の内向き整流が観察された。これは Cs^+ によって抑制されたが、 Ba^{2+} によって抑制されなかったので、おそらく h コンダクタンスによって生ずるものと考えられる。

最後に、TTX を分けて下さった中山博士に感謝します。

キクガシラコウモリにおける発声系と聴覚系の協調について

谷口郁雄

キクガシラコウモリが洞窟の天井や止まり木にぶら下って、エコーロケーションを行っている際には両側の耳介に激しい振動が起こる。左の耳介が前方に動くときには、右の耳介は後方に向

かい、交互に運動する。その振動数は、毎秒30回にも達する。この耳介運動の生物学的な意義は明らかではないが、キクガシラコウモリに特徴的な行動で、コウモリが発する超音波パルスと同期することが知られている。ニホンキクガシラコウモリについて、そのパルスの周波数分析と、聴覚系の周波数—閾値曲線の測定を行い、両者を比較したところ、発声音の周波数と聴覚系の最適周波数との間にずれがあることがわかった。この周波数差を補償するために、コウモリは耳介運動によるドプラー効果を積極的に利用しているように思われる。

耳介運動と発声との強い相関を示すこの行動について、今回は特に耳介を運動させる筋肉への神経支配を調べ、発声系と聴覚系の解剖学的な連絡について検討した。キクガシラコウモリの耳介を動かす筋肉の一つである後耳介筋の一侧に HRP を注入し、脳切片を作成し、TMB 法により HRP 陽性細胞を検索した。その結果を図1に示す。

HRP 陽性細胞は HRP 注入部と同側の顔面神経核の他に、同側の三叉神経運動核にも見出された。後耳介筋が同側の顔面神経核から支配を受けることは、他の種に関する多くの報告と一致する。しかし、三叉神経運動核からも二重の支配を受けるという証拠は報告されていないようである。ただ Bowden ら (1960) がウサギにおいて両者の連絡の可能性があることを示唆している。

このコウモリの三叉神経運動核に分布する HRP 陽性細胞は、ネコやラットに関する報告と照合すると、咀嚼筋を支配する小区画に一致して局在する。咀嚼筋は構音機構の一要素として発声に関与するので、上の結果は発声と耳介運動を協調させる機構の存在を示唆する。もし、これが正しいとすると、耳介の運動と発声とは共通の上位中枢から、既にプログラムされたコマンドによって制御され、聴覚系からの感覚情報のフィードバックは必要ではないように思われる。

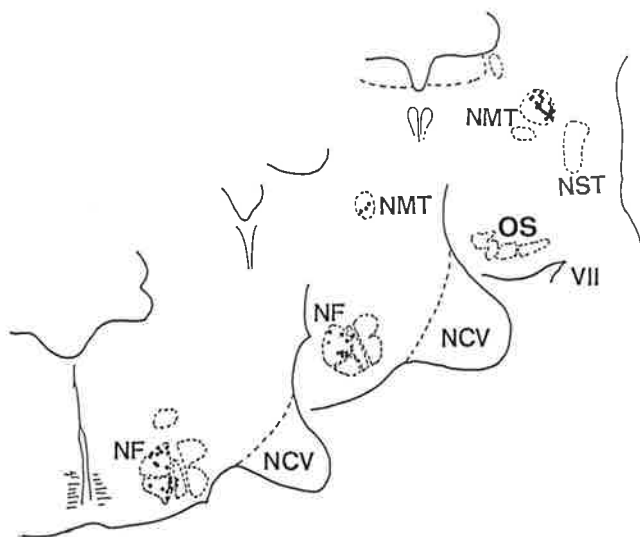


図1. 後耳介筋を支配する神経細胞の延髄における分布。

一侧の後耳介筋へ HRP を注入すると、HRP 陽性細胞が同側の顔面神経運動核の他に、三叉神経運動核にも見出された。

情報記憶部門

概要

記憶及び学習の過程は経験による神経系の機能的変化の結果として形成される。神経系は、同一の刺激に対してでも環境あるいは過去の経験に応じて異った反応を示し、このような機能的変化は、神経系の可塑性と呼ばれている。神経系の可塑的变化を発現する条件は、ホルモンあるいは体内の一部の変化という内的因子でもあり得るし、また外界からの刺激あるいは環境の変化という外的因子でもあり得る。神経系の正常機能を維持する機構は一般に栄養機能と呼ばれているが、この栄養機能が不変であれば神経系の機能的変化は起こり得ない。したがって、栄養機能の変化は神経系の可塑性に対する必要条件である。神経系がどのような栄養機構によってその正常機能を維持しているかを細胞レベルで明らかにするのが本部門の研究目的である。この目的のために、哺乳動物における最も単純な反射弓である単シナプス性の筋伸展脊髄反射経路を用い、脊髄運動ニューロンにおけるシナプス機能がどのような栄養因子によって維持され、どのような条件下でシナプス機能が変化するかを検討している。これらの研究によって、栄養機能と可塑性の関連を明らかにすることと、具体的な栄養因子を見いだすことが窮極の目的である。

新生ラットにおける筋神経傷害に伴う Ia シナプス伝達の変化

久野 宗（生理研；京都大・医）、宮田雄平（生理研；東京医歯大・医）、
梶原康博（生理研）

〔研究目的〕 哺乳動物の筋神経を切断すると、2週間以内にその筋神経刺激によって発生する脊髄運動ニューロンの単シナプス性 EPSP の減弱が見られる。この EPSP の減弱は、切断神経と筋の再縫合後時間と共に回復する。したがって、筋紡錘から由来する Ia 感覚神経の中樞シナプス機能の維持には、Ia 線維と筋との結合が必要である。本研究は、Ia 感覚神経の中樞シナプス機能の維持に参与する筋の因子を明らかにすることを目的とする。

〔実験方法〕 新生ラットの下肢の medial gastrocnemius (MG) 神経をピンセットで挫滅し、4-5週間後に、lateral gastrocnemius-soleus (LGS) 運動ニューロンから細胞内電位を記録し、MG 神経刺激に対する単シナプス性 EPSP を記録した。MG 神経は生後1日あるいは4日目に挫滅した。また、雄マウスの顎下腺から神経成長因子 (nerve growth factor: 2.5S-NGF) を抽出し、これを、生後1日目に MG 神経を挫滅したラットの腹腔内に慢性的に投与して、MG 神経刺激によって発生する EPSP に対する効果を観察した。

〔結果及び考察〕 図1は、LGS 運動ニューロンから記録した単シナプス性 EPSP の例を示

す。図1 Aは、LGS神経刺激による同種性EPSPである。この場合は、その筋神経のIa線維に対する最大上刺激強度以下でその運動ニューロンの軸索が刺激されることがある(上図)。そのような例では、細胞内電極から過分極電流を通電し、逆方向に発生する活動電位をブロックし、Ia線維に対する最大上刺激強度におけるEPSPを観察した(下図)。図1 Bは、MG神経刺激に対する異種性EPSPを示す。Ia線維に対する最大上刺激強度においても、EPSPの大きさに時に変動が見られたので、2秒に1回の刺激頻度で10回EPSPを記録し、その最大EPSPの振巾を採用した。活動電位が60mV以下の細胞は分析から除外した。

図2 Aの破線のヒストグラムは、24-35日令の正常のラットから得られた結果で、MG神経刺激によって、LGS運動ニューロンから記録した最大EPSPの振巾の分布を示す。用いたラットは20匹で、146ケのLGS運動ニューロンから記録したEPSPの平均値は、1.1mV(2重矢印)であった。図2 Aの実線のヒストグラムで示すように、生後1日にMG神経を挫滅した動物では、26-35日令において、MG神経刺激によって誘起した異種性EPSPは著明に減弱していた。記録した58ケのLGS運動ニューロンの44ケ(76%)においてはMG神経刺激によってEPSPが観察されなかった。これらのラット(8匹)における異種性EPSPの平均値は0.10mV(1重矢印)であった。

図2 Bは、生後4日にMG神経を挫滅した結果を示す。生後1日の神経挫滅の結果と比較して、EPSPは著明に大きく、また、分布のmodal peakは正常動物のそれと一致した。MG神経を生後1日及び4日に挫滅した場合では、運動神経による筋の再支配には差がなく、共に全ての筋線維が神経刺激に対して収縮を示した。一方、これらの筋における筋紡錘の形態には著しい相違があり、生後1日に神経を挫滅したMG筋の筋紡錘に強い萎縮が見られた。筋紡錘の萎縮度を定量化する目的で、その赤道面における筋紡錘の直径を測定した。正常のMG筋におけるこの値は、平均、48 μ mであった。生後4日に神経を挫滅したMG筋での値は、平均、46 μ mであり、生後1日の神経挫滅のMG筋の筋紡錘の平均直径は25 μ mであった。これらの結果は、Ia感覚神経の中枢シナプス機能の維持には正常の筋紡錘のIa線維の末梢のコンタクトが必要であることを示唆する。過去の実験で、末梢の筋神経の切断によって減弱したEPSPは、その神経を筋に再縫合することによって回復するが、切断神経を正常の神経支配を受けている筋に縫合した場合には回復しないことを示した。したがって、Ia線維の末梢端と筋の除神経された構造のコンタクトが中枢シナプス機能の回復に必須であると考えられるが、本研究の結果から見て、この構造は、除神経された筋紡錘であろうと推測される。

切断した筋神経を除神経した筋に再縫合することによりEPSPが回復する時、その運動神経と筋の機能的伝達の回復も、筋の伸展に対するIa線維の機能的回復も必要条件ではないことを先の実験で示した。このことは、Ia線維と筋、あるいは筋紡錘との機械的コンタクトがEPSPの回復に対する必要条件であり、この両者間における何んらかの化学的物質の媒介を示唆する。神経成長因子(NGF)は、胎生期における感覚神経細胞に対する栄養物質であるので、生後においても、Ia線維の中枢シナプス機能にNGFが関与しているか否かを検討した。生後1日にMG神経を

挫滅し、その後、NGFを3週間にわたって投与した結果を図3Bに示す。MG神経刺激によってLGS運動ニューロンに誘発したEPSPは、NGF処置をしなかった動物(図3A)に比べて有意の差をもって亢進した。NGFが、Ia線維の中枢シナプス機能に対する栄養因子であれば、抗NGF抗血清の投与によってEPSPの減弱が予測されるが、抗NGF抗血清の投与によってはEPSPは影響されなかった。もし、NGFがIa線維の栄養因子として筋紡錘の被膜内に存在していれば、抗NGF抗体の筋紡錘内への侵入がはばまれてEPSPに対する効果が見られない可能性も存在する。しかし、内因性NGFが、Ia線維の中枢シナプス機能に対して栄養効果を示すか否かは現在不明である。

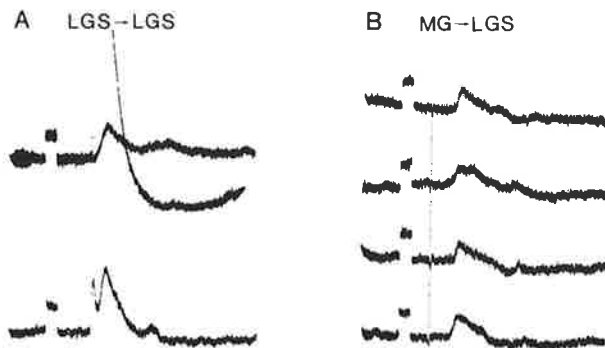


図1. LGS運動ニューロンから記録したEPSP. A, LGS神経刺激. B, MG神経刺激. 矩形波, 1 mV, 1 msec。

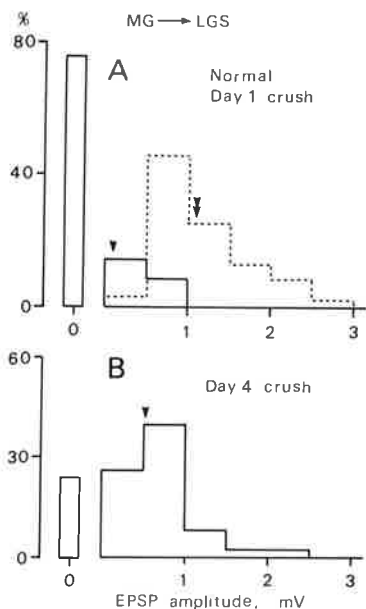


図2. EPSPの大きさの分布. A, 正常ラット(点線)と生後1日のMG神経挫滅(実線)の結果. B, 生後4日のMG神経挫滅の結果。

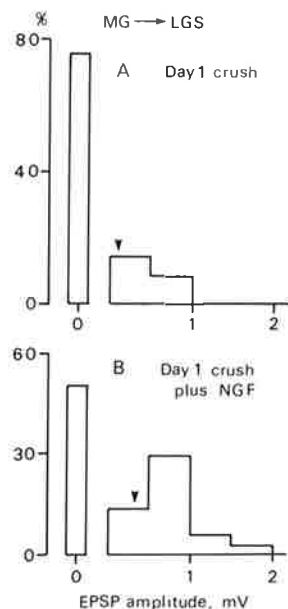


図3. A, 図2Aの実線と同じ. B, 生後1日にMG神経を挫滅し、その直後からNGFを投与した時のEPSPの大きさの分布。

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、高次神経調節研究部門、高次液性調節部門、生体システム部門の3部門からなり、各部門は連携を保ちつつ、生体調節の機序を定量的に解明するべく、研究をすすめている。このうち、生体システム部門は昭和59年度に新設がみとめられたので、一層幅広い活動が予想されるようになった。

高次神経性調節部門は、昭和54年開設以来5箇年を経た。開設後2年間は洞房結節、房室結節の微小標本作製し、電圧固定法によりイオン流を測定し、ペースメーカー機転の研究を行ってきたが、以後3年間は専ら、新しく開発した単一遊離心筋細胞を用いて、一般生理学的な研究を行なうに至った。このように元来、多細胞系である心臓の組織を、遊離して一個にする事は今まで心筋という特殊な細胞の研究にとどまっていた研究の視野を広く骨格筋、神経細胞、又は卵細胞のごとき細胞で知られてきた興奮膜の一般的性質と対比できるレベルにまで広げることが可能になった点がまずあげられる。比較的早い時期に研究を開始したために、幸い単一心筋の研究において、2～3重要な貢献をなしたように思う。しかし一方、眼前に展開した研究の分野が急速に拡大したため、研究の課題も多岐にわたるようになった。次年度以降は、その中から最も必須な研究課題を選択し、これに向けて研究努力を結集する方向の検討が必要となると思われる。

昨年度の年報において印刷中と報告した2編、すなわち兎洞房結節細胞の拡張期脱分極にいわゆるペースメーカー電流は寄与するか（野間ら）及び心室細胞の定常膜電流に対する Ca^{2+} 注入の効果（松田）の2編はいづれも発表済み（文献参照）となった。

本年度は2編の先導的報告が行われた。一つは野間が昭和57年3月に西ドイツに滞在中行ったもので、洞房結節細胞のムスカリン性 K イオンチャンネルの発見である。迷走神経刺激により、その末端から遊離されるアセチルコリン(ACh)が細胞の K^+ コンダクタンスを増加させ、心拍数を減少させることは古くよりわかってきたことであるが、パッチクランプの技術を使用して、単一チャンネル分析を行ったのは、これがはじめてであり、 ACh が心筋にある I_{K1} チャンネルに作用して、そのコンダクタンスをかえているというような考えが誤りであったことを明らかにしたものである。第二は野間による ATP により調節されるチャンネルの報告である。従来、虚血があると活動電位の持続時間は短縮し、心不全や不整脈の原因となると考えられていた。この原因はカルシウム電流の減少によるものか、 K 電流の増加によるものか、多くの仮説があってはっきりしなかった。又、多細胞系の標本でえられた細胞内 Ca^{2+} イオンの増加による K^+ 電流の増加が一つの原因とも考えられてきた。しかし細胞内 Ca^{2+} イオンの増加は、松田によって K 電流の増加をおこさず、むしろ非選択的な電流系の活性をおこすことが知られているので、疑いをもたれ

ていた。今回の ATP- 調節 K チャンネルの発見により、その原因が一挙に解決することとなり、虚血により生じた細胞内 ATP 濃度の減少こそ、活動電位短縮の原因となることが理解されるに至ったのである。

この 2 論文を含め、本年度内に印刷された論文および国際生理学会において報告した 6 編の論文について、その概要を以下に記すこととする。

ATP 及び関連物質の細胞内注入による単一心室筋細胞の 活動電位調節について

谷口淳一，野間昭典，入沢 宏

モルモットの心室筋を型のごとくコラゲナーゼ処理で単一細胞に遊離した。ATP を細胞内に注入すると活動電位のプラトー相は延長し、振幅も大きくなった。同様の結果は ATP, AMP, CP のように細胞内の ATP 濃度をますと考えられる物質を細胞内に注入してもらえられた。一方、細胞内の ATP 濃度を減少させると考えられるクレアチンの注入、又は 5.4 mM CN を含むタイロード液の灌流、CN 灌流中に AMP を細胞内注入するなどの操作によっては活動電位は短縮し、振幅も減少したのである。膜電位固定法によってみると、ATP の注入はカルシウム電流の振幅を増加させたが、一方 CN の灌流によっては、カルシウム電流の減少は著明でなく、活動電位の短縮が著明であった。さらに AMP の注入は、プラトー相の付近における外向き電流の振幅は減少させるが、-40mV 付近における外向き電流は増加させ、電流電圧曲線をみれば (0.3 秒位の) N 字型の波形が強盛される傾向を示した。CN を灌流すると、これと逆の効果がおこった。即ちプラトー相より正側の脱分極パルスによっては膜電流は CN 下で著明におえるが、この電流は ATP 作用下ではほとんど増加しなかった。この実験結果から、ATP が膜電流を修飾し、活動電位の持続を維持していることが明らかになったと考えられる。

〔発表〕 Circulation Research, 53 : 131-139 (1983) に発表。

洞房結節細胞のムスカリン性 K イオンチャンネル

Sakmann, B., A. Noma, and W. Trautwein

アセチルコリン (ACh) は迷走神経末端から遊離される物質で、洞房結節細胞膜に作用して K^+ コンダクタンスを増すことがわかっているが、先に野間と Trautwein (1979) はノイズ解析を行ない、ムスカリン性 ACh 受容器を介する独自の K^+ チャンネルの開閉によることを提唱した。し

かし、現在に至るもムスカリン性ACh受容器は心筋に存在する時間非依存性の内向き電流Kチャンネルを調節するにすぎないという説があって、先の実験結果が認められていない。この論文では洞房結節又は房室結節の細胞にAChによって活性化される単一チャンネルを発見したことを報告している。すなわちAChによって活性化される単一Kチャンネルは、心房や心室に存在する内向き整流性のKチャンネルとは全くことなるものであることをのべ、さらに洞房結節の静止時KチャンネルはAChにより活性化されるKチャンネルと同質のものではないかとのべた。

この報告では、電極内に $20 \text{ mM K}^+ \cdot 2 \times 10^{-7} \text{ M ACh}$ を含む条件では逆転電位は静止電位よりも約 $+20 \text{ mV}$ 正電位側にあり、単一チャンネルのコンダクタンスは、負電位側では 25 pS 、正電位側では 5 pS となった。

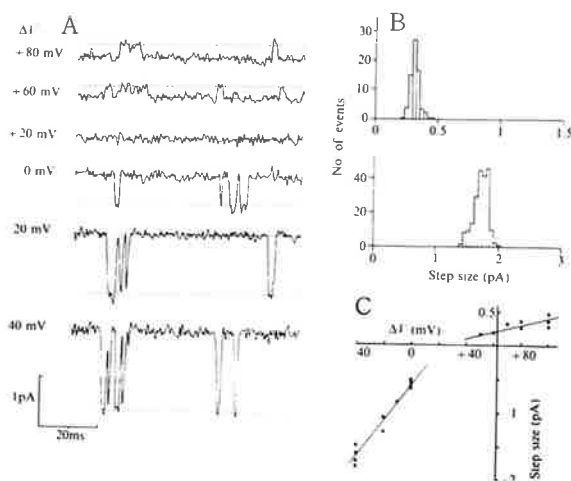


図. AChチャンネルのコンダクタンスを示す。Aは内向き電流と外向き電流を示す。電流記録用の電極内には mM で、 $\text{NaCl } 120$, $\text{KCl } 20$, $\text{CaCl}_2 4$, $\text{Na-HEPES } 5$ と $2 \times 10^{-7} \text{ ACh}$ を含む。

左側の数字はパッチ電極の静止電位からのシフトを示している。例えば -20 mV は静止電位より -20 mV より負電位であることを示す。内向き電流は下向きに表示した。直線は電流0のレベルを示し、点線は各電位における平均電流値を示している。

Bは、上図は静止電位より $+80 \text{ mV}$ 脱分極させた時の外向き電流の分布、下図は静止電位より -40 mV 過分極された時の内向き電流の分布を示している。両者は単峰性で、平均電流値は各々 0.32 pA と 1.68 pA である。

Cは、電流電圧曲線を示している。ピペット内 20 mM K^+ 。Bにおける平均電流値を求め、実験例を示してプロットした。

電極内のK濃度を 20 mM から 70 mM 又は 140 mM に上げると、AChにより活性化する内向き電流の振幅は $0.58 \pm 0.04 \text{ pA}$ から各々 $1.8 \pm 0.12 \text{ pA}$ 又は $3.4 \pm 0.4 \text{ pA}$ と増加した。このことは、この電流系が、外液のKイオン濃度と相関し、 K^+ 選択性があることを示すものであった。このチャンネルは、内向き整流を示すものの、心房筋にみられる内向き整流Kチャンネルとは全くことなることがわかった。すなわち、コンダクタンスは 70 mM K 液をピペット内においた時でも $34 \pm 6 \text{ pS}$ とAChにより

活性化するK電流よりも高く、しかもチャンネル開放時間が50ms又はそれ以上もあり、AChチャンネルのそれよりも長いことがわかった。 2×10^{-7} AChを含む条件下でAChチャンネルのゲーティングを測定し、チャンネルの開閉はbursts的におこり、決してrandom間隔にはならないことを示した。チャンネルの閉時間は1.3msと80msに明らかに分離される2つのコンポーネントから成立していた。6msより長い間隔のある事をバーストと定義すると、バーストの時間もあきらかに11msと1.1msecとの2つの指数極数的にわかれる因子から成立していた。長い方の時間間隔より、バーストは平均して1.3msの間隔をもち、5.3のパルスを有するものであった。

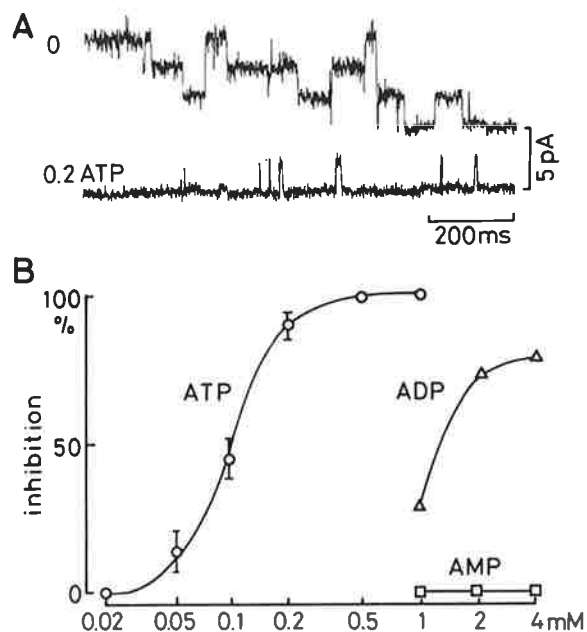
〔発表〕Nature, 303 : 250-253 (1983) に発表.

ATP により調節される K チャンネル

野間昭典

細胞内のATPをCN⁻処理を施して減少させるか、酸素不足を起されると外向き電流が増加することは、先に谷口・野間・入沢の報告(33頁本書)にもあきらかであったが、その本態は知られていなかった。モルモット又は兎の心室筋を用い、5.4 mM CNを灌流して、かつTyrode液中からブドウ糖をとり去ると、20~60分後に著明な単一チャンネル電流が出現する。この電流は電極内に5.4 mM K⁺を含むCell-attached条件下で、21psのコンダクタンスを有していて、逆転電位からこの電流がK⁺に選択性のあるものであることが明らかとなった。この電流はinside-out標本においても測定することができ、内向き整流チャンネルの単一チャンネルコンダクタンスが46psの時に、ATPにより調節されるこのチャンネルは65psであった。inside-out 標本をつかうことにより、細胞内液のATP濃度を任意にかえて、このチャンネルの活性閾値をはかることが出来た。図はATP濃度依存性のチャンネル抑制を示している。細胞内液にATPを含まない時には、図Aに示すようにATPチャンネルが活性化し、この例では3個のチャンネルを記録した。これは0.2mMのATPを細胞内液に含ませるだけで、チャンネル開放時間は短縮した。しかし、この際単一チャンネル電流の振幅に差はなかった。ATPが存在する場合には、上段に示すようなチャンネルの重複像は殆んどみられなかった。図のBはATPの濃度と、電流の減少度を平均電流から求めたものである。ATP濃度が0.5mM以上の時は、このチャンネルは全て閉鎖され、ATP濃度が減少するにつれ、チャンネルは開放度をましてくる。ADPは、ATPに比して強さは弱い、同様な効果がわずかにみられる。一方、AMPは全くその効果がなかったのである。

このATPチャンネルは細胞ないえきに全くCa²⁺を欠如する際にもみられ、Ca²⁺濃度を増加するとかえってこのチャンネルは抑制されてしまうことから、Ca mediated K⁺チャンネルとは全くことなるものであることを明らかにした。ATPチャンネルは、従来平滑筋等で知られているATPレセプターともことなったものである。これらは膜の外側からきき、極めて僅かな濃度で作



用するため purinergic receptor として知られている。

ATP チャンネルの生理的意義について、未だ問題が残っているが、虚血時における心筋活動電位の波形に重大な関係のあることは間違いないと思われた。

〔発表〕 Nature, 305 : 147-148 (1983) に発表。

兎心室筋における内向き整流電流の単一チャンネル分析

亀山正樹, 清末達人 (大分医大), 副島道正 (慈恵医大)

本研究は、清末が昭和57年度共同研究として、副島が昭和57年度大学院受託学生として生理研に所属した際に行われた。パッチクランプ法により、兎心室心筋の内向き整流性Kチャンネルの特性を調べた。電極内液は150mMKである。膜電位が -140mV から -40mV の範囲ではコンダクタンスは $46.6 \pm 6.7\text{ps}$ であり、電極内液のK濃度を減少させるとコンダクタンスの減少がみられた。K濃度の平方根に対して、コンダクタンスをプロットすると直線となり、このチャンネルが内向き整流Kチャンネルであることを示していた。チャンネルは Cs^+ 又は Ba^{++} によりブロックされた。150mMKでは、電極内電位に対し、 $+60\text{mV}$ 脱分極電位では信号は雑音に隠蔽され測定できなくなるが、50mMK液を使うと脱分極範囲まで外向き電流が記録され、このチャンネルの内向き整流特性を示していた。

チャンネル開閉の確率は、静止電位 ($-81.7 \pm 1.7\text{mV}$ $n=16$) において 0.33 ± 0.05 ($n=10$)

であり、過分極とともに減少した。静止電位における平均開閉時間は $178 \pm 25 \text{ ms}$ ($n = 6$)であった。開閉時間は2個の指数関数によって示され、各々 $11.0 \pm 2.0 \text{ ms}$, $1.92 \pm 0.52 \text{ sec}$ ($n = 6$)であった。単一チャンネルの振幅は過分極により増大するのに対し、開口確率は過分極により減少するため、平均電流としてみると、静止電位付近が最も電流値が大きく、過分極側に向けても脱分極側にむけても平均電流は減少を示した。

電極内電位を静止電位 $+20 \text{ mV}$ から静止電位 -10 mV までの矩形波で、 500 m sec の期間電位固定し、再び $+20 \text{ mV}$ に脱分極させる。プロトコルを57回にわたって平均加算すると、単一チャンネルが時間依存性に減少してゆく波形がえられる。この減少のカイネテックスは理論式に一致した(理論式についてはKameyama et al 1983, P. 1053に記載)。

心筋における内向き整流電流は、 I_{K1} としてもっともよく知られたが、単一チャンネルのレベルで分析がすすんだことは意義が深いが、内向き整流の本態、過分極側で時間とともに減少する電流の原因が細胞外におけるKイオンの蓄積によるか否か、 Ba^{++} Cs^{+} のブロックの本態など問題が将来に残されている。

〔発表〕Jpn. Jour. Physiol. 33 : 1039-1056 (1983)に発表。

単一S-A及びA-V結節細胞のイオン流について

野間昭典, 入沢 宏

ペースメーカー細胞における自発性興奮の発生機序は、本部門の長期間にわたる主題の一つであったため、本年度の国際生理学会のシンポジウムにおいてとりあげられた心筋興奮と収縮の中で単一心筋細胞の生理学的研究として入沢がシンポジウムの組織をし、8名のシンポジストに各方面から議論を以てした。本課題はその中の一つで、野間が報告したものである。本報告では自発活動の成因の一条件としては、低静止膜電位があり、これは結節細胞には内向き整流チャンネルが殆んどなく、静止電位はアセチルコリンチャンネルによっていることが多いことをのべた。他、自動性をおこなう、電位・時間依存性の電流系としては、カルシウム電流・カリウム電流・過分極側で活性化する I_h 電流があるが、この中でカルシウム電流は電流密度が心室細胞も結節細胞も同程度であるため、電流密度が特に多いか、又は少ないために自動性が起こるとは考えにくいことを述べた。さらに、カリウム電流は心室に少なく、結節細胞には著明にみられることを述べた。 I_h については心周期のような短い期間におこる振動現象には直接関与せず、ペースメーカー野の面積を確保するような長期間における生理的役割があるという考えを述べた。

〔発表〕Proc. of the International Union of Physiol. Sciences, XV : 167. 08 (1983)に発表。

パッチクランプ法によるペースメーカー細胞の アセチルコリンチャンネル

Trautwein, W. Noma, A. Sakwamm, B.

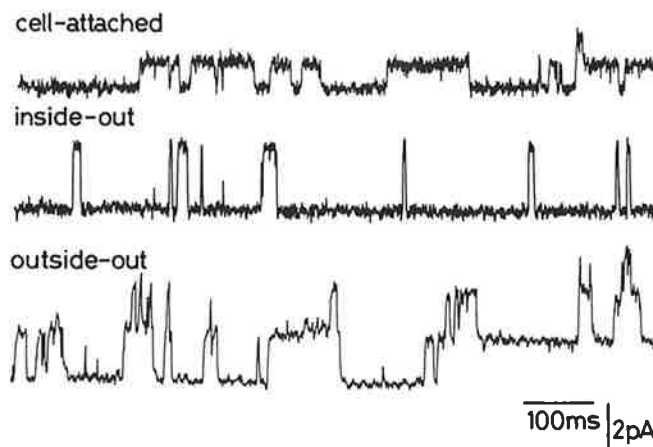
本課題も国際生理学会のシンポジウムにおいて、英国の Colquhoun 氏によって主催された神経伝達受容機構の中で、野間によって報告されたものである。この報告の要旨は本年報 頁に既に Nature に報告されたので、重複をさける。

〔発表〕 Proc. of the International Union of Physiol. Sciences, XV : 116. 03 (1983) に発表.

兎房室結節の電位依存性K電流の単一チャンネル分析

加計正文, 入沢 宏, 野間昭典

パッチクランプ法により、房室結節のKチャンネルの解析を行った。電極内液は 5.4, 20, 130 mM K^+ を含む液で、 E_K より正電位では外向きの矩形波パルスとして記録できた。このチャンネルは cell-attached, inside-out, outside-out のすべての記録モードでも記録できた (図参照)。図の上段では 2 個のチャンネルが開放しているが、電極内電位は -60mV 、中段は、電極電位は 0mV 、電極内液は Tyrode 5.4 mM K であり、灌流液に 130 K Aspartate を流したときのものである。更に下段は電極内 -15mV で、電極内液は 130 K Aspartate、灌流液は Tyrode であった。図の上段でチャンネルコンダクタンスは 15ps であり、電極内の K 濃度を 20mM に上昇させると、コンダクタンスは 29ps に増加した。



静止電位より80mV以上脱分極させると、コンダクタンスは現少し、電流は内向き整流性を示した。inside out パッチで、灌流液中のCa濃度をpCa 8よりpCa 5.3まで上昇させたとき、チャンネル開放の確率は不変であった。

〔発表〕Proc. of the International Union of Physiological Sciences, VX : 138, 08 (1983)に発表。本課題はAdenosine 5'-Triphosphate-Sensitive single Potassium Channel in the A-V node Cell of the rabbit heart M. Kakei and A. NomaとしてJ. Physiolに印刷中である。

兎心室細胞の I_{K1} チャンネルには電圧一時間依存性がある

亀山正樹, 清末達人, 副島道正, 野間昭典

心室の内向き整流Kチャンネルを同定し、そのカイネテックスをパッチ法で分析した。単一チャンネル電流はCell-attached パッチで記録され、電極内には150 mM KClを入れている。−80mVにおける接線コンダクタンスは44psであった。このチャンネルは(1) チャンネル密度が高いこと ($2-3/\mu m^2$), (2) 単一チャンネル電流の電流電圧曲線に著明な内向き整流性がみとめられること, (3) 外液K濃度20~100mMの範囲において単一チャンネルコンダクタンスは外液K濃度に依存していること, (4) Cs^+ 及び Ba^{2+} によってチャンネルは鋭敏にブロックされること, などから心筋の I_{K1} と同じものであることが証明された。

〔発表〕Proc. of the International Union of Physiol. Sciences, XV : 138, 09 (1983)に発表。論文はJpn. J. Physiolに報告。

兎洞房及び房室結節の単一ペースメーカー細胞の電流密度について

入沢 宏, 中山敏文, 倉智嘉久, 野間昭典

ペースメーカー細胞を1個に遊離すると、生体内では紡錘形をしていた細胞は円形となり、容積をかえることなく、表面積の著明な現象を来す。単一結節細胞の形を、oblate spheroidと仮定して、表面積を測ると洞房結節では $1225 \pm 420 \mu m^2$ ($n=71$), 房室結節では $1559 \pm 542 \mu m^2$ ($n=63$)という値をえた。ペースメーカー細胞は一個にしても、自発興奮をつづけ、その興奮頻度は120~200/分であり、生体内における頻度と同程度であった。一個のペースメーカー細胞において、膜電位、活動電位等をはかり、パッチ電極を用いて電圧固定を行ない、各電流系の分析を行った。カルシウム電流の最大振幅は $20 \mu A/cm^2$ ($n=14$), カリウム電流の最大値は、−40mVで

$3.5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($n=12$) となった。また定常状態における電流電圧曲線の接線コンダクタンスをペースメーカー電位の範囲で測ると約 $10 \text{K} \Omega \text{cm}^2$ となった。静止時のコンダクタンスに比して、 I_K の振幅が比較的大きかったことは、自動能にとって意義があると考えた。

〔発表〕 Proc. International Union of Physiol. Sciences XV : 138, 07 (1983) に発表。

単一心室細胞の細胞内透析による膜電流の分離

松田博子, 野間昭典, 入沢 宏

酵素的に分離した心室細胞にパッチ電極内を灌流する方法を用いて細胞内の灌流をこころみた。電極の先端は $3 \sim 4 \mu\text{m}$ で、電極を一定の液から他の液に交換すると 5 分以内に定常状態に達する。5 mM ATP, 5 mM EGTA を電極内に入れることにより、カルシウム電流は長時間にわたり維持された。細胞内に ATP, EGTA を灌流することにより、細胞外液の Na^+ をすべてとり去ることも可能となったし、K-free 液を灌流することも可能になった。この方法をとらなければ、細胞内に Ca^{2+} が蓄積し、細胞は強縮してしまうことは明らかであった。電流—電圧関係をまず細胞内 K^+ を Cs^+ で交換した際に測定し、つづいて外液の K^+ と Na^+ をとりのぞき、最後に Co^{2+} を与える等の操作の後に測定した。過分極側の電流波形から、この電圧範囲ではコンダクタンスの 95 % は K^+ により運ばれ、残りは Na^+ により運ばれることを明らかにした。カルシウム電流は Na 及び K の除去によっては大きな影響をうけなかった。

本課題は Isolation of Ca channel current and its sensitivity to monovalent cations in internally dialysed ventricular cells of guinea pig. Matsuda, H. and A. Noma として目下出版の準備中である。

〔発表〕 Proc. International Union of Physiological Sciences, XV : 138, 10 (1983) に発表。

心筋における K チャンネルに結合したアセチルコリンリセプターについて

福島道正, 野間昭典

ムスカリン性の受容器に細胞内の機転がなんらか働いていないかという疑問をとくために、兎の心房筋単一細胞にパッチクランプ法を適用した。電極内液は 150 mM KCl として試験液を電極内に流し、 -40cm 水圧程度の陰圧を加え電極内液が常に一定濃度の ACh 液で灌流されるようにした。この新しい電極内灌流法を用いると細胞表面のパッチ膜に種々の濃度の ACh がいない時でも $1 \sim 50/\text{s}$ ぐらいの低頻度の K チャンネルが開放している。チャンネルは開放時間が $1 \sim 2 \text{ms}$ で

内向き流のときのコンダクタンスは50 PS, 外向き流ではコンダクタンスの減少がある。AChを灌流液中に入れてもチャンネル活動には殆んど影響がなかった。すなわちAChは細胞内に作用してメッセンジャーを介しているというような考えは適用できないことがわかった。電極内にAChをいれるとその濃度に応じて1~2分以内にチャンネルの開放は増加した。1 μ M アトロピンによりこのチャンネルはブロックされた。すなわちムスカリン性受容器とKチャンネルとか直接に結合していることを示した。

〔発表〕 Proc. of the International Union of Physiol. Sciences, XV: 138, 18 (1983) に発表。

Giga-Seal 吸引電極の製作と単一心筋細胞への応用

小原正裕, 亀山正樹, 野間昭典, 入沢 宏

パッチクランプ法について生理研で工夫をした方法を一括して日本生理学雑誌45, 10号, 629-639に発表した。電極内灌流法をはじめ将来も使用する方法をのべた。

部門における他の活動：本年度は大学院受託学生の副島道正（慈恵医大）が帰学し，非常勤講師であった木村純子が郡山に移った。生理研助手倉智嘉久はマックスプランク研究所より一年の研修をおえて，研究所に帰ったが，一方，亀山正樹はザール大学，生理学研究所に研修のため出張した。新たに日本医大（奥村内科）より佐藤良一，岐阜大学（平川内科）より柴崎享が研究に参加している。松田博子（京都大学・河合内科）は非常勤講師として加計正文（鹿児島大学田中内科）中山敏夫（自治医大細田内科）は特別研究協力員として研究を行った。倉智は内向き整流チャンネル及びムスカリン性アセチルコリン電流について実験結果をとりまとめている。亀山の留学直前に発見したNa依存性Kチャンネルは印刷中である。佐藤は細胞内pHの心室電流系に及ぼす効果を，柴崎はATPの心室電流系への効果を研究中である。さらに松田はカルシウム電流の分離とそのイオン選択性について論文を提出中であり，その結果を深化しつつある。加計は野間とともにATPチャンネルをさらに種々のATP関連物質をもちいて検討している。中山は単一結節細胞の電気生理学的性質をあきらかにしさらに心筋における一過性外向き電流の本態について研究を行った。心筋に関して共同研究を2例について行った。一は福大・今永一成，奈良大・中沢隆と入沢とが行ったものであり，心筋細胞のギャップ結合を通して，各種の蛍光色素を流しその拡散定数を求め，ギャップ結合を通して分子量8のアミノ酸結合ローダミンの通過をみとめた。さらに東北大・飯島俊彦は亀山と共に心房細胞に対するAChの影響がカルシウム巨流を介するものか又はAChによるカリウム電流を介するものかをしらべる実験を行った。

本年度の文部省外国人研究者として昭59年1月より3月に亘って来所した，Dr. D. Gadsbyは野間と共に単一心筋細胞におけるNa-Kポンプ作用について，極めて漸新な研究を行った。

共同研究として心筋研究以外に東京大学・山口和彦，河西春郎は培養DRG細胞の i_a 電流についてパッチクランプ法により検討した他，広島大学・小林惇は赤にしの舌筋において内向き整流チャンネルを検討した。

高次液性調節部門

概要

高次液性調節部門では無麻酔・行動下の動物に多連微小電極法および細胞内記録法を応用し、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作用機序の解明を試みている。これらの研究を通して、従来麻酔下で得られてきた種々の情報を再検討すると共に、ニューロンの動的性質についての新しい知見が集まりつつある。本年度はサルの摂食行動開始時の動機付けの神経機構をさらに詳細に検討するため、サルの自発的要求（発声）で始まる摂食課題を新たに考案し、従来の他律的摂食課題と比較しながら視床下部外側野および前頭眼窩野のニューロン活動の長時間同時記録を試みた。またサル扁桃核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、中心核にグルコース感受性ニューロンを見出すとともにカテコールアミンやアセチルコリンの部位的特異性を調べた。さらに無麻酔サルの運動野ニューロンの細胞内記録を行ない、脳内自己刺激—報酬系の神経機構を検討した。なお本年度から性行動の中枢制御機構の解明にも取り組みはじめた。

無麻酔サル運動野ニューロンの視床下部刺激に対する応答性

栗生 修司, C. D. Woody, 大村 裕, 西野 仁雄,
吉松 博信, L. Lenard (生理研; UCLA; 九州大・医; Pecs 医科大)

近年、自律神経や内分泌系の中核といわれていた視床下部が運動野 (MC) をはじめとして大脳皮質と線維連絡をもっていることが解剖学的あるいは電気生理学的に明らかにされている。その機能的意義の解明は重要である。視床下部と MC の機能的関連を調べるため、脳内自己刺激 (ICSS) 行動を引き起す視床下部外側野の電気刺激に対する運動野ニューロンの応答性を無麻酔サルで細胞内記録法を用いて検討した。

手掛り光刺激に応じてレバーを押せば報酬 (食物) を獲得できることをあらかじめ学習している 2 匹のニホンザル (4—6 kg) を用いた。刺激用同心双極電極を kusama と Mabuchi の脳地図により視床下部外側野に脳定位的に挿入した。レバー押しに対する報酬として食物のかわりに視床下部刺激 (0.5—2.0 mA, 持続 0.1—0.5 ms, 50 Hz, 5 発刺激) を行い、レバー押し行動を誘発する場合を ICSS 有効刺激とした。その刺激に対する MC ニューロンの反応様式を調べた。ICSS を起こさない部位でも MC ニューロンの応答様式を調べ比較検討した。また 300 Hz の高頻度刺激も行った。細胞内記録用電極は、3 M 塩化カリウムまたは 2 M 酢酸カリウムをつめたガラス微小電極 (15—40 MΩ) を用いた。

20 mV 以上（平均48 mV, 最大78 mV）の活動電位が得られたニューロンで解析した。111個のニューロンの視床下部刺激に対する反応は図1に示すような4つの反応様式に分類できた。すなわち28個のニューロンは潜時3 ms 以下の興奮性反応を示した（図1 A）。17個のニューロンは潜時5–20 ms の興奮性反応を起こした（図1 B）。12個のニューロンは20 ms 以上の潜時で興奮性応答を示した（図1 C）。また15個のニューロンは抑制性反応を示した（図1 D）。

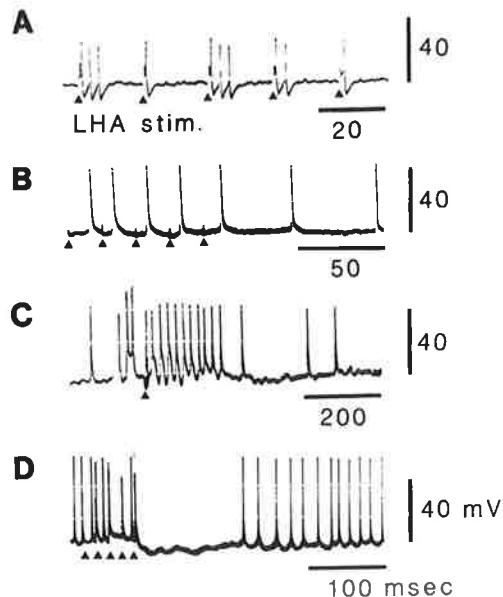


図1. 視床下部外側野刺激に対する運動野ニューロンの応答様式。
A, B: 20 ms 以下の短潜時の興奮性応答。C: 潜時および持続の長い興奮。
D: 抑制性応答。

ICSS 有効部位の刺激は約50%のMCニューロンに短潜時（20 ms 以下）の興奮性応答をおこした。非有効部位の刺激ではMCニューロンの約10% が短潜時に興奮性に応答した。この応答率の差は有意であった。一方、潜時の長い反応はICSSの有効性の有無にかかわらず10–15%のMCニューロンでみられ、有意の差はなかった。

本実験において、ICSSに有効な（すなわち報酬効果をもつ）視床下部側野の電気刺激が無麻酔のサルの運動野ニューロンに対して短潜時の興奮性応答を起すことがわかった。最近、Woodyらは古典的条件付け学習行動の成立とそれに対応したネコ運動野ニューロンの電氣的活動の変化が視床下部外側野の電気刺激により促進され、さらにそのような視床下部の刺激はMCニューロンに20 ms 以下の短潜時の興奮性応答を引き起すことを報告している。これらの事実は、短潜時の視床下部性興奮入力がおペラント条件付けおよび古典的条件付け過程の促進系に関与していることを示唆している。

発声にはじまる摂食課題とサル前頭眼窩野 及び視床下部外側野ニューロン活動

山本智矢, 大村 裕, 西野仁雄, 粟生修司, 中野保彦

前頭前窩野 (OBF) の破壊されたサルでは攻撃行動や発声行動などの情動性行動が変化することが知られている。また視床下部外側野 (LHA) は摂食行動の調節に重要な働きを持っている。OBF と LHA は発声行動の最高中枢である帯状回と線維連絡を持ち、また互いに直接線維を送っている。また両者とも電気刺激で発声行動を誘発する部位であることが知られている。

われわれは OBF と LHA におけるサルの摂食行動開始のための動機付けのメカニズムを解明する目的で、サルの要求によって始まる摂食課題を考案し、課題遂行時のニューロン活動を記録した。この課題ではサルは発声によって課題開始を要求する。コンピューターがサルの発声を感知すると約 30 msec の潜時で手掛り光刺激を点灯させる。この時、サルがレバーを 30 回押すと手掛り音刺激の後に報酬として餌が与えられる。また従来からの摂食課題、即ち実験者によって手掛り光刺激が与えられ、サルがレバーを押し、報酬を得る課題時のニューロン活動も対照として記録した。

実験にはメスニホンザルを用い、ニューロン活動を、発声及び体動による artifact を避けるために 35 μ テフロン被覆 Pt-Ir 電極から差動的に記録した。課題の遂行はコンピューターによって制御した。

安定に記録された 38 例の OBF ニューロンのうち 7 例が発声開始に数秒間先行する活動変化を示した。これらのなかにはその活動変化がレバー押し以降の活動変化に連続したものと独立したものがあった。7 例のニューロンのすべてがレバー押し期以後に何らかの活動変化を示した。このうち 3 例は摂食行動を催促するサルの自発的なレバー押しの開始に先行する活動変化を示した。また 16 例の LHA ニューロンのうち 4 例が同様に発声に数秒間先行する活動変化を示した。

従来より readiness potential という運動に先行する脳波の変化が知られている。今回 OBF と LHA で観察された発声に先行するニューロン活動変化は、readiness potential を単一ニューロンレベルでとらえたものと考えられる。これは OBF と LHA が摂食行動の開始もしくは動機付けに関与している可能性を示唆している。

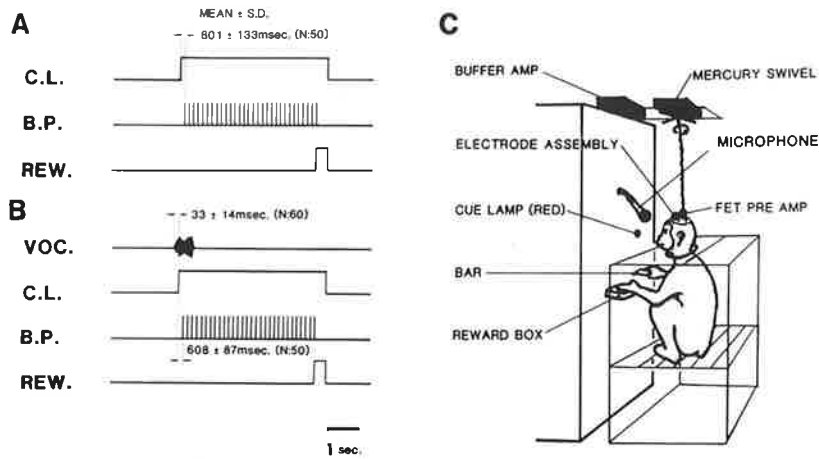


図1. A) 実験者によって与えられる手掛り光刺激によって始まる摂食課題。B) サルの発声行動によって始まる摂食課題。C. L.; 手掛り光刺激, B. P.; レバー押し, REW.; 報酬, VOC.; 発声行動。C) 実験のセットアップ。前頭眼窩野及び視床下部外側野で同時に記録されたニューロン活動はFETプリアンプ、水銀槽、バッファアンプを経て処理される。サルの前のハネルには手掛り光刺激、レバー、餌箱およびマイクフォンが取り付けられている。

OBF

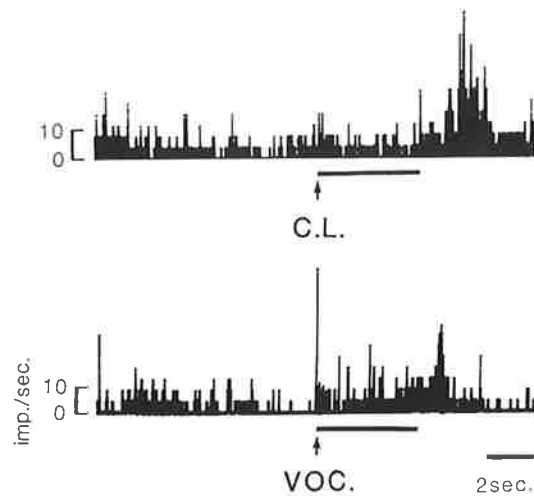


図2. ニューロン活動のラスタ表示及びヒストグラム。上) 実験者によって手掛り光刺激 (C. L.) が与えられる摂食課題。下線部はレバー押し期間を示す。報酬期に活動の増加が見られる以外は活動変化を示さない。下) 同一ニューロンのサルの発声行動に始まる摂食課題時の活動。発声行動に約2秒先行する活動減少と発声行動の開始期に一致した活動上昇が見られる。

生理機能研究施設

組織培養標本室

神経グリア雑種細胞におけるセロトニンの局在部位

古家園子

神経グリア雑種細胞である NG108-15 細胞はアセチルコリンを合成し、放出し、培養筋細胞とシナプスを形成することが知られており、コリン作動性ニューロンのモデルとして使われてきた。最近、この細胞にセロトニンが含まれ、合成酵素であるトリプトファンヒドロキシラーゼ、分解酵素であるモノアミンオキシダーゼも存在することが報告された (Suzuki, et al.)。これらセロトニンの細胞内の合成、輸送の過程や取り込み部位を ^3H トリプトファンや ^3H セロトニンをトレーサーとして電顕オートラジオグラフィーで観察した。

1) ^3H セロトニンの取り込み

^3H セロトニンで NG108-15 細胞を 10 分 - 1 時間ラベルすると、銀粒子は常に、高密度で突起に局在した (Fig. 1 a)。細胞体の細胞質や核にも少量の銀粒子が認められたが、チェイスにより減少した。一方、突起の銀粒子密度はチェイスしても一定であった。突起における総銀粒子数の 25~35% が直径 60~170 nm の含粒小胞 (dense core vesicles) に、各 10% がミトコンドリア、滑面小胞体に存在し、銀粒子の含粒小胞への強い集中が統計処理で明らかになった (Fig. 2)。以上の結果からセロトニンの取り込みは突起で優先的に行われ、取り組まれたセロトニンは含粒小胞に貯蔵されることが示された。

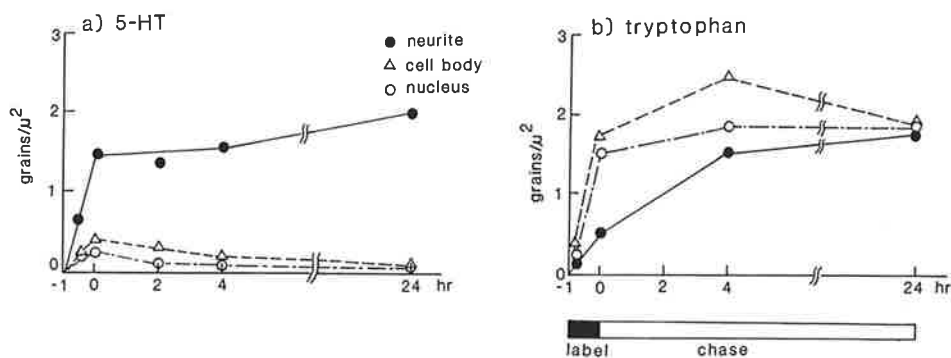


図 1. セロトニンは選択的に突起に取り込まれる。前駆物質のトリプトファンはまず細胞体に取り込まれ、後、突起に輸送される。

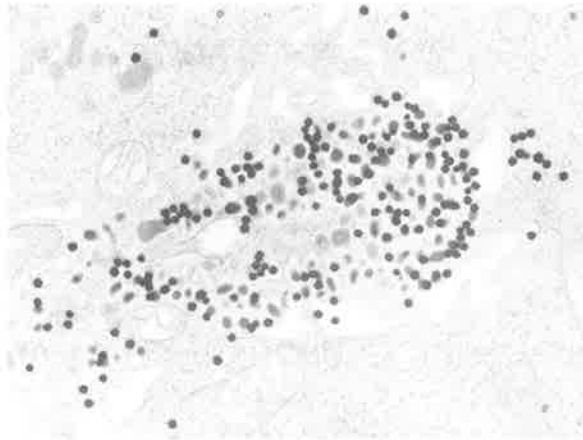


図2. 突起の含粒小胞に銀粒子が集中している。

2) ^3H トリプトファンの取り込み

セロトニンの前駆物質であるトリプトファンはまず細胞体に取り込まれ、その後、チェイスにより突起へ輸送された (Fig. 1 b)。銀粒子は小胞体 (粗面+滑面) に集り、含粒小胞への集中は認められなかった。この結果は取り込まれたトリプトファンの大部分が蛋白合成に使われた為と考えられる。目下、トリプトファンの次の代謝産物である5ヒドロキシトリプトファンを使ってセロトニンが突起へ輸送される過程を調べている。

以上より、NG108-15細胞はセロトニンを合成、分解、取り込み、貯蔵、放出し、コリン作動性ニューロンの性質と共にセロトニン作動性ニューロンの性質も併せ持つことが明らかになった。

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

医学生物学用超高圧電子顕微鏡（H-1250M型）を用いての生物試料に関する共同利用実験計画が、2年目を迎え、年度初めより本格的に超高圧電顕が使用された。この計画は、①厚い生物試料の立体観察 ②生物試料の高分解能観察 ③生物試料の自然状態における観察を、主な課題としている。これらの成果に関しては、超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告に詳述されているのを参照されたい。

昭和58年度は、合計22課題が採択されたが、試料の準備等の都合もあり、実際に使用されたのは、共同研究からの1件を含めて、18件である。利用日数は、共同利用実験等184日、修理、調整47日であり、電顕フィルム使用枚数12,044枚、フィラメント点灯時間729時間であった。

超高圧電顕室では、上記の共同利用実験計画を円滑に進める方法の確立を目指すと共に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て次の研究を進展させて来た。

1. ステレオ観察定量化に関して

2枚の透過電子顕微鏡ステレオ写真から、立体的情報を抽出する方法においては、試料の傾斜角度の指示精度が、厚さ方向の対象物の位置精度に重要な影響を与える。当研究所の超高圧電顕は、真空外において試料に対するレーザー光の反射を利用して傾斜角度の精度を校正している。しかし、実際の使用状態における傾斜角度を知ることが、最も重要であるので、我々は、無機単結晶から得られる電子回折像上の菊池模様を各傾斜指示角度毎に撮影し、この模様を解析することによって実際の傾斜角度を測定した。この方法によれば、使用状態において $\pm 0.1^\circ$ 以内に傾斜角度を測定することが可能であり、その結果サイドエントリー傾斜台の歯車の回転の向きにおける差（ $\leq 0.4^\circ$ ）を考慮すれば、 $\pm 0.1^\circ$ 以内で、指示値と、実際の傾斜角度が一致していることを明らかにした。

又、日本レギュレーター社のLuzex 5000を主体とした画像解析システムを用い、ステレオ写真から三次元情報を抽出する方法を、一定の近似のもとに開発しつつあるので前述の指示傾斜角度の精度の向上との結合により、今後、ステレオ写真から、三次元的な定量的情報を得ていけるであろう。

Ⅱ．生物試料の高分解能観察に関して

生物試料の高分解能観察のためには、照射損傷を低減することが不可避である。これまで、超高圧電子顕微鏡においては、漏洩X線対策等の困難さの理由により、シャッター方式が、採用されていなかったが、当生理学研究所において始めてシャッター方式を採用することに成功し、フィルム面上への露光量の制御が可能となった。そこでさらにこの方式のシャッターを試料上部に配置することにより未照射領域を撮影時のみ照射する方法を開発した。この方法を用いて、点分解能 2 Åを実現出来ることを確認したので、今後、生物試料に対して照射損傷を防ぎつつ高分解能観察を行える見通しを得た。

Ⅲ．生物試料の自然状態における観察に関して

昭和58年度にクライオミクロトームを導入したので、今後さらに、凍結試料作製法の向上を図ると共に、この試料の電顕観察を目標として、隔膜方式による雰囲気試料室実現へ向けて、共同利用実験計画を進めている。

動物実験施設

尾崎 毅

概要

動物実験施設は、陸生動物室、水生動物室から成り、生理学、基礎生物学両研究所の共同利用施設として昭和55年より発足、創設整備期（昭和55年度～昭和57年度）を経て、両研究所の研究体制の整備の進展に合わせて利用も順調に拡大している。

昭和58年度は陸生動物室のSPF動物室を除くほぼ全室が利用され、特にラットの飼育増に対応してラット飼育室を2室から3室に増室した。水生動物室においては、利用増に合わせて水槽4基を新たに導入した。

人獣共通伝染病による動物からの感染事故は現在まで皆無である。

施設利用

〔陸生動物室〕

施設の利用は、陸生動物室における実験室の利用が8部門のべ138件、飼育室の利用計17部門のべ17件で搬入動物は11種約3800匹（昆虫を除く）であった。

飼育室の利用状況は時期によって変動があるが、イヌ室、ラット室、マウス室で高くなっている。実験室の利用は、共同研究者を中心とする利用が増えている。

〔水生動物室〕

水生動物室は、水槽及び飼育室の利用21件、搬入した動物32種約10,000匹（計数できないものを除く）であった。今年度より全水槽に集中配管方式による曝気システムをとり入れたため、エアープンプの故障によるトラブルはなくなったが、揚水ポンプ関係で故障が相次いだため警報回路の取付けや、ポンプの保護対策を行ない改善をはかった。貯水槽・利用実績については、別表を参照して下さい。

〔検疫と治療〕

検疫はイヌ86頭、ネコ7頭、ニホンザル3頭について実施し、実験不適として処分したもの及び検疫中に死亡したものの9件であった。処分及び死亡したものの9件のうち8件は、飼犬指導所由来のイヌで、検疫中に発病治癒したものを加えるとパルボウイルス感染の疑いのあったものの割合は15%に上り、入手困難になりつつある状況と合わせてイヌの供給には大きな不安材料となっている。

長期飼育中の動物における疾病の発生は、イヌ7件、ネコ12件、ヤギ1件、ラット2件計（22件）で、のべ治療回数は90回であった。治療の内訳は内科的処置を行なったもの13件、外科的処置を行なったもの5件、併用したもの2件で、予後不良又は淘汰したものは10件、19匹であった。感染症の流行は前記イヌパルボウイルス症のほかネコの集団カゼ（ネコインフルエンザ）がみら

れたが治療により全例治癒した。

水生動物室では、キンギョ、コイに寄生虫症と真菌症様疾患が認められた他アメリカナマズに体表に潰瘍を形成する感染症が散発した。水生動物の感染症は病原菌の特定が困難なため現在、効果的な薬浴、治療法の確立をめざして試行中である。

別表 1. 陸生動物月別動物種別搬入頭数

(昭和58年度)

月 動物種	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	計
ラ ッ ト	7	19	71	51	85	109	101	115	79	91	129	68	925
マ ウ ス	1220	6	30	30	52	97	85	133	71	57	89	151	2021
モルモット	15	36	68	38	63	46	35	50	48	45	40	23	507
ウ サ ギ	5	10	26	13	5	22	2	7	6	12	10	12	130
イ ヌ	13		2	12		6	12	10	8	10	5	8	86
ネ コ						8	5	4	2		3		22
サ ル									3				3
ヤ ギ									2				2
カ エ ル			21	5		9	20	17	16	2	7		97
カ メ							20		6				26
ハ ト					9								9

別表 2. 部門別動物種別搬入動物数

(昭和58年度)

動物種 部門別	ラ ット	マ ウス	モ ル モ ット	ウ サ ギ	イ ヌ	ネ コ	サ ル	ヤ ギ	カ エ ル	カ メ	ハ ト
超微小形態	53	5	15						29		
細胞内代謝	442	30		23	29			2			
生体膜	6	22							10		
液性情報	70	6	15								
生体調節			267	104		3					
高次神経機構	17		144			19					
情報記憶	97	1200							4		
高次液性	14						3				
神経情報										26	9
機能協関									54		
神経化学	10	30									
細胞情報	5										
細胞増殖	18	24									
形態形成	185	208									
情報制御	4	196		3							
生殖	4	266									
技術課その他		34									
動物室			66		57						
計	925	2021	507	130	86	22	3	2	97	26	9

別表 3. 実験室月別利用件数

(昭和58年度)

室 名 \ 月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	計
手 術 室	7	3	6	8	7	9	12	9	10	15	13	9	108
生理実験室						2	2	(1)	3		2	2	12
生化学実験室								(1)					(1)
測 定 室								(1)				(1)	(2)
手術実験室	(1)												(1)
解 剖 室											1	2	3
レントゲン室			1	2			3			2			8
そ の 他										2			2
計	8	3	7	10	7	11	17	12	13	19	16	14	137

() は長期利用

別表 4. 水生動物月別動物種別搬入数

(昭和58年度)

月 動物種	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	計
キンギョ	300			310									610
コイ	20			60			20						100
ウグイ				85									85
アメリカナマズ		60	60	30	30					50		50	280
マナマズ							40			40			80
アマゴ		2	10	7	7	16							42
ニジマス									9				9
デソキウナギ										1			1
ゴンズイ		347											347
シビレエイ		2											2
ドチザメ									10			8	18
ホシザメ												1	1
アナゴ									20				20
アフリカツマグエル	80		4		4			4		20		20	132
アカハライモリ	1000												1000
アメリカザリガニ	60						60						120
イセエビ								11		5		10	26
クルマエビ	11						10						21
ヤリイカ	50						51	56	29	90		20	296
アカニシ				16									16
オオアサリ								6					6
ホッキガイ												20	20
ヒトデ		2270		294				150				2900	5614
ウニ	58			445						700	600		1803
ナマコ							10			10			20
クサガメ	24		23						12	10		12	81

先天性 Aganglionosis rat 無神経節腸管の病態に関する研究

尾崎 毅

概要

小児外科領域でしばしば認められる「ヒルシュスプルング病」は、大腸の壁内神経叢の発達障害に起因する「巨大結腸症」を主徴とする疾患として知られる。近年、我が国で筏井ら（動繁研）によって、先天性 Aganglionosis rat と呼ばれるこの疾患に類似した症状を表わすラットが発見され注目されている。このラットは、壁内神経叢の欠除部が大腸から回腸にまで及び、「巨大回腸症」とも呼ぶべき症状を呈するなど、ヒトのヒルシュスプルング病に極めて類似している。

本研究は、このラットの無神経節腸管を用いて、ヒルシュスプルング病発症のメカニズムと、壁内神経叢の役割りの解明をめざすものである。

〔研究経過〕 先天性 Aganglionosis rat は、発見者筏井洋氏より、繁殖用親 2 組の分与を受け、クローズドコロニーとして繁殖を行なった。このラットの Aganglionosis は、単一劣性遺伝子によって劣性ホモ個体にのみ出現し、また生存日数は平均 4 週令と短い。このため、繁殖に供する親には、同遺伝子をヘテロに持つ個体を維持することが必要であり、ヘテロ個体の検定作業を含めてかなり繁雑である。これまでに、ヘテロメス 63 匹、ヘテロオス 25 匹を得、現在 F₄～F₅ 世代が維持されている。繁殖成績は、全交配回数 307 に対し妊娠・出産したもの 229 で、受胎率は 74% と Wister 系ラットなどに比べてかなり低く、平均リッターサイズでも 5.7 と極めて小さい。このため品種の改良を含めさらに繁殖効率の向上の努力が必要である。

Aganglionosis ラットを用いた無神経節部腸等の組織化学的、電子顕微鏡学的検索の結果、肛門部に近い大腸壁内に正常のものと明らかに異なる神経線維が見出されるなど、興味ある知見が得られている。無神経節部腸管の剔出標本における薬理学的な方法による検討は始まったばかりであるが、拘縮状態にある狭小部腸管の各種生理活性物質に対する反応性について研究を進めている。

技 術 課

大平仁夫

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所長直属の技術専門組織である。

技術課の技官は、サブライショップなど研究所の共通的な業務に従事する他は、日常それぞれの職場に出向して専門業務に従事している。また、技術課としての自主的な活動も実施しており、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定例で毎週月曜日の朝1時間、全員が技術課室に集まって技術研修を行っている。これによって、技官相互の意志の疎通が計られる他、相互の技術情報の交換などもでき、各自の技術力の向上や業務の能率化が計られている。

生理学技術研究会は、本年度は第6回を昭和59年2月17日～18日の両日に開催した。これは、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、医学系研究所などにおいて生体科学技術に従事している技官との技術交流を計るために、毎年2月に当研究所の技術課が主催して開催しているものである。本年度は21大学より35名の技官の参加があり、2日目には最近医学部に設置されている実験実習機器センターの現状と展望についての総合討論を実施した関係から、北は旭川医科大学、秋田大学医学部など、南は島根医科大学、愛媛大学医学部、熊本大学医学部など多くの大学の技官の参加があり、終日技術研究発表や総合討論が熱心に行われた。なお、この第6回生理学技術研究会についての詳しい内容は、技術課が編集している「生理学技術研究会報告」第6号にまとめられ、昭和59年7月に刊行を予定している。



第6回生理学技術研究会（昭和59.2.17～18）

技術課プロジェクトは、技官の技術力の向上を目指して自主的にとり組む研修活動で、技術課の技官は、課が企画する研修課題のいずれかの一つに参画することにしており、昭和58年度は①電極作製用プレー開発班、②走査電子顕微鏡技術修得班、③HPLC技術修得班、④画像解析技術修得班の4プロジェクトを実施した。なお、これらのプロジェクト活動を通して修得した成果

は、「生理学技術研究会報告」か「技術課技術報告」に発表の予定である。技術報告の第1号は伊藤昭光技官による「生理研サプライショップにおける電子計算機処理システム」（B5，13頁）を昭和58年度に発刊した。

昭和58年2月に開催した第5回生理学技術研究会の内容とその年度における技術課の活動状況については、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5号：1～49（B5，8月刊）。

研究施設の概要

1. 機器研究試作室

加藤勝己

機器研究試作室は、昭和57年度をもって、当初計画の創設設備を終え、技官は2名となった。また、創設当初から使用していた「工作室」という名称は、当室の作業実体をより明確に表現するために、上記の名称を今後使用していくことになった。本年度は、研究者からの工作依頼件数が昨年度と同程度であったため、新任技官の技術修得に主眼をおいて運営することができ、初心者のための工作実習等に相当時間を費やすことができたのは幸いであった。しかし、依頼内容は昨年までのとは異なり、サル性行動制御実験装置（高次液性調節研究部門）や、マニピュレーター（神経情報研究部門）のような実験装置の依頼がふえてきている。特に、サル性行動制御実験装置は、試作的なもので、必要条件以外はほとんど当室にまかされたため、研究者との連絡を密にして、試行錯誤を繰り返しながら製作した大型の装置である。しかし、試作品であるため、製作途中で設計変更などで、未使用になった部品もあり、貴重な経験にもなった。

また、一般工作室利用者に対する技術指導も、適宜行なうことができた。反面、大がかりな装置作成に取り組んだため、サービス部門で、利用者に迷惑をかけたようにも思われる。技官が2名になり、実習期間も終わったので、当室の役割である3本柱（工作技術指導・サービス・開発および試作）に均等に力を入れることにより、機器研究試作室の機能をフルに発揮して、研究の進展に寄与したいと願っている。

なお、機器研究試作室の昭和58年度の利用状況は、以下のとおりである。

機器研究試作室使用機器表（件数）

（昭和58年度）

	フライス盤	ボール盤	帯鋸盤	旋 盤	切断盤	横切盤	その他	合 計
4月	17	25	34	20	15	10	22	143
5月	21	16	15	20	4	9	19	104
6月	26	17	18	7	4	9	17	98
7月	46	39	30	20	18	5	29	187
8月	9	12	6	8	10	0	15	60
9月	12	8	13	8	7	5	7	60
10月	13	17	11	0	11	2	16	70
11月	16	18	11	6	4	3	18	76
12月	13	13	10	2	5	4	10	57
1月	12	19	10	6	6	2	15	70
2月	17	13	8	2	5	5	16	66
3月	6	6	8	15	1	6	17	59
合計	208	203	174	114	90	60	201	1050

機器研究試作室利用人数表（件数）

（昭和58年度）

月	生理研（人）	基生研（人）	計	延べ時間
4	64	18	82	160
5	58	10	68	125
6	48	13	62	175
7	104	13	117	196
8	25	7	36	94
9	26	11	38	119
10	21	26	47	103
11	32	15	47	101
12	22	6	28	50
1	22	21	43	75
2	31	6	39	76
3	29	10	39	59
合 計	482	156	646	1333

（ただし、6・8・9・2月には、分子研利用者が含まれる。）

部門別利用状況

高次神経性調節	107名	機能協関	73名	動物実験施設	66名
超微小形態生理	61名	高次神経機構	46名	神経情報	44名
液性情報	30名	高次液性調節	27名	生体膜	14名
情報記憶	4名	電子顕微鏡室	4名	細胞内代謝	2名
超高压電子顕微鏡室	2名	生体機能検査室	1名	その他	1名
大型スペクトログラフ室	44名	細胞内エネルギー変換機構	32名	分析室	19名
生 殖	13名	情報制御	10名	感覚情報	7名
形態形成	7名	細胞融合	6名	計時機構	5名
細胞機構	4名	R I 実験施設	3名	細胞増殖	2名
行動制御	2名	技術課	2名		
分子研その他利用者	8名				

2. 電子顕微鏡センター

大庭明生

電子顕微鏡センターは、昭和57年11月の共通施設棟Ⅰの完成とともに、地階に移転し本年度（昭和58年）、4月より新施設での運営を始めた。新施設は電子顕微鏡室、試料作製室、暗室、写真作画室に大別され試料作製から写真作画までの一連の過程を行なえるよう考えられている。電子顕微鏡も1°透過型、2°走査型、3°分析型の三型を設置し、研究目的に応じて使用出来るようになっている。センターの運営の為に使用内規を作成した。

内規は、最少限度の規則にとどめ、利用者に「開放された施設」となるよう心掛けている。

下記の表は、本年度センターを利用してなされた研究内容である。件数は所内20件、所外（国内）10件、所外（国外）4件であった。

研 究 所 内

研 究 所	部 門	研 究 内 容
生 理 学 研 究 所	生 体 膜	イカ巨大神経の微細構造の観察
	機 能 協 関	カエル紋輪部へのHRP結合の観察 イカ巨大神経の微細構造の観察 生体膜表面電荷の元素分析
	液 性 情 報	先天性 AGANGLIONOSISラット腸管のアウエルバッ ハ神経叢に関する組織学的研究
	組 織 培 養 標 本 室	培養神経細胞への ³ H-セロトニンの取り込みの オートラジオグラフィー観察
	高 次 神 経 機 構	シナプスの可塑性の研究, 中枢神経系形態観察
	高 次 神 経 性 調 節	電極先端の二次電子像観察
	技 術 課	マウス臓器の二次電子像観察
基 礎 生 物 学 研 究 所	形 態 形 成	動物細胞の超微細形態観察
	細 胞 機 構	母性遺伝の機構の研究
	細胞内エネルギー変換	ラン藻細胞微細構造の観察
	生 殖	魚類生殖巣の微細構造の観察
	細 胞 増 殖	ウニ精子鞭毛ダイニンへの抗体の結合の観察 ACTIN FILAMENTの観察
	細 胞 分 化	DNA-PROTEIN COMPLEX の観察
	感 覚 情 報	脊椎動物網膜シナプス構造の研究 アメリカナマズ網膜のシナプス機構及び神経回路 網の解析
分子科学研究所	機 器 セ ン タ ー	金属超微粒子の粒径測定

研究所外（国内）

大学・研究所	研 究 内 容
名古屋大学	カエル筋紡錘感覚神経末端部の超微細構造の研究 核分裂の機構の研究 色素蛋白の会合状態の検討
遺伝学研究所	ショウジョウバエの外部形態の観察
帝京大学	ティラピア・アマゴ・ペラの卵巢及び精巢の観察
東北大学	ショウジョウバエ視細胞の微細構造の観察
岡山大学	コオロギ尾葉感覚毛の外部形態の観察
東京女子医科大学	脊椎動物網膜の視細胞とC型水平細胞のシナプス結合の研究
筑波大学	トウモロコシ根の特定部位の元素分析
九州大学	心筋細胞レプリカ膜のステレオ観察

研究所外（国外）

大 学 ・ 研 究 所	研 究 者	研 究 内 容
アメリカ，ニューハンプシャー大学	C. W. Walker	ヒトデ生殖巣の微細構造の観察
アメリカ，インディアナ大学	F. W. Goetzi	魚類生殖巣の微細構造の観察
カナダ，マック・マスター大学	E. E. Daniel	カハールの介在細胞の研究
イラク，バクダット大学	S. F. AL. Samarrai	シナプス小胞の研究

3. 電子計算機室

伊藤 昭光

電子計算機室では、昭和58年度の計画としてミニコンピューター（VAX-11/750）を導入することになった。今回の計画は今まで導入した各ミニコンピューターの仕様をさらに進めたものとした。導入機器の仕様としては、1)アナログデータの入出力が、on-lineで10ch、最高100 μ secの入力が最低限保証される。2)アナログデータの集録と同時にパラメータ等の入出力ができる。3)入出力の操作が高級言語（FORTRAN, BASIC, PASCAL など）で可能である。4)各種実験装置の制御が可能である。5)現在実験データは一旦アナログデータレコーダ等に記録し、それを電子計算機の室へ運んで入力・処理を行っているが、各実験室から real time, on-line でデータの集録、処理、判定が行える。6)実験データ・処理結果をグラフィックディスプレイへ図示でき、その図形をハードコピー化できる。7)複数の利用者が使用しても、他の利用者を意識せずに使用で

き、雑音解析などには現在より高い能力を持つなどとした。これらの諸条件を満足する電子計算機として VAX-11/750 を選定した。実際の機器構成について以下に上げることとする。

1. 基本システム

a) 中央処理装置 (VAX-11/750), b) 主記憶メモリ (3 MB), c) 固定ディスク装置 (456 MB), d) 磁気テープ装置 (800/1600 BPI), e) 8 回線制御装置, f) コンソール端末, g) オペレーティングシステム (VAX/VMS)

2. 浮動小数点加速器

精度 32 bit/64 bit/128 bit

実行速度改善率 (平均) 単精度: 2.25 倍, 倍精度: 3.43 倍

3. 磁気ディスク装置 (システム用として使用)

記憶容量: 121 MB, 情報転送速度: 1.2 MB/S (最大)

4. データ収集制御システム (LPA-11) × 2 システム

A/D, D/A 変換及びデジタル入出力

5. 8 回線制御装置

EIA RS 232-C 又は CCITT V. 24, 50~9600 BPS

6. ラインプリンター

150~250 行/分, ASCII 96 文字種

7. ビデオ・ターミナル × 4 台

8. グラフィック・ターミナル

カラーグラフィックディスプレイ (AGS 1000) × 2 台

ハードコピー装置 (AGS 1000 用) × 2 台

9. レタープリンター

240 CPS, ASCII キーボード付

10. ソフトウェア

主言語 (FORTRAN), グラフィック・パッケージ (PLOT-10, PLOT-79, GCSP-II E) ラボラトリ サブルーチン・パッケージ, 科学技術計算用プログラムライブラリ, 磁気テープフォーマット変換ソフトウェア

これらの構成で新システムは昭和59年度2月より運転を開始し、現在では実際の実験に利用し始めている。今後の利用状況を見て利用法を検討して行きたいと考えている。以下に計算機室 (M-150) 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58年度

	4月	5月	6月	7月	8月	9月
バッチジョブ	170	203	134	226	294	331
T S S	37	47	35	79	65	82
利用時間	76:21	70:27	58:25	336:38	78:42	83:42
プリントOUT	1291	1054	770	2617	2299	2308
	10月	11月	12月	1月	2月	3月
バッチジョブ	410	217	138	105	54	113
T S S	206	94	101	23	17	67
利用時間	191:15	227:56	75:36	76:32	24:45	125:52
プリントOUT	3177	1418	1818	594	260	1287

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

【 研 究 活 動 】

研 究 活 動 (発表論文)

〔目 次〕

神経化学部門	115
超微小形態生理部門	116
細胞内代謝部門	119
生体膜部門	123
機能協関部門	126
能動輸送部門	127
神経情報部門	128
液性情報部門	130
高次神経機構部門	130
情報記憶部門	134
高次神経性調節部門	134
高次液性調節部門	137
組織培養標本室	139
超高圧電子顕微鏡室	139
動物実験施設	140

発 表 論 文

《神 經 化 学 部 門》

Ebashi S. and Kohama K.,(1982) Contractile Proteins and Regulation of Their Interactions in Cardiac and Smooth Muscle. In Trends in Autonomic Pharmacology, 2 (ed. S. Kalsner), Urban & Schwarzenberg, Baltimore-Munich: 511-520.

Kohama K., Shimizu T., Sugita H., Toyokura Y., and Ebashi S.,(1983) Turnover of Actin and Actin-related Proteins in Dystrophic and Denervated Muscles. In Muscular Dystrophy: Biomedical Aspects (eds. Ebashi, S. and Ozawa, E.) Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin: 211-220.

Ebashi S.,(1983) Regulation of Muscle Contraction. In Cell and Muscle Motility, 3 (eds. R. M. Dowben et al), Plenum Publishing.

Ebashi, S.,(1983) Regulation of contractility. In Muscle and Nonmuscle Motility (ed. A. Stracher). Academic Press, New York: 217-232.

Ebashi S. and Ohtsuki I.,(1983) Troponin, Roles of Its Subunits. In Calcium-Binding Proteins (eds. B. de Bernard et al.), Elsevier Science Publishers B. V.: 251-262.

Yoshikawa K., Usui H., Imazu M. and Takeda T., Ebashi S.,(1983) The effect of heart and skeletal muscle troponin complexes and calmodulin on the Ca^{2+} -dependent reactions of phosphorylase kinase isoenzymes. Eur. J. Biochem, 136: 413-419.

Maruyama Kei, Mikawa T. and Ebashi S.,(1984) New Assay Method of Calcium Binding Proteins. Detection of Calcium Binding Proteins by ^{45}Ca Autoradiography on the Nitrocellulose Membrane after SDS Gel Electrophoresis. J. Biochem, 95: 511-519.

Ebashi S.,(1984) Actin-linked mechanism: leiotonin system. In Smooth Muscle Contraction (ed. N. L. Stephens) Marcel Dekker, Inc., New York: 317-328.

Takano-Ohmuro H., Obinata T., Mikawa T.,(1983) Changes in myosin isozymes during

development of chicken gizzard muscle. J. Biochem. **93**: 903-908.

Kitaura T., Ishiko T., and Mikawa T.,(1983) Classification of single muscle fibers in mouse soleus and extensor digitorum longus muscles with myosin light chains. J. Physical Fitness Japan, **32**: 32-36.

Takano-Ohmuro H., Hirose G., and Mikawa T.,(1983) Separation and identification of drosophila myosin light chains. J. Biochem, **94**: 967-974.

Maruyama Kei, Mikawa T., and Ebashi S.,(1984) Detection of calcium binding proteins by ⁴⁵Ca autoradiography on nitrocellulose membrane after sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis. J. Biochem, **95**: 511-519.

江橋節郎 (1983) 筋収縮の分子機構. 蛋白質・核酸・酵素, **28**: 334~339.

江橋節郎 (1983) 序説: カルシウムと医学. 臨床科学, **19**: 1018~1022.

江橋節郎 (1983) II 細胞の代謝応答とカルシウム. 臨床科学, **19**: 1098~1102.

《超微小形態生理部門》

Naruse, S., Takada, S., Koizuka, I. and Watari, H.,(1983) In vivo ³¹P-NMR studies on experimental cerebral infarction. Jap. J. Physiol., **33**: 19-28.

Murakami, M., Imai, Y., Seo, Y., Morimoto, T., Shiga, K. and Watari, H.,(1983) Phosphorus nuclear magnetic resonance of perfused salivary gland. Biochim. Biophys. Acta, **762**: 19-24.

Miura, R., Nishina, Y., Ohta, M., Tojo, H., Shiga, K., Watari, H., Yamano, T. and Miyake, Y.,(1983) Resonance Raman study on the flavin in the purple intermediates of D-amino acid oxidase. Biochem. Biophys. Res. Commun., **111** : 588-594.

豊岡照彦, 永山国昭, 亘 弘 (1983) 焦点磁場式 ¹H-及び ³¹P-核磁気共鳴法による心筋症の非侵襲的診断. 医学のあゆみ, **127**(2): 109-113.

志賀暁子, 松本修一, 上田 宏, 志賀 潔, 二科安三, 亘 弘 (1983) 蛍光分光法によるフラビン蛋白とクロールプロマジンの相互作用に関する研究. 藤田学園医学会誌, 7(2): 31-34.

志賀暁子, 松本修一, 上田 宏, 志賀 潔, 二科安三, 亘 弘 (1983) ルミフラビンとリボフラビン結合蛋白の複合体形成に対するクロールプロマジンの影響について. 藤田学園医学会誌, 7(2): 27-29.

Shiga, A., Matsumoto, S., Ueda, H., Shiga, K., Nishina, Y., Watari, H. and Horiike, K., (1983) A study of the interaction between chlorpromazine and riboflavin binding protein. J. Dermatology, 10: 461-467.

Shiga, K., Nishina, Y. and Watari, H., (1983) A study of chlorpromazine as a flavin antagonist. J. Physiol. Soc. Japan, 45: 378.

Nishina, Y., Shiga, K., Watari, H., Miura, R., Ohta, M., Miyake, Y., Tojo, H. and Yamano, T., (1983) A resonance Raman study on the flavoenzyme D-amino acid oxidase catalytic intermediates. J. Physiol. Soc. Japan, 45: 379.

Sogami, M., Nagaoka, S., Era, S., Watari, H., Shiga, H. and Akasaka, K., (1983) Studies on the acid-induced transition of bovine mercaptalbumin by 360 MHz ¹H-NMR. J. Physiol. Soc. Japan, 45: 377.

Watari, H., Shiga, K., Nishina, Y., Naruse, S., Koizuka, I. and Takada, S., (1983) Energy metabolism in experimental cerebral ischemia of rat brain by topical magnetic resonance (TMR). J. Physiol. Soc. Japan, 45: 389.

Murakami, M., Seo, Y., Watari, H., Nakahari, T., Michigami, M., Mori, H. and Imai, Y., (1983) Salivary secretion and ATP metabolism in dog under the condition of low Na⁺ perfusion using NMR. J. Physiol. Soc. Japan, 45: 397.

楠岡英雄, 常岡 豊, 井上通敏, 堀 正二, 阿部 裕, 亘 弘 (1983) 燐核磁気共鳴法による生体計測. 臨床 ME, 7(6): 53-60.

口脇博治, 稲尾意秀, 平井長年, 高田宗春, 景山直樹, 権田隆実, 古瀬和寛, 亘 弘 (1983) 脳梗塞形成初期の脳浮腫および脳代謝・脳局所圧・水分構成変化と TMR (Topical Magnetic

Resonance) による脳代謝の検討. 脳虚血とフリーラジカル: 181-188.

横野 論, 宮崎正夫, 小栗顕二, 亘 弘, 成瀬昭二 (1983) 磷核磁気共鳴法を用いた無酸素状態及び蘇生時における in vivo rat 脳内エネルギー代謝の研究. 京都府医科大学雑誌, 92(6): 1227-1232.

成瀬昭二, 堀川義治, 田中忠蔵, 平川公義, 西川弘恭, 肥塚 泉, 高田宗春, 亘 弘 (1983) Topical magnetic resonance (TMR) による虚血脳の in vivo エネルギー代謝の研究. BRAIN and NERVE, 35(6): 603-609.

Higashi, A., (1983) Identification of r.e.m. sleep in the mouse by measuring the body movements. Med. Biol. Eng. Comput., 21: 644-646.

Komoda, Y., Ishikawa, M., Nagasaki, H., Iriki, M., Honda, K., Inoue, S., Higashi, A. and Uchizono, K., (1983) Uridine, a sleep-promoting substance form brainstems of sleep-deprived rats. Biomed. Res., 4 (*in press*).

亘 弘, 肥塚 泉, 成瀬昭二, 高田宗春 (1983) TMR の医学的応用. 画像診断, 3(9): 835-840.

Seo, Y., Murakami, M., Watari, H., Imai, Y., Yoshizaki, K., Nishikawa, H. and Morimoto, T., (1983) Intracellular pH determination by a ^{31}P -NMR technique. The second dissociation constant of phosphoric acid in a biological system. J. Biochem., 94: 729-734.

Naruse, S., Hirakawa, K., Horikawa, Y., Tanaka, C., and Watari, H., (1983) In vivo studies on energy metabolism in experimental cerebral infarction by ^{31}P -NMR. Proceedings of 7th European Congress of Neurosurgery (Brussels): 192-196. P 1 1 4

亘 弘, 下山雄平 (1983) Vector EPR. 第22回 ESR 討論会 (松山) 講演要旨集: 42-44.

下山雄平, 亘 弘 (1983) Vector EPR によるリン脂質配向膜の分子ゆらぎ. 第22回 ESR 討論会 (松山) 講演要旨集: 45-47.

中沢 隆, 肥塚 泉, 亘 弘, 志賀 潔, 矢内原 昇, 永山国昭 (1983) CCK オクタペプチドとそのアナログの二次元 NMR による構造研究. 第22回 NMR 討論会 (京都) 講演要旨集:

231-234.

加藤欣士郎, 里見 均, 成瀬昭二, 堀川義治, 田中忠蔵, 西川弘恭, 亘 弘 (1983) In vivo ^{31}P -NMR による実験腫瘍の研究. 第22回 NMR 討論会 (京都) 講演要旨集: 292-295.

堀川義治, 成瀬昭二, 田中忠蔵, 平川公義, 西川弘恭, 横野 諭, 亘 弘 (1983) 虚血脳及び無酸素脳の in vivo ^{31}P -NMR. 第22回 NMR 討論会 (京都) 講演要旨集: 296-299.

Nishina, Y., Shiga, K., Miura, R., Tojo, H., Ohta, M., Miyake, Y., Yamano, T. and Watari, H. (1983) On the structures on flavoprotein D-amino acid oxidase purple intermediates. A resonance Raman study. J. Biochem., **94**: 1979-1990.

亘 弘, 瀬尾芳輝 (1983) 臓器機能の生理化学 (分離臓器を用いて), (12) 生体臓器代謝研究への NMR の応用. 代謝, **20**(12): 1689-1697.

《細胞内代謝部門》

Yanaihara, N., Noki, K., Yanaihara, C., Iwanaga, T. and Fujita, T. (1983) Immunocytochemical demonstration of PHI and its co-existence with VIP in intestinal nerves of the rat and pig. Arch. histol. jap. **46**: 575-581.

Hioki, Y., Hoshino, M., Yanaihara, C., Ogino, K., Sato, H. and Yanaihara, N. (1983) Characterization of VIP-like immunoreactivity in a human neuroblastoma cell line. In Peptide Chemistry 1982 (ed. Sakakibara, S., Protein Research Foundation, Osaka) 263-266.

Itoh, N., Obata, K., Yanaihara, N. and Okamoto, H. (1983) Human Preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. Nature. **304**: 547-549.

Obata-Tsuto, H. L., Okamura, H., Tsuto, T., Terubayashi, H., Fukui, K., Yanaihara, N. and Ibata, Y. (1983) Distribution of the VIP-like immunoreactive neurons in the cat central nervous system. Brain Res. Bull. **10**: 653-660.

Terubayashi, H., Tsuto, T., Fukui, K., Obata, H. L., Okamura, H., Fujisawa, H., Itoi, M., Yanaihara, C., Yanaihara, N. and Ibata, Y. (1983) VIP (vasoactive intestinal polypeptide)-like

immunoreactive amacrine cells in the retina of the rat. *Exp. Eye Res.* **36**: 743-749.

Shimatsu, A., Kato, Y., Matsushita, N., Katakami, H., Ohta, H., Yanaihara, N. and Imura, H. (1983) Serotonin stimulates vasoactive intestinal polypeptide release from rat hypothalamus in vitro. *Brain Res.* **264**: 148-151.

Kaji, H., Chihara, K., Minamitani, N., Kodama, H., Yanaihara, N. and Fujita, T. (1983) Release of vasoactive intestinal polypeptide into the cerebrospinal fluid of the fourth ventricle of the rat: involvement of cholinergic mechanism. *Brain Res.* **269**: 303-310.

Hartschuh, W., Weihe, E., Yanaihara, N. and Reinecke, M. (1983) Immunohistochemical localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in merkel cells of various mammals: evidence for a neuromodulator function of the merkel cell. *J. Invest. Dermatol.* **81**: 361-364.

Nokihara, N., Yamamoto Y., Tanaka, M., Mochizuki, T., Yanaihara, C. and Yanaihara, N. (1984) Synthesis of PHM (human PHI) and its related peptides. In *Peptide Chemistry 1983* (ed. by Munekata, E., Protein Research Foundation, Osaka) 303-308.

Fuxe, K., Agnati, L. F., McDonald, T., Locatelli, V., Hokfelt, T., Dalsgaard, C. -J., Battistini, N., Yanaihara, N., Mutt, V. and Cuellar, A. C. (1983) Immunohistochemical indications of gastrin releasing peptide-bombesin-like immunoreactivity in the nervous system of the rat. Codistribution with substance P-like immunoreactive nerve terminal systems and coexistence with substance P-like immunoreactivity in dorsal root ganglion cell bodies. *Neurosci. Lett.* **37**: 17-22.

Wood, S. M., Jung, R. T., Webster, J. D., Ghatei, M. A., Adrian, T. E., Yanaihara, N., Yanaihara, C. and Bloom, S. R. (1983) The effect of the mammalian neuropeptide, gastrin-releasing peptide (GRP), on gastrointestinal and pancreatic hormone secretion in man. *Clinical Science*, **65**: 365-371.

McDonald, T. J., Ghatei, M. A., Bloom, S. R., Adrian, T. E., Mochizuki, T., Yanaihara, C. and Yanaihara, N. (1983) Dose-response comparisons of canine plasma gastroenteropancreatic hormone responses to bombesin and the porcine gastrin-releasing peptide (GRP). *Regulatory Peptides* **5**: 125-137.

Kuwahara, A., Ishikawa, T., Mikami, S. and Yanaihara, N. (1983) Distribution of neurons containing immunoreactivity for gastrin-releasing peptide (GRP), substance P, and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in the rat gastric wall. *Biomed. Res.* **4**: 473-478.

Tsutsumi, Y., Osamura, R. Y., Watanabe, K. and Yanaihara, N. (1983) Simultaneous immunohistochemical localization of gastrin releasing peptide (GRP) and calcitonin (CT) in human bronchial endocrine-type cells. *Virchows Arch. [Pathol. Anat.]* **400**: 163-171.

Yamaguchi, K., Abe, K., Kameya, T., Adachi, I., Taguchi, S., Otsubo, K. and Yanaihara, N. (1983) Production and molecular size heterogeneity of immunoreactive gastrin-releasing peptide in fetal and adult lungs and primary lung tumors. *Cancer Res.* **43**: 3932-3939.

Kondo, H., Iwanaga, T. and Yanaihara, N. (1983) On the occurrence of gastrin releasing peptide (GRP)-like immunoreactive nerve fibers in the celiac ganglion of rats. *Brain Res.* **289**: 326-329.

Kobayashi, S., Uchida, T., Ohashi, T., Fujita, T., Imura, H., Mochizuki, T., Yanaihara, C. and Yanaihara, N. (1983) Met-Enkephalin-Arg-Gly-Leu-like immunoreactivity in adrenal chromaffin cells and carotid body chief cells of the dog and monkey. *Biomed. Res.* **4**: 201-210.

Nihei, K., Iwanaga, T., Yanaihara, N., Mochizuki, T. and Fujita, T. (1983) Preproenkephalin A occurs in the enterochromaffin (EC) cells of the porcine intestine: an immunocytochemical study using antisera to Met-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ and to serotonin. *Biomed. Res.* **4**: 393-398.

Kobayashi, S., Ohashi, T., Fujita, T., Nakao, K., Yoshimasa, T., Imura, H., Mochizuki, T., Yanaihara, C., Yanaihara, N. and Verhofstad, A. A. J. (1983) An immunohistochemical study on the co-storage of Met-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ Met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ with adrenaline and/or noradrenaline in the adrenal chromaffin cells of the rat, dog, and cat. *Biomed. Res.* **4**: 433-442.

Kobayashi, S., Uchida, T., Ohashi, T., Fujita, T., Nakao, K., Yoshimasa, T., Imura, H., Mochizuki, T., Yanaihara, C., Yanaihara, N. and Verhofstad, A. A. J. (1983) Immunocytochemical demonstration of the co-storage of noradrenaline with Met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ and

Met-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ in the carotid body chief cells of the dog. Arch. histol. jap. **46**: 713-722.

Sakamoto, M., Nakao, K., Yoshimasa, T., Ikeda, Y., Suda, M., Takasu, K., Shimbo, S., Yanaihara, N. and Imura, H. (1983) Occurrence of methionine-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ with methionine-enkephalin, leucine-enkephalin and methionine-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ in human gastric antrum. J. Clin. Endocrinol. Metab. **56**: 202-204.

Shimosegawa, T., Kobayashi, S., Fujita, T., Mochizuki, T., Yanaihara, C. and Yanaihara, N. (1983) Nerve elements containing Met-enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸-like immunoreactivity in canine pancreas—a histochemical study. Neurosci. Lett. **42**: 161-165.

Yamamoto, Y., Yanaihara, C., Katsumaru, Y., Mochizuki, T., Tobe, A., Egawa, M., Imura, H., Numa, S. and Yanaihara, N. (1983) Synthesis of porcine leumorphin and some of its biological activities. Regulatory Peptides **6**: 163-168.

Suda, M., Nakao, K., Yoshimasa, T., Ikeda, Y., Sakamoto, M., Yanaihara, C., Yanaihara, N., Numa, S. and Imura, H. (1983) Comparison of the action of putative endogenous K-agonists, leumorphin and rimorphin in vitro. Life Sci. **33**: 275-278.

Nakao, K., Suda, M., Sakamoto, M., Yoshimasa, T., Morii, N., Ikeda, Y., Yanaihara, C., Yanaihara, N., Numa, S. and Imura, H. (1983) Leumorphin is a novel endogenous opioid peptide derived from preproenkephalin B. Biochem. Biophys. Res. Commun. **117**: 695-701.

Mochizuki, T., Yamamoto, Y., Tanaka, M., Yanaihara, C., Katsumaru, Y., Tatemoto, K., Mutt, V. and Yanaihara, N. (1983) Synthesis of hexatriacontapeptide amide corresponding to the proposed structure of peptide YY (PYY). In Peptide Chemistry 1982, ed. Sakakibara, S., Protein Research Foundation, Osaka: 59-64.

Yanaihara, N., Mochizuki, T. and Yanaihara, C. (1983) Chemistry of avian peptide hormones. In Avian Endocrinology: Environmental and Ecological Perspectives (eds. Mikami, S. et al., Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin) 135-146.

Iwanaga, T., Ito, S., Fujita, T. and Yanaihara, N. (1983) Brain-gut peptides and their precursors: Big gastrin, glicentin, proinsulin and somatostatin 28—an immunocytochemical

study. In Gut Peptides and Ulcer (ed. by Miyoshi, A., Biomedical Research Foundation, Tokyo) 93-101.

Yasuhara, T., Nakajima, T., Nokihara, K., Yanaihara, C., Yanaihara, N., Erspamer, V. and Erspamer, G. F. (1983) Two new frog skin peptides, phyllolitorins, of the bombesin-ranatensin family from *Phyllomedusa sauvagei*. Biomed. Res. 4: 407-412.

Varndell, I. M., Harris, A., Tapia, F. J., Yanaihara, N., De Mey, J., Bloom, S. R. and Polak, J. M. (1983) Intracellular topography of immunoreactive gastrin demonstrated using electron immunocytochemistry. Experientia 39: 713-717.

矢内原 昇 (1983) 脳-腸管ペプチドの生化学. 消化器とホルモン. 医学図書出版: 35-46.

岩永敏彦, 藤田恒夫, 矢内原 昇 (1983) 胃腸膵ホルモンとプロホルモンの免疫組織化学. 消化器とホルモン, 医学図書出版: 47-56.

下瀬川 徹, 小林 繁, 矢内原千鶴子, 矢内原 昇 (1984) イヌの下垂体および松果体のモチリン様免疫液性 — 組織化学的研究 —. 日本内分泌学会雑誌, 60: 54-62.

矢内原 昇, 矢内原千鶴子, 望月 徹, 軒原清史, 山下裕一, 大久保正士, 岩原邦宏, 松林直, 深田修司, 島崎英樹 (1984) 消化管ホルモン, ホルモンと臨床, 32: 231-237.

矢内原 昇 (1984) CRF と GRF の化学, 代謝, 21: 213-227.

《生 体 膜 部 門》

Kukita, F. & Yamagishi, S., (1983) Effects of an outward water flow on potassium currents in a squid giant axon. J. Membrane Biol. 75: 33-44.

Kawai, N., Yamagishi, S., Saito, M. & Furuya, K., (1983) Blockade of synaptic transmission in the squid giant synapse by a spider toxin (JSTX). Brain Research, 278: 346-349.

Hirano, H., Nishiyama, F., Furuya, K. & Yamagishi, S., (1983) Binding of cationized ferritin on the cytoplasmic surface of the axolemma and its effect on the membrane excitation. Proc.

Japan Acad. 59, Ser. B 59: 140-143.

Furuya, K., Furuya, S. & Yamagishi, S.,(1983) Developments of membrane excitability and intramembranous particles in neuroblastoma $\times$ glioma hybrid cells. J. Physiol. Soc. Japan, 45: 89.

Yamagishi, S. & Furuya, K.,(1983) Effects of intracellular divalent cations on Na channel and K channel activations of squid giant axons. J. Physiol. Soc. Japan, 45: 122.

Sugiyama, H.,(1983) Properties of intracellular α -bungarotoxin binding components in cultured skeletal muscle cells. J. Physiol. Soc. Japan, 45: 277.

Sugiyama, H., Yamashita, Y. & Fukumoto, T.,(1983) Monoclonal antibodies against nicotinic acetylcholine receptors from *Narke japonica*. Neurochem. Res. 8: 811-812.

Yamashita, Y. & Sugiyama, H.,(1983) A highly sensitive and convenient method to detect monoclonal antibodies against acetylcholine receptors. J. Biochem. 93: 1709-1712.

Sugiyama, H., Yamagishi, S. & Yamashita, Y.,(1983) Multiple forms of intracellular α -bungarotoxin binding components with different molecular sizes in cultured skeletal muscle cells. Biomed. Res. 4: 425-432.

Yagisawa, H., Yamagishi, S. & Sugiyama, H.,(1983) Characterization of muscarinic acetylcholine receptors as glycoproteins. Proc. Japan Acad. 59, Ser. B 9: 324-327.

Yagisawa, H., Yamagishi, S. & Sugiyama, H.,(1983) Interaction of plant lectins with muscarinic acetylcholine receptors. Abstracts of International Symposium on Neurotransmitter Receptor Regulation, Interactions and Coupling to the Effectors.(1983, Oct. Hiroshima): 60.

Furuya, K., Furuya, S. & Yamagishi, S.,(1983) Developmental time courses of Na and Ca spikes in neuroblastoma $\times$ glioma hybrid cells. Develop. Brain Res. 11: 229-234.

Furuya, S. & Furuya, K.,(1983) A quantitative analysis of intramembranous particles during the development of neuroblastoma $\times$ glioma hybrid cells. Develop. Brain Res. 11: 235-244

Furuya, S. & Furuya, K.,(1983) Ultrastructural changes in differentiating neuroblastoma × glioma hybrid cells. *Tissue & Cell*, 15: 903-919.

Hirono, C. & Mitsui, T.,(1983) Slow onset of activation and delay of inactivation in transient current of *Nitella axilliformis*. *Plant & Cell Physiology*, 24: 289-299.

Hirono, C. & Mitsui, T.,(1983) Experimental demonstration of delayed onset of inactivation in the transient current of *Nitella axilliformis*. *Plant & Cell Physiology*, 24: 1323-1325.

山岸俊一, 古家喜四夫 (1983) 神経膜Naチャネル, Kチャネルに対する細胞内2価イオンの作用. 生物物理 (第21回年会講演予講集), 23: S 127.

古家喜四夫, 山岸俊一 (1983) 荷電ポリアミノ酸のKチャネルへの影響. 生物物理 (第21回年会講演予講集), 23: S 127.

田沢 仁, 新免輝男, 山岸俊一 (1983) 車軸藻細胞およびイカ巨大神経線維の膜特性の比較研究. 生物物理, 23(2): 47-57.

杉山博之 (1983) アセチルコリンレセプターの発生; 「筋発生の細胞生物学」小沢, 嶋田, 真崎編, 学会出版センター: 109-122.

杉山博之 (1983) アセチルコリンエステラーゼの発生; 「筋発生の細胞生物学」小沢, 嶋田, 真崎編, 学会出版センター: 140-142.

八木沢 仁 (1983) リンパ球のムスカリン性アセチルコリン受容体と細胞障害性. 蛋白質核酸酵素, 28: 1016-1018.

八木沢 仁, 山岸俊一, 杉山博之 (1983) 小麦胚アグルチニン (WGA) によるムスカリン性アセチルコリン受容体サブクラスの解析と部分精製. 生化学, 55(8): 713.

福本哲夫, 山下 昭, 玉腰勝敏, 杉山博之 (1983) 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. 生化学, 55(8): 887.

長宗秀明, 浦山 修, 原 諭吉, 福島義博, 中尾 真, 杉山博之 (1983) 腎 Na, K-ATPase に対するモノクローナル抗体 (I). 生化学, 55(8): 902.

浦山 修, 長宗秀明, 中尾 真, 杉山博之, 佐藤かな子, 中尾順子 (1983) 腎 Na, K-ATPase に対するモノクローナル抗体 (II). 生化学, 55(8): 902.

山岸俊一 (1983) 興奮性膜の物理化学. (特集/生体膜) 病態生理, 2(12): 1182-119.

《機能協関部門》

Watanabe, A. (1983) Change in optical activity of stained nerve. J. Physiol. Soc. Japan, 45: 400.

Watanabe, A., (1983) Optical activity response of a stained nerve. Proc. Intern. Union Physiol. Sci. 40: 308.

Watanabe, A., (1983) Change in optical activity of nerve fibers with excitation. : 294-304 In A. D. Grinnel and W. J. Moody, Jr. (eds), The physiology of excitable cells.

Terakawa, S., (1983) Changes in intracellular pressure in squid giant axons associated with production of action potentials. Biochem. Biophys. Res. Commun. 114: 1006-1010.

Terakawa, S., (1983) Potential dependent variations of intracellular pressure in the squid giant axon. Proc. Intern. Union Physiol. Sci. 40: 310.

Hsu, K. and Terakawa, S., (1984) Localization of the excitable membrane in the myelinated giant fiber of shrimp *Penaeus japonicus*. Japan. J. Physiol. 34: 181-185.

Terakawa, S., (1983) Rapid changes in intracellular pressure of squid giant axons. J. Physiol. Soc. Japan, 45: 414.

Nakayama, T. and Terakawa, S., (1983) Synthesis of tetrodotoxin derivative and purification of tetrodotoxin binding protein from *E. electricus* electroplax. J. Physiol. Soc. Japan, 45: 414.

Kimura, Y and Ikegami, A., (1984) Anisotropic electric properties of purple membrane and their change during the photoreaction cycle. Biophys. J. 45: no. 3.

渡辺 昭 (1983) 神経興奮に伴う旋光性と複屈折性の変化. 生物物理, 23: S-132.

寺川 進 (1983) 興奮膜の厚みと膜電位. 生物物理, 23: S-133.

木村能章, 池上 明, Stoeckenius, W., (1983) 紫膜とローカルイオン. 生物物理, 23: S-226.

《能 動 輸 送 部 門》

福島義博, 中尾 真 (1983) 膜の (Na^+ , K^+) ATPase. 最新医学, 38: 861—867.

福島義博 (1983) Na^+ , K^+ -ATPase のリン酸化反応—イオン輸送機構の基礎の確立—蛋白質・核酸・酸素 (共立): 1131~1144.

Fukushima, Y. and Nakao, M., (1983) Reinvestigation of the sequence of sensitivity of phosphoenzyme of Na, K-ATPase to ADP and K^+ during the presteady state of the phosphorylation by ATP. In : Current Topics in Membranes and Transport, ed. by Hoffman, J. F. and Forbush, B. III. Academic Press, New York, 19: 557-560.

Fukushima, Y., Yamada, S., and Nakao, M., (1984) ATP inactivates hydrolysis of the K^+ -sensitive phosphoenzyme of kidney Na^+ , K^+ -transport ATPase and activates that of muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -transport ATPase. J. Biochem. 95: 359-368.

Nakao, M., Nakao, T., Ohno, T., Fukushima, Y., Hara, Y., and Arai, M., (1983) High-performance gel chromatography of horse kidney Na, K-ATPase. In : Current Topics in Membranes and Transport, ed. by Hoffman, J. F. and Forbush, B. III. Academic Press, New York, 19: 107-112.

Nakao, T., Ohno, T., Nakao, M., Maeki, G., Taukita, S. and Ishikawa, H., (1983) Monomeric and Trimeric Structures of Active Na, K-ATPase in C_{12}E_8 Solution. Biochim. Biophys. Res. Commun. 113: 361-367.

Nakao, T., Ohno-Fujitani, T. and Nakao, M., (1983) Sodium and Potassium ion-dependent change in oligomerization of Na, K-ATPase in C_{12}E_8 detected by low-angle laser light scattering technique in combination with high performance porous silica-gel chromatography. J.

Biochem. **94**: 689-697.

Jinbu, Y., Sato, S., Nakao, M. and Tsukita, S., (1984) Ca^{2+} - and Mg-ATP-dependent shape change of human erythrocyte ghosts and triton shells. *Exp. Cell Res.* **151**: 160-170.

Jinbu, Y., Sato, S. and Nakao, M., (1984) Redversible shape change of triton-treated erythrocyte ghosts induced by Ca^{2+} and Mg-ATP. *Nature*, **307**: 376-378.

Nakao, M., Jinbu, Y., Sato, S. and Nakao, T., (1983) Structure and function of membrane undercoat in erythrocytes. *Acta Haemato. Japonica*, **46**: 1399-1405.

Shiba, S., Sano, K., Nakao, M., Kobayashi, K. and Igarashi, Y., (1984) Short communication Analysis of human palatine salivary proteins by isoelectric focusing in agarose. *Archives Oral Biology*, **28**: 363-364.

《神經情報部門》

Ishida, A. T., Kaneko, A. and Tachibana, M., (1983) Responses of solitary horizontal cells of goldfish retinas to L-glutamate and related compounds. *Neurosci. Lett.*, **13**: S123.

Ishida, A. T., Kaneko, A. and Tachinana, M., (1983) Solitary horizontal cells in culture-II. A new tool for examining effects of photoreceptor neurotransmitter condidates. *Vision Res.*, **23**: 1217-1220.

Ishida, A. T., Kaneko, A. and Tachinana, M., (1984) Responses of solitary retinal horizontal cells from carassius auratus to L-glutamate and related amino acids. *J. Physiol.*, **348**: 255-270.

Kaneko, A., (1983) Retinal bipolar cells : Their function and morpholog. *Trends in Neurosci.*, **6**: 219-223.

Kaneko, A. and Saito, T., (1983) Ionic mechanisms underlying the responses of off-center bipolar cells in the carp retina. II. Studies on responses evoked by transretinal current stimulation. *J. Gen. Physiol.*, **81**: 603-612.

Kaneko, A. and Tachibana, M., (1983) Double color-opponent receptive field of carp bipolar cells. *Vision Res.*, **23**: 381-388.

Kaneko, A. Tachibana, M. and Ishida, A. T., (1983) Effects of L-glutamate on solitary horizontal cells of the goldfish retina. *J. Physiol. Soc. Japan*, **45**: 479.

MecLeish, P. R., Schwartz, E. A. and Tachibana, M., (1984) Control of the generator current in solitary rods of the *ambystoma tigrinum* retina. *J. Physiol.* **348**: 645-664.

Ohtsuka, T., (1983) Axons connecting somata and axon terminals of L-aminosity-type horizontal cells in the turtle retina : Receptive field studies and intracellular injections of HRP. *J. Comp. Neurol.*, **220**: 191-198.

Ohtsuka, T., (1983) Receptive fields studies of L-type horizontal cells in the turtle retina. *J. Physiol. Soc. Japan*, **45**: 479.

Saito, T. and Kaneko, A., (1983) Ionic mechanisms underlying the responses of off-center bipolar cells in the carp retina. I. Studies on responses evoked by light. *J. Gen. Physiol.*, **81**: 589-602.

Tachibana, M., (1983) Ionic currents of solitary horizontal cells isolated from goldfish retina. *J. Physiol.*, **345**: 329-351.

Tachibana, M., (1983) Membrane properties of retinal horizontal cells in culture. *J. Physiol. Soc. Japan*, **45**: 407.

Tachibana, M., (1983) Separation of ionic currents in solitary horizontal cells dissociated from goldfish retina. *Neurosci. Lett.*, **13**: S122.

Tachibana, M., (1983) Solitary horizontal cells in culture-I. Their electrical properties. *Vision Res.*, **23**: 1292-1216.

Yang, X-L., Tauchi, M. and Kaneko, A., (1983) Convergence of signals from red-sensitive and green-sensitive cones onto L-type horizontal cells of the goldfish retina. *Vision Res.*, **23**: 371-381.

Yasui, S. and Ohtsuka, T., (1983) Responses of the horizontal cell to density-modulated random-dot patterns. *J. Physiol. Soc. Japan*, **45**: 479.

立花政夫 (1983) 成熟脊椎動物からの網膜神経細胞の単離と培養. *生体の科学*, **34**(5): 405-411.

《液 性 情 報 部 門》

Kosaka, T., (1983) Gap junctions between non-pyramidal cell dendrites in the rat hippocampus (CA1 and CA3 regions). *Brain Research*, **271**: 157-161.

Kosaka, T., (1983) Axon initial segments of the granule cell in the rat dentate gyrus: synaptic contacts on bundles of axon initial segments. *Brain Research*, **274**: 129-134.

Kosaka, T., (1983) Neuronal gap junctions in the polymorph layer of the rat dentate gyrus. *Brain Research*, **277**: 347-351.

Kosaka, T. and Hama, K., (1982-1983) Synaptic organization in the teleost olfactory bulb. *J. Physiol., Paris*, **78**: 707-719.

Kosaka, T. and Ikeda, K., (1983) Reversible Blockage of Membrane Retrieval and Endocytosis in the Garland Cell of the Temperature-sensitive Mutant of *Drosophila melanogaster*, shibirets. *J. Cell Biology*, **97**: 499-507.

Kosaka, T. and Ikeda, K., (1983) Possible Temperature-Dependent Blockage of Synaptic Vesicle Recycling Induced by a Single Gene Mutation in *Drosophila*. *J. Neurobiology*, **14**: 207-225.

Kosaka, T., Hama, K. and Wu, J.-Y., (1984) GABAergic synaptic boutons in the granule cell layer of rat dentate gyrus. *Brain Research*, **293**: 353-359.

《高 次 神 經 機 構 部 門》

Tsukahara, N., Fujito, Y. and Kubota, M., (1983) Specificity of the newly-formed

corticorubral synapses in the kitten red nucleus. *Exp. Brain Res.*, **51**: 45-56.

Fujito, Y., Murakami, F., Maeda, J. and Tsukahara, N., (1983) Synaptic inputs of feline rubrospinal neurons from the parietal association cortex, pretectum and medial lemniscus, and their lesion-induced sprouting. *Japn. J. of Physiol.*, **33**: 197-214.

Tsukahara, N., Bando, T., Murakami, F. and Oda, Y., (1983) Properties of cerebello-precerebellar reverberating circuits. *Brain Res.*, **274**: 249-257.

Kawato, M. & Tsukahara, N., (1983) Theoretical study on electrical properties of dendritic spines. *J. of Theor. Biol.*, **103**: 507-522.

Kawato, M. & Tsukahara, N., (1983) Morphological changes of dendritic spines as a possible mechanism of synaptic plasticity. *Neurosci. Lett., Suppl.* **13**: S41.

Oda, Y., Miyasaka, S., Ito, M. and Tsukahara, N., (1983) Appearance of new component in the cortico-rubral EPSPs after the establishment of classical conditioning in the cat. *J. Physiol. Soc. Japan*, **45**: 431.

Asanuma, H., Kosar, E., Tsukahara, N. and Robinson, H., (1983) Modification of cortico-cortical projection after elimination of thalamocortical projection in the cat. *Society for Neurosci., 13th. Annual Meeting, Abst.* **9**: 308.

Tsukahara, N., (1983) Neuronal plasticity in red nucleus during development and in adult age. *The Cell Biology of Neuronal Plasticity, Sardinia, Italy, Abst.*: 87-88.

Tsukahara, N., (1983) Learning in a monosynaptic corticorubral system. *Proc. IUPS*: 379.

Tsukahara, N., (1983) Significance of synaptic plasticity at the brainstem level for the control of movement. *Proc. IUPS*: 116.

Maeda, J., Murakami, F. and Tsukahara, N., (1983) Morphological and electrical properties of red nucleus neuron using three dimensional reconstruction by computer. *J. Physiol. Soc. Japan.*, **54**: 431.

Kubota, M., Sakaguchi, H. and Tsukahara, N., (1983) Release of GABA from the cat red nucleus in vitro. *Neurosci. Lett., Suppl.*, **13**: S95.

Kubota, M., Tsukahara, N. and Sakaguchi, H., (1983) Release of endogenous GABA from the cat red nucleus slices. *Brain Res.*, **270**: 190-192.

Tsukahara, N. and Murakami, F., (1983) Axonal sprouting and recovery of function after brain damage. In *Motor Control Mechanisms in Health and Disease*. Edited by J. E. Desmedt., Raven Press, New York: 1073-1084.

Murakami, F., Katsumaru, H., Wu, J-Y., Matsuka, T. and Tsukahara, N., (1983) Immunocytochemical demonstration of GABAergic synapses on identified rubrospinal neurons. *Brain Res.*, **267**: 357-360.

Murakami, F., Katsumaru, H. & Tsukahara, N., (1983) Immunocytochemical demonstration of intrinsic interneurons mediating cortically induced IPSPs in cat red nucleus. *J. Physiol. Soc. Japan.*, **45**: 465.

Obata, K. Inoue, H., Yamamoto, N. and Fujita S. C., (1983) Neurite growth from cultured dorsal-root ganglion cells by conditioned medium and nerve growth factor. *Neurosci. Lett., Suppl.* **13**: S33.

佐々木和夫, 塚原仲晃 (1983) 脳における感覚・運動統御. Eccles 教授80歳記念シンポジウム. 生体の科学, 医学書院, **34**(4): 341-342.

塚原仲晃 (1983) 脳障害の機能回復のメカニズム, 第19回日本リハビリテーション医学会総会シンポジウム/リハビリテーションにおける機能回復のメカニズム. リハビリテーション医学, 医学書院, **20**(1): 11-15.

塚原仲晃 (1983) 非ノイマン型計算機と脳. 病態生理, 永井書店, **2**(10): 1014-1018.

塚原仲晃 (1983) 記憶とシナプス. 科学, 岩波書店, **53**(12): 762-770.

塚原仲晃, 小田洋一 (1983) 記憶のメカニズム. 脳の科学Ⅱ, 朝倉書店: 146-170.

川人光男, 浜口隆浩, 塚原仲晃 (1983) 神経細胞の棘シナプスの可塑性. 第7回大阪大学BME研究会コロキウム講演論文集: 11-16.

山本亘彦 (1983) 培養における神経成長のHRPによる解析. 第83回北関東医学会例会抄録. 33: 29.

Taniguchi, I., (1983) Correlation between vocalization and audition in the Japanese horseshoe bat. J. Physiol. Soc. Japan., 45: 489.

Taniguchi, I., (1983) A possible role of pinna movement in the Japanese horseshoe bat. Neurosci. Lett., Suppl. 13: 17.

Suga, N., Niwa, H. and Taniguchi, I., (1983) Representation of biosonar information in the auditory cortex of the mustached bat, with emphasis on representation of target velocity information. In Advances in Vertebrate Neuroethology, Edited by J.-P. Ewert, R. Capranica & D. J. Ingle: 829-867.

Murakami, F., Katsumaru, H., Maeda, J. and Tsukahara, N., (1984) Reorganization of corticorubral synapses following crossinnervation of flexor and extensor nerves of adult cat: an electron microscopic study. Brain Res., (*in press*).

Katsumaru, H., Murakami, F., Wu, J. Y. and Tsukahara, N., (1984) GABAergic intrinsic interneurons in cat red nucleus demonstrated with combined immunocytochemistry and anterograde degeneration method. Neurosci. Res., 1(1): 35-44.

Hultborn, H., Murakami, F., Tsukahara, N. and Gustafsson, B., (1984) The afterhyperpolarization in neurons of the red nucleus. Exp. Brain Res. (*in press*).

Sakaguchi, H., Kubota, M., Nakamura, M. & Tsukahara, N., (1984) Effects of amino acids on cat red nucleus neurons in vitro. Exp. Brain Res., 54: 150-156.

谷口郁雄 (1983) キクガシラコウモリの「こだま定位」: 発声系と聴覚系の関連. 日本音響学会講演論文集: 211-212.

塚原仲晃 (1984) ニューロン・シナプス・神経網. 脳の情報処理, 朝倉書店: 1-35.

塚原仲晃 (1984) 高次脳機能. 脳の情報処理, 朝倉書店: 226—261.

《情報記憶部門》

Yawo, H. and Kuno, M., (1983). How a nerve fiber repairs its cut end : Involvement of phospholipase A₂. Science, N. Y : 222: 1351-1353.

Hironaka, T., Ikari, Y., Miyata, Y. and Otsuka, M., (1983). An etiological study of avian muscular dystrophy, using muscle transplantation. In: Muscular dystrophy; Biomedical aspects, ed. by Ebashi, S. and Ozawa, E. Jap. Sci. Soc. Press, Tokyo and Springer-Verlag, Berlin: 3-10.

Yoshioka, K. and Miyata, Y., (1983). Changes in the distribution of the extrajunctional acetylcholine sensitivity along muscle fibers during development and following cordotomy in the rat. Neurosci. 9: 437-443.

Miyata, Y., (1983). A new mutant mouse with motor neuron disease. Develop. Brain Res. 10: 139-142.

《高次神経性調節部門》

Matsuda, H., (1983) Effects of intracellular calcium injection on steady state membrane currents in isolated single ventricular cells. Pflügers Archiv, 397: 81-83.

Kameyama, M., (1983) Electrical coupling between ventricular paired cells isolated from quinea-pig heart. Journal of Physiol. 336: 345-357.

Noma, A., (1983) ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. Nature, 305: 147-148.

Sakmann, B., Noma, A. and W, Trautwein., (1983) Acetylcholine activation of single muscarinic K⁺ channels in the isolated pacemaker cells of mammalian heart. Nature, 303: 250-253.

Noma, A., M. Morad. and Irisawa, H., (1983) Does the "Pacemaker currents" generate the diastolic depolarization in the rabbit SA node cells ? *Pflügers Archiv.* **397**: 190-194.

Irisawa, H. and Kokubun, S., (1983) Modulation by intracellular ATP and cyclic AMP of the slow inward current in isolated single ventricular cells of the guinea-pig. *Journal of Physiol.* **338**: 321-337.

Taniguchi, J., Noma, A. and Irisawa, H., (1983) Modification of the cardiac action potential by intracellular injection of adenosine triphosphate and related substances in guinea pig single ventricular cells. *Circ. Research.* **53**: 131-139.

Kameyama, M., Kiyosue. and Soejima, M.,(1983) Single channel analysis of the inward rectifier K current in the rabbit ventricular cells. *Jpn. J. Physiol.* **33**: 1039-1056.

Trautwein, W., Noma, A. and Sakmann, B., (1983) ACH activated potassium channels in the pacemaker of the heart, studied with the patch clamp. *Proc. of the International Union of Physiol. Sciences*, **15**: 116, 03. .

Noma, A. and Irisawa, H., (1983) Ionic currents of the isolated single S-A and A-V node cells. *Proc. of the International Union of Physiol. Sciences*, **15**: 167, 08.

Irisawa, H., Nakayama, T., Kurachi, Y. and Noma, A., (1983) Ionic current density of the single pacemaker cell isolated from rabbit S-A and A-V nodes. *Proc. International Union of Physiol. Sciences*, **15**: 138, 07.

Takei, M., Irisawa, H. and Noma, A. (1983) Single channel analysis of the voltage dependent K current in rabbit A-V node cells. *Proc. International Union of Physiol. Sciences* **15**: 138, 08.

Kameyama, M., Kiyosue, T., Soejima, M. and Noma, A.,(1983) I_{K1} Channel in the rabbit ventricular cell is time and voltage dependent. *Proc. International Union of Physiol. Sciences.* **15**: 138, 09.

Matsuda, H., Noma, A., and Irisawa, H. (1983) Separation of membrane current components by internal dialysis of the single ventricular cells. *Proc. International Union of Physiol.*

Sciences, 15: 138, 10.

Soejima, M. and Noma, A. (1983) The K channel coupled with the muscarinic ACh receptor in the heart muscle. Proc. International Union of Physiol. Sciences. 15: 138, 18.

Kameyama, M., Kiyosue, M., Noma, A. and Irisawa, H., (1983) Inward rectifier K channel in the rabbit ventricular cells. J. Physiol. Soc. Japan, 45: 410. 115.

Takei, M., Noma, A. and Irisawa, H., (1983) Single channel analysis of the outward K channel in rabbit A-V node cells. J. Physiol. Soc. Japan, 45: 411. 116.

Kiyosue, T., Soejima, M., Noma, A., and Irisawa, H., (1983) Distribution of inward rectifier K⁺ channel in rabbit heart. J. Physiol. Soc. Japan, 45: 525, 444.

Iijima, T., Kamayama, M. and Irisawa, H., (1983) Membrane currents in single guinea pig atrial cells. J. Physiol. Soc. Japan, 45: 520, 429.

中山敏夫, 倉智嘉久, 野間昭典, 入沢 宏 (1983) 遊離した単一心筋ペースメーカー細胞の自動性. 日本循環器誌 47回学会誌: 20 L, 375.

小原正裕, 亀山正樹, 野間昭典, 入沢 宏 (1983) Giga-Seal吸引電極の製作と単一心筋細胞への応用. 日生誌, 45: 629-639.

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

入沢 宏 (1983) 1 個の心筋細胞—その特長と生理的性質. 循環科学, 3: 58-59.

入沢 宏 (1983) ペースメーカーの不思議. 循環科学, 3: 834-835.

入沢 宏 (1983) カルシウム電流とその働き. 循環科学, 3: 1072-1073.

入沢 宏 (1983) 虚血とプラトー相. 循環科学, 3: 1182-1183.

入沢 宏 (1983) 心臓生理における静かな革命—パッチ法. 循環科学, 3: 1276-1277.

《高次液性調節部門》

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

Oomura, Y., Yoshimatsu, H. and Aou, S., (1983) Medial preoptic and hypothalamic neuronal activity during sexual behavior of the male monkey. *Brain Res.* **266**: 340-343.

Aou, S., Oomura, Y., Nishino, H., Inokuchi, A. and Mizuno, Y., (1983) Influence of catecholamines on reward-related neuronal activity in monkey orbitofrontal cortex. *Brain Res.* **267**: 165-170.

Aou, S., Oomura, Y. and Nishino, H., (1983) Influence of acetylcholine on neuronal activity in monkey orbitofrontal cortex during bar press feeding task. *Brain Res.* **275**: 178-182.

Inoue, M., Oomura, Y., Nishino, H., Aou, S., Sikdar, S. K., Hynes, M., Mizuno, Y. and Katafuchi, T., (1983) Cholinergic role in monkey dorsolateral prefrontal cortex during bar press feeding task. *Brain Res.* **278**: 185-194.

Oomura, Y., Nishino, H., Aou, S., Lenard, L., Minami, T., Misaki, H. and Inokuchi, A. (1983) Behavioral significance of monkey lateral hypothalamic chemo-sensitive neurons. *J. Physiol. Soc. Japan*, **45**: 437.

Aou, S., Oomura, Y., Nishino, H., Inoue, M. and Nakano, Y., (1983) Autonomic modulation in monkey prefrontal neuronal activity during feeding behavior. *J. Physiol. Soc. Japan*, **45**: 439.

Yamamoto, T., Oomura, Y., Nishino, H., Aou, S., Nakano, Y. and Nemoto, S., (1983) Long term unit recording in the monkey orbitofrontal cortex during emotional and feeding behaviors. *J. Physiol. Soc. Japan*, **45**: 446.

Hori, T., Kiyohara, T., Oomura, Y., Nishino, H. and Aou, S., (1983) Unit activity in the monkey orbitofrontal cortex during thermoregulatory and feeding behaviors. *J. Physiol. Soc. Japan*, **45**: 594.

Aou, S., Oomura, Y., Nishino, H., Lénárd, L., Minami, T. Misaki, H. and Inokuchi, A., (1983) Role of regulatory substances on the monkey lateral hypothalamic neuron activity during feeding behavior. *Neurosci. Lett. suppl.* 13: S19.

Koga, T., Miyazawa, T., Ishikawa, T., Aou, S., Oomura, Y. and Nishino, H., (1983) Orbitofrontal neuronal activity of the monkey in extinction. *Neurosci. Lett. suppl.* 13: S140.

Nakano, Y., Oomura, Y., Nishino, H., Aou, S., Yamamoto, T. and Nemoto, S., (1983) Long-term neuronal activity in the monkey orbitofrontal cortex in responds to internal and external conditional changes. *Neurosci. Lett. suppl.* 13: S140.

Oomura, Y., Aou, S., Lenard, L., Nishino, H., Minami, T. and Misaki, H., (1983) Lateral hypothalamic activity during monkey's feeding behavior and effects of iontophoretically applied chemicals. *Proceedings of the International Union of Physiological Sciences.* 15: 462.

Oomura, Y., (1983) Glucose as a regulator of neuronal activity. *Advances in Metabolic Disorders.* 10. Edited by A. J. Szabo, Academic Press, Inc., New York: 31-65.

Oomura, Y., (1983) Recent techniques and investigations on the influence of noradrenaline on feeding and behavior. *Methods in Biogenic Amine Research.* Edited by S. Parvez, T. Nagatsu, I. Nagatsu and H. Parvez, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam: 953-979.

Oomura, Y., Shimizu, N. and Sakata, T., (1983) Endogenous chemical substances and control of food intake. *Neurology and Neurobiology.* 5. *The Physiology of Excitable Cells.* Edited by A. D. Grinnel and W. J. Moody, Jr., Alan R. Liss, Inc., New York: 569-586.

大村 裕, 水野勇司 (1983) 中枢性食欲に関する最近の知見. *最新医学*, 38: 217-230.

大村 裕, 水野勇司 (1983) 中枢神経系の化学受容器. *臨床監査 Mook*, 15: 194-203.

大村 裕, 井之口昭, 石橋慎一郎 (1983) 摂食・飲水行動の調節. *日本医師会雑誌*, 90: 595-614.

大村 裕 (1983) 知と情—脳内情報処理機構と計算機. *情報処理*, 24: 954-966.

大村 裕, 水野勇司 (1983) 生体のグルコース・センサー. *Diabetes Journal* (糖尿病と代謝), 11: 141-148.

大村 裕 (1983) 脳の連合野機能と情動機能. *九州鉄道医学会誌*, 29: 45-55.

栗生修司, 大村 裕, 南 武嗣, 三崎久好, 井之口昭, 西野仁雄, László Lénárd (1983), 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様式. 第3回肥満研究会記録: 179-181.

《組織培養標本室》

Furuya, S. and Furuya, K., (1983) Ultrastructural changes in differentiating neuroblastoma×glioma hybrid cells. *Tissue and Cell*: 15: 903-919.

Furuya, S. and Furuya, K., (1983) A quantitative analysis of intramembranous particles during the development of neuroblastoma×glioma hybrid cells. *Develop. Brain Res.*, 11: 235-244.

Furuya, K., Furuya, S. and Yamagishi, S., (1983) Developmental time courses of Na and Ca spikes in neuroblastoma×Glioma hybrid cells. *Develop. Brain Res.* 11: 229-234.

《超高圧電子顕微鏡室》

Matsuda, T., Endo, J., Osakabe, N., Tonomura, A. & Arie, T., (1983) Morphology and structure of biogenic magnetite particles. *Nature*, 302: 411-412.

松田 強, 有井達夫, 遠藤潤二, 長我部信行, 外村 彰 (1983) 走磁性細菌内磁性体微粒子の高分解能観察. 日本電子顕微鏡学会第39回講演予稿集: 157.

Matsuda, T., Arie, T., Endo, J., Osakabe, N. & Tonomura, A., (1983) High resolution electron microscopy of biogenic magnetite particles. *J. Electron Microsc.* 32: 255.

浜 清, 中村栄男, 有井達夫 (1983) Golgi変法による横紋筋T-tubulesの超高圧電子顕微鏡立体観察. 日本電子顕微鏡学会第39回講演予稿集: 258.

Hama, K., Nakamura, S. & Arai, T.,(1983) Observation on the T-system of skeletal and cardiac muscles in three dimensions using high-voltage electron microscopy and Golgi black reaction. J. Electron Microsc. 32: 280.

有井達夫（1983）ローレンツ電顕法による菱形十二面体鉄微粒子の磁化分布．日本物理学会
1983年秋の分科会（岡山）講演予稿集 3: 168.

《動物実験施設》

権田辰夫，沖 充，尾崎 毅（1983）無神経節腸管とペプチド（Substance P, Enkephaline, VIP）性神経について．日平滑筋誌，19: 351-353.

研 究 活 動(学会報告)

〔目 次〕

神経化学部門	143
超微小形態生理部門	144
細胞内代謝部門	147
生体膜部門	148
機能協関部門	150
能動輸送部門	151
神経情報部門	152
液性情報部門	153
高次神経機構部門	153
情報記憶部門	154
高次液性調節部門	155
組織培養標本室	157
超高圧電子顕微鏡室	157
動物実験施設	157

学 会 報 告

《神 經 化 学 部 門》

江橋節郎「日本医学の進路と独創性」 第21回日本医学会総会（1983. 4. 大阪府青少年会館文化ホール）.

江橋節郎「カルシウムイオンと生命現象」 愛知県発達障害研究所セミナー（1983. 6. 春日井市, 愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所）.

江橋節郎「筋収縮の生理学」 第25回日本小児神経学会総合（1983. 7. 自治医科大学地域医療情報研修センター）.

江橋節郎「カルシウムイオンと薬物：筋収縮をめぐる」 第3回日本臨床麻酔学会（1983. 11. 日本都市センター）.

江橋節郎「筋収縮の分子機構」 日本結晶学会年会（1983. 11. 東北大学理学部）.

江橋節郎「筋収縮とカルシウムイオン」第二回山中湖 GIBCO-DEXTER シンポジウム『遺伝子の構造からみた生物機能の解析』.

江橋節郎「カルシウムイオンと生命現象」 第27回日本薬学会関東支部大会（1983. 11. 昭和大学薬学部）.

江橋節郎「独創性とは何か：わが国の基礎医学研究における問題点」 浜松医科大学開学10周年記念講演会（1984. 2. 浜松医科大学）.

三川 隆, 古関千寿子, 広瀬宣郎「特異割球由来細胞と発想タンパクの同定」 第16回日本発生生物学会（1983. 5. 愛媛）.

田中良晴, 広瀬宣郎, 三川 隆, 丸山 敬, 堀田凱樹「キイロシヨウジョウパエの筋肉のCa感受性タンパク質」第21回日本生物物理学会（1983. 10. 岐阜）.

丸山 敬, 三川 隆, 江橋節郎「カルシウム結合性タンパク質検出法」 第56回日本生化学会（1983. 10. 福岡）.

Ebashi, S: Troponin, roles of its subunits. 4th International Symposium on Calcium-Binding Proteins in Health and Disease. (1983. 5. 17. Trieste, Italy).

Ebashi, S: Ca^{2+} and the contractile proteins. 11th Congress of International Society for Heart Research, Ringer Centenary Symposium. (1983. 7. 14. South Kensington, London).

Ebashi, S: Mode of action of Ca ion on contractile elements. 29th Congress of Physiological Sciences, Excitation contraction coupling. (1983. 8. 30. Sydney, Australia).

Ebashi, S: Actin-linked Ca Regulation in Smooth Muscle. Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience. (1983. 11. 21. Kyoto, Japan).

《超微小形態生理部門》

亘 弘, 志賀 潔, 成瀬昭二, 堀川義治, 田中忠蔵, 平川公義, 横野 輪, 小栗頭二, 肥塚 泉, 高田宗春, 口脇博治, 蔭山直樹「TMRによる脳代謝の研究」 大阪大学蛋白質研究所セミナー『医学におけるNMRの利用』講演(1983. 2. 大阪).

亘 弘「NMRによる臓器代謝の計測」 第21回日本医学会総会生化学分科会『灌流を中心とした臓器機能の生理化学シンポジウム』講演. 同抄録集: 4 (1983. 大阪).

曾我美 勝, 長岡俊治, 恵良聖一, 亘 弘, 志賀 潔, 赤坂一之「 ^1H -NMRによる血漿結晶アルブミン構造転移の研究」 第60回日本生理学会大会講演(1983. 大阪).

二科安三, 志賀 潔, 亘 弘, 三浦 洸, 太田美穂, 三宅可浩, 東条博雅, 山野俊雄「フラビン酵素の中間体の共鳴ラマン分光法による研究」 第60回日本生理学会大会講演(1983. 大阪).

志賀 潔, 二科安三, 亘 弘, 「ビタミン B_2 (フラビン) 拮抗剤としてのクロールプロマジンについて」 フラビン酵素の中間体の共鳴ラマン分光法による研究. 第60回日本生理学会大会講演(1983. 大阪).

村上政隆, 亘 弘, 瀬尾芳輝, 中張隆司, 森 博彦, 道上巨松, 今井雄介「 ^{31}P -NMRによるpH測定の問題点について」 第60回日本生理学会大会講演(1983. 大阪).

亘 弘, 志賀, 二科安三, 成瀬昭二, 肥塚 泉, 高田宗春「ラット脳におけるエネルギー代謝の TMR による研究」 第60回日本生理学会大会講演 (1983. 大阪).

堀川義治, 成瀬昭二, 田中忠蔵, 平川公義, 西川弘恭, 亘 弘, 志賀 潔, 肥塚 泉「脳梗塞の in vivo ^{31}P -NMR」 第3回核磁気共鳴医学研究会大会講演, 同講演抄録集: 21 (1983. 仙台).

成瀬昭二, 堀川義治, 田中忠蔵, 平川公義, 西川弘恭, 亘 弘, 肥塚 泉, 志賀 潔「実験腫瘍の in vivo ^{31}P -NMR」 第3回核磁気共鳴医学研究会大会講演, 同講演抄録集: 16 (1983. 仙台).

加藤欣士郎, 里見 均, 伴 真二郎, 榊田喜三郎, 成瀬昭二, 堀川義治, 田中忠蔵, 西川弘恭, 亘 弘「in vivo ^{31}P -NMR による実験腫瘍の研究—瘍々の抗腫瘍剤の効果について—」 第3回核磁気共鳴医学研究会大会講演, 同講演抄録集: 12 (1983. 仙台).

上田 徹, 三宅英則, 小林 映, 安里令人, 米川康弘, 半田 肇, 亘 弘「TMR を用いた脳虚血の実験的研究」 第3回核磁気共鳴医学研究大会講演, 同講演抄録集: 23 (1983. 仙台).

高田宗春, 口脇博治, 平井長年, 三須憲雄, 池田 公, 石栗 仁, 蔭山直樹, 亘 弘「脳細障害性浮腫の組織代謝状態及び ^1H -縦緩和時間測定-TMR による in vivo における検討」 第3回核磁気共鳴医学研究大会講演, 同講演抄録集: 24 (1983. 仙台).

口脇博治, 高田宗春, 平井長年, 三須憲雄, 池田 公, 石栗 仁, 蔭山直樹, 亘 弘「脳梗塞形成初期の脳対処動態及び steroid hormone 投与の影響-TMR-32 による検討」 第3回核磁気共鳴医学研究会大会講演, 同講演抄録集: 25 (1983. 仙台).

亘 弘, 志賀 潔, 瀬尾芳輝, 吉崎和男, 西川弘恭, 森本武利, 村上政隆, 今井雄介「 ^{31}P -NMR による pH 測定の問題点について」 第3回核磁気共鳴医学研究会大会講演, 同講演抄録集: 52 (1983. 仙台).

常岡 豊, 楠岡英男, 井上通敏, 阿部 裕, 亘 弘「高時間分解核磁気共鳴に関する検討」 第3回核磁気共鳴医学研究大会講演, 同講演抄録集: 121 (1983. 仙台).

Uchizono, K., Ishikawa, M., Iriki, M., Inoue, S., Komoda, K., Nagasaki, H., Higashi, A. and Honda, K.: Determination of chemical nature of sleep-promoting substance. The

Congress of International Union of Physiological Sciences, Proceedings: 248 (1983. 8. Sidney).

Murakami, M. , Seo, Y. , Nakahari, T. , Michigami, M. , Mori, H. , Imai, Y. and Watari, H.: Phosphorus nuclear magnetic resonance of perfused salivary gland. The Congress of International Union of Physiological Sciences, Proceedings : 361 (1983. 8. Sidney).

Naruse, S. , Horikawa, Y. , Tanaka, C. , Higuchi, Ueda, S. , Hirakawa, K. , Nishikawa, H. and Watari, H.: In vivo ^{31}P -NMR studies on experimental tumors using topical magnetic resonance(TMR). The Congress of International Soc. Magn. Res. , Bull. Mag. Res. , 5: 272 (1983.8. Chicago).

Yokono, S. , Oguri, K. , Yokono, A. , Naruse, S. and Watari, H. : In vivo ^{31}P -NMR studies on dynamic changes of energy metabolites in rat brain during anoxia. The Congress of International Soc. Magn. Res. , Bull. Mag. Res. , 5: 274 (1983. 8. Chicago).

Hirakawa, K. , Naruse, S. ,Horikawa, Y. , Tanaka, C. ,Higuchi, T. , Nishikawa, H. and Watari, H. : In vivo ^{31}P -NMR studies on experimental cerebral infarction using topical magnetic resonance(TMR). The Congress of International Soc. Magn. Res. , Bull. Mag. Res. , 5: 192 (1983. 8. Chicago).

二科安三, 志賀 潔, 三浦 洸, 東条博雅, 太田美穂, 三宅可浩, 山野俊雄, 亘 弘「共鳴ラマン分光法による D- アミノ酸酸化酵素の紫色中間体の研究」. 第56回日本生化学会大会講演, 生化学 55(8): 927 (1983. 福岡).

東条博雅, 堀池喜八郎, 志賀 潔, 二科安三, 野崎光洋, 亘 弘, 山野俊雄「D- アミノ酸酸化酵素の解離会合平衡系のゲルクロマトグラフィーによる研究」. 第 5 6 回日本生物学会大会講演, 生化学 55(8): 927 (1983. 福岡).

下山雄平, 松木貴司, 亘 弘, 志賀 潔「スピラベル磷脂質配向膜の飽和移動ESR」. 第21回日本生物物理学会年会講演, 生物物理 23(Suppl.): S55 (1983. 岐阜).

長岡俊治, 恵良聖一, 曾我美勝, 志賀 潔, 亘 弘, 赤坂一之「 ^1H -NMR による結晶アルブミン構造転移の研究」. 第21回日本生物物理学会年会講演, 生物物理 23(Suppl.): S182 (1983. 岐阜).

折田義正, 中西 健, 堀尾 勝, 岡田倫之, 安東明夫, 亘 弘「TMRによる腎内のATP含量の観察(furosemide注入時)」, 第21回日本生物物理学会年会講演, 生物物理 23 (Suppl.): S190 (1983. 3. 岐阜).

《細胞内代謝部門》

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回神経科学学会学術集会(1983. 1. 京都).

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(GPR)とガストリンの放出動態」第6回神経科学学会学術集会(1983. 1. 京都).

須田光明, 中尾一和, 吉政孝明, 坂本 誠, 池田淑夫, 田中一成, 隠岐尚吾, 山本栄仁, 矢内原千鶴子, 矢内原 昇, 沼 正作, 井村裕夫「Leumorphin様免疫活性のヒトおよびブタの脳内分布について」第56回日本内分泌学会総会(1983. 5. 大阪).

松林 直, 山本栄仁, 矢内原千鶴子, 江川三生, 戸部広昭, 井村裕夫, 沼 正作, 矢内原 昇「ブタ Leumorphin の合成とその生物学的性質」第56回日本内分泌学会総会(1983. 5. 大阪).

星野 稔, 日置善雄, 矢内原千鶴子, 矢内原 昇「ヒト神経芽細胞腫培養細胞におけるVIPの合成と放出」第56回日本内分泌学会総会(1983. 5. 大阪).

石塚 仁, 矢内原千鶴子, 矢内原 昇, 千葉之宣, 今泉久男, 今野浩二, 小泉 勝, 豊田隆謙, 後藤由夫「STF Radioimmunoassay法による種々の検討」第56回日本内分泌学会総会(1983. 5. 大阪).

大久保正士, 岩原邦宏, 矢内原千鶴子, 岩永敏彦, 藤田恒夫, 兼子俊男, 矢内原 昇「GRP(ガストリン放出ペプチド)のラット組織内分布とその存在様式について」第56回日本内分泌学会総会(1983. 5. 大阪).

松本 智明, 吉田 恵子, 香川 昌平, 松岡 瑛, 矢内原千鶴子, 矢内原 昇「臍ラ氏島細胞単層培養系におけるグリセンチン様物質の放出」第56回日本内分泌学会秋季大会(1983. 11. 大阪).

深田修司, 中村公一, 赤井裕輝, 軒原清史, 矢内原千鶴子, 岩永敏彦, 藤田恒夫, 矢内原 昇
「ブタおよびラット組織 PHI と VIP の免疫化学的比較検討」第56回日本内分泌学会秋季大会
(1983. 11. 大阪).

須田光明, 中尾一和, 吉政孝明, 坂本 誠, 森井成人, 池田淑夫, 田中一成, 隠岐尚吾, 矢内原
千鶴子, 矢内原 昇, 井村裕夫「Leumorphin様免疫活性のヒト脳内分布について」第56回日本内
分泌学会秋季大会 (1983. 11. 大阪).

中村公一, 深田修司, 井口和明, 矢内原千鶴子, 入江 実, 矢内原 昇「CCK, VIP, PHI 様免疫
活性のブタ, ラットおよびヒトの脳内分布について」第56回日本内分泌学会秋季大会 (1983. 11.
大阪).

小林 繁, 矢内原 昇「ラットの副腎クロム親和細胞を支配する神経終末に含まれる
Met-enkephalin-Arg-Gly-Leu 様免疫活性」第7回神経科学学術集会 (1984. 1. 千葉).

井口和明, 矢内原千鶴子, 深田修司, 軒原清史, 矢内原 昇「PHI と VIP の組織内分布」第7回
神経科学学術集会 (1984. 1. 千葉).

星野 稔, 佐藤晴子, 鈴木利光, 矢内原 昇, 萩野晃一, 井口和明, 矢内原千鶴子「神経芽細胞
腫培養細胞の VIP-PHM 免疫活性の産生について」第7回神経科学学術集会 (1984. 1. 千葉).

中尾一和・須田光明, 坂本 誠, 吉政孝明, 森井成人, 池田淑夫, 矢内原千鶴子, 矢内原 昇,
井村裕夫「新しい内因性 Opioid Peptide である Leumorphin の同定」第7回神経科学学術集会
(1984. 1. 千葉).

星野 稔, 佐藤晴子, 鈴木利光, 矢内原 昇, 萩野晃一, 矢内原千鶴子「ヒト神経芽細胞腫培養
細胞における VIP-PHM の産生について」第61回日本生理学会大会 (1984. 3. 前橋).

桑原厚和, 安井章裕, 成瀬 達, 矢内原 昇「CCK の胃運動に及ぼす影響について」第61回日本
生理学会大会 (1984. 3. 前橋).

《生体膜部門》

Furuya, K. , Furuya, S. & Yamagishi, S.: Developments of membrane excitability and

intramembranous particles in neuroblastoma × glima hybrid cells. The 60th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, (1983. 4. Osaka).

Yamagishi, S. & Furuya, K. : Effects of intracellular divalent cations on Na channel and K channel activations of squid giant axons. The 60th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, (1983. 4. Osaka).

Fukumoto, T. , Tamakoshi, K. , Sugiyama, H. & Miyamoto, M.: Characterization of cell membrane antigens on rat hepatomas using monoclonal antibodies. The 5th International Congress of Immunology, (1983. 8. Kyoto).

八木沢仁, 山岸俊一, 杉山博之「小麦胚アグルチニン (WGA) によるムスカリン性アセチルコリン受容体サブクラス解析と部分精製」 第56回日本生化学会 (1983. 9. 福岡).

福本哲夫, 山下 昭, 玉腰勝敏, 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56回日本生化学会 (1983. 9. 福岡).

長宗秀明, 浦山 修, 原 論吉, 福島義博, 中尾 真, 杉山博之「腎 Na, K-ATPase に対するモノクローナル抗体 (I)」 第56回日本生化学会 (1983. 9. 福岡).

浦山 修, 長宗秀明, 中尾 真, 杉山博之, 佐藤かな子, 中尾順子「腎 Na, K-ATPase に対するモノクローナル抗体 (II)」 第56回日本生化学会 (1983. 9. 福岡).

広野 力「ニテラ原形質膜の興奮の遅れ時間」 電気生理談話会 (1983. 10. 京都).

山岸俊一, 古家喜四夫「神経膜 Na チャネル, K チャネルに対する細胞内 2 価イオンの作用」 日本生物物理学会第21回年会 (1983. 10. 8. 岐阜).

古家喜四夫, 山岸俊一「荷電ポリアミノ酸の K チャネルへの影響」 日本生物物理学会第21回年会 (1983. 10. 8. 岐阜).

Yagisawa, H. , Yamagishi, S. & Sugiyama, H.: Interaction of plant lectins with muscarinic acetylcholine receptors. International Symposium on Neurotransmitter Receptor Regulation, Interactions and Coupling to the Effectors, (1983. 10. Hiroshima).

《機能協関部門》

Watanabe, A. : Optical activity response of a stained nerve. 29th Congress of the International Union of Physiological Sciences (1983. 8. Sydney).

Terakawa, S. : Potential dependent of intracellular pressure in the squid giant axon. 29th Congress of the International Union of Physiological Sciences (1983. 8. Sydney).

渡辺 昭「神経興奮に伴う旋光性と複屈折性の変化」 第21回日本生物物理学会年会 (1983. 10. 岐阜).

寺川 進「興奮膜の厚みと膜電位」 第21回日本生物物理学会年会 (1983. 10. 岐阜).

木村能章, 池上 明, Stoeckenius, W. 「紫膜とローカルイオン」 第21回日本生物物理学会年会 (1983. 10. 岐阜).

中山 孝, 寺川 進「テトロドトキシン結合タンパク質の単離」 第26回日本神経化学学会年会 (1983. 11. 大阪).

Watanabe, A. : Optical activity signals recorded from nerve fibers. 9th Seiriken Conference (1983. 12. Okazaki).

Terakawa, S. : Potential-dependent changes in intracellular pressure of the squid giant axon. 9th Seiriken Conference (1983. 12. Okazaki).

渡辺 昭「光弾性モジュレータによる神経の旋光性シグナル」 第61回日本生理学会大会 (1984. 3. 前橋).

寺川 進「興奮性膜に対する繊維性蛋白の支持補強作用」 第61回日本生理学大会 (1984. 3. 前橋).

中山 孝, 寺川 進「テトロドトキシンを用いた Na チャネルの単離」 第61回日本生理大会 (1984. 3. 前橋).

《能 動 輸 送 部 門》

完倉孝子, 中尾 眞「ラット尿中 cAMP 及び cGMP 量に対する X 線全身照射の影響・続報」
生化学, 55: 621(1983).

神部芳則, 佐藤眞悟, 中尾 眞「赤血球膜のリン酸化と, Ca^{2+} , Mg-ATP 依存性形態変化」 生
化学, 55: 857(1983).

福島義博, 中尾 眞「輸送 ATPase のリン酸化中間体の加水分解に対する ATP の影響」 第56回
日本生化学大会 (1983, 9, 29-10, 2 福岡).

佐藤かな子, 藤谷知子, 田中健志, 眞崎知生, 浦山 修, 中尾順子, 中尾 眞「馬腎 ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)
ATPase のモノクロナール抗体」 生化学, : 902(1983).

長宗秀明, 浦山 修, 原 諭吉, 福島義博, 中尾 眞, 杉山博之「腎 Na, K-ATPase に対するモ
ノクロナール抗体(I)」 生化学, 55: 902(1983).

浦山 修, 長宗秀明, 中尾 眞, 杉山博之, 佐藤かな子, 中尾順子「腎 Na, K-ATPase に対する
モノクロナール抗体(II)」 生化学, 55: 902(1983).

藤谷知子, 中尾順子, 佐藤かな子, 浦山 修, 加潤いつ, 中尾 眞「腎 Na^+ , K^+ -ATPase のオ
リゴメリゼーションについて」 生化学, 55: 904(1983).

上野(伊藤)栄子, 佐藤眞悟, 神部芳則, 中尾 眞「赤血球における Band 3-ankyrin 結合の動的
状態について」 生化学55: 1010(1983).

佐藤眞悟, 神部芳則, 中尾 眞「赤血球におけるアクチンの状態解析」 生化学, 55: 1010(198
3).

神部芳則, 佐藤眞悟, 中尾順子, 中尾 眞, 月田早智子, 月田承一郎, 石川春律「赤血球膜の形
態変化および変形能に対するアンキリンの役割につて」 第36回日本細胞生物学会大会: 62(198
3).

太田英彦, 福本哲夫「ラット腎臓の Na, K-ATPase 標品に対するモノクローン抗体について」

第56回日本生化学会大会 (1983, 福岡).

《神 経 情 報 部 門》

金子章道, 立花政夫, A. T. Ishida 「単離した水平細胞に対する L-グルタミン酸の脱分極作用」
第60回日本生理学会大会 (1983, 4, 大阪).

立花政夫 「キンギョ網膜より単離培養した水平細胞の膜特性」 第60回日本生理学会大会 (1983,
4, 大阪).

大塚輝彌 「カメ網膜 L 型水平細胞の受容野の大きさと応答記録部位との対応」 第60回日本生理
学会大会 (1983, 4, 大阪).

安井湘三, 大塚輝彌 「光量がドット密度で変わる場合の網膜神経細胞の光応答」 第60回日本生
理学大会 (1983, 4, 大阪).

大塚輝彌 「カメ網膜 3 相性 C 型水平細胞の錐体入力の同定」 第30回中部生理学談話会 (1983,
10, 名古屋).

大塚輝彌 「カメ網膜 L 型水平細胞の軸索の形態と機能」 第 5 回日本動物生理学会大会 (1983,
11, 東京).

金子章道 「局所回路ニューロン」 第 3 回脳の動的神経機構シンポジウム (1984, 1, 千葉).

立花政夫, 金子章道 「異常整流を示す K-電流 (I_{anom}) に対する L-グルタミン酸 (L-Glu) の
作用」 第 7 回神経科学学術集会 (1984, 1, 千葉).

金子章道 「キンギョ網膜から単離・培養した双極細胞の電位依存性膜電流」 第61回日本生理学
会大会 (1984, 3, 前橋).

大塚輝彌 「カメ網膜の無色油滴を有する錐体の 2 種の色光応答」 第61回日本生理学会大会 (19
84, 3, 前橋).

立花政夫 「キンギョ網膜から単離培養した水平細胞のグルタミン酸応答」 第61回日本生理学会

大会 (1984, 3, 前橋).

《液 性 情 報 部 門》

小坂俊夫, 浜 清「硬骨魚類嗅球の細胞構築, 第4報ニューロパイルの解析」 第88回日本解剖学会総会 (1983年4月, 大阪).

K. Hama, S. Nakamura and T. Arii.: Observation on the T-system of skeletal and cardiac muscles in three dimensions using high voltage electron microscopy and Golgi black reaction. 39th Annual Meeting of the Japanese Society of Electron Microscopy (1983, 6. 名古屋).

浜 清, 小坂俊夫「ラット海馬歯状回の星状グリア細胞の立体観察」 第7回神経科学学術集会 (1984, 1, 千葉).

小坂俊夫「ラット海馬及び歯状回における局所回路ニューロン間の gap junction」 第7回神経科学学術集会 (1984, 1, 千葉).

《高 次 神 經 機 構 部 門》

Tsukahara, N. : "Cellular basis of classical conditioning mediated by the red nucleus in the cat" Neural Mechanisms of Conditioning, eds. by D. L. Alkon & C. D. Woody (1983).

Tsukahara, N. : "Sprouting and the neuronal basis of classical conditioning" Perspectives of Neuroscience, Tsukada Symposium. (1983).

村上富士夫, 勝丸博信, 塚原仲晃「赤核脊髄路細胞への GABA 作動性入力の免疫組織化学的研究」 第60回日本生理学会大会 (1983, 4, 大阪).

前田純, 村上富士夫, 塚原仲晃「三次元画像処理システムによる赤核細胞の形態計測」 第60回日本生理学会大会 (1983, 4, 大阪).

小田洋一, 宮坂信司, 一井雄二, 塚原仲晃「ネコの古典的条件付けにおける大脳-赤核シナプスの可塑的变化」 第60回日本生理学会大会 (1983, 4, 大阪).

村上富士夫「哺乳動物中枢神経系におけるシナプス結合の可塑性」 三菱化成生命科学研究, 記憶と学習の分子機構研究会 (1983, 7, 東京).

村上富士夫: "Synaptic plasticity in the central nervous system of mammals" International biophysical symposium for young scientists(1983. 10, 神戸).

窪田道典, 中村 真, 塚原伸晃 「赤核細胞の電気生理学的性質」第7回神経科学学会 (1984, 千葉).

川人光男, 塚原伸晃 「樹状突起スパインの形態変化とシナプス可塑性 (第二報)」 第7回神経科学学会 (1984, 千葉).

川人光男, 塚原伸晃 「膜の受動的性質が非一様な神経細胞モデル」 第61回日本生理学会大会 (1984, 3, 群馬).

塚原伸晃, 米森文彦 「大脳一赤核シナプス伝達の長短増強と cAMP による遅延性電位」 第61回日本生理学会大会 (1984, 3, 群馬).

窪田道典, 中村 真, 塚原伸晃 「赤核細胞におけるイオンコンダクタンス」 第61回日本生理学会大会 (1984, 3, 群馬).

谷口郁雄 「キクガシラコウモリの発声系と聴覚系の連関」 第60回日本生理学会大会 (1983, 4, 大阪).

《情報記憶部門》

Yawo, H. and Kuno, M. (1983) Mechanism of the conduction failure in degenerating giant axons of the cockroach. *Neurosci. Lett. Suppl.* 13: 256 (京都).

Yawo, H. and Kuno, M. (1983) Tests of a calcium hypothesis for Wallerian degeneration. *J. Physiol. Soc. Japan* 45: 399 (大阪).

Miyata, : Effects of partial denervation on synapse elimination during postnatal development of rats. *Neurosci. Lett. Suppl.* 13: 39(1983, 京都).

《高次液性調節部門》

L. Lénárd, 大村 裕, 栗生修司, 西野仁雄, 南 武嗣, 三崎久好, 井之口昭, 「Activity of catecholamine-sensitive neurons in monkey lateral hypothalamus during operant feeding behavior」 第30回生理学中部談話会 (1983, 10, 名古屋).

栗生修司, 大村 裕, 西野仁雄, L. Lénárd, 井之口昭「摂食行動時の視床下部一前頭眼窩野神経情報処理とオペエート」 第30回生理学中部談話会 (1983, 10, 名古屋).

中野保彦, 大村 裕, 栗生修司, 西野仁雄, 山本智矢, L. Lénárd「オペラント摂食行動時のサル扁桃体ニューロン活動と関連する生理活性物質」 第30回生理学中部談話会 (1983, 10, 名古屋).

山本智矢, 大村 裕, 西野仁雄, 栗生修司, 中野保彦「自発発声に始まるオペラント摂食時のサル前頭眼窩野ニューロン活動」 第30回生理学中部談話会 (1983, 10, 名古屋).

栗生修司, 大村 裕, 西野仁雄, L. Lénárd「サルの摂食行動時の神経情報処理とオペエート」 第4回肥満研究会 (1983, 12, 大阪).

栗生修司, C. D. Woody, 大村 裕, 西野仁雄, L. Lénárd「無麻酔サル運動野ニューロンの視床下部刺激に対する応答性」 第7回神経科学学術集会 (1984, 1, 千葉).

堀 哲郎, 清原壽一, 大村 裕, 西野仁雄, 栗生修司「サルの体温調節行動および摂食行動時の前頭眼窩野ニューロン活動」 第7回神経科学学術集会 (1984, 1, 千葉).

中野保彦, L. Lénárd, 大村 裕, 栗生修司, 山本智矢「サル扁桃体ニューロンの薬物感受性及びレバー押し摂食行動時の神経活動様式」 第7回神経科学学術集会 (1984, 1, 千葉).

山本智矢, 大村 裕, 西野仁雄, 栗生修司, 中野保彦「レバー押し摂食課題の開始要因とサル前頭眼窩野ニューロン活動」 第7回神経科学学術集会 (1984, 1, 千葉).

古賀知行, 石川友衛, 宮澤多恵子, 栗生修司, 大村 裕, 西野仁雄「摂食および回避条件行動下でのサル前頭眼窩野ニューロンの識別関連応答」 第7回神経科学学術集会 (1984, 1, 千葉).

大村 裕, 西野仁雄, 栗生修司, L. Lénárd「サル視床下部オビエート感受性ニューロンの摂食行動時の役割」 第61回日本生理学会大会 (1984, 4, 前橋).

栗生修司, 大村 裕, 吉松博信「オスザル内側視索前野ニューロンのメスに対する応答性」 第61回日本生理学大会 (1984, 4, 前橋).

中野保彦, 大村 裕, 栗生修司, 西野仁雄, 山本智矢, L. Lénárd「サル扁桃体ニューロンの薬物感受性とその摂食行動における意義」 第61回日本生理学会大会 (1984, 4, 前橋).

山本智矢, 大村 裕, 西野仁雄, 栗生修司, 中野保彦「自発的発声に始まる摂食課題とサル前頭眼窩野ニューロン活動」 第61回日本生理学会大会 (1984, 4, 前橋).

堀 哲郎, 清原壽一, 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視床前野ニューロン活動」 第61回日本生理学会大会 (1984, 4, 前橋).

Oomura, Y.: General involvement of enteroceptors in motor, homeostatic and behavior regulations. French Japanese Joint Seminar. (1983, 4. Marseille, France).

Oomura, Y.: Chemosensitive neurons in the nucleus tractus solitarius(NTS). Eighth International Conference on the Physiology of Food and Fluid Intake. (1983, 8. Melbourne, Australia).

Oomura, Y., Aou, S., Lénárd, L., Nishino, H., Minami, T. and Misaki, H.: Lateral hypothalamic activity during monkey's feeding behavior and effects of iontophoretically applied chemicals. XXXIXth Congress of the International Union of Physiological Sciences. (1983, 8. Sydney, Australia).

Oomura, Y., Aou, S., Lénárd, L., Nishino, H., Minami, T. and Misaki, H.: Lateral hypothalamic activity during monkey's feeding behavior and effects of iontophoretically applied chemicals. Fourth International Congress on Obesity. (1983, 10. New York, U.S.A.).

Oomura, Y.: Hypothalamic neuronal activity during sexual behavior in male monkey. 4th European Winter Conference on Brain Research. (1984, 3. Courchevel, France).

Oomura, Y.: Appetite and chemical regulation. 第4回国際セミナー “糖尿病と栄養—とくに東

南アジア，太平洋地域糖尿病の病因としての栄養，環境因子の糖尿病の疫学，病因と生活環境因子” (1983, 11. 神戸).

《組織培養標本室》

古家園子，東田陽博「NG108-15 雑種細胞内の [^3H] セロトニンの局在」，第26回日本神経化学会 (1983, 大阪).

《超高压電子顕微鏡室》

松田 強，有井達夫，遠藤潤二，長我部信行，外村 彰「走磁性細菌内磁性体微粒子の高分解能観察」 第39回日本電子顕微鏡学会講演 (1983, 5, 31, 名古屋).

浜 清，中村栄男，有井達夫「Golgi 変法による横紋筋 T-tubules 超高压電子顕微鏡立体観察」 第39回日本電子顕微鏡学会講演 (1983, 6, 2, 名古屋).

有井達夫「ローレンツ電顕法による菱形十二面体鉄微粒子の磁化分布」 日本物理学会 1983 年秋の分科会講演 (1983, 10, 13, 岡山).

《動物実験施設》

権田辰夫，沖 充，遠藤昭穂，尾崎 毅「無神経節腸管とペプチド性神経」 第1回消化器臓器相関研究会 (1983, 8, 京都).

権田辰夫，沖 充，尾崎 毅「無神経節腸管とペプチド (Substance P, Enkephalin, VIP) 性神経について」 第25回日本平滑筋学会 (1983, 5, 山梨).

長浜真人，浜 清，尾崎 毅，福田芳郎「先天性 aganglionosis ラット腸管の Auerback 神経叢の病理組織学的研究」 第73回日本病理学会 (1984, 4, 東京).

【 共 同 研 究 報 告 】

共同研究報告

〔目 次〕

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 (曾我美勝他)	165
平滑筋におけるエネルギー代謝分析への ³¹ P 核磁気共鳴の応用 (富田忠雄他)	166
生体膜系酸化還元酸素の構造と機能に関する 分子生理学的研究 (三宅可浩他)	167
In vivo ³¹ P-NMR による生体脳および腫瘍の エネルギー代謝の研究 (成瀬昭二他)	170
NMR による唾液腺の磷代謝の研究 (今井雄介他)	171
¹ H-NMR による水晶体、角膜、硝子体などの水および 蚕白質の研究 (早野三郎他)	172
心筋内高エネルギー磷酸の代謝に関する研究 (井上通敏他)	174
核磁気共鳴法による心筋内磷代謝と収縮能との 連関の解析 (豊岡照彦他)	177
摘出臓器の灌流実験の際の磷代謝について (亘 弘他)	178
脳内活性物質と針麻酔の関連性についての研究 (森 和他)	179
小腸および大腸の蠕動に対するエンケファリンの 生理的役割 (横山正松他)	180
生体膜のゆらぎと動的構造 (下山雄平他)	181
鳥類ペプチドの生理学的研究 (矢内原昇他)	183
鳥類光周反応の根底にある視床下部興奮性の概日リズムと その特性 (本間運隆)	183
鳥類の視床下部における各種神経ペプチドの分布に関する免疫組織 化学的研究 (見上晋一)	184
カエル皮膚活性ペプチドと哺乳動物神経ペプチドの 相関性 (矢内原昇他)	185
細胞内酵素基質の合成と基質特異性 (金岡祐一他)	186

酵素-基質相互作用研究への新しいアプローチ ―トリプシンおよび 関連酵素の“逆性基質”に関する研究― (金岡祐一)	187
マボヤの受精に関するプロテアーゼ類 (石井信一)	187
プレペプシノーゲンおよびプレプロキモシンのシグナルペプチドの アミノ酸配列順序 (高橋健治)	188
音刺激受容の分子機構 (柳沢慧二他)	189
Tbイオンの興奮膜に対する作用 (西江 弘他)	190
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 (池沢宏郎他)	191
グラヤノトキシンによる Gate 電流の抑制 (井上 勲他)	192
白鼠上頸部交感神経節のシナプス伝達機能と環状ヌクレオチド 生成系の関連性 (永田 豊他)	193
細胞膜受容体分子の単クローン性抗体による解析 (報告、3) (福本哲夫他)	194
高張耐性細胞の膜機能に関する研究 (佐藤温重他)	195
^{31}P -NMR による赤血球膜リン脂質の状態解析 (佐藤真悟他)	196
Na, K-ATPase に対する高親和性モノクローナル抗体 (浦山 修他)	197
ベンゾキノン処理プレートへの Na, K-ATPase のカップリング (浦山 修)	197
孵化直後のヤリイカ神経細胞の培養 (福田 潤他)	198
イカ巨大神経の静止膜電位に対する表面電位の 寄与の検討 (三宅教尚他)	199
興奮性膜における多面性リガンドの結合とその作用 (平野 寛他)	200
神経毒を用いた神経興奮発生機構解明のための薬理学的研究 (瀬山一正他)	201
神経膜および細胞骨格の活動を制御するCaイオンと 関連物質 (山岸俊一他)	202
HRP 電顕法による網膜神経回路の解析 (金子章道他)	204
脊椎動物網膜の視細胞とC型水平細胞のシナプス結合 (大塚輝彌他)	205

内耳有毛細胞に於けるアミノ配糖体の作用部位の探索 (吉岡 亨)	207
聴前庭器感覚上皮における細胞間連絡の研究 (古河太郎)	207
筋細胞における細胞骨格および筋原線維の分化 (嶋田 裕)	208
条件付学習哺乳動物の赤核におけるシナプスの可塑性 (小田洋一他)	208
脳切片標本による視覚中枢の可塑性の研究 (外山敬介他)	209
聴覚中枢の可塑性の研究 (橋本 亨他)	211
筋感覚神経細胞に対する神経成長因子の効果 (久野 宗他)	212
高次感覚器における受容細胞・求心神経間の伝達物質：HPLC による分析 (小原昭作他)	213
モルモット単一心房筋細胞のイオン電流 (飯島俊彦他)	216
単一チャネル電流記録法を用いた神経細胞膜のA電流の解析 (河西春郎他)	217
軟体動物歯舌筋運動の制御機構—特に中枢神経節細胞の電気生理的 性質について (小林 惇他)	218
心筋細胞内pH低下の膜電流への影響 (今永一成)	219
サルのパー押し行動による環境温及び体温認知の脳内機構—体温調節 行動及び摂食行動時の視束前野ニューロン反応— (堀 哲郎他)	219
慢性オペラント摂食条件付けサルにおける化学感受性ニューロン及び カテコラミン行動系の役割—扁桃体における摂食調節— (中野保彦他)	221
細胞内灌流法による心筋及び神経節細胞膜電流の比較 (野間昭典他)	222
陽性および陰性条件刺激による摂食行動の研究 (石川友衛他)	223
延髄腹側部の化学感受性領野ニューロン活動に及ぼす 筋ポリモーダル受容器入力の影響 (熊澤孝朗他)	225

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・桑田一夫（岐阜大・医）

亘 弘・志賀 潔（生理研）・赤坂一之（京都大・理）

ウシ血漿アルブミン（BPA）は酸性側において N-F 転移（pD4.15～4.90），酸膨潤（F-E, pD3.0～4.0），中性域で N-B 転移（pD7.4～9.4）を示す。¹H-NMR(360MHz)を用い，N，F，E，B 型の構造，ゲル化について研究した。

(1) 蛋白質濃度，ゲル化の NMR スペクトルに対する影響——plasma protease を含まぬウシメルカプトアルブミン（BMA）を用い，N 型（pD5.32, 0.97～4.84%），F 型（pD4.03, 2.42～11.77%）のスペクトルを比較したが，濃度効果は僅少であった。plasma protease を含む BPA の F 型は CYS-390 と 435 の間のペプチド鎖が 1～2 箇所加水分解され BPA* と呼ばれる構造になり，F 型 BMA がゲル化しない 8.0, 8.96, 10.08, 11.20, 11.87% において F 型 BPA* はゲル化し，CH₃, HIS に対応したピークに変化が出る。T₁(HDO, SEC) は，ゲル化により，鎖状高分子のゲルと異なり，表(1)のようになる。スピン拡散測定より求めた交叉緩和時間，T_{is} は BPA* ゲル（8.

（表—1）T₁ (SEC) と T_{is} (SEC, HDO より—7.18 ppm, $\gamma H_2 / 2\pi \sim 107\text{Hz}$ 照射)

	8.00%	8.96%	10.08%	11.20%	11.87%
T ₁ (HDO, F 型 BPA* ゲル)	1.89	1.71	1.70	—	1.64
T _{is} (HDO, F 型 BPA* ゲル)	1.59	1.33	—	—	0.87
T ₁ (HDO, F 型 BMA 溶液)	6.94	6.49	6.00	5.59	—

96%) で 1.33SEC であり，BPA* ゲルの CH₃, LYS の T_{is} にほぼ等しい。BPA* (pD7.30, 0.87%) の ¹H-NMR スペクトルは，HIS をのぞいて F 型スペクトルに近い。また，電気泳動的にも，BPA* は pH4.8 において F 型的である。

(2) 構造転移による T_{is} の変化——HDO より—7.18ppm を照射したスピン拡散測定の結果を表—2 に示してある。T_{is} (N 型) ～T_{is} (B 型) で N 型，B 型のスピン拡散に差がない。すなわ

（表—2）T_{is} (SEC, HDO より—7.18 ppm, $\gamma H_2 / 2\pi \sim 107\text{Hz}$ 照射)

	—CH ₃	LYS	AROM	HDO
N 型 (BMA, pD 5.32)	0.53	0.79	0.44	—
F 型 (BMA, pD 4.03)	1.49	2.22	0.68	—
E 型 (BMA, pD 3.02)	2.94	4.35	0.90	—
F 型 (BPA* ゲル, 11.87%)	2.13	1.43	0.72	0.87
N 型 (IA-BPA, pD 6.67)	0.60	0.86	0.54	—
B 型 (IA-BPA, pD 9.34)	0.70	0.86	0.53	—

ち，ほぼ同じかたさである。T_{is} (N 型) < T_{is} (F 型) で，N 型が F 型より，かたいことを示唆し

ている。表—2のIA-BPAはSH基をヨードアセトアミドでブロックしたBPAである。HDOより2.40ppm(AROM), $\gamma H_2/2\pi \sim 69\text{Hz}$ で照射して求めたN型, F型の T_{1s} にも表—2と同様の差があった。

平滑筋におけるエネルギー代謝分析への ^{31}P 核磁気共鳴の応用

富田忠雄・高井 章(名古屋大・医) 亘 弘(生理研)

平滑筋における代謝と収縮機構の関係を調べる研究の一環として, 高エネルギー磷酸の濃度変化を ^{31}P 核磁気共鳴法によって経時的に測定する実験をモルモットの結腸紐を用いて行なった。初期の実験ではモルモット30~50匹から得た3~5gの結腸紐を径30mmの試料管に取り付けて ^{31}P 核磁気共鳴のスペクトルを観察したが, その後経験をつみ, 10~15匹からの標本(1~1.5g)でも, 径15mmの試料管を用いて明確なスペクトルが得られ, かならずしも標本の量を多くすることが良い結果につながらないことが明らかになった。しかし, まだ creatine phosphate(CrP), ATPおよび無機磷(Pi)の量は実験毎にかなりな差異がみられる。この理由は, この平滑筋の正常液中での酸素消費が $0.5\mu\text{moles}/\text{min}/\text{g}$ 以上であり, 灌流液の酸素溶解度から考えても, 標本の量が多くなると酸素欠乏の状態になり易いためと考えられる。

10mg程度の標本を用いた収縮反応についての実験ではグルコース除去で減弱した収縮は数時間後であってもグルコース再投与によって非常に良く回復し, この場合 luciferin-luciferase 法で求めた生化学的分析による高エネルギー磷酸の組織内濃度の変化とよく一致する結果が得られた。しかしながら, NMRでの実験ではグルコースの再投与によって高エネルギー磷酸量の回復が明確にみられない場合が多い。これらの違いも, 酸素補給の差に基づいている可能性が考えられ, 今後さらに標本の量を少なくし, 灌流速度を増し, 常に理想的な条件下で代謝活動が調べられるように改善する必要がある。現在までに行なった実験の中で, 良い条件で得られたと思われる結果を集約すれば次のようなことが結論される。1) 1g程度の標本量であれば4分間の積算であっても, 150mgで10.5時間のもの(Vogel達: Biosci. Rep. 3, 863, 1983)に匹敵したスペクトルが得られる。2) 正常状態では Pi は検出できない程低濃度である。またCrPと Pi の濃度には相逆関があり, Pi 量から標本の状態が推測できる。3) CrP/ATPの比は約1.5であり, 骨格筋でみられている程大きくはない。4) ATPの β と γ スペクトル峰の面積比はほぼ等しく, 遊離ADP濃度はATPに比しかなり低いといえる。5) 代謝阻害で高エネルギー磷酸が減少するときにはまずCrPが消失した後でATPが減少し始める。6) このとき, Pi のスペクトルは4.6から4.2ppm程度に移動し, 細胞内pHが酸性に傾くことを示している。

生体膜系酸化還元酵素の構造と機能に関する分子生理学的研究

三宅可浩・三浦 洌・坂元寛志（国立循環器病センター研）

堀池喜八郎（滋賀医大），東城博雅・藤井 茂・山野俊雄（大阪大・医）

志賀 潔・亘 弘（生理研）

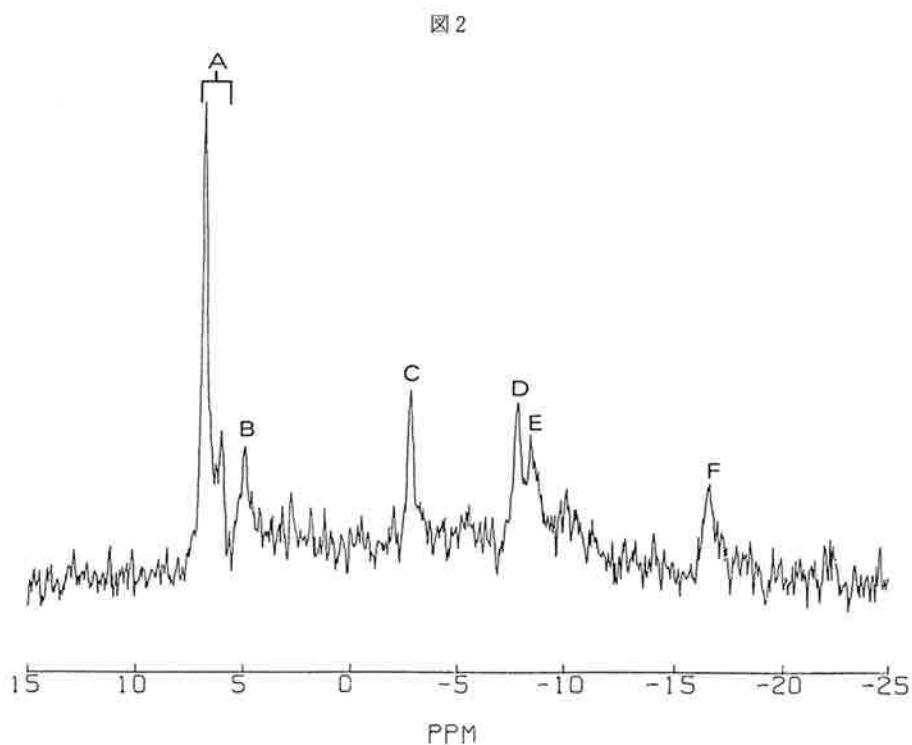
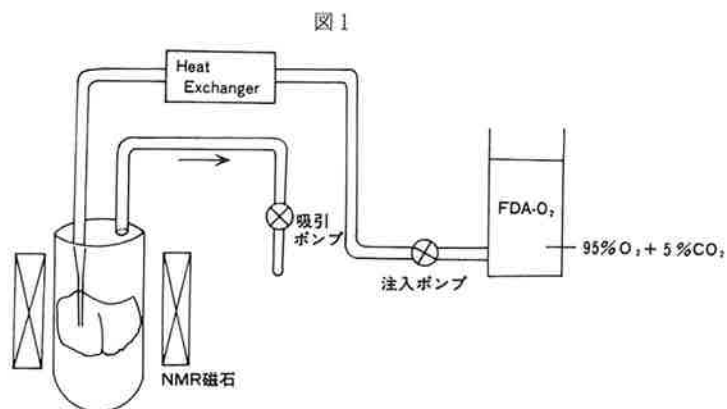
生体膜系酸化還元酵素として、D-アミノ酸酸化酵素、及び、チトクロームP-450系酵素を中心として研究を行った。豚腎皮質を材料とし、ペルオキシゾーム局在性のD-アミノ酸酸化酵素について、反応中間体である「紫色中間体」の構造を共鳴ラマン法を用いて検討した。紫色中間体は長波長領域にcharge transfer(CT)に由来する幅広い吸収帯を示すが、この吸収帯を励起した共鳴ラマンスペクトルではいくつかの特徴のあるラマン線が観察され、これらの帰属を補酵素FAD、及び、基質として用いたD-アラニン、D-プロリンの重原子(^2H , ^{13}C , ^{15}N)置換体を用いて調べ、ラマン線の同位体シフトなどから、本酵素のセミキノン型とは著しく異り、還元型フラビンに由来する $\text{C}(10a) = \text{C}(4a) - \text{C}(4) = 0$ の領域に関係した振動モードに属するラマン線が得られること、また、基質中間体であるイミノ酸の CO_2^- 基の振動モードに属するラマン線の同位体シフトが得られた。これらの結果から、紫色中間体はイミノ酸と還元型フラビンのCT複合体であり、還元型フラビンの $\text{C}(10a) = \text{C}(4a) - \text{C}(4) = 0$ 部分とイミノ酸の $\text{N} = \text{C} - \text{CO}_2^-$ 部分の間で相互作用があり、イミノ酸の CO_2^- 基が酵素蛋白のアミノ酸残基とプロトンを通じて相互作用していることが判明した。本酵素に関して、従来提案されている単量体-2量体平衡のみでなく、さらに大きい重合度の分子種が関与する平衡系の存在することも示唆した。

副腎皮質ミトコンドリアに局在するチトクロームP-450_{11 β} 系については酵素系の再構成を行い、この系によって、ステロイドの11 β 、18位のほかに、19位が水酸化され、新しいステロイド（18, 19-ジヒドロキシデオキシコルチコステロン）を生成することが見出された。また、この生成物の構造決定を行い同定した。

表1

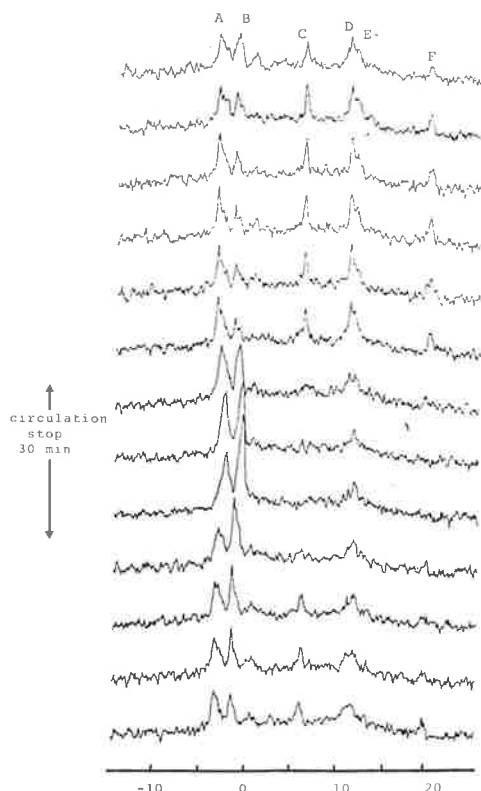
Fluosol-DA 20%	W/V%
Perfluorodecalin	14.0
Perfluorotripropylamine	6.0
Pluronic F-68	2.7
Yolk phospholipids	0.4
Glycerol	0.8
NaCl	0.600
KCl	0.034
MgCl ₂	0.020
CaCl ₂	0.028
NaHCO ₃	0.210
Glucose	0.180
Hydroxyethylstarch	3.0

pH: 7.4 (95%O₂ + 5%CO₂)



Assignment of ^{31}P -NMR spectrum of perfused mouse liver.
 Sugar phosphates and AMP(A), inorganic phosphate(B), γ -ATP
 and β -ADP(C), α -ATP and α -ADP(D), NAD^+ and NADH (E), β -
 -ATP(F).

図 3



Metabolic changes induced by cessation of perfusion.

By a transient cessation for 30 min, ATP and ADP peaks decreased.

These changes were observed 5 min after the cessation of perfusion.

After restarting perfusion, ATP levels were regained.

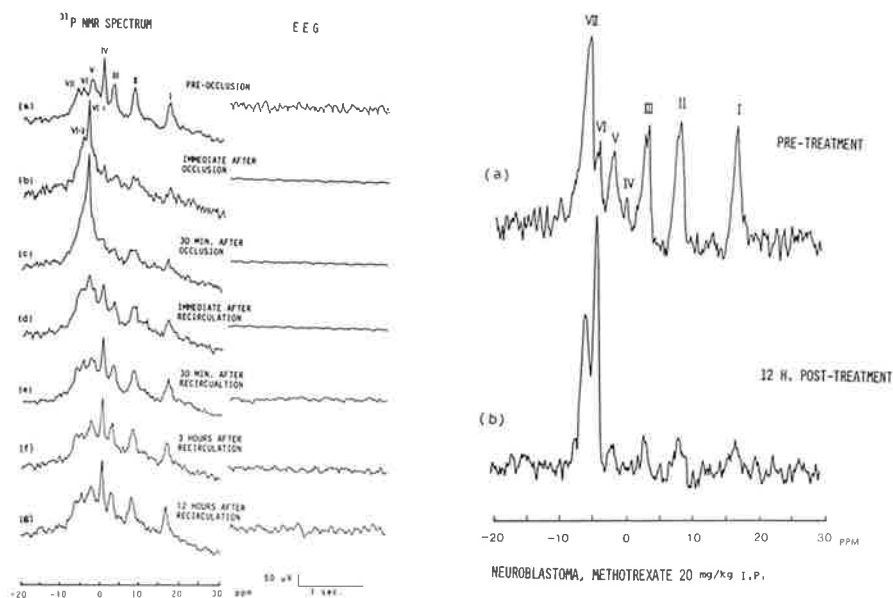
1. Nishina, Y., Shiga, K., Miura, R., Tojo, H., Ohta, M., Miyake, Y., Yamano, T., and Watari, H.(1983) On the structures of flavoprotein D-amino acid oxidase purple intermediates. A resonance Raman study. *J. Biochem.*, **94** : 6-1979.
2. Miura, R., Nishina, Y., Ohta, M., Tojo, H., Shiga, K., Watari, H., Yamano, T., and Miyake, Y.(1983) Resonance Raman study on the flavin in the purple intermediates of D-amino acid oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **111** : 3-588.
3. Tojo, H., Horiike, K., Shiga, K., Nishina, Y., Nozaki, M., Watari, H., and Yamano, T.(1984) Gel chromatographic evidence for the participation of the higher polymers in the self-association system of a flavoenzyme D-amino acid oxidase. *J. Biochem.*, **95** : 1-1.
4. Momoi, K., Okamoto, M., Fujii, S., Kim, C.Y., Miyake, Y., and Yamano, T. (1983) 19-Hydroxylation of 18-hydroxy-11-deoxycorticosterone catalyzed by cytochrome P-450_{11β} of bovine adrenocortex. *J. Biol. Chem.*, **258** : 14-8855.

In vivo ^{31}P -NMR による生体脳および腫瘍のエネルギー代謝の研究

成瀬昭二・堀川義治・田中忠蔵・平川公義・西川弘恭（京都府立医大）

亘 弘（生理研）

虚血脳及び腫瘍の in vivo ^{31}P -NMR spectrum を経時的に得て組織のエネルギー代謝を観察した。各種治療薬剤の効果もエネルギー代謝の面から検討した。（方法）脳虚血モデルはラット主幹4動脈閉塞モデルを用いた。血流再開は両側総頸動脈の結紮解除により行なった。同時に脳波も記録した。腫瘍モデルとしてラット glioma, ヒト glioblastoma, neuroblastoma, 肺癌等をラットあるいはハムスターの腰部皮下に移植したものをを用いた。in vivo ^{31}P -NMR は TMR 法ならびに surface coil 法で行なった。脳虚血治療剤として Fluosol-DA(PFC)20mg/kg, Glycerol 20mg/kg を静脈内投与し、抗腫瘍剤として MTX, Vincristin 等の LD_{50} 相当量を静脈内投与した。（結果）正常ラット脳の ^{31}P -NMR spectrum では ATP, PCr, Pi, phosphodiester, sugar phosphate 等の peak が認められた。虚血後直ちに Pi が増加し ATP, PCr が減少した。脳波は平坦化した。Pi の化学シフトから脳組織の酸性化が示された。30分間虚血例では血流再開後 spectrum は直ちに回復したが脳波の回復は遅れ約12時間後に正常に復した。60分間虚血例では半数で、120分間虚血例では全例で血流再開後も spectrum は回復しなかった。虚血前に PFC を投与しておくとも120分間虚血でも全例で spectrum は回復し、血流再開前に更に Glycerol を投与すると240分間の虚血でも80%で spectrum は一時回復を示した。腫瘍の ^{31}P -NMR spectrum は脳のそれとは異なり、



腫瘍の種類を問わず PCr が小さく sugar phosphate が大きな形を呈した。組織 pH も酸性に傾き嫌氣的解糖系によるエネルギー代謝が主であると思われた。抗腫瘍剤を投与すると10時間前後で Pi が増加し ATP が減少した。この時腫瘍に組織学的変化はみられず、他の組織例えば筋肉の spectrum には何ら変化はみられなかった。この事は薬剤の作用機序から考え、腫瘍細胞への薬剤の直接効果に起因すると思われた。以上 in vivo ^{31}P -NMR spectrum のエネルギー代謝研究での有用性が確認されたが、分解能、定量性については今だ問題があり、また他核種への応用等今後の研究に期待される所が大きい。

1. 成瀬昭二, 堀川義治, 田中忠蔵, 平川公義, 西川弘恭, 肥塚泉, 高田宗春, 亘弘 (1983) Topical Magnetic Resonance (TMR) による虚血脳のエネルギー代謝の研究——虚血時および再開通時のリン化合物の経時的変化——脳神経, 35: 603-609.
2. Naruse S., Horikawa Y., Tanaka C., Hirakawa K., Nishikawa H. and Watari H. (1984): In vivo measurement of energy metabolism and the concomitant monitoring of electroencephalogram in experimental ischemia. Brain Res (in press).

NMR による唾液腺の燐代謝の研究

今井雄介・村上政隆・森 博彦・中張隆司 (大阪医大・医)
瀬尾芳輝 (京府医大・医) 亘 弘 (生理研)

生体は上皮膜輸送により、外界との物質交流を行いこれは唾液腺、腎、腸などにおける分泌吸収現象として、研究されてきた。なかでも唾液腺はその分泌機能（上皮膜輸送の輸送能）の評価を分泌される唾液量の秤量のみで簡単に行えるため、上皮膜輸送のモデル臓器として、膜輸送研究者の材料となってきた。唾液腺での水輸送の本態はイオン能動輸送に伴う浸透流であり、刺激により受動的なイオンの運搬と水の輸送がおり、この受動的なイオン輸送は $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase により ATP が分解されるときに形成されるポテンシャル勾配によって駆動される。これまで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亢進することを報告してきたが、ATPase が作動する局面でイオン輸送を理解するためにはエネルギー代謝燐化合物 (ATP, ADP, クレアチン燐酸) の種々の条件下での動態を経時的に明らかにする必要がある。

本共同研究では無侵襲計測法である ^{31}P -NMR 法によりイヌ顎下腺を口径 30 μm の試料管に設置して灌流を行いつつ、静止における、およびアセチルコリン投与による分泌刺激時における腺組織の燐化合物の変化および pH を測定すると同時に分泌唾液を装置外に導き分泌量をもモニターした。その結果、分泌に対応して ATP は約 50% 減少、クレアチン燐酸 (CP) は約 70% 減少し、ADP と P_i は増加し、また pH は一過性に約 0.4 pH 単位低下した。分泌終了後燐化合物、

pHは静止レベルへ復帰し、ローマン反応が関与することが明らかになった。さらに、灌流液の Na^+ を完全に Li^+ で置換した灌流実験を行うと腺組織中のATPおよびCPのレベルは静止時においてもアセチルコリン刺激時においても減少しなかった。この Li^+ 灌流時のアセチルコリン刺激では、唾液分泌は一回目に少量見られるのみで二回目以降は極く少量であった。この結果より、分泌に際しては Na^+ イオンが必須であり、 Na^+ を Li^+ に完全置換するとATP、CPの消費が抑制されATPaseの不活性化が起っていることが明らかになった。これらの実験系は 25°C Krebs Ringerによる定流灌流条件 (in vitro) であったが局所核磁気共鳴法 (TMR法) を用い、in vivo 条件で分泌時の燐化合物およびpHの変化を測定すると、CP減少 P_i の増加と酸性側へのシフトが見られ、in vitro 条件と同様の結果が得られ、in vitro 条件での結果が酸素供給不足による人工的な変化ではなく、分泌現象に伴う生理学的な変化であることが明らかになった。

〔発表論文〕

- 1) M. Murakami, Y. Imai, Y. Seo, T. Morimoto, K. Shiga and H. Watari (1983) Phosphorus nuclear magnetic resonance of perfused salivary gland. *Biochim. Biophys. Acta.*, **762**: 19-24.
- 2) M. Murakami, Y. Seo, T. Nakahari, H. Mori, Y. Imai and H. Watari (1984) Effect of Na^+ depletion on fluid secretion and on levels of ATP and creatine phosphate in the perfused canine salivary gland using ^{31}P -NMR. In: *Secretion: Mechanism and Control*, (ed) Case, R. M., Lingard, J. M. and Young, J. A. Manchester Univ. Press., Manchester.: 17-21.
- 3) Seo, Y., Murakami, M., Watari, H., Imai, Y., Yoshizaki, K., Nishikawa, H. and Morimoto, T. (1983) Intracellular pH determination by a ^{31}P -NMR technique. The second dissociation constant of phosphoric acid in a biological system. *J. Biochem.*, **94**: 729-734.

^1H -NMRによる水晶体、角膜、硝子体などの水および蛋白質の研究

早野三郎・天野 肇・河合憲司・高橋捷允（岐阜大・医）曾我美勝・長岡俊治・
 恵良聖一・桑田一夫（岐阜大・医）亘 弘・志賀 潔（生理研）

水晶体、硝子体、角膜などの水構造研究のモデル系として、蛋白質ゲル、ソフトコンタクトレンズ (SCL) を用い、水構造について 360MHz ^1H -NMR を用いて研究した。

(1) 蛋白質ゲル中の水構造——市販ウシ血漿アルブミン (BPA) は微量の plasma protease を含み、pH3.7~3.8 で1~2個所ペプチド鎖が切断され、BPA*と呼ばれる構造になる。8%以上の濃度の場合に、BPA*は透明なゲル状態になる。 D_2O 中でBPA*ゲルを作製し、ゲル中のHD-

Oの縦緩和時間 (T_1), スピン拡散より求める交叉緩和時間 (T_{is}) を測定した。HDO シグナルは 4.74ppm (3-trimethyl silyl propionate- d_4 , TSP 基準) で, 自由水と同一位置に観測されるが, スペクトル巾は溶液状態の時に比し大きい。D₂O 中の T_1 (HDO) は14.8秒であるが, ゲル状態 (8.0% BPA*) の T_1 (HDO) は1.89秒であった。スピン拡散 ($\gamma H_2/2\pi \sim 69\text{Hz}$, 7.14ppm 照射) より求めた T_{is} (HDO) は1.96秒で, 蛋白質側鎖の T_{is} とほぼ同値 (2.17秒) で, 蛋白質よりHDOへかなりスピン拡散をしている (図1 参照)。

(2) ソフトコンタクトレンズ (SCL) 内の水構造——NMR5mm ϕ 試料管を用い, 円柱 (4.8 $\times$ 20 mm) で中心部にロック用 D₂O 毛細管挿入用縦穴を持つ T. Y 社 HEMA 系 SCL (3 種類, #1, #2, #3) 内の水構造を調べた。円柱状 SCL を保存液 (生理食塩水, H₂O) 中より取り出し, 軽く表面の H₂O をキムワイプを用いてとり, NMR 試料管に挿入した (軽水処理 SCL)。また, 軽く H₂O をとった SCL を D₂O 中に 3 $\sim$ 4 分つけ, ついで D₂O より取り出し, 表面の D₂O をキムワイプを用いて軽くとる。この操作を数回繰り返した後, NMR 試料管に挿入した (重水処理 SCL)。軽水処理 SCL では, BPA* ゲル中の HDO に対応した 4.73ppm の H₂O と高磁場側に化学シフトした線巾の大きい 4.47 $\sim$ 4.53ppm の H₂O が観測される。表-1 に T_1 値を示してある。表-1 の**付の T_1 , T_{is} は, 4.74ppm のシグナルが小さいため, 4.52ppm の線巾の大きい H₂O スペクトルの影響を受け, 値が小さい。-4.00ppm, $\gamma H_2/2\pi \sim 69\text{Hz}$ 照射したスピン拡散より求めた T_{is} を表-1, 図2 に示してある。4.47 $\sim$ 4.53ppm H₂O への T_{is} は0.35 $\sim$ 0.39秒で, SCL 構成高分子と H₂O 分子の相互作用の大きいことを示唆している。また, SCL 表面に近い D₂O と交換しやすい 4.73ppm の H₂O へも, BPA* ゲルと同様に, スピン拡散することは非常に興味ある現象である。

(表-1) T_1 および T_{is} (25 $^{\circ}\text{C}$)

	(ppm)	T_1 (sec)	T_{is} (sec)
#1 (軽水処理)	4.73	2.70	1.54
	4.52	0.62	0.35
#2 (軽水処理)	4.73	2.78	2.94
	4.47	0.56	0.37
#1 (重水処理)	4.74	1.08**	0.83**
	4.52	0.63	0.40
#3 (重水処理)	4.75	0.82*	—
	4.53	0.57	0.39
H ₂ O	4.77	3.30	—

(**) 本文参照

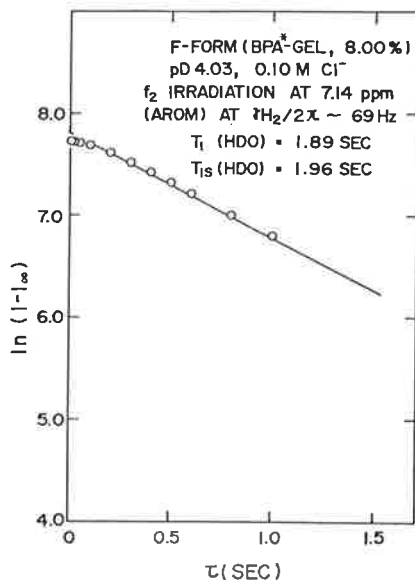


図1. BPA* ゲル。

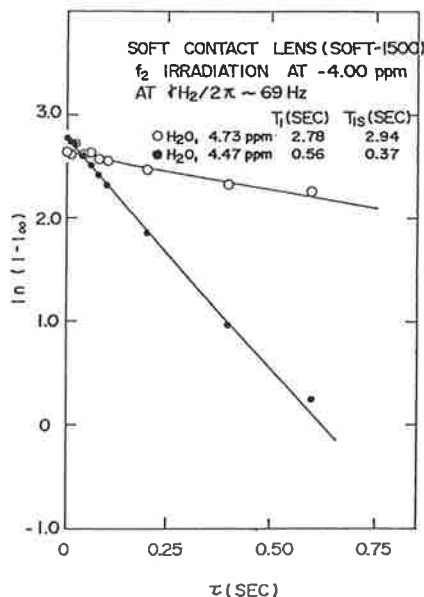


図2. ソフトコンタクトレンズ (T. Y. 社, 軽水処理#2)。

心筋内高エネルギー燐酸の代謝に関する研究

井上通敏・楠岡英雄・常岡 豊 (大阪大・医)

亘 弘 (生理研)

燐核磁気共鳴法は、生体内のエネルギー代謝を担う高エネルギー燐酸化合物を非破壊的に、したがって、連続的に観測できるため、各種の摘出灌流臓器におけるエネルギー動態の解析手段として用いられている。今回、我々は、左室圧にてトリガーをかけた燐核磁気共鳴法を用いることにより、従来の解析ではほとんど行なわれていなかった、心筋内の高エネルギー燐酸の心周期内での変動を観測し、さらに、心筋の収縮性がエネルギー代謝、特に高エネルギー燐酸の心周期変動に及ぼす影響について検討を行なった。

今回使用したシステムを図1に示す。体重180 gのWister種の雄ラットから摘出した心臓をLangendorff標本とし、 Ca^{++} 濃度5mEq/Lの酸素化したKrebs-Henselei変法液にて100cm水柱の圧で灌流した。本システムでは左室圧にてNMR計測装置を制御しており、心周期の任意の時相での燐酸化合物の測定が可能となった(図2)。

さらに、NMRによる測定開始後の安定した状態を対照状態とし、その後、 Ca^{++} 濃度10mEq/L、Isoproterenol(ISP) 5×10^{-6} Mを含むKrebs-Henselei液にて灌流を行ない、 maxdp/dt 、心拍

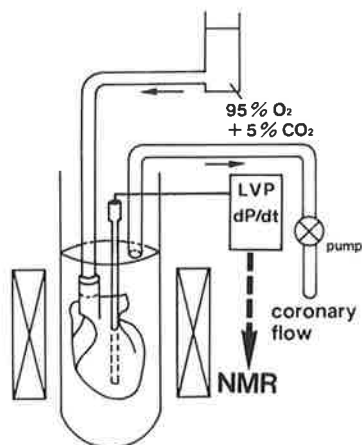


図1. 圧同期核磁気共鳴法。

左室圧は、左房より挿入した径2mm、長さ5cmのカテーテルを圧トランスデューサに結合して測定した。これは、外部よりの雑音がトランスデューサを介して混入し、NMR 測定の妨げとなるので、トランスデューサを計測用コイルの外側に置く必要があるためである。しかし、この方法は、左室圧の周波数特性にはほとんど影響を及ぼさなかった。灌流心標本と圧トランスデューサは共に外径15mmのNMR試料管に入れ、心臓より流出した灌流液をポンプにて吸引し、30秒毎に測定して冠灌流量とした。本システムでは左室圧にてNMR装置、Bruker社製WM360の測定パルスを制御しており、その結果、心周期の任意の時相でのNMRスペクトルの測定が可能となった。

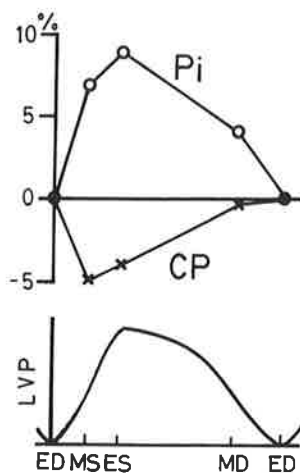


図2. クレアチン磷酸、無機磷酸の心周期内変動。

心筋内のクレアチン磷酸は、拡張末期に最大となり、収縮期には減少することが観測された。これに対し、無機磷酸は、クレアチン磷酸と逆に、拡張末期に最少となり、収縮期には増加した。

数の増加を確認してこれを収縮性増加状態とした。心筋内のクレアチン磷酸は、収縮性増加状態では、対照時に比べて36%の減少を、同じくATPは13%の減少を示し、無機磷酸は67%の増加を示した(図3)。また、収縮末期に対し拡張末期では、対照状態では、クレアチン磷酸は1.8%の増加を無機磷酸は1.3%の減少を示したが、収縮性増加状態では、クレアチン磷酸は4.1%の増加、無機磷酸は2.8%の減少と、いずれも対照状態よりも大きな変動を示した(図4)。

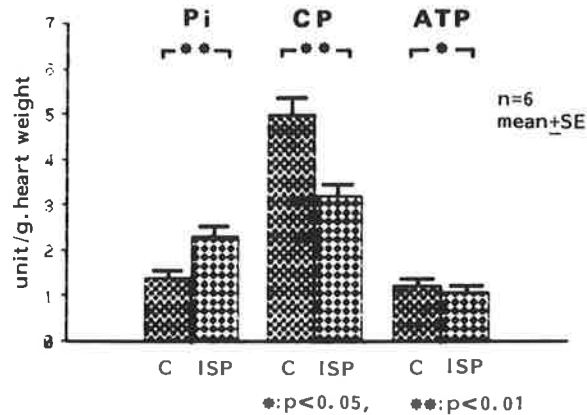


図3. 収縮性の増加が心筋内高エネルギー磷酸化合物に及ぼす影響。

心筋内のクレアチン磷酸(CP)は、収縮性増加状態(ISP)では、対照時(C)に比べて36%の減少を、同じくATPは13%の減少を示した。これに対し、無機磷酸(Pi)は、収縮性増加状態では対照状態に比し、67%の増加を示した。

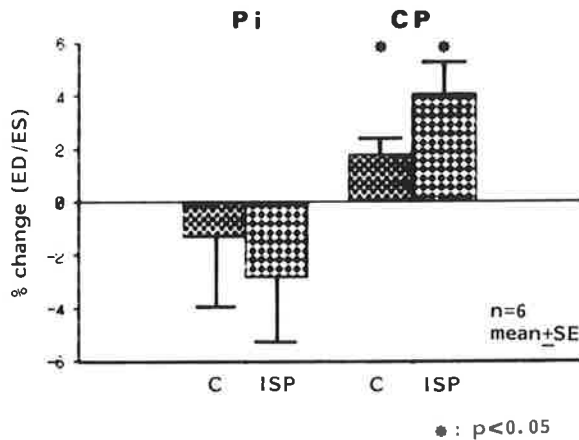


図4. 収縮性が心筋内クレアチン磷酸、無機磷酸の心周期内変動に及ぼす影響。

対照状態においては、収縮末期に対し拡張末期で、クレアチン磷酸は1.8%の増加を、無機磷酸は1.3%の減少を示した。収縮性増加状態においては、収縮末期に対し拡張末期で、クレアチン磷酸は4.1%の増加、無機磷酸は2.8%の減少と、いずれも対照状態よりも大きな変動を示した。

心筋におけるエネルギー代謝に関しては従来の生化学的手法に基づく多くの解析が行なわれているが、心周期の位相に同期させた解析はほとんど行なわれていない。磷核磁気共鳴法は、非破壊的な測定法であり、ここに示したように左室圧にてゲートをかけることにより、同一の標本にて種々の心時相における心筋内の高エネルギー磷酸化合物などが測定可能となった。さらに、本システムを用いることにより、心筋の収縮性がエネルギー代謝に及ぼす影響について検討が可能となった。すなわち、収縮性増加状態での無機磷酸の増加、クレアチン磷酸とATPの減少は、虚血状態での変化とは明らかに異なり、冠灌流圧が一定の条件の下で心筋酸素消費量が増加したことにより、相対的な低酸素状態が生じたためと考えられる。また、収縮性増加状態では対照状態に比べて心周期内におけるクレアチン磷酸と無機磷酸の変動が拡大したのは、収縮性の増加に伴ない、高エネルギー磷酸の需要が増加したためと考えられた。以上の結果より、収縮性の増大は高エネルギー磷酸の需要の増加と供給の減少をもたらすことが示唆された。

〔文献〕

楠岡英雄・常岡 豊・井上通敏・堀 正二・阿部 裕・亘 弘（1983）磷核磁気共鳴法による生体計測。臨床 ME, 7 : 655-672.

核磁気共鳴法による心筋内磷代謝と収縮能との連関の解析

豊岡照彦（自治医大）

核磁気共鳴法（NMR）は、臓器内代謝を知る上で臓器自体を傷つけることなく、連続的に細胞内化学物質を同定、定量できる優れた方法である。中でも近年開発された表面コイル法は、体外に置いたコイルで体内深部に位置する器官の代謝も測定可能な為、長時間にわたる司令や病態の経時変化を、非侵襲的に繰返し測定できる。この点で、今後特に臨床応用が期待される。我々は、この表面コイル法 NMR（以下 SC-NMR と略す）を、高血圧自然発症ラット（SHR）を用いて生後 4 週の高血圧発症以前から 10 週、15 週、20 週と同一動物が高血圧を発症し、心臓の仕事量が増加するに従い、心肥大が形成されていく過程を観察している。SC-NMR 法では、その分解能を上げ、心尖拍動部に置いたコイルで、いかに正確に心臓由来の信号を他の近接臓器由来の信号と混ぜないで得るかが、その生命といえる。予備実験でファントムを用い、コイルの空間分解能を上げる為、パルス幅、表面コイルの大きさ等を十分に検討した後、得られた最適条件で動物を用い、心臓内、磷酸化合物代謝の変化を心電図 R 波と同期させ測定を始めた。得られた結果は、従来病理学的、生化学的分析結果とほぼ併行するが、今後多数の動物を用い、その詳細な変化を追跡する予定である。

摘出臓器の灌流実験の際の磷代謝について

亘 弘（生理研）馬場正三（浜松医大）中井勝彦（同）

小沢享史（同）真野 勇（同）瀬尾芳輝（京都府立医大）

摘出臓器に酸素加人工血液（Perfluorochemical- O_2 ）を灌流することにより Viable に保ち、各種の実験的研究を行っている。（Ex-vivo organ perfusion）従来動物でしか得られなかった、In vivo autoradiogram に相当する所見がヒトの摘出臓器を酸素加人工血液で灌流し 3H -Thymidine による標識を行なうことにより人各種疾患において細胞動態を研究することが可能になった。我々はこれを Ex-vivo autoradiogram と名付け報告した¹⁾が、現在 Flash labelling の段階であり、長期灌流のためにはエネルギー代謝の面から検討する必要がある。今回はマウス摘出肝を用い酸素加人工血液（以下 FDA- O_2 ）灌流時の磷代謝を経時的に測定した結果について報告する。

方法：マウスをエーテル麻酔下に開腹，門脈内に Canulation を行ない直ちに肝を摘出し測定用プローブに固定し FDA- O_2 による灌流を開始し，経時的に測定を行った。（図 1）灌流液の組成は表 1 に示す如き組成であり，その酸素供給能は PO_2 550torr に酸素化した状態で 5.0ml/100ml である。灌流条件は流量 4ml/mim，温度 29.5°C（常温灌流を目的としたがこの系ではやや低温となった）であった。

^{31}P -NMR 測定は WB-360（Bruker 社製）に ^{31}P 用，径 15mm の試料管を用い，観測周波数 145.8MHz，RF パルス幅 20 μ sec. パルス繰返し時間 1.155秒で 512 回（10分）の積算を行った。（図 2）シグナルの増減は各信号の面積から行った。最長灌流時間は 6 時間であった。

結果：図 3 は灌流開始後 30 分から 10 分毎に経時的に測定したスペクトラムである。 α ， β ， γ ，ATP のピークが認められ 80 分までその量はほとんど減量していない。ここで灌流を停止し 30 分後に再び灌流を再開した。この際経時的に測定したスペクトラムがそれより下段である。灌流停止後 10 分（5 分でも見られる）で ATP 及び ADP のピークは著明に減少し，無機磷酸のピークの増加を認めた。灌流開始時 ATP 及び ADP のピークは再び出現したが，30 分の無酸素状態のあとでは灌流初期に比べピークはやや低かった。

それぞれのピークの面積を測定すると ATP 及び ADP に対し無機磷酸の量は相反する様な形で増減しており，代謝が好気性解糖系から嫌気性解糖となり又恢復する事を示しているものと考えられ FDA- O_2 が組織を Viable に保つのに役立っていると考えられる。尚，糖磷酸のピークが分裂している点については今後の検討を要する。

脳内活性物質と針麻酔の関連性についての研究

森 和・矢野 忠・丸山彰貞（明治鍼灸大）石崎 智（麻布獣医大）

I 研究目的

針麻酔の発現に疼痛抑制に関する脳内活性物質が重要な役割りを演じていることは多くの研究の示すところである。しかし、針麻酔の発現機序は未だ解明されておらず、特に針麻酔時に遊離されるであろう脳内活性物質は同定されていない。そこで本研究の目的は針麻酔による鎮痛効果の判定方法の開発と針麻酔に関連する脳内活性物質を抽出することである。今年度は針麻酔方式の効果判定と少数例についてオピエート物質の測定を試みた。

II 研究方法

実験対象は雑種成犬とした。針麻酔方式は前肢、後肢に刺針部位を求め、15Hz～20Hzの刺激頻度で筋攣縮が軽く生ずる程度の刺激強度（約1.5V）で15分～20分間通電した。疼痛閾値の測定は熱刺激法（輻射熱約80℃）を用い、光照射時から体動が発現するまでの時間を疼痛閾値とした。体動はマイクロバイブレーションとストレンゲージを用いて測定した。脳脊髄液（CSF）の採集は第1頸椎下から行い、CSF中のMet-Enkephalineを測定した。

III 研究結果

1. 針麻酔の効果——針麻酔無効群と針麻酔有効群に分かれ、針麻酔効果の安定性は十分得られなかった。針麻酔有効群では疼痛閾値は約2倍以上となった。after effectは約30分程度であった。2. エンケファリンの変動——針麻酔をしないコントロール群（N=5）=25.4±7pg equivalent/ml, 針麻酔群（N=3）=27.6±7.9pg equivalent/ml, と両者の間には有意な差は認められなかった。

IV 考 察

針麻酔の発現に内在性オピエートを中心とする脳内活性物質に関連するといわれているが針麻酔時の有効物質は未だ同定されていない。今回は針麻酔時のCSF中のエンケファリンを少数例について測定したところ顕著な増加は認められなかった。また針麻酔効果発現についても無効例もあり、針麻酔方式の安定性に問題があるようである。針麻酔無効例ではオピエートリセプターの量的関係を示唆する成績も報告されているがより安定的な針麻酔効果の方式の開発が必要であろう。さらに疼痛閾値の判定についても安定的な熱刺激装置の開発と疼痛反応の測定法も検討する必要があると考える。

小腸および大腸の蠕動に対するエンケファリンの生理的役割

横山正松（福島県立医大）尾崎 毅（生理研）

エンケファリンはオピウム類似物質として中枢神経に発見され(1)，針療法の鎮痛作用に関与していることが示され(2)注目をよんでいる。一方この物質が小腸のアウエルパッフ神経叢に，中枢神経と比肩される程多く含まれていること(3)，しかもエンケファリン産生神経はモルモット小腸では輪走筋をつよく支配していることが免疫組織化学的に示された(4)。内圧上昇，即ち腸首伸展によって起る蠕動が輪走筋の局所反射的収縮によって起ることも最近明確にされた(5)。我々はエンケファリンが腸管蠕動を生理的に抑制しているのではないかという想定の下に次の実験を行った。

Trendelenburg 法を用いモルモットの別出腸管の内圧を上げ蠕動を起こさせ，一定内圧（小腸では $4\text{cmH}_2\text{O}$ ，大腸では $10\text{cmH}_2\text{O}$ ）の下での蠕動継続時間を計測した。その時間は一般に小腸口側部で短かく，小腸肛門側，大腸で長い。十二指腸では1～3分，空腸（小腸中央部）では1～20分，回腸では1～30分，大腸では24～50分であった。小腸蠕動発現時にエンケファリンを投与（最終濃度 500nM ）すると蠕動は停止し，ナロクソン（ 500nM ）を投与すると蠕動が恢復する。大腸の蠕動に対してエンケファリンは一時運動を促進し後蠕動は停止する。

小腸および大腸の蠕動継続時間は，あらかじめナロクソンを投与（ 500nM ）することによって，全例において延長する。その延長率は次表の如く，十二指腸では1.1—2.2，空腸では1.2—4.0，回腸では3.3—165，大腸では2.2—4.7であり，回腸と大腸で大きい値を示している。

蠕動継続時間のナロクソンによる延長率

Sample No.	十二指腸	空腸	回腸	大腸
1	1.1	3.4	22	4.7
2	1.3	4.0	14	2.7
3	2.2	4.0	3.3	>2.2
4	1.8	1.3	165	
5	1.4	1.2	27	
6	2.0	3.3	5	
7		3.0	126	
8			>11	
平 均	1.6	2.9	>62	>3.2

以上の成績により，小腸や大腸の内圧が高くなり蠕動が発現している時に，壁内神経叢からエンケファリンが遊離され，蠕動をとめていることが考えられる。生体内では食物が腸管内に入っ

て来た時、局所反射としてアウエルバッハ神経叢を介し蠕動が起るが一方蠕動抑制物質が遊離し、蠕動を抑え食物輸送を急にしない働きをしているものと考えられる。エンケファリンは腸管における運動の抑制物質として重要な働きを営んでいると考えられる。

〔文献〕

- 1) Hughes, J.(1975). Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res.*, **88**: 295-308.
- 2) Hosobuchi, Y. & Li, Choh Hao.(1978). The analgetic activity of human μ -endorphin in man. *Communication in Psychopharmacol.* **2**: 33-37.
- 3) Hughes, J., Kosterlitz, H. W. & Smith, J. W.(1977). The distribution of methionine-enkephalin and leucine-enkephaline in the brain and peripheral tissues. *Br. J. Pharmacol.*, **61**: 639-647.
- 4) Furness, J. B., Costa, M. & Miller, R. J.(1983). Distribution and projections of nerves with enkephalin-like immunoreactivity in the guinea-pig small intestine. *Neurosci.* **8**: 653-664.
- 5) Yokoyama, S. & North, R. A.(1983). Electrical activity of longitudinal and circular muscle during peristalsis. *Am. J. Physiol.* **244**: G83-G88.

生体膜のゆらぎと動的構造

下山雄平（北海道教育大） 亘 弘（生理研）

生体膜の流動性は生理機能の発現に大きな役割を演じている。その流動性を観測する手段としては飽和移動電子スピン共鳴（Saturation transfer ESR : ST-ESR）が最適である。これはスピン束の飽和移動を観測するものであるが、 $10^{-3} \sim 10^{-7}$ sec の遅い分子運動の検出を可能にする特徴をもっている。生体膜は種々の状態が複雑に混り合っており解析が困難のため、本研究では生体膜の異方的構造と物性を際立たせる積層配向膜を用いた。

合成磷脂質 Dimyristoyl phosphatidylcholine(DMPC) にスピンラベル 3-spiro-doxyl-5 α -cholestane(CSL)を0.5M%の濃度で混合し、適当な水和条件のもとで、石英基盤上に積層配向膜を作成した。この膜を温度変化させてESRスペクトルを測定したが、すべての観測スペクトルは共鳴吸収の二次高調波成分を採用した。最近我々はESR信号をベクトル量とみなして振幅と位相の二つのパラメーターより動的情報を検出するベクトルESR法を開発した。即ち、変調磁場（50KHz）に対する搬送波の位相を 10° 毎に変化させてスペクトルを得た。これらはすべて12bit A/D CONVERTORでdigitizeした後、数値計算により、磁場ごとにベクトル成分、すなわち振幅と位相の二つのスペクトルを得た。 V_2 の積分強度が分子運動の相関時間を精度良く反映する

ことは前に報告した通りである。

DMPC膜は、膜面が磁場に対する角度によって異方性の高いスペクトルを示す。CSLの超微細構造テンソルより膜分子は膜面にはほぼ垂直に配列することがわかった。スピンラベルした配向膜の磁場に平行と垂直方向における V_2 の積分強度の温度変化より 25° と 18° とに主転移と前駆転移が観測された。スペクトルの積分値と相関時間の較正曲線よりゲル相において $10^{-3} \sim 10^{-5}$ sec, 液晶相で $10^{-6} \sim 10^{-8}$ sec の揺ぎの速さが決定された。5 M%と10M%のコレステロールを加えた場合、積分強度はゲル相の低温域と液晶相では一致するがゲル相の中間領域では相関時間が異なり、しかもモードの違う分子運動が検出された。これよりコレステロールの配向効果が相関時間の異方性を高めることがわかった。

図に DMPC 膜を磁場に垂直においたときの各温度におけるベクトル強度スペクトルのピーク比の変化をしめす。積層配向膜の膜面が磁場に垂直である時、膜分子の長軸の首振り運動が検出でき、各温度での二次元の自由度をもつ膜シート内の分子ゆらぎが議論できた。 L_β (ゲル相) から L_α (液晶相) への大きな転移が 25°C 付近に観測された。興味あることに、この主転移にともない critical slowing down が観測された。 18°C 近辺の小さな転移は L_β から L_β (tilted gel phase) への変化で前駆転移に対応している。このピーク比は透磁率に比例する物理量とみなせるが、協同的 (cooperative) な相転移にともなう分子ゆらぎを敏感に反映している。コレステロールの存在下で、転移幅が増加し転移の協同性が減少することは積分値より得た結果と良い一致を見ている。これは生体膜がコレステロールにより流動性が低下することの分子論的な示唆である。

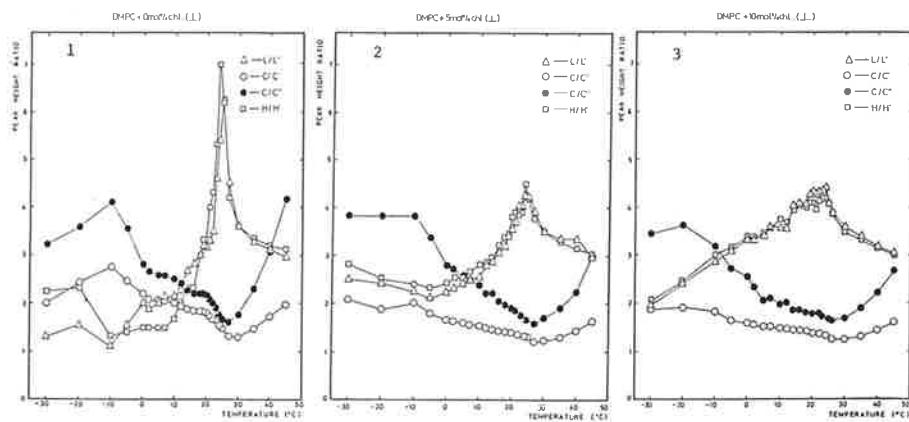


Fig. 1. Temperature variation of the peak height ratio taken from vector magnitude spectra of the spin labeled DMPC oriented multilayer membrane. Cholesterol was intercalated in the membrane with concentrations of (1)0 M%, (2)5 M% and (3)10 M%.

鳥類ペプチドの生理学的研究

矢内原昇（生理研），本間運隆，加納康彦（東京大・農）

見上晋一（岩手大・農），小林英司（東那大・理）

本研究は，高純度の合成神経ペプチドおよび特異抗血清を用い，鳥類ペプチドの生理学的意義を追求したものである。矢内原らは，各種神経ペプチドに特異的な抗血清により鳥類ペプチド，とくに GRP，VIP の組織内分布を検討した。

本間らは，鳥類光周反応の根底にある視床下部興奮性の概日リズムとその生殖活動における特性を調べる目的で，刺激強度一定の条件下，時間帯による反応の変化を追い，感受性リズムを検出した。短日条件で生殖腺発育を抑制した鳥類において，光による生殖腺発育には照射時刻が決定因子であって光の強度は重要ではないことを明らかにした。さらに，視床下部の光感受性と電気刺激に対する位相が一致し，21：00時の電気刺激によって，昼行性であったウズラの活動リズムが逆転し，活動は専ら暗期に限定されることを見いだした。

見上は，鳥類視床下部における各種神経ペプチドの分布に関する免疫組織化学的研究を行なった。すなわち，ウズラ前脳における各種神経ペプチドの分布について酵素抗体法を用いて検討し，それらの産生部位と正中隆起への経路を明らかにした。

小林は，鳥類の飲水行動における神経ペプチドの役割について検討し，また加納は山羊を用い，鳥類のセクレチンおよび GRP に対する特異抗血清の作製をはじめて行い，抗体産生に成功し，今後の鳥類の生理学的研究に重要な基質を提供した。

鳥類光周反応の根底にある視床下部興奮性の概日リズムとその特性

本間運隆（東京大・農）

日長によって生殖活動が支配される現象は動植物を通じて普遍的にみられる。本研究は刺激強度を一定にし，時間帯による反応の変化を追い，感受性リズムを検出したものである。

鳥類の特性として，短日条件（8 L：16 D）で生殖腺発育を抑制し，暗期に可視光のパルスを与えると，光による生殖腺発育には照射時刻が決定因子で光の強度は重要でないことが分る。光刺激の有効時間帯を光誘導相という。光ファイバーで視床下部を直接照射した場合も同様で，光誘導相とは視床下部の示す性質にはかならない。

短日条件より全暗黒で飼育する方が生殖腺抑制が弱く，明期の脳への光の侵入はむしろ抑制作用を持つことが予想されたが，その実験的証明は困難である。われわれはむしろ光誘導相に視床

下部で何が生じているかをさぐるのが早道と考えた。

まずウズラ視床下部に光ファイバーを慢性的に留置し、局所照射によって生殖腺刺激効果が最大に達する位置を決定し、ついで同一部位に電極を植えて、毎日1回2分間弱い電気刺激を与えた。10:00時点灯、18:00時消灯の光環境で、21:00とその前後1時間に刺激がみられ、予想したごとく明期の刺激は全く無効であった。

このような視床下部の光感受性と電気刺激に対する反応の位相の一致は、両者が同一の現象を別の角度から見たものであることを示している。予期せぬ現象として21:00時の電気刺激によって、これまでみられなかった行動上の変化が発現した。すなわち、実験開始日から昼行性であるウズラの活動リズムが逆転し、活動は専ら暗期に限定された。さらにこの活動には1時間を周期とするウルトラディアンリズムが見られ、行動を30分間隔で集計した結果から作図したプロフィールプログラムは鋸状の波型を示した。明・暗の行動に対する効果逆転と同時に生ずる生殖腺の賦活との神経的リンクの本態は不明であるが、密接な関係のあることは生殖腺刺激効果を欠いた個体ですべて行動上の変化をも欠いていたことから明白である。

電極の先端は視床下部ロート部のほぼ中央に位置せしめた。この附近にはLHRH陽性細胞群はなく、刺激をうけたのはその線維であるか、何か他のニューロンであるのかが未決定であるが、後者の可能性が高いと思われる。

鳥類の視床下部における各種神経ペプチドの分布に関する免疫組織化学的研究

見上晋一（岩手大・農）

近年、視床下部には各種の神経ペプチドが存在することが知られ、これがホルモンとしてのみならず、神経伝達物質あるいは調整物質として重要な役割を有することが明らかになりつつある。本研究ではウズラの前脳における各種神経ペプチドの分布について、酵素抗体法を用いて検討し、それらの産生部位と正中隆起への経路を明らかにした。

LHRH 陽性細胞は、室周視索前核、外側視索前核および中隔野に少数散在性に認められる。somatostatin(SOM) 陽性細胞は内側視索前核、室旁核内側部、外側視床下核、漏斗核前部に集合して存在する。それらの線維はともに前および後部正中隆起の外層に終末する。substance P 陽性細胞は嗅旁葉の内側、室旁核背側部および視床下核に散在し、enkephalin 陽性細胞は側坐核、分界条核、内側視索前核、室旁核外側部、漏斗核後部に存在し、それらの線維はともに視索前野および視床下部で密な網眼を作るとともに、正中隆起外層に終末する。gastrin releasing peptide(GRP) 陽性細胞は新線条体や背、腹上線条体の皮質層に広く分散するほか、嗅旁葉や分界条核に認められ、その線維は分界条に沿って伸びるが、正中隆起には侵入しない。glucagon (GLI) 陽性細胞は側脳室内壁に沿って側坐核に出現し、突起を側脳室に突出させる髄液接触神経であ

る。GLI細胞は室周視索前核や漏斗核にも少数散在し、その線維は正中隆起外層に終る。VIP陽性細胞は側坐核および漏斗核後部に多数存在し、それぞれ側脳室および第三脳室に突起を送る髄液接触神経である。その線維は正中隆起外層に終末する。

上記、神経ペプチド神経系のうち、正中隆起に線維終末を有するものは、ホルモンとして作用することが考えられるが、同時に、視床下部においては、相互に刺激、抑制等の機能的関係を有することが示唆される。

カエル皮膚活性ペプチドと哺乳動物神経ペプチドの相関性

矢内原昇（生理研）、藤田恒夫（新潟大・医）、中嶋暉躬（東医歯大・医材研）

本研究は、カエル皮膚活性ペプチドと哺乳動物神経ペプチドの相関性を生物化学的ならびに免疫組織化学的に追求したものである。

中嶋らは、カエル皮膚から各種生理活性ペプチドを単離しているが、これらペプチドの多くは、ラット子宮筋標本の自発的収縮を誘起する作用を有し、哺乳動物神経ペプチドと化学構造上しばしば類似点がみられる。とくにボンベシンは、哺乳動物の神経ペプチドであるガストリン放出ペプチド（GRP）とそのC末端デカペプチド配列が1アミノ酸残基を除き一致していた。矢内原はボンベシンおよびGRPの両者を化学合成し、合成ペプチドを用いて両者の生理作用を比較検討した。イヌを用い、in vivo投与によりボンベシンとGRPはガストリン、インスリン、腸管グルカゴンの放出を用量反応的に刺激することを示し、かつ、その活性はモル濃度で一致することを明らかにした。また、矢内原は、哺乳動物のGRP免疫活性の組織内分布を検討し、GRPが胃噴門部・体部にもっとも高濃度に存在するが、その他、脳と胃・腸・脾に広く分布する脳-腸管ペプチドであり、ボンベシンそのものは哺乳動物に存在しないことを明らかにした。藤田は、免疫組織化学により、GRPの神経内局在を検討し、とくに胃・腸・脾では胃の粘膜下神経マイスナー神経叢に多数の陽性細胞を検出した。脾のラ氏島にいたる神経にもGRP免疫活性を検出した。これらの結果から、GRPは哺乳動物においてガストリンやインスリンの分泌を傍分泌により調節する神経ペプチドである可能性が示唆された。また、中嶋は、*Rana rugosa*の皮膚に4種のブラジキニン類似のペプチド、ラナテンシン-R、およびグラスリペリン-Rを含むことを明らかにした。ラナテンシン-Cはラナテンシン族に属し、最近哺乳動物脊髄から単離されたニューロキニン α ともっとも類似した化学構造であった。なお、ニューロキニン α と同一の配列がP物質前駆体中に見いだされたことは興味深く、矢内原はすでにニューロキニン α を化学合成し、そのモノクローン抗体の作製を検討中である。

ここに述べたボンベシンおよびラナテンシンの他にカエル皮膚ペプチドには、各種の哺乳類神経ペプチドと共通のアミノ酸配列を有するものがある。ブラジキニン、アンジオテンシン、ガス

トリン、コレシストキニン、P物質およびTRHの類似ペプチドがその例であり、これについてはさらに生物化学および免疫組織化学的に検討し、その生理的意義を追求する必要がある。

細胞内酵素基質の合成と基質特異性

金岡祐一，石井信一（北海道大・薬），塩入孝之（名市大・薬）

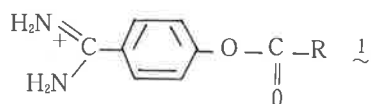
橋本 忠（北陸大・薬），高橋健治（京都大・霊長研），矢内原昇（生理研）

金岡は、種々の酵素基質や阻害剤の候補化合物を合成し、それらと酵素の相互作用、とくにトリプシンの合成基質・合成阻害剤について研究してきたが、その過程において逆性基質という一連の合成基質を合成した。これは、特異性決定基であるカチオン基を脱離基中にもつエステル類であり、酵素の構造-活性相関や基質特異性の研究に有用なものである。また、あたらしい脱アシル化過程の研究が可能になり、トリプシン以外の酵素にも応用が可能である。石井は、マボヤの受精に関与するプロテアーゼ類を単離・精製し、酵素学的に検討し、これらの酵素の受精における役割を明らかにした。高橋は、ヒト、ラット、ブタのプレペプシノーゲンおよびコウシのプレプロキモシンについて、そのシグナルペプチドの一次構造を明らかにし、比較検討した。その結果、シグナルペプチドの長さは15～16アミノ酸残基であり、従来報告されている各種前駆体蛋白質のシグナルペプチドの中では最も短い部類に属した。また、これらペプシノーゲン間でシグナルペプチドのかんりのアミノ酸残基の置換がみられるが、具体的性質は保持される範囲内での変異が大部分である。塩入および橋本は、蛋白質分解酵素基質のデザインを合成化学的に検討した。矢内原は、遺伝子構造解析により推定されたプロレニンおよびアンジオテシノーゲンの構造に着目し、その変換酵素基質の化学合成を行い、とくにプロレニンについては、N末端部44アミノ酸残基からなるポリペプチドを合成し、現在その精製を行っているが、これはレニン活性の発現機構の解析に重要な基質と考えられる。アンジオテシノーゲンについては、セリンプロテアーゼに共通する構造部について化学合成を試みている。脳にレニンおよびアンジオランシンの存在が報告されている現状から、本研究はその役割を実証するうえに欠くことができない新しいアプローチである。

酵素－基質相互作用研究への新しいアプローチ ートリプシンおよび関連酵素の“逆性基質”に関する研究ー

金岡祐一（北海道大・薬）

酵素の構造－活性相関や基質特異性を研究する方法の一つに，種々の基質や阻害剤の候補化合物を合成してそれらと酵素の相互作用を調べる，いわゆる合成化学的アプローチがある。我々はトリプシンの合成基質，合成阻害剤に関する研究を続けてきたが，その過程において，特異性決定基であるカチオン基を通常のようにアシル基中（の然るべき場所）ではなくて，脱離基中にもつような，パラアミジノフェノールエステル類¹⁾が，このような特殊な構造をもつにもかかわらず一種の基質として挙動し，比較的効率よく加水分解されることを見出した¹⁾。これらを今は逆性基質とよんでいる。



この新しい基質概念を利用し，種々の応用研究が可能である。最も重要な点は，酵素が主として脱離基中にある特異性決定基を認識するため，任意のアシル基を活性中心へ特異的に導入できることである。従って例えばレポーター基を導入して活性部位の性質を調べることで，種々のアシル基を導入して従来ほとんど知られていなかった脱アシル化過程を調べることで，等が可能となった。一方，種々のトリプシン関連酵素にもこの手法が適用できることがわかってきたので，ドラッグデザインへの応用も期待できそうである。

さらに広範囲の酵素の研究に，合成化学的アプローチを適用すべく研究中である。

〔文献〕

- 1) 金岡祐一，薬学雑誌，100: 973(1980)。

マボヤの受精に関与するプロテアーゼ類

石井信一（北海道大・薬）

マボヤ (*Halocynthia roretzi*) の精子中に 2 種類のトリプシン様酵素と少なくとも 1 種類のキモトリプシン様酵素が存在することを確認し，前者については 2 種類とも夫々電気泳動的に均一な程度にまで精製した。精製酵素の一方は哺乳類アクロシンとよく似た諸性状を示したが，他方はサブサイトに関する基質特異性の極めて高い，全くユニークな酵素であった。ロイペプチ

ン (acetyl-Leu-Leu-argininal) やこれら誘導された各種ペプチジルargininalが両酵素の活性におよぼす阻害作用とマボヤの受精におよぼす阻害作用との両方の様相を比較解析して、これらの酵素どちらもが受精に（特に精子の卵保護層通過の段階で）重要な役割を果たしていることを明らかにした。マボヤ精子キモトリプシンの受精への関与を示唆する実験結果をも提示し、このことも含めた討論を行った。

Evidence for Acrosin-Like Enzyme in Sperm Extract and Its Involvement in Fertilization of the Ascidian, *Halocynthia roretzi*.

H. Sawada, H. Yokosawa, M. Hoshi and S. Ishii: Gamete Research 5 : 291-301(1982).

Ascidian Sperm Chymotrypsin-Like Enzyme: Participation in Fertilization.

H. Sawada, H. Yokosawa, M. Hoshi and S. Ishii: Experientia 39 : 377-378(1983).

Purification and Characterization of Two Types of Trypsin-Like Enzymes from Sperm of the Ascidian(Prochordata), *Halocynthia roretzi*: EVIDENCE FOR THE PRESENCE OF SPERMOSIN, A NOVEL ACROSIN-LIKE ENZYME.

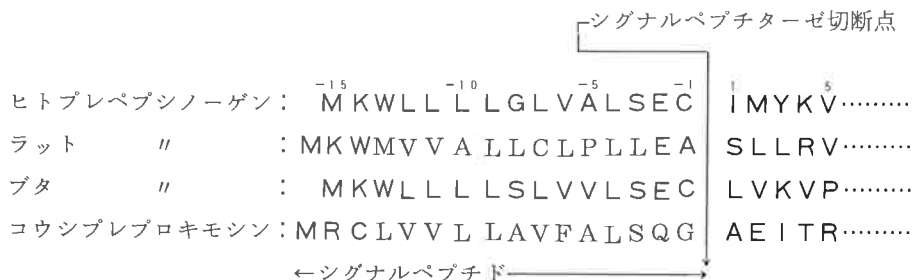
H. Sawada, H. Yokosawa and S. Ishii: J. Biol. Chem., *in press* (Mar. or Apr., 1984).

プレペプシノーゲンおよびプレプロキモシンのシグナルペプチドのアミノ酸配列順序

高橋健治（京都大・霊長研）

胃の消化酵素であるペプシンのチモーゲンであるペプシノーゲンは、生合成前駆体プレペプシノーゲンとして疎面小胞体上で生合成される。この前駆体はそのアミノ基末端にシグナルペプチドと呼ばれる部分を含んでおり、これは前駆体が疎面小胞体内腔へ移行する際に重要な役割を果たすこと、またこの移行の際に小胞体内腔側に存在するシグナルペプチダーゼの作用により特異的に切断されることが知られている。本研究では、比較生化学的興味から、ヒト、ラット、ブタのプレペプシノーゲンおよびコウジのプレプロキモシンについて、そのシグナルペプチドの一次構造を明らかにした。

まず、各動物の胃より全RNAを抽出し、コムギ胚無細胞蛋白合成系で翻訳させた後、翻訳産物をSDSスラブゲル電気泳動により分離し、これよりプレペプシノーゲンまたはプレプロキモシンを抽出した。翻訳の際には、20種のアミノ酸のうち1種類のみについて放射性標識アミノ酸を使用し、各1種類の放射性アミノ酸のみを含む前駆体を多数調製した。その各々について、手動エドマン分解法によりアミノ基末端のアミノ酸配列順序を決定した。その結果は次の通りである。



これから明らかなように、シグナルペプチドの長さは15～16残基であり、従来報告されている各種前駆体蛋白質のシグナルペプチドの中では最も短い部類に属する。疎面小胞体膜を貫通するためには最低この長さのシグナルペプチド部分を必要とすることを強く示唆している。また、これらのシグナルペプチドは中央部分に疎水性アミノ酸残基（とくに Leu）のクラスターを有し、アミノ末端側にプラスの電荷を有し、シグナルペプチターゼによる切断点近傍には側鎖の比較的小さい残基が多いという一般のシグナルペプチドに共通的な特徴を有している。同じペプシノーゲン間で比較すると、かなりアミノ酸残基の置換がみられるが、基本的性質は保持される範囲内での変異が大部分である。

音刺激受容の分子機構

柳沢慧二，浅沼 厚，堀越哲郎（鶴見大・歯）

田中康夫（独協医大），山岸俊一（生理研）

高等動物の音受容器である蝸牛において、有毛細胞の受容分子あるいはそのモジュレータと考えられる分子として、イノシトールリン脂質を考えて追及してきた。

本年はイノシトールリン脂質，中でもトリフォスホイノシタイド（TPI）にかなり特異的に反応する抗体を入手し（横浜市大・吉岡らによる），これを用いて PAP 染色法より蝸牛内のどこに抗原が存在するかを検討した。その結果，蝸牛の組織においては内外有毛細胞の毛の部分以外の部位よりも明らかに良く染まっていることがわかった。光学顕微鏡レベルの観察なので，毛のどの部位かということまでは特定できないが，一応毛の長面に一様に抗原が存在しているように思われる。したがって Hudspeth の報告している毛の先端に電流の流入口があるという像ではないが，有毛細胞の毛の部分が良い染まっているということは，この抗原性を示すものが音刺激受容と密接な関係を有する分子であることを考えさせる。

抽出されている TPI を投与前の抗体に加えるとその抗体価は約30%に低下した。この低下した抗体を用いて同様に PAP 染色を行い，もとの抗体によるものと比較すると，染色性は明らかに低下していた。このことは，用いた抗体の TPI との結合性を裏づけるものである。また有毛細胞の

毛のまわりにはムコ多糖類が大量に存在することが知られているが、ムコ多糖類を染め出すルテニウム赤による染色では、PAP染色と異った像を呈した。したがって抗原性を有する分子がムコ多糖類であるとはいいがたいように思われる。もちろん上記の議論によって抗原性を有する分子がTPIであるとただちに断定することは出来ないが、TPIである可能性を示しているといえる。

蝸牛組織の摘出の際に細胞をまだ活性を有する状態でとり出したか、あるいは死んだ状態であったかということは、TPIのように代謝回転の早い物質を相手にしているときは非常に重要になってくる。ミトコンドリアが活動状態のときにのみ染色性を有するローダミン6Gを用いて有毛細胞を染色し、今回の標本作製の途中で、固定液を作用させるまでは有毛細胞のミトコンドリアが活動状態にあることを確認した。

Tb イオンの興奮膜に対する作用

西江 弘（順天堂大・医・生理）、

古家喜四夫、志賀 潔、山岸俊一（生理研）

〔目的〕 Tb イオンは3価の陽イオンで、特有のスペクトルを示す蛍光を発する。Ca 結合蛋白であるトロポニン-C、カルモジュリン、パルバルブミンその他に結合して蛍光を発することが知られている。山岸らのヤリイカ軸索膜を用いたこれまでの研究から、2価イオンは 10^{-4} M、 $\sim 10^{-2}$ Mの濃度範囲においてNaチャンネル電流およびKチャンネル電流を抑制することが明らかにされている。TbがCaの結合あるいは作用部位に作用すると考え、その作用の特質の解明を試みた。さらにTb特有の蛍光スペクトラムを示標にした解析も試みた。

〔方法〕 人工海水中でヤリイカ軸索膜を100mMKFあるいはK-glutamate等張溶液で細胞内灌流し、これにTbイオンを加えて活動電位や静止膜電位、膜抵抗の変化を観察した。膜電位固定下でNaおよびKチャンネル電流に対する効果を観測した。細胞内灌流によって軸索膜を可溶化して得た可溶化サンプルを神経膜およびその関連成分と考え、Tb結合の有無およびその特性を蛍光分光光度計を用いて解析した。

〔結果と考察〕 軸索膜内からの作用：100mMKF溶液で灌流したとき、Tbイオンを1mM加えても活動電位や静止電位に変化はみられなかった。それとは対象的にK-glutamate溶液灌流下では1mMのTbイオン作用で、活動電位の発生は急速に抑制された。静止膜電位は脱分極側にシフトした。Tbイオン作用からの回復は、K-glutamate溶液では遅かったが、KF溶液灌流に変えると急速に回復した。膜電位固定法による電流測定から、0.5mMのTb作用下でNaチャンネル電流、Kチャンネル電流ともに約2分で完全に抑制された。0.05mMTbでも著明な抑制を示した。軸索膜外からの作用：人工海水にTbイオンを加えて作用させたとき、1mMでは活動電位のピーク値はほとんど変化しなかった。静止膜電位は急速に脱分極側へシフトしたが、静止膜抵抗は少し増

加の傾向がみられた。刺激閾値は上昇した。高濃度の Tb を長時間作用させると活動電位のピーク値はしだいに減り、 dV/dt も減少傾向を示した。Tb の蛍光測定：可溶化膜サンプル中に Tb が結合する成分が 4 種類以上存在することを示す結果が得られた。また、Tb に対して親和性の高いグループと低いグループがあるとも示唆された。以上の結果から、軸索膜内側に Ca 結合部位があって膜興奮を修飾していることが強く示唆される。

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・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)，*Bacillus cereus* 菌の精製スフィンゴミエリン分解型ホスホリパーゼ C (SMase)，*Clostridium pefringens* 菌の精製ホスファチジルコリン分解型ホスホリパーゼ C (PCase) を、ヤリイカ巨大神経繊維に作用させて、その興奮と伝達、及び膜抵抗にどのような影響があるかを調べた。

前回、軸索内灌流液の 25mM K-glutamate に PIase を加えて、ヤリイカ巨大神経軸索内を灌流したところ、活動電位、静止電位の減少が見られた（生理学研究所年報第 4 巻 1983）。今回、100mM K-glutamate 1 ml 中に対し、5units の PIase を加え、この溶液で軸索内を灌流したところ、作用後数分で活動電位の低下が見られ、約 10 分後には活動電位はほとんど消失した。その後、灌流液を 100mMKF に変えたところ、前回と同様に、活動電位の回復が見られたが、対照の 70% 程度のレベルであった。さらに、神経膜抵抗は PIase 処理により、約 1/3 に低下し、また、KF で灌流することにより、膜抵抗は約 70% にまで回復した。

基質特異性が異なる他のホスホリパーゼ C，すなわち SMase，PCase を 100mMKF の灌流液に加え、PIase 処理と同様神経膜内に作用させたが、顕著な影響は見られなかった。100mM K-glutamate の灌流液中での SMase，PCase の神経膜への影響は目下検討中である。

膜リン脂質のわずか数%に過ぎない、ホスファチジルイノシトール (PI) を特異的に分解する PIase によって、活動電位の変化が見られるということは、ヤリイカ巨大神経の興奮及び伝達機構に膜 PI が、密接に関係していると思われる。また PIase を、赤血球に作用させた場合、膜結合酵素の遊離が起こるが、この時、赤血球の溶血はおこらないことから、PIase 処理による神経膜の損傷は、ほとんどないと考えられるが、膜抵抗の減少が見られていることから、膜リン脂質中の数%の PI の分解が、他の膜リン脂質とタンパク質間の相互作用に影響を与え、膜抵抗減少という結果をもたらしたと思われる。

グラヤノトキシンによるGate電流の抑制

井上 勲（徳島大・医・海洋生物実験所），山岸俊一（生理研）

グラヤノトキシン（GTX）はNa-channelと特異的に結合し、Na-channelのkineticsを修飾する。GTXで修飾されたNa-channelは通常の静止電位（ -60mV ～ -70mV ）でその約半数が開いた状態にある（Seyama and Narahashi, 1973）。GTXは中性で電荷をもたない。

イカ巨大神経のgate電流に対するGTXの効果を調べた。細胞内から $1\sim 20\mu\text{M}$ のGTXを15分作用させるとGTX濃度に応じてgate電流が減少した（図1）。GTXを洗い去るとgate電流は不完全であるが回復した（図1黒印）。図2に示されている様に、GTXはgate電流の振巾を減少させたが、その他の性質、たとえばrise-time、減衰の時定数はほとんど変化しなかった。またBで見られる様にGTXはK-conductanceには全く影響を及ぼさない。すなわちGTXはこの実験条件下ではgate電流を特異的に阻害する。また阻害の仕方はgate電流発生源、すなわち電荷の移動量を減少するが、そのkineticsには影響を及ぼさないものと解釈される。このことは、gate電流を発生するNa-channelの数が減少したと考えることにより説明される。言い換えれば、GTXで修飾されたNa-channelからはgate電流が検出されなかったと考えられる。

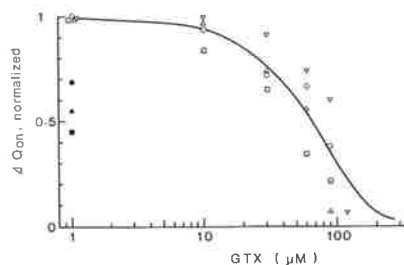


図1. Gate電流の積分値に対するGTX作用の濃度依存性。膜電位は -70mV から $+18\text{mV}$ に上昇した。細胞内液： 125mM CsF ，外液： 60-mM CaCl_2 ， $300\text{mM TMA}\cdot\text{Cl}$ ， $1\mu\text{M TTX}$ 。

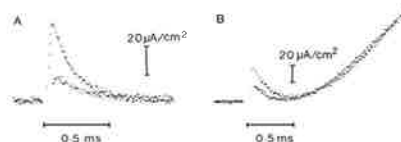


図2. $60\mu\text{M GTX}$ 15分作用後のgate電流（A），gate電流とK電流（B）。GTX作用前および後の二つのデータを重ねてある。細胞外液： 60mM CaCl_2 ， $300\text{mM TMA}\cdot\text{Cl}$ ， $1\mu\text{M TTX}$ ，内液： 125mM CsF （A）； 30mM KF ， 60mM NaF （B）。

〔文献〕

Seyama, I. and T. Narahashi. J. Pharmacol. Exp. Therap. 184 : 299-307(1973).

白鼠上頸部交感神経節のシナプス伝達機能と環状タクロチド生成系の関連性

永田 豊, 安藤正人, 三輪正人 (名保衛大・医), 杉山博之 (生理研)

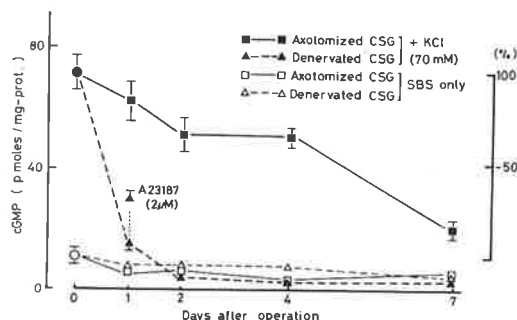
〔研究目的〕 白鼠上頸部交感神経節 (SCG) は, 生体より摘出後も適当な条件下では長時間にわたってシナプス伝達機能を観察できました, 比較的高い物質代謝活動を示すので, 神経系の機能と代謝との関連性を追及するには極めて有用な標本である。一方, 環状ヌクレオチドのうち cyclicGMP (cGMP) は, musarinic cholinergic シナプス伝達の第二次メッセンジャーとして機能していることがよく知られている。そこで我々は鼠より摘出した SCG に電気刺激ならびに溶液中の高 K^+ 濃度による脱分極刺激を与えたとき, cGMP 生成量の変動を測定した。また節前および節後神経の切断手術をおこなって, それぞれ神経末端および神経節細胞の変性, 脱落をおこさせた SCG に高 K^+ 刺激を与えて, SCG の cGMP 生成系がどのように変動するかを調べて, この刺激の細胞レベルでの作用点を明らかにしようとした。

〔方法〕 白鼠より SCG を摘出し, 毛細管電極に装着, 節前線維より電気刺激をおこないながら, 生理的溶液 (1.5mM-IBMX 含有) 中で 10 分インキュベーションをおこなった。SCG 内の cGMP 生成は, radioimmunoassay 法で定量した。節前および節後神経の切断手術は麻酔下で無菌的におこない, 回復後 1~7 日後に SCG を摘出して実験に用いた。

〔結果と考察〕 節前神経の電気刺激によって SCG 内の cGMP 量は著明に増大した。この変化はムスカリン様拮抗剤 (アトロピン) 添加で著明に低下するが, ニコチン様拮抗剤 (C_6) 添加ではほとんど影響されなかった。このような結果は, 神経節のシナプス伝達は muscarinic ACh レセプターを介する cGMP 生成系の活性化をひきおこすことを示唆している。一方, 溶液中の K^+ 濃度を 70mM に高めて神経細胞の脱分極をひきおこすと, SCG 内 cGMP は著明に増大した。しかしこの変化は, 電気刺激と異なって C_6 やアトロピン添加によっては全く影響されず, ACh レセプターを介しておこるとは考えにくい。節前神経切断 SCG では, 術後 1~2 日で高 K^+ による cGMP 生成増加は殆んどみられなくなった。しかし節後神経切断 SCG は術後 4 日まで高 K^+ による

Conditions	cGMP formed (pmol./mg-protein)
At rest	11.0 ± 2.4 (6)
+ Elect stim. (10Hz)	48.6 ± 1.5 (4)*
+ Atropine (10 μ M)	18.3 ± 1.5 (4)
+ Hexamethonium (10 μ M)	42.8 ± 1.8 (4)*
High [K^+] _o (70mM)	70.6 ± 6.5 (4)*
+ Atropine (10 μ M)	71.4 ± 4.7 (4)*
+ Hexamethonium (10 μ M)	70.5 ± 8.0 (4)*

*Statistically significant, $p < 0.001$



る cGMP 増加は高値に保たれた。つまり、高 K^+ による SCG 内の cGMP 生成系は節後神経細胞ではなくて、節前線維にあり、伝達物質の遊離と共役している可能性が強く示唆された。

〔文献〕

Ando, M., Nanba, T., Okuya, M., & Nagata, Y. : Brain Research, 267 : 313-321(1983).

細胞膜受容体分子の単クローン性抗体による解析（報告 3）

福本哲夫, 宮本 愛, 山下 昭（浜松医大）, 杉山博之（生理研）

(1) 細胞膜受容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してきた（報告 1, 及び 2）。今回の研究では、主として、得られた mAb を用いて、種々の発生胚葉を異にする細胞の細胞膜表面抗原の発現を相互に比較検討し、細胞表面抗原発現の側面から、発生胚葉を異にする細胞相互の関連や異同を検討してみた。用いた mAb としては、各種ラットリンパ球の subset や胸腺細胞に反応する mAb（Williams ら, 1977—1983）；即ち W3/13（抗 T 並びに抗白血球）, OX 1（抗白血球共通）, OX 7（抗 Thy-1）, W3/25（抗体 T-helper）, OX 8（抗 T-nonhelper）, および我々の確立した抗肝細胞膜抗体（HAM.1 および 3, Molecular Immunol. 1984）などである。方法は間接蛍光抗体法により細胞自動蛍光解析装置（FACS II 並びに EPICS V）を用いて解析した。また各種細胞や臓器ホモジネイトを標的細胞にした細胞性ラジオイム, マッセイによる解析の両方を用いた。その結果、例えば図 1 の如く、各種 mAb に反応する各臓器の反応性の強さを原点からとり、作図すると、Brain, Thymus 或は Liver など各種器特有の pattern を示すことがわかる。リンパ系の臓器である脾臓やリンパ節は Thymus 型に近く、腸管系などは Liver 型に近いような結果が得られた。遊離細胞を用いた FACS 解析などでも類似の結果が得られた。もっと数多くの種々の臓器に対する mAb を用いれば臓器の相互の類似や異同を検索できると思われる。

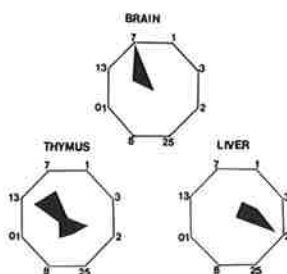


図 1. 1, 3, 2 : HAM. 1, HAM. 3 and HAM 2. 25 : W3/25. 8 : OX8. 01 : OX1. 13 : W3/13. 7 : OX7.

(2) 既に報告した HAM. 2 抗体はラットの class I 抗原 (RT-IA) を認識する抗体である。免疫学の領域では、各種免疫反応においては、effector cell と target cell の間にはこの種の組織適合性抗原の適合が強く要求される場合が多い (Doherty & Zinkernagel 1975)。これらの分子は、細胞と細胞が識別し合う上で極めて重要な分子である。ラット肝細胞膜を DOC で可溶化し、HAM. 2 腹水 IgG を CNBr 活性化 Sepharose 4B に結合させたカラムに通し、抗原を単離することができた (Fukumoto et al. Molecular Immunol. 1984)。そのアミノ酸組成はマウスの H-2 のそれと類似し、ラットリンパ球表面に発現する他の膜糖蛋白で既にそのアミノ酸組成の解析されている W3/13, OX 1, 或は Thy-1 抗原 (Williams ら) とは明らかに異なる分子であった。従ってこの方法を用いれば、ラット Class I 抗原を肝臓より多量に精製できることがわかった。

高張耐性細胞の機能に関する研究

佐藤温重, 小沢和子, 桑井康宏 (東京医科歯科大 歯)

中尾 真, 福島義博 (生理研)

哺乳類の腎髄質部には耐高塩性, 耐高浸透圧性を有する細胞が存在することが知られているが、ヒト腎について同細胞の存在は記載されていない。そこで、ヒト腎の高浸透圧耐性細胞について検討した。

ヒト腎組織片を 0.0125% コラゲナーゼ Ca-Mg 欠塩類溶液中で 37℃, 60 分処理した。得られた細胞は 30% 仔牛血清添加した Ham F12 + Dulbecco MEM (1:1) 培地 (等張培地) を用いプラスチックシャーレに播植し、5% CO₂ 空気気相, 37℃ で培養した。細胞が confluent になった時に培地を 600m Osm/l 培地と交換した。以後 2 日間隔で 750, 900, 1,050, 1,200, 1,350, 1,500, 1,650, 1,800m Osm/l の各高張培地と交換し、高浸透圧耐性細胞の存在を形態的に観察した。高張培地は等張培地に所定の浸透圧になるように NaCl を加えて作成した。さらに 600m Osm/l 培地に生存する高張耐性細胞については等張培地中で継代培養してのち細胞が上皮に分化する能力を有するか否かを“ドーム”形成能を指標に検討した。

等張培地においてヒト腎髄質の初代培養細胞は形態的に上皮様および線維芽様細胞が区分された。600m Osm/l 培地においては一部の線維芽様細胞は死滅したが、その他の細胞は高張耐性を有していた。900m Osm/l 培地においては上皮様細胞は形態的变化を認めなかったが、線維芽様細胞では細胞間に隙間が出現した。1,500m Osm/l 培地においては線維芽様細胞は変性したが、上皮様細胞は正常な形態を維持していた。1,650m Osm/l においては上皮様細胞の一部が変性した。1,800m Osm/l 培地においては少数の細胞のみ生存していた。初代培養細胞の中には浸透圧耐性の異なる細胞が混在していたが、最大耐容浸透圧は 1,800m Osm/l であった。600m Osm/l 培地で選択した高張耐性細胞を等張培地中で継代培養した後上皮様細胞をプラスチック

シャーレ中に播植すると“ドーム”様構造を形成した。“ドーム”様構造はウワバイン投与で消滅することから、細胞が上皮に分化し細胞は極性をもち細胞間には tight junction が形成されて、Na の能動輸送がおこなわれた結果と考えられる。

ヒト腎髄質組織中に高張耐性細胞の存在が確認され、また同細胞の継代培養が可能となった。今後、腎上皮細胞の能動輸送の研究モデルとして応用してゆきたい。

³¹P-NMR による赤血球膜リン脂質の状態解析

佐藤真悟，神部芳則（東京医歯大・医），中尾 真，福島義博（生理研）

赤血球膜は脂質二重層をスペクトリン・アクチンなどの蛋白質が裏打した形として存在する。この裏打ち構造は3つの重要な機能を荷なっていると考えられている。その第1は膜に強さと弾力を与え赤血球に特徴的な円盤状を与えることである。第2は内在性タンパク性の分布を調節することである。第3は脂質二重層のリン脂質を非対称的に分布に関与している可能性があげられている。裏打ち構造の最後の機能については、スピラベルした試薬や化学修飾を用いた間接的な証拠より考えられたものであり直接的な証拠には乏しい。そこで我々は native な状態で赤血球における裏打ち構造体とリン脂質の相互作用を調べることが必要と考え ³¹P-NMR を用いて解析をおこなった。

ヒト赤血球膜は10mM Tris HClを用いる通常の方法に従って調整した。赤血球膜を0.2 mM ATP (pH 7.5) で洗浄し、20倍容の同溶液に懸濁し、37℃で15分間 incubate した。この incubation により赤血球膜はスペクトリン・アクチンを遊離し、それと逆行して崩壊し、小さな vesicle になった。30,000rpm, 30分間遠心してこの vesicle を得た。この vesicle を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析すると、スペクトリン・アクチンの約80%は膜より抽出されていた。上記の vesicle を10mM Tris HCl(pH7.5)でよく洗い ³¹P-NMR の試料標品とした。赤血球膜及び vesicle の ³¹P-NMR スペクトルは Saturation transfer テクニックを用いて描いた。3時間におよぶ scan でリン脂質に由来するスペクトルを得たが、intact 赤血球膜と vesicle の間には差を見出すことはできなかった。この結果より脂質二重層のリン脂質と裏打ち構造体間の直接的な相互作用はかなり小さいと考えられるがさらにカルシウムなどの2価イオンの影響なども調べる必要がある。

Na, K-ATPase に対する高親和性モノクローナル抗体

浦山 修, 長宗秀明, 原 諭吉, (東京医科歯科大・医)

中尾 真, 福島義博(生理研)

昨年度報告書で報告したように, 私達は生体膜部門・杉山博之助教授との共同研究で, ブタ腎 SDS 処理 Na, K-ATPase に対するマウス・モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを 4 種類得た。今年度はそれらハイブリドーマをマウス腹腔に注射し増殖させ, その腹水中から多量の抗体を得て, プロティン A カラムにより各抗体の精製を行い, それらの性質を調べた。そのうちの抗体 38 は私達の他の 3 つの抗体ともまた 6 研究室から既報告の Na, K-ATPase のモノクローナル抗体とも異なる性質を示した。その特徴は Na, K-ATPase に対する高い親和性である。そのことは, $C_{12}E_8$ 可溶性酵素を用いたプレート, アッセイおよびブタ赤血球を用いた蛍光抗体法で確かめた。抗体 38 の諸性質を表にまとめる。

	方 法	性 質
1 g サブクラス	免疫拡散法	G_1
分子量	SDS-PAGE	166,000
特異的結合	プレート・アッセイ	$C_{12}E_8$ 可溶性 Na, K-ATPase に結合
親和性	"	高い, $K_{0.5}=0.24nM$
ストイキオメトリ	結合実験および SDS-PAGE	IgG 0.65 モル/ α サブユニット/モル
膜内外認識	ブタ赤血球使用蛍光抗体法	インタクト細胞に有意な結合 (膜外表露部位認識)
サブユニットあるいは高次構造認識	分離サブユニットを用いた プレート・アッセイ	SDS 変性サブユニットとは結合 せず(高次構造認識)
種交叉	プレート・アッセイ	ラット, ウマ酵素と免疫交叉
Na, K-ATPase 活性		阻害せず
^{86}Rb 能動輸送	ブタ赤血球使用	阻害せず

ベンゾキノン処理プレートへの Na, K-ATPase のカップリング

浦山 修^{*}, 中尾 真^{*}, 長宗秀明 (東京医歯大・医^{*}, 生理研)

ブタ腎の Na, K-ATPase に対するモノクローナル抗体の, その抗原への結合の諸性質を明らか

にするために、Na, K-ATPase 標品とマイクロタイター・プレートにカップリングする方法を新たに開発した。プラスチック・ウェル（ファルコン）をベンゾキノン溶液で処理し水洗いのち、膜結合型あるいはC₁₂ E₈ 可溶化型 Na, K-ATPase (10 μ g/20 μ g) をウェルに添加、室温に90分間放置しプラスチック表面に共有結合性に抗原を固定化する。BSAでブロッキングのち、その固定化抗原に特異抗体産生ハイブリドーマの培養上清を作用（4℃，1晩）させ洗浄のち、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を加えて反応させ、特異抗体を含みぬ培養上清との発色量の差から結合を観察した。ベンゾキノン処理の有無によるペルオキシダーゼ活性の違いを表に示す。膜型，可溶化型酵素の双方とも，ベンゾキノン処理ウェルにて発色が増加した。本報告書中のモノクローナル抗体38のNa, K-ATPaseへの結合の性質の一部はこの方法によって明らかにされた。ベンゾキノンによるカップリング法は再現性よくかつ簡便な方法である。Na, K-ATPase 以外の膜タンパクにも適用できよう。

ベンゾキノン処理	ペルオキシダーゼ活性 A492 ($\times 10^{-3}$)	
	膜結合型	可溶化型 Na, K-ATPase
+	44	108
-	13	10

孵化直後のヤリイカ神経細胞の培養

福田 潤，山口和彦（東大・医），寺川 進（生理研）

ヤリイカ等の軟体動物の神経細胞の培養可能性を調べる目的で，孵化直後のヤリイカより，神経細胞ならびに上皮性細胞，結合組織細胞を単離し，人工環境におき，その成育を調べた。本研究では特に，培養の可能性を探ることに重点をおき，培養液の組成，培養温度，培養皿の条件，培養の手法等，巾広く試み，そのうちいずれの条件が細胞の生長にとって好ましいかを調べた。その結果，ヤリイカの神経細胞にとって好ましい条件が，ある特定の培養条件内にあるということにまでしぼりこむことが出来るとともに，ヤリイカ細胞の培養にとっての問題点を2，3，明らかにすることが出来た。その問題点の第1は，細菌感染が非常に頻繁に起り，その対策を十分行う必要があるということである。すなわち，新生のヤリイカの呼吸器系や消化器系の表面に附着している雑菌が，細胞摘出時にどうしても混入し，培養条件を汚染するものと考えられる。問題点の第2は，新生ヤリイカの入手出来る時期が極めて短期間に限られてしまうので，培養試行を繰り返し行うことが困難であった。この点は，幼若なヤリイカ等の入手の可能性を検討する必要がある。

以上まとめると、ヤリイカの神経細胞を培養する手法にめどがつき、少数例においては、2—3日であるが細胞の培養は可能であった。2・3新たな問題点が生じたものの、解決は可能でありこの培養は将来有望であり、その改良は十分期待出来ることが明らかになった。

イカ巨大神経の静止膜電位に対する表面電位の寄与の検討

三宅教尚（北海道大・薬），寺川 進（生理研）

従来、細胞膜上の表面電位変化は、イオンチャネルの膜電位依存性パラメータやスパイク発火の閾値電位に影響するが、静止膜電位そのものには影響しないと考えられてきた。最近我々は、マウス由来の神経芽細胞腫において、生理的条件下（ $[K^+]_o < 10\text{mM}$ ）の静止時では種々の選択的なイオンチャネルがほぼ閉じており、この時、表面電位変化が直接膜電位変化として観測されることを見出した（B. B. A. 262, 256—264）。そこで本共同研究では、同様のことがイカ巨大神経においても成立するかどうか検討した。

表面電位変化が膜電位変化として観測されるためには選択的なイオンチャネルが充分閉じていることが必要である。そこでまず、イカ軸索膜の静止時での K^+ —選択性について再検討した。他の多くの興奮性膜と同様に、イカ巨大神経は $[K^+]_o$ の上昇に伴って著しく脱分極する（ $[K^+]_o$ を30mMより300mMにすることによって約40mV脱分極する）。この時、多くの軸索で、 $[K^+]_o$ が50mM前後において膜抵抗の不連続な減少が観測された。軸索内を30mM TEAおよび1 mM 4—APを含む溶液で灌流して電位依存性 K^+ —チャネルをブロックした線維では、このような膜抵抗の不連続な減少は見出されなかった。又、膜電位の $[K^+]_o$ —依存性は著しく減少した。（ $[K^+]_o$ の30mMより300mMへの変化によって約25mV変化した）。これらのことにより、 $[K^+]_o$ の上昇による脱分極には電位依存性 K^+ —チャネルが開くことによる寄与がかなりあること、さらに低 $[K^+]_o$ 条件下でのイカ巨大神経膜の K^+ —選択性については従来高く見積られていたことが示唆される。

次に、この様にして電位依存性 K^+ —チャネルをブロックした神経を用い、外液中のCa濃度を変化させた（1～400 mM）。通常の水溶液中の Na^+ を Ca^{2+} で置換して $[Ca^{2+}]$ を変化させても膜電位に著しい変化は見られなかった。一方、Naを取り除いた条件下（グリセロール又は γ -糖で浸透圧を調節した）では $[Ca^{2+}]_o$ を1 mMから200 mMに上昇させると約50 mV脱分極するなど、膜電位に著しい $[Ca^{2+}]_o$ —依存性が見出された。このような現象は、外液のイオン強度の高い環境では、 $[Ca^{2+}]_o$ の変化によって表面電位はあまり変化しないが、Naを取り除いた低イオン強度下では表面電位が大きく変化し、膜電位に反映することを示すものと考えられる。詳細な検討がさらに必要であるが、以上の結果よりイカ巨大神経においても軸索内外のイオン強度が充分低い条件下では、表面電位が膜電位変化として観測される可能性が高いと思われる。

興奮性膜における多面性リガンドの結合とその作用

平野 寛, 西山文昭 (杏林大・医) 山岸俊一, 古家喜四夫 (生理研)

これまで、多価リガンドが細胞膜内表面に直接結合する状態を細胞化学的に可視化し、同時に同一標本で膜興奮性の変化を生理学的に検討した報告はなかった。われわれは、ヤリイカ巨大神経細胞内灌流標本を用い、通常のフェリチン分子 (native ferritin, NF), およびそれをカチオン化した陽性荷電フェリチン (cationized ferritin, CF) を用い膜内表面への結合状態と興奮性に対する変化との関連を追求した。

ローラー法で細胞質を除いたヤリイカ (*Doryteuthis bleekeri*) 巨大神経線維を人工海水に浸し、まず0.01% pronaseを含む 250mM KF 溶液で5分間灌流した。Pronase灌流は残った細胞質を除去し、膜内表面を露出させるために必要な操作であり、そうでないとフェリチン分子は膜内面まで到達しない。K⁺溶液で pronase を洗い出したのち、10℃の条件で CF(Miles Yeda) ないし、NF(Pentex Miles) の細胞内灌流を行った。図1に示すように、10分間の灌流で(a) 0.02mg/ml CF 投与では細胞内表面に CF 粒子の結合は見られない。活動電位にも変化は見られなかった。

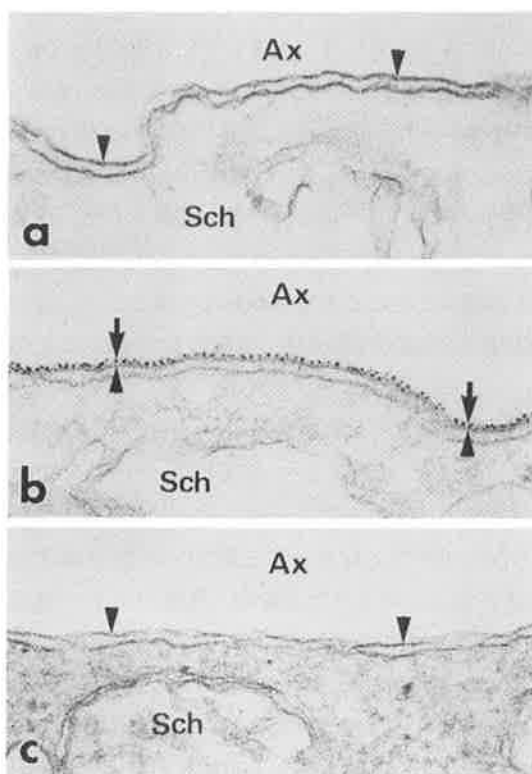


図. 細胞質を除去したイカ巨大神経線維の電子顕微鏡写真.

三角印は細胞膜. Sch はシュワン細胞.

a : 0.02 mg/ml CF. b : 0.5mg/ml CF.

矢印は一列に並んだCF粒子.

C : 0.5 mg/ml NF. いずれも75,000倍.

(b)0.5mg/ml CF 投与では膜内表面に CF が一層となって瀰漫性に結合している状態が認められた (約3,000個/ μm^2)。膜外表面でみられる様な clustering, patch formation, internalization の現象は殆ど認められなかった。このとき活動電位の大きさは変わらず、持続が約2倍に延長した。
(c)0.5mg/ml NF 投与ではNF粒子の結合も興奮性の変化も見られなかった。

以上の結果、膜内表面においても陽性荷電粒子のみが結合することから、膜がマイナスの電荷をもつことが可視化された。また CF については更に膜電流の解析の結果、興奮チャンネルに対してはNaチャンネルのみに作用し、その不活性化過程を遅らせる効果をもつことが明らかとなった。

神経毒を用いた神経興奮発生機構解明のための薬理学的研究

瀬山一正, 焼広益秀 (広島大・医)

本研究は生物毒がNa channelに対して特異的作用を発揮する性質を利用して生体における複雑な興奮発生機構を解明しようとして企画された。Tetrodotoxin や Saxitoxin の研究で明らか様な分子内の guanidinium 基の存在は、これらの生物毒が細胞外からNa channelに結合してイオン透過を阻害する作用に必須である。最近細胞内から作用しNa channelを通るイオンの膜透過を阻害する物質についてもやはり guanidinium 基の存在が重要であるという指摘がある。アフリカ産蛙皮膚から抽出された Trypargine(TRG)は guanidinium 基を分子内に有している事からNa channelを通るイオンの働きを阻害する事が予想される。化学的類縁な物質であるB-carbolineはラット縫線核中に特異的に多量に見い出され、5-HT分泌を抑制しているらしい事が神経化学の研究から明らかにされ、 β -carboline 類の神経生理学的データが待望される状態になっている。この様な中でイカ巨大神経を用いて TRG が細胞内からのみ特異的にNa channelをblockする事を明らかにし、その際 TRG の受容部との結合についての kinetics を明らかにする事を行なった。実験はイカ巨大神経において膜電位固定法及び細胞内灌流法を用いて行なった。1 $\times 10^{-4}$ M TRG の細胞内投与によってNa channelのみが選択的に抑制されK channelには影響を与えなかった。同じ濃度の TRG の細胞外投与はいずれの channel にも影響を与えなかった。Na channelにはゲートの開閉がある事から細胞内より TRG が膜内に存在する結合部位に至る量は時間的制限を受ける。もし Pronase 処理によって不活性化過程を選択的に除いた状態に軸索が出来れば TRG の結合部位へ至る時間は人為的に制御出来る事になる。それ故この条件下で始めて受容部との結合の解析が可能となる。TRG 存在下でNa電流は単一時定数を待って減衰し、 I_{Na} の減衰は脱分極が大きい程強くその際の時定数も短縮された。これらの事実から TRG と受容部との結合は $\text{Rest} \xrightleftharpoons[k_1]{H-H} \text{Open} \xrightleftharpoons[k_2]{I} \text{Occluded}$ と表わされる事が解かった。TRG の膜電位と結合(k)及び解離(l)定数の関係が求められた。結合定数 $k=b[\text{TRG}]$ でありbの値は外液Na⁺濃度に依存す

る事なく $b = 1.1 \times 10^3 \times e^{0.018V}$ (Vは保持電圧) という関係を持つ。lは膜電位に対し比較的に独立でありkに比べ一桁大きな値を示した。この結果 TRG の受容部との結合は結合定数依存性であると結論された。これらの結合を考慮すると縫線核における β -carboline は Na channel を制御する事によって神経末端からの伝達物質の放出を調節すると考えられる。

神経膜および細胞骨格の活動を制御する Ca イオンと関連物質

山岸俊一, 古家喜四夫, 八木沢 仁 (生理研), 藤田省三, 下地恒毅 (新潟大・医)

われわれは細胞内 Ca が神経膜興奮活動を大きく制御していることを生理学的実験によって明らかにしてきたが、このとき細胞内 Ca は膜高分子および膜近傍に存在する細胞骨格にどのような変化をもたらすかを究明するため、形態学的、生化学的検索を進めた。

イカ巨大神経線維を人工海水に浸して 100 mM K-glutamate 溶液 (glycerol 溶液が外液と等張に調整) で細胞内灌流を行い、細胞内に 0.3 mM 以上の Ca イオンを加えると興奮発性のための閾値の著しい低下 (10~20 mV), 活動電位持続時間の延長 (2~3 倍), 活動電位の大きさの漸減, 膜抵抗の減少などが生理的特徴としてあらわれる。

図 1 は細胞内 Ca 投与, pronase 投与時の生理的变化と対応づけた膜内表面の走査電顕像を示している。a. は 100 mM K-glutamate で 10 分間灌流したとき, b. は 1 mM Ca を加えて 10 分経過した

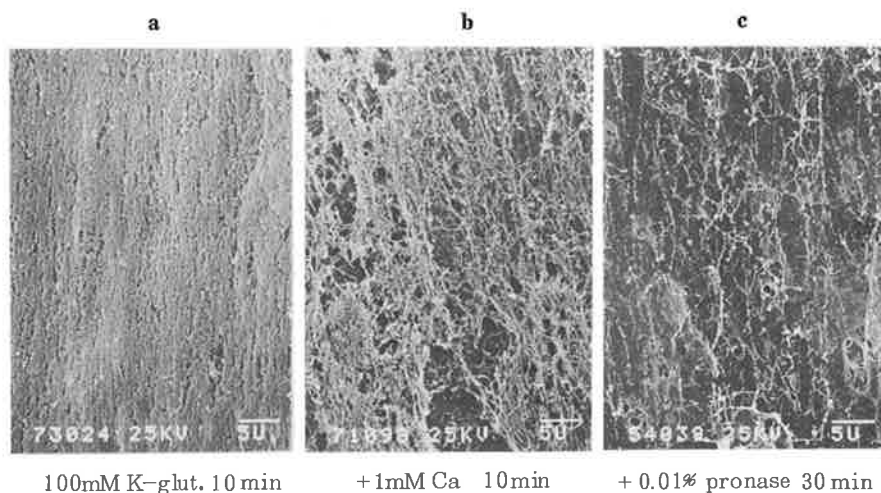


図 1. イカ巨大神経膜内表面の走査電顕像。

ときの内表面の状態を示している。細胞骨格はニューロフィラメント, マイクロチューブル, アクチンが主成分といわれているが, a ではそれらフィラメント間にもかなり密に物質が存在することがわかり, b ではフィラメントが露になると同時に密度もかなり粗になっている。c では 0.

0.1% pronaseを加え30分灌流した時の電顕像で殆どの細胞骨格が消失している。尚、b. c. の状態で膜興奮性は保たれていた。

イカ巨大神経を種々の灌流液で細胞内灌流し、溶出してくる蛋白を SDS-PAGE で分析した。3~10 mM Ca^{2+} 添加の場合、 K^+ 溶液のみでは現れない分子量 5~7 万の数本のバンドが見られた。これは細胞骨格をつくる蛋白の一部が分離してきたものと判断される。Ca 灌流後、0.1% SDS を加えた K^+ 溶液では分子量 20 万（ニューロフィラメントか？）を含む 4.3 万以上のバンドが約 15 本出現した。これらは細胞骨格および膜を構成する蛋白の分画と推定される。0.01% pronase を含む K^+ 溶液では溶出した筈の蛋白はすべて低分子に分解され、バンドとしては現れなかった。SDS-PAGE による解離溶出蛋白の所見と処理後の膜内表面電顕像の所見は対応のつく説明ができると考えられる。ただ、今回の形態学的・生理学的アプローチでは興奮チャネルの変化に結びつくチャネル蛋白の変化や抽出を明らかにする段階には至っていない。また Ca^{2+} で活性化される酵素の活動を抑制する leupeptin, trifluoperazin の効果を探ったが、生理的にも生化学的にもまだ有意の変化は把握していない。

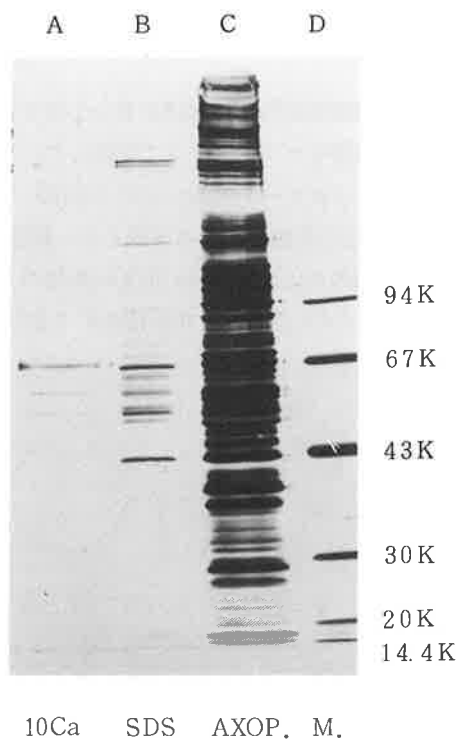


図2. SDS-PAGE によるイカ巨大神経の蛋白バンド。

A, 10 mM Ca で流出したバンド。

B, 10 mM Ca 灌流後、0.1% SDS により流出してきたバンド。

C, 細胞質の蛋白バンド。

D, マーカー。

HRP 電顕法による網膜神経回路の解析

金子章道（生理研），塚本吉彦（兵庫医大），山田雅弘（工技院，電総研）

コイ網膜において杆体視細胞とシナプス結合を持つ中間水平細胞の三次元的構築を明らかにすることが本実験の目的である。特に中間水平細胞が錐体と結合する他の水平細胞の特徴となっている軸索状突起を有するか否かは未だ確立していないので，この点に注目して研究を行った。

暗順応したコイの眼球から剝離した網膜を酸素ガスを送気した試料室に置き HRP をつめたガラス微小電極を用いて細胞内刺入を行った。杆体入力型の水平細胞を光応答電位の波形から同定し，パルス通電により HRP を注入した。10 分間放置後，2 % グルタルアルデヒド・1 % パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝溶液に浸漬，1 時間固定した。DAB 法により HRP を発色させ，光顕観察ののち，標識細胞を含む組織片をガラス面上に薄紙をあてて支持し，1 % OsO_4 で 1 時間固定した。0.5 % 酢酸ウランによるブロック染色のあと，脱水，置換し，アララルダイト樹脂で平板状に包埋した。

先端面に溝を切った円柱状の樹脂製試料台に網膜を含む平板を視細胞側を上にして架橋するように貼り付け，視細胞の外節と内節をガラスナイフで切除した。試料片を台から外して，スライドガラス上に固持し，プランアポクロマート対物レンズ（ $\times 100$ ，油浸）で視野と焦点位置を連続的に変えて写真撮影した。1,500 倍の光顕写真を再構成して，細胞の全体像を検索した結果，(1) 水平細胞の樹状突起と杆体視細胞のシナプス結合が $0.3\mu\text{m}$ 程度の分解能で観察が可能となり（図 1），水平細胞の型の同定，シナプスの個数と分布の解明ができること，(2) 軸索状突起の検索，

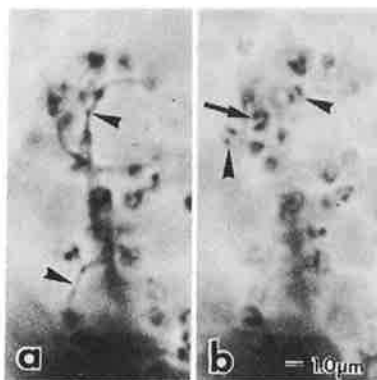


図 1.

(a) HRP を注入した水平細胞の樹状突起の細糸（矢頭）。

(b) 焦点位置を $2\mu\text{m}$ 変えると，杆体視細胞終末のシナプスリボンの両脇に入り込んだ突起の先端が一對の線状（矢頭）または馬蹄形状（矢印）に見える。このように光顕の限界分解能近くで全細胞体の観察が可能である。

突起の長さ等の計測が容易にできること、が明らかになった。今のところ、15例の杆体入力型の間水平細胞が応答と形態の両方から確認され、それらは少なくとも1本の細長い突起（平均±標準偏差、 $150 \pm 65 \mu\text{m}$ ）を有していた。また、間水平細胞は1個あたり約700個以上の杆体とシナプス結合を持つことがわかった。

光顕のあと電顕観察を進め、標識シナプス部位が杆体終末であることを微細構造の特徴から確認した（図2）。さらに、シナプス構造の三次元的構築を明らかにするため、連続超薄切片による再構成と超高圧電顕による厚い試料の観察を行い、興味深い所見が得られつつある。

細胞内染色に使われる色素としてHRPは蛍光性色素に比べて、光顕と電顕両方の観察が容易である点ですぐれているが、浸透性ではいくらか劣っている。それに関連して、細長い突起の先端の詳細に関してはいまだ不明な点が多い。今後、ルシファー・イエローなどの色素による細胞内染色を併用して検索を進める必要がある。

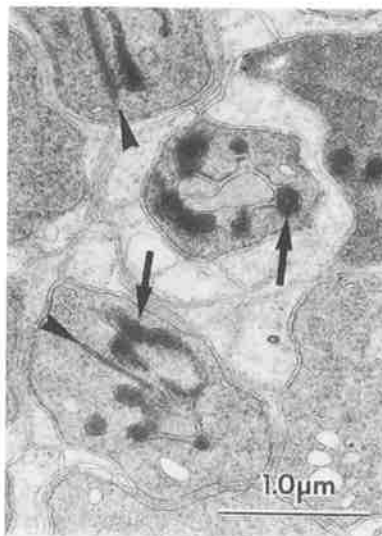


図2.

杆体視細胞シナプス部の横断面の電顕像。HRPで黒く標識された水平細胞の樹状突起（矢印）が認められる。杆体終末には各1個のシナプスリボン（矢頭）がある。

脊椎動物網膜の視細胞とC型水平細胞のシナプス結合

大塚輝彌（生理研），神山暢夫，渡辺宏助（東大医大）

脊椎動物網膜の2次ニューロンである水平細胞は色光照射に対する応答様式からL型とC型に

分類される。C型水平細胞は照射する色光によって過分極又は脱分極性応答を示す。この脱分極性電位は水平細胞から視細胞へのフィードバック経路を介して（その機構は不明であるが）、符号を反転してC型水平細胞に入力されるためであると考えられている。中でも3相性C型水平細胞は青感受性錐体とのみシナプス結合していて、緑—赤色光に対する応答は他の水平細胞から青感受性錐体へのフィードバック経路を伝わって来ると信じられてきた。ところが最近、カメ網膜で青感受性錐体と考えられていた無色油滴を含む錐体の約2/3は赤感受性錐体であることが明らかになった（生理学研究所年報，第5巻，1984，P. 59）。そこで3相性C型水平細胞が青感受性錐体のみから入力を受けていることを再確認するため HRP—電顕法によって両者のシナプス結合を直接検索した。

実験には甲長20cm前後のアカミミガメから摘出した眼球杯標本を用いた。単色光刺激により3相性C型水平細胞を同定した後，記録電極から HRP を電気泳動的に注入した。網膜を固定，DAB 法で発色し油滴を観察した後に脱水・包埋して光顕及び電顕用連続切片を作製した。

図1は3相性C型水平細胞の色光応答を示した。この細胞は青—緑（380—550nm）と赤色（>660nm）光照射に対して過分極性応答，一方黄—橙色（580—620nm）光照射には脱分極性応答を示す。応答の感度極大が青色光にあることから，この細胞は主に青感受性錐体から入力を受けると推定される。DAB 処理後，光顕下で観察すると，3相性C型水平細胞は細胞体から5—8本の細かい樹状突起を50—70 μ m放射状に延ばし，突起の途中や先端には視細胞とシナプス結合する小突起（knob）が多数見られた。さらに「油滴を手掛りとした光顕—電顕の連続切片の重ね合わせ法」により HRP で標識した3相性C型水平細胞の樹状突起が侵入しリボンシナプス結合している視細胞の種類と数を調べた。この結果，図1に示した細胞は23個の錐体視細胞の軸索終末にシナプス結合していた。このうち15個は蛍光性無色油滴（赤感受性錐体），7個は非蛍光性無色油滴（青感受性錐体），そして1個は赤色油滴（赤感受性錐体）を各々含んでいた。

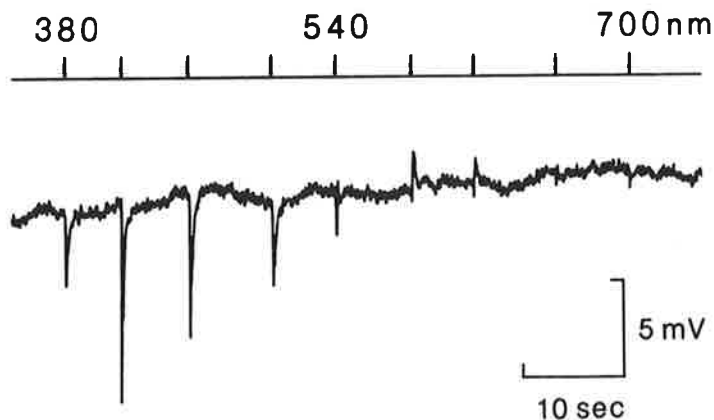


図1.

アカミミガメの3相性C型水平細胞の色光応答。等光量子数に調節した単色光（380—700 nm，40 nm 毎）を順次 20msec 照射した。光刺激は図の上部に示した。

これらの結果は3相性C型水平細胞が青感受性錐体とシナプス結合して直接入力を受けるという従来の知見を支持する。しかし黄—赤色光に対する応答は青錐体に他の水平細胞からフィードバック経路を介して来た間接的な信号であるという説は明らかに誤りであった。3相性C型水平細胞にシナプス結合する錐体の2/3は赤感受性錐体であるから、黄—赤色光に対する応答は直接赤感受性錐体からリボンシナプス結合を通して入力されと考えられる。今後、他のI型及びC型水平細胞にシナプス結合する錐体の種類と数を精しく検索し、視細胞—水平細胞間の信号伝達機構を解明したい。

内耳有毛細胞に於けるアミノ配糖体の作用部位の探索

吉岡 亨（横浜市大・医）

ネオマイシンなどのアミノ配糖体が耳毒性を示すことはよく知られているが、その作用点については未だに不明である。近年、米国のSchachtらはその作用点としてTriphosphoinositide (TPI)を提案している。我々はモルモットの内耳有毛細胞のリン酸化実験などから、アミノ配糖体の作用点はむしろphosphatidic acid (PA)ではないかと考えている。本研究はこれら2つの可能性のうち、どちらがより確からしいかについて主として形態学的に明らかにし、その分子がどこにどのように存在しているのかを調べる目的で行った。すでに我々は上記アミノ配糖体の作用分子としてのTPIのモノクローン抗体を単離しているので単離したモルモット内耳有毛細胞膜表面についてTPIの局在をPAPを用いて免疫細胞化学的に検討し、感覚毛表面に強い陽性反応を認めた。

聴前庭器感覚上皮における細胞間連絡の研究

古河太郎（東京医歯大・医）

聴前庭器感覚上皮の支持細胞がGap Junctionによって互に密に連絡していることは、よく知られているが、感覚有毛細胞と支持細胞との間にも若干の細胞間連絡路の存在することが見出されている（K. Hama, 1980）。本研究は電気生理学的方法と細胞内色素注入法を含む光顕・電顕による検索を併用し、上記二つの細胞間連絡路の性状を調べ、それらの機能的意義を明らかにしようとするものである。

本年度は食用ガエルの小嚢（球形嚢）を用いて研究し、剔出した小嚢斑を鏡下で強拡大で観察しながら、有毛細胞あるいは支持細胞から微小電極による細胞内記録を行ない、蛍光色素（ルシ

ファイエローその他)を注入し、固定透明化の後、蛍光顕微鏡で色素の拡がり方を調べた。電気生理学的操作および色素注入は東京医科大学医学部第1生理学教室において行った。Freeze fracture 法による細胞膜構造の観察は生理学研究所で目下進行中である。

筋細胞における細胞骨格および筋原線維の分化

嶋田 裕 (千葉大・医)

筋細胞には収縮を司る装置として筋原線維がある。この装置は、一般の細胞に共通にみられる細胞骨格が、筋細胞で特殊な分化をとげた構造物であると考えられることができる。本研究は、筋細胞の発生過程における細胞骨格と筋原線維を、微細形態学的方法と免疫細胞学的方法とを組み合わせることにより解析することを目的とする。すなわち、生物の重要な機能の1つである細胞の支持、運動に関与する構造の分化と、それらを構成する蛋白質の性質(特に抗原性)の変換との関係について追求する。細胞は分化の結果、特殊な蛋白質と構造を作る。これは遺伝子発現にもとづくもので、本研究は筋(および細胞骨格)蛋白質の作る構造を指標として、遺伝子発現の相様を解明するという意義がある。

本年度においては胚子期の骨格筋と心筋およびその培養細胞を材料とし、細胞骨格および筋原線維の分化について、つぎの方法により調べた。

発生各段階における細胞を界面活性剤処理あるいは凍結割断することにより、細胞内の細胞骨格と筋原線維を露出させ、その立体微細胞構造の発生分化をフリーズエッチング装置、透過型および走査型電子顕微鏡を用いて観察する。

条件付学習哺乳動物の赤核におけるシナプスの可塑性

小田洋一 (大阪大・基礎工), 塚原伸晃 (大阪大・基礎工, 生理研)

村上富士夫 (生理研), 勝丸博信 (生理研)

学習の神経機構を明らかにする最良の方法の1つは、①適当な学習行動を選択し、②それを制御する神経回路を同定し、③学習によってその神経回路のどの要素がいかなる変化を遂げたかを明らかにすることである。実際、この方法を用いてKandelやAlkonらは無脊椎動物における学習の神経機構の解明に成果をあげてきているが、哺乳動物のような高等動物における学習の機構が無脊椎動物のそれと同一であるとは考え難く、この問題に関しては直接哺乳動物を用いた研究が必要となる。本研究の代表者である塚原伸晃や小田洋一らはネコの大脳脚への刺激を条件刺激、

対側前肢皮膚の電気刺激を無条件刺激として与えることによって前肢肘関節の屈曲を条件付けることに成功し、この条件付学習は皮質→赤核細胞のいずれかの部位で起っていることを見出した。さらに条件付学習の成立したネコでは大脳脚の刺激によって赤核細胞に発生する単シナプス性 EPSP の立上り時間が非条件付学習ネコで観察されるものに比べて有意に短いことを見出した。これは従来より研究をおこなってきた中位核破壊ネコや末梢神経交叉縫合ネコの赤核で見られたものと同様な変化であり、これらの場合と同様にシナプス発芽が EPSP の立上りの変化に寄与している可能性が強い。本研究はこのことを電子顕微鏡を用いた形態学的解析によって明らかにすることを目的として開始した。

大脳脚と対側前肢皮膚の組合せ刺激によって条件付学習の成立したネコの大脳感覚運動領を除去すると共に赤核脊髓路に HRP (horseradish peroxidase) を注入した。その 4 日後に赤核脊髓路細胞を電気生理学的に同定し、その細胞内に HRP を電気泳動的に注入したのち、ネコを灌流固定し、ビブラトームで 100 μ m の厚さの切片をつくり、DAB (diaminobenzidine tetrahydrochloride) を用いて、HRP の細胞内注入を受けた、又は逆行性に取り込んだ赤核脊髓路細胞を選び出し、超薄切片をつくって電子顕微鏡による観察をおこなった。

現在のところ大脳感覚運動野由来と思われる変性終末の多くは赤核細胞の樹状突起上に見出されているが、解析例数が充分とは言えないため引き続き研究を続行中である。

脳切片標本による視覚中枢の可塑性の研究

外山敬介, 小松由紀夫 (京都府立医科大), 村上富士夫 (生理研)

1. 研究目的

大脳視覚野についてシナプスの可塑性と神経回路網の自己組織化のメカニズムを明らかにする。

2. 研究内容および成果

すでにこれまでの研究により、幼若期のネコでも視覚中枢の神経回路網の全ての部分のシナプスが可塑的であるのではなく、少なくとも一部は固定 (完成) された状態にあり、可塑的な (未完成な) 部分の自己組織化が完成された部分の制約の下に行なわれることを示している。

本年度は視覚中枢の興奮性シナプス結合の生後発達を調べることによりこの作業仮説の可否を更に検討した。

生後 1—9 日の子ネコでは外側膝状体細胞の軸索との興奮性シナプス結合 (図 2 の黒のヒストグラム) が II—VI 層の全ての視覚中枢細胞に見出され、視覚中枢細胞との興奮性シナプス結合 (図 1 の白のヒストグラム) は、V, VI 層の細胞にわずかに見られただけであった。

ネコの年令の増加の伴い II 層の細胞のシナプス結合に大きな変化が起る。II 層の細胞は外側膝状体軸索とのシナプス結合を失い、これに代って視覚中枢細胞とのシナプス結合が現われる。年

令の増加に伴って、これらのシナプス結合の強度は次第に大きくなり、生後110日ではほぼ成長したネコと同じになる（図2）。一方シナプスの遅れにはほとんど変化が見られない。このことから、生れたての状態では視覚中枢の全ての細胞が外側膝状体軸索と無差別に弱い興奮性結合を持つが、感受性期にかけてⅡ層の細胞は外側膝状体とのシナプス結合を失い、他の視覚中枢細胞とシナプス結合を持つようになると考えられる。層により多少の差があり、発達はⅤ層で最も早く、Ⅵ層で遅い。

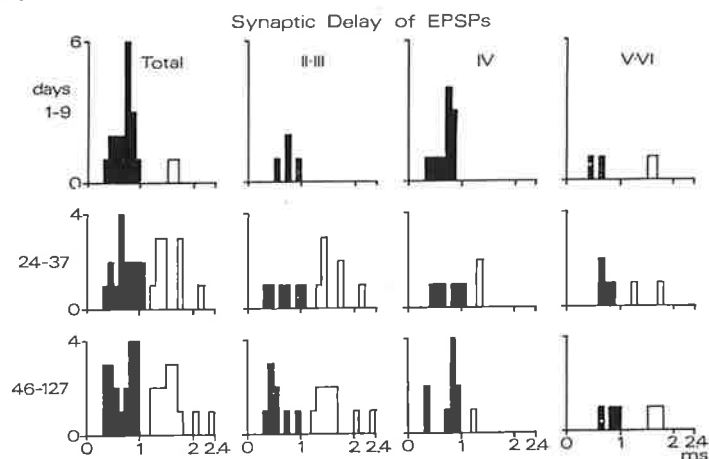


図1. 興奮性シナプス結合の生後発達。

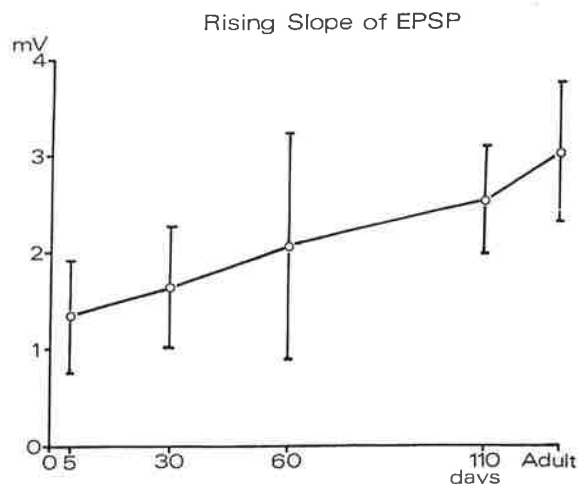


図2. 興奮性シナプス結合の強さの生後発達。

以上の結果を総合し次の結論が得られる。1) 生後直後の視覚中枢では全ての細胞が無差別に外側膝状体軸索と弱いシナプス結合を持つ。2) 神経回路の自己組織化はⅡ層の細胞が外側膝状体軸索とのシナプス結合を失い、他の層（特にⅢ，Ⅳ層）の細胞とシナプス結合を形成するという形で行なわれる。この結論は視覚中枢の神経回路の自己組織化が主としてⅡ—Ⅲに局限して起ることを示し、作業仮説を支持している。

聴覚中枢の可塑性の研究

橋本 享（東京医歯大・医用研），谷口郁雄（生理研），山岸俊一（生理研）
森山俊男（独協医大），棚橋汀路（名古屋大・分院）

^{14}C デオキシグルコースを用いた聴覚系のオートラジオグラフィによって，谷口らが見出した聴覚中枢の機能的な可塑性についての知見を基礎として，聴覚系の局所的破壊に伴う聴覚中枢の再構築の経過を，HRPを用いた形態学的観察および単一ニューロン活動の観察により追跡した。聴覚経路の破壊・切断後のシナプスの再生およびその機能回復に着目し，聴覚中枢の可塑性について実験的検討を加えることが，本研究の目的である。

マウスを材料として，下丘交連を切断したのち，その回復のプロセスをHRPを用いて経時的に追跡し，両側の下丘を結ぶ神経軸索の再生を組織学的に検索した。その結果，下丘交連線維は切断部を乗り越えて再生し得ることが判明し，軸索の再生には3—4週の期間を要するということが判った。4週後には交連線維群は切断部を横断して，対側下丘内のほぼ対称的な部位まで線維を伸長させることが見出された。線維が切断面を横断するためには，組織の再生が順調で強度の瘢痕形成のないところが選ばれるようではあるが，切断例の殆んどすべての場合に再生が見られるので，多少の瘢痕形成があっても，線維の終止するべき目標の神経核すなわち対側の下丘が健在である限り，切断部を横断して線維の伸長が発生する。

次に形態学的には再生した線維連絡が，切断以前の機能を回復しているかどうかを神経生理学的に調べた。実験材料としてラットを使い，下丘交連を予め切断し，その回復を3～4週まった後，下丘交連部再構築の模様を実験的に調べた。実験の手順としては，直視下においた両側の下丘の一方から，音刺激に対する単一神経応答を記録し，他方の下丘には電気刺激を与え，下丘交連線維を経由して先の単一ユニットの活動に及ぼされる電気刺激の影響を観察するという方法をとった。また音刺激のない状態で，電気刺激のみを与え，下丘交連線維を経由して他側の下丘で見られる神経活動を記録した。下丘交連を再び切断し，上記の神経活動に対する急性的な影響を観察した。下丘の聴応答に対して，対側下丘に与えた電気刺激は抑制的影響を及ぼし，その抑制効果は50ms以上も持続した。音刺激のない状態で見られる交連線維経由の電気刺激に由来する下丘神経活動には，潜時が20msにも及ぶものが見られた。これらの応答は下丘交連の再切断ですべて消失するので，交連線維を経由したものと考えられる。対照群の健常ラットについても同様の結果を得た。

筋感覚神経細胞に対する神経成長因子の効果

久野 宗（生理研：京都大・医），宮田雄平（生理研：東京医歯大・医）

本間信治（富山医薬大・医），小川正晴（高知医大）

研究目的

体性感覚神経細胞は胎生期において神経成長因子（Nerve Growth Factor：NGF）の栄養効果によって維持されている。生後の動物においては，体性感覚神経細胞の NGF 依存性は消失し，NGF の投与，あるいはその欠如によって感覚神経細胞の数と形態には変化が見られない。しかし，生後の感覚神経細胞の機能の維持に NGF が関与しているか否かは不明である。本研究は，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生後のラットにおいて NGF によって影響されるかを検討することを目的とする。

実験方法

雄マウスの顎下腺から 2.5S-NGF を抽出し，また，これを家兎に皮下注射することによって NGF に対する抗血清を作製した。新生ラットに，出生翌日から 4—5 週間の間，NGF ($2\mu\text{g/g}$ body weight)あるいは NGF 抗血清 ($10\mu\text{l/g}$ body weight)の皮下投与を行った。この処置後数日から 1 週間して，ラットの lateral gastrocnemius-soleus (LGS) 脊髄運動ニューロンから細胞内電位を記録し，下肢の LGS 筋神経刺激に対する単シナプス性 EPSP の大きさを正常のラットの結果と比較した。

結果及び考察

図 1 A は，正常のラット (11 匹) の 103 個の LGS 運動ニューロンから記録した EPSP の大きさの分布を示す。この平均値は，2.4 mV であった。図 1 B は，NGF を投与した 6 匹のラットから得た結果 (60 運動ニューロン) で，EPSP の平均値は 3.0 mV と正常より有意の増大が見られた。しかし，NGF 抗血清投与した 6 匹のラットから得た EPSP の平均値 (2.4 mV) は正常と差がみとめられなかった (図 1 C)。生後のラットの後根神経節の substance P 量が NGF 投与によって増加することから，NGF は感覚神経細胞の特異なグループの伝達物質機能にのみ効果を示すと言われている。本研究の結果は，筋紡錘由来の Ia 感覚神経も NGF に対して反応することを示した。NGF 抗血清が無効であったから，内因性 NGF の生理的作用に関して現在不明である。もし，内因性 NGF が筋紡錘の被膜内に存在すれば，NGF 抗血清に影響されないと考えられるが，この可能性の検討は困難である。

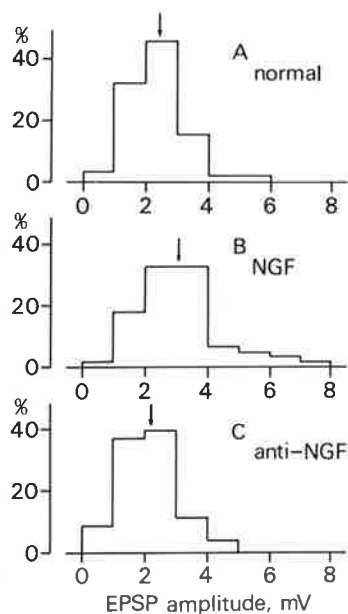


図1. 下肢 lateral gastrocnemius-soleus 筋神経刺激によって誘発して同種 EPSP の大きさの頻度分布。A, 正常ラットからの結果。B, NGF 処置ラットからの結果。C, NGF 抗血清処置ラットからの結果。

高次感覚器における受容細胞・求心神経間の伝達物質：HPLC による分析

小原昭作, 梅北峻一, 岡野桂樹 (帝京大・医), 金子章道 (生理研)

聴・側線器の求心性シナプス伝達物質を同定するために、生物由来の活性物質を追求してきた。これらと、ここでの候補物質とされたグルタミン酸 (Glu), アスパラギン酸 (Asp) との差異については、生物検定および Glu の特異的阻害剤としてのジョーログモ毒 (JSTX) の効果などを先に報告した。

これらの未知の活性物質の同定のために、より高感度、高分解能の化学的検出手段を開発する必要がある。今回は陽イオン交換樹脂による高速液体クロマトグラフ (HPLC) とオーフタルアルデハイド (OPA) 蛍光検出法による生体アミン分析法を試みた。

試料1) 刺激・放出液：ゴンズイ電気受容器の受容器単位 (アンプラ) を 5～8 ケ単離し、頻数、最大の電流刺激を与え、15 分後に灌流液を採取する。試料2) 日本ナマズの血漿低分子画分 (MW < 1000)：採血、遠心分離後に限外ろ過、ゲルろ過により分画。活性は生物検定により確かめた (図1)。

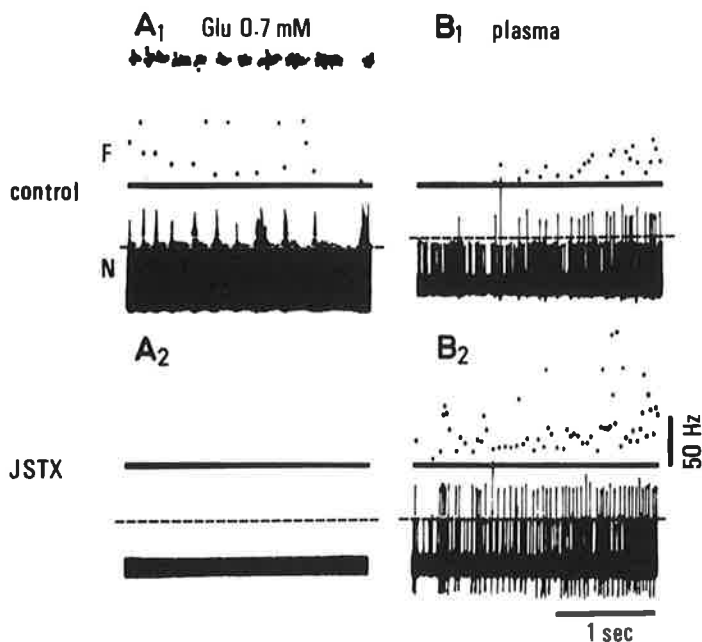


図1. JSTX 投与 (1unit/100 μ l) 後の Glu と血漿画分の活性の比較。条件刺激により受容細胞からの伝達物質放出は完全に抑圧している。A: Glu 0.7mM 投与。B: ゲルロ過 (セファディクス G-10. DW) による血漿の活性画分投与 (元の血漿に対して12.6倍濃縮)。A₂, B₂: JSTX 投与後の応答。N: 求心神経放電。F: N中の破線を越える unit の瞬間周波数。血漿画分の活性は JSTX 投与で影響されないことに注意。

Table 1. Concentrations of Identified Amino Acids in Plasma Active Fraction and in the Perfusate Obtained in Stimulus-release Experiment.

	plasma fraction		perfusate		plasma fraction		perfusate
Taurine	168	μ M	4.3	μ M	Valine	53	μ M
α -Phospho ethanolamine	58		-		Methionine	62	-
Threonine	153		0.47		Isoleucine	7.6	0.40
Serine	3.9		-		Leucine	5.9	0.68
Asparagine	-		3.5		Tyrosine	468	-
Glutamic acid	264		-		Phenylalanine	-	0.24
α -Aminoadipic acid	19		-		β -Alanine	0.73	0.17
Proline	19		-		β -Amino-iso- butyric acid	20	-
Glycine	1.2		1.7		GABA	5.4	-
Alanine	20		2.8		Hydroxylysine	30	-
α -Amino-n- butyric acid	6.5		-				

結果: 図1は上記試料のうち, 血漿中の活性物質が JSTX 投与後でも有効であることを示す。このとき 1 mM の Glu, Asp の効果は完全に阻害されるが, シナプス伝達は阻害されず, こ

の活性物質が伝達物質と類似することを示唆する。

上記の二種の試料は凍結乾燥後、希釈液に溶解し、HPLC（島津LC-4A）に注入した。分析条件は島津の2液グラジェント法の原法を一部変更してある（図2）。

図2 Aは血漿試料の分析結果を示す。全部で62成分が検出されるが、このうち保持時間で同定、定量できたアミノ酸を表1に示す。Aspは未知物質の大きなピーク直後に溶出したので定量できないが、Glu (0.26mM) と共に、生物検定の感度以下である。

図2 Bは刺激・放出液の結果であり、22成分が検出できた。他の例とも合せると23~24成分が存在する。Glu, Aspともに検出されない。未知成分のうち、血漿試料とも共通して存在するものが3~5成分（●印）あることに注意したい。

今後は、血漿試料をさらに細分画し、活性画分中に残留する成分、特に上記の刺激・放出液との共通成分を中心に分析を進める。なお、この血漿試料はゴンズイ半規管でも求心神経放電の増加を起すことが確かめられた。

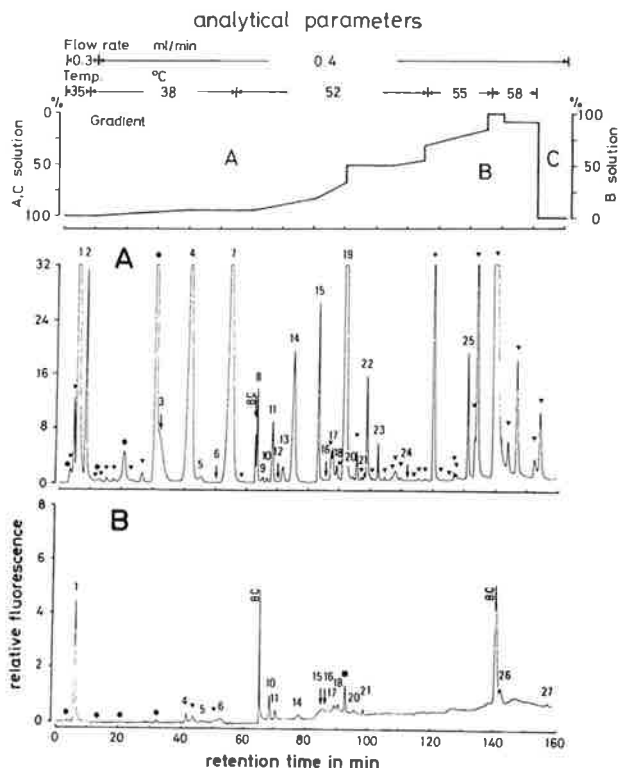


図2. 前図の血漿試料（A）と刺激・放出液（B）のHPLCによるアミノ酸分析。分析の各 parameter は図の上に示す。カラム： Shim-pack ISC-07/S 1504Li 形。15 cm。移動相： A液，クエン酸リチウム緩衝液 pH 2.48。B液，クエン酸リチウム・ホウ酸緩衝液 pH 10.05。C液，水酸化リチウム。検出感度：一級アミンのみの検出でβ-アラニン 0.5p mol/20μℓ。二級アミンを含める（次亜塩素酸 Na 存在下）と 2p

mol/20 μ l。▼：未知物質。●：未知物質中で A, B 共に共通する peak。■：未知の二級アミン。BC: buffer change noise。A, B 間の縦軸の差に注意。定量しうる既知物質の濃度は表 1 に表わす。

1, taurine ; 2, o-phosphoethanolamine ; 3, L-aspartic acid ; 4, L-threonine ; 5, L-serine ; 6, L-asparagine ; 7, L-glutamic acid ; 8, L- α -aminoadipic acid ; 9, L-proline ; 10, glycine ; 11, L-alanine ; 12, L-citrulline ; 13, L- α -amino-n-butyric acid ; 14, L-valine ; 15, L-methionine ; 16, L-cystine ; 17, L-isoleucine ; 18, L-leucine ; 19, L-tyrosine ; 20, L-phenylalanine ; 21, β -alanine ; 22, L- β -amino-is-o-butyric acid ; 23, γ -aminobutyric acid (GABA) ; 24, L-Histidine ; 25, Hydroxylysine ; 26, ammonium chloride + ethanolamine + L-lysine, 27, L-arginine.

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・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作製した。膜電位および膜電流の記録はパッチ電極を用いて行った。単離心房筋細胞は 37°C, 1.8mM Ca^{++} のタイロード液中で, 長さが約 115 μ m, 幅が約 13 μ m で明確な縞紋様が認められた。単一心房筋細胞の静止膜電位は -79mV, アンプリチュドは 117 mV, 最大立上り速度は 263V/sec であった。膜電位固定により, I_{Na} , I_{Ca} , I_{K1} そして I_{K} の存在が確認された。これらの結果は今までに報告されている多細胞標本での結果にほぼ一致していた。次にアセチルコリンによる膜電流の変化について検討し以下の結果を得た。1) アセチルコリン (10^{-8} M ~) によって活動電位持続時間の短縮が見られた。2) アセチルコリンにより外向き電流の増加は, D-600 存在下で時間と共に減少する "relaxation" 現象を示した。3) 細胞内外に Cs^+ を投与することによってアセチルコリンの外向き電流を抑制すると, アセチルコリンによる見かけ上の I_{Ca} の減少作用は著明に減少し, なおかつ用量依存性を消失した。

以上の結果から, アセチルコリンによる I_{Ca} の減少は, 外向き電流それも時間と共に減少する外向き電流が内向きの I_{Ca} に重なり合うために見かけ上減少することが結論された。

単一チャネル電流記録法を用いた神経細胞膜のA電流の解析

河西春郎, 山口和彦, 福田 潤 (東大・医)

亀山正樹, 入沢 宏 (生理研)

本共同研究によって、形質膜に「一過性カリウム電流 (A電流)」を生ずるチャネルの性質が、単一分子レベルで詳しく調べられた。神経細胞の細胞膜にはカリウムによって運ばれる電流が数種類あることが知られている (Delayed K current, A-current, Ca activated K current, M-current, Inward K current など)。従って通常の Whole cell voltage clamp 法によっては個々のK電流を完全に単離し解析することは困難であった。これに対し、Patch clamp 法による単一チャネル電流記録を用いると、一種類の電流を完全に単離することができるのみならず、それを単一分子の性質として調べることができる。今回、この方法を用いてA電流の単一チャネル電流記録を行うことに初めて成功した。

成熟モルモットの後根神経節細胞を酵素的に単離し培養条件下においた。Patch clamp 法による実験においては、この細胞を等張KClに浸した。Patch pipetteにはNaをTrisで置換したリンゲル液を用いた。Patch膜の膜電位を過分極側 (-100 mV) に保持した後、脱分極パルスを与えると、一定の振幅を持った矩形波状の電流が現われた。この矩形波状電流の出現頻度は脱分極の経過に伴い徐々に減少し、30秒以上脱分極側に保持することで消失した。この電流は以下の4つの性質を持つことがわかった。①単一チャネルコンダクタンスは 20 pS で、反転電位はほぼ E_K に従った。②活性化は -50 mV 付近より始まり、③活性化の時間経過は delayed K channel より速く、 0 mV では 8 msec で peak に達した。④ -40 mV より脱分極側に保持することで完全に不活化し、この不活化は -100 mV より過分極側に保持することで除かれた。これらの性質は既に Whole cell clamp 法によって調べられた A-current の性質によく合致する。また Whole cell clamp 法では明らかではなかったが、不活化過程は 80 msec と 4 sec (0 mV) という大きく異なる2つの時定数を持つことが新たに明らかになった。2つの不活化過程はその電位依存性も異なっていた。更にA電流を特異的に阻害することの知られる 4-aminophridine を細胞膜内側から与えて (inside-out patch), その作用を調べた。Whole cell clamp 法による解析から予想されたように、4AP は① mean open time を減少させ、② latency を延長することが確認されたが、更にまた 5 mM においては③単一チャネル電流の振幅も減少させることが明らかとなった。

軟体動物歯舌筋運動の制御機構

—特に中枢神経節細胞の電気生理的性質について—

小林 惇*, 古川 康雄 (広島大・総合科学)

Malte K. Peters (西独 Max-Planck Inst.)

入沢 宏, 野間昭典 (生理研)

軟体動物アカニシの歯舌筋運動に対する中枢神経性制御機構をしらべる研究の一環として、口球神経節運動ニューロンの電気生理的性質を研究した。

口球神経節を覆うシースを機械的にとり去り、露出した細胞をさらに0.1%トリプシンで30分間程処理した。この処理では細胞体の単離はできないので、カミソリの刃で小さな細胞塊に分け、実験用皿に移し、その中でピペッティングを行なった。以上の処理で、軸索部から離れたいくつもの細胞体を得られた。これらの細胞体に対して、パッチ電極法による膜電位固定を行なった。

細胞膜を -30 mV程度の浅い膜電位に保持し、脱分極パルスを与えると、はじめは内向きの小さな電流のみがみられるが、パルスを大きくしていくと、内向き電流に続いて大きな外向き電流がみられるという、軟体動物ニューロンで典型的な膜電流波形がみられた。過分極性パルスに対しては、顕著な電流はみられなかった。また、保持電位を -50 mVより深くしておくと、脱分極性コマンドパルスに対して、一過性の外向き電流が観察された。これはいわゆるA-電流であろうと考えられる。

上と同様の標本に対し、シングルチャネル記録も試みた。この場合、パッチ電極内液は正常人工海水とした。Cell-attached パッチの状態でもよく記録されたチャネル電流は、脱分極させるとその出現頻度が増し、また非常に大きなコンダクタンス (最大約 150 pS) を示す外向き電流であった。Inside-out パッチで、内液を無 Ca^{++} の等張 K-aspartate としても、脱分極時のこのチャネル電流の出現に変化はみられなかった。また、 -80 mV に膜電位固定するとこのチャネル電流はみられなくなり、それ以上過分極させても逆転はしなかった。内液の Ca^{++} 濃度を 2.5×10^{-6} M としても変化がなかったが、その濃度を 1×10^{-4} M にあげると、このチャネル電流の出現の増大がみられ、また -80 mV でもチャネル電流がみられるという、膜電位感受性の変化がみられた。これらの性質は、その Ca^{++} 感受性に違いはあるが、哺乳類唾腺の acinar cell で報告された電位及び Ca^{++} 依存性 K^{+} チャネルに似ており、これと同種のチャネルである可能性が考えられる。

以上の結果はまだ予備的なものであるが、今後の研究により、軟体動物の筋運動に関与する中枢神経細胞の生理的性質を、次第に明らかにして行くことができると期待される。

心筋細胞内 pH 低下の膜電流への影響

今永一成（福岡大・医）

イヌ摘出心室筋に NH_4Cl を一過性に作用させ、これを Tris 緩衝液で除去すると細胞内 pH は低下する。このとき活動電位持続時間 (APD) の延長と収縮力の低下がみられる。ここで HCO_3^- 緩衝液に切り替えると、細胞内 pH の標準値への回復とともに、延長していた APD は短縮始めすみやかに標準値に回復し、収縮力もまた回復する。これを利用し細胞内 pH 低下における電氣的、機械的活動の変化に対する Na^+ -ポンプ、 Ca^{++} 動態の関与を検討した。

サルのバー押し行動による環境温及び体温認知の脳内機構

—体温調節行動及び摂食行動時の視束前野ニューロン反応—

堀 哲郎，清原寿一（佐賀医大）

大村 裕，西野仁雄，粟生修司（生理研）

昨年度の共同研究において、サルの前頭眼窩野 (OBF) ニューロンが体温調節行動発現の動機づけ及至報酬の認知に重要な役割を果たしている事を明らかにした。一方、OBF と神経結合のある視束前野 (POA) の温度ニューロンは体内及び外部環境の温度情報統合を行っており、体温調節行動発現の基盤となっている。今年度はサルの POA ニューロン活動を記録し、cue lamp で誘導した求冷行動または摂食行動遂行時 (FR 30) 及び cue lamp を点燈しないで環境温変化を加えた時の反応を調べた。

71 個の POA ユニットのうち、求冷行動中に反応したユニット 39 個 (55%) は次の 4 型に大別される。①バー押し前から報酬期にかけ活動が増加または減少するもの (26.8%)、②報酬期にのみ活動が変化するもの (5.6%)、③バー押しの少なくとも数十秒前から持続的高頻度活動があり、バー押し期の後半または終了直後に活動減少が起り、報酬期全部またはそれが過ぎても活動が長期間抑制されるもの (8.5%)、④温度変化に持続性或は一過性に、又は cue 音、摂食行動の cue 光や食物提示などのいずれか或はその組み合わせに反応するもの (14.1%)。①型は OBF ニューロンでも我々が見出したものと類似しており、摂食行動でも同様のパターンを示すものが多く、前頭葉—視床下部間の相互神経結合に基づくと考えられる。②型及び一部の①型に見られる報酬期応答は温度レベルや報酬予知音と関係なく、温度下降期に一致して活動が変化し、しかも深部体温が高い程、より低い環境温 (皮膚温) まで下降しないと出現しない。その一部はエサの提示にも反応する。報酬の認知或は報酬獲得に伴う情動変化に関与している可能性がある。③型

は行動遂行の動因が高まっている時に高頻度活動があり、種々の性質から動因レベルを反映している様にみえる。④型は単種または複数の種の感覚性入力に反応するが、一次性感覚情報でなく、サルの内的状態（深部体温の高低に伴う外部温度刺激に対する快、不快や飽食或は空腹状態など）も反映した反応であり、行動発現の為の感覚入力の認知に関係があると想像される。以上の結果は①体温調節行動遂行に必要な感覚入力の識別的認知、行動遂行動因の維持、温熱的快不快感、報酬の認知及至それに伴う情動変化などの機能要素を分担し得る資格をもつニューロンがPOAに存在する事、②温度に反応するニューロンが求冷行動遂行で修飾されるものが多く、一部は更に摂食行動時にも反応するものがあり、体温調節行動のみならず複数の行動にも関与する可能性などを明らかにした。

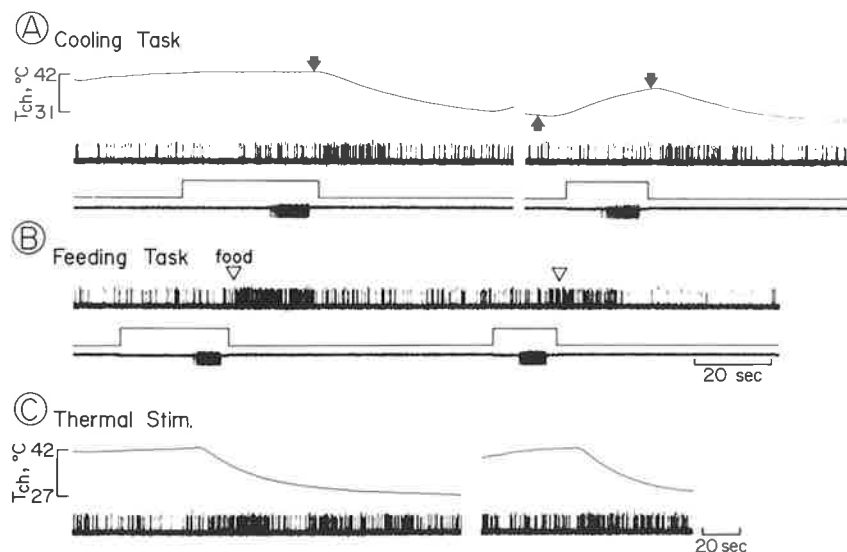


図1. 求冷行動時 (A), 摂食行動時 (B) および環境温度 (Tch) 刺激時のサル視束前野ニューロンの反応。このニューロンでは求冷行動時、温度下降期に一致して一過性に活動が増加するがその温度レベルとは直接関係なく深部体温が高い時は外部温がより低いレベルに下った時、反応する (Aの右)。また摂食行動では食物提示に反応している (B)。受動的な外部温度刺激の時は高温に長く維持しておいてから下げた方が (Cの左)、高温暴露が短期間の場合 (Cの右) より反応が大きい。

慢性オペラント摂食条件付けサルにおける化学感受性ニューロン及び カテコラミン作動系の役割—扁桃体における摂食調節

中野保彦, 大村 裕, 西野仁雄, 栗生修司 (生理研)

László Lénárd (Pecs 医大) 山本智矢, 西村博行, 鍋倉淳一 (九大医・一生理)

扁桃体は従来から主に破壊実験により, 摂食行動に関与することが示されている。すなわちその内側核群の破壊により無食が, 外側核群の破壊により多食が生じる。しかしながら, 実際の摂食行動中の扁桃体ニューロンの活動様式については不明の点が多く, またその活動が扁桃体内に豊富に存在する神経化学物質によりどのような調節を受けるかについてはほとんど知られていない。そこで今回我々は, これらを解明するためサルを用いオペラント摂食行動遂行中の扁桃体ニューロンの活動様式を同定し, 同時に多連微小電極法により電気泳動的にノルアドレナリン (NA), ドーパミン (DA), アセチルコリン (ACh), モルフィン (Mo), およびグルコース Gluc) を投与し, 反応性を検討した。

総計 186個の扁桃体ニューロン中, 128個のニューロンがレバー押し摂食課題において何らかの変化を示した。このうち最もよくみられたのはレバー押し期における活動の低下 (47%) および報酬期における活動の上昇 (29%) であった。レバー押し期における活動変化は, 報酬として与えられる餌の種類により変化を示し, 一般にサルが好む餌で増強した (図 1 A)。また餌を与え

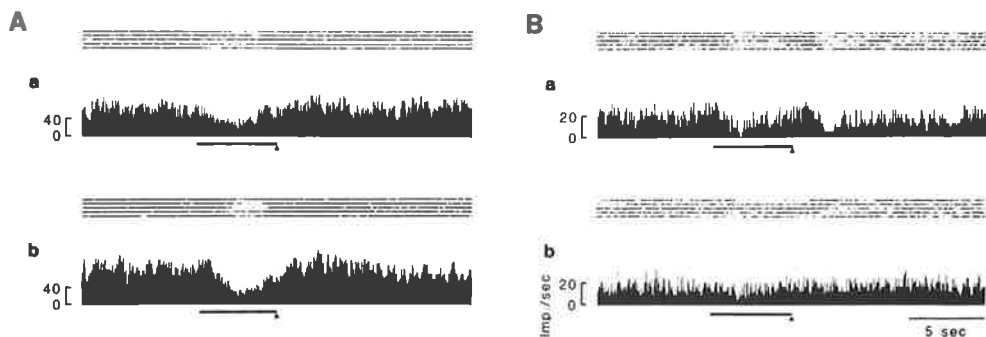


図 1. 報酬として与えられる餌の種類を変えたとき (A) および餌を与えない (消去) とき (B) のレバー押し摂食行動中の扁桃体ニューロンの活動変化。

A; パンの小片を餌としたときのレバー押しの神経活動の抑制 (a) は餌をサルがより好むレーズンに変えると全体の活動頻度が上昇するため増強を示している (b)。

B; レバー押し期および摂食期の活動の抑制 (a) は, 餌を与えないようにすると消失する (b)。上段, ラスター表示。下段, 加算ヒストグラム。黒い太線, レバー押し。黒三角, 手がかり音刺激。手がかり音刺激に続いて約 0.5~1 秒後に餌が与えられる。

ないようにするとレバー押しは続けても、その間の神経活動変化は減弱ないし消失した（図 1 B）。投与した薬物に対し、NA および Mo では主に活動の抑制、DA 及び ACh では主に活動の促進が認められた。またブドウ糖の投与により活動抑制を示すブドウ糖感受性ニューロンが約 15% に認められた。扁桃体内においては、内側核群に DA, ACh, Mo に感受性を示すニューロンが多く、NA 感受性ニューロンは外側核群においてより多く認められた。ブドウ糖感受性ニューロンはほとんどが中心核およびその周辺に見られた。レバー押し期における活動変化と上記の薬物感受性との相関は内側核群において強い関連がみられ、NA, Mo, Gluc に感受性を示すニューロンはレバー押し中有意に低下を示し、DA 感受性ニューロンはレバー押し中、有意に変化を示した。

以上の結果より、扁桃体ニューロンは摂食行動中の神経情報処理に関係しており、報酬による強化あるいは消去といった過程に関与していることが示唆される。また内側核群のニューロンは、解剖学的にも摂食行動と関係の深い視床下部あるいは、下部脳幹自律系と密な連絡を有している。従って、この内側核群において NA, Mo, Gluc に感受性を有するニューロン群が何らかの形で協調して働きレバー押し中すなわち求餌行動中の神経活動に深く関与していると考えられる。また DA 感受性ニューロンは、レバー押し中の活動様式ではなく、活動変化の有無に関連していることから、動機付けられた行動の運動調節に関与していることも考えられる。ACh 系の役割についてはレバー押し摂食行動自体とは直接関連はみられず、大脳皮質において考えられているのと同様、細胞の興奮性レベルの調節に関係していると考えている。一方外側核群のニューロンについては、現在までの所、内側核群と比較して摂食課題遂行中の活動様式に特に大きな差はなく、また特定の薬物との相関性もみられず、その機能については、はっきりしない。今後の検討を要する問題である。

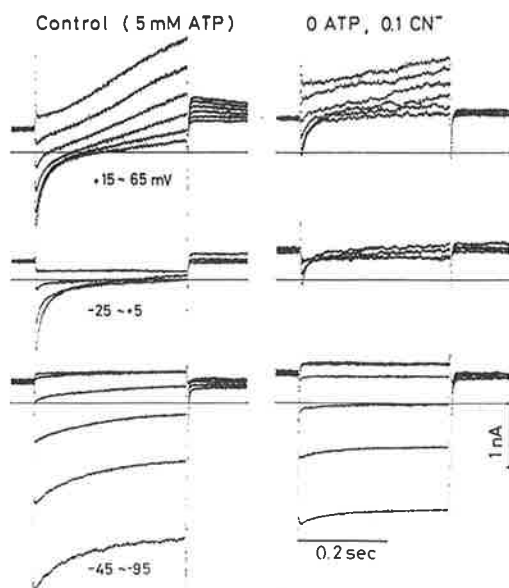
細胞内灌流法による心筋及び神経節細胞膜電流の比較

野間昭典（生理研）、赤池紀生（九大・医）

心筋では低酸素下エネルギー代謝が抑制されると活動電位のプラトー相が著しく短縮する。この原因としては、細胞内 ATP 欠乏による Na-K ポンプ機転の低下による細胞内イオン濃度の変化、それによる膜電流の変化と、ATP によるより直接的なイオンチャンネルに対する影響の二つの可能性が考えられてきた。グルコースを含まず、5 mM の CN⁻を含む液を単一心室筋細胞に与えると、活動電位は短縮するが、このとき、細胞内に刺入した微小電極により ATP を微量注入すると、活動電位は瞬間的に回復する。この結果はイオンチャンネルに対する ATP の直接的な効果を示すのではないかと考えられた。そこで、先端径約 4 ミクロンのパッチ電極を用いて、全細胞クランプ実験をした。電極内液は、細いポリエチレンチューブをパッチ電極内に挿入し、これを通して連続的に灌流した。灌流液のイオン組成は一定に保ち、EGTA 5mM を含む液に各種

濃度のATPを加えることによって、細胞内イオン組成、特にカルシウムイオン濃度を一定に保って、ATP濃度のみを変化させることを試みた。図はその一例を示すが、保持電位は -35mV でナトリウムチャンネルは不活化している。10 mV ステップで脱分極（上二段）、過分極（最下段）に対する電流を示している。カルシウム電流と遅延整流カリウム電流、内向き整流カリウム電流が記録されている。電極内液をOATP, 0.1mMCN液にして、10分後（右図）ではすべての時間依存性膜電流が抑制されているのがわかる。逆に保持電流は外向きに移動し、電流記録上、微小なノイズ成分が増加している。これは、ATP欠乏時開くカリウムチャンネルに基づいていると考えられた。

心筋における上記の変化に対して、神経節細胞で同様の試みをしたが、有意な変化を記録することができなかった。さらに検討する必要があると思われる。



陽性および陰性条件刺激による摂食行動の研究

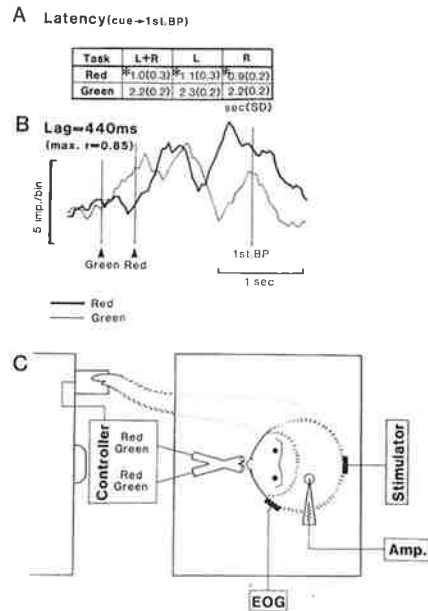
石川友衛, 古賀知行, 宮澤多恵子 (日本大・医)

栗生修司, 西野仁雄, 大村 裕 (生理研)

摂食条件行動と回避条件行動を視覚弁別性の課題として行なわせ、弁別期における前頭眼窩野(OBF)での細胞活動の差を追究した。

〔方法〕 サルの左右耳側眼底に赤か緑に切換えられるスポット光源の手がかり光刺激を与えた。赤の手がかりランプは、30回のレバー押し(BP)をし、報酬としてのパンが与えられ(摂食課

題), 緑のランプでは2.5秒以内に, レバーを持続的に5.5秒間押し続けなければ, 罰として後頭部に通電刺激が加わる(回避課題)。これらの手がかり刺激は, EOGで, サルが中央を固視した時に点灯した。2つの課題は, 3~5回ずつ, 各々両眼・左眼・右眼への刺激として与え, 左OBFに刺入したタングステン電極により細胞活動を記録し, 1st BPをトリガーとして発射頻度のタイムヒストグラムを作製した。



A: 左眼(L) 右眼(R) 両眼(L+R)に加えた手がかり刺激の赤ランプ(Red, 摂食課題)と緑ランプ(Green, 回避課題), 点灯から最初のレバー押し(1st BP)までの平均潜時, *印は課題間に有意差があることを示す。B: 1st BPをトリガーとした前頭眼窩野細胞の発射頻度の移動平均曲線。回避課題と摂食課題間の時差相関係数が最大値(0.85)を示す時の時差は440msであった。これは1st BPまでの両者の潜時差にはほぼ一致する。C: 実験方法を示す図。

〔結果〕 安定して記録できた細胞活動は, 手がかり刺激から1st BPまでの識別期に phasic か tonic に増加を示すものが殆ど(96%)であった。識別期に phasic に応答する細胞について, 摂食課題と回避課題を比較すると, 赤ランプの摂食課題では1st BPに向って発射頻度が徐々に増大するが, 緑の回避課題では急速な発射増大の後, 一旦活動性が低下し, 反応行動としては, 手がかり刺激から1st BPまでの潜時が赤では1秒であるが, 緑では2, 3秒と長いことが特徴であり, この傾向は両眼・単眼刺激の両方に認められた。発射頻度の最高値は, 回避行動では識別期の初めの1秒間に, 摂食行動では1st BPの直前にあり, 各々の反応間に有意差が認められた。また, 回避課題では, Cue toneでBPの終了を知らせた後も光刺激を続けていると, 一旦生じた発火頻度の増加が, そのまま持続するのがみつかった。Tonicな反応を示すユニットでは, 単眼

刺激の発射頻度は、両眼刺激の約半になるのが認められた。赤ランプと緑ランプ刺激による発火頻度の潜時差は、400 ms であり、発火頻度曲線の時差相関係数の最大値を示す場合の潜時440 msにはほぼ一致した。更に、緑に反応した発火頻度曲線の第1, 第2のピークは、赤のそれに対応したが、第3のピークは赤に存在しない独特の要素であった。

以上のことから、視覚性弁別に要する時間差だけでなく、報酬の有無、すなわち課題の違いが細胞活動にも反映していて、動機づけの効果の差となって現われるものと推測される。

延髄腹側部の化学感受性領野ニューロン活動に及ぼす 筋ポリモーダル受容器入力の影響

熊澤孝朗, 江口国博, 只木英子 (名古屋大・環医研)

福田康一郎 (千葉大・医), 入沢 宏 (生理研)

延髄腹側面の中枢性化学感受領野 (以下 CCA) は PCO_2/pH センサーとして呼吸調節に重要である。一方、筋細径求心系の化学的、あるいは電氣的刺激による呼吸反応が呼気 CO_2 濃度の変動により容易に修飾されることや、これらの刺激に応じる神経細胞が CCA で例数は少ないが観察できたことから、この呼吸反応は CCA の活動を介して発現する可能性がある。延髄腹側面の生理的作用の一つの機序として筋細径求心系からの影響を明らかにするため、第一歩として延髄腹側面に対する筋細径求心系刺激の有効性およびその反応様式を誘発電場電位を用いて調べた。

不動化、人工呼吸下、クロラロース (30 mg/kg)・ウレタン (150 mg/kg) で麻酔した成ネコ ($n=4$) の血圧、心拍数、呼気 CO_2 と O_2 濃度、一側の横隔神経放電をモニターしながら、一側の腓腹筋神経の電気刺激による誘発電場電位を延髄腹側面からクモ膜を介して記録した。刺激強度は A_2 線維 2 閾値を基準に設定し、0.5 Hz, 100秒間刺激し、各刺激に対する誘発電位を計算平均した (50回)。CCA の同定は舌下神経根および脳底動脈の走行を指標とした。

得られた誘発電位には 2 種類のパターンがあった：Ⅰ．潜時40ms, 持続130msの単相性陰性電位, Ⅱ．潜時15ms, 持続25msの陽性電位でⅠ．がひき続き現われる二相性電位。Ⅰ．は CCA 以外の延髄腹側面でも記録されたが、CCA からの記録は全てⅡであった。Ⅰ．Ⅱともに刺激強度に依存した振幅の増大を示した。また同じ強度の刺激試行を短い時間間隔で繰り返すと順次反応強度が減弱し、いわゆる慣れの現象が観察できた。また高頻度刺激では刺激期間中に次第に反応が減衰する傾向があった。

これらの反応様式は横隔神経放電を指標とした呼吸出力の反応パターンと類似していることから筋細径求心系による呼吸運動の修飾には延髄腹側面領域の活動が介在していることを示唆する。

今後、これら誘発電位の起源がどこにあるのかを 3 次元的に詳細に検索するとともに単一ニューロン活動に及ぼす筋細径求心系の影響を明らかにしていきたい。

【 研 究 会 報 告 】

研究会報告

〔目 次〕

不整脈研究における基礎と臨床の接点 (昭和58年 6月30日～7月1日)	231
睡眠促進物質研究会 (昭和58年 7月5日～7月7日)	252
音声による言語行動の生理学的アプローチ (昭和58年 9月9日)	256
音受容とリン脂質代謝 (昭和58年11月1日～11月2日)	266
筋内部膜の活性化、心筋・平滑筋の収縮調節 (昭和58年11月26日～11月27日)	268
正常及び異常時における生体調節機能 (昭和58年12月2日～12月3日)	299
各種臓器におけるブドウ糖分子の受容識別機構と生理機能に関する研究 (昭和58年12月3日)	304
蛋白質の物性から電気生理へ (昭和58年12月22日～12月23日)	321
生理学における数学的方法 (昭和59年 2月10日～2月11日)	332
筋収縮と細胞運動：相違点と類似点 (昭和59年 3月9日～3月10日)	362
血液生理学—酸塩基平衡、血球、血液構成蛋白質の構造と生理機能 (昭和59年 3月12日～3月13日)	365
自律神経中枢機構の研究会 (昭和59年 3月16日～3月17日)	377
〔昭和57年度研究会報告・追加〕	
画像処理の現状と問題点 (昭和57年 3月19日～3月20日)	388
〔セミナー報告〕	
DANIEL, E. E. 他	417

『不整脈研究における基礎と臨床の接点』

昭和58年 6月30日～7月1日

第1日 6月30日（木曜日）

9：30～12：00 「イオンチャネル最近の話題」

司 会 入沢 宏（生理研）

指 名 発 表 （各30分）

大地陸男（順天堂大・生理）

野間昭典（生理研）

予 定 発 言 者

飯島俊彦（東北大・薬理） ・ 柳沢輝行（東北大・薬理）

日野直樹（順天堂大・生理） ・ 飯沼宏之（心臓血管研）

13：30～17：00 「不整脈の発生機序」

司 会 橋本敬太郎（山梨医大・薬理）

指 名 発 表 （各30分）

春見建一（昭和大・内科）

西 勝英（熊本大・薬理）

予 定 発 言 者

有田 真（大分医大・生理） ・ 猪岡英二（東北大・内科）

松尾博司（東京大・内科） ・ 平岡昌和（医歯大・難治研）

沢登 徹（医歯大・難治研） ・ 西村昌雄（保衛大・総医研）

小竹 寛（島取大・内科） ・ 西園康文（熊本大・薬理）

中谷晴昭（北大・薬理） ・ 小川 聡（慶応大・内科）

19：30～20：30 「抗不整脈薬」

指 名 発 表 （30分）

早川弘一（日本医大・内科）

第2日 7月1日（金曜日）

9：30～12：00 「抗不整脈薬」

司 会 平岡昌和（医歯大・難治研）

指 名 発 表 （30分）

外山淳治（名大・環研）

予 定 発 言 者

春見建一（昭和大・内科） ・ 笠貫 宏（女医大・心研内科）

杉山 理（名大・生化） ・ 伴 隆志（山口大・薬理）

小西與承（京大・内科） ・内藤 政人（国立2病・内科）
五島喜与太（名大・理） ・橋本 敬太郎（山梨医大・薬理）

12:00~12:30

総 括 入沢 宏（生理研）
春見建一（昭和大学・内科）

不整脈の発生機序

春見建一（昭和大学・藤が丘病院）

不整脈の発生は、教科書的には刺激生成と心筋の興奮性の両者に関連し、刺激生成には、心筋細胞のペースメーカー活動 re-entry 機構, triggered activity 等があげられるであろう。以下不整脈の発生機序に関しての問題点を述べる。

(1) Train Pulse による 2 段階, 心室頻拍, 心室細動について。

Wegria¹⁾ は既に anodal 直流刺激は心室細動を誘発し易いが cathodal 直流刺激は、誘発し難いとしている。村尾と共に²⁾ 拡張期刺激閾値に近い値での train pulse はしばしば心室性 2 段階脈を誘発することを認めた。この点を検討するため犬の in situ 心を用い train pulse と興奮性のパラメータである strength interval curve を比較し次の結果を得た。

① anodal 刺激による strength-interval curve には dip 現象, supernormal period より深いものと浅いものがあった³⁾。

② 2msec 50CPS の train pulse を拡張期閾値近くの値で与えると、2 段階脈, 速進性心室頻拍, は心室細動, および稀に持続型の心室頻拍の 3 種類が得られた。2 段階脈を示す例の Strength-interval curve は、supernormal period を有するが dip 現象はこの範囲より高い所にあり、洞収縮の supernormal period より train により誘発された心室期外収縮の閾値が高く、train pulse の強さが両者の中間にあった。速進性心室頻拍又は心室細動を生じた例では、dip 現象又は supernormal period の閾値が拡張期閾値より著明に低かった。持続的心室頻拍の例では、dip 現象, supernormal period が認められず strength-interval curve 拡張終期に向って次第に下る形を示した³⁾。

③ 家兎心室筋で同様の傾向を認めたが、血中 K 濃度を上昇させると、dip 消失, strength-interval curve 拡張終期に向って下る形を示し、train に対し持続性心室頻拍型を示した。

(2) 刺激 mode による心室細動発生様式の差について。

Wiggers は⁴⁾ 拡張期のある時期に刺激を与えると心室細動が生ずることを認め vulnerable period という概念を出した。心室細動は高電流の単一刺激でも、低い電流の train pulse という概念を出した。心室細動は高電流の単一刺激でも、低い電流の train pulse でも生ずる。心室細動の発

生様式が両者の間で差があるのではないかということを実心を用いて検討し次の結果を得た⁵⁾。

① 高電流の単一刺激を vulnerable period に与えて生ずる心室細動は、刺激を与えた心室筋の場所に生じた multiple firing により誘発される如くであった。2 mm 間隔の格子形電極で記録した結果では、刺激部位近辺に生ずる小範囲の re-entry が単一誘導にみられた multiple firing のメカニズムであることが示唆された⁵⁾。

② 拡張期閾値に近い値の pulse を 3 ケ与え心室期外収縮を 3 つ連続して出現させ、期外収縮の間隔を適当に調節すると心室細動を発生せしめ得る。この際逆伝導性 P 波がみられ房室結節による何らかの関与が例えば re-entry の関与が示唆された。格子状電極による検討では、3 拍の心室外収縮は、刺激部位からの波紋状興奮伝播を示すが、次にエコーと思われる収縮がみられ、この際既に細動の徴がみられる⁵⁾。

③ train pulse による心室細動発生を迷走神経刺激により抑制する試み。

心室期外収縮 3 連続による心室細動発生に房室結節が関与した大きな re-entry が関係している可能性があるとするれば、当然房室結節における拡張期閾値近辺の値による train pulse で誘発される心室細動にも適用できる可能性がある。家兎を用い preliminary な実験を行なった。家兎の一部において、5 CPS 数 Volt による迷走神経刺激下では、対照時における心室細動誘発の train の長さより、より長い時間を要するという結果を得た。恐らく房室結節を介する re-entry のブロックによるためと推定される。

以上の如く、不整脈の発生機構には、心筋の興奮性の重要性が再認識されたが、同じ心室細動発生について、刺激 mode により、局所的 small re-entry が関与している場合と、大きな re-entry が関与していることが明らかにされ、これ等の知識は臨床に応用され得るものと思われる。

〔文献〕

- 1) Wegria, R. and Wiggers, C. J. : Amer. J. Physiol, 131 : 104(1940~41).
- 2) 村尾 覚 : 日内会誌, 49 : 786(1960).
- 3) Harumi, K. et al : Circulation Res. 35 : 464(1974).
- 4) Wiggers, C. J. and Wegria, R. : Amer. J. Physiol 128 : 500(1939~40).
- 5) Harumi, K. et al : Jpn. Heart J. 21 : 533(1980).

モルモット単離心房筋細胞に対するアドレナリンの作用

飯島俊彦（東北大・医・第二薬理）

従来、アドレナリン様作動物質の心筋活動電位に及ぼす作用は、1) 静止膜電位にはほとんど影響を及ぼさないか、ほんの数 mV 過分極する。2) プラトー電位を上昇させ、プラトー相の活動電

位持続時間を延長する。3) 90%再分極相での活動電位持続時間については延長・短縮の両報告があり、論議が一定していない。最近になって単離心筋細胞を作製する技術が進歩し、電気生理学にも用いられるようになり、多くの知見が報告されつつある。なかでもアドレナリン様作動物質の作用については、プラトー相のみならず活動電位持続時間を著明に延長することが明らかになり、今までの心筋条件を用いた結果と非常に異っている。

今回の実験では、モルモット単離心房筋細胞を用い、アドレナリンの活動電位および膜電位固定下でのイオン電流系に対する作用を検討した。

ベントパルピターに麻酔下で開胸し、ランゲンドルフ標本を作製し、コラゲナーゼ処理によって単離心筋細胞を得た。全ての実験は正常タイロイド液中で行なわれ、次のような結果が得られた。

- 1) 0.2~0.5 Hz で刺激して得られる活動電位に対し、アドレナリン ($10^{-8} \sim 3 \times 10^{-7}$ M) は活動電位持続時間を著明に短縮し、延長した例は無かった。
- 2) 電極内より細胞内へ 4-AP を注入すると、活動電位は著明に延長し、膜電位固定下では外向き電流が減少していることが確められた。
- 3) 4-AP を注入した細胞にアドレナリンを作用させると、ica は増加しなおかつ抑制されていた外向き電流も増加が認められた。

以上の結果から、単離心房筋細胞ではアドレナリンは活動電位持続時間を著明に短縮し、その作用は外向き電流の増加によると考えられる。しかし、同時に ica の増加もみられることから今までの報告と質的な差は見られない。今回用いた単離心筋細胞が、アドレナリンの作用に応えるだけの十分な酸素の供給が受けられたのか、また十分な ATP の供給が有ったのか、等々多くの問題は今後の実験を重ねて行くつもりである。

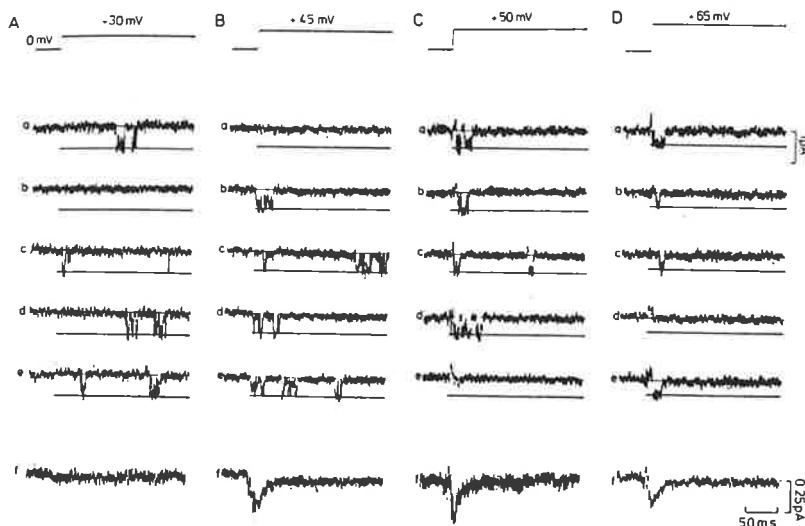
心室筋の単一カルシウムチャンネル電流の性質

大地陸男（順天堂大学・医・第二生理）

心室筋の Ca は、これまで Sucrose gap 法による多細胞標本の膜電位固定や、単一細胞を使用した微小電極による膜電位固定法により研究されてきたが、これらは膜の個々の Ca チャンネルを流れる電流の総和である全体的な Ca 電流であった。Neher と Sakmann らによって発展された Patch Clamp 法¹⁾ を利用すると形質膜の中の微妙な（通常 $1 \mu\text{m}^2$ 以下）範囲を限局的に膜電位個定し、そこを流れる膜電流を測定できる。最近この方法によって心筋の一個の Ca チャンネル^{2) 3) 4)} (slow channel) を通過する電流を測定することが可能になった。

先端の直径が $0.5-1 \mu\text{m}$ のガラスのピペットに S/N 比を改善するために高濃度の Ca または Ba を充たし、コラゲナーゼ処理で単離したモルモットの単一心室筋の表面に密着させて patch

clamp した。静止電位より矩形脱分極すると、振幅から 1 pA、持続時間 1—2 ms のパルス状の内向き電流が、1 個の Ca チャンネルの開口に相当して発生した (図参照)。この単位的な Ca 電流は単発のあともあるが、大多数は連発してバースト状に発生した。そして脱分極ステップが小さいときは全くランダムに脱分極中の種々の時点で発生したが、脱分極を増大するとランダムではあっても全体的 Ca 電流の時間経過によく一致して脱分極ステップの最初の部分に集合する傾向を示し、これは特に外液が Ca を含むときに著しかった。なお、2—300 ms 脱分極中に開口が全くおこらないこともあった。Ca チャンネルの開口確率は脱分極の増大につれて増大した。一方、単位的な Ca 電流の振幅は脱分極増大で直線的に減少し、そこでコンダクタンスは 50mHBa、50mMCa 中で約 10 pS、90mBa 中で 18 pS であった。一定の脱分極を 5—60 回反復してえられた単一カルシウムチャンネル電流を平均加算すると slow inward current と類似した平均電流がえられた (図参照)。またこの平均電流の振幅と単位的 Ca 電流の振幅から Ca チャンネルの開口確率が計算されるが、これは脱分極で急激に増大し最大で約 0.5 に達した。一定の脱分極させるにつれて Ca チャンネルの開口確率が減少した。このときチャンネル電流の振幅は不変であった。心筋では Ca チャンネル電流は Ba で運ばれるときも不活性化があった。活性化はバースト状をますがこれは閉 $\leftrightarrow$ 閉 $\leftrightarrow$ 開の 3 状態モデル⁵⁾で説明された。



全体的な Ca 電流は膜電位と時間によって単位的な振幅の Ca 電流を通す Ca チャンネルの開口する確率が変化することによって示された。全体的な Ca 電流はカテコルアミンなどの生理活性物質で修飾され、また Ca 結合剤で抑制される。これらが各 Ca チャンネルでのどの様な変化によるのかは直ちに研究可能な、興味あるテーマであろう。

〔文献〕

- 1) Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. : Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free

membrane patches. Pflugers Arch. 391 : 85-100(1981).

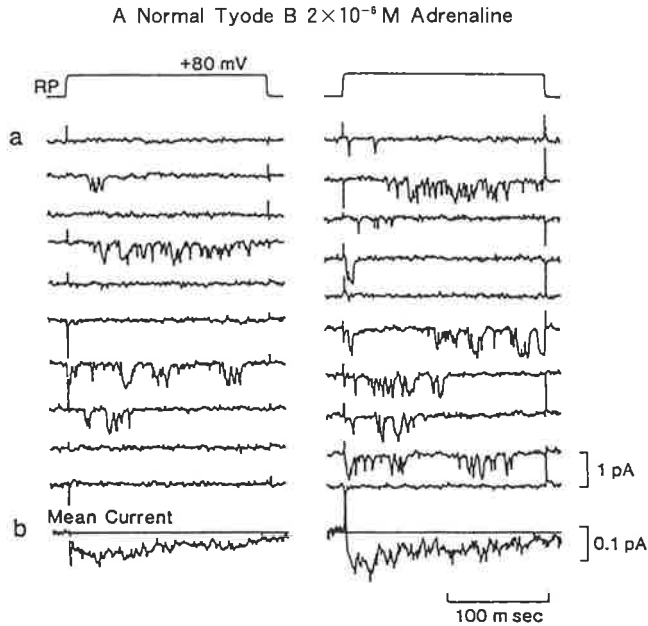
- 2) Reuter, H., Stevens, C.F., Tsien, R.W. & Yellen, G. : Properties of single calcium channels in cardiac cell culture. Nature, 297 : 501-504(1982).
- 3) Cavalie, A., Ochi, R., Pelzer, D. & Trautwein, W. : Elementary currents through Ca^{2+} channels in guinea pig myocytes. Pflugers Arch. 398 : 284-297(1983).
- 4) 大地陸男：心筋膜のイオンチャンネル，生体の科学，33 : 462-470(1982).
- 5) Fenwick E.M., Marty, A. & Neher, E. : Sodium and calcium channels in bovine chromaffine cells. J. Physiol. 331 : 599-635(1982).

心室筋のカルシウムチャンネルに対するアドレナリンの作用

日野直樹，大地陸男（順天堂大・医・生理）

心筋の内向き Ca 電流はカテコラミンやアセチルコリンなど自律神経伝達物質により調節される。カテコラミンによる Ca 電流の増強はサイクリック AMP を介する膜のリン酸化によって Ca チャンネルの数が増加する為と考えられてきたが，Ca チャンネル自体のコンダクタンスあるいは開口確率の増加によって発現される可能性がある。我々はコラゲナーゼ処理によって単離したモルモット心室筋細胞にパッチクランプ法を適用し，単一 Ca チャンネル電流を記録してこの電流に対するアドレナリン（Adr）の作用を検討した。ピペット内溶液として 50mM BaCl_2 ，75mM choline Cl，30 μM TTX (pH7.4)を用い，実験は室温（24～30℃）で行った。正常タイロード液中では静止電位から 60～100mV の脱分極によって 1～0.3pA，コンダクタンス 10～12pS のパルス状内向き電流がされた。チャンネル開口確率は脱分極と共に増加した。その開口時間は単一指数分布を示し，平均時間は 1～2 ms であった。又，チャンネル電流の平均加算によって，細胞全体から記録される巨視的 Ba 電流と類似した（a）及び平均電流（b）を示す。正常液中（A）では 38 の脱分極中にチャンネル電流が誘発され，その総出現頻度は 698 回であった。外液に投与された Adr によって平均電流はその時間経過が変化することなく顕著に増大した（B，b）。この時チャンネル電流は 77 の脱分極中に出現し（B，a），総出現頻度は 1,120 回に増加したが，振幅，コンダクタンス及び平均持続時間は不変であり，又，更に大きな脱分極中においてもチャンネル電流は全く観察されなかった。

Adr はチャンネル数を増加させることなく Ca 電流を増強しうることが示された。最近，Reuter らは膜電位依存性の 3 状態から成るチャンネルモデル（閉 $\xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1}$ $\xrightleftharpoons[k_{-2}]{k_2}$ 開）においてはサイクリック AMP は k_1 と k_2 を促進すると報告した。我々の結果からはアドレナリンはこれら 3 状態間の反応速度よりもむしろ膜電位依存性過程の前にある過程に作用し，膜電位依存性過程に入るのを促進すると考えられる。



細胞外 K^+ 濃度と無 Na^+ カエル心室筋収縮との関係

柳澤輝行（東北大・医・第二薬理）

心筋の収縮部細胞外 K^+ 濃度が低い条件では大きく、高い条件では、小さいことが古くより知られている。細胞外 K^+ 濃度 $[K^+]_e$ を変化させると、特に細胞内 Na^+ 濃度 $[Na^+]_i$ も変化し、ひいては他のイオンの輸送にも大きな影響を及ぼす。そこで今回の研究では、まず心室筋を無 Na^+ 液により灌流し、細胞内外の Na^+ をできるだけ除去し、その後に $[K^+]_e$ を変化させて、 $[K^+]_e$ の変化が収縮力や膜電流にどのような影響をもつか検討した。

カエル心室筋条件を単一蔗糖隔絶装置に装着し、Ringer 液中の Na^+ を $Tris^+$ あるいは Li^+ に置換し、約 1 時間程度灌流すると、細胞内 Na^+ 含量は約 $50 \mu\text{mol/kg w. w.}$ となり、細胞外の Na 濃度は約 $20 \mu\text{M}$ であった。この心室筋を無 Na^+ 筋と呼ぶことにする。

膜電位固定を行うと 0mV を頂点としたベル型の膜電位—収縮力関係がえられた。この関係は Is_i の膜電位—膜電流関係と相似で、 $[Ca^{2+}]_e$ の減少や種々の Ca^{2+} channel blockers により両者ともに抑制される。そこで無 Na^+ 筋の収縮は Ca^{2+} channel を通って、流入する Ca^{2+} が重要な因子であると結論した。

$[K^+]_e$ を 0mM から 9mM と変化させると、膜電位固定法を用いての脱分極により生ずる収縮力と Is_i はともに小さくなり、膜電位—収縮力関係と膜電位— Is_i 関係は相似的に抑制された。

以上の結果より, $[K^+]_e$ がなんらかの機構で, Ca^{2+} channelのconductanceに影響していることが示唆され, $[K^+]_e$ の変化は, $[Na^+]_i$ の変化を伴わなくとも収縮力や Ca^{2+} 流入に影響することが示唆された。

高K液中の犬心室筋細胞にみられる通常興奮・通常伝導

飯沼宏之 (心臓血管研究所), Dreifus, L. S. (Lan Kenau 病院)

高 K(21mM)・高Ca(10mM) 液中の犬心室筋標本に銀線電極を刺入, 基本刺激 (S_1) (周期2,000 msec)及び早期刺激 (S_2) (S_1 S_2 間隔は任意)を加えた, S_1 , S_2 には3活動電位 (AP_1 , AP_2)を刺激電極から数 mm ずつ離れた2点 (P点, O点)で通常の微小電極法を用いて記録, AP_1 , AP_2 の大きさ, 伝導性を比較した。大きな S_1 (25.6 ± 11.6 mA, 10 msec)により安定した AP_1 がP点でえられたが, 反応は小さく (30 ± 6 mV, 34 ± 12 msec), O点まで行われなかった。しかし 188 ± 58 S_1 $S_2 \leq 523 \pm 107$ msec の S_2 による反応は AP_1 よりはるかに大きく, D点まで伝導可能であった。 AP_1 , AP_2 とを verapamil (5×10^{-6} g/ml), isoproterenol (10^{-10} g/ml)によりそれぞれ抑制, 増大されたので slow response と思われた。刺激点周囲の mapping 実験, propranolol (10^{-4} g/ml)を用いた実験から, 膜電位の oscillation ϕ , summation 現象, S_1 によるカテコラミン分泌などは, この AP_2 が増大する現象と無関係であることが分ったが, その成因は未解明である。標本を正常域, 脱分極域, 正常域に3分し (高K寒天使用), 脱分極領域の刺激を正常域の propagated normal AP によって行った実験でも, AP_2 のみが脱分極域を通過できた。その際, 一方向性ブロックや re-entry 現象が観察され, 生体でもかかる現象がみられること, 又それに基づく不整脈が生ずる可能性があることが示唆された。

サル心室筋における活動電位持続時間, overdrive-hyperpolarization と Na,K-ATPase 活性: 内膜側と外膜側の対比

有田 真, 青峰正裕, 今西 愿, 清末達人 (大分医科大・生理)

ニホンザル左室自由壁の心内外膜側で活動電位の持続時間 (APD)を調べると, 外膜側 (-EPI)が内膜側 (ENDO)より平均65 msec 短い (刺激頻度 1 Hz, 80%再分極相での測定)。この心室内外膜の APD 較差に Na,K-pump 活性, 従って外向き pump current の大きさの差が関与している可能性が考えられる。そこで ouabain および overdrive 後の過分極に対する両組織の反応を調べ, かつ Na,K-ATPase 活性を測定してみた。

摘出した ENDO と EPI の標本を 1 Hz で電気刺激しながら ouabain ($0.5-1 \mu\text{M}$) を作用させると、両標本とも濃度依存性に APD が短縮するが、ENDO の短縮が EPI より著明で、 $1 \mu\text{M}$ の濃度では APD の差が完全に消失した。すなわち ouabain 作用下では、ENDO に比べ、EPI の APD が相対的に延長したことになる。この APD の相対的延長が、ouabain による外向き electrogenic pump current の消失によるなら、サル心室筋ではもともと Na,K-ATPase 活性が ENDO より EPI で高く、「ENDO に比し EPI でより多くの外向き電流が ouabain でブロックされたことが EPI における相対的 APD 延長の原因である」との推定もまた可能であろう。そこで Fiske and SubbaRow 法により両組織における Mg^{2+} dependent, ouabain sensitive Na,K-ATPase 活性を測定した。その活性値は $\text{ENDO} = 11.80 \pm 4.6$ (S. D.) ; $\text{EPI} = 15.45 \pm 7.2$ (S. D.) $\text{Pi } \mu\text{M}/\text{mg.wt}/\text{hr}$ であり、EPI は ENDO より有意に高値を示した ($n=11$)。次に 3.3-3.8 Hz の overdrive を 1 分間行った直後、刺激を中止したときにみられる過分極の大きさを ENDO と EPI で比較した。得られた過分極の最大値は $\text{ENDO} = 3.2 \pm 0.9 \text{ mV}$; $\text{EPI} = 4.6 \pm 1.3 \text{ mV}$ で EPI は ENDO に比し強い過分極を示した ($n=5$)。

以上の事実は、心室筋内外膜側の APD 較差の発現、従って心電図における陽性 T 波の成因の一つとして、心内外膜側における Na,K-pump 活性の差が関与していることを示唆する。

心房早期刺激によるエントリーと自動能亢進の鑑別

松尾博司（東京大学・医・附属病院）

自動能が関与する調律 (A) として、①洞調律 (臨床例 15 例、家兎 15 例)、②アコニチンをイヌ右房局所に投与して作成した実験的心房頻拍 (5 例)、リエントリー型調律 (R) として、①心房粗動 (臨床例 7 例、Rosenblueth らの方法でイヌに作成した実験例 20 例)、②concealed WPW 症候群の発作性頻拍 (臨床例 3 例) を対象とし、心房早期刺激 (PAS) に対する周期の反応パターンから、A と R が鑑別可能か否かを検討した。

A では、PAS の連結期が短縮するにつれ、次の周期は初め代償性延長を示し、次いで一定となって周期の更新をみるが、さらに短い連結期の刺激に対して次の周期も徐々に短縮するパターンが基本と考えられた。実験的には自動中枢の活動電位が早期刺激で短縮することが知られている。ただし刺激部位が自動中枢から離れていると、次の周期は必ずしも短縮しない。

R では、PAS により連結期が短縮する場合、次の周期は基本周期のまま一定であるのが基本であった。ただしリエントリー経路に房室結節などが含まれると、短い連結期で伝統遅延が生じ、それだけ次の周期も延長した。

従って、早期刺激の連結期と次の周期の関係から、原則的には、自動能が関与する調律とリエントリー型調律の鑑別が可能であると結論した。

高K液中モルモット心筋のカテコラミンによる異常自動能

長谷川純一, 小竹 寛, 真柴裕人 (鳥取大・医・第一内科)

心筋虚血時には, 心筋の傷害による細胞外K濃度上昇, 傷害電流, 交感神経よりのカテコラミン遊離増大等による slow response が不整脈発生の要因として重要視されている。

一方心筋の低酸素条件下においては, エネルギー代謝の変化による slow inward current の減少などが報告されている。またカテコラミンと反応する β -receptor は, 心筋梗塞後増加することともいわれており, 低酸素と心筋の異常反応に関する研究は未だ十分ではない。そこで今回, 心筋のカテコラミンによる異常反応を用いて, 低酸素条件の影響を調べた。

方法: 心筋 β -receptor-slow channel 系実験モデルを用い, コントロール(95%O₂, 5%CO₂ 飽和溶液)と低酸素条件下(95%N₂, 5%CO₂)の反応を比較した。

本実験モデルは, 微量の Ba を含む高K液 (27mM K) でモルモット右室乳頭筋を灌流し, カテコラミンを作用させることにより, β -receptor を介した slow inward current 増大によると考えられる異常反応をみるものである。この反応は, カテコラミンが一定濃度以下では全くみられず, それを上回る極めて狭い濃度範囲で膜電位の減少が起こる。更にわずかに高濃度で自動的活動電位を発生する。従って, 脱分極を起こすカテコラミン濃度, あるいは自動性を発生させる最低濃度を測定することにより, この反応の起こり易さが比較できる。

結果: 脱分極及び自動性の反応に対するカテコラミン (isoproterenol) の閾濃度は, それぞれコントロール 4.0 ± 1.3 , 5.8 ± 1.3 ($\times 10^{-8}$ M) で, 1 時間後の値も同様であった。次に低酸素条件下で, β -receptor-slow channel 系反応の閾値が低下し, 低濃度カテコラミンで脱分極, 自動性の発生が起こったものであるが, この際の静止電位は, コントロール 44.5 ± 0.3 , 1 時間後 44.1 ± 0.2 , 低酸素時 44.3 ± 0.2 (mV) と殆んど変化なく, カテコラミン反応への影響は無視できる。

一方心筋内交感神経終末に含まれる norepinephrine 量は, 作用させるカテコラミンに比べて微量であり, しかも時間とともに減少するため, 今回の測定値への影響も無視できると考えられる。

このことから, 心筋梗塞時には, このような異常反応が起こり易く, 不整脈におけるカテコラミン, slow inward current の関与が重要であることが示唆され, 低酸素時のエネルギー代謝の変化の他にも, β -receptor の増加をも含め, 交感神経緊張によって遊離されるカテコラミンの心筋の感受性増大という面での検討も必要と思われる。

膜電位の光学的検出法による巡回性頻拍について

沢登 徹（東京医科歯科大・難研）

径路を或る程度規定したモデル実験として蛙心房のリング状標本（大きさ 1.5×1.0 cm）を用い巡回性頻拍を光学的にモニター可能であることを報告してきた。今回は出現した巡回頻拍の rate の変化を検討した。方法は、膜電位感受性色素メロサイアミン・ローダニン色素（NK2761） 0.1 mg/ml の濃度で標本を室温下15分間染色，その後 Ca^{2+} free 液で洗い，標本の動きが抑制された25～30分後に標本 8 ケ所より膜電位を光学的に検出した。頻拍の発生には期外刺激法を用いた。刺激電極を光学的シグナル終了時点に差を有する領域に置き刺激を 5～10 msec 毎連結期を変え与えた。頻拍が200 beats以上維持された 8 割につき beat 間隔は変動を示した。残りは変動は少なかった。② beat 間隔の変動は30～50拍目以後は少くなっている。③ beat 間隔は頻拍発生初期より次第に延長し100～200拍目でプラトーに達している。頻拍初期からプラトーに達する間の beat 間隔の変化は45～100 msec（平均72 msec）である。④このプラトーに達した時の伝導速度は基本刺激時の伝導速度 0.3 M/秒の $1/3$ に減少している。

以上のことより次の事が結論される。巡回性頻拍が発生する初期は巡回径路が単一でなく，複数存在し，頻拍が進行するに従い巡回径路が決っていき，beat 間隔が比較的一定になる。その際 beat 間隔は延長しながら一定になるが，この延長には急激な Cycle length の変化による立ち上り速度の減少，頻拍に伴う細胞内結合抵抗の増加や細胞外 K 蓄積などの関与が考えられる。

心筋細胞膜障害と電気生理学的異常：特に膜磷脂質代謝産物増加および膜糖衣シアル酸除去の影響について

中谷晴昭・木村真一・菅野盛夫（北海道大・医・薬理）

病的状態，特に虚血あるいは低酸素状態において心筋細胞膜が生化学的，病理学的変化を来す事が知られている。そこで細胞膜磷脂質代謝産物である lysophosphatidylcholine (LPC) 増加時，および膜糖衣シアル酸除去時の電気生理学的変化をイヌ摘出心筋を用いて検討した。

LPC を 10 — 160 μ M の濃度で表面灌流すると心房筋，Purkinje 線維において濃度依存性に最大拡張期電位，活動電位高，最大脱分極速度が減少したが，LPC に対する組織感受性は心房筋が最も高く，次いで Purkinje 線維，心室筋の順であつた。Purkinje 線維では -50 mV 前後の浅い膜電位からの異常自動能（rhythmic automatic depolarizations）の発現が観察されたが，verapamil（ 3 μ M）で前処置した線維ではその発現は抑制された。またLPCによって拡張期電位が浅くな

るが、その時細胞内 K^+ 活性の減少が観察されるか否かについて K^+ 選択性微小電極を用いて検討した。Purkinje 線維を $80-160 \mu M$ の濃度の LPC を含む栄養液で表面灌流すると、拡張期電位は $-76 \pm 5 \text{ mV}$ から $-43 \pm 7 \text{ mV}$ へと有意に減少したが、細胞内 K^+ 活性は $115 \pm 22 \text{ mM}$ から $102 \pm 14 \text{ mM}$ (Mean $\pm$ SD) と有意の変化を示さず、LPC による脱分極には有の要因が関与すると思われる。

イヌ Purkinje 線維を neuraminidase で処置し膜糖衣シアル酸を約 70% 除去しても、対照時の活動電位、自動能には有意の影響を与えなかったが、細胞外の Ca^{++} 濃度を 8.1 mM まで上昇させると delayed afterdepolarizations (DAD) が出現し、時には triggered activity の発現が観察された。また ouabain ($0.2 \mu M$) を 25 分間灌流して誘発される DAD を有意に増強した。これらの実験結果は膜糖衣シアル酸は生理的状态においては一種の Ca^{++} barrier として機能している事を示唆するものと思われる。

これから、心筋虚血等の病的状態において細胞膜が障害され、lysophosphoglycerides が増加したり、膜糖衣シアル酸が減少したりすると、電気生理学的異常が惹起される可能性が示唆された。

ウサギ房室結節に及ぼす虚血・低酸素の電気生理学的作用

西村昌雄 (名古屋保健衛生大・総合医科学研・心臓血管)

ウサギ房室結節の伝導能と自動能に及ぼす虚血・低酸素の影響を His 束心電図法と微小電極法で検討した。10 例の摘出灌流心で冠灌流量を正常の $1/2$ に減少すると、房室結節内伝導時間は対照の 33.3 から 107.7 msec へと有意に延長し、第 2 度房室ブロックを呈した。これに対し、心房内および His-Purkinje 系伝導時間は僅かながら増加するものの、伝導杜絶を生じるには至らなかった。従って、刺激伝導上房室結節は特殊伝導系組織の中で虚血に対し最も高い感受性を示すことが明らかとなった。

自発性活動電位に及ぼす低酸素の効果をみるため、房室結節を $0.2 \times 0.2 \times 0.1 \text{ mm}$ の微小標本に細切した。灌流液の酸素分圧 (PO_2) を正常の 500 から 30 mmHg に減少すること、拡張期脱分極速度は 60 から 39 mV/sec へと減少し、その結果自発性興奮周期は 492 から 538 msec へと延長した。最大拡張期電位と最大脱分極速度は -67 から -63 mV へ、 17 から 14 V/sec へとそれぞれ減少したが、オーバーシュートと活動電位持続時間は不変であった。灌流液の PO_2 を更に 19 mmHg に低下すると、房室結節の自発性興奮は停止し、膜の過分極とともに静止時張力の増大もみられたが、 10 mM ブドウ糖の添加によりこれらの低酸素効果は拮抗され、自発性興奮の再開がみられた。

イオン電流的に低酸素の効果を解析するため、二重微小電極法による電圧固定実験を行なった。低酸素灌流により、 -40 mV における保持電流は $3 \sim 5 \text{ nA}$ 外向きに流れ、 0 mV への脱分極に

より発現する緩徐な内向き電流は23%減少したが、その不活性化の時定数は不変であつた。他方、外向き K^+ 末尾電流と過分極により活性化される内向き電流は不変であつた。

以上より、房室結節に及ぼす虚血・低酸素の陰性変導および陰性変時作用はイオン電流的には緩徐な内向き電流の減少に基づくが、前者には細胞内抵抗の増大も関与することが示唆された。

非開胸犬モデルにおける心筋梗塞後4～6時間の心室頻拍数に対する Verapamil の効果

小川 聡・宮崎利久（慶応義塾大・医・呼吸循環科）

右頸動脈より挿入した血栓除去用 Fogarty バルーンカテーテルにより、左冠動脈前下行枝近位部を選択に閉塞して心筋梗塞を作成した。

梗塞作成直後の所謂 Harris 第1相不整脈を経過した後、全く不整脈をみない時期に至るが、通常2時間後より再びその出現が始まる。以後頻度は急速に亢進し、4～6時間では、arrhythmic ratio（全心拍数／分に対する不整脈心拍の数）は60～100%に達し、多くは持続性心室頻拍数（150～200／分）を呈する。この出現経過は、頸部迷走神経刺激により測定した心室自動能が梗塞作成1時間前後より急速に亢進する経過と完全に一致した。4時間では、迷走神経刺激下の洞徐脈により心室頻拍数が顕性化し、逆に一過性の洞頻度増加時には頻拍数は抑制された。verapamil（0.15 mg/kg）の静注は、半数例で不整脈の完全抑制を、他の例でも arrhythmic ratio の50%以上の減少をそたらした。但し、洞頻度には静注前後で有意な変化はなかった。抑制効果は静注後3分までが最大で、6分時にも有意な効果持続した。

不整脈多発時に開胸の上、心外膜及び心内膜マッピングを施行した。不整脈源は全例梗塞巣の周囲（通常 edge より1～2 cm 外側の健康部）で宜々、心内膜下に局在していた。

結論：梗塞作成後4～8以後48時間までに出現する不整脈は、（Harris 第2相）、梗塞巣内プルキンエ線維の自動能亢進が主因とされてきたが、その初期には、梗塞巣外の健康部心内腔下心筋に起源を有する自動能亢進によって不整脈が関与していることが明らかとなった。その成因として、verapamil に特する特徴的反応より、slow-current の関与が示唆された。

各種抗不整脈薬静注における問題点

——発作性心房細動、発作性上室性頻拍を中心として——

早川弘一・新 博次（日本医科大・第一内科）

各種抗不整脈薬静注による発作性心房細動（a f）、発作性上室性頻拍（PSVT）の発作停止に

つき検討した。対象は、日本医科大学第一内科における症例のうち、同一症例において2回以上の同種の頻脈性不整脈発作に対し2種以上の抗不整脈薬をそれぞれ静注し得た症例で、静注開始より10～15分間の心拍数を心電図連続モニター記録より1分毎に計測し各薬剤毎にその推移を比較検討した。図Aは6例のa fにつき比較したものであるがdisopyramide, procainamideでは静注により心拍数は増加し、洞リズムに復帰したものが3例あった(S)。一方aprinidin, verapamilでは心拍数は漸次減少したが、この症例では洞リズムに復帰したものはなかった。図BはWPW症候群のa f 3例におけるものであるが、WPW症候群を伴なわないものではdisopyramide, procainamideで心拍数は増加したのに対し、他の2剤と同様にdipyramide及びprocainamideにても心拍数は減少した。これはこれら2剤が副伝導路に対して抑制効果を示すことによると思われる。図Cは7例のPSVTにおける比較であるが、いずれの薬剤でも心拍数は漸次減少したが、dipyramideでは減少率がわずかであった。なおa fの症例ではdisopyramide静注により一過性の粗動への移行、また心室内変行伝導を思わせる幅の広いQRSが連続して出現する場合があった。PSVT停止についてはverapamil静注例にてPSVTのR P間隔の長短が交互に出現し停止する症例があり、また心室起源と思われる幅の広いQRSが出現し停止する場合がみられた。これらの現象についてはすでに報告されているものもあるが系統的な研究はなされておらず、今後に期待される。

Long chain acyl carnitine および L-carnitine の電気生理学的作用

林 秀晴・山崎 昇(浜松医科大・第3内科)

虚血心における高遊離脂肪酸血症の不整脈誘発作用の機序として、遊離脂肪酸の酸化過程における中間代謝物質であるlong chain acyl CoAと、long chain acyl carnitineの蓄積の関与が注目されており、一方、L-carnitineの投与によりlong chain acyl carnitineの蓄積と重症心室性不整脈の軽減が報告されている。我々は、L-carnitineの抗不整脈作用の機序を解明する目的で、① palmitoyl carnitine (long chain acyl carnitine) の電気生理学的作用、② palmitoyl carnitineとL-carnitineの同時投与による電気生理学的作用、③低酸素灌流下におけるL-carnitineの電気生理学的作用、について検討した。

〔方法〕 犬右室乳頭筋をTyrode液で灌流し、通常の微小電極法を用いて活動電位を記録した。① palmitoyl carnitine(PC) 0.3mM および 0.6mM を含む Tyrode 液で30分間灌流した。② PC 0.3mM と L-carnitine 25mM および 0.6mM を含む Tyrode 液で30分間灌流した。③95% N₂, 5% CO₂で灌流したTyrode液(PO₂=60～65 mmHg)で30分間低酸素灌流した後L-carnitine 25mMを加え、更に30分間灌流した。

〔結果〕 ①PCは濃度依存性に、RMP, APA, dV/dtmaxを減少させ、APDとERPを短縮さ

せた。② L-carnitine の同時投与により、P C の上記の変化を防御した。③低酸素灌流により、RMPD, APA, dV/dt_{max} は軽度低下し、APDとERPは短縮した。低酸素灌流液に L-carnitine を添加することにより、RMP は軽度深くなり、APDとERPは延長した。

〔考案〕 パルミチン酸（遊離脂肪酸）による APD 短縮の機序として、細胞質内 ATP の減少によるとの報告もあるが、P C は、APD の短縮のみでなく RMP と APA の減少もきたした為その作用が ATP の減少のみによるとは考え難い。一方 P C は Na, K-ATPase および Ca-ATPase を阻害する事が報告され、P C が detergent 作用により生体膜の構造の変化をきたして作用した可能性が考えられる。また P C による作用は早期の虚血心筋における変化と類似しており、long chain acyl carnitine の蓄積が急性心筋虚血の不整脈の発生に重要な役割を果たしていることを示唆する。carnitine は、遊離脂肪酸代謝に必須の物質であり、P C と L-carnitine の同時投与により、P C 単独投与による変化を防御した事より、L-carnitine が P C の蓄積を軽減する事により作用した事が示唆された。また、低酸素灌流による心筋活動電位が L-carnitine の添加により軽減されたことから、虚血心筋における L-carnitine の抗不整脈作用が示唆された。

Reperfusion arrhythmia

杉山 理（名古屋大・医・第二生化）

最近の外科的あるいは内科的冠血行再建術の進歩、また冠動脈内血栓溶解療法の発展から、以前にもまして、冠血流再開後に出現する不整脈（reperfusion arrhythmia）に対する関心が高まってきている。この不整脈出現機序について我々が実験的に検討を加えた結果を示す。

〔方法〕 In vivo 実験：雑種成犬36頭を用い、15分間左冠動脈前下行枝の血流を遮断した後5分間冠血流を再開させた。そして血流を再開させた5分間に3個以上の連続した心室性不整脈が2回以上、または1分間に5個以上の心室性不整脈の出現、あるいは心室細動がみられた群を不整脈(+)群とし、これら不整脈のみられなかった群を不整脈(-)群とした。5分間の冠血流再開の後に再灌流部及び正常部心筋から Lefkowitz の方法で膜成分を Hatifi の方法でミトコンドリアを分離調製し、膜成分中のリン脂質を Allen の方法で、各種遊離脂肪酸量を高速液体クロマトグラフィ（HPLC）を用いて定量するとともにミトコンドリア中の Ca^{++} 量を原子吸光法で測定した。

In vitro 実験法：イヌの左室心筋片を修正 Krebs 液で灌流しながら、微小電極を用いて心筋の活動電位を記録した。その後ホスホリパーゼ（Plase）C（4U/ml）又は A_2 （2U/ml）を加え5分間灌流した後の活動電位を記録した。

〔結果〕 In vivo 実験：不整脈がみられたのは36例中11例（30.6%）であった。不整脈(+)群では再灌流部心筋から得られた膜成分中のリン脂質量は $0.22 \pm 0.03 \mu \text{mol/mg}$ たん白（mean $\pm$

SD) で正常部の 0.29 ± 0.04 と比べ有意に低下していた。膜成分中には9種類の遊離脂肪酸が検出されたが、再灌流部では正常部と比べて、いずれの脂肪酸とも有意の増加が認められた。再灌流部のミトコンドリア中の Ca^{++} は $15.0 \pm 2.1 \text{ nmol/mg}$ たん白と正常部の 9.8 ± 1.8 に比べ、有意に増加していた。不整脈(－)群では、不整脈(＋)群で観察されたこれらの変化は認められなかった。

In vitro : PLase C または A_2 の添加は50%再分極時には影響を与えなかったが、心室筋の静止膜電位は $-72 \pm 4 \text{ mV}$, $-71 \pm 5 \text{ mV}$ とコントロール群の $-85 \pm 6 \text{ mV}$ に比べ有意に浅くなった。一方活動電位振幅も $86 \pm 4 \text{ mV}$, $84 \pm 4 \text{ mV}$ とコントロール群の $108 \pm 9 \text{ mV}$ に比べ有意に小さくなった。

〔考察〕 生体膜は、心筋細胞膜を含め、リン脂質とたん白質から構成されている。PLase は Ca^{++} によって活性化されて膜のリン脂質を分解する酵素で、その作用部位の違いによって A_1 , A_2 , B, C, D の5種が知られている。最近 PLase の活性化と不整脈の発生が注目されている。不整脈(＋)群では、膜成分中の遊離の脂肪酸の増加、リン脂質の減少、ミトコンドリア中の Ca^{++} の増加が認められた。これらの結果から細胞内への Ca^{++} の流入による PLase の活性化それに伴って膜リン脂質が破壊され、この結果 reperfusion arrhythmia が出現したことを示唆する。実際、PLase が活動電位に変化を与えることもこの考えを支持する。

〔結論〕 Reperfusion arrhythmia は Ca^{++} の流入→PLase の活性化→膜障害が関与している可能性が示唆された。

いわゆる Class III 抗不整脈作用薬

小西與承(京大・医・第三内科)

近年わが国に導入される抗不整脈薬が増加し、すでに臨床治験が済み認可を待つものもある。しかし Vaughan Williams の分類¹⁾ で Class III に属するものは全く手がつけられていない。活動電位第0相に影響せず、活動電位持続および不応期を延長することは副作用の少ない抗不整脈薬として有用で、ときには他剤無効でこれしか効かない必須のものとなる可能性もある。この見地からまず微小電極法による活動電位記録の面から Class III、作用薬の検討に着手した。

1. amiodarone の作用

摘出家兎心房筋(A)および心室筋(V)の表面灌流標本について amiodarone の直接作用(10^{-6} g/ml)を観察した。

静止電位、活動電位振幅、O相最大立上り速度($V_{\max}$)、90%再分極時間(APD90)、有効不応期(ERP)のパラメーターを用いたが、これらには全く有意の変化を生じなかった。

一方 $50 \text{ mg} \times 2 \text{ 週間} + 25 \text{ mg} \times 4 \sim 6 \text{ 週間}$ 経口投与した場合は対照群よりAPD、ERPが延長

した。

APD90

A $80.4 \pm 11.4 \rightarrow 93.3 \pm 7.4^{**}$

$P < 0.05$

V $122.2 \pm 9.6 \rightarrow 133.9 \pm 8.7^{**}$

$P < 0.001$

ERP

A $82.7 \pm 13.4 \rightarrow 110.2 \pm 12.1^{**}$

$P < 0.002$

V $126.6 \pm 10.6 \rightarrow 141.8 \pm 15.5^{**}$

$P < 0.002$

この結果は諸外国の報告と同傾向である²⁾。

2. bethanidine の作用

bretylum tosylate の誘導体である bethanidine sulfate は降圧剤としてのみわが国で発売されている。腸管吸収は bretylum の約20倍といわれ³⁾ 経口投与に有利である。

今回の 2.5×10^{-5} g/ml を用いた検討では心室筋において $V_{\max} 160.6 \pm 41.0 \rightarrow 139.2 \pm 33.3$ V/sec ($P < 0.05$) のみ有意と出た。むしろ心房筋では $V_{\max}$ に変化なく

APD90

$102.1 \pm 165.5 \rightarrow 117.3 \pm 15.5^{**}$

$P < 0.001$

ERP

$85.7 \pm 19.2 \rightarrow 96.5 \pm 26.2^{**}$

$P < 0.02$

とそれぞれ延長し Class III 的であった。

3. 臨床応用と今後の問題

まず臨床投与が可能な bethanidine を心房期外収縮と発生性心房細動に試用したが、有効な兆が見えたところで起立性低血圧の副作用のため中断した。投与法の検討が必要で、Protriptylene が低血圧に持抗するという報告⁴⁾ があるがこのもの自身の副作用も考慮しなければならぬ。

amiodarone の副作用は角膜沈着、甲状腺機能異常、皮膚着色などがあり、とくに前者は高率でわが国導入の障害となっている。一般に薬剤用量は欧米人に比し日本人は少量でよい場合が多いのでこのへんに問題解決の道があるかもしれない。

amiodarone の作用機序は未解決である。表面灌流標本では作用が出ないので直接の膜作用ではないが、洞結節自動頻度抑制と房室結節伝導の抑制は最近報告されており⁵⁾、われわれも確認した。活性代謝物の存在は否定的である。

急性投与では C-AMP 産生の減少⁶⁾、慢性投与では甲状腺ホルモン代謝に作用し thyroxine か

ら triiodothyronine への変換を阻止する⁶⁾ことが原因と目される。後者については副作用としての甲状腺機能低下は多くないが、subclinical hypothyroid state が β レセプター減少あるいは adenylate cyclase 活性抑制として働いている可能性もある。

〔文献〕

- 1) VAUGHAN WILLIAMS EM : Classification of antidysrhythmic drugs. Pharmac Therap, 1 : 115(1975).
- 2) SINGH BN, VAUGHAN WILLIAMS EM : The effect of amiodarone, a new anti-anginal drug, on cardiac muscle. Br J Pharmacol, 39 : 657(1970).
- 3) DOYLE AE, MORLEY A : Studies in the absorption and excretion of ^{14}C labeled bethanidine on man. Br J Pharmacol, 24 : 710(1965).
- 4) BACANER MB, BENDITT DG : Antiarrhythmic, antifibrillatory, and hemodynamic actions of bethanidine sulfate; an orally effective analog of bretylium for suppression of ventricular tachyarrhythmia. Am J Cardiol, 50 : 728(1982).
- 5) GLOOR HO, URTHALER F, JAMES TN : The immediate electrophysiologic effects of amiodarone on the canine sinus node and AV junctional region. Am J Cardiol, 49 : 981(1982).
- 6) POLSTER P, BROEKHUYSEN J : The adrenergic antagonism of amiodarone. Biochem Pharmacol, 25 : 131(1976).

培養心筋細胞のウアバイン誘発不整拍動に対するキニジン，プロカインアミドの作用

五島喜与太（名古屋大・理）

培養心筋細胞のウアバイン誘発不整脈拍動の生成機序として次の考え方をしている。⁽¹⁾ウアバインによる Na ポンプ阻害，その結果，細胞内 Na 濃度の増加，それに伴う $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換輸送系を介した Ca^{2+} 流入の増加，細胞内 Ca^{2+} 濃度の恒常的増加，その結果，筋原線維の異常収縮とおそらく膜の異常興奮により，不整拍動が生じるものと考えている。

キニジンやプロカインアミドなどの抗不整脈剤存在下では，培養心筋細胞のウアバイン誘発不整脈拍動は生じにくい。これら化合物存在下では，ウアバインによる細胞内 Na 濃度の増加は抑制された。⁽²⁾そのイオン機序を検討した。キニジンやプロカインアミドは，ウアバインの $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$ 交換輸送系そのものには全く影響しない。キニジンやプロカインアミドは，外液 Na の細胞内への単純拡散による流入を抑制することにより，細胞内 Na 濃度のウアバインによる増加をみかけ上抑制し，抗不整脈作用を示すことを明らかにした。

〔文献〕

- 1) Kiyota GOSHIMA, & Shigeo WAKABAYASHI. Involvement of a $\text{Ca}^{+} - \text{Na}^{2+}$ e-exchange system in genesis of ouabain-induced arrhythmias of cultured myocardial cells. J. Mol. Cell. Cardiol., 13, 489-509(1981).
- 2) Kiyota GOSHIMA, & Shigeo WAKABAYASHI. Inhibition of ouabain-induced increase in Na content of cultured myocardial cells by quinidine and procainamide. J. Pharmacol. Exp. Ther., 224, 239-246(1983).

Recurrent sustained ventricular tachycardia に対する Verapamil の作用機序に関する研究

笠貫 宏（東京女子医科大・日本心臓血圧研・内科）

近年、臨床電気生理学的検査法の発展により、心室性頻拍（VT）に関する研究は著しく進歩した。即ち、心臓ペースングにて人為的にVTを誘発および停止させることによってVTの機序解明、抗不整脈薬の効果判定および作用機序の検討が可能となった。Ca 持抗剤であるVerapamilは発作性上室性頻拍症に対しては有効であり、その作用機序は房室結節での伝導抑制である。一方、VTに対して本剤は無効と考えられているが、その有効性については必ずしも確立されていない。我々はVTに対するVerapamilの影響について電気生理学的検討を加え、その作用機序について考察する。

対象はrecurrent sustained VTを有する症例（男、3例、年齢16～30歳、平均24歳）で、いずれも明らかな基礎心疾患は認められなかった。3例とも本室ペースングの単一早期刺激法によって自然発作と同一波形（CRBB+LAD型）のVTが誘発され、右室ペースングで停止された。Verapamil 5mg 静注後の電気生理学的検査では単一早期刺激法でVT誘発可能な連結期のZone (VT zone) は3例とも著明に拡大し（各々410～440 msec から500～610 msec, 265～280 msec から320～460 msec, 330～340 msec から340～390 msec）、かつ長い連結期でVTが誘発された。誘発されたVTのレートは著減し、心室補従の出現～三段脈あるいは二段脈となり、洞調律に復した。1例では更にverapamilを増量すると再び心室性期外収縮が出現し、二段脈となった。

3症例において、VerapamilはVTの停止効果を有したが、電気生理学的検査によるVT zoneは著明に拡大し、予防効果は無効～増悪の可能性が示唆された。Verapamilはslow inward currentを抑制することから、本症例のVTの機序として次の2つが考えられる。即ち、第1はVTのリントリー回路にslow response action potentialが存在すること、第2はVTがtriggered activityによって生じることが考えられる。後者はslow channel dependentなafter-potentialによると考えられている。右室単一早期刺激によりVTが誘発されることからre-entry機序の蓋然

性が高いと考えられるが、最近、triggered activity も類似の性質を有していることが指摘されており、VT に対する Verapamil の作用機序については今後更に検討が必要と考えられる。

抗不整脈薬の薬効評価のための動物実験モデル

内藤政人（国立東京第二病院・循環器）

最近、急死の原因となる心室性不整脈の誘発が可能となり、臨床的な新知見が得られるようになったが、実際の治療は未だ経験的にならざるを得ないのが実状である。臨床的に行う新しい治療法の評価に伴う危険を考慮すると、その研究には動物実験モデルがどうしても必要となる。しかし、現在までの多くの報告をみる限り、必ずしも臨床に役立つような実験モデルが開発されていない。最近のデータ偏重主義も一役買っていると思われるが、学問の細分化が著しく進んだ結果、臨床家の目から見ると基礎のデータが余りにも臨床とかけ離れるようになり、何か別の世界で行われていることのように感じられることさえある。今後は誰かがこの両者を結びつける作業をすべきである、そのためにも今回のような基礎と臨床との交流は非常に有意義であると思われる。

心室性不整脈に対する犬を用いた動物実験モデルとして、急性モデルが主として使われてきた。いわゆる Harris の一段階結紮法を行うと、実験犬の死亡率は10—90%と報告によりバラツキが多く、大量の実験と共に厳密な統計的解析が要求される。Harris の一段階結紮法のあとに再灌流するモデルでは、実験犬の死亡率は50—100%と高くなり、20—30分間の結紮後に再灌流すると、もっとも死亡率が高い。また、この一段階結紮後に再灌流を行い、これをくり返すいわゆる連続結紮法では、その結果に一貫性がみられない。このように急性犬の不整脈モデルにはいろいろな問題点があり、臨床に役立つようなデータはほとんどない。Harris の二段階結紮法を用いた実験犬に発生する不整脈に対しては、いくつかの抗不整脈が有効であることが報告されている。

臨床の場で現在一番の問題となっているのは慢性冠動脈疾患患者にみられる急死に関連した心室性不整脈であり、これに近い犬の実験モデルが数年前よりいくつか作られている。筆者もその一つを行ってきたので紹介した。その作製方法は、10kg 前後の比較的小さな健康犬を選び、麻酔下に左第5肋間開胸、冠動脈の走行確認後、左冠動脈前下行枝の中央附近を Harris の二段階結紮を行い、2時間後に再灌流する。側副血管の発達がよく犬では、心央部附近の数本の心外膜表面を走行する冠動脈を結紮する。3日目以降に再開胸すると、健常部と梗塞部との入り組んだモザイク模様の慢性梗塞犬ができ上り、非常に簡単に programmed pacing により心室性不整脈の誘発が可能である。これを用いて数種類の抗不整脈薬の薬効評価を行ったが、その他不整脈の発生機序の解明、急死の可能性のある患者の発見、programmed pacing 法の再評価、薬剤の用量・投与法の決定などにも用いることができると考えられた。従って、今後大いにこのモデルを使用して

新知見が得られることが期待され、またいくらかでも患者のために役立つようなデータが得られるものと確信している。

モデル不整脈とイオンチャネル

橋本敬太郎（山梨医科大・薬理）

我々は三種のイヌ心室性不整脈モデルに対して各種の抗不整脈薬の作用を検討し、抗不整脈薬の電気生理学的作用の分析から、それ等モデル不整脈の発生機序、または抗不整脈薬の作用機序を明らかにしたいと考え実験を行ってきた。イヌのモデル不整脈のうち、ジギタリス不整脈には、Vaughan Williams の分類でクラス 1 とされる Na チャネル抑制薬がすべて有効であった。電気生理学的に摘出心筋ではジギタリスが、異常自動能を誘発し、それが Ca 拮抗薬で血圧を低下させるので、大量投与は出来ず、無効であった。アドレナリン不整脈には、 β 遮断薬は当然のことながら有効であったが、クラス 1 の薬物には、有効なもの、悪化させるもの等があったが、クラス 4 の Ca 拮抗薬はすべて有効であった。以上の成績から詳細なモデル不整脈の発生機序は不明であるが、ジギタリス不整脈は、Na チャネル、アドレナリン不整脈は、Ca²⁺ チャネルが関与している不整脈ということが出来よう。冠動脈二段結紮不整脈は、クラス 1 の薬物のほとんどが有効であったが、リドカインは無効であった。今後クラス 1 の薬物が Na チャネル抑制以外にどの程度他のイオンチャネルを常用量で抑制するかを検討し、抗不整脈作用とイオンチャネルの関係を明らかにしたいと考えている。

『睡眠促進物質研究会』

昭和58年7月5日～7月7日

井上昌次郎（東京医科歯科大・医用器材研）

十余年に及ぶ地道な努力の甲斐があって、断眠ラットの脳幹に生成される睡眠促進物質群SPSの第1号A-1が1982年に同定された。さらに、A-2、B、Xという未同定物質の存在が化学的にも生理的にも確実となった。ここ1年間の睡眠物質研究の展開は、国の内外ともにめざましく、新しい情報の整理と体系化が必要となった。国際睡眠研究会議、国際生理科学会議の開催が間近かに迫った。これらの情勢をふまえて、SPS研究の最新データを持ち寄って検討を加え、また今後思い切った研究方針の転換を計ろうとする研究会が本会である。

小人数（生理研4名、山梨医大2名、東京医歯大5名、他2名）で集中的に、納得のいくまで議論できるという岡崎のすぐれた環境を活かして、昨年度同様、2泊3日をかけて徹底的にいろいろな角度から分析と統合が試みられた。成果の主要内容は、以下の3編の報告に記すとおりであるが、ここでは本会のプログラムをそのまま転写して会合の熱気をいくらかでも伝えておきたい。

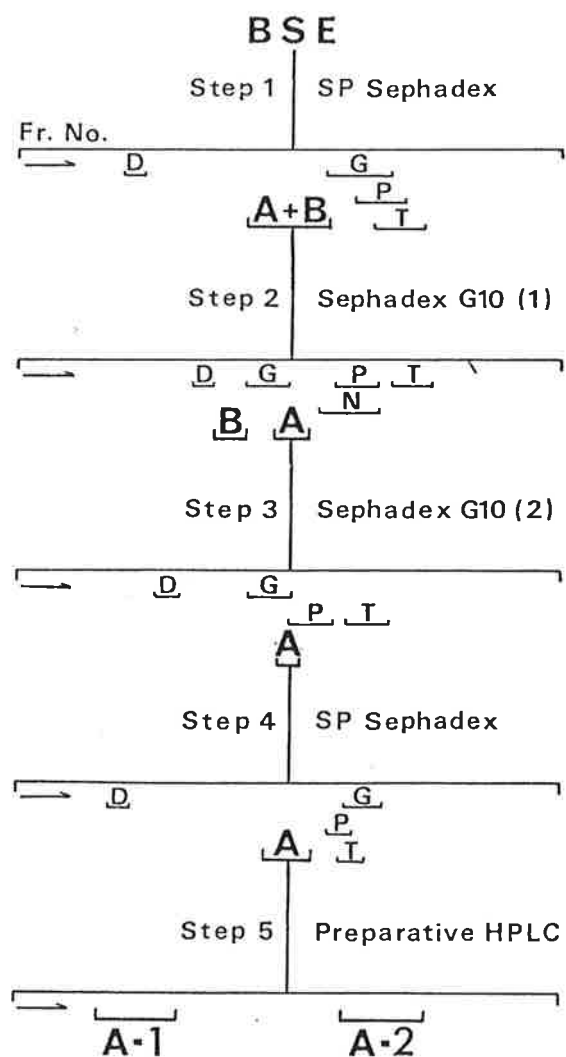
睡眠促進物質研究の新戦略	内蘭耕二
睡眠促進物質精製—現状と将来計画	菰田泰夫
SPS - A 研究の将来計画(1)	長崎紘明
SPS - A 研究の将来計画(2)	入来正躬
SPS - A 研究の現状	長崎紘明
SPS - A/B 研究の現状	本多和樹
睡眠物質の新検定法	西田 哲
睡眠物質の比較	井上昌次郎
フランスの睡眠研究	内蘭耕二
睡眠促進物質研究計画	尾崎 毅
睡眠促進物質の薬化学的応用	石川正幸
総合討論：新しい研究の方法と分担	

〔世話人 山岸俊一〕

睡眠促進物質の精製，単離，同定

菰田泰夫，石川正幸（東京医科歯科大・医）

断眼ラット脳幹抽出物（BSE）に含まれる睡眠促進物質の精製を下图のように行い，睡眠促進活性をもつA-1を単離し，同定した。さらに，同様の活性をもつA-2およびBの精製を続行中である。



睡眠物質SPS-A₁の単離とその作用について

長崎紘明（山梨医科大）

1. SPS-A₁の単離は、マウスの逆説睡眠量を指標とした。マウスの逆説睡眠量は一日当りの総量が遺伝的に規定されているので、それを生理的な睡眠量として基準値とした。対照値としては、生理食塩水投与群、溶媒投与群の二種を用いた。
2. 別項フローチャートのステップ(3)と(4)において、強力な逆説睡眠増加作用が見出された。生理的な逆説睡眠量の50%増しくらいの効果であった。
3. 別項フローチャートのステップ(5)において、逆説睡眠増加作用は、二つの分画にわかれた。（ステップ(5)の精製法はカラム溶媒とも2種類の方法で行われた。）ステップ(5)の活性は、いずれの場合も二つの分画にあった。
4. SPS-A₁は同定された。既知物質であった。
SPS-A₂は同定に至らなかった。
5. SPS-A₁は natural と authentic との物質について、濃度依存効果を検討したところ、類似した曲線を示した。
6. authentic の物質については数種の関連化合物の活性を測定したところ、いずれも活性を示した。活性は、逆説睡眠の増加作用が抑制作用であった。現在は、その作用と化合物の化学構造について検討中である。

睡眠促進物質 SPS-A とSPS-B の活性

本多和樹，西田 哲，菰田泰夫，井上昌次郎（東京医科歯科大・医）

〔材料〕 24時間電気刺激断眠したラットの脳幹抽出物を精製していくと、数種類の睡眠に活性を示す分画が認められる。そのうち SPS-A はすでに単離されており、また SPS-B は SPS-A を除く活性分画としては最も精製が進んでいる。

〔方法〕 被験動物には、脳波、筋電、脳温用の電極と第三脳室内への物質注入用カニューレを、それぞれ慢性的に植込んだ300—350 g の Sprague - Dawley 系の雄ラットを用いた。脳波、筋電、脳温、行動は睡眠ポリグラフで連続記録し、コンピュータシステムでオフ・ライン処理を行なう。SPS-A および SPS-B は明瞭な睡眠—覚醒の日周リズムを示すラットの脳室内へ、暗期（1900—0500）、明期（0700—1700）にかけて、200 μ l の生理食塩水に溶かし10時間連続して注入する。睡眠促進効果は前日の生理食塩水のみを注入したときの日周リズムおよび睡眠総量とを比

較して判定する。

【結果】 SPS-A の注入量を 1 p~1 n mol まで10倍ずつ変化させると、暗期（1900—0500）にかけての注入では10 p molでSWSが21.1%（ $P < 0.02$, $n = 8$ ）、PSは70.0%（ $P < 0.05$, $n = 8$ ）のそれぞれの増加を示し、10 p mol が至適量であった。しかし同量（10 p mol）を明期にかけて注入しても SWS, PS ともに変化はみられず、他の量を注入しても同様に変化はなかった。また SPS-A の明・暗期注入とともに脳温の日周リズムへの影響はなかった。

SPS-B は断眠ラット 2 匹分に相当する量を暗期にかけて注入すると、SWS は38.6%（ $P < 0.01$, $n = 9$ ）、PS は50.0%（ $P < 0.05$, $n = 9$ ）の増加を示す。現時点ではすでに単離されている SPS-A と比較すると、より強い睡眠促進効果をもっている。

さらに近年、新しいデータの処理方法としてマイクロコンピュータを利用した、データ処理システムを開発した。将来このコンピュータシステムを利用し、SPS を使った睡眠のコントロールへの可能性が開けた。

『音声による言語行動の生理学的アプローチ』

昭和58年 9月 9日

斎藤 望（提案代表者）（獨協医大・医・生理）

平野 実，栗田茂二郎，永田和人（久留米大・医・耳鼻科）

広瀬 肇（東京大・医・音声研）

沢島政行（東京大・医・音声研）

高田 充，長浜辰文（徳島大・歯・生理）

矢島幸雄，林 泰正（兵庫医大・医・生理）

鎌田 勉，亀田和夫（北海道大・歯・生理）

谷口郁雄（東京医歯大・医・難治研）

前川正夫，藍 書成，斎藤 望（獨協医大・医・生理）

角田忠信（東京医歯大・医・難治研）

宮本健作（大阪大・人間科学）

日野原正，平林秀樹（獨協医大・医・気管食道科）

平野はヒトと哺乳類の声帯の比較解剖学的考察を試み、声帯じん帯はヒトのみにみられることを見出した。広瀬はヒトの声帯が調音器官（発声器官でなく）として重要性を示摘した。ヒトのスピーチは分節性が特徴的であるが、従来考えられている咽頭と口唇だけが調音の役割をしているのではなく、声帯の急速な開閉が大きく関与していることを強調し、筋電図とファイバースコープでこの事実を実証した。先に述べたヒト声帯の形態的特質はこの調音機能と共に発達したと思われる。沢島はヒトの軟口蓋筋群の調音動態を同時にダイナミックに解析するためにX線マイクロビーム装置を用いて筋運動の同期化に注目した。筋電図パターンと比較すると、筋群の動きに遅れと平滑化がみられることを見出した。運動指令は動きの遅れがあることを予期して組立てられているらしい。高田はネコ舌運動の motoneuron の解析を通じて、ここに示されたヒト調音筋の運動指令の神経機構の裏づけを示唆した。ネコ舌筋 motoneuron には「つき出し」 motoneuron と「ひっこめ」 motoneuron の2種類があり、それらに抑制シナプスの差異（同側と対側支配の仕方が2種の間で違う）を示した。それら抑制シナプスは motoneuron の使用、未使用に関係して変化する可塑性があることを強調した。この一連の事実が口蓋筋の調節、学習訓練の神経機構にもあてはまるとすれば、先に述べた運動指令の組立てにも関係が深いことを思わせる。

矢島はネズミの超音波発声筋の motoneuron を同定し、他の哺乳動物の発声筋の motoneuron と同じく、疑核ニューロンであることを示した。鳥類でもこれと相同である。鳴器を支配する

motoneuron 舌下神経核ニューロンが見出されている。前川はこの motoneuron を支配する、カナリヤと九官鳥の脳にある 2 つの発声中枢、HVC と RA についての支配関係を述べた。HVC は RA とその周辺領域を支配し、RA は motoneuron を直接支配する。RA とその周辺領域には聴覚に反応するニューロンを見出し、この反応パターンと形態が thalamocortical diffuse projection と似ていることを示した。この投射系と RA が鳥類の歌声学習と音声認識に果たす役割を論じた。

谷口と鎌田はコーモリの音声（音響）定位について紹介し、谷口は日本産キクガシラコーモリの耳介の高速リズム運動の役割と意味を示した。コーモリは飛行時にドブラー効果による位置定位を行うが、静止時にはこの効果がないので耳介運動による代償をしていると説明した。耳介運動の motoneuron を HRP 染色で同定し、発声中枢との関係を示唆した。鎌田はコーモリ乳仔の FM 音発声の ontogeny と phylogeny について論じた。

宮本と小島は学習行動の立場から音声認識の意味を考えた。宮本は九官鳥の音声模倣の条件を求めて、実験者と動物との間の密度の深い communication（愛情）が必要であることを強調した。その結果音刺激を条件刺激として音声を模倣させることに成功した。一般に霊鳥類の視覚を手がかりとする学習は多く成功しているのに、聴覚を手がかりとすると訓練は成功しない。小島はこの点に着目し、ニホンザルとチンパンジーを用いて、記憶保持時間（遅延反応）を指標にして、音声と視像とをそれぞれ手がかりとして実験し比較した。その過程で霊長類の音声の内的表象の特徴（音声認識の意味）の分析を試みた。角田はヒトの音声認識パターンに同期する、一定のリズム（60 Hz と 40 Hz）があることを示唆した。最後に日野原は無声帯患者の使用する発声装置を実際に供覧して注目を引いた。この装置は後日、小島がサルに発声訓練させる実験に使用して、ヒト類似の母音発声に成功した。この事実は、今まで困難だった、サルの発声をヒトのそれに近ずけることによりサルをヒトの発声機構のモデルとして使用することを可能にした。これは画期的意義があり、将来の発展を期待したい。

本会をオルガナイズした頭初の目的はほぼ達せられ、多方面からの問題提起があった。音声認識は入力系だけでなく出力系も共に含んだ系で理解した方が適当である（前川と谷口の報告）。この考え方と音声の内的表象の特徴との関係がありそうである（小島）。また、舌 motoneuron の抑制シナプスの解析（高田）は調音筋の運動協調の様式（沢島と広瀬）をさぐるのにより手がかりを与える可能性を示す。

無喉頭者における言語行動について

日野原正，平林秀樹（獨協医科大・気管食道科）

言語活動は、ひと社会においては近位的情報伝達として極めて重要な意義をもつが、これが一端喪失された状態においては、言語行動ならびに精神生理面において、常態と異なる種々なる特

舌下神経運動ニューロンのシナプス後電位

高田 充, 長浜辰文 (徳島大・歯・生理)

そしゃく運動時或いは発音時における舌の動きを調節する末梢・中枢機構を明らかにするために, 舌運動の基本となる舌下神経運動ニューロンの興奮と抑制機構をしらべた。舌下神経運動ニューロンは舌つきだし筋支配の運動ニューロン (P-Mn) と舌ひっこめ筋支配の運動ニューロン (R-Mn) に大別される。実験にはネコを用い, 運動ニューロンへの感覚情報として舌神経刺激を, 中枢からの情報としては大脳皮質舌運動領刺激を用い, 各刺激に対する運動ニューロンの応答をしらべた。

舌神経刺激により誘発されるシナプス電位より, P-Mn-R-Mn は IPSP 型, IPSP-IPSP 型, EPSP-IPSP 型の 3 型に分類できる。舌神経刺激により誘発された IPSP の研究より P-Mn では, 同側・対側舌神経の抑制性シナプスは細胞体部・樹状突起部に結合しており, R-Mn では同側舌神経は主に細胞体部に, 対側舌神経は主に樹状突起部に抑制性シナプスで結合していることを推察した。細胞体部及び樹状突起部と異なった部位に結合していると推察される抑制性シナプスの性質および大脳皮質舌運動領刺激により誘発されるシナプス後電位について報告する。また軸索を切断し, 筋細胞との連絡を断った運動ニューロンでのシナプスの可塑的变化について討議したい。

ラット超音波発声の中枢発現機構の電気生理学的研究, 主として疑核運動ニューロンの役割について

矢島幸雄 (兵庫医大・生理)

ラットなどのげっ歯類の発する超音波にはある行動場面に特異的なある種の交信機能があることが示唆されている。私達はこれを交信のきわめて単純なモデルとみなし, 脳のどの部位がどのように働くことによって, このような交信が動物間で可能になるかという点に大いに興味を持っている。この問題の解明は最終的には, ヒトの言語, 特に発語の中枢神経機構解明に重要な糸口を与えるであろうことが期待される。最終共通路としての疑核ニューロンに関する知見についてものべ, ラット超音波発声の中枢発現機構の問題点や今後の展望などにも言及したい。

ネズミとコウモリの超音波発声

鎌田 勉, 亀田和夫 (北海道大・歯・生理)

ネズミ類は可聴音の他に, 超音波を発する。エコーロケーションを行うという報告もあるが, 定かではない。彼らは超音波を, (a)乳仔が親を呼ぶ場合, (b)攻撃行動を受けた場合, (c)性行動のあと雄によって, (d)単独状態におかれた場合, に発する。従って彼らは超音波を, 特定の意味をもつ信号として使用している。一方コウモリはエコーロケーション用の信号として超音波パルスを使用する。彼らは反射してくるエコーを解析することによって物体を検知し, その速度, 性質を知る。彼らが使用する音には大きく2種類がある。1つはCF-FM音といわれるもので, 一定の周波数の音につづいて周波数が変化する音が出されるものであり, もう1つはFM音といわれ, 周波数が下る音である。ここではラット, マウス, スナネズミ等の実験動物および野生ネズミの発する超音波について, とくに乳仔が発するものが生後どのように推移するかを紹介し, またコウモリについては, 日本産および北米産コウモリについて上記2種の音, 種々のコウモリの発する音の文献による系統発生学的比較, および実験室でコウモリが, 障害物の糸を回避して飛ぶときに, どのように超音波を出すかを紹介する。またネズミおよびコウモリにおける超音波受容のメカニズムの相違についても言及したい。

ニホンキクガシラコウモリの反響定位：発生と聴覚の関係

谷口郁雄 (東京医科歯科大・難研)

ニホンキクガシラコウモリが発する超音波パルスは約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成分から成っている。パルスのCFの平均は65.5 k Hzで, ハーモニックスを持たない。

一方, 耳介反射を利用してオーディオグラムを求めると, いき値が最低となる周波数(BF)は平均66.3 k Hzであった。オーディオグラムはBFにシャープに同調し, Q値は極めて高い。

CFとBFを比較すると, BFは常にCFよりも高く, 平均0.8 k Hzの差があった。従ってコウモリの聴覚系は自分の声には同調しないようにできていることがわかる。そのため, 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とのずれによって, 反響定位ができなくなる。そこで, キクガシラコウモリはエコーの周波数を何らかの方法で上昇させ, 補償していると考えられる。

1962年にGriffinらはヨーロッパ産のキクガシラがとまり木にぶら下がっているときや, そこへ

Landing するときに反響定位を行う際、左右の耳介を交互に、前後方向に激しく振動させることと、その耳介の運動が発声と同期していることを報告した。しかし、この行動の生物学的意味については明らかにされていない。

ニホンキクガシラについて、その耳介運動の速度をストロボカメラで測定すると、その速度は充分速く、ドプラー効果によって、CF と BF との差を補償する可能性が示唆された。

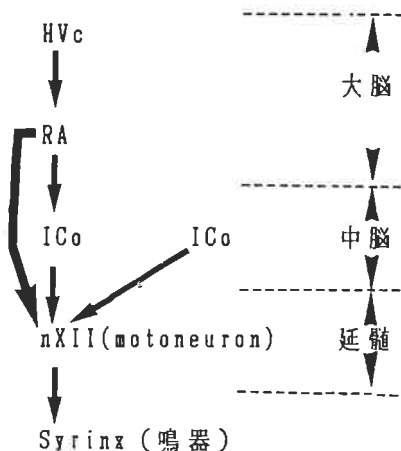
耳介運動によるエコーの周波数補償は、Schnitzler (1968) が発見した発声系による飛行中に行うドプラー変換補償とは別のものである。この補償はコウモリが飛行するとドプラー変換によってエコーの周波数が上昇するので、自分が発するパルスの周波数を下げて、エコーの周波数が BF になるように調節する補償行動である。耳介運動による補償はコウモリが積極的にドプラー効果を利用して行うもので、彼らが必要な情報を得たいと思うときだけ耳介を動かし聞く訳であるから、仲間同志の jamming 防止にも役立っているであろう。

この発声系と聴覚系の協調機構について、神経解剖学的にも検討したので、その結果を併せて報告したいと思う。

鳴きん類の発声中枢と聴反応

前川正夫，藍 書成，斎藤 望（獨協医大・生理）

鳴きん類の発声の発達 は学習によることがよく知られている。その発達過程はヒトの言語発達過程とよく類似しているので興味をもたれている。鳴きん類発声中枢を他の鳥類のそれと比較すると特別に発達している。そのうちで大脳基底核として特異的発達した2つの核、HVC と RA はその部位が明瞭に同定し易いのが特徴的である。HRP 法と2 DG-法によって得られた、鳴きん類の発声中枢の概略を右図に示す。鳥類は錐体路がなく、運動中枢の左右交差がほとんどない。鳴



器 (syrinx) を支配している中枢系も大部分は片側性であるが、中脳部位 (ICo) においてのみ両側性である。motoneuron である、nXII は 2 重に支配されているが、特に大脳からの直接支配 (RA) が強くみられる。これら中枢核のうち HVc と RA の発達は発声の発達過程と密接な関係が報告されている。そのなかで特に興味あることは RA- neuron のあるパラメーターが発声と平行して発達することが示唆されている。RA- neuron のシナプスレベルでの運動系機能と感覚系機能の統合がみられ、その統合関係が発声の消長に平行して進行すると予想される。

この点に着目して、九官鳥とカナリヤの RA の (1) 自発発声 neuron の音刺激に対する反応、(2) RA の聴反応 neuron の入出力の細胞構築 (その樹状突起、軸索、シナプスの機能と形態) について研究を展開する計画である。その結果の一部を報告する。

言語情報処理と 40 Hz, 60 Hz システム

角田忠信 (東京医科歯科大・難研)

〔目的〕 左右の脳の聴覚情報処理機構は言語と非言語に分れ、これまでの内外の研究はこの範ちゅうに属する音刺激を用いてきた。角田法は原理的に 20 Hz 以上の可聴範囲のすべての純音を 1 Hz 毎に検査できる分解能を持っている。16 KHz 以下の純音を詳細に調べた結果、人脳には 40 Hz, 60 Hz を基調とする特殊な聴覚情報処理機構のあることを発見した。

〔方法と対象〕 角田法に習熟した日本人の正常者 9 名 (19~57 才) と中国人 3 名について長期間にわたって可聴範囲の純音の優位性の特徴を求めた。

〔結果〕 人の聴覚系は優位性の特徴から 99 Hz 以下の低音域と 100 Hz 以上の音声周波数帯域とに二分される。低音域では人種、言語差は見られず、純音の優位性はこれまでの常識と逆に右耳優位となるが、40 Hz, 60 Hz, 80 Hz は例外的に左耳優位の特徴を示した。100 Hz 以上の音声帯域では 1 k Hz の整数倍を含む大多数の周波数は非言語音の特徴である左耳優位を示したが、40 Hz, 60 Hz を基調とする整然とした右耳優位の系列が見出された。日本人の特徴は 40, 60 の等差級数 (120, 160, 200...15040, 15080...), (120, 180, 240...15060, 15120 Hz) の 1 Hz ずつの系列から成るが、中国人では等比級数的に (40, 80, 160, 320...5120), (60, 120, 180...3840 Hz...) を中心とした少々巾の広い帯域をもつ。両群とも言語刺激によって優位性の逆転がおこることから非交叉神経の関与が推測される。また、指先に与えた振動刺激やランダムな配列の視覚刺激に対しても 40, 60 Hz 系列が存在した。

〔考察と結論〕 1 kHz 刻みの精緻な分解能は古典的聴覚伝導路には証明されていない。40, 60 Hz システムは視、聴、触角その他の感覚とも共通な脳幹部中脳網様体を中心とした感覚の左右の振り分け機構の機能を反映したものと推測される。

九官鳥の音声物まね行動

—ヒトのまねとトリのまね—

宮本建作（大阪大・人間科学部・行動工学）

- I. ヒトの音声のまね：九官鳥の幼鳥に女声（“オハヨウ” 他）を録音したテープを毎日午前と午後の一定時刻に1時間聞かせると、約70～100日で正確な安定した音声模倣が形成された。ヒトとトリの音声（“オハヨウ”，“メメちゃん”）についてのサウンドスペクトログラムを比較した。(1)スペクトログラムのパターンは基本的に類似していた。(2)トリは母音の「わたり」（／o／- ／a／- ／i／- ／o／）を巧みに模倣した。(3)トリの音声ではヒトに明瞭に認められる約500 Hz以下のエネルギー成分がほとんど欠如しているにもかかわらず、有声通鼻音（／n／）を構音できた。(4)トリの音声では[h]成分がヒトのそれより明瞭に現われた。(5)両者の3母音のフォルマント（F）分布パターンは、／i／のF1を除いて大体類似していた（例えば、トリの／o／のF1：540 Hz, ヒト：521 Hz, F2：841 Hzと877 Hz, ／i／のF1：758 Hzと440 Hz, F2：2526 Hzと2519 Hz）。(6)トリの模倣音声を聞いて、関西弁に特徴的なイントネーションが認められる場合でも、スペクトログラムの上には正確に現われないことがあった。(7)九官鳥の音声模倣の発達過程は、乳児の言語習得の初期過程に似ていた。
- II. 条件反射性の模倣発声：異なる3つの音刺激に対して、順次特定の模倣音声を条件づけると、45～73日で完成した。さらに難しい課題として、3種の条件刺激をランダム呈示した弁別学習も43日で100%基準に達した。
- III. トリの音声のまね：音声模倣を学習した成鳥に隣接して幼鳥を飼育すると、約7～10日で成鳥の模倣音声をまねるようになる。幼鳥の音声はサウンドスペクトログラム、基本周波数および母音原波形の上から教師役の成鳥のそれにきわめて類似していた。
- IV. 飼育環境と模倣：家庭で愛情深く単独飼育された幼鳥は、研究室で集団飼育された幼鳥に比べて、自発的な音声模倣は量的にも質的にも著しく豊富で多様性に富んでいた。このことはヒトの言語発達を規制する環境要因の重要性和類似していて誠に興味深い。

チンパンジーの音声弁別

小島祥三（京都大・霊長研・心理）

チンパンジーの言語学習については最近20年来多くの研究が行われているが、すべて視覚の手がかりを使って学習訓練が行われている。手話またはキーボードとモニターディスプレイなどの視

覚サインを使って動物同士またはヒトと動物の間で精細なコミュニケーションを行っている。それに比較して音声による言語学習について試みは多くなされたが成功例はいまだにない。

しかしヒトを含めて動物が音声によるコミュニケーションを行っていることを考えると聴覚刺激の弁別および記憶の研究は重要である。それ故刺激モダリティによる記憶保持（遅延）時間の変化があることに着目して実験を進め、ニホンザルとチンパンジーを用いた実験で予想されたような刺激モダリティによる差があることを見出した。また音声弁別についても同じ動物を用いて検討したのであわせて報告する。

『音受容とリン脂質代謝』

昭和58年11月 1 日～ 2 日

Characteristics of TPI antibody immunized on rabbit.

吉岡 亨（横浜市大・医）

Characterization of biomembranes within the cochlea

橘 正芳（京都府立医大）

Polyphosphoinositides in auditory Transduction

Jochen Schacht（ミシガン大・聴覚研）

Ca antagonism and reversibility of gentamicin - induced loss of cochlea
microphonics in the guinea pig.

高田 憲（京都府立医大）

Effect of neomycin on cochlear potentials.

田中康夫（獨協医大）

Effect of neomycin on the hair cell function.

柳沢慧二（鶴見大・歯）

音受容とリン脂質代謝

吉岡 亨（横浜市立大・医）

リン脂質代謝はホルモンや神経伝達物質の受容に極めて重要な役割を果たしていることが知られているが、最近ではこれに加えて光受容や音受容といった感覚受容の素過程にも、リン脂質代謝が関連していることも示唆されるようになって来た。また古くから知られていた耳毒性物質アミノグリコシド化合物（ネオマイシン、ストレプトマイシン）のレセプターがイノシトールリン脂質 2 リン酸（TPI）である可能性も高くなった。今回、ミシガン大 Schacht 博士の来日を機に音受容とリン脂質代謝の関連について検討した。まず吉岡（横浜市大）は TPI の抗体を作り、その特性を紹介した。次に柳沢（鶴見大・歯・生理）は有毛細胞中に TPI の存在を証明し、吉岡の作成した TPI 抗体を用いて有毛細胞を染めだした。橘（京都府立医大・耳）も同じ抗体を用いて有毛細胞を金コロイド法により観察した。Schacht は TPI と音受容に関する歴史的経緯を説明すると共に最近の研究成果を紹介した。高田（京都府立医大・耳）は最強力な耳毒性を持ってゲンタマイシンによるマイクロフォン電位の消失と、それからの回復について検討した。田中（獨協医大

・耳) は、これまた強い耳毒性を示すネオマイシンにより、cochlear potentialが減少してゆくか Ca がアンタゴニストとして有効であると述べた。

以上を総括するにアミノグリコシド化合物のレセプターがTPIであるかないかについてはまだ解決されていないが、TPI 抗体の出現により、これらの解明も時間の問題であるとの印象をうけた。

『筋内部膜の活性化, 心筋・平滑筋の収縮調節』

昭和58年11月26日～11月27日

塩酸ブピバカイン（マーカイン）による急性筋融解

（国立神経センター）猪飼哲夫・高木昭夫・杉田秀夫

興奮収縮連関の化学的アプローチ

（防衛医大・第一生理）大羽利治・堀田 健

Ag^+ による骨格筋の張力発生と外液 Ca^{2+} 濃度依存性

（名市大・医・第一生理）大羽利治・堀田 健

骨格筋収縮におけるエネルギー収支の不足

（1）高時間分解能³¹PNMRによるクレアチンリン酸の収縮後分解

（大分医大・生理）山田和広・田之倉優

（2）Labile heatの筋節長依存性

（大分医大・生理）米谷快男児・山田和広

Skinned fiberの弾性系

（慈恵医大・第一生理）馬詰良樹・名取礼二

Skinned fiberの収縮特性に対する浸透圧効果

（帝京大・医・第二生理）土屋禎三

Arsenazo IIIによる骨格筋収縮中の Ca^{2+} 濃度測定

（川崎医大・第一生理）越智和典・村松幹郎

蛙骨格筋急冷収縮時の細胞内 Ca^{2+} の定量化

（慈恵医大・第二生理）栗原 敏・小西真人・酒井敏夫

骨格筋におけるカリウム拘縮の2つの要素

（札幌医大・第一生理）高氏 昌・筒浦理正・金谷秀秋

心筋収縮モデルによる等張力性収縮のシミュレーション

（順天堂大・医・第二生理¹⁾：電算機室²⁾）真島英信¹⁾・
樺沢一之²⁾

心筋の単一カルシウムチャンネル電流に対するカテコルアミンの作用

（順天堂大・医・第二生理）大地陸男・日野直樹

Tbイオンの筋収縮に及ぼす作用について

（順天堂大・医・第二生理）西江 弘・田中薫子・真島英信

心室固有筋の異常自動能

（東京医歯大・難研）平岡昌和

心筋の Sarcomere dynamics

(川崎医大・M. E.) 辻岡克彦

Ba 拘縮心筋の収縮特性

(鶴見大・歯・生理) 三枝木泰丈

Oxalate 法による平滑筋細胞内の Ca translocation の研究

単一心筋細胞における局所収縮の伝播の高速ビデオによる研究

(帝京大・医・第二生理) 杉 晴夫・大門健夫・為安 司・豊城隆明

カエル心房筋における Na^+ 関連の遅延電流($\text{Na} - \text{Ca}$ 交換電流?)

(九州大・医・第二生理) 後藤昌義

平滑筋の神経伝達物質調節によるカルシウムイオンチャンネル

(東北大・医・応用生理) 猪又八郎

サポニン処理単離平滑筋細胞の形態学的観察

(札幌医大・第一生理) 太田 勲・薮 英世

妊娠ラット子宮筋におよぼす Mg^{2+} およびカテコラミンの効果

(山口大・医・第一生理) 長 琢郎

平滑筋の収縮に対する低温効果と Vanadate の作用

(近畿大・医・高血圧研) 砂野 哲

強縮時におけるカエル骨格筋小胞体の元素組成・パリノマイシンの効果

(順天堂大・医・薬理) 北沢俊雄・江橋節郎 (A. P. Somlyo)

(生理研)

骨格筋収縮時および拘縮時の超音波弾性率

(名大・工・応用物理) 八田一郎

骨格筋の単収縮と強縮におよぼす低 Na^+ の効果

(福岡大・医・第二生理) 波多野純真・河田 博

Guercetin の Ca 遊離作用

(順天堂大・医・薬理) 小川靖男・呉林なごみ

筋小胞体の Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release 機構による生理的条件下での最大 Ca 遊離速度

(東大・医・薬理) 遠藤 実

細胞内液の灌流による心筋イオン流の分離

(生理研) 入沢 宏・松田博子・野間昭典

外液 Ca に依存しない収縮について

(名大・医・第一生理) 富田忠雄

Nitroglycerine と isoprenaline の血管弛緩作用

(九大・医・薬理) 栗山 熙・伊藤猛雄・末松栄一

VIP による平滑筋弛緩反応に対する APP の抑制作用

- 冠動脈平滑筋の収縮機構について
(北大・獣医・薬理) 伊藤茂男・大賀 皓
- 脳動脈のノルアドレナリン反応性
(新潟大・医・薬理) 仲沢幹雄・今井昭一
- イヌ静脈平滑筋における α -受容体のサブタイプ
(滋賀医大・薬理) 戸田 昇
- 平滑筋収縮蛋白の微量実験法
(名大・医・薬理) 重井達明
- C - Kinase によるミオシン軽鎖リン酸化反応
(東大・医・薬理) 野々村禎昭
- 心筋の興奮収縮連関に対する inotropic agents の影響
(三重大・医・薬理) 日高弘義
- 新強心薬 ARL- 115 BS の心室筋に対する作用
(北薬大・薬理) 藤野澄子
- (東北大・医・第二生理) 柳沢輝行・平 則夫

塩酸ブピバカイン（マーカイン）による急性筋融壊

猪飼哲夫, 高木昭夫, 杉田秀夫 (国立神経センター)

局所麻酔薬である塩酸ブピバカイン（マーカイン）の筋肉内注射により，筋線維の壊死とその後の急速な筋再生が出現する。

今回，筋線維束およびスキンドファイバーに対するマーカインの効果（in vitro）を検討した。その結果にもとづいて筋壊死をおこす機序について考察した。

ラットの長趾伸筋を Krebs - Ringer 液を含む小容器中に固定して張力を記録した。マーカインを添加した場合には，著名な筋拘縮が発生した。しかし，Ca-free の Krebs - Ringer 液ではマーカインによる筋拘縮の程度は小さく，さらに procaine を添加した場合には，明らかに減少した。筋破壊の一指標として外液中に漏出した CK 活性を30分毎に測定した。マーカインにより筋肉内の CK が多量に漏出することが観察された。外液中の Ca を除去し，Procaine を添加した時は，外液に漏出する CK は著名に減少した。形態学的には，マーカイン処理後には過収縮や断裂した筋線維が観察された。電顕では，形質膜の部分的欠損，筋節の短縮，ミオフィラメント配列の変化などが観察された。

別の実験ではスキンドファイバーを使用して，マーカインの筋小胞体に及ぼす作用を分析した。筋小胞体のみかけ上の Ca 摂取の抑制，Ca 漏出や Ca 誘発性 Ca 遊離の促進が認められた。

上記の実験より、(1)マーカインによる筋壊死に際して、外液のCaイオンは筋破壊を加速させている。(2)マーカインは筋小胞体よりCa漏出や遊離を亢進させる。この作用が筋壊死のトリガーとなる可能性が考慮された。

興奮収縮連関機構への化学的アプローチ

藤野和宏・佐藤義昭・有馬利昭・高井秀昭（防衛医大・生理）

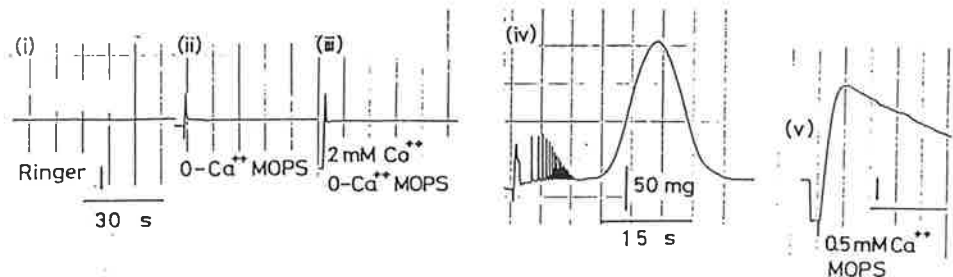
筋の興奮収縮連関（E-C coupling）過程を、それを担う物質系から理解する目的で、種々の aldehydes を用いて検討し、以下の結果を得た。

- (1) *Xenopus laevis* の単一筋線維を用い、これに対する 2 mM acrolein 5 年間の処理は、K - contracture, tetanus を抑制し、caffeine - contracture, 静止電位 (RP), 活動電位 (AP) に殆ど影響しない。これらの事実は、この処理条件が E - C coupling を抑制する事を意味する。
- (2) この E-C coupling に対する選択的抑制作用は、0.5 mM から現われ、coffeine - contracture を未だ抑制しない 5 mM まで認められる。
- (3) 種々の aldehydes の中、acrolein に似た E-C coupling 抑制作用をもつものは、formaldehyde, crotonaldehyde, n- hexylaldehyde, n- heptaldehyde 等幾つかのものである。その中、acrolein が強さ、選択性の点で優れている。cinnamic aldehyde, Na-acrylate には抑制作用は認められない。以上から、aldehyde 基が、抑制作用をもたらす最も重要な部分であり、その残りの基が aldehyde 抑制作用を修飾するものと考えられる。
- (4) acrolein は膜容量を減らさない。
- (5) acrolein は -SH と結合し complex をつくる。cystein との complex は、acrolein が結合する site に結合するが、E-C coupling を抑制しない。一般に、monothiol 類と acrolein との complex（一般の aldehyde）は E-C coupling を抑制しない、これに対し、dithiol 類との complex は（何れも aldehyde）は E-C coupling を抑制し、この抑制は可逆的である。
- (6) acrolein - dithiol complex は、caffeine - contracture, AP, RP, に全く影響しない。つまり、高度に選択的な E-C uncoupling 作用を持つ、又、Rm を 2 倍にし、creep の発現を抑制する。
- (7) 3 mM phenylglyoxal (PGO) は蛙単一筋線維の tetanus, K- contracture を抑制し、Caffeine - contracture, RP, AP に殆ど影響しない（E-C uncoupling 作用）。これは K-Ringer 中の適用では減弱する。PGO 処理は terminal cisternae 内に less dense 斑をつくる。PGO 処理筋からの蛋白の SDS - PAGE 法分析により、低分子量領域に PGO 結合蛋白が現われる。

Ag⁺による骨格筋の張力発生と外液 Ca²⁺濃度依存性

大羽利治, 堀田 健 (名古屋市大・医・生理)

骨格筋の収縮が、膜電位に依存することなく、化学物質により誘起されるか否かを研究することはT管からSRへの情報伝達機序を解明する上で興味がある。我々はウシガエルから得た単一骨格筋線維を用いこれを研究した。1.8 mM Ca²⁺を含むCl⁻-free MOPS液中で5 μMのAg⁺適用により筋はゆっくりと不可逆的に収縮した。この収縮は外液Ca²⁺除去により抑制されたが、Co²⁺やNi²⁺投与では影響を受けなかった。又Ca²⁺除去液中では100 μM Ag⁺投与でも筋収縮は見られなかった。この筋への1.8 mM Ca²⁺又は25 mMカフェイン投与は拘縮を起した。この事はAg⁺が細胞内に入り、SRからCa²⁺遊離を起したと考えるよりむしろ表面膜又はT管膜に作用し、Ca²⁺の膜透過性を高め、外液のCa²⁺流入で筋が収縮したことを示唆している。外液0-Ca²⁺の条件下で、10分間2 mM Co²⁺又は1 mM Ni²⁺前処置後、5 μM Ag⁺投与により投与直後の繰返し収縮とその後の大きな収縮が観察された(図(V))。静止張力に戻った後、0.5 mM Ca²⁺又は25 mMカフェインにより不可逆的に収縮した。グリセリン処置でのT管破壊後はAg⁺による張力発生は認められなかった。3 mM EGTA, 3 mM Mg²⁺を含むCa²⁺-free液に30分浸漬後、筋線維のAg⁺による張力は大きく減少した。特異的SH試薬であるp-chloremercuriphenylsulfonic acid (p CMPS) は筋に対しAg⁺と似た作用を示さなかった。p CMPS処理筋へのCa²⁺投与は筋収縮を引き起こさなかったが、カフェイン拘縮は観察された。今回の実験で、(1)Ag⁺がCa²⁺チャンネルを形成すること、(2)Ca²⁺チャンネル形成はSH基の単なるmodificationだけでは起こらないこと、および、(3)T管がintactな場合、Co²⁺又はNi²⁺処置後、0-Ca²⁺液中でAg⁺筋収縮を起こすことがわかり、Ag⁺はE-Cカップリングの研究に有益な道具として使いうることが示された。



[文献]

1. Silver ion induces transient tension development in Ca²⁺- channel blocked skeletal muscle fibers. Oba, T. & Hotta, K. Jpn. J. Physiol. (印刷中)。

高時間分解能³¹P NMR によるクレアチン燐酸の収縮後分解

山田和廣, 田之倉優 (大分医大・生理)

筋の収縮に際してクレアチン燐酸が分解され、そのエネルギーが利用される。このとき無機燐酸が遊離する。収縮後は、酸素の供給が十分であればこれらの変化は回復する。これらの事実は化学分析の他、燐NMRを用いても明らかにされている。しかしこれまでの方法によっては、収縮に伴って発生するこれらの変化を時々刻々調べるには方法上の制約が大きかった。

天然に存在する燐 (³¹P) は NMR に適した核種であり、この方法によって非破壊的に細胞内の燐化合物の量を測定することができるが、NMR の感度が低いために多くの測定を加算しなければならない。このため、できるだけ多量の筋組織を用いることによって NMR の感度、ひいては測定の高時間分解能を向上させる試みを行ってきた (Yamada & Tanokura, 1983)。これまでにヒキガエルおよびウシガエルの縫工筋を対象として、上にのべた方法を用い収縮によるクレアチン燐酸と無機燐酸の低温における収縮後の回復の経過を16秒の高時間分解能をもって測定した。その結果、収縮後の数分間に収縮後のクレアチン燐酸の分解が生じることが明らかとなった。収縮後のクレアチン燐酸の分解は、その量及び収縮の持続時間にたいする発生の経過が、収縮におけるエネルギー収支の不足とほぼ一致していることから、両者は同じ因果関係にあると考えられる。

また、このようにして測定したスペクトルの無機燐酸の化学シフトから、細胞内 pH の変化を知ることが出来る。細胞内 pH は5秒間の収縮により0.1 pH 単位だけアルカリ側に变化した。収縮によるアルカリ化は無機燐酸の回復の経過とほぼ一致して回復した。クレアチン燐酸の分解反応の進行によって水素イオンの吸収が生じることから、筋の収縮によるアルカリ化が生じることが予想されていた。

〔文献〕

山田和廣, 田之倉優, 米谷快男児 (1982) 生体の科学, 33: 326-329.

Yamada, K. & Tanokura, M., (1983) Jpn. J. Physiol. 33(6).

Labile heat の筋節長依存性

米谷快男児, 山田和廣 (大分医大・生理)

骨格筋が等尺性収縮時に遊離するエネルギーの総量 (仕事+熱) は、収縮時に分解される ATP の化学エネルギーの総量より多い。このエネルギー収支の不均衡の程度は labile maintenance heat (LMH) 産生量と密接な関係にある。従って LMH の起源を明らかにすれば、

エネルギー収支の不均衡の原因を明らかにすることができると考えられる。LMHの起源として(1)細胞内パルバルブミンとCaとの結合反応熱および(2)収縮への移行に伴うクロスブリッジのエンタルピー変化がその可能性として考えられているが、まだ確定するに至っていない。

LMHの産生率は $ha \exp(-at)$ で表わすことができる。 ha は最大産生率、 a は産生率の減衰定数である。LMHの総量は産生率を $t=0$ から ∞ まで積分した値 ha/a で与えられる。LMHの起源を調べるため ha 、 a および ha/a の筋節長依存性およびカフェインの影響を調べた。実験にはアカガエル半腱様筋(筋節長依存性)およびトノサマガエル縫工筋(カフェインの影響)を用い、 0°C で測定を行なった。得られた結果は次の通りである。

- 1) ha/a は筋節長増大に伴ないlinearに減少した。張力発生のない筋節長での ha/a の値は最大張力発生時の約70%であった。
- 2) ha と a は共に筋節長増大に伴ない減少した。この減少の程度は ha/a より大きい。
- 3) ha/a の大きさはカフェインの存在によって変化しないが ha と a は共に増大した。

以上の結果は次のように解釈することができる。LMHの約70%はパルバルブミン-Ca結合熱に由来し、残りの30%がクロスブリッジに由来する。LMHの総量は細胞内パルバルブミン量及びアクチンと相互作用可能なミオシン量より決まり、Ca遊離量に依存しない。刺激によるCa遊離量が多い程、刺激当たりのパルバルブミン-Ca結合量は多く、パルバルブミンは早くCaを飽和するので、 ha および a はCa遊離量に依存して変動する。

Skinned fiberの弾性系

馬詰良樹, 名取礼二(慈恵医大・生理)

骨格筋の横断面は正方六方格子構造をとり、この構造はフィラメント間に働くvan der Waals力や、静電反発力、コネクチン、Z、M帯などの支え構造、形質膜などの間に働く力のバランスの上にある。これらは骨格筋の直径方向の弾性性質を担っていると考えられる。形質膜を剝離したスキンドファイバーは膨潤するし、フィラメント間距離も約20%増加する。これは、上記の力が新しい平衡点に移ったと考えられる。今回はこれらの力の内静電反発力に着目した。たとえばpHを低下させると負に荷電したフィラメントは等電点に近づくから静電反発力は減少するだろう。この静電反発力はファイバーのradial stiffnessに反映するだろう。PVPによる浸透圧効果を利用して、種々の条件下でradial stiffness (K)を求めた。

〔方法〕 ウシガエル半腱様筋, mechanically skinned fiber, 20 と 5°C , 4 EGTA, 4 Mg ATP, 10 PIPES (mM), $p\text{Ca} \sim 9$, 主な陰イオンは Cl^- , PVPによる浸透圧と線維幅の関係を求めた。一部でFranksカメラによるX線赤道反射を観察した。

〔結果〕 (1)pH $6 \sim 8$ の範囲で幅は可逆的に変化した。pH 6 までゆるやかに減少し、それ以下

で急激に減少した。pH 6 以下の変化は不可逆的であった。pH 6 でKは約1/3に減少した。(2) Mg^{++} 0.2~30 mM で幅を観察した。10 mM で細くなりだし30 mM で95%になった。30 mM Mg^{++} でKはpH 6 と同程度に減少した。(3) 5℃での実験、弛緩状態でも一部のクロスブリッジは形成されており、低 $\Gamma/2$ で形成数が増加するが、低温ではその増加が少いといわれている (Yanagida, J. Biochem, 92, 407 - 412, 1982)。これを考慮して5℃で同様の実験をおこなった。 $\Gamma/2=0.06$ でのKはむしろ20℃のそれより大であった。

〔考察〕 pH 6 と30 mM Mg^{++} 下でKは小で、それは幅が小になるほど顕著になる。この条件下で filament charge が減少し反発力が減少することで説明できる。

Skinned fiber の収縮特性に対する浸透圧効果

土屋禎三, 杉 晴夫 (帝区大・医・生理)

生筋のように体積一定という条件下では太いフィラメントと細いフィラメントの感覚は筋長が変化するとそれに伴って変化する。そして通常、筋肉にはこれに対する調節能力が存在するといわれているが実体はわかっていない。このフィラメント間隔変化の力学的性質への影響を調べる為、ウシガエルの縫工筋又は大内転筋から作製した skinned fiber を用い、外液中に高分子物質 PVP (polyvinylpyrrolidone, 平均分子量 4 万) 又は dextran (平均分子量 50 万) を加え、浸透圧的に skinned fiber の外径を変化させ、筋繊維方向の硬さ変化及び伸長後の張力過渡現象を測定した。実験は 4~5℃で行い、伸長ステップは 0.5%, それに要する時間は 0.7 m sec であり、硬さの測定は伸長時の長さ変化と張力変化を $x-y$ 表示し、その伸長速度一定の部分の傾きから求めた。最初に高分子溶液中に標本を入れた場合のその外径の時間変化をビデオカメラにより測定した。標本を高分子溶液に入れるとその直後に外径の減少が始まり、3~4 分で一定値となる。その大きさは 8% PVP では約 0.65, 16% PVP では 0.55, 24% PVP では 0.50 であった。弛緩液中で筋繊維の硬さ変化を測定すると、PVP 濃度 0 又は 4% の場合には硬さは 0 であるが 8% 以上になると硬さが発生し、濃度が増加すると硬さも増加する。収縮液中 (pCa 4.8) では、硬さは弛緩液中よりも更に増加するが興味深いことは、その増加の値は高分子物質の濃度が 12% 以下では濃度によらず一定であった。この事実は恐らく硬さには Ca^{++} 感受性のものと、 Ca^{++} 非感受性のものがあり両者は並列に存在していることを示していると思われる。溶液中に ATP が存在しない場合、すなわち硬直状態の場合には、溶液中に高分子物質がなければ、硬さは Ca^{++} 存在の如何によらず一定であった。しかし溶液中に高分子物質を加え外径を減少させると、 Ca^{++} が存在した場合には明瞭に硬さは増加した。即ち硬直状態にも Ca^{++} 感受性が存在することを示している。また伸長後の張力過渡現象もそれぞれの硬さに特有な時間変化を示した。

筋線維内 Ca イオン濃度変化におよぼす単収縮増強物質の作用

越智和典, 松村幹郎 (川崎医大・生理)

骨格筋の興奮収縮連関においては、膜の脱分極に続いて筋線維内 Ca イオン濃度が上昇し、収縮が開始される。この Ca イオン濃度上昇の経過は、Ca イオンと特異的かつ定量的に反応して蛍光を発するエクオリンを用いて直接に測定されるようになったが、近年、いくつかの金属指示薬が開発されさらに詳細に検討されるようになった。本研究においては、その一つであるアルセナゾⅢを筋線維内に注入し、その吸光度変化から活動電位に後続する筋線維内 Ca イオン濃度変化を測定し、また、単収縮増強物質として知られている NO_3^- 、カフェイン、 Zn^{2+} などの影響を求めた。アルセナゾⅢは、入手が容易である、筋線維内への注入が容易である、Ca イオンとの結合速度が大き、などの利点を持つ。一層である数本の筋線維束を用意し、動きによる測定誤差を除去するために、筋節長が $4.0\mu\text{m}$ 以上に引き伸ばす。通常の細胞内ガラス微小電極内にアルセナゾⅢ試薬を満ちし、負電流を通电して試薬を細胞内に注入する。吸光度変化は、現在は $651 - 721\text{ nm}$ において測定されているが、当初は $534 - 604\text{ nm}$ においてなされ、ここではその結果について述べる。

単一刺激を与えると、アルセナゾⅢ信号は活動電位の立ち上がりから測定して 2.4 m sec の潜伏時間の後に上昇し、次の 5.0 m sec の後に最大値に達した後、ほぼ指数関数的に減退する。その半減時間は 15.6 m sec である ($20 - 22^\circ\text{C}$)。 10 m sec の間隔で連続刺激を与える時は、アルセナゾⅢ信号振幅は、3 刺激で約 2 倍に増大する。外液の Cl^- を NO_3^- に置換すると、単一刺激後の信号の下降相が延長して半減時間は 23 m sec に達する。下降相の初期における減退の経過が抑えられることが特徴的である。振幅はせいぜい 30% 増大するに過ぎない。 Zn^{2+} もまた振幅を増大し、下降相を遅延させるし、 0.9 mM カフェインは特に遅延の程度が顕著である。

下降相の経過は、注入される色素量、筋小胞体より放出される Ca 量、筋小胞体の Ca 結合速度によって影響され、また筋節長に依存しているが、 NO_3^- 液においては、活動電位のスパイクに伴う Ca の大量放出の後に、後電位の持続時間にわたって Ca 放出が継続されることが示唆された。

蛙骨格筋急冷拘縮時の細胞内 Ca 濃度の定量

栗原 敏, 小西真人, 酒井敏夫 (慈恵医大・医・生理)

骨格筋の細胞内 Ca 濃度と収縮との関係を定量的に求めるために、Ca 感受性発光タンパクであ

るエクロリンを細胞内に圧注入して、急速冷却拘縮時の収縮と細胞内 Ca 濃度を同時に測定した。

〔方法〕 R. temporaria の M. fib. ant. から単一筋線維を摘出し、一端を支持用フックに、他端を張力測定用トランスデューサーに結合した後、微小電極を用いて細胞内にエクロリンを注入した。液温はサーミスター温度計で計測し、あらかじめ低濃度カフェインで処理した液を流し、液温を18℃から各温度に低下させた。冷却に伴う、張力と発光を同時に測定し、細胞内 Ca 濃度と張力との関係を求めた。エクロリンの発光と遊離 Ca との関係は、150 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM MOPS pH 7.0 の溶液を用い、18, 8, 5, 3℃の各温度において求め、Ca 濃度の算出に用いた。

〔結果〕 筋線維を低濃度カフェイン処理した後、液温を18℃から急速に5℃以下に低下させると拘縮が誘起され、3相のCa濃度変化が観察された。第1相は張力発生に先行して見られ、ピークに達した後、減衰した。第2相は第1相後に生じるCa濃度増加で張力発生を伴った。第2相が発生すると張力は頂点に達したが、その後、更にCa濃度が増加する第3相が観察された。第1相のピークはCa濃度にして約3 μM、第2相から第3相への移行点のCa濃度もおよそ3 μMであった。第1相、第2相発生時をよく観察すると微少な振動性のCa濃度変化と、それに対応する張力変化が観察された。第3相のピークは約17 μMであり、収縮に無関係な過剰Caであった。第2相の細胞内Ca濃度変化と張力との関係は、スキンドファイバーで得られたpCa-張力関係よりもより急峻であった。プロカインは、第2、第3相をより選択的に抑制した。これらの細胞内Ca濃度変化は、Ca除去液中でも見られた。以上の結果から、第1相は急冷により動員された細胞内の特定部位（例えばT-SR間）におけるCa濃度変化で収縮とは直接関係なく、第2、第3相は筋小胞体から、Ca誘発性Ca遊離によって生じたCa濃度変化であることが推察され、細胞内Ca濃度が1 μMから3 μMまで増加すると、張力は最大値に達しうることがわかった。

骨格筋におけるカリウム拘縮の2つの component

高氏 昌, 筒浦理正, 金谷秀秋 (札幌医大・生理)

骨格筋におけるカリウム拘縮 (K拘縮) は depolarization contracture の代表として Kuffler (1946) 以来注目されてきた (Sandow, 1955, 1965)。また、比較的最近では、興奮収縮連関機構の解明のための重要な手段としても注目されている (Caputo, 1978; 1981)。しかし、これら一連の研究では、K拘縮は monophasic なものとして取り扱われてきた。最近、Costantin (1971) により、K拘縮は2相性を示すことが明らかにされ、われわれもこれを認めるとともに、さらにその性質につき詳細に検討してきた (Takauji et al., 1980; 1981)。今回は、この研究に関するわれわれの現在までの成績を要約して報告する。

主な成績と考察: 1) Costantin (1971) の成績を追試確認した: ① K拘縮は2相性を示す。② K拘

縮の2相性は、70 - 80 mM K^+ , $[Cl^-]$ = constant (約 120 mM), 室温下で出現し易い。③2相性は K^+ による conditioning depolarization により抑制される。2) 2相性は、太い single fiber 程現れやすいことを追加した (Takauji et al., 1980)。3) ①2つの component は、諸種の試薬あるいは条件により別々に抑制される: initial component は, procaine, verapamil および lincomycin により強く抑制されるが, secondary component は、ほとんど変化しないか, lincomycin の場合にはむしろ増強される。②一方、外液 Ca^{++} 除去液 (1 mM EGTA を含む), 2.5 μ M DAN および 5 mM Mn^{++} による30秒間の前処理により, secondary component はほとんど完全に抑制されるが, initial component は、なお残る。4) 3)の①および②と同様の成績が、さらに最近, twitch potentiator である Zn^{++} および TEA により、また fatigued fiber について、それぞれ認められた。以上の成績は、いずれも両 component の E-C coupling の異なることを示唆する。5) 2相性 K^+ 拘縮に対する外液 Ca^{++} 除去効果ならびにそれに対する2価カチオン (Mg^{++} , Mn^{++} , Ni^{++} , Ca^{++})の作用において、initial component の peak tension は外液 Ca^{++} 除去の初期 (約30秒後)に著明に増強され、その後徐々に抑制された。一方 secondary component の peak tension は、 Ca^{++} 除去のきわめて初期 (5~10秒以内)に増強されるが急速に抑制され消失した。両 component のこの抑制は諸種2価カチオンにより阻止された。その効果は 3 mM Mg^{++} 0.7 mM Mn^{++} = 0.5 mM Ni^{++} = 1.8 mM Ca^{++} であった。しかし、 Ca^{++} 除去により抑制された secondary component の time course は、これらのカチオンにより $Mg^{++} < Mn^{++} < Ni^{++} < Ca^{++}$ の順に reverse された。この序列は、inactivation に対しても、明瞭に認められた。これらの成績は、2相性 K^+ 拘縮の activation process に対する2価カチオンの作用は、inactivation process へのそれと明らかに異なることを示唆する。

心筋収縮モデルによる等張力性収縮のシュミレーション

真島英信 (順天堂大・医・立理), 樺沢一之 (順天堂大・医・電算機室)

心筋収縮の特徴的な性質を数式化することにより、収縮モデルを作成した。このモデルは3つのサブシステムからなる。第1は筋フィラメントに対する Ca の活性化機構、第2は連結橋運動の動力学、第3は収縮要素と直列弾性要素からなる収縮力学で、等尺性収縮の場合は張力を、等張力性収縮の場合は張力と短縮量が出力される。連結橋の動力学としては静止状態のほか活動状態として4相を区別する。第1相は Ca によるトロポニンの活性化、それによる連結橋の活性化、第2相は連結橋の結合による張力発生、第3相は連結橋の運動によるフィラメントの滑走、第4相は連結橋の解離である。 Ca 遊離量が十分多ければ、第4相から第1相にもどってサイクルを繰り返すが、 Ca 濃度が減少すればサイクルは終り、第4相を経て静止状態にもどる。とくに第2相から第3相への反応速度定数は、滑走速度すなわち出力としての短縮速度に比例すると考える。

また出力としての短縮量は筋長の変化としてCaの活性化機構にフィードバックされる。モデル定数の大部分はカエル心室筋について20℃のとき実験的にえられた定数から決定された。かくして、入力パラメータ（通常3つ）を操作することにより単収縮曲線が出力される。この操作により、出力曲線をカエル心室筋について実例された収縮曲線に合致させることにより、入力パラメータが決定され、それを用いて実測曲線に対応するCa遊離およびとりこみ曲線、および筋内Ca濃度変化曲線などを描くことができる。

等尺性単収縮については出力曲線と実測曲線とを合致させることは比較的容易であった。このときCa濃度曲線は、筋を伸長して長さを大にすると、張力の増大と共にその振幅および持続時間が大となった。等張力性単収縮については、静止時の粘弾性やCa活性化の長さ依存性などについて検討する必要があったが、ほぼ満足すべき合致がえられるようになった。このときCa濃度曲線は、負荷が軽く短縮量が大きくなるにつれて延長することがわかった。エクオリンによる筋内Ca濃度変化曲線は本モデルによる推定Ca曲線とよく似ている。本モデルはトロポニン周辺のCa濃度を示すので、両者は必ずしも同じものではないが、両者の間に高い類似がみられることは興味深い。

心筋の単一カルシウムチャンネル電流に対するカテコルアミンの作用

大地陸男, 日野直樹, 奥山博司 (順天堂大・医・生理)

アドレナリンをはじめとするカテコルアミンは心筋の β 受容体に結合しサイクリックAMPを増加させ、これが膜の磷酸化を促進してCa電流を増大させることが知られている。この増大がCaチャンネル閉鎖様式の変化によるのか、Caチャンネル数の増加によるのかをパッチクランプ法で膜の微小部分よりCaチャンネル電流だけを選択的に記録して検討した。コラゲナーゼ処理によってモルモットの心臓から心室筋細胞を単離し、KB液中に低温に保存し、実験槽中で正常液中に戻して使用した。50 mM Baビペットで細胞付着型のパッチを形成した。比較的細い電極では単一Ba電流が、抵抗1—2 M Ω の太い電極では多Caチャンネル電流が記録された。実験は室温で行った。単一Ba電流は静止電位から持続時間50—150 ms, 70—100 mVの脱分極を0.4—1 Hzで反復するとバースト状に発生し振幅は0.5 pA程度であった。単一Caチャンネルの開口時間は脱分極と共に増大し、80 mVで1 ms, 90 mVで2 msであった。脱分極ステップはあるときはBaパルス発生に成功し、あるときは失敗する。成功したときは1個だけでなく数個のBaパルスが発生した。また成功率は正常液中で20—30%と低かったが成功は集団となってえられる傾向があった。失敗例も含めた全体のCaチャンネルの開口確率（全開口時間／全脱分極時間）は正常液中では0.02—0.05であった。2 $\times 10^{-6}$ M アドレナリンは5分以内に成功率を60—80%に増大させ、開口確率を0.15—0.30とした。このとき単一Ba電流の振幅は不変であるから、カテコル

アミンのCa電流増加作用は、まず、個々のCaチャンネルの開口確率の増加で説明される。アドレナリンは開口時間を変えなかった。90 mVの脱分極でのBa電流発生の潜時のヒストグラムは脱分極開始後5 ms近くにピークをもったのち指数関数的に減衰し、平均時間は12 msであったが、アドレナリンはこれに殆ど影響しなかった。また成功例のみについての平均加算電流はアドレナリンでやや増加されたのみであった。多Caチャンネル電流の平均加算電流は円滑な時間経過を示した。この電流の立上りはS字状であり、50%のへの上昇時間は脱分極と共に、70 mVで6 ms、110 mVで3 msと減少したが、これにアドレナリンは影響しなかった。以上からカテコルアミンは脱分極によるCaチャンネルの開口の様式には、バースト中の経過の速い過程へは不明であるが、あまり影響しないと結論された。アドレナリンは個々のCaチャンネルの脱分極で利用される効率を高めて開口確率を増大し、全体としてみればみかけ上Caチャンネルの数を増大するかの様にCa電流を増大するのであろう。

心筋の Sarcomere dynamics

辻岡克彦, 小笠原康夫, 友永 轟, 梶谷文彦 (川崎医科学・医用工学)

〔目的〕 心筋収縮の基本単位はサルコメアであり、その力学的過渡応答には、クロスブリッジカイネティックスに関する情報が含まれているので、サルコメア動態を直接計測することは極めて重要である。本研究では、レーザ回折法により心筋サルコメア長を計測するとともに、サーボ回路により長さ、張力を制御し心筋サルコメアの動態を解析した。

〔方法〕 心筋サルコメア長の計測にレーザ回折法を用いた。ラットの右室乳頭筋または肉柱を標本とし、He-Neレーザ(5 mW)を照射してできる回折光をフォトダイオードアレイでビデオ信号に変換し、0次と1次の回折縞の間隔Dより、 $\lambda f/D$ としてサルコメア長を求めた。ここで λ はレーザ光の波長、 f は光学系により決まる定数である。心筋サルコメア長の動的制御は、標本の一端に装着した小型モータをサーボ回路により駆動して行った。心筋標本は、28℃の酸素化したKrebs-Ringer液で灌流し、刺激頻度は毎分12回とした。

〔結果〕 まず、張力のステップ状変化に対する速度過渡応答を検討した。サーボ回路によりサルコメア長を一定に保った後、張力を急激に減少させ続いて一定値に保つと、張力減少後30~40 m secにわたって、短縮速度が2~3回増減をくり返す速度過渡現象を示した後、張力-速度関係で決まる速度で短縮した。しかし、心筋長を一定に保った後、張力の急速解放を行うと、サルコメアは急速解放の前から少しづつ短縮し、速度過渡現象は認められなかった。次に、サルコメアレベルにおける張力-速度関係について検討した。短縮領域の張力-速度関係はHillの式に従う直角双曲線状であったが、伸展領域ではこれから解離し、 $2 \mu/\text{sec}/\text{half sarcomere}$ 以上では、ほぼ一定の張力となった。

〔考察〕 従来、骨格筋では速度過渡現象が認められていたが、心筋では観察されていなかった。今回の結果から考えると、従来の心筋の実験でサルコメア長を一定に保てなかったことが、心筋において速度過渡現象の観察されなかった原因と考えられる。心筋サルコメアの張力—速度関係は、骨格筋と類似性があった。以上、心筋のサルコメア動態の検討より、心筋と骨格筋のクロスブリッジ・カイネティックスは基本的に似かよったものと推測される。

平滑筋細胞内の Ca translocation の Oxalate による研究

杉 晴夫（帝京大・医・生理），大門建夫（帝京大・医・解剖）

われわれは各種の温血動物平滑筋細胞の収縮弛緩時の細胞内 Ca translocation をもっぱら Pyroantimonate 法によって研究してきた。従来、平滑筋細胞内の Ca 局在には Oxalate が広く用いられ、静止時平滑筋細胞内の Ca 局在部位は Pyroantimonate と定性的に同様な結果がえられている。しかし Oxalate 法を用いての Ca translocation の研究はまだ報告されていない。本研究はモルモットの taenia coli の収縮弛緩時の細胞内 Ca translocation を Oxalate 法によって研究することを目的とした。

筋試料をあらかじめ 40 mM K-Oxalate を含む高 K 溶液中に 10 分間処理して形質膜脱分極時に Oxalate の細胞内流入をおこさせたのち正常 Tyrode 液にもどしてから実験をおこなった。試料は 40 mM Oxalate を含む 2.5% glutaraldehyde 液中で前固定し、ついで 2% OsO₄ 液で後固定したのち超薄切片を作製し電顕下に観察した。

静止筋の切片では筋小胞体の内腔に Ca-Oxalate の明瞭な沈澱がみられるが、形質膜内表面における沈澱は試験によりみとめられる場合とそうでない場合がある。しかし Tyrode 液の Ca 濃度を 10 mM に上昇させると、どの試料にも明瞭な形質膜内表面にそっての沈澱がみられるようになる。一方、140 mM-K による拘縮張力は glutaraldehyde 液中ですみやかに弛緩する傾向を示すが、拘縮張力のピークで 5 mM-La を与えると最大張力を保持したまま試料を固定することが可能である。La 存在下で拘縮張力発生時に固定した試料の切片では筋小胞体および形質膜における沈澱は消失し、多数の顆粒状沈澱が筋細胞中に diffuse に分布する。この場合、試料により沈澱はきわめて小さなものが多数生ずるものと比較的大きな沈澱が少数生ずるものがある。沈澱中には多量の La が検出されるが、Ca も有意の量がつねに含まれている。

以上の結果は定性的にわれわれが Pyroantimonate 法によってえた結果と同様であり、形質膜内表面および筋小胞体内腔に存在する Ca が収縮系を活性化する activator Ca としてはたらくという考えを強く支持すると考えられる。

ラット分離単一心筋細胞における局所収縮の伝播の高速ビデオによる研究

杉 晴夫, 爲安 司, 豊城隆明 (帝京大・医・生理)

心筋の収縮に Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release 機構が関与するか否かについては未だ明らかでない。本研究は分離単一心筋細胞における収縮の伝播を顕微鏡下に高速ビデオ (毎秒200コマ) を用いて記録解析し, 正常な全か無かの伝播に Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release 機構が必要か否かに焦点をあててしらべた。

ラット心室から分離した単一心筋細胞は長時間にわたって全か無かの法則にしたがう単収縮をおこない, その経過は intact な心室のそれとほぼ等しい。適当な直径のガラス細管中に単一心筋細胞の一部を吸引により引きこみ, 細胞を細管内部と外部の二部分に分けガラス細管内外においた一対の電極により電気刺激をおこなった。ガラス細管内外ともに 1.8 mM Ca^{2+} が存在するときには, 一方でおこった収縮はすみやかに他方に伝わり, 高速ビデオの時間分解能 (5 m sec) では伝播時間は測定できないほど速い。ガラス細管内外のいずれか一方の Ca^{2+} を除去すると Ca^{2+} -free 部は他方が全か無かの収縮をつづけるのにたいしてまったく収縮を示さなくなる。心筋の活動電位は Ca^{2+} -free 条件下でも発生することが知られているので, 上記の結果は外液 Ca^{2+} が収縮の伝播に必須であることを示している。

一方, 1~数 mM の caffeine をつめたガラス細管を心筋標本に近づけ, caffeine を局所的に作用させると, その部に著しい局所収縮を生じ約 1 秒間で細胞の長軸にそって伝播してゆく。この caffeine による収縮の伝播は外液の Ca^{2+} 除去によって消失せず, またその伝播速度は caffeine の細胞内拡散から説明できないほど速い。したがってこの収縮の伝播は Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release 機構が関与していると考えられる。心筋細胞をいくつかのセグメントに分け各セグメントにおける収縮の経過を全か無かの単収縮と caffeine による収縮との間で比較すると, 収縮高は両者間でほとんど同じであり, 筋フィラメント周囲の Ca^{2+} ion 濃度の上昇の程度は両者間でほとんど同等と考えられる。

以上の結果は全か無かの活動電位による収縮波の伝播のさいには筋小胞体における Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release 機構がはたらかないように抑制がかかっていることを強く示唆すると思われる。

心筋の膜電流要素への Ca^{++} イオンの作用

—第3報 $\text{Na} - \text{Ca}$ exchange 電流—

後藤昌義（九州・医・生理）

〔研究目標〕 心筋の興奮収縮連関において主役を果す Ca イオンは、筋小胞体からの Ca 放出のみならず、形質膜の Ca 電流、 $\text{Na} - \text{Ca}$ exchange 機構、 $\text{Na} - \text{K}$ pump などにより直接、間接に多様な影響をうける。他方、細胞内外の Ca イオンは逆に心筋の膜電流要素また $\text{Na} - \text{Ca}$ exchange などの膜のイオン輸送機構に影響し、巧妙かつ複雑な feedback control を行なっているようにみえる。著者らは先に Ca イオンの心筋形質膜の膜電流要素ことに K 関連電流 (I_{K} や I_{X}) や起電性 $\text{Na} - \text{K}$ pump への効果を明らかにしてきたが、本年度は起電性 $\text{Na} - \text{Ca}$ exchange による膜電流への効果を検討した。

〔実験方法〕 実験には膜電流要素、張力要素が定量的に解析されている食用ガエルの心房筋束（径 0.5 ～ 0.6 mm、長さ 8 ～ 10 mm）を使用した。蔗糖二重隔絶法によりその収縮張力、膜電位、活動電位を同時記録するとともに、膜電位固定下に膜電流要素を解析できるが、必要に応じて TTX, Co (Mn), Ba などにより $\text{Na} - \text{Ca}$ exchange 電流 ($I_{\text{Na} \cdot \text{Ex}}$) 以外の電流を除去し、 $I_{\text{Na} \cdot \text{Ex}}$ を分離して $[\text{Na}]_o$, $[\text{Ca}]_o$ の効果を検討した。

〔実験結果と考察〕

- 1) 静止電位レベルでの起電性 $\text{Na} - \text{Ca}$ exchange 電流 外液の $[\text{Na}]_o$ 除去により心筋は拘縮をともなう膜の過分極を発生し、膜電位固定下にも拘縮とともに膜抵抗の増大をともなう維持電流の外向き移動を出現した。この電流は $[\text{Ca}]_o$ 欠下にも出現し、明らかに Na の内向き電流の減少によるものであり、TTX, Mn, ouabain 存在下にも認められ、既知の Na チャネル、 Ca チャネルまた $\text{Na} - \text{K}$ pump によるものではない。
- 2) 脱分極または再分極による $\text{Na} - \text{Ca}$ 電流の変化 膜の脱分極または再分極時の遅延性外向き電流に及ぼす $[\text{Na}]_o$, $[\text{Ca}]_o$ の効果を検討の結果、(1) 静止時に内向きの $I_{\text{Na} \cdot \text{EX}}$ は脱分極により内向きから外向きへ、(2) 再分極により外向きから内向きに変化することが判明し、(3) その膜電位依存性、時間依存性また張力との関係を明らかにできた。

〔結論〕 以上の所見は心筋に起電性の $\text{Na} - \text{Ca}$ exchange が存在し、それに基づく電流 $I_{\text{Na} \cdot \text{EX}}$ は心筋膜電位の全範囲にわたり出現して、既知の膜電流を本質的に変調しているのみならず、心筋の張力発生にも寄与していることを物語るものである。

平滑筋の神経伝達物質調節による Ca イオン電流 — アドレナリン性 α_1 とプリン性 P_2 再受容体反応の比較 —

猪又八郎, 泉井 亮 (東北大・医・応用生理)

〔研究目的〕 アドレナリン作動性神経筋の代表的標本であるモルモット輸精管平滑筋組織では, 神経刺激による興奮収縮反応に, 従来のアドレナリン性 α , 受容体の外にプリン性 P_2 受容体を介する反応が存在することが指摘されている^{1,2)}。本実験ではこの筋組織について, ノルアドレナリン (NA) とアデノシン 3 磷酸 (ATP) に対する筋細胞膜の受容反応のイオン機構を解明する目的で, この興奮性に対する NA と ATP の効果を活動電位と電圧固定下の膜イオン電流を指標にしてしらべた。

〔方法・結果〕 特に本実験では K イオン電流の関与を除外し Ca イオン電流の動向, キネティクスに対する NA および ATP の調節作用を比較検討するために tetraethyl ammonium (TEA) 溶液を環境液として使用した。TEA 液では 1×10^{-6} 1×10^{-5} g/ml 濃度の NA および ATP はともに, 正常 Krebs 液下と同様に興奮収縮反応に対し 2 増強作用を示すが, NA によるこの陽性変力効果は経時的に漸減するのに対して ATP によるこの効果は時間に無関係に定常状態が維持される。電圧固定下では NA は最大 Ca イオン電流 $\max I_{Ca}$ および最大コードコンダクタンス $\bar{g}_{Ca}$ の値をそれぞれ 1.0 ± 0.1 から 0.7 ± 0.1 ($\mu A/\mu F$) および 52.3 ± 5.9 から 39.8 ± 4.5 ($\mu S/\mu F$) ($n = 12$) と有意に減少させ, さらにこのイオン電流の逆転電位 E_a の値を約 10 mV 負性側に移行させた。一方, 等濃度の ATP は Ca イオン電流の挙動に対して活性化作用を呈し, $\max I_{Ca}$ および $\bar{g}_{Ca}$ の値を 0.7 ± 0.1 から 0.9 ± 0.1 ($\mu A/\mu F$) および 44.5 ± 7.3 から 50.4 ± 7.3 ($\mu S/\mu F$) ($n = 12$) へとそれぞれ有意に増大させた。この時のこのイオン電流の逆転電位 E_a の値は ATP 投与前後で殆ど不変であるが標本により正側に移行する傾向を示した。

最大 Ca イオン電流のピーク電流に続く tail 電流より求めた活性化過程, τ_m および不活性化過程, τ_h に対する影響について, ATP は活性化 τ_m : 不過程両過程, τ_h に対して殆ど影響を与えなかった。

〔結論・考察〕 NA は Ca 運搬系 kinetics 変化と g_{Ca} の減少を誘起するが, ATP はその kinetics に影響することなく g_{Ca} を増大させる。この相違点から P_2 受容反応の発現には 'potential operated channel' を介する Ca influx が主要な機構として働くのに対し, α_1 受容反応は 'potential independent channel' 又は筋膜内結合部位からの Ca が優位に働いている可能性が示唆される。

〔文献〕

- 1) Blakeley, A. G. et al. Nature 291: 759 - 761 (1981).
- 2) Sneddon, P. et al. Science 218: 693 - 695 (1982).
- 3) Inomata, H. et al. In Vascular Neuroeffector Mechanism: 4th International

サポニン処理単離平滑筋細胞の形態学的観察

太田 勲, 薮 英世 (札幌医大・生理)

平滑筋の興奮収縮連関や力学的性質などの諸性質に関する研究には、多くの場合平滑筋束が用いられてきた。しかし、このような標本では、骨格筋や心筋の場合に比べて、細胞間隙が広いことや非筋細胞あるいは間質成分が存在し、これらが平滑筋細胞自身の諸性質を解析するとき大きな障害になることが指摘されている。また、平滑筋の諸性質は、種間あるいは臓器間で多様性のあることも知られている。

われわれは、モルモット結腸紐から酵素処理により単離した平滑筋細胞を用いて興奮収縮連関に関する実験を行っているが、今回は、われわれの標本について走査電顕 (SEM) および透過電顕 (TEM) を用いて短縮にともなう形態変化を検討したので、その結果を報告する。

〔結果ならびに考察〕

無傷単離平滑筋細胞について：静止時の細胞は、なめらかな輪郭を示した。4 mM カフェインを添加し、短縮 (50%以上) させた細胞の SEM 像は、細胞表面全域に大小多数の evagination を示した。短縮細胞の TEM 像は、表面膜が複雑な凹凸を示した。これらの成績は、FAY et al. がガマの胃の単離平滑筋細胞について報告している成績と類似している。

サポニン処理単離細胞について：サポニン処理は、単離細胞を $7 \mu\text{g}/\text{ml}$ のサポニンで10分間行った。静止状態の細胞の輪郭は、無傷細胞のそれと大差なかったが、細胞周縁部の収縮フィラメントの密度が中央部に比べてやや疎になる傾向があった。pCa を8.5から6.0に変化させると細胞は強く短縮した。短縮細胞は、無傷細胞と同様に多数の evagination を生じたが、細胞本体と evagination あるいは evagination 間に繊細な糸状構造が認められた。この構造は、細胞質の突起で、このなかにも収縮フィラメントが存在することがTEM像で示された。また、収縮フィラメントが細胞中央部に濃縮し、周縁部に疎になる傾向が静止細胞より一層顕著になった。

サポニンは、膜の脂質層からコレステロールを除去する作用を有し、コレステロールは膜の流動性を減ずることが知られている。これらを考慮すると、サポニン処理細胞では膜の流動性が増加し、その結果細胞が短縮する際、輪郭が複雑に変化すると思われる。

今後、膜の dense area とフィラメントとの関係や、フィラメントの走行などについて無傷細胞とサポニン処理細胞について比較検討をするつもりである。

妊娠ラット子宮筋におよぼすマグネシウムイオンおよびカテコラミンの効果

長 琢郎 (山口大・医・生理)

いとぐち：子宮平滑筋では，生体内において卵巣ホルモンの影響下で生理学的ならびに薬理的性質が変化する。一方，ホルモン動態の見地からみて，動物の種差を問わず分娩前に血漿中プロゲステロン濃度が低下することが知られている。この際，ラット等の双角子宮においては輪走筋は縦走筋にくらべ性質の変化が著しい。本研究では，このような子宮輪走筋の可塑性の調節機序をしらべる端緒として，妊娠末期に体外に摘出した標本を長時間クレブス液中に超生保存し，その間マグネシウムイオン，カテコラミンに対する応答を指標として，輪走筋の性質がどのように変化するかについて検索した。

実験材料および方法：雌ラットを交配後，19日，21日，22日午前，分娩中および分娩翌日の子宮輪走筋標本（幅0.5 mm，長さ3 mm）を作製した。分娩中を除き，標本は午前8：30に摘出し，その後37℃のクレブス液で灌流を行ない，約12時間の経過について定時的に薬物効果をしらべた。薬物応答は微小電極法による記録および収縮活動を指標とした。

実験結果および考察：(1)Mgの効果。Mg欠除クレブス液に0.6 mM Mgを添加し，自発性収縮または電気刺激によって発生した収縮に対する効果をしらべた。19日に摘出した標本では，Mg添加により収縮高は半減する。この効果は12時間の灌流によりほぼ同一であった。分娩中に摘出した標本では，Mg添加により自発性収縮の頻度は減少するが収縮高は影響されなかった。22日朝に摘出した標本は約5時間の灌流中，Mg添加により収縮高は半減するが，その後次第にMgによる収縮抑制作用は減弱した。収縮高の減少の際には徐電位の短縮が見られた。(2)ノルアドレナリンの効果。正常クレブス液で標本を灌流し， 3×10^{-7} M， 10^{-6} Mのノルアドレナリンの効果をしらべた。ノルアドレナリンは21日の標本では収縮増大，22日朝の標本では収縮抑制，分娩後標本では収縮増大をおこした。21日朝の標本は灌流時間の延長に伴いノルアドレナリンの効果は収縮抑制に転じた。また22日朝の標本は灌流時間の延長によりノルアドレナリンの収縮抑制作用が次第に減弱した。以上の灌流時間によるMgおよびノルアドレナリンの効果の変動の方向性に影響する因子は，今後更に検討を加える必要がある。

平滑筋の収縮に対する低温効果と vanadate の作用

砂野 哲 (近畿大・高血圧研)

平滑筋の収縮は細胞外Caの流入あるいは細胞内結合部位からのCaの遊離と細胞外への汲み出

しあるいは細胞内結合部位へのとり組みによって調節されていると考えられる。低温はこのうち Ca の能動輸送を抑制して収縮に影響を与えられ、vanadate も膜系の Ca-ATPase を抑制して Ca の輸送を抑えることが報告されている。本研究では各種平滑筋の収縮に対する低温および vanadate の効果、およびその相互作用について検討した。

尿管平滑筋 twitch contraction は低温 (30℃) で増強され、このとき rate of rise, rate of fall ともに低下した。vanadate では rate of rise が増し、rate of fall は低下したが、低温と同様、収縮持続時間が延長した。同様の効果は K 拘縮でもみられ、低温で phasic contraction と tonic contraction が増強され、このとき phasic contraction の持続時間が延長した。

尿管や精管で K 拘縮の tonic contraction の経過中に低温にすると張力の増大がみられるが、同様の効果は vanadate によってももたらされた。子宮平滑筋や盲腸紐平滑筋では低温によって弛緩反応がみられるが、vanadate は一過性の収縮反応をもたらしただけでこれを弛緩させた。門脈では低温では低温で弛緩したが、vanadate では持続性の収縮反応を示した。

脱分極した尿管や精管の低温による収縮は vanadate で著明に増強され、control の 5~6 倍に達したが ouabain はこのような効果を示さなかった。一方、vanadate による収縮は低温で影響を受けないか、あるいは逆に弛緩反応がみられた。この弛緩反応は細胞外 Ca の増量で反転した。

脱分極した結腸紐平滑筋は低温で弛緩するが、vanadate を作用させて 30 分後に低温にすると強い収縮反応に変った。ouabain はそれ自身で弛緩作用を示し、低温による収縮を反転させることもなかった。細胞外 Ca を増量させて低温にした場合も弛緩反応がみられた。

脱分極門脈平滑筋では低温で弛緩反応がみられ、vanadate は持続性収縮をもたらしただけで、低温による弛緩反応は変えなかった。

以上のように、低温効果と vanadate の効果には類似点と異なる点がみられ、それらは平滑筋の種類、とくに Ca の能動輸送の相異によってもたらされるものと考えられる。

強縮時におけるカエル骨格筋小胞体の元素組成・バリノマイシンの効果

北沢俊雄 (順天堂大・医・薬理), 江橋 節郎 (生理研)

A. V. Somlyo & A. P. Somlyo (ペンシルバニア大・医・筋肉研)

強縮中のカエル骨格筋小胞体の terminal cisternae (TC) からの Ca 遊離は、TC 内への K と Mg の流入を伴うが、このとり込んだ電荷総量は遊離した Ca の電荷量の約半分しかないことが電子プローブ分析によりわかった (Somlyo, et al. 1981)。もしこの電荷不足が事実であるとする筋小胞体膜には非現実的な一千万ボルト以上の電位がかかることになるので、X線分析では検出できない、例えば H⁺ とか有機イオン (S や P を含まない) がその見掛けの電荷不足をおぎなっていることになる。そこで我々は K⁺ イオンがなぜもっと流れ込まないのかを検討した。なぜな

ら分離筋小胞体の K^+ 透過性は高く、細胞内には高濃度の K^+ が存在するからである。

カエル骨格筋を $5 \mu M$ valinomycin で 2 時間処理し、静止あるいは強縮状態で急速凍結し、凍結超薄切片を作製した後、凍結乾燥したものを電子プローブ分析の試料とした。valinomycin の細胞内への侵入はミトコンドリアの膨潤で確めた。この濃度の valinomycin は筋の強縮、TC の容積 (2.3% of fiber volume)、筋細胞の元素組成に影響を与えなかった。静止筋の TC 内の元素組成は、特に K も未処理筋のそれと一致し、TC 内外での K^+ 濃度の差はなかった。強縮中では TC から静止時の約 60% の Ca が放出されたが、その値は valinomycin によって有意に変化しなかった。ところがその際とり込まれた K と Mg の総電荷量は遊離した Ca の電荷量にほぼ一致し、電荷不足は消失した。TC 内への K のとり込みは有意 ($P < 0.001$) に未処理のそれより多く、Mg は意に反し減少しなかった。Cl の移動は検出できなかった。以上の結果から次のような結論を得た：①静止時筋小胞体には膜電位がない、②Cl の高透過性や TC 内の酸性タンパクの K^+ への親和性が、in vivo でも報告されているような値であるとする、Ca 遊離中も大きな、持続性のある膜電位は生じていない、③未処理筋での Ca 遊離の際の TC への K のとり込みが少ないのは、in vivo の TC では Ca^{2+} 透過性に比べて K^+ のそれはかなり低いからである、④Ca 遊離は電位発生的であり、その電位と TC 内の酸性タンパクの影響により K^+ がとり込まれるらしい、⑤未処理筋での Ca 遊離の際の TC 内での見掛けの電荷不足は、陰イオン系のものによるのではなく、 H^+ あるいは有機陽イオンによるらしい。

骨格筋収縮時および硬直時の超音波弾性率

八田一郎 (名古屋大・工・応物)、田村陽次郎 (鈴鹿高専・物理)

杉 晴夫 (帝京大・医・生理)

1. はじめに

超音波パルスにより、カエルの半腱筋、縫工筋の弾性率を測定した。超音波パルス法では筋肉の中の中心部分を伝播する音波の音速より弾性率を求めるから、中心の一樣な部分についての弾性率を筋肉の外側の状態とは無関係に決めることができる。したがって、全筋肉を用いるといえども端の腱、骨などの弾性率への寄与はない。また、超音波パルス法による弾性率は MHz の周波数における弾性率を与える。われわれは弛緩時の強縮時あるいは硬直時の音速を比べ、強縮状態と硬直状態の差異を検討した。

2. 方 法

強縮状態での超音波音速の測定法、結果についてはすでに発表した [Y. Tamura et al., *Nature* 299 631 - 3 (1982)]。ここではさらに硬直状態での音速測定を行った。硬直状態としては Mulvany [*J. Physiol., Lond.* 252, 319 - 34 (1975)] に従って induced Ca-rigor, CA-rigor,

induced Ca-free-rigor と Ca-free-rigor を作り、それぞれについて測定を行った。

3. 結 果

弛緩状態に対する硬直状態への変化に対応する音速度化は傾向において硬直状態の作り方には依らなかったもので、ここでは induced Ca-rigor に対する結果を示す。長さ方向では、弛緩状態の音速は 1552 m s^{-1} 、強縮状態の音速は 1572 m s^{-1} 、硬直状態の音速は 1565 m s^{-1} であった。これは超音波領域では硬直状態の方が強縮状態より弾性的に柔らかいことを意味する。また、長さ方向と垂直の方向では、弛緩状態の音速は 1500 m s^{-1} 、強縮状態の音速は 1481 m s^{-1} 、硬直状態の音速は 1513 m s^{-1} であった。強縮状態での softening は、硬直状態では hardening に変った。

4. 考 察

長さ方向の強縮状態と硬直状態の音速の差は、単純な硬直状態でミオシン—アクチン結合が最大になりその弾性率への寄与が最大になるという考えとは矛盾する結果である。硬直状態を作る際に蛋白質の変性が起こったことによるのかもしれない。横方向の差は強縮状態の局所的ゆらぎが硬直状態では押えられたことによるのではなかろうか。

骨格筋の単収縮と強縮におよぼす低 Na^+ の効果

波多江純真・河田 溥（福岡大・医・生理）

骨格筋にくり返しの刺激を与えると、単収縮張力は増大し、正の階段現象がみられるが、刺激頻度を増すとその効果が強まり、20 Hz 以上では強縮が起こる。一方、外液の Na イオン濃度を減少させると、活動電位の抑制にもかかわらず単収縮張力が増大することが知られている。ここでは外液の Na イオンを $1/2$ に減少させたときの階段現象と強縮ならびに膜電位変化についてしらべた。さらに、単収縮の階段現象後に強縮が抑制されることについてはすでに報告したので、その効果に対する低 Na 溶液中の変化についてしらべた。

実験はアカガエル半腱様筋から取り出した数本～10本の筋束を用い、 20°C で行った。収縮張力を strain gauge で測定し、ペンレコーダーで記録した。細胞内膜電位の測定による 3 M KCl を満たしたガラス管微小電極を用いたが、機械的障害を軽減するために実験によっては2倍しよ糖高張液を灌流した。電気刺激は1対の白金板電極を用い、単収縮刺激ないし強縮刺激を与えた。実験に用いた溶液にはすべて α -ツボクラリン 10^{-5} g/ml を加えた。

正常リンガー液中において5分間隔で100 Hz—40回の強縮刺激を与えつつ、収縮張力が安定したのち1 Hz—150～200回の単収縮刺激を与えて階段現象を観察した。外液の Na イオン濃度をコリン置換により正常の 111.2 mM から $1/2$ の 55.6 mM に減少させると、骨格筋の単収縮張力は増大し、強縮の立上り速度が増大した。このとき活動電位スパイクは約 10 mV 程度減少し、スパイクの持続が延長した。正常リンガー液中では階段現象の発現中活動電位のスパイクはほとんど変

化せず、静止電位に数mV程度の脱分極と後電位のわずかな増大と延長がみられた。低Na溶液中では、少くとも150回の刺激までは、正常リンガー液中に比べ階段現象の増大がもたらされたが、この場合活動電位スパイクの減少をともなった。このとき直後の強縮は正常リンガー液中に比べて強く抑制されたが、この抑制はスパイクの減少のみに起因するとは考えられず、興奮収縮連関の抑制も関与している可能性が示唆された。

このように低Na溶液中で単収縮や強縮にみられた諸変化は、細胞内Na濃度の減少が二次的にNa - Ca交換機構の抑制に基づく細胞内Ca濃度の上昇、さらには筋小胞体のCa取り込み過程の変化を介して activator Caの動態に影響をおよぼしたためではないかと推測される。

Quercetin の Ca 遊離作用

小川靖男, 呉林なごみ (順天堂大・医・薬理)

Shoshan らは quercetin が筋小胞体の Ca^{2+} -ATPase 活性及びCaとりこみを抑制するが、筋小胞体からのCa遊離にはなんら影響を与えないと報告している。もしそうならば quercetin は筋小胞体機能の研究に重要な道具となりうる。一方 quercetin を作用させた時Ca遊離が起るが、このCa遊離はCaとりこみ抑制の結果と解釈しているものとカフェイン類似のCa遊離作用によると考えているものがある。我々は quercetin のCa遊離作用の性質を明らかにする目的でカエル骨格筋より調製した分離筋小胞体および skinned fiber を用いた in situ の筋小胞体に対する quercetin の効果を研究し、カフェイン、ハロセンの作用とも比較した。

分離小胞体を用いた実験 — 重い画分の方がCaを多く遊離するので、専ら重い画分を用いた。ATPを加えてCaとりこみを開始させ、とりこみが最大になったところで $30\mu\text{M}$ quercetin を加えると5秒以内にみられる速いCa遊離 (平均 $30\text{ n mol/mg protein}$) とそれに続くゆっくりとしたCa遊離が観察された。一方、カルバミルリン酸でCaとりこみを駆動させた場合、quercetin によるとりこみ速度の減少がATPに比し著明であるのにもかかわらず、速いCa遊離は殆どみられず、大部分が遅いCa遊離であった。従って少くとも5秒以内に起る速いCa遊離はCaとりこみ速度の減少によるものでもなく、また非特異的なCa透過性の増加によるものでもない結論される。以後この速いCa遊離にのみ着目する。上述の結論は quercetin によるCa遊離がプロカインにより拮抗されるのに対し、 Ca^{2+} -ATPase活性は協同的に抑制されることでも支持される。Ca遊離作用は高 Mg^{2+} で拮抗され、ATPにより促進される。非分解性ATPアナログである AMPOPCP でも促進された。カフェイン存在下にCaをとりこませた筋小胞体からのCa遊離量が対照に比し減少したことは quercetin のCa遊離作用がカフェインのそれに非常に近いことを示唆し、この点で halothane と異っている。

skinned fiber を用いた実験 — 分離筋小胞体を用いた実験結果を確認するとともに以下の新

しい事実が判明した。Ca 遊離はヌクレオチド依存性で、AMP でもよい。Ca²⁺=10 μM までは Ca²⁺ 依存性に促進されるが、10 mM GEDTA 存在下で Ca 遊離を起す。カフェインと一諸に作用させるとカフェインの効果をむしろ減弱させる。quercetin はカフェインの partial agonist と考えられ、その Ca 遊離作用はカフェインと同じか極めて酷似している。

外液 Ca に依存しない収縮について

富田忠雄, アシュリー・F, 高井 章 (名古屋大・医・生理)

ラット輸精管の平滑筋では外液の Ca を除き、2 mM EGTA を加えた液中でも長時間にわたって noradrenaline による収縮を観察できる。この収縮は calmodulin 拮抗剤で抑えられるので、細胞内 Ca の遊離によって起こる可能性も考えられるが、これらの薬剤は α 受容体遮断作用をもつとされるので結論的ではない。本実験では、同様に外液 Ca の存在なしに収縮がみられるラット子宮筋の oxytocin に対する反応について、calmodulin 拮抗剤の作用を含めて、その性質について調べてみた。

ラット子宮の縦走筋は多くの場合、Ca を除いても oxytocin (10⁻⁴ unit, 2×10⁻¹⁰ M) によって持続性の収縮を起こす。20分おきに投与を繰り返すと最初数回は収縮の増大がみられ、その後も数日間にわたって減少しない。しかし、中には Ca を除くと反応が殆ど消失したり、または次第に減少していく標本も存在する。これらの反応のパターンと性周期との間には明確な相関を見出し得なかったが、同一子宮であれば、部位による差は著明でなかった。筋小胞体からの Ca を遊離するとされる caffeine (30 mM) による張力発生は非常に弱い、その存在下では oxytocin の反応は消失する。しかし、30分以上の処理後でも caffeine を除くと完全な回復がみられ、細胞内 Ca 貯蔵の枯渇を示唆するような結果は得られなかった。Calmodulin 拮抗剤である chlorpromazine (100 μM), fluphenazine (30 μM) および trifluoperazine (10 μM) は Ca 非依存性の oxytocin の反応に対しては著明な抑制を示さなかった。しかし、W-7 (100 μM) は Ca および oxytocin の反応を両方とも平行して抑制した。Ca 拮抗剤とされている diltiazem は、高濃度になる細胞内貯蔵部からの Ca の遊離も抑えるとされるが、ラットの子宮筋では低濃度 (100 μM 以下) では Ca による収縮のみを、高濃度 (1 mM) では oxytocin の反応も消失させた。最近血管や子宮筋の細胞膜に存在する Ca 結合蛋白が収縮に関与している可能性が考えられ、pH 7 以下では Ca に対する親和性を失うと報告されている。外液の pH を 6 以下にすると oxytocin および Ca による収縮反応は強く抑制されたが、pH を 7 以上にもどしたときの回復は完全であった。これらの結果からは外液 Ca に依存しない oxytocin の収縮が細胞内 Ca の遊離に起因するものか、Ca と関係ない過程による収縮蛋白系の活性化によるものか結論するには不十分である。さらに直接的な研究を進めなければならない。

ニトログリセリンとイソプレナリンの血管弛緩作用

栗山 熙, 伊藤猛雄, 末松栄一, 上村裕一 (九州大・医・薬理)

ニトログリセリン (NG) およびイソプレナリン (Isop) は血管平滑筋を弛緩させることがよく知られているが, その作用機序に関しては不明な点が多い。先に我々は NG が, 1) 膜電位および膜抵抗に影響を示さず弛緩作用を有すること, 2) その機序として細胞内での Ca 動態が関係していること等を見出した。また最近 NG 等の亜硝酸化合物により cyclic GMP が増加し, その弛緩機序との関連が注目されている。そこで今回, 我々は NG による cyclic GMP の増加作用およびその弛緩作用との関連について, 更にこの nucleotide と cyclic AMP との差異についても合わせて検討した。

NG はブタ冠動脈で 10^{-7} M より cyclic GMP を増加したが, cyclic AMP は増加させなかった。Isop は 10^{-6} M で cyclic AMP を増加したが cyclic GMP は増加させなかった。そこで NG と cyclic GMP との作用比較を行うため 8- bromo cyclic GMP (8- br- c GMP) を, また Isop と cyclic AMP との作用比較のため dibutyl cyclic AMP (Db- c AMP) を用い, ウサギ腸間膜動脈を正常および saponin ($25 \mu\text{g/ml}$, 20 分間) により作製した chemically skinned muscle を用いて, 等尺性張力記録法によりこれらの弛緩機序を検討した。正常筋の K 拘縮 (128 mM) を NG, 8- br- c GMP, Isop および Db- c AMP は抑制したが, この抑制作用は全薬物ともに phasic よりも tonic - 拘縮で著明であった。一方ノルアドレナリン (NAd) 拘縮は NG および 8- br- c GMP により濃度依存性に抑制されたが, Isop および Db- c AMP では低濃度で増加し, 高濃度で抑制された。また Ca 欠如条件下では全ての薬物で NAd - およびカフェイン拘縮の振幅を抑制したが, NG および 8- br- c GMP はその弛緩速度を増加させ, Isop および Db- c AMP は減少させた。Chemically skinned muscle で NG および Isop は p Ca - 張力曲線に影響しなかったが, cyclic AMP および cyclic GMP は各々の依存性酵素の存在下で Ca - 収縮を抑制した。また Ca - 貯蔵部位への Ca 取り込みに対して NG, Isop は効果がなく, cyclic AMP は増加させ, cyclic GMP は僅かに減少させた。またブタ冠動脈の single cell での ^{45}Ca - efflux は ACh により促進されるが, NG はこの作用を更に促進した。そこで NG は cyclic GMP を増加し, Ca - efflux を増加させることにより, Isop は cyclic AMP を増加させ, Ca - 取り込みを増加させることにより血管平滑筋を弛緩させるものと推定させるものと推定した。

冠動脈平滑筋の収縮機構について

仲澤幹雄, 今井昭一 (新潟大・医・薬理)

Nitroglycerin が狭心症に奏効する事は良く知られている。しかしその作用機序については現在の所未だに明らかでない。太い冠動脈の拡張作用が注目されており狭心症の病態生理と相俟って興味深い問題であると考えられる。我々は、太い冠動脈の拡張作用の作用機序を解明すべくイヌ冠動脈平滑筋に対する nitroglycerin の作用を検討して来た。その結果細胞内にその作用点が存在する事まで明らかとなった。さらにイヌ冠動脈平滑筋の収縮機構について一つの仮説を立てることが出来たので報告する。

Nitroglycerin は nifedipine と同様に 128 mM K^+ による冠動脈平滑筋の収縮を抑制したが、nifedipine と異なり 128 mM K^+ による La^{3+} resistant Ca^{2+} uptake の増加を抑制しなかった。一方、外液 Ca^{2+} free, 1 mM La^{3+} による冠動脈平滑筋の収縮は nifedipine では抑制されなかったが nitroglycerin は 128 mM K^+ 収縮じ用量範囲でこれを抑制した。これは nitroglycerin の作用部位が細胞内にある事を示唆する事実であると考えられたのでさらに細胞内の Ca^{2+} store からの Ca^{2+} release により収縮すると考えられる caffeine 収縮に対する作用を検討したが、nitroglycerin はこの収縮に対し抑制作用を示さなかった。我々の標本の caffeine 収縮は procaine で用量依存的に抑制されるので、所謂 Ca^{2+} induced Ca^{2+} release 機構による収縮と考えて良いと思われる。従って nitroglycerin の作用部位は細胞膜から SR までの間にあると思われる。一方、128 mM K^+ による収縮を procaine は caffeine 収縮とほぼ同じ用量で抑制し (抑制の pD_2 は caffeine 収縮で 2.92, 128 mM K^+ 収縮で 2.86) しかも 128 mM K^+ による La^{3+} resistant Ca^{2+} uptake を抑制しないのでイヌ冠動脈平滑筋の 128 mM K^+ による収縮は必ず Ca^{2+} store からの Ca^{2+} release を介して起こっていると考えられる。

大脳動脈のノルアドレナリン反応性

戸田 昇 (滋賀医大・医・薬理)

近年、血管平滑筋に α_2 アドレナリン受容体の存在を示す報告が数多くみられるようになってきた。noradrenaline に対する大脳動脈反応性の異常についても、 α_2 受容体優位でもって説明される傾向にある。また、大脳動脈が交感神経刺激に対して反応し難い理由の一つに神経筋接合部の α_1 受容体が少いことがあげられている。そこで今回は、これまで検討されてきたイヌだけでなくサルおよびヒトの摘出大脳動脈と上腸間膜・胃動脈を用いて α 受容体刺激薬と遮断薬の作用

を比較し、これら動脈平滑筋における α 受容体 subtype の関与の程度を推論することにした。ラセン状条片標本を37℃栄養液に懸垂し、その等尺性張力変化を記録した。ヒトとサルの大脳動脈の noradrenaline 収縮はイヌ大脳動脈のそれより明らかに大であった。しかし、ヒト胃ないしサル・イヌ腸間膜動脈の noradrenaline 収縮に比較すると、大脳動脈の同収縮はいずれの動物種においても小であった。サル大脳動脈では、phenylephrine の ED 50 は noradrenaline のそれの5.6倍であったが、両アミンによる最大収縮は同等であった。clonidine は収縮作用を示さなかった。イヌ大脳動脈では、phenylephrine の高用量で noradrenaline より明らかに強い収縮を示した。clonidine も有意の収縮をひきおこした。ヒトとサルの大脳動脈では、noradrenaline 収縮は prazosin の低用量 (3×10^{-10} M) で抑制されたが 10^{-8} M までの用量の yohimbine によって影響をうけなかった。一方、イヌ大脳動脈の noradrenaline 収縮は yohimbine 10^{-8} M 処置によって抑制されたが prazosin 高濃度 (10^{-8} M) によっても影響をうけなかった。以上の成績から、(1) イヌの大脳動脈では α_2 アドレナリン受容体が優位であるのに対し、ヒトとサルの大脳動脈では胃・腸間膜動脈と同様 α_1 受容体が優位であること、(2) サルとイヌの大脳動脈が交感神経刺激に反応し難いのは神経筋接合部の α_1 受容体が少ないためではないことが示唆される。

イヌ静脈平滑筋における α - 受容体のサブタイプ

重井達郎, 庄司忠夫 (名古屋大・医・薬理)

水流弘通 (広島大・医・薬理)

イヌ静脈平滑筋における α_1 - , α_2 - 受容体の分布をしらべる目的で、15部位から摘出した静脈片より輪状筋条片15種、縦走筋条片3種を作り、norepinephrine (NE), phenylephrine (Phe, α_1 - 選択性), clonidine (Cln, α_2 - 選択性) に対する収縮反応をしらべた。標本を Krebs - bicarbonate 液中に懸垂し、等尺性収縮を記録した。Cocaine, propranolol, corticosterone 存在下に各薬物に対する濃度-反応曲線を作り、最大発生張力および EC 50 を求めた。NE, Phe にはすべての静脈が反応したが、Cln による著明な収縮は7部位にのみ見られた。即ち、(A) saphenous, cephalic, jugular, femoral veins (輪状筋)、(B) portal vein および inferior vena cava の中部位 (縦走筋のみ)、(C) mesenteric vein (縦走筋のみ)。Phe, Cln に対する相対的感受性において (A) では $\text{phe} < \text{Cln}$, (B) では $\text{Phe} > \text{Cln}$, (C) は $\text{Phe} \approx \text{Cln}$ であった。

Saphenous vein, portal vein の Cln 収縮反応について prazosin (α_1 - 選択性), yohimbine (α_2 - 選択性) による拮抗様式をしらべた。Portal vein の濃度-反応曲線は単相性であって、Prazosin 10^{-7} M, yohimbine 10^{-7} M の前処置によっ右に平行移動し、移動後の EC 50 はそれぞれ対照時 (3×10^{-7} M) の30×, 3×であった。一方、saphenous vein では濃度-反応曲線は屢々軽度2相性であって、prazosin によって高濃度範囲 ($10^{-7} \sim 10^{-5}$ M) が低濃度範囲 (10^{-8}

$\sim 10^{-7}$ M) よりも強く右に移動する為、濃度—反応曲線は2相性が著しくなった。又、yohimbine 前処置により、逆に低濃度範囲が強く移動する結果、濃度—反応曲線は傾斜の急な単相の形になった。これらの所見から、portal vein の縦走筋には殆ど α_1 -受容体のみが分布し、saphenous vein の輪状筋には α_1 -, α_2 -両受容体が分布すると考えられる。別に、両静脈のNE収縮に対するprazosin, phentolamine, yohimbine の拮抗様式をSchild-plotによって解析したが、その成績も上記の結論を支持した。Saphenous vein は α_1 -, α_2 -受容体の性質を比較検討する為のよい標本と思われる。又、portal vein (縦走筋) のClnによる最大発生張力はNEのそれに匹敵することから、この筋には剰余 α_1 -受容体が多数存在する可能性がある。イヌ静脈系における postsynaptic α_2 -adrenoceptors の分布には著しい部位差のあることがわかった。

Cキナーゼによるミオシン軽鎖リン酸化反応

日高弘義 (三重大・医・薬理)

平滑筋機能のカルシウムによる制御機構に、ミオシン軽鎖のリン酸化反応が深く関与していることが近年明らかとなった。我々はすでにこのリン酸化反応にカルモデュリンが重要な役割を果たしていることを薬理学的に証明している。本年度は、カルシウムの作用点として、カルモデュリン以外にホスホリピッドに注目し、検討した。

具体的には、カルシウム・ホスホリピッド依存性キナーゼ (Cキナーゼ) が、ミオシン軽鎖をどのようにリン酸化するか、カルシウム・カルモデュリン依存性ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) との異同について詳細に検討した。1) ニワトリ砂胃ミオシンまたは同単離ミオシン軽鎖を含む反応液にラット脳Cキナーゼを添加すると、単離したミオシン軽鎖のみならずミオシンをもリン酸化することが判明した。2) Cキナーゼのミオシン軽鎖に対する K_m 値は $93 \mu\text{M}$ であった。3) MLCK と Cキナーゼの両者あるいは各々を反応液に加え、これら2種のカルシウム依存性キナーゼによるミオシン軽鎖のリン酸化反応を検討したところ、両キナーゼは相加的にミオシン軽鎖をリン酸化することが判明した。この結果は、MLCK と Cキナーゼが、ミオシン軽鎖の異なる部位をリン酸化していることを示唆していると考えられた。4) 両キナーゼによるリン酸化部位の異同について検討するため、 ^{32}P 標識 ATP を用いてミオシン軽鎖をリン酸化させ、トリブシンにて限定分解後、二次元薄層クロマトグラフィーにより ^{32}P 標識ペプチドを分離し、コダック XOMAT RP フィルムによるオートラジオグラフィーを行ったところ、各々のキナーゼは異なる部位をリン酸化していることが判明した。

単離したミオシン軽鎖は、MLCK のみならずキナーゼ、c AMP依存性キナーゼ、カゼインキナーゼ等の多くのキナーゼによってリン酸化されるが、ミオシン分子を基質にできるのはMLCK と Cキナーゼの2種である。両キナーゼが微量のカルシウムによって調節されていることは興味深

い。しかも両キナーゼはミオシン軽鎖の異なる部位をリン酸化し、ほぼ同モルのリン酸が入るところから、アクチンとミオシンの相互作用に与える両キナーゼの効果についてさらに詳細に検討する予定である。

VIP による平滑筋弛緩反応に対する APP の抑制作用

大賀 皓・伊藤茂男（北大・獣医・薬理）

Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) が、消化管に分布する非アドレナリン・非コリン（非ア・非コ）作動性抑制神経の伝達物質であるか否かを調べるために、各種動物の胃運動及び摘出消化管平滑筋に対する VIP、セクレチン及びグルカゴンの作用を比較し、さらに avian pancreatic polypeptide (APP) が非ア・非コ作動性抑制神経刺激と VIP による平滑筋弛緩反応を平行して抑制するか否かを検討した。

1. VIP を胃へ近接動注すると、イヌ、ネコ及びウサギの全胃を濃度依存性に弛緩させた（40 p mole - 0.1 n mole）。セクレチンとグルカゴンも VIP と同様にイヌの胃を弛緩させたが、両者の弛緩反応は VIP のそれよりも発現は遅くかつ長時間持続した。三者のペプチドによる弛緩反応の力価は、VIP $\geq$ セクレチン $>$ グルカゴンの順であった。
2. VIP はブタ、モルモット、ラット胃条片及びニワトリ直腸標本を濃度依存性に弛緩させた。VIP の PD₂ 値は、7.62 $\pm$ 0.11（ブタ）、7.89 $\pm$ 0.07（モルモット）及び 7.84 $\pm$ 0.05（ニワトリ）であった。セクレチンはブタ胃条片のみに作用し、その力価は VIP よりも高かった（PD₂ = 8.86 $\pm$ 0.08）。しかし、グルカゴンは摘出標本では全く効果を示さなかった。
3. APP はネコ下顎腺において、VIP（1 n mole）と鼓索神経刺激によるアトロピン耐性の血管拡張反応を濃度依存性（0.48 - 12 n mole）に抑制した。
4. ネコ大腸において、APP は濃度依存性に血流を低下させたが（0.4 - 6 n mol）、低濃度の APP（0.4 - 1.5 n mole）は、ブラデキニン（20 p mole）とイソプロテレノール（0.1 n mole）による血管拡張反応をほとんど抑制することなしに、VIP（0.2 n mole）と骨盤神経刺激によるアトロピン耐性の血管拡張反応を平行して抑制した。
5. 他方、APP（10 n mole）はイヌの胃の VIP（1.5 n mole）動注と迷走-迷走神経反射による胃の弛緩反応を抑制しなかった。また、モルモット、ラット胃条片及びニワトリ直腸標本では、APP（10⁻⁶）は VIP（10⁻⁸M）と非ア・非コ作動性抑制神経刺激による弛緩反応に対し抑制効果を示さなかった。

以上の成績より、VIP は各種動物の消化管平滑筋を強く弛緩させることが示された。また、APP は消化管平滑筋では VIP 反応の拮抗物質として作用しないが、血管平滑筋では VIP 反応に拮抗する可能性が示唆された。

心筋の興奮収縮連関に対する inotropic agents の影響

藤野澄子（北海道薬大・薬理）

心筋の興奮収縮連関機構解明のために negative inotropic agent として phenylglyoxal, positive inotropic agent として ouabain を用い一連の実験を行った。

phenylglyoxal (PGO) は多くの活性酵素の構成アミノ酸として重要なアルギニン残基のグアニン基と特異的に反応することから、タンパク質修飾試薬として用いられている。5 mM PGO 中で10分間心筋切片を処理したのち、60分間 washout すると、攣縮 (0.1 HZ) および K- 攣縮張力は初めの約1/5に減少した。この減少は活動電位 (AP) や膜電位 (MP) の変化に依存しなかった。caffeine 攣縮は PGO により何ら影響されなかった。このような PGO によりおこされた心筋の E-C link の遮断は12時間後も持続した。PGO を K- gluconate Ringer 液中で与えると PGO による心筋の E-C link 遮断は生じなかった。choline Ringer 液中では正常 Ringer 液中と同程度の PGO- 遮断が生じた。

この事実は PGO- 遮断が polarized muscle でのみおこされる可能性を示唆している。 ^{14}C - PGO (5 mM) を用いて行った心筋内とりこみ量は、10分間処理直後では10.5 n moles/mg muscle であった。この濃度は drug space であらわすと2.9で、 ^{14}C - inulin space の約15倍に相当した。60分間の washout 後には約1/3に減少した。 ^3H - ouabain (1 μM) による典型的な心筋収縮増強時のとりこみは25 p moles/mg muscle (drug space ; 0.55) で、PGO のその1/500であった。次いで5 mM ^{14}C - PGO 処理後60分の心筋細胞内 radioactivity の分布について検索した。上清 (200000 $\times\text{g}$, 66 時間以上) と pellet の比は94.6 : 5.4で、大部分が上清中に存在した。pellet 中の分布は N (600 $\times\text{g}$, 10 分); 8.4 %, Mt (8000 $\times\text{g}$, 10分); 9 %, Mic (軽) (100000 $\times\text{g}$, 30^m); 8.4 %, Mic (重) (200000 $\times\text{g}$, 66^h); 0.5 % であった。mg タンパク当りの radioactivity は Mic (重) がもっとも高く Mt 画分の約5倍であった。 ^3H - ouabain の場合も Mic 画分 (8000 $\times\text{g}$ - 25000 $\times\text{g}$) は Mt 画分の約2倍でもっとも高かった。更に各画分について SDS- Gel-Electrophoresis を行い、E-C link 遮断時における ^{14}C - PGO 結合タンパクの検索も行った。

新強心薬 AR-L 115 BS の心室筋に対する作用

柳澤輝行, 平 則夫 (東北大・医・薬理)

新強心薬 AR-L 115 BS (AR-L) をイヌ摘出血液灌流心部分標本に近接動注すると、洞房調律、房室結節伝導速度、Purkinje 線維の自動能によると考えられる心室自動能、乳頭筋収縮力そして冠血管拡張による血流の増加を生じた。これらの作用のうち AR-L の作用は比較的心筋収縮力増加作用に選択性があるように考えられた。またこの様な作用は c AMP 分解酵素 (PDE) 阻害剤の作用と比較的類似しているので、心室筋より得られた粗 PDE 活性に対する AR-L の作用を theophylline のそれと比較した。theophylline は $300\mu\text{M}$, 1 mM そして 3 mM で PDE 活性を 22%, 35% そして 63% と用量依存的に抑制した。AR-L は $300\mu\text{M}$, 1 mM , 3 mM , そして 10 mM で PDE 活性を 8%, 14%, 26% そして 21% と高濃度ではかえって抑制作用は減弱し、theophylline よりもあきらかに PDE 活性阻害作用は弱かった。摘出イヌ右心室標本の発生張力と c AMP 含量の時間—反応曲線を検討すると、c AMP 含量の有意の増加は AR-L 作用後 10 分以後で見られたが、張力増加はほぼ定常状態であった。同程度の isoprenaline による収縮力増加の際に c AMP 含量は約 $1.8\text{ p mol/mg w. w.}$ と増加したが、AR-L による c AMP の増加は約 $1.4\text{ p mol/mg. w. w.}$ と isoprenaline による増加と比較して有意に少なかった。AR-L により張力が直加し c AMP 含量が増加している状態に carbachol $3\mu\text{M}$ を作用させると c AMP は有意に減少し、control の状態よりも低下したにもかかわらず AR-L の陽性変力作用は部分的にしか抑制されなかった。モルモットの右室乳頭筋を用いて活動電位に対する AR-L の作用を検討すると、plateau 相の増高と、APD の延長が見られた。単一蔗糖隔絶法を用いて膜電位固定を行った。AR-L は、静止時コンダクタンス (I_{K1}) や I_K に影響せず、 $I-V$ 曲線をほとんど変えることなく I_{Si} を増加した。

AR-L は比較的心筋収縮力増強作用に選択性を持つ薬物であり、その作用機序に c AMP 含量を PDE 阻害作用により増加し、 I_{Si} を増加する作用を持つ。AR-L による c AMP の増加作用は、AR-L の陽性変力作用の一部を説明するにすぎず、c AMP に関係しない他の陽性変力作用を持つと考えられる。

『正常及び異常時における生体調節機能』

昭和58年12月2日～12月3日

12月2日

13:00～14:00

Cl能動輸送とBartter氏病

司会 福原武彦

星 猛

14:30～15:30

ヘモグロビンの構造とSickle cell anemia

司会 本田良行

中馬一郎

16:00～17:00

心筋イオンチャンネルと不整脈

司会 富田忠雄

入沢 宏

12月3日

9:00～10:00

心収縮力測定の問題と心不全

司会 真島英信

菅 弘之

10:30～11:30

体温調節と偶発性低体温症

司会 大村 裕

入來正躬

「正常および異常時における生体調節機能」の研究の推進には、基礎生理学とともに臨床生理学の概念が必要とされる。近年生理学の急速な進歩とともに、基礎生理学のみならず臨床生理学の概念も著しく変化し進展しつつある。今回の会合は、標記研究の推進の根源にある臨床生理学の諸問題——臨床生理学の現況、問題点、将来像——を検討することを目的として開催された。

2日にわたり行った自由討論の概要を、1.基本的問題、2.情報交換と共同研究、3.教育に大別して世話人の責任において以下にまとめた。今回の目的は問題点の抽出にあり、各問題点についての結論は期待しなかった。今回提起された問題点について、各参加者が検討し、具体的問題として明年度の研究会に提出して検討することを予定している。

〔臨床生理学の基本的事項〕

臨床生理学の基本的事項——概念など——について討議され、以下のような意見が提出された。

- 1) 臨床生理学という特別な学問体系は存在しない。臨床生理学の基本的な学問体系はあくまで生理学であるとする意見と、内科学そのものであるとする意見があった。
- 2) 臨床生理学という本を書くことは可能であるし、教育の上では重要な分野である。しかし研究の分野やそのやり方についての考え方、名称などは人により異なる。

たとえば次のような意見があった。ヒトの問題を取り扱う（人体生理学）、臨床医学のベッドサイドで取り扱うような疾病に関連した問題を取り扱う（病態生理学）、ヒトの内的および外的条

件変化に対する応答を主題に、システムの問題として取り扱う（応用生理学）。

3) 臨床生理学にベットを含む施設が必要か否かについては意見の対立があった。因みに「臨床薬理学」はベットを含む施設でヒトにおける薬理学問題を取り扱う分野に用いられている。「臨床生化学」は病院の生化学的臨床検査を取り扱う分野に用いられている。「臨床生理学」が単なる機能検査技師のための学問とは思えない方がよいであろう。しかし臨床生理学会はそういう学会になりつつある。

4) 臨床生理学の教育と研究の担当は、生理学者と臨床医学研究者が可能であろう。

〔臨床生理学の教育〕

I. 臨床生理学の講義について

医学部の生理学教育では、生理学の基本的事項並びに可及的にそれらと臨床医学との関連に言及するとともに、臨床医学に関連する、あるいは臨床医学を指向する事項も教育することが望ましいとの意見が多い。近年臨床生理学が生理学の講義の中で、あるいは臨床医学を学び始めた後で生理学の講義とは独立して講義科目として取り上げられている大学が増加しつつある。しかしこの講義科目の内容については、現在のところ各担当教員に一任されている。したがって何らかの機会にこの内容について検討することが望ましい。具体的に次の提案があった。

Case book of physiology——臨床の症例をあげ、生理学的観点より病因、症状を解説した本——を日本でも刊行することは教える人の参考になるであろう。

臓器別生理機能の正常および異常に関するシリーズの刊行。

臨床生理学講座の問題については、東北大学医学部応用生理学講座について紹介があり、種々の問題点が討議された。

II. 医学部生理学必座に所属する医学部外出身者の生涯教育について

近年医学部外出身者が生理学講座に所属し、生理学の教育、研究、研究指導に従事することが増加しつつある。医学部における生理学の教育が、臨床医学に関連し、あるいはこれを指向する事項を一つとして留意する必要があるだろう。具体的には、大阪大学医学部の医学部出身者のための大学院制度について紹介され、さらにたとえば生理学研究所のような共同研究施設において、このような教育が系統的に実施されることが要望された。

〔臨床生理学に関する情報交換と共同研究〕

臨床生理学の分野へのアプローチが、少なくとも生理学と臨床医学の2方面より可能であり、かつ問題の解決に生理学以外の discipline——たとえば生化学、形態学、薬理学など——の参加が望ましいことから、情報交換と共同研究の場が、臨床生理学では特に有用であり、今後の努力すべき目標の一つはこの点であろう。以下の諸点が討論され、推奨された。

I. 口頭による討論の場として

臨床生理学研究会を、生理学者、他の基礎医学研究者、臨床医学研究者の参加により実施する。

Ⅱ．発表論文による討論の場として

- 1．単行本シリーズの刊行，たとえば Clinical Physiology series の刊行。
- 2．雑誌としては病態生理（中山書店）が最近刊行された。
- 3．JPN. J. Physiology に臨床医学研究者がその研究成果を積極的に投稿するよう方策を考える。

Ⅲ．共同研究の場として

共同利用しうる研究施設，たとえば臨床生理学研究所を考える。

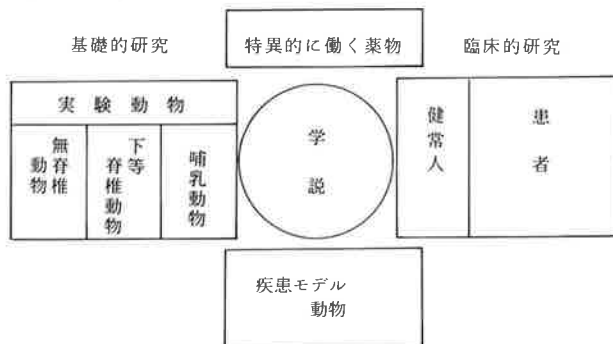
あるいは大学，研究所などに共同利用も可能な施設として，臨床生理学研究のユニットを考える。

参考：情報交換の場としての日本生理学会のあり方についても熱心な検討が行われ，以下のような提案があった。

- 1．生理学会の学問体系の共通する，医学部生理学に関連する研究教育施設以外の生理学研究者との交流をはかることを考慮すべきかもしれない。この際，1)臨床医学研究者のほかに，2)医学部以外，たとえば薬学部，理学部，農学部，獣医学部などの参加について検討すべきであろう。この際，生理学研究としての評価をどのように加えるかについて配慮すべきであろう。
- 2．生理学会地方会の役割について，より全体的な，組織運営についても配慮されたい。

昭和57年度生理学研究所研究会「正常および異常時における生体調査機能」において，生理学者が如何に臨床医学に貢献しうるかという趣旨の討論が行われた。臨床生理学の基本的事項，臨床生理学の教育，および臨床生理学の共同研究などのあり方についての討論の大要は生理学研究所報に報告されている。

Ⅰ．本年度はこの趣旨に沿って，最近の生理学の進歩により，どのような病態が理解しうるようになったかを主題として研究会を開催した。近年の目ざましい生理学研究の進展により，種々の疾病のひき起こされる生理学的機構が明らかにされ，疾病の研究や対策に役立っている。星教授により提唱された次の図は，生理学において学説を研究する方法をまとめたものである。



比較生理学などの基礎的研究と、臨床的研究とより新しい学説が提唱される。このとき、近年とくに特異的に働く薬物に関する研究とともに、疾患モデル動物に関する研究の重要性も強調されている。

本年の研究会では、次の話題が紹介され、討論が行われた。

1. Cl⁻能動輸送と Bartter 氏病

正常人に Furosemide を投与したときにみられる特発性筋腫などの症状は、Bartter 症候群と類似することから、Pseudo-Bartter 症候群とよばれる。Furosemide により腎尿細管の early distal portion での Cl⁻ 能動輸送が障害される。種々の病因が提唱されていた Bartter 氏病も尿細管の Cl⁻ 能動輸送の障害によりひき起されることが明らかにされた。

この Cl⁻ 能動輸送障害の原因として、Carrier の欠損、binding site の変化、pump の強化、K⁺ の recirculation の欠損などが仮定され、研究されつつある。この例も、病態生理学的解析の努力が、Cl⁻ 能動輸送の機能という生理学の根本問題の解明に役立っている一つの例であろう。

2. ヘモグロビンの構造と Sick cell anemia sickle cell anemia の病態生理学を、分子生物学の立場から論じた。とくに、ヘモグロビン分子の異常から polymerization がおこり、これが赤血球の変形と膜の異常をもたらし、微小血管の閉塞ひいては各組織の梗塞がおこる一連の過程について解説した。また、sickling の機作から考えられる治療法についても言及した。

3. 心筋イオンチャンネルと不整脈

4. 心収縮力測定の問題と心不全

まず最初に最近の生理学の進歩に関して、演者の最近の重要な知見、すなわち、イヌ左心室の収縮期圧容積面積 (PVA) が、その管拍酸素消費量とよく直線相関することを報告した。そしてこの関係が変力効果によって収縮性の変ると特異的に移動することが、心不全の理解に役立つことに言及した。次いで心不全の中の収縮不全心の意義を紹介し、収縮不全心の収縮性の測定に、心臓レベル、心室レベル、細胞レベルでそれぞれ多くの問題点があることを紹介した。質疑に入り、座長の真島教授から、PVA の内の収縮期末潜在エネルギーの実体について未解決の点が多い旨の発言があり、演者も同意し、今後の解明が必要な点で意見が一致した。

5. 体温調節と偶発性低体温症

核心温が正常範囲以下に低下した状態は低体温症といわれる。低体温手術などで目的をもって人工的に体内温を低下させる以外に、偶発的に体内温が低下したものが accidental hypothermia-偶発性低体温症といわれる。海や山の遭難、酩酊で起るほか、最近では老人でみられる老人性低体温症が諸外国では多くみられ、社会問題とされている。

研究会では、①老人性低体温症の現状、症状、原因について。②老人の体温調節の特徴について。③このような特徴の原因となる老化による生体機能の変化について、主として紹介した。討論のなかから、将来の研究方向について有効な指示を得ることが出来た。

Ⅱ．昭和57年度報告にもあるように、医学部教育における臨床生理学の重要性にもかかわらず、この講義科目の内容について検討される機会がない。

本研究会の討論の中から、“Case study of medical physiology”を研究会参加者が共同して翻訳し、出版して臨床生理学の講義に役立てたいとの提案が出され、承認された。真島英信教授を中心にして実行される予定である。
(文責：入来)

平滑筋のK拘縮に及ぼすNaの影響

富田忠雄，高井 章，アシュリー・ファラマルツ（名古屋大・医・生理）

平滑筋の興奮ならびに収縮過程におけるNaイオンの役割については不明な点が多い。本研究ではモルモット結腸紐の張力発生がNaによってどのように影響を受けるかを調べてみた。外液のK濃度を増してCaに対する透過性を高めておいて、外液に20分間だけ、30分間隔でCaを加えたとき発生する張力を記録した。

Naを完全にKで置換した場合には、Caによる張力発生は時間と共に次第に減少してくる。この減り速度は標本によって異なるが、3時間から4時間で半分の張力になる。なお、低温で保存すると、その期間が長いほど減少速度が遅くなる。20mM以上のNaを含む場合には殆んど張力の減少はみられず、また0mM Na中で一度減少した張力も20~40mMのNaを加えることによって回復する。Caと同時に1回のみ与えると、その収縮自身の増大はみられず、次の収縮が最大となる。このように20~40mMのNaは張力を維持させるために必要であるといえる。

40mMのNaを含んだ液でCaの投与を繰返しておいて、Caを与えるとき一度だけNaを完全に除くと、その収縮は増大する。しかし、その後40mM Na中で発生させる収縮は小さくなり、しかも回復する傾向はみられない。もしCaの投与を0mM Naと40mM Na液で交互に繰返していくと、40mM Na中での収縮は非常に小さくなっていく。すなわち、Naを含んだ液で脱分極させておいて、一過性にNaを完全に除いた液中で収縮を起すと、その後与えたNaは収縮を抑制する作用をもつといえる。

これらのNaの作用はウアバイン (10^{-4} M) によって本質的な変化を受けないので、Naの能動輸送の関与はないものと考えられる。また効果の現れる時間経過からして、細胞内のイオンよりも、むしろ結合状態のNaが酵素系あたりを介して収縮に影響を与えている可能性が推測される。

『各種臓器におけるブドウ糖分子の受容識別機構と生理機能に関する研究』

昭和58年12月3日

糖の膜透過

- 8:40 小腸, 腎刷子縁膜の糖/ Na^+ 共輸送体の特異性
星 猛 (東大・医・二生理)
- 9:00 骨格筋におけるグルコース輸送系とインシュリン
北里 宏 (滋賀医大・二生理)

腸管吸収

- 9:20 多糖類による糖質吸収の抑制効果
笠木 健 (鳥取大・医療短大)
- 9:40 糖質食餌組成のブドウ糖吸収への影響
土屋正彦, 井上修二 (横浜市大・医・三内科)

味覚

- 10:20 甘味・苦味アミノ酸の味覚受容
佐藤昌康 (東京都神経研)
- 10:40 ラット舌味細胞における糖分子の識別
山田博子, 井元敏明, 日地康武 (鳥取大・医・一生理)
- 11:00 ラット舌表面 α -グルコシダーゼ
三輪一智 (名城大・薬)
- 11:40 総合討論

ブドウ糖の構造とタンパク質との相互作用

- 13:00 ブドウ糖とその関連単糖のNMRスペクトルの特徴
泉 邦彦 (京工繊大・工芸・化学)
- 13:40 アミラーゼ-グルコースアナログ相互作用における糖質分子の認識機構
分光学的手法を主体にした静的ならびに速度論的観測と解析
大西正健 (京大・農・食品工学)
- 14:20 ブドウ糖アルデヒド型代謝酵素としてのアルドースレダクターゼとその阻害剤
奥田 潤 (名城大・薬)

血糖値制御と食欲形成

15:20 中枢性及び末梢性ブドウ糖センサーの生理学的機能

大村 裕 (九大・医・一生理)

15:40 肝臓門脈系ブドウ糖感受性迷走神経活動に及ぼすD-グルコースの α と β アノマー効果の差異について

新島 旭 (新潟大・医・一生理)

16:00 マウス膵 β 細胞のグルコース誘発活動電位とcAMPについて

坂本康二 (福岡大・医・一生理)

16:20 ブドウ糖によるインスリン分泌における Ca^{++} とcAMPの役割

仁木 厚 (愛知学院大・歯・内科)

16:40 総合討論

概要

日地康武 (鳥取大・医・生理)

本研究の目的は、ブドウ糖分子と生体とのかかわり合いを各種臓器別に眺め、その共通点と相違点を見い出すことによってブドウ糖の分子識別機構と生理機能発現の本質を明らかにしようとするものである。同様の研究目的で、昭和57年度文部省科学研究費の総合研究(A)が採択され10名の研究分担者により組織されて遂行されてきたが、昭和58年度は岡崎国立共同研究機構において同研究会を開催するに至った。当初は、主として生理機能を研究している者の集りであったが、本年度は、ブドウ糖とタンパク質との相互作用、あるいはブドウ糖に対する酵素の識別機転等を研究しておられる化学、薬学系の研究者にも参加をお願いして、ブドウ糖分子の生体内挙動をより鮮明に推測し得る会となるように努めた。

小腸上皮の糖能動輸送系の特異性——比較生理学的研究

星 猛, 島田忠人 (東京大・医・生理)

小腸上皮の糖の能動輸送の律速段階は、上皮細胞刷子縁膜における糖/ Na^+ 共輸送過程であり、それによる糖の上り坂輸送(細胞内のとり込み)は Na^+-K^+ ポンプ活性に依存した二次性能動輸送であること、その輸送は分子量160,000~165,000の糖蛋白質性の担体によって行なわれることが知られている。その担体による糖輸送の特異性については、従来主として哺乳動物(ハムスター, ラット)について系統的に調べられて来っており、必要最小限の構造として

D-pyranose 環構造を有すること、 C_2 -OH が equatorial 位にあることが必須であることが知られている。しかし他の炭素原子に結合している OH 基、 C_6 構造もある程度担体との結合に関与することを示唆する成績が多く報告されている。しかしその関与の程度については動物種により、又観察法の差により、一定の見解が得られておらず、また哺乳動物以外の動物についての系統的な研究もない。今回吾々は、糖/ Na^+ 共輸送が起電性を有し、糖輸送により増大する壁内外電位差 (ΔPD_s) 又は短絡電流 (ΔI_{sc}) が糖フラックスと密接に関係すること、 ΔPD_s 又は ΔI_{sc} から求めた K_m 値が糖の influx の速度論解析で求めた K_m 値とよく一致する性質を利用し、電氣的計測によって哺乳類としてモルモット、鳥類として日本産ウズラ、爬虫類としてイシガメ、両棲類としてウシガエル、硬骨淡水魚として金魚の 5 種類の動物種の反転小腸につき 12 種の単糖について夫々の K_m を測定し比較した。尚 D-xylose についてはモルモット、ラット並びにヒトについて比較を行った。得られた結果は次の通りである。

- 1) L-glucose, D-fructose, D-mannitol は何れの動物においても全く電位変化を誘起せず、D 型の pyranose 環構造は絶対的に必要であることは上記脊椎動物で共通している。
- 2) D-Glucose の C_1 -O を修飾した α -, β -methylglucoside の K_m 値は何れの動物でも D-glucose のそれに近似し、 C_1 -OH の関与は殆どないものと思われる。カメ、カエル、金魚等の冷血動物では β -methylglucoside は D-glucose よりむしろ若干高い親和性を有すること、全般的に β -methylglucoside は α -methylglucoside より親和性が高いことが明らかになった。
- 3) C_2 -OH が axial である D-mannose, 同 OH を欠く 2-deoxyglucose は何れも殆ど電位変化を誘起せず、 C_2 -OH の重要性を示すが、然し何れもすべての動物で pylorizin で抑制される小さな電位変化を出す (K_m 値の測定は不可能)。従ってこの 2 つの糖も全く担体と結合しないとは云い得ない。
- 4) C_3 -OH を修飾した 3-O-methylglucose は、鳥類、両棲類では比較的顕著な電位変化を誘起するが、他の動物では K_m 測定が不可能の程度の小さな変化しか誘起せず、動物による差が顕著であった。
- 5) C_4 -OH が D-glucose と反対位にある D-galactose は全部の動物で顕著な電位変化を示し、 K_m 値は、D-glucose の 2~5 倍の間にあった。
- 6) C_6 -OH を除去した 6-deoxyglucose はモルモット、金魚では D-galactose に近い親和性を示したが、他の動物では K_m 測定不能の程度の小さい変化しか誘起しなかった。 C_6 を欠く D-xylose も全例で K_m 測定不能の程度の僅かな電位変化しか出さず、更に別の実験で検討した混食動物 (ラット、ヒト) では全く電位変化を生じなかった。

以上の所見から脊椎動物小腸の糖/ Na^+ 共輸送体の特異性については、D 型 pyranose 環構造をとるとともに、D-glucose と同じ電位の C_2 -OH, C_3 -OH, C_4 -OH, C_6 -OH は何れも水素結合で結合に関与すること、その関与の程度は C_2 -OH > C_4 -OH > C_3 -OH > C_6 -OH となっていること、動物間に見られる D-glucose 誘導体の親和性の程度の差は、各 OH 基の結合位の僅かな差異に基づくものであると結論される。

骨格筋におけるグルコース輸送系とインシュリン

北里 宏 (滋賀医科大・生理)

カエル骨格筋では非代謝性のグルコース・アナログである 3-0-メチルグルコース (3-0-MG) のインフラクスは細胞外から Na^+ を取去ると減少する。細胞外に Na^+ が存在するときの 3-0-MG インフラクスの大きさと Na-free リンガー中での 3-0-MG インフラクスの大きさとの差は細胞外 3-0-MG 濃度の上昇と共に S 字状に増大するのに対して、Na-free リンガー中での 3-0-MG インフラクスと細胞外 3-0-MG 濃度との間には直線関係が認められる。この点に注目して以下の実験を行った。

1. 細胞外グルコースの影響

細胞外に Na^+ が存在しないとき、細胞外にグルコースを加えても 3-0-MG インフラクスには変化は現われなかった。しかし、細胞外に Na^+ が存在するとき、細胞外にグルコースを加えると 3-0-MG インフラクスの大きさは Na-free リンガー中での 3-0-MG インフラクスの大きさとほぼ同じ大きさであった。これらのことは、 Na^+ に依存しないグルコース・インフラクスは飽和する性質を持たないのに対して、 Na^+ に依存する成分は飽和する性質を持つことを示す。

2. 糖・ Na^+ 共輸送の特異的阻害剤の影響

小腸および腎における糖・ Na^+ 共輸送の特異的阻害剤である plorizin は正常リンガー中での 3-0-MG インフラクスを約 20% 抑制するのに対して、Na-free リンガー中では 3-0-MG インフラクスに影響を与えなかった。phloretin は正常リンガー中に於ても Na-free インフラクスに殆んど影響を与えなかった。

3. 膜電位の影響

Na-free リンガー中と正常リンガー中では静止電位に殆んど差は認められない。このことは、Na-free リンガー中での 3-0-MG インフラクスと正常リンガー中での 3-0-MG インフラクスとの大きさの違いは膜電位の変化が関与する現象でないことを示している。ところで正常リンガー中でインシュリンを与えると、 ^{22}Na エフラクスの増大と共に過分極が起る。Na-free リンガー中ではインシュリンによって過分極は起るが、3-0-MG インフラクスの増大は認められなかった。

正常リンガー中においてもまた Na-free リンガー中においても Valinomycin を与えることによって僅かな過分極が認められ、正常リンガーの場合には 3-0-MG インフラクスの増大は認められたが、Na-free リンガーの場合には 3-0-MG インフラクスの増大は認められなかった。また、インシュリンを与えて十分に過分極させておき、その後で Valinomycin を与えると脱分極が起り、3-0-MG インフラクスに Na^+ 依存性の成分と Na^+ に依存しない成分とがあり、 Na^+ 依存性成分は膜電位の変化に従って変化すると考えることが出来よう。

多糖類による糖質吸収の抑制効果

笠木 健 (鳥取大・医療短大)

フロリジンは強力なブドウ糖吸収阻害効果を有するが、腎性糖尿や代謝阻害等の副作用を示すため、そのまま臨床に応用することは出来ない。筆者らはフロリジンを難消化性の多糖類（デキストラン、プルラン等）に結合させた複合体を合成して、ラットにおける小腸内循環灌流法でそのブドウ糖吸収阻害効果を検索した。その結果、かなりのブドウ糖吸収を抑制させることが観察された。また、フロリジンのみ的小腸内灌流によって血中にはフロリジンが検出されたが、合成した多糖類——フロリジン複合体では検出されなかった。このことからこれらの物質をブドウ糖吸収阻害剤として応用するための基礎的な条件は満たされていると言える。ただし、現在のところ多糖類へのフロリジン結合が少ないことから多量の服用を必要とするので、今後の改善が望まれる。

上記の実験の遂行中に、デキストラン、プルラン等の難消化性多糖類自身にショ糖経口投与後の血糖値上昇を抑制する効果があることが判明した。すなわち、これらの多糖類をショ糖にある濃度で添加して経口投与すると、添加しないときに較べて血糖値上昇が抑制されることが観察された。しかし、ブドウ糖に添加してもこの効果は全く見られなかった。このことからこれらの多糖類がインシュリン分泌を促進しているとは考えられないことと、ショ糖分解酵素に作用すると考えられることが推測されるが、いずれも未だ詳細は不明である。また、アロキサン糖尿ラットを作って同様な実験を行なったところ、やはり血糖値上昇抑制効果が見られることから、糖尿病患者への臨床応用が可能であることが示唆された。

糖質食餌組成のブドウ糖吸収への影響

土屋正彦, 井上修二 (横浜市立大・医・第3内科)

〔目的〕 ラット反転小腸によるブドウ糖吸収の実験方法に改良を加え、経時的に反転小腸の漿膜側と粘膜側のブドウ糖濃度を連続的に観察し得る方法を開発した。この方法を用い異なる糖質食餌にて飼育したラットのブドウ糖吸収能を検討した。

〔方法〕 生後10週令のSD雌ラットを4週間Sucrose食, Maltose食, Glucose食, Fructose食にて飼育し実験に供した。側壁に3個の等面積の窓を開けたBeckman Autoanalyzer用のチップを上部, 中部, 下部反転小腸各々2本ずつに挿入し, ブドウ糖濃度10mMのKrebs-Henseleit液20ml (Glucose食飼育ラットの実験2のみ60ml) の入った容器中に同液0.5mlを漿膜側に入れた反

転小腸を懸垂し、180分間37℃にて incubate し12分毎に1回10 μ lずつ15回漿膜側と粘着側の検体を採取しブドウ糖濃度を Beckman Autoanalyzer にて測定した。

〔成績〕 成績の要約を Table 1. に示した。Sucrose 食餌育ラットは、漿膜側では上部小腸で有意に低く、下部小腸で有意に高く、粘膜側では全小腸で有意に低かった。Maltose 食餌育ラットでは、漿膜側は中部小腸で低く、下部小腸で高値を示したが粘膜側は上部小腸で低下を示した。

Table 1. 糖質食餌育ラット反転小腸の Glucose 吸収能

		上部小腸		中部小腸		下部小腸	
		漿膜側	粘膜側	漿膜側	粘膜側	漿膜側	粘膜側
Sucrose	食餌育ラット	↓	↓↓	→	↓↓	↑↑	↓↓
Maltose	食餌育ラット	→	↓↓	↓↓	→	↑	→
Glucose	食餌育ラット (実験2)	↑↑	↓↓	↑↑	↓↓	↑↑	↓↓
Fructose	食餌育ラット	↓	↓	→	→	↑↑	↑↑

Glucose 食餌育ラットでは粘膜側液量 20ml の実験 1 では漿膜側は上部小腸で低下し、下部小腸では高値を示した。この結果はメディウム中の利用しうるブドウ糖の不足のためと考えられたので、同液 60ml の実験 2 を実施した。漿膜側は全小腸で高値を示し、粘膜側は全小腸で低値を示した。Fructose 食餌育ラットでは漿膜側は上部小腸で有意に低下し、下部小腸で高値を示した。粘膜側では上部小腸で低下し、下部小腸で高値を示した。

〔考案〕 改良を加えたラット反転小腸のブドウ糖吸収能を経時的に観察し得る方法により 4 種類の糖質組成食により飼育されたラットは、Glucose 食で最高の漿膜側濃度を示した。この事はブドウ糖を含有した 2 種類 Sucrose や Maltose 食飼育よりも Glucose 食飼育が小腸でのブドウ糖吸収をより亢進させる事を示唆している。

甘味、苦味アミノ酸の味覚受容

佐藤昌康（東京都神経科学総合研）

一般に D-アミノ酸は甘い。また L-アミノ酸でも側鎖がメチル基、エチル基のものは甘い。しかし側鎖が大きくなるにつれて、L-アミノ酸は無味、苦味を呈するようになる。他に、側鎖の疎水性が大きくなると苦味が増し、苦味いき値が低下することが知られている。われわれは各種アミ

ノ酸に対する ddy マウスの嗜好を測定し、これをアミノ酸の分子量、疎水性を関連づけ、これによって味覚受容膜におけるアミノ酸の受容機構を解明しようとした。

1) 各種 D-, L-アミノ酸に対する嗜好

19種の L-, D-アミノ酸に対する ddy マウスの嗜好を、2 瓶選択法を用いて測定した。嗜好の大きさは、preference 比 (試験液摂取量 $\times 100\%$ / (水 + 試験液) 摂取量) によって表わした。マウスは甘味を呈するアミノ酸 (Gly, L-Ala, -Ser, -Pro, -Thr, -Gln) を好むが、苦味を呈するアミノ酸 (L-Ile, -Arg, -Phe, -Met) を嫌らった。また無味または微苦味とされるアミノ酸 (L-Leu, Val, -His, Lys) には中性であった。D-Ala, -Phe, -Met は好まれた。

14種の、0.1ML-アミノ酸に対する嗜好の大きさは、アミノ酸分子量と負の相関 ($r = -0.69$, $p < 0.01$) を示し、側鎖疎水性とも負の相関 ($r = -0.54$, $p < 0.05$) があった。これに対し D-アミノ酸に対する嗜好は、分子量、疎水性とともに大きくなる傾向があった。

13種の 0.1ML-アミノ酸に対するヒトの快度 (hedonic intensity) を二宮らの心理物理学実験の測定値から計算し、マウスの嗜好の大きさととの相関をみると、高い正相関がえられる ($r = 0.79$, $p < 0.01$)。以上のことから、アミノ酸に対する嗜好がマウスとヒトではきわめて似ていることがわかる。

以上の結果に基づき、アミノ酸の甘味、苦味発現のための受容サイドとの interaction のモデルを提示することができる。

2) マウス鼓索神経の糖、アミノ酸応答に対する Cu^{2+} , Zn^{2+} の抑制効果

CuCl_2 , ZnCl_2 をショ糖, サッカリンに添加すると、 $10^{-5} \sim 10^{-4} \text{M}$ の濃度で鼓索神経応答は選択的に抑制される。抑制の程度はおおよそ 20~70% であり、 10^{-3}M ではほとんど 100% の抑制がみられる。しかし食塩, 塩酸, キニーネに対する神経応答は、 10^{-4}M の CuCl_2 , ZnCl_2 でほとんど影響されない。この抑制効果は、甘味物質と受容タンパク質の結合を、 Cu^{2+} , Zn^{2+} が阻害するためであろう。

これら重金属塩は、同様に、果糖, グルコースなど他の糖に対する神経応答を抑制する。しかし Gly, L-Ala, -Ser, -Pro など甘味を呈するアミノ酸に対する神経応答の抑制は、糖の抑制に比べて小さい。このことは甘味を呈するアミノ酸の味覚受容のメカニズムが、糖, サッカリンの受容機構とは若干ことになっていることを示すものである。

ラット舌味細胞における糖分子の識別

山田博子, 井元敏明, 日地康武 (鳥取大・医・生理)

ラット舌味細胞膜上の糖受容部位の性質を明らかにするために、各種の糖に対する鼓索神経束からの積分応答を指標として以下の検討を行った。

ラット舌をジチオスライトール (DTT) やウッドワード試薬で処理すると、応答を記録した 4 種の糖のうちスクロースとフラクトースの応答のみ有意に抑制され、グルコースとマルトースの応答には影響がみられなかった。一方、膵臓の β -細胞に作用して糖尿病を誘発することで知られているストレプトゾトシンを用いてラットの舌を処理した場合には、逆にグルコースとマルトースの応答のみ有意に抑制されるという興味ある結果を得た。また、4 種の糖に対する濃度応答関係の解析から得られた Hill 係数および糖と受容体とのみかけの解離定数の pH 依存性を検討した結果、グルコースとマルトースおよびスクロースとフラクトースは pH の変化に一致してそれぞれ類似した挙動を示すことが明らかとなった。

以上の結果は、糖受容部位は決して単一なものではなく、フラクトース構造に対して親和性の高い部位と、グルコースに対して親和性の高い部位の少なくとも二つから成っていることを強く示唆している。しかしながら、続いて行った交叉順応の実験結果では、スクロースはグルコースの結合部位とも強く相互作用し得ることが示された。この結果と、スクロースの応答がストレプトゾトシンによって全く影響を受けないという事実は、一見矛盾しているように思われるが、ストレプトゾトシンに感受性の高い別のグルコース結合部位の存在を示唆しているのかも知れない。

ラットおよびヒトの組織、細胞によるグルコースアノマーの取り込みと代謝

三輪一智 (名城大・薬学)

高等動物の組織、細胞によるグルコースの代謝、利用に際し、 α -、 β -アノマー間で差が見られるか否かについては明らかではない。

Bailey¹⁾らは、ヘキソキナーゼ (HK) にはアノマー優位性がなく、またグルコース-6-リン酸 (G-6-P) の自然変旋光が極めて速いために、両アノマーの代謝速度には差は生じないと報告している。一方、膵ラ氏島のグルコース代謝 (解糖) においては、Idahl²⁾らはアノマー間に差はないとし、Malaisse³⁾らは α -アノマーの方が速いとしている。

ここには、ラットおよびヒトの組織、細胞によるグルコースの取り込みと代謝におけるアノマー間の差について調べた結果を述べる。

1. ラットの遊離脂肪細胞によるグルコース取り込みの速度 (37℃, 15sec での測定) は、インスリンの有無に拘らず (インスリンにより取り込みは 6 倍になる)、 α -、 β -アノマー間で有意差がなかった。
2. ラット横隔膜は、好氣的条件下においてはインスリンの有無に拘らず (インスリンにより取り込みは 3~4 倍になる)、両アノマーをほぼ同じ速さ (37℃, 1 min での測定) で取り込んだ。しかし、嫌氣的条件下では、インスリンが存在しない場合 (好氣的条件下に比し、取り込みは 2~3 倍になる)、 α -アノマーは β -アノマーより 1.3 倍速く取り込まれた。すなわち、インスリ

ンによる取り込み増大の機構は、anoxiaによるそれとは異なることを示唆する⁴⁾。また、横隔膜におけるグリコーゲン合成速度は、種々条件を変えても有意差を生じなかった。これは、グリコーゲン合成酵素が律速段階となっているため、G-6-P段階での停滞の際、変旋光が起き、アノマー間の差が消失するためと考えられる。

3. 洗浄ヒト赤血球（グルコースをほとんど含まない）においては、 β -グルコースは α -グルコースより1.2倍速く（25℃, 5 secでの測定）取り込まれた。また、グルコースからの乳酸生成は、 α -アノマーからより β -アノマーからの方が1.3倍速かった（37℃, 3 minでの測定）。乳酸生成は、グルコース取り込みに比べれば極めて遅いので、乳酸生成の β -優位性は、取り込みの β -優位性とは関係なく、むしろ、律速段階の一つであるHKの β -優位性（ラット肝、脳、骨格筋のType I-IIIのHKの V_{β}/V_{α} は1.3—1.6であることをすでに報告した⁵⁾）と関連すると考えられる。

〔文献〕

- 1) Bailey, J. M. et al., J. Biol. Chem. **243** : 4827 (1968).
- 2) Idahl, L.-A. et al., Diabetes **25** : 450 (1976).
- 3) F. Malaisse-Lagae, et al., Biochimie. **64** : 1059 (1982).
- 4) Miwa, I. et al., Biomed. Res. **3** : 247 (1982).
- 5) Okuda, J. et al., Biochem. **84** : 993 (1978).

ブドウ糖とその関連単糖のNMRスペクトルの特徴

泉 邦彦（京工繊大・工芸・化学）

一連のグルコース（Glc）（ブドウ糖）系単糖（D-グルコース、D-キシロース、D-グルクロン酸およびN-アセチル、D-クルコザミン）についてプロトンおよび炭素核NMRスペクトルを測定し、化学シフト、スピン結合定数およびスピン格子緩和時間（ T_1 ）のデータを整理してその特徴をまとめた。とくにアノマー間の相違および相応するガラクトース（Gal）系単糖（D-ガラクトース、L-アラビノース、D-ガラクトツロン酸およびN-アセチル、D-ガラクトサミン）のスペクトルとの相違に留意して考察を深めた結果、次のような知見が得られた。

1. ピラノイド環の非対称性について——環のプロトンや炭素核の化学シフトがアノマー間で大きく異なる（S値は一般に前者では $\alpha > \beta$ であり、後者では $\beta > \alpha$ である）が、その差はプロトン、炭素核ともに3位に比して5位により大きく現れる。3位と5位の間のこの不均衡はGal系の糖との化学シフトの違いについても見られるが、これはGal系では、環プロトン間の結合定数のうち、 $J_{3,4}$ 値と $J_{4,5a}$ 値が明確な相違を示すことによって裏付けられる。したがって、ピラノイド環の1位や4位に結合する水素原子と水酸基の立体配達の転換は、一般に1位と4位の

炭素原子を結ぶ直線に関して対称でない変化をひき起こすと考えられる。

2. ヒドロキシメチル基のコンホメーションについて——ヘキソースとヘキソサミンの6位に結合するメチレンプロトン (H-6A と H-6B) の化学シフトの差は, Glc系では明確に現れる ($\beta > \alpha$) が, Gal系ではほとんど皆無である。また, 5位と6位のプロトン間の結合定数 ($J_{5,6A}$ と $J_{5,6B}$) も, Glc系と β -Gal系では明確に異なるが, α -Gal系ではほとんど区別できない。一方, メチルグリコシドについて6位の炭素核の T_1 を比較すると, α -Gal系, β -Gal系, α -Glc系, β -Glc系の順に小さくなり, β -Glc系ではピラノイド環の炭素核と同じ程度の拘束状態が維持されていることが分かった。そこでこれらのデータを総合して各系, 各アノマーの糖についてヒドロキシメチル基のコンホメーション, すなわち C-5/C-6 軸のまわりのロータマー分布を推測した。とくに各ロータマーの安定性を分子内の双極子間相互作用と結びつけて考察した。

3. ランタニドイオン (L_n) との結合性について——ウロン酸 (Na 塩) の重水溶液に Pr^{3+} を加えると, 5位の炭素核の化学シフトがもっとも大きく変化するが, α -アノマーに限り, 1位と6位のそれもあり大きく変化する。また同じく Gd^{3+} を加えると, 4~6位の炭素核の T_1 値が大なり小なり減少するが, α -アノマーに限り, 1位のそれもあり顕著に減少する。そこでこれらのデータからウロン酸への L_n の結合部位を求めたところ, L_n は, β -アノマーではカルボキシル基と結合するのみであるが, α -アノマーではそれに加えて環酸素ともキレート状に結合することが分かった。

アミラーゼ・グルコースアナログ相互作用における糖質分子の識別機構

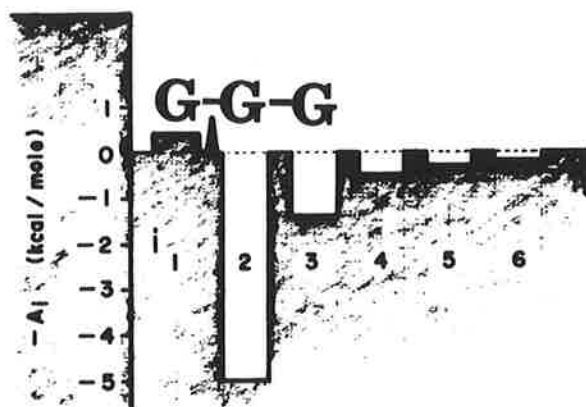
—分光学的手法を主体にした静的ならびに速度論的観測と解析—

大西正健 (京都大・農・食品工学)

従来, 私共は“触媒機能”を指標として酵素における反応の「しくみ」を活性部位構造に関連づけて解析してきた。ここでは, グルコアミラーゼの例を取り挙げよう¹⁾。本酵素は澱粉, グリコゲン, オリゴ糖などを非還元性末端から水解して, いずれも β -グルコースを生産する反応を触媒する。では, どんな「しくみ」で上記各種糖質 (α -1.4又は α -1.6グルコシド結合) を取り込み, その“グルコース”を識別して分解するのであろう。

1. “サブサイト”を単位とする活性部位構造

鎖長の異なるマルトオリゴ糖 ($G_2 \sim G_7$) を基質として, 水解反応の分子活性 k_0 と Michaelis 定数 K_m を調べると, k_0 及び K_m は共に鎖長に伴って大きくなることが判る。これは, 活性部位が幾つかの“サブサイト” (グルコース残基に対応する部位) からなり, 各個が固有の親和力をもつと考えると, 実験結果に矛盾なく解釈される。このように考えて解析したサブサイト構造が図²⁾である。以下, 糖質の特異的受容の分子機構をサブサイト構造に基づいて考えよう³⁾。



〈図〉 グルコアミラーゼのサブサイト構造 i はサブサイト番号, A_i はサブサイト親和力, $\blacktriangle$ は触媒基, これをまたいで結合した基質のグルコシド結合が水解される。G は基質のグルコース残基, $\square$ は基質マルトトリオースが触媒基をまたいで, 生産性 *miproduktive* 結合した様子を表わしている。

2. グルコース受容に関する分子識別

グルコース (G_1), マルトース (G_2), 及び遷移状態アナログ, グルコノラクトン (GLN) の結合をトリプトファン残基 (Trp) に由来する吸収及び蛍光を指標として調べたところ, G_1 は最も親和力の大きいサブサイト 2 (図で i が 2) に取り込まれ, また GLN はサブサイト 1 に G_2 はサブサイト 1 と 2 にまたがって結合し, サブサイト 1 には Trp 1 個が位置していて, GLN をわりと G_2 の結合に伴なって吸収, 蛍光が変化すると考えられる。しかし, GLN に類似の構造をもつマンノースラクトン (MLN) 及び各種グルコースアナログは, いずれもサブサイト 2 に取り込まれる。一方, 阻害実験からも, この結果は支持される。即ち, 阻害型式は, GLN が非抵抗型⁴⁾, MLN 及び各アナログが抵抗型を示すのである。以上の結果, サブサイト 1 は基質のグルコース残基を厳格に識別する, と考えられる。

3. 結合反応に関する速度論的研究: GLN と G_2 について, 結合反応をストップクロウ法で観測した結果, 速い 2 分子過程に遅い 1 分子過程が続く 2 段階機構で説明されることが判明した。 G_1 存在下での測定結果をも合わせて, 結合反応をサブサイト構造に基づき解釈すると, 基質 G_2 は, まずサブサイト 1—2 へ移ることになる。 G_1 のみではこのようなことはみられない。従って, サブサイト 1 は結合に関する 2 段階機構の違い 1 分子過程において, 基質となるグルコース残基を識別する, と考えられる。

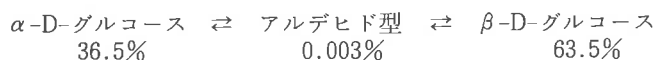
〔文献〕

- 1) Hiromi, K. et al (1983) Mol. Cell. Biochem. 51 : 79-95.
- 2) 廣海啓太郎 (1983) 化学と生物 21 : 116-122.
- 3) 大西正健 (1983) 化学と生物 21 : 502-511.
- 4) Royer, G. P. (1982) “酵素科学の基礎” (大西正健訳), ワイリー・ジャパン : 71

D-グルコースアルデヒド型の代謝酵素としての アルドースレダクターゼとその阻害剤

奥田 潤 (名城大・薬・臨床生化)

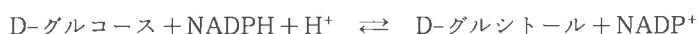
D-グルコースは体液、水溶液中では下記のごとく平衡状態となって存在している。



筆者らの研究で、体内では α -D-グルコースは主としてグルコキナーゼによって、 β -D-グルコースはヘキソキナーゼⅠ、Ⅱ、Ⅲ型によって代謝されることが明らかになっている¹⁾。しかし、アルデヒド型がどのような酵素で代謝されるかよくわかっていなかった。

筆者らは、牛水晶体から $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分画, DEAE Sephacel, Matrex gel red A, Sephadex G-75のクロマトにより比活性が12,600倍高く、電気泳動上はほぼ単一の酵素標品を得た。

本酵素は下記の反応を触媒する。本酵素反応が還元反応であることから、本酵素はD-グルコースのアルデヒド型に働くことが予想されたが、その反応機構を確めるために上記正逆反応について調べたところ、本酵素は α 、 β -D-グルコースには働かず、アルデヒド型にのみ反応することを証明した²⁾。したがって、D-グルコースの生化学は α 、 β -D-グルコースのみでなくアルデヒド型の生化学も含めて研究していく必要がある。



最近、糖尿病治療の進歩と共に、糖尿病患者の寿命が延びたが、その罹病期間の延長は糖性白内障および末梢神経症などの合併症を増加させる結果となった。これらの合併症は糖尿病時にこれらの組織に多量のグルシトールが蓄積することが原因で発生するといわれている。アルドースレダクターゼはこのD-グルシトールを生成する酵素であることから、本酵素を阻害すれば上記糖尿病性合併症の発生を防止するかあるいは進行を抑制することが出来るといわれている。筆者らは多くの化合物についてアルドースレダクターゼ阻害活性を調べたところ、LARI-1 (6, 3', 4'-Trihydroxy-5, 7, 8-trimethoxy flavone), LARI-4 (3', 4'-Dihydroxy-5, 6, 7, 8-tetramethoxy favone)³⁾が、 $10^{-7} \sim 10^{-8} \text{M}$ で、p-BrPSH(1- [(p-bromophenyl)-sulfonyl]) hydantoin⁴⁾が 10^{-7}M でつよくアルドースレダクターゼを阻害することを見出した。

p-BrPSHは50mg/kg/day投与で血糖低下作用も示し、有効な糖尿病合併症予防薬となる可能性がある。

References

- 1) Okuda, J., Miwa, I., Inagaki, K., Ueda, M., and Taketa, K., J. Biochem., **84**:993 (1978).
- 2) Inagaki, K., Miwa, I., and Okuda, J., Arch. Biochem. Biophys., **216**: 337 (1982).

- 3) Inagaki, K., Miwa, I., Yashiro, T., and Okuda, J., *Chem. Pharm. Bull.*, **30**: 3244 (1982).
- 4) Okuda, J., Miwa, I., Inagaki, K., Horie, T., and Nakayama, M., *Biochem. Pharmacol.*, **31**: 3807 (1982).

中枢性及び末梢性ブドウ糖センサーの生理学的機能

大村 裕 (九州大・医・生理)

生体のエネルギー源として必須な物質であるブドウ糖のレベルを維持するために、これをモニターする機構が存在することは殊に、Mayer & Marshall (*Nature*, 1956)が提唱している。事実、この機構のいくつかから、中枢から末梢レベルにおいて実証されている。

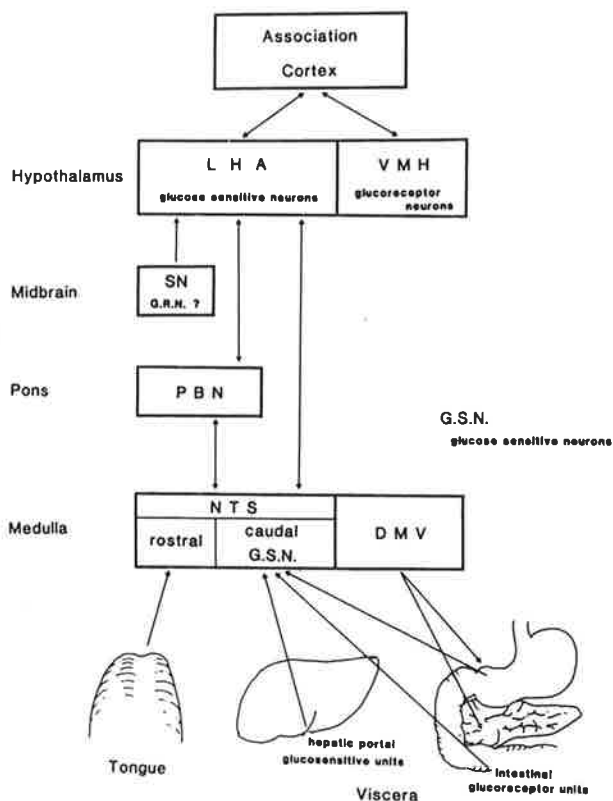
中枢神経系においては、摂食中枢である視床部外側野 (lateral hypothalamic area, LHA) および満腹中枢である腹内側核 (ventromedial hypothalamic nucleus, VMH) において、ブドウ糖の全身投与および多連微小電極法による電気泳動的投与によって、それぞれ約25%のニューロンがブドウ糖に応答性を示す特異的ニューロン群である。LHA ではブドウ糖投与で活動低下の起こるブドウ糖感受性ニューロン (glucose-sensitive neuron, GSニューロンと略記) が存在し、一方 VMH ではブドウ糖投与で活動高進の起こるブドウ糖受容ニューロン (glucoreceptor neuron, GRニューロンと略記) が存在し、それぞれ血中のホルモン、有機酸およびオピエートなどにも感受性を有する。一方、延髄の第4脳室に近接する部位にブドウ糖応答ニューロンの存在が示唆されている (1979, DiRocco ら; 1980, Kadekaro ら; 1981, Ritter ら)。延髄薄片標本を用い、孤束核 (nucleus tractus solitarius, NTS) のブドウ糖応答性を調べた。162個のNTSニューロンの約20%がGSニューロン、約7%がGRニューロンで、特にGSニューロンは内臓感覚の入力する尾側部に有意に存在した。GSニューロンは膜抵抗の変化が殆んどなく、2-DG で興奮することからLHAのGSニューロンと同じくNa-Kポンプの活弁化によるものと考えられ、GRニューロンは膜抵抗の増大を伴う脱分極が起こる。これらはシナプス遮断下でも応答性を示し、HRP色素注入により非応答ニューロンと区別される、特異なニューロン群と考えられる。

一方、末梢においては肝門脈領域にGSユニット (1969, 新島), および小腸のGRユニット (1978, Mei) が存在し、末梢のブドウ糖環境をモニタとしている。肝門脈のGSユニットからの情報はNTSへ入力 (1981, 足立) し、さらにLHAのGSニューロンへ集束する (1983, 清水ら)。

NTSのブドウ糖センサーは、迷走神経運動核、最後野および脊髄側角と連絡し、脳幹レベルで自律神経反射機構を介し、ブドウ糖、インスリンなどの調節にすばやく応答する。

一方、NTSからの情報はさらに上位のLHA, DMHのブドウ糖センサーへ送られ、ここでより統合された複雑な内分泌、代謝及び摂食行動調整が行なわれると考えられる (図1)。

Connections between viscera and brain



肝臓内脈系ブドウ糖感受性迷走神経活動に及ぼすD-グルコースの α と β アノマーの効果の差異について

新島 旭 (新潟大・医・生理)

ラット或いはモルモットの迷走神経肝臓枝にはグルコース感受性求心線維が存在する。肝臓枝の切断末梢側よりフィラメントを分離し求心線インパルスを記録，観察するとグルコース感受性求心線維が存在する場合には門脈内にグルコースを注入すると求心性神経活動の頻度が減少する。門脈内血糖値と求心性活動頻度の間には反比例的な関係が観察される。またD-グルコースを含めて，D-マンノース，D-ガラクトース，D-フルクトース，L-グルコースの投与効果を調べると，D-グルコースにおいてのみ求心性神経活動頻度の減少がみられた。すなわち，D-グルコースのみが求心性活動を抑制する。この抑制効果はウアペインの事前投与により遮断される。またグルコース代謝阻害剤である2-デオキシD-グルコース投与により求心性活動はかえって増強す

る。視床下部外側野に存在するグルコース感受性ニューロンと同様に肝臓グルコース感受性求心線維のD-グルコースによる抑制は求心線維内でのD-グルコース代謝により生産されるATPによるNaポンプ活動促進によると推測される。

摘出灌流肝臓標本で迷走神経肝臓枝から求心性インパルスを記録しつつD-グルコースの α あるいは β -アノマーを含んだリンゲル液（濃度300mg/dlおよび500mg/dl）で灌流すると、300mg/dlでは α より β -アノマーでより強い抑制が観察された。In vivo実験においても β -アノマーはより強く求心性活動を抑制した。また β -アノマーの抑制作用はウアベイン事前投与により遮断されるので、 β -アノマーが α より強い抑制効果を示すのは、グルコースセンサーより強い透過性を示すことによるものと思われる。 β -アノマーが α -アノマーより容易に細胞膜を通過することは神経細胞においても観察されている。

マウス膵 β 細胞のグルコース誘発活動電位とサイクリックAMPについて

坂本康二（福岡大・医・生理）

マウス膵 β 細胞のグルコース誘発活動電位はDean & Matthews (1968)らによって始めて記録され、しかもこの活動電位の発現はインシュリン分泌と何らかの関係があることが多くの研究者によって示されてきた。他方サイクリックAMPは、グルコース誘発インシュリン分泌は促進するが、本質的な役割は果していないとされている。しかし1mMのIBMXを低濃度のグルコース存在中で投与すると、比較的長く続く、単相性のインシュリン分泌の増大が程察されることより、サイクリックAMPも細胞内Caイオン制御にある程度関与しているという報告もある。

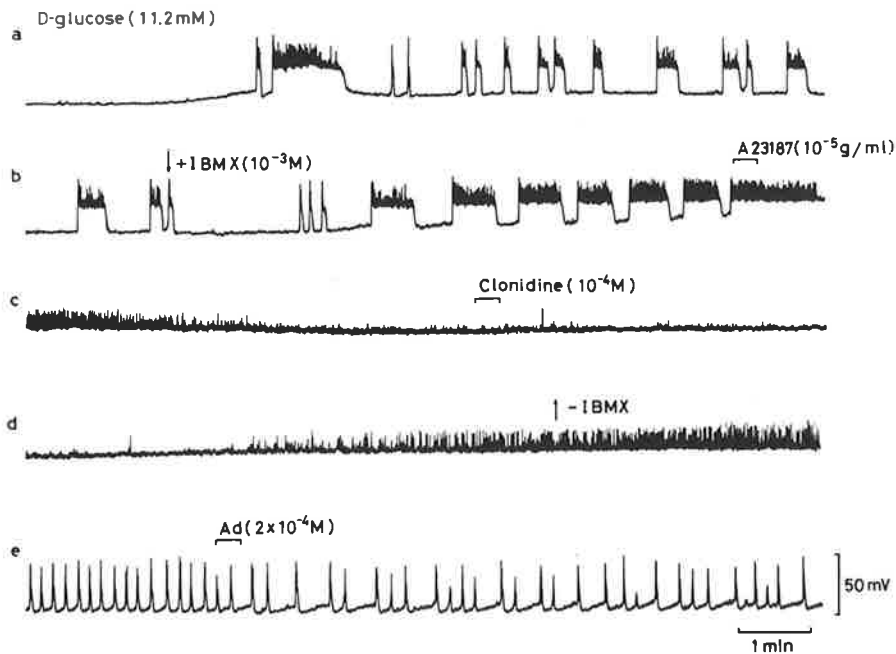
そこで本研究では、マウス膵臓を用いて、 β 細胞に微小電極を刺入して、グルコース誘発活動電位を記録し、特にburst typeの活動電位に対するquinidine, Theophylline, IBMX, clonidine, A23187, DNPなどの効果を検討した。

Burst typeの活動電位はグルコース濃度、11.2mMのときに良く発現する。このような活動電位を示す β 細胞にquinidine (0.1mM), IBMX (1mM)を投与すると、slow waveの持続時間が延長した後、膜が脱分極して、スパイク放電のみがみられる。一方Theophylline (3mM)投与では、初め膜の過分極とslow wave持続時間、および頻度の減少がみられるが、しかし10分後にTheophyllineを洗浄すると、slow wave持続時間の延長と、著明なスパイク放電がみられる。この傾向はIBMX投与の場合もみられた。このように細胞内c-AMP濃度を増加させるといわれている薬物投与の場合、活動電位の抑制と促進の2相性の反応がみられ、ひいてはインシュリン分泌にもこのような反応があると考えられる。

Quinidine投与でスパイク放電のみを示す細胞に、A23187 (10 μ g/ml), clonidine (10 $^{-5}$ M), DNP (10 $^{-4}$ M)などを一過性に与えると、いずれの場合にも膜の再分極とともにslow waveが再び現

われる。しかしこれらの現象は IBMX 投与の場合は観察されなかった。もし A23187, clonidine, DNP など細胞内 Ca 濃度を上昇させ, Ca-依存性 g_K を増大させて quinidine 誘発脱分極とスパイク放電を抑制するとすれば, Theophylline, IBMX による膜の脱分極とスパイク放電も同様に抑制されると考えられるが, 実際には抑制されない。このことは, c-AMP と細胞内 Ca イオンとは何らかの関係で結ばれていることを示唆する。

図は IBMX 誘発脱分極とスパイク放電に対する, A23187, clonidine の効果を示す。



ブドウ糖によるインスリン分泌における Ca^{2+} と cAMP の役割

仁木 厚 (愛知学院大・医・内科)

種々の刺激をインスリン分泌につなぐ細胞内メッセンジャーとして, Ca^{2+} と cAMP が取り上げられるが, 2つのメッセンジャーの相互の位置づけについては不明な点が多い。現在, もっとも広く受け入れられているのは, 細胞質 Ca^{2+} 濃度が分泌を規制する因子であり, cAMP は細胞内貯蔵 Ca を遊出させることにより細胞質 Ca^{2+} 濃度をたかめ, 分泌を増幅するとする見解である。しかしこの見解もなお決定的な知見に欠けている。この点を検討するため, グルコースによるインスリン分泌に対する各種阻害剤の影響を調べた。

カルモデュリンは膵島にも存在することが示され, その阻害剤であるトリフルオペラジンがインスリン分泌を阻害することも示された。日高らによって合成された W-7 は, 特異性がより高

く、細胞膜をよく通過し、細胞毒性も少ないことから、より優れたカルモデュリン阻害剤と考えられる。10mMグルコースによるインスリン分泌へのW-7の影響をみると、25 μ Mで有意に、50 μ Mではほぼ最高に近い分泌抑制を示した。一方W-7は膵島グルコース酸化やプロインスリン生合成には影響しない。しかしプロインスリンからインスリンへの転換を抑制する傾向がみられ、カルモデュリンが輸送小胞の移動に関与している可能性が示唆される。

フォルスコリンはアデニル酸シクラーゼの触媒側を活性化し、広汎な組織細胞でcAMPを非特異的に増加させる。膵島においても、0.1~100 μ Mで用量反応的にcAMP量を増加させるが、この作用はCa²⁺非依存性であり、また共存するグルコースの濃度には影響されない。灌流液を10mMグルコースで刺激すると2相性のインスリン分泌をみるが、これにフォルスコリンを重ねると両相の分泌ともに著明に増幅される。グルコース単独刺激では灌流液中にCaを加えないとインスリン分泌はみられないが、この条件下にフォルスコリンを添加すると明瞭な2相性分泌が出現する。Caを加えない灌流液中にも微量(約0.05mM)のCaを含有するので、これに0.2mM EGTAを加えると前記の分泌はまったくみられなくなる。これはcAMPの作用発現が、細胞内貯蔵Caのみでなく、たとえ微量であっても細胞外Ca²⁺を必要とすることを示唆する。

Ca非添加灌流液においてグルコースとcAMPにより形成されるインスリン分泌に対しては、カルモデュリン阻害剤であるW-7、貯蔵Caから細胞質へのCa²⁺流出を阻害するdantrolene、細胞質から貯蔵Caへの取り込みを阻害するthapsigarginのいずれも、有意の分泌阻害作用を示さない。これらの阻害物質の特異性、組織親和性などにはなお検討を要するが、以上の結果は、cAMPが貯蔵Caを動員して、細胞質Ca²⁺濃度をたかめることによりインスリン分泌を増幅するとの見解に対して、否定的な知見であると考えられる。

『蛋白質の物性から電気生理へ』

昭和58年12月22日～12月23日

- 挨拶 内蘭耕二所長
- はじめに 曾我美勝（岐大・医・2生理）
- フラビン蛋白とハロゲン・イオンの相互作用について
志賀 潔，二科安三，亘 弘（生理研）
- 血漿アルブミン分子の構造転移
曾我美勝，長岡俊治，恵良聖一，桑田一夫（岐大・医・2生理）
- 巨大分子酸素担体の構造と機能
今井清博・吉川信也^{*}（大阪大・医・生理，^{*}甲南大・理・生物）
- 膜流動性を介する膜蛋白活性の変調
志賀 健，前田信治（愛媛大・医・2生理）
- 生体中の Na^+ と ^{23}Na -NMR
西川弘恭（京府医大・1生理）
- 膜の LATERAL DIFFUSION と興奮
竹中敏文（横浜市大・医・1生理）
- 筋における Na^+ 依存性グルコース輸送とインシュリンの作用
北里 宏（滋賀医大・2生理）
- 受精卵における電気現象
宮崎俊一（自治医大・1生理）
- 培養海馬錐体細胞の GABA 感受性イオンチャンネル
小沢静司（自治医大・2生理）
- 蛋白合成を阻害した培養神経細胞における活動電位
福田 潤（東大・医1生理）
- 哺乳動物発達過程におけるイオンチャンネルの研究
吉田 繁（長崎大・医・2生理）
- 上皮小体膜電位における協同現象
広瀬智道，上坂伸宏，品川嘉也（日本医大・1生理）
- モノクローナル抗体の細胞間連絡への影響
菅野義信（広大・歯・口腔生理）
- 線虫 *C. Elegans* 神経系に対するモノクローナル抗体
岡本治正（東大・脳研・神経生物）

総合討論

(司会)

亘 弘 (生理研)

入沢 宏 (生理研)

フラビン蛋白とハロゲンイオンの相互作用について

志賀 潔・二科安三・亘 弘 (生理研)

FADを補酵素とするD-アミノ酸化酵素において、FADとアポ酵素との結合に与えるハロゲンイオン (F^- , Cl^- , Br^- , I^-) の影響を調べた。種々の濃度のハロゲンイオン存在下で酵素溶液中のトリプトファン残基の蛍光強度、FADの蛍光強度およびFADの蛍光偏光度の測定から次の結論を得た。 F^- はFADのアポタンパクへの結合を促進し、他のイオンは解離を促進する(その効果は $Cl^- < Br^- < I^-$ とカオトロピック系列の順になっている)。これは水の構造をつくる方向に作用し、疎水性相互作用を弱める他のハロゲンイオン (Cl^- , Br^- , I^-) がFAD-アポ酵素間にはたらく疎水性相互作用力に変化をもたらし、結合に影響した結果と考えられる。

またアポ酵素のトリプトファン残基の蛍光の I^- による消光実験から約半数のトリプトファン残基がタンパク表面に存在することが示唆された。

血漿アルブミン分子の構造転移

曾我美勝・長岡俊治・恵良聖一・桑田一夫 (岐大・医・生理)

ウシ血漿アルブミン (BPA), ウシメルカプトアルブミン (BMA, SH基を持つBPA分子のみ精製したもの) はN-F転移 (pH 3.75~4.50), N-B転移 (pH 7.0~9.0) なる構造転移を示す。単分子分散におけるN-F転移と、分子集団としてのN-F転移に、大きな差がある。水素イオンと結合していないN型 (N_0), F型 (F_0) の平衡は式(1)ようになる。N型, F型それぞれの水素イオン結合点が独立で、結合定数が $K_{H^+, N}$, $K_{H^+, F}$ の場合、式(2, 3)に対応した平衡定数、 K は式(4)ようになる。構造転移協同性の指標となるF型とN型の1分子当り

$$N_0 \rightleftharpoons F_0 \quad (1)$$

$$N\text{型}; N_0, N_1, N_2, \dots, N_i, \dots, N_m \quad (2)$$

$$F\text{型}; F_0, F_1, F_2, \dots, F_i, \dots, F_n \quad (3)$$

i ; BPA分子と結合した水素イオン数

$$K = (\sum F_i) / (\sum N_i) = K_0 (1 + K_{H^+, F} a_{H^+}) / (1 + K_{H^+, N} a_{H^+}) \quad (4)$$

$$\alpha \ln K / \alpha \ln a_{H^+} = \bar{\nu}_{H^+, N} - \bar{\nu}_{H^+, F} = \Delta \bar{\nu}_{H^+} \quad (5)$$

の結合水素イオンの差, $\Delta \bar{\nu}_{H^+}$ は式(5)のようになる。 $\Delta \bar{\nu}_{H^+}$ は0.10MKCl中で, $[\alpha]_{233}$, $[\theta]_{262}$, $[\theta]_{208}$, TRP 蛍光強度等の pH 依存性より求めた。比較的マイクロ不均一性の少ない活性炭脱脂 BPA の $\Delta \bar{\nu}_{H^+}$ は3~5である。分子集団としての性状が観察される3.0M KCl中における溶解度の pH 依存性より求めた $\Delta \bar{\nu}_{H^+}$ は, ミクロ不均一性の大きな BPA, 比較的少ないもの, ほとんどないもので, それぞれ5.5, 12, 21となる。

協同的構造転移を示す蛋白質分子が集団として構造的転移を示す際, 見掛け上, 非常に協同的構造転移を示す。サブユニットを持つイオンチャンネルの構造転移において, 上述の可能性があるだろう。

巨大分子酸素担体の構造と機能

今井清博・吉川信也^{*} (大阪大・医・生理,^{*}甲南大・理・生物)

脊椎動物ヘモグロビンに比べて, 大巾に研究が立ち遅れているが, アロステリック効果の解明にとって重要な, 無脊椎動物の巨大分子酸素担体の研究の一助として, Potamilla leptochaeta (ドロケヤリ) のクロロクルオリンの酸素結合特性を詳細に研究した。

他の種のクロロクルオリンと同様に, ドロケヤリ・クロロクルオリンは, 他の酸素担体に比べて, 異常に低い酸素親和性を示し, 強い協同効果 (Hill 係数=5.82) や Bohr 効果 (Bohr 係数=0.98) を示した。しかし, ドロケヤリ・クロロクルオリンの協同効果の強さは, pH や温度の条件に強く依存することが見い出され, 他の種のクロロクルオリンとは対照的であった。 Mg^{2+} や Ca^{2+} などの2価カチオンは, 低濃度でも, 著明に酸素親和性を上昇させることが, 初めて見い出され, アニオンが調節因子であるヘモグロビンとは対照的に, クロロクルオリンの生理機能は, 2価カチオンによって調節されることが示唆された。直線化した Monod-Wyman-Changeux の式に基づく解析法により, 今回得られた酸素結合データは, クロロオリン分子内の6個のヘムの間の相互作用で説明できることが明らかにされ, 電顕像に基づく分子模型との関連で, 結論の意義について検討した。

膜流動性を介する膜タンパク活性の変調

志賀 健・前田信治（愛媛大・医・生理）

膜タンパク活性は「膜流動性」が変れば変化するとよく言われている。ところが「膜流動性」は測定法によってその意味する内容が異っている。私達はスピンラベル法、すなわちもっぱら膜内脂肪酸スピンラベルの電子スピン共鳴吸収スペクトルの解釈を通じて赤血球膜の「膜流動性」の指標を得ているが、これがどの程度有効なものか実例をまとめて検討する。

1. 観測可能な現象は幾つかあるが、簡単かつ広く応用できるのは脂肪酸のアシル鎖運動をみる方法である。

2. スペクトル解析の手続きとしては、理論的シミュレーションに始まり、単純なパターン認識に至る3段階が区別できるが、変化が大きければ order parameter や相関時間をとれば十分である。

3. 材料調製は大きな問題で、細胞形態や代謝状態の変化に留意すべきである。また、ラベル分子の取り込みについても、定量化することが望ましい。赤血球では2種のサイトが区別できる。

4. 流動性変化の表現としては「体温附近で、ある操作により x °C 程度の変化」というのが直観的には判り易い。

5. この方法がどの程度敏感に状態を反映するか、典型例を示すと：① lipid の質的量的変化はよく反映され、膜内コレステロール量を2倍に増すとき温度約10°C程度の変化がある（膜はかたくなる）；②構造タンパク（スペクトリン）を約50%クロスリンクさせると膜の力学的性質は著しく変化するが、スピンラベル運動にはみるべき変化がない；③グルタルアルデヒド処理は膜脂質の状態を大きく変化させる。

6. 「膜流動性」変化による Na-K ATPase 活性変化は必ずしもパラレルではない：赤血球膜コレステロールを2倍増加させても活性低下は20%程度、逆にコレステロールを1/2に減少させるとき活性上昇は約50%程度であり、スピンラベルで観測したバルクの「膜流動性」はタンパク近傍の変化に対しどれ位敏感なのか多少問題がある。

生体中の $\text{Na}^+ - ^{23}\text{Na-NMR}$

西川弘恭（京都府立医大・生理）

$^{23}\text{Na-NMR}$ を生体組織に適用し、次の事項を検討した。

(1) $^{23}\text{Na-NMR}$ の定量性

生体中の Na^+ の ^{23}Na -NMR 信号強度が期待される強度の約40%であるといわれている。これが、生体中の Na^+ の核四重極相互作用によるのか、NMR 緩和が速いことによるのか、未解決である。グリセリン—水溶液中の Na^+ ではグリセリン濃度が増すにつれ、緩和は速くなり、かつ、検出される信号が減少した。一方、カエル筋中の Na^+ の T_2 -NMR 緩和時間は2成分 (2.4 msec, 31.1 msec) よりなり、sampling delay time = 0 での信号強度に対し、1 msec 後での遅い緩和成分の信号強度は39%であった。これらの事実、速い緩和成分は装置によるデータ収録開始までに大部分緩和し、信号強度は小さくなっていることを示している。したがって、生体内 Na^+ は sampling delay time = 0 に外挿することにより、全信号強度を得ることができる。

(2) Na^+ の存在状態

カエル筋中の Na^+ の存在状態を ^{23}Na -NMR 緩和時間により解析した。 T_2 緩和時間は2.4 msec, 31.1 msec, T_1 緩和時間は35.1 msec であった。これは動きを制約された Na^+ (2.4 msec 成分) と動きやすい Na^+ (31.1 msec 成分) の存在を示している。 Na^+ の動きを制約する因子として、negative charge をもった、タンパク質、膜脂質や細胞間のコラーゲンが考えられる。

(3) 水溶性シフト剤の適用

シフト剤 ($\text{Dy}(\text{PPPi})_2^-$) 添加メジウムにより、カエル筋および坐骨神経の細胞内外の Na^+ を示す ^{23}Na -NMR スペクトルを得た。細胞内外のスペクトル面積より、細胞内の Na^+ 濃度を算出し、筋で 3.9 mM/net weight kg, 神経で 22 mM/net weight kg を得た。

膜の LATERAL DIFFUSION と興奮

竹中敏文 (横浜市大・医・生理)

生体膜は、磷脂質とたん白質からなる。これらの物質は、膜内部を $1 \times 10^{-8} \sim 10^{-11} \text{cm}^2/\text{sec}$ の値で流動している。この流動性が膜の興奮と関係があるかどうかを調べる事を目的とした。神経膜の流動性、ことに Lateral diffusion は、Fluorescence Photobleaching Recovery method (FPR法、蛍光光退色回復法) をもちいて調べた。この方法は、膜の中に蛍光で標識した物質を入れ込み、蛍光強度を測りながら、その領域を強いレーザー光で退色させ、その後の回復曲線から拡散定数を計算する方法である。蛍光色素としては 5-octadecylthiocarbamoylamino fluorescein (F18) という炭素数18ケの脂肪酸に蛍光物質のついたものをもちいた。すなわち、培養後根神経細胞を F18 の 15 μM 溶液に10分間浸し、洗浄した。この細胞膜に488nmのレーザー光をあてて励起させ、520nmの波長の光を測定した。退色させる光は約1,000倍の強さの光をもちいた。可逆的に膜を非興奮状態にするために、2-decenoic acid をもちいた。この薬物は、神経膜の興奮現象を抑制する。特に Na^+ 電流を選択的に抑制する。実験としてコントロール、2-decenoic acid で繰り返し作用させると、 $0.26 \times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{sec}$ の値から、 $0.43 \sim 0.50 \times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{sec}$ の値に増加する。

また、興奮を抑制する脂肪酸では、コントロールの約40%も増加するが、同じ脂肪酸でも valeric acid のような興奮を抑制しない物質は拡散定数を殆んど増加させない。これらのことから興奮を抑制する物質は、膜の流動性を増大させ、その結果、直接あるいは間接的にNaチャンネルに影響を及ぼすと考えられる。

筋における Na^+ 依存性グルコース輸送とインシュリンの作用

北里 宏（滋賀医大・生理）

骨格筋における 3-O-メチルグルコース (3-O-MG) 取込みのうち細胞外から Na^+ を取去ることによって抑制される成分の大きさを細胞外 3-O-MG 濃度についてプロットすると、S字状曲線が得られ、1/2飽和度は約 13mM であった。これに対して、Na-free リンガー液において筋に取込まれる 3-O-MG の量は細胞外 3-O-MG 濃度に単純に比例した。また、糖・Na 共輸送を特異的に抑制することで知られている phloridin は 3-O-MG 取込みを細胞外から Na^+ を取除いたときのレベルにまで抑制し、しかも残っている 3-O-MG 取込みの大きさは細胞外 3-O-MG 濃度の上昇に比例して増大した。細胞外 Na^+ を取去ることによって抑制される成分が糖・Na 共輸送によるものであり。その糖結合部位が飽和する性質を持っていれば、細胞外のグルコース濃度を高めると、3-O-MG 取込みは Na-free リンガー中におけるレベルにまで抑制されるであろうと考えて実験を行った。実験の結果、 Na^+ 存在下で [^{14}C] 3-O-MG 取込みは、3-O-MG の各濃度において、細胞外グルコース濃度を充分高くすると Na-free リンガー中におけるレベルにまで抑制されることが確認された。

Na^+ に対する駆動力とグルコース取込みとの関係については次の通りである。正常リンガー中で筋にインシュリンを与えると、静止電位は 6~7mV 過分極方向へ移動し、それと共に [^{14}C] 3-O-MG 取込みは約20%増大した。正常筋にバリノマイシンを与えると、静止電位は4~5mV 過分極方向へ移動すると共に、[^{14}C] 3-O-MG 取込みも約10%増大した。更に、インシュリンを与えておき、これにバリノマイシンを与えると僅かな脱分極が認められ、[^{14}C] 3-O-MG 取込みも僅かに減少した。以上のことは、筋におけるグルコース取込みに Na^+ 依存性の部分があることを示している。

一方、細胞外K濃度を高くすると脱分極が起るが、この場合には予想に反して、[^{14}C] 3-O-MG 取込みの促進が認められた。このことは、筋におけるグルコース取込み促進に、 Na^+ に対する駆動力の増大によるもの以外の機構もあることを示唆している。

受精卵の電気現象

宮崎俊一（自治医大・生理）

受精時の卵では、受精電位とよばれる一過性の膜電位変化がおこる。この受精電位に関する興味ある問題は、1)それ自体が早い多精拒否機構の役割をはたすこと、2)受精電位の基にある細胞内 Ca^{2+} イオンの増加である。

1) ウニやヒトデ卵では、膜電位を $-5\sim 0\text{mV}$ よりプラスに保持すると精子が卵内に侵入できない。この膜電位依存性の精子侵入阻止機構は、受精のタイミングからみて、精子と卵の細胞膜の融合の時点でブロックされる可能性が強い。膜電位によって、融合に関連する膜蛋白の構造が変化するのか、或は膜の脂質の性状が変化するのかは、未だ不明である。

2) 哺乳動物のハムスター卵に於ける受精電位は、くり返しおこる一過性の過分極反応 (HR) から成る。個々の HR は、細胞内 Ca^{2+} によって activate される K conductance の増加による。従って周期的に起こる HR は細胞内 Ca^{2+} が周期的に増加することを反映するものと考えられる。HR の発生頻度は細胞外 Ca^{2+} 濃度に依存し、 Ca^{2+} 除去によって消失する。しかしながら、個々の HR の大きさや反転電位は、細胞外 Ca^{2+} $0.3\sim 12\text{mM}$ の変化に対してほとんど変化しない。他方、細胞内電極から Ca^{2+} を電気泳動的に注入すると過分極がおこり、ある注入量で急に大きな過分極が all-or-none 的に発生することから、細胞内 Ca 貯蔵系からの Ca-induced Ca release の機構が存在することが示唆された。受精時のハムスター卵では、精子との融合によって細胞膜の Ca 透過性が上昇し、細胞内に流入した Ca^{2+} は貯蔵系にとりこまれ、ある Ca 濃度で Ca^{2+} が細胞内に放出されると考えられる。増加した Ca^{2+} は、細胞内 Ca buffer 系及び細胞外排出系によって処理されるのであろう。これらの現象がくり返しおこることが、周期的な HR に反映されると考えられる。

培養海馬錐体細胞の GABA 感受性イオンチャンネル

小沢瀬司（自治医大・生理）

胎生17~19日目のラット胎児の海馬 (hippocampus) をとり出して分散培養を行うと、主として錐体細胞からなる単層培養標本を得ることができる。錐体細胞は培養後3日目でガンマアミノ酪酸 (GABA) に対して高い感受性をもち、GABA に反応して、 Cl^{-} イオンに対する形態膜の透過性を選択的に上昇させる。この GABA 感受性 Cl^{-} イオンチャンネルの微視的性質について、patch 電極法を用いて解析した。

1. Whole cell voltage clamp 法による結果

低濃度（2～3 μM ）の GABA 投与によって発生する定常状態の Cl イオン電流の雑音解析を行った。GABA 電流の平均と分散から effective single channel conductance を求めると、細胞内外の Cl イオン濃度が、それぞれ 150, 120mM のとき、19pS であった。また power density spectrum は単一のロレンツ曲線に適合せず、このイオンチャンネルの動態は一つの開状態と一つの閉状態を遷移するという、単純なモデルではとりあつかえないことが結論された。

2. outside-out patch clamp 法による結果

GABA 感受性単一イオンチャンネルに由来する電流を観察すると、意外にも、チャンネルの開状態は一つではなく、少くとも三つ以上の異なる大きさをもつ開状態の存在が示された。開状態の最大単一チャンネルコンダクタンスは、1 と同じ実験条件下で 29pS であり、その他の開状態のコンダクタンスは 9～19pS であった。1 の解析で求められた effective single channel conductance の値はこれらの複数の開状態の平均値を示すものと考えられる。

蛋白合成を阻害した培養神経細胞における活動電位

福田 潤（東京大・医・生理）

細胞膜に生ずる電気現象を引き起こす本体は、多くのものが膜中の蛋白分子の活動によるものであることが次第に明らかになってきている。たとえば神経や筋肉細胞の膜にみられる興奮あるいは活動電位は膜中の Na チャンネル、Ca チャンネルとして K チャンネル等の活動であり、これらのイオンチャンネルはおそらく蛋白質ないしは類似の生体高分子であることはほぼ間違いなからう。ではこれら蛋白分子あるいは生体高分子が細胞の中でどのようにして作られ、どのようにして膜にはこばれ活動をはじめようになるのであろうか？ 未だそれについてはあまり良く知られていない。この疑問を解きあかしていく方法の 1 つに、培養した神経細胞や筋肉細胞はまことに都合の良い実験材料である。すなわちこれらの細胞は人工的にコントロールされている環境で、他の細胞との相互干渉も少ない条件下で育っているので、種々な実験的に望ましい条件を作り出し得る。また、電気生理学的な研究手法も非常に容易に導入出来、精度の高い情報が得られるという利点がある。

本研究会では、培養神経細胞に蛋白合成阻害作用を持つ抗生物質を作用させて、それによって生ずる細胞膜の電気生理学的性質の変化を調べた結果を発表した。特に細胞膜の興奮性イオンチャンネルに重点をおき、神経細胞の Na スパイクの最大立ち上がり速度より膜中の Na チャンネルの数を推定した。神経細胞の核において DNA から mRNA の合成を阻害する α -amanitin を加えると、Na チャンネルの数は 4～6 日に後に減少した。また 3 種類の RNA 合成（tRNA, mRNA, rRNA）合成阻害を acitinomycin D, chromomycin A₃ で抑えると、Na チャンネルの減少は 2 日程度

の delcy をもってあらわれた。また tunicamycin によって蛋白の glycorilation を抑えると、1 日程度の delcy で Na チャネルの減少が観察された。これらのことを総合して考えると、Na チャネルは通常の糖蛋白のように、DNA から 3 種類の RNA, Ribosome における蛋白合成、そして Golgi 器管における糖化の経路をたどって合成されていると推定出来た。

〔文献〕

Fukuda, J., Kameyama, M. and Yamaguch, K. Nature, 294 : 82-85(1981).

Fukuda, J., Kasai, H. and Yamaguchi. XXVII InA. CCongress of Physiol, Sydney (1981).

哺乳動物発達過程におけるイオンチャネルの研究

吉田 繁（長崎大・医・生理）

哺乳動物細胞膜の興奮性に関与するイオンチャネルの性質が発達と共にどのように変化するかを、マウスの卵細胞と後根神経節細胞を実験材料として細胞内記録法により調べた。

卵細胞は、排卵前から16細胞期までのいずれの時期においても興奮性を示し、2種類の活動電位を発生した。A)二価イオン (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Mn^{2+}) 依存性活動電位。B)一価イオン (Na^+ , Li^+) 依存性活動電位。A)B)とも、inorganic Ca blockers (Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , La^{3+}) および organic Ca blocker (diltiazem) で抑制されたが、tetrodotoxin (TTX) には感受性を示さず、一価イオンと二価イオンの間には拮抗現象が見られたので、A)B) 両者共 Ca チャネルによると判定された。また、Ca チャネルの diltiazem に対する感受性は、卵細胞の分裂と共にわずかず上昇した。

後根神経節細胞の活動電位発生には Ca チャネルと Na チャネルが関与しており、胎児期から成熟期へと進むにつれ、Ca チャネルの割合が減少し、Na チャネルの割合が増大した。Ca チャネルはどの時期においても TTX 抵抗性であった。Na チャネルは、胎児期には TTX 抵抗性のものが大部分であったが、細胞の分化と共に TTX に感受性を示すものが増大した。

以上の実験結果を説明するために、仮説を提案したい。TTX抵抗性で二価イオンと一価イオンの両者に透過性を示す卵細胞の Ca チャネルは、個体発生および系統発生の両面から古いものと考えられる。この未分化な Ca チャネルを形成する遺伝子およびその発現を調節する遺伝子に変化を受け (gene mutation), これらの変形遺伝子から少しずつ性質の違う Ca および Na チャネルが出現するものと考えられる。

上皮小体膜電位における協同現象

広瀬智雄・上坂伸宏・品川嘉也（日本医大・生理）

上皮小体細胞はCaの調節機構を司るもので、その働きは血液中の微小なCa濃度の変化をキャッチしパラトルモンを放出する等のことによりCa濃度を一定に調節するものです。すなわち上皮小体は他の一般細胞に比べ、Caに関して何か特別な性質を持っているのであろうかと思われます。そこで、このCa特性を膜電位によって観察した。外液2.5mM Ca (Krebs液) 存在下でのマウス上皮小体の膜電位は -20mV であった。Caを減少させていくと2.0mM Ca付近より膜電位は急激に増大し、シグモイド変化となり、1.0mM Ca低濃度時に最大値 -60mV を示現した。一方高濃度Caでは膜電位の大きな変化はなかった。この膜電位変化は興奮性細胞と同じくKの平衡電位であった。他の2価イオンでは、SrがCaと非常に似た傾向を示し、シグモイド変化を表わす濃度がCaよりも1mM高濃度であった。Sr 1.8mM存在下でCaを変化させるとCaとSrとの間に同様のシグモイドとして示された。これらのHill定数はいずれも $n=20$ であることから、その関係はcompetitiveなもので解離定数のみが増加しているものと思われる。MgはCa、Srと異なり膜電位変化は緩やかなものであり、Mg単独のHill定数は $n=1.5$ である。Ca 1.3mM存在下でMgを変化させるとCaに似た傾向を示し、Hill定数も $n=8$ とCaに近づいてくるが、CaとMgではHill係数が大巾に異なりcooperativeが低いものと思われます。温度と膜電位の関係では、Arrheniusプロットより2.5mM Caのとき、3.3Kcal（変位点 23°C ）、1.0mM Caで5.6Kcal（同 27°C ）であり、低Ca濃度下でKチャンネルを開かせるには、2.3Kcal余分にエネルギーが必要となる計算である。また変位点が変わるということは膜の状態が変わったためと思われます。

蛋白質の物性から電気生理へ

14：モノクローナル抗体の細胞間連絡への影響

菅野義信（広大・歯・口腔生理）・竹市雅俊（京大・理・生物物理）

一般に培養細胞では、石垣状に細胞同士が密に接触して増殖する上皮様細胞より、細胞が長い突起を出し、突起を先端で細胞同士接触はしているが、細胞間隙が至る所に見られる線維芽細胞の方が電氣的細胞間結合比が大きい。培養上皮細胞は精度の高い測定によってのみ細胞間連絡が証明されるので、簡単な測定のみを行って培養上皮細胞には細胞間連絡が無いという意見さえあった。

腫瘍プロモーターの一種 TPA は F L 培養上皮細胞の顕微鏡観察による形態を線維芽細胞状へと変化させるが、細胞間連絡を可逆的に離断する。一方、接維芽細胞の中には TPA に感受性の無いものも少ない。細胞の形態上考えられる接着状況と細胞間連絡の関係は必ずしも単純ではない。

モノクローナル抗体 ECCD-1 はテラトカルチノーマ PCC3 培養細胞の Ca 依存性細胞接着系に作用し、細胞接着を妨害する。ある一定の大きさに増殖した PCC3 細胞のコロニーに対しては上皮様形態を接維芽細胞に近い形態へと変化させる。モノクローナル抗体の細胞間連絡への影響を細胞内に注入した蛍光色素 Lucifer Yellow CH の細胞から細胞への拡散移動を指標に調べた。

顕微鏡下に据いた細胞に 0 から 70 分までの間にはほぼ等時間間隔で 29 例注入した蛍光色素は平均 6.9 ± 0.5 個の接触細胞に移動する。一方 ECCD-1 を添加した例では 0 から 20 分までの 14 例で 4.2 ± 0.9 と減じ、20 分から 100 分の形態変化しない 19 例では 4.4 ± 0.6 であるが、形態変化を伴う 36 例では 0.9 ± 0.2 と著明に減少した。腫瘍プロモーターの例と同様、形態は線維芽細胞様に変化し、変化した例に著明な細胞間連絡の離断が生じた。Ca 依存性接着が阻害されると、ほぼ同時に細胞間連絡の保持が困難になることが、蛍光色素の移動で実際に明らかになった。又細胞の形態によって細胞間連絡の有無や程度を類推することは不可能であることも確定した。

線虫 *C. elegans* 神経系に対するモノクローナル抗体

岡本治正（東京大・医・脳研）

近年モノクローナル抗体を用いて、各種ニューロンをタイプ別に固定する事が様々な実験動物神経系において可能となって来た。これらの研究の窮極の目的の一つは、複雑な神経回路結合の発生分化、及びその最終的な出力即ち動物行動の問題を細胞さらに分子レベルで解明する事にあると考えられる。

神経細胞がわずか 302 しか存在せず、しかし一方で多彩な行動パターンを有する線虫 *C. elegans* もこうした問題を扱うのに適当な実験動物であると思われる。最近この *C. elegans* 神経系 of 全構造（シナプス、電気結合の全てを固定）が電子顕微鏡連続切片より明らかにされ（J. White et al.），又多数の行動異常変異株が単離されてその遺伝学的な解析も進められている。そこでこれら変異株神経系における細胞構築レベルでの異常を迅速に検索する事を当面の目的として、*C. elegans* 神経系に親和性を有するモノクローナル抗体を調整し、その免疫組織化学的特異性（特に神経細胞タイプに対する特異性）を光学顕微鏡下、又は金コロイド／二次抗体複合体を用いて電子顕微鏡下に解析したので報告する。

『生理学における数学的方法』

昭和59年2月10日～2月11日

相関分析による非線形システムの構造決定および同定

陳 海文, 石井直宏 (名工大)

Replicon cluster 複製速度の経時的变化に関する数学的モデル

高橋 学 (山口大・医)

網膜L型水平細胞の空間機構

臼井支郎, 江角浩二, 池野英利 (豊橋技大)

八木哲也, 御手洗玄洋 (名大環研)

細胞性粘菌の分化比の調節とパターン形成モデル

小渕洋一 (京大・理)

興奮性と抑制性の混合入力の超汎関数

伊藤嘉房 (名大・医短)

双線型系について

安井湘三 (基生研)

生物の行動にあらわれる Random evolution equations

飛田武幸 (名大・理)

久保モデルによる非線形解析

安藤祐一郎 (基生研)

桜永昌徳 (日医大), 中 研一 (基生研)

Hodgikin-Huxley 式における活動電位の温度依存性

吉田秀也 (大阪医大)

パワー連結過程の回路網表現

今井雄介 (大阪医大)

一次元 Poisson 方程式の爆発解

品川嘉也 (日本医大)

電子スピン共鳴のベクトル的な考え方

亘 弘 (生理研), 下山雄平 (北教大)

動的物体の認識—その数理的基礎

甘利俊一, 丸山稔 (東大・工)

生体高分子のコンフォメーション解析に水の効果を取り入れる新しい方法

磯貝芳徳 (京府医大), 西川 健, 大井龍夫 (東大化研)

生理学と数学的方法

磯本昭夫 (大阪大・医)

生理学は複雑な構造と結びついた物理化学的現象—生理現象を解析的に研究するため、最近まで、現実的で数学的にも興味あるモデルを組立てたり現象をあてはめたりすることが比較的困難であったが、最近超微小構造やそのはたらきの解明がすすみ、数理科学の広範な進歩と相まって、数学的にも深く、高度かつ多様な手法が必要とされるようになり、研究が急速に進んでいる。生理学研究所に有効にもちいられるというに止まらず、生理学そのもののスタイルをかえつつある、また臨床医学にも影響を及ぼしている。このような見地から研究会が開催された。

相関分析による非線形システムの構造決定および同定

陳 海文, 石井直宏 (名古屋工業大)

1. はじめに

入力と出力の相互関係によって、ブラックボックスとする非線形システムの構造決定の方法は生物システムの研究に役立つ。まず、本文で検討された線形モデルおよびN, W, HとGの各非線形モデルを対象として、周波数領域および時間領域での非線形システムの構造の判別式を導きだしてきた。時間領域での判別式を具体的な計算方法として、非線形システムの構造は容易に判別できる。次に、数学的帰納法より、S—モデルという非線形の構造をもつ必要条件を新たに導き出した。シミュレーションを行ない、この方法論が正しいことを検証した。最後に、各種のフィードバック非線形システムの構造をもつ必要条件を新たに求めてきた。さらに、構造を決定してから、フィードバック非線形システムの線形素子のインパルス応答および非線形素子のパラメータの推定方法も示した。

2. G—モデル (General model) の構造決定

$$\left[\sum_{i=0}^{N-1} \phi_{yxx}(i, \tau) \right] / \phi_{yx}(\tau) = \text{const.} \quad (1)$$

式(1)はG—モデルの構造の判別式である。 $\phi_{yxx}(\tau_1, \tau_2)$, $\phi_{yx}(\tau)$ はこのシステムの入力と出力の二次および一次相互相関関数である。

3. W-モデル (Wiener model) の構造決定

$$\phi_{yxx}(\tau_1, \tau_2) / \phi_{yx}(\tau_1) \phi_{yx}(\tau_2) = \text{const.} \quad (2)$$

$\tau_1 = \tau_2 = \tau$ とすると

$$\phi_{yxx}(\tau, \tau) / \phi^2_{yx}(\tau) = \text{const.} \quad (3)$$

式(2), (3)はW-モデルの構造の判別式である。

4. H-モデル (Hammerstein model) の構造決定

$$\phi_{yxx}(\tau, \tau) / \phi_{yx}(\tau) = \text{const.} \quad (4)$$

式(4)はH-モデルの構造の判別式である。すなわち、H-モデルの場合、二次の相関関数の対角線が一次の相関関数と比例している。

5. S-モデル (Super model) の構造決定

$$\left[\sum_{i=0}^{N-1} K_{v2}(i, \tau) \right] / K_{v1}(\tau) = \text{const.} \quad (5)$$

S-モデルとは n 個 ($1 < n < \infty$) の非線形素子と $n+1$ 個の線形素子が交互に直列に接続しているシステムである。式(5)はS-モデルの構造をもつ必要条件である。 $K_{v2}(\tau_1, \tau_2)$, $K_{v1}(\tau)$ はこのシステムの二次および一次のボルテラ核である。

6. シミュレーションの結果

図1でシミュレーションの結果を示している。図1により、WとH-モデルがG-モデルの特例であることがわかる。すなわち、WとH-モデルもG-モデルの判別式を満す。

7. フィードバック非線形システムの構造決定および同定

$$\left. \begin{aligned} K_{R1}(\omega) &= K_{A1}(\omega) / [1 + K_{A1}(\omega)] \\ K_{R2}(\omega_1, \omega_2) &= \frac{K_{A2}(\omega_1, \omega_2)}{[1 + K_{A1}(\omega_1)][1 + K_{A1}(\omega_2)][1 + K_{A1}(\omega_1 + \omega_2)]} \end{aligned} \right\} \quad (6)$$

式(6)は単位フィードバック非線形システムのボルテラ核の周波数領域での関係式で、 $K_{R1}(\omega)$, $K_{R2}(\omega_1, \omega_2)$ が閉ループの一次と二次のボルテラ核で、 $K_{A1}(\omega)$, $K_{A2}(\omega_1, \omega_2)$ が開ループの一次と二次のボルテラ核である。この式によって、開ループのボルテラ核の関係式が得られる。

$$\left. \begin{aligned} K_{A1}(\omega) &= K_{R1}(\omega) / [1 - K_{R1}(\omega)] \\ K_{A2}(\omega_1, \omega_2) &= K_{R2}(\omega_1, \omega_2) / \{ [1 - K_{R1}(\omega_1)][1 - K_{R1}(\omega_2)][1 - K_{R1}(\omega_1 + \omega_2)] \} \end{aligned} \right\} \quad (7)$$

故に、開ループの構造がG, W, HおよびS-モデルであれば、前に検討した方法と同様に、式(7)によって、このフィードバックシステムの構造決定ができる。式(7)の閉ループのボルテラ核 $K_{R1}(\omega)$, $K_{R2}(\omega_1, \omega_2)$ が入出力の関係から測定できる。構造を決定してから、開ループがH, W, G-モデルである場合、式(7)によって、このシステムの線形素子のインパルス応答の同定および非線形素子のパラメータの推定ができる。

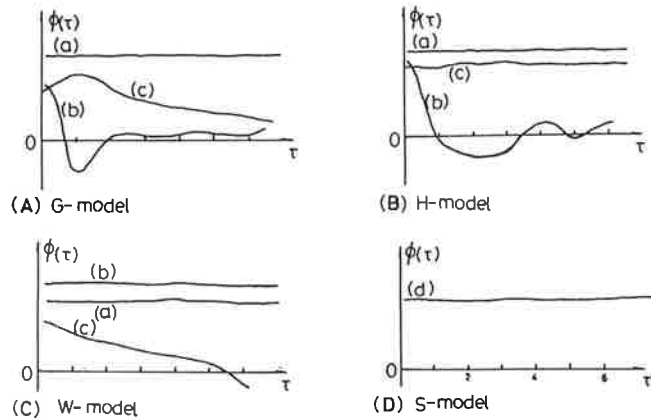


図1. シミュレーションの結果

- (a)の曲線: $\phi(\tau) = \left[\sum_{i=0}^{N-1} \phi_{yx}(i, \tau) \right] / \phi_{yx}(\tau)$;
 (b)の曲線: $\phi(\tau) = \phi_{yx}(1, \tau) / [\phi_{yx}(1) \phi_{yx}(\tau)]$;
 (c)の曲線: $\phi(\tau) = \phi_{yx}(\tau, \tau) / \phi_{yx}(\tau)$;
 (d)の曲線: $\phi(\tau) = \left[\sum_{i=0}^{N-1} K_{v2}(i, \tau) \right] / K_{v1}(\tau)$;

Replicon Cluster 複製過程の Simulation Model

高橋 学 (山口大・医・病理)

〔はじめに〕

DNA複製速度に関しては、fiber autoradiographyによる「分子レベルの研究」と、最近ではflow cytometryによる「細胞レベルの研究」とがある。本研究は、分子論的仮定に基づいて、S期におけるDNA合成仮定をsimulateし、両者を関連づけようとするものである。

〔Replication Model〕

Fork progressionの速度は約 $1 \mu/\text{min}/\text{fork}$ であるから、「DNA合成速度」の問題は「Forkの数」の問題に転換される。しかも、forkの数（またはbubbleの数）は、新しいinitiationにより増加し、隣接するbubbleの融合により減少する。

Initiation timeの分布 Initiationは逐次起るものとする。若し、全てのinitiation sitesが一斉に開くものとすれば、fork progression rateとorigin-to-origin distanceから計算されるS期の長さは非常に短いものとなるからである。また、initiationは時間的にrandomと仮定する。これは、replication enzymeとinitiation siteとの邂逅がrandomであると想定することと等価である。

Initiation sitesの分布 Initiation sitesはrandomに分布していると仮定する。それにより、origin-to-origin distanceは指数分布することとなり、実験データに近いものとなる。initiation siteがnucleotide sequenceにより予め決っていても、この仮定と矛盾しない。

Replicon cluster DNAはclusterに分れており、各clusterにはtriggering sitesがあるとする。第一のclusterのtriggering sitesが複製されると、第一cluster全体の複製は完了してなくても、第二のclusterへのarrivalが始まるとする。第三、第四のclusterについても同じと仮定する。

〔Simulation〕

Discrete segment and discrete time 一本のDNAを長さ 1μ のsegmentに分割し、時間も1分単位に分割する。そして、computerのmemoryに各segmentに対応する柁（配列）を設け、そのsegmentが複製される時間（S期の始まりからの時間）を記入してゆく。

Random arrival on random sites Initiationという事象がDNA fiber上に降り注ぐものとし、その現象をarrivalと呼ぶ。但し、複製終了部へのarrivalは無効（不発に終る）とする。

Replication tableの作成 Step 0: 時間=0とし、一様乱数を発生させて最初のinitiation siteを（第1 clusterの中に）定め、そのsiteに対応する柁に、その時間（即ち0）を記入する。それから、指数乱数を発生させarrival time intervalを決める。これは第二のarrivalの起る時間を決めるためである。仮に、それが3であると、それに続く2つの時間単位（即ち、時間=1と時間=2）においては、initiation siteを決める必要はない。だから、step 1の操作に移る。但し、time intervalを決める乱数が0であったなら、時間を進行させないまま、新しいinitiation siteを決めなければならない。

Step 1: 時間=0が記入されている柁の両横の柁に1を記入する。

Step 2: 時間=1が記入されている柁の両横の柁に2を記入する。

Step 3: 時間=3となる。これはStep 0で決めたように、第二のarrivalが起る時間である。だから、ここで第二のinitiation siteを決める操作に移る。これは時間が3だけ進んでいる以外はStep 0におけると同じ操作である。

この操作を反復していると、やがて第一のclusterのtriggering sitesの複製が完了するときが来る。そのとき、第二のclusterにおける複製開始のためのtriggeringが起るわけで、arrival可能な領域を第二clusterの範囲にまで拡張する。

複製の進行に伴い、不発のarrivalが増え、またbubbleの融合も起って、bubbleの増加速度は低下する。しかし、triggeringが起れば、initiationの成功率が上昇する。全ての柁に数字が入った時、複製のsimulationは終る。このデータをreplication tableと呼び、次のようにDNA複製仮定の解析に使う。

〔DNA合成速度の計算〕

S期時間とDNA合成速度 時間 i （S期開始 i 分目）におけるDNA合成速度を求めるには、整数 i の記入されている「柁の数」をカウントすれば良い。以下に示すデータは、DNA=1000 0μ , mean arrival/min = 1としてシミュレートしたものである。

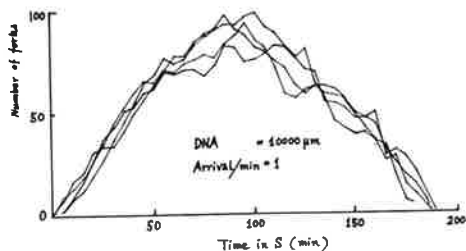


図 1. Cluster = 1

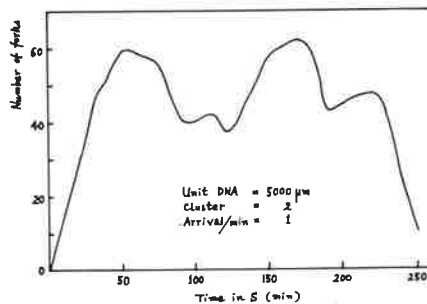


図 2. Cluster = 2

DNA量とDNA合成速度 i 分以内に複製されたDNAの量 $n(i)$ は、「 i 以下の数を入れた枡」の数に等しい。そのことより、S期時間 i とその時のDNA量 $n(i)$ の関係が求められるから、先に求めた「S期時間とDNA合成速度の関係」を「DNA合成速度の関係」に書き変えることが出来る（図3と図4）。

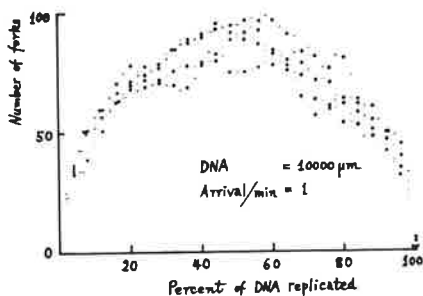


図 3.

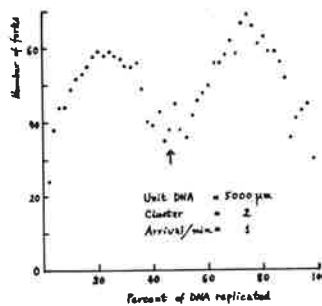


図 4.

[Bubble Size Distribution の分布]

前述の複製テーブルを用い、origin-to-origin distanceの分布とbubble sizeの分布も計算出来る（図5と図6）。結果は、fiber autoradiographyのデータに良く類似していることが判る。

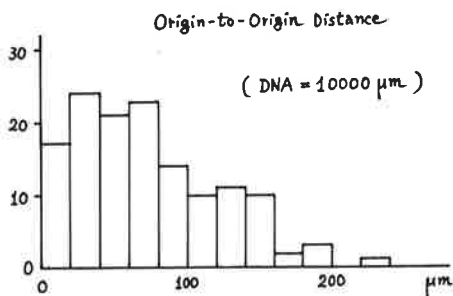


図 5.

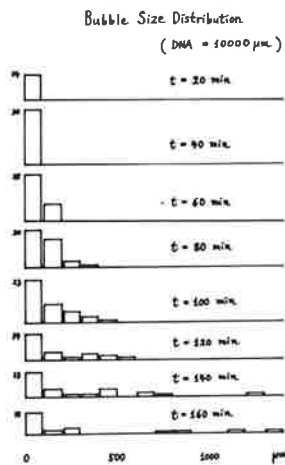


図 6.

〔まとめ〕

このReplication modelによるMonte Carlo simulationの結果は、実験データと定性的に一致している。今後、modelをrealisticな形で動かすには、super-computerの利用を考えなければならないし、見透しを良くするために、数学的な取扱い（特に、queue theoryの応用）が重要と考えられる。

網膜L型水平細胞層の空間特性

臼井支郎，江角浩二，池野英利（豊橋技科大），
八木哲也，御手洗玄洋（名大環研）

はじめに 細胞は、単なる光受容器としてでなく、外界の膨大な情報から視覚中枢で必要とされる情報を抽出、前処理を行なう3次元回路網と考えられる。その中で水平細胞は、視細胞からの信号を空間的に平滑にすること、その信号を選択的に視細胞ヘフィード・バックすることによって、複雑な空間対比信号・色対立信号を生成するといった重要な役割を果たしていると考えられている。また、図1に示すように空間分布は、すそ広がり特性を示している。

本稿では、その機構を探るべく、これまでに提案されている2次元線形モデルについて検討・考察を加え、さらに今後の方向について述べる。

(1) Marmarelis & Naka (1972) モデル⁽¹⁾ このモデルは低抵抗な細胞内液が比較的高抵抗な細胞膜で包まれている個々の水平細胞どうしが低抵抗なgap junctionによって2次元的に結合していることに注目し、無限に広がる2枚の高抵抗な薄膜が低抵抗な媒体をはさみ込んだサンドイッチ構造である。光刺激として、スポット光を用い、その影響は、円状電流の注入により記述している。従って、電流分布は、中心からの距離と深さの関数となっている。解析には層内でのラプラス方程式を立て、薄膜内外での電流密度の連続性という境界条件のもとで解を得ている。

このモデルで電位の空間分布は、実際の水平細胞層でのそれと同じように、すそ広がり特性をうまく表現している。しかし、スポット半径の大きさに対する中心応答については、その半径が小さい時、実際の応答と大きく異なっている。我々は、この解の導出過程をもう一度確かめてみたところ、近似法に問題があることがわかった。すなわち、この解はスポット光が小さい場合のみ成り立つものである。

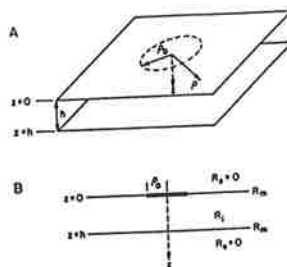
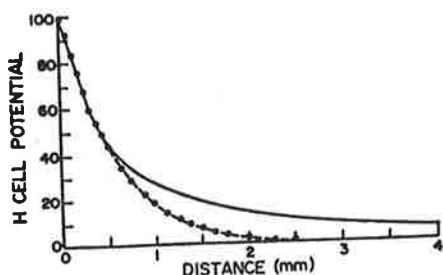
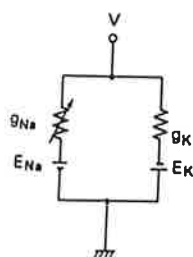


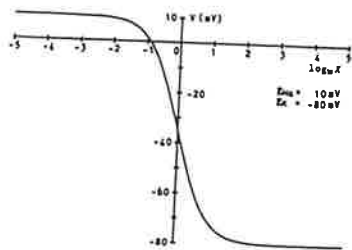
図 1. 水平細胞層の空間電位分布。⁽¹⁾ 図 2. Marmarelis & Naka のモデルとその解。

(2) T. D. LAMB (1976) モデル⁽²⁾ 水平細胞層をシート抵抗と漏れ抵抗から成る一枚の導電板と考え、光刺激の影響を漏れ抵抗に直列に入る駆動電源で表現し、その空間電位分布の解析解を得ている。これによると、スリット光に対しては光の当たっていない部分で、電位は指数関数的に減衰し、スポット光に対しては、 K_0 で減衰していくことがわかる。弱いフラッシュ光に対する応答から刺激位置近傍での λ ($=R_m/R_s$) を推定しているが、光の強度を大きくした時、空間的な減衰の傾きがゆるやかになることは表現できない。これに対し、LAMB は、 R_m の増加か、散乱光の影響が考えられると述べているが明確でない。

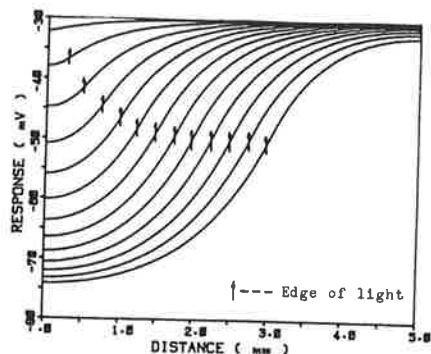
(3) 2次元離散モデル 我々は、より生理学的な立場から、図4(a)のように、 g_{Na} と g_K が並列に結合した水平細胞の膜モデルを考えた。ここで、 g_K 、 g_{Na} はそれぞれ、 K^+ 、 Na^+ イオンに対する膜の透過性を示し、 E_K 、 E_{Na} は、膜内外のイオン濃度差によって生じる起電力で、光刺激の影響は g_{Na} の減少を引き起こすと考えた。このモデルで1個の水平細胞の膜電位は、 g_{Na} の変化に伴い、 E_{Na} と E_K 間を図4(b)のように非線形に変化する。これを平衡電位付近で線形近似し、1対の起電力と抵抗で表現したものがLAMBのモデルに相当する。図4(c)は本モデルで光強度一定の下で、スリット巾を変化させた時の空間電位分布の一例である。スリット巾の増加に伴い、中心の応答が増加していく様子がわかる。しかし、膜抵抗の変化を考えても、すそ広がり表現できない。また、散乱光の影響を考えるには、あまりに離れすぎている。



(a) 膜モデル



(b) g_{Na} の変化に対する V の変化



(c) 種々なスリット幅に対する電位分布

図4. 離散膜モデル

まとめ すそ広がり特性に対する残る可能性として、水平細胞—視細胞間の干渉、gap-junctionの特性などが考えられる。現在、我々は、gap-junctionに電位依存の非線形を導入し、このような空間分布特性と動的応答波形の両面から検討を進めている。⁽³⁾

〔文献〕

- 1) P. Z. Marmarelis & K. I. Naka : "SPATIAL DISTRIBUTION OF POTENTIAL IN A FLAT CELL", Biophysical (1972), Vol 12, 1515-1532
- 2) T. D. LAMB : "SPATIAL PROPERTIES OF HORIZONTAL CELL RESPONSES IN THE TURTLE RETINA", J. physiol. (1976), 263, 239-2555
- 3) 臼井, 猿山, 八木, 榊原, 高林, 御手洗 : "網膜L型水平細胞の非線形時空間メカニズム", 信学技報, MBE 82-80

本研究の一部は昭和58年度文部省・科研費一般研究(C) (代表 臼井) の下で行なったものである。

細胞性粘菌の分化比の調節とパターン形成モデル

小淵洋一 (京都大・理・生物物理)

1 はじめに 細胞性粘菌(ここでは主として Dictyostelium discoideum を念頭においている)が生長期, 中間期, 集合期を経て多細胞体を形成し移動期に入る頃には, 大別して2種類の細胞(予定柄(T), 予定胞子(P))が存在する。T細胞は移動体の前部にあって全体の20%程度を占め将来‘柄細胞’になり, P細胞は後部にあり将来‘胞子’になるのであるが, 後部のP細胞の領域にT細胞と区別のつけ難い細胞が10%程度混在している。これらの細胞がT細胞と全く同じものであるか否かについては議論のあるところであるが, 区別するため前部様(A)細胞と呼ぶ。細胞性粘菌が分化を研究する上で好材料と考えられている理由として, 上記の移動期におい

て細胞の増殖がみられず、細胞の種類が2～3で体制が簡明であり、かつその細胞数比やパターンがよく調節されていること等があげられる。ここでは簡単なモデルでこれらの調節やパターン形成の過程を説明する。

2 細胞数比の調節 まず、2状態をとり得る細胞集団を含むシステムにおける細胞数比の調節の問題を少し一般的に考えてみよう。調節機構として(a)細胞相互の位置関係が調節の過程に意味を持つ場合と(b)個々の細胞の相互位置に無関係に調節が行なわれる場合に大別できる。前者はさらに細分され(a-1)システム内の細胞の相対的な位置の情報によって状態が規定される場合(例: Wolpertの位置情報)と(a-2)ある細胞が特定の状態になった結果その影響が周辺に伝わりその状態変化を規定する場合(例: Gierer-MeinhardtのActivator-Inhibitorモデル)等が考えられる。さて(b)の場合は近接する細胞間の相互作用が直接に調節機構に係わっていないのであるから、システム全体を共通的に支配するもの(パラメータ)を予想しなければならない。(例: 梅田-梯-寺本のCommunityモデル)これは例えば細胞の状態によって異なる生産性を示し、システム内に急速に拡散する物質を考えればよい。このようにシステム全体に共通のある量によって状態変化を制御していると考え、細胞間に感受性等の何らかの個性の違いがあるとしないと安定した比の調節は困難である。ここでは粘菌への応用を考慮して(b)の場合を具体的に考える。

3 生成-拡散系による細胞数比の調節 $\{0, 1\}$ いずれかの状態をとり得る n 個の細胞からなるシステムを考える。各細胞 C_i ($i = 1, 2, \dots, n$) は物質 X を生成する能力を持っており、状態1になった時にのみ A_i の割合で生成を行うとする。 X は各細胞内でその濃度に比例して一定の割合 D で減少し、細胞外に一定の係数 ν で拡散する。細胞集団を含むシステムは閉じており、細胞外の X の濃度は一様になっているとする。 X の細胞 C_i 内、及び細胞外の濃度を x_i, x_e とすると、以上の仮定より次式が得られる。

$$\begin{cases} dx_i/dt = S(C_i) A_i - D x_i + \nu (x_e - x_i) & (i = 1, 2, \dots, n) \\ dx_e/dt = \nu E \sum_{i=1}^n (x_i - x_e) \end{cases}$$

ここに $S(C_i)$ は細胞 C_i の状態で0または1となる。この方程式系は次のような唯一の平衡状態 x_i^*, x_e^* を持つ。

$$x_i^* = \frac{S(C_i) A_i + \nu x_e^*}{\nu + D}, \quad x_e^* = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i^* = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{S(C_i) A_i}{D}$$

1状態の細胞数を n_1 , $n_1/n = \alpha$, 1状態の細胞の A_i の平均値を $A_{(1)}$ とすると

$$x_i^* = \frac{S(C_i) A_i D + \alpha \nu A_{(1)}}{D(\nu + D)}, \quad x_e^* = \alpha \frac{A_{(1)}}{D}$$

細胞 C_i は一般に $A_{(1)}$ の値を知り得ないが、近似的にそれを A_i と考えると α を推定することができる。従って今 α を目標とする細胞数比だとすると、状態遷移は次のように行なえばよい。

$$S(C_i) = 1 \text{ で } x_i^* > \frac{D + \alpha \nu}{D(\nu + D)} A_i \text{ なら } S(C_i) \text{ を } 0 \text{ にする。}$$

$$S(C_i) = 0 \text{ で } x_i^* < \frac{\alpha \nu}{D(\nu + D)} A_i \text{ なら } S(C_i) \text{ を } 1 \text{ にする。}$$

ある時刻に状態遷移を行なう細胞は高々一つであるとし、上記の不等式の差の最大のものが変化すると仮定する。これによって基本的に任意の初期状態の組合せから出発しても1状態の細胞の割合が α に調節される。

4 粘菌の状態遷移とパターン形成モデル ここではディクチオ型粘菌の3つの細胞状態—予定柄(T), 予定胞子(P), 前部様(A)を区別して考え、それらの間の遷移を $T \rightleftharpoons A \rightleftharpoons P$ とし、二種類の物質X, Yによって状態遷移が制御されていると仮定する。 (S_x, S_y) によってX, Yを生成するか否かの状態を表示し、 $T=(0,1)$, $A=(0,0)$, $P=(1,0)$ とすると、Xが $A \rightleftharpoons P$ の遷移を、Yが $T \rightleftharpoons A$ の遷移を規定することになる。Xに関する1状態の目標値を $\alpha=0.7$, Yに関する1状態の目標値を $\beta=0.2$ とすると、細胞数比は所期の通り調節されるはずである。さて、粘菌は集合期から移動期にかけて各細胞の運動速度の違いによって速いものが前に、遅いものが後部に位置するようになる。ここではこの運動速度が基本的にはY生成能力の大小に対応し、細胞がTになることによって一層速度は早くなると仮定する。即ち最初にX, Y生成能力を各細胞にランダムに与えても、移動期において各細胞の位置関係が定まった段階では細胞は前部から後部へYの生成能力の順に並んでいることになる。他方Y生成能力の大きい細胞からTになるのであるから結局T細胞が前部にかたまり、残りのA, P細胞が後部にランダムに存在することになる。移動体の一部を除いて、A, P細胞のみからなる後部から出発すると、 $A \rightarrow T$, $P \rightarrow A$ の転換が起り新たにTとなった細胞が移動して前部に集まる。逆に前部のT細胞のみから出発すると後部の方から $T \rightarrow A$, $A \rightarrow P$ の転換が起って正常なパターンにもどり、実際とよく合致する。

興奮性と抑制性の混合入力を超汎関数

伊藤嘉房（名古屋大・医療技術短大）



図のようなシステムを考える。出力は入力の非線形汎関数である。このようなシステムは生物・物理・工学など多くの分野でしばしば見られるものである。このシステムがガウス白雑音を受け入れるならガウス白雑音が、ポアソン白雑音を受け入れるならポアソン白雑音がシステムの同定に使われることはよく知られている。

飛田はガウス白雑音の汎関数を超汎関数にまで拡張した。この様な拡張が数学的には無論であるが、応用上も必要なことは殆んど自明である。例えば出力が点過程であればこれは従来の意味での汎関数ではない。点過程を出力とするシステムはいたるところで見られるので、汎関数の概

念を超汎関数にまで拡張しておなかいと不便である。飛田やその共同研究者によって、その後、ガウス白雑音による微分作用素、その共役作用素、積作用素などが導入され、ガウス白雑音についての内容豊富なカルキュラスが成立し、飛田カルキュラスと呼ばれている。ポアソン白雑音に対しても飛田カルキュラスが可能なので、次の目標は飛田カルキュラスを一般のレヴィ白雑音にまで拡張することであった。最近これも可能な事が判明したので、ニューロンの生理学を意識して、レヴィ白雑音の特殊な場合に飛田カルキュラスを適用して得られる結果の一部について述べる。

$\dot{P}_1(t), \dots, \dot{P}_K(t)$ をお互いに独立で、各々の頻度が $\lambda_k, k=1, \dots, K$, であるようなポアソン白雑音とし、システムへの入力：

$$\dot{P}(t) = a_1 \dot{P}_1(t) + \dots + a_K \dot{P}_K(t)$$

を考える。 a_k は振幅に相当し、負の値を取ることも許されるので、 $\dot{P}(t)$ はそのままニューロンへの入力のモデルとなる。一般に白雑音の非線形汎関数は発散してしまうがこれを救うのが renormalization である。Renormalization によって発散量は手なづけられて超汎関数となる。

$\dot{P}(t_1), \dots, \dot{P}(t_j)$ の多項式を renormalize するには次のようにすればよい。多項式の各項を展開して整頓すると各項が

$$C \dot{P}_1(t_1)^{n_{11}} \dots \dot{P}_1(t_j)^{n_{1j}} \dot{P}_2(t_1)^{n_{21}} \dots \dot{P}_K(t_j)^{n_{Kj}}$$

なる形をした多項式となる。各 $\dot{P}_k(t_j)^{n_{kj}}, k=1, \dots, K, j=1, \dots, J$, を

$$\dot{P}_k(t_j) \left\{ \dot{P}_k(t_j) - \frac{1}{dt_j} \right\} \dots \left\{ \dot{P}_k(t_j) - \frac{n_{ki}-1}{dt_j} \right\}$$

にて置き換えると直ちにもとの多項式の renormalization が得られる。

この式には $1/dt_j$ などが含まれていて奇妙な感じを与えるかも知れないが、これは超汎関数として数学的に厳密に定義されたものを直感に最もよく訴えるように表現したものとなっている。Renormalization の手続きが、形式的に単純ポアソン白雑音の多項式の renormalization と全く同じと云うのは、当然かも知れないが興味のもたれるところである。多項式の renormalization ができると、超汎関数の空間に適当な位相が入れば、自然にあるクラスの解析関数の renormalization ができることになる。 $\dot{P}(t)$ による微分作用素やその共役作用素も定義され、飛田カルキュラスの世界が展開されるのであるが複雑になるのでここには書かない。積作用素にのみ少し触れておく。

$a_k \dot{P}_k(t)$ による微分作用素を $\alpha_{k,t}$, その共役作用素を $\alpha_{k,t}^*$ と書くことにすると $a_k \dot{P}_k(t)$ による積作用素は $a_k \lambda_k(\alpha_{k,t}^* + 1)(\alpha_{k,t} + 1)$ となることが知られているが、 $a_k \dot{P}_k(t)$ の和である $\dot{P}(t)$ による積作用素は

$$\sum_{k=1}^K a_k \lambda_k(\alpha_{k,t}^* + 1)(\alpha_{k,t} + 1)$$

となり極めて自然である。

締め括りのため、ニューロンへの興奮性および抑制性の混合入力のモデルとなり得る $\dot{P}(t)$ を用いて、自発興奮性をもたない存り来りのニューロンを同定する事の意味を考える。まず云えることは、ニューロンの出力が点過程であるから超汎関数の概念が必要という事である。興奮性の単純ポアソン白雑音の入力に対して同じように応答する二つのニューロンが、抑制性の入力に対

しては異なる反応を示すという事は有り得る。この二つのニューロンを異なるものとして同定するのに抑制性の単純ポアソン白雑音のみを入力として用いるわけには行かない。自発興奮性をもたないニューロンは抑制性の入力に対してサイレントだからである。このようなニューロンには、抑制性の入力は興奮性の入力と並行してやって来て始めて意味をもつ。かようにして、混合入力 $P(t)$ を用いてシステムを同定することの意味が理解される。

双線型系について：その重要性和と生命科学との関連

安井湘三（基生研）

双線型系 (bilinear system) の重要性は近年急速に認識されつつある。その例は自然界にも人工機械にも数多く見られる。^{1), 7), 8)} 社会的または経済学的現象を双線型系モデルで理解しようとする方向もある。⁸⁾ 一方、システム科学の純理論的立場からも双線型系は極めて注目される。広範囲の非線型系が双線型系に数学的に帰着出来ることが分かってきたからである。^{2), 4), -6)} また線型系に若干の操作を加えて双線型化することにより系の能力（可制御性、安定性、最適制御性能等に関して）の向上を図ることも可能である。^{1), 6), 7)} これは生体の科学において双線型系が頻出する事実と無関係ではないかも知れない。このように双線型系は並みの非線型系ではない。学問の進歩を妨げる障害の一つである非線型学の後進性を打開していくものとして、その研究の発展は大いに期待される。

双線型系とは？ 生命科学における例

入力 x と出力 y の関係が $\dot{y} + a y + d x y + b x = 0$ で記述される系を考えてみる。 $d \neq 0$ のとき双線型となる。 x と y が各線型に入り、入出力の積が含まれることが特徴である。生物界における例は下記の他に細胞分化、酵素反応、抗原抗体反応、循環器系に見られ研究されている。^{7), 8)}

例 1. 集団生物学における population dynamics

y をある生物の個体総数、 x をその増減系数（出生率－死亡率）とすれば $\dot{y} = x y$ となる。 x を気象、食料、害敵等の環境条件で左右される入力変数と考えれば、これは最も簡単な双線型系を構成する。 x が外的因子だけでなく y 自身にも依存すれば population feedback がこの双線型のまわりに働く図式となる。例えば食料に限りがあれば、 x は y の減少関数となるであろうし、もしそれが $x = \alpha - \beta y$ と線型近似出来れば閉ループ系は Verhulst-Pearl の方程式で支配され、その解を吟味することにより問題の生物の盛衰が予言される。

例 2. 薬物による生体膜チャンネル開閉の kinetics

膜チャンネルの開閉に直接携わる分子を X 、外部から与えるアゴニスト薬物を A とする。 X と A が結合して XA となるときチャンネルが開きイオンが透過すると考える。一次反応を仮定すれば $X + A \rightleftharpoons XA$ である。 k_1 と k_2 を適当方向の速度定数とすれば $d[XA]/dt = k_1[X] -$

$[A] - k_2 [XA]$ を得る。一方, $[X] + [XA] = C = \text{一定}$ である。これらより $[X]$ を消去し, $y = [XA]$ と $x = [A]$ とすれば $y + k_2 y + k_1 x y - k_1 c x = 0$ が成立し, 開チャンネル総数と薬物投与量の関係が双線型系として記述された。定常時は $\dot{y} = 0$ で, また $y_{\max} = c$ であるから, $y/y_{\max} = x/(x + k_2/k_1)$ の Hill 係数が 1 の sigmoidal 曲線が得られ, 多くの dose-response データに見られる傾向を反映する。

例 3. CO_2 -chemostat

呼吸器系は O_2 と CO_2 のガス交換を行うが, 動脈血 pH もこの機能に関与するので本格的モデル化には少なくとも $p\text{O}_2$, $p\text{CO}_2$ と $[\text{H}^+]$ を状態変数として扱う必要がある。ここでは $p\text{CO}_2$ のみに着目した図 1 のような簡単な 3-compartment モデルを考える。 Q を心臓血流量とすれば, $\frac{d}{dt}(\text{動脈血 } p\text{CO}_2) = q_1 = Q(\alpha y_1 + \beta)$, $\frac{d}{dt}(\text{静脈血 } p\text{CO}_2) = q_2 = Q y_2$, $\frac{d}{dt}(\text{代謝系産出 } p\text{CO}_2) = q_0 = \text{一定}$ の近似を得る。これらから, $V_1 \dot{y}_1 = (r - y_1)x + Q(y_2 - \alpha y_1 - \beta)$, $V_2 \dot{y}_2 = -q_0 - Q(y_2 - \alpha y_1 - \beta)$ を得る。肺換気率 x を $p\text{CO}_2$ 応答の入力と考えれば, $y_1 x$ の存在により次元 2 の双線型系となることが分かる。

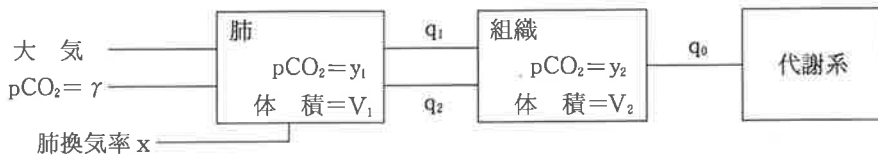


図 1.

双線型系の一般理論について

双線型系理論の過去 20 年間に及ぶ発展を紹介する紙数はないので, 汎関数展開論における積分核に関して簡単にふれる。スカラー入出力の双線型系は $\dot{\underline{y}} + \underline{A} \underline{y} + \underline{D} \underline{y} x + \underline{b} x = \underline{0}$, $y = \underline{c} \underline{y}$ と一般に書ける。 $\underline{y}$, $\underline{b}$, $\underline{c}^T$ は m 次元ベクトル, $\underline{A}$ と $\underline{D}$ は $m \times m$ 行列である。この系 $[\underline{A}, \underline{b}, \underline{c}, \underline{D}]$ の n 階ボルテラ核は $g_n = \underline{c} e^{\underline{A}^T t_1} \underline{D} e^{\underline{A}(\tau_2 - \tau_1)} \dots \underline{D} e^{\underline{A}(\tau_n - \tau_{n-1})} \underline{b}$ となる ($\tau_1 \leq \dots \leq \tau_n$)¹⁾。最近の大きな発見はこの逆の命題 (実現問題) に関し以下が分かったことである。有限個のボルテラ核で定義される系は $m < \infty$ の双線型系であり, 与えられた核から $\underline{A}$, $\underline{b}$, $\underline{c}$, $\underline{D}$ が決定可能である。^{2), 4), 5)} 非線型系同定問題で応用上より重要と考えられるウィナー核は $h_n = \underline{c} e^{\underline{A}^T t_1} \underline{D} e^{\underline{A}(\tau_2 - \tau_1)} \dots \underline{D} e^{\underline{A}(\tau_n - \tau_{n-1})} [\underline{I} - \underline{P} \underline{D} \underline{Q}^{-1} \underline{D}] \underline{b}$ (ここで $\underline{Q} = \underline{A} + \underline{P} \underline{D}^2$ で $\underline{P}$ は白色雑音の電力密度) となり,³⁾ ボルテラ核の場合と同様な実現定理が成立することは明白である。最後に, 対応する線型系 $[\underline{A}, \underline{b}, \underline{c}, \underline{D} = \underline{0}]$ が可観測ならば, 双線型系は $[\underline{A}, \underline{b}, \underline{c}, \underline{D} = \underline{u} \underline{c}]$ で表わされ, さらに $\underline{L}$ を線型演算子として $\underline{L} [y^{(m)}, \dots, \dot{y}, y, x^{(m-1)}, \dots, \dot{x}, x] + \sum_{i=0}^{m-1} \beta_i (yx)^{(i)} = 0$ と書ける。⁶⁾ これは双線型性可変ゲインのフィードバック系に相当し, $\underline{D} = \underline{u} \underline{c}$ であるから積分核はスカラー関数の積に分解可能となり, 非線型サーボ機構の解析に都合が良い。⁶⁾

〔文献〕

- 1) Bruni et al (1974), IEEE Trans. Automat. Contr. 19:
- 2) Gilbert (1977), ibid. 22:

- 3) Yasui (1982), ibid, 27:
- 4) Rugh (1983), ibid, 28:
- 5) Brockett (1976), Automatica, 12:
- 6) Yasui (1984), Proc. 9th IFAC Int. Congress;
- 7) Mohler, Bilinear Control Processes, Academic Press, 1973;
- 8) Beckmann e Künzi, Vareable structure Systems with Application to Economics and Biology, Spring-Verlag, 1974.

生物の行動にあらわれる Random Evolution Equations

飛田武幸 (名古屋大・理・数学)

生物の行動は“ゆらぎ”の影響を受けて、時間の推移とともに変化していく偶然現象、すなわち確率過程と考えることができる。ゆらぎを理想化したものはホワイトノイズとして数学的に記述される。それはブラウン運動 $B(t)$, $-\infty < t < \infty$, の時間微分 $\dot{B}(t) = \frac{d}{dt} B(t)$, $-\infty < t < \infty$, であって、各時点で独立な値をとる確率超過程である。

問題の確率過程を $X(t)$ と書くとき、それはホワイトノイズの汎関数として

$$(1) \quad X(t) = \varphi(\dot{B}(s), S \leq t, t), \quad t \text{ は時刻を指す,}$$

のように記述される。

このような $X(t)$ がみたす確率微分方程式の例として

① 双線型 (bilinear) 方程式

$$(2) \quad \frac{d}{dt} X(t) = -\lambda X(t) + (c + DX(t))\dot{B}(t), \quad \lambda > 0,$$

② 指数型のゆらぎをもつ方程式

$$(3) \quad \frac{d}{dt} X(t) = -\lambda X(t) + ce^{\beta B(t)}, \quad \beta, c \text{ 定数}$$

③ 2種類のゆらぎをもつ場合

$$(4) \quad \frac{d}{dt} X(t) = (-\lambda + \lambda' \dot{B}_2(t))X(t) + ce^{\beta B_1(t)}, \quad \lambda' \text{ 定数}$$

$\{B_1(t)\}, \{B_2(t)\}$ 互に独立なホワイトノイズ

および、それらの一般化がある。ここで $\dot{B}(t)$ との積をとる演算は creation operator として、また $e^{\beta B(t)}$ は乗法的な renormalization を行ったものとして、数学的に正確な意味をもったものとして理解される。

これらの方程式の解法にあたって、 $\{B(t)\}$ を (1) の φ の変数系と考え、あたかも通常の微分方程式を解くかのように扱うのが causal calculus である。このとき扱う量は $\{B(t)\}$ の超汎関数として表わされる。そして、それらの解析のためには、 φ に $\mathcal{T}$ -変換

$$(5) \quad (\mathcal{T}\varphi)(\xi) = \int e^{i\langle \dot{B}, \xi \rangle} (B) d\mu(B), \quad \begin{array}{l} \mu: \text{ホワイトノイズ測度} \\ \xi: \text{テスト関数} \end{array}$$

を施して、 C^∞ 級のどの汎関数になおして、通常の間数解析的な手法を用いるのが有効である。

久保モデルによる非線形解析

安藤祐一郎（基生研），桜永昌徳（日本医大），中 研一（基生研）

ナマズ網膜細胞には、光入力に対する応答動特性が二次 Wiener 核のみで十分に再現される一群の細胞があり、C型細胞と名づけられている。この種の細胞は、多くの脊椎動物網膜に存在するアマクリン細胞に相当しステップ光を与えると on-off 応答を示すことから一過型と言われてきた。今回の研究の目的は、C型細胞の二次非線形動特性に着目し、それを再現する信号変換モデルを作って、この細胞が果たす役割を明らかにすることである。

ナマズ網膜に白色雑音変調した光刺激を加え、その応答を水平細胞、双極細胞およびC型細胞で記録し、入出力間の関係を Wiener 解析によって調べる。その結果、水平細胞および双極細胞の応答は準線形でありそれぞれ低域通過（Low-Pass）および帯域通過（Band-Pass）性の信号変換を行っていることが明らかになった。C型細胞の応答は二次 Wiener 核により十分に再現され、個々の細胞で求めた二次核は同一のパターンを示す。一方、水平細胞内に白色雑音変調した電流を加えると、光刺激時と同様の応答をC型細胞から記録できる。このときの応答も二次非線形であり、細胞によらない定型の二次 Wiener 核を得る。このようにして測定された二次核を説明するために以下に概略をしめす簡単なモデルを考える。

1) 一つのC型細胞の出力（応答）は多数チャンネル出力の和である。2) 各チャンネルは、線形帯域通過フィルタに二乗変換器が続いた二段構成をなす。3) 線形帯域通過フィルタは符号反転および符号非反転の二種類から成る。ここで帯域通過のフィルタ特性は光刺激あるいは電流注入において得られる双極細胞のインパルス応答（一次核）に等しいものと仮定すると、ある簡単な数式によって表すことができる。このモデル系は二次非線形でありその二次核は光刺激および電流刺激で得られた実測値を十分に再現することができる。なお、符号反転および符号非反転のチャンネルがほぼ同数存在し、時間特性が両者でほぼ共通であれば、モデル内の二乗器は二乗型半波整流器でも置き換えられる。

以上に要約した結果は、網膜では帯域通過されて双極細胞に到達した準線形な信号が双極細胞→C型細胞間で二乗操作による非線形信号変換を受け、明るさ変化の検出器として機能していることを示唆している。

Hodgikin-Huxley 式における活動電位の温度依存性

吉田秀世（大阪医科大・教養・生物）

最近、パソコンが発達して、かなり、複雑な式でも取り扱えるようになりました。このパソコンを利用して、Hodgikin-Huxley の式の解析で、二、三気付いた事を報告いたします。用いた式とパラメータの値は次の通りです。

$$\begin{aligned}
 I &= C_M \frac{dV}{dt} + \bar{g}_K n^4 (V - V_K) + \bar{g}_{Na} m^3 h (V - V_{Na}) + \bar{g}_L (V - V_L) \\
 \frac{dn}{dt} &= (\alpha_n (1-n) - \beta_n n) \phi & \alpha_n &= 0.01(V+10) / (\exp \frac{V+10}{10} - 1) \\
 \frac{dm}{dt} &= (\alpha_m (1-m) - \beta_m m) \phi & \beta_n &= 0.125 \exp(V/80) \\
 \frac{dh}{dt} &= (\alpha_h (1-h) - \beta_h h) \phi & \alpha_m &= 0.1(V+25) / (\exp \frac{V+25}{10} - 1) \\
 \phi &= 3^{(T-6.3)/10} & \beta_m &= 4 \exp(V/18) \\
 & & \alpha_h &= 0.07 \exp(V/20) \\
 & & \beta_h &= 1 / (\exp \frac{V+30}{10} + 1) \\
 \bar{g}_K &= 36.0(\text{ms}) & V_K &= -72.0(\text{mV}) \\
 \bar{g}_{Na} &= 120.0(\text{ms}) & V_{Na} &= 55.0(\text{mV}) & C_M &= 1.0 (\mu F) \\
 \bar{g}_L &= 0.3(\text{ms}) & V_L &= -49.4011(\text{mV})
 \end{aligned}$$

刺激電流 1 mA を 0.02m sec 流すことにより活動電位を発生させ、温度を 0℃ から 30℃ 迄変えて、活動電位がどのように変るかを調べてみました。図 1 が活動電位のピークの値と温度との関係を示したもので、図 2 が活動電位の半値巾と温度の関係です。半値巾は図 3 に示されている値を用いました。図 1 に示されているように、活動電位の大きさは 15℃ 位の温度をすぎると急激に小さくなりますし、半値巾も図 2 のように急激に小さくなります。興味あることに、半値巾の下り方は Q_{10} を 3 とするカーブ、すなわち $1.48 \times 3^{(63-T)/10}$ という式に非常によくのります（図 2 の実線）。H-H 式における Q_{10} は、 m 、 n 、 h のパラメータに関して定義されているのですから、それが半値巾の大きさにそのまま反映してくるとは云えないので、このことは偶然の一致かとも考えられますが、 Q_{10} を他の値に選んでやってみても、やはりその変えた Q_{10} が半値巾の大きさにそのまま反映してきますので何か H-H 式の構造がそうなっているのではないかと想像されます。今のところ、この原因はわかりませんが、実験データの解析に利用できるのではないかと思います。それから伝播する活動電位についての H-H の式を解くことを試みました。

$$\frac{a}{2 R_2 \theta} \frac{d^2 V}{dt^2} = C_M \frac{dV}{dt} + \bar{g}_K (V - V_K) + \bar{g}_{Na} (V - V_{Na}) + \bar{g}_L (V - V_L)$$

θ が伝播速度を表わしています。この式を解くのに用いた方法は、最初適当に θ を選んで活動電位の形を求めてみますと図 4 のように θ の値が真の値より大きいと $+\infty$ に、逆に小さいと $-\infty$ に発散する傾向がありますので、それを利用して θ の値を決めようとしたのですが、すべての変

数を倍精度にして計算を行なっても、満足できるような活動電位が得られませんでした。すなわち θ の値の範囲が狭まるにつれて活動電位が静止電位に回復していく時間が長くなる傾向は認められるのですが、一旦 $+\infty$ か $-\infty$ に発散する方向に向かうと急激にその方向に向かってしまい、その勾配は θ の値の範囲の大きさにはあまり関係がないようです。この原因として気付いた事は、活動電位が静止電位に近づくにつれて上式の右辺も左辺も 0 に近づくために計算結果が不安定になるのではないかとと思われるのですがそれを避ける良い方法を思いつきませんでした。

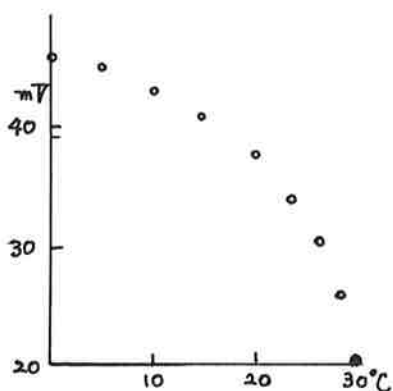


図 1.

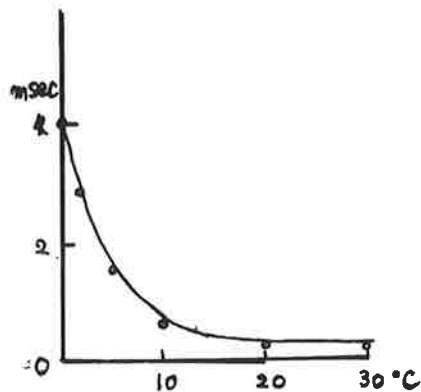


図 2.

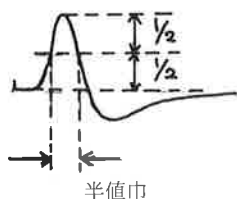


図 3.

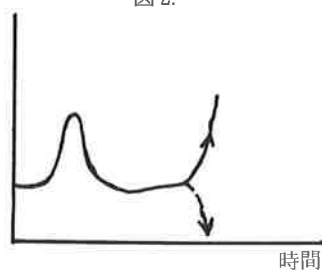


図 4.

パワー連結過程の回路網表現

今井雄介（大阪医大・生理）

システムの考察において数学モデルは有力な手段を提供する。システムを記述する連立常微分方程式が与えられ、かつ初期条件および係数値についての情報がある場合、そのシステムの動態はコンピューターによる数値計算法によってシミュレートし、実際のシステム動態との対応を検討することが可能となる。しかし、現時点において生体システムのすべてを記述できる方程式群を導出することは必ずしも容易ではない。生体システムは複合有機体系であって、基本機構としてのエネルギーの流れに関する系と、制御機構に関する情報系、およびそれらの場である構造体

系の3つの系からなる。これらの系の存在は相互依存的であるが、概念的には分離して考察することができる。基本機構系は化学反応、輸送および運動の機構に関するものであって「エネルギー保存則」の適用が可能であり、このシステムは統合的に考察できる。すなわち回路網熱力学の手段でもって生体システムを回路化するとき、そのグラフからエネルギー論的に完結した連立常微分方程式が導かれる。今回、生体パワーシステムの回路化で中心的役割を担うパワー連結の表現について考察を加え、また応用としての膜輸送系の回路網表現とシミュレーションにつき検討したので報告する。

1 パワー保存とパワー連結

生命現象は多種類の、かつ相互に連結したエネルギーの流れの上に発現しているものであり、エネルギーではなくエネルギーの流れが問題となる。回路網熱力学ではエネルギーの流れをパワーと呼び、パワーを基本量とする。パワーは一般的に流れとそれに共役した力の積で表現する。パワーの保存則はエネルギー保存則の時間微分の形で表現され、自由エネルギーの変化速度 (dG/dt) とパワー散逸 (Φ) により特徴づけられる。

$$dG/dt + \Phi = 0, \quad \text{または} \quad -dG/dt = \Phi \quad (1)$$

今系内に含まれるパワー種 i をすべて数え上げて、各々のパワー種の自由エネルギー変化と各々の散逸を考えると、(1)式は次で表現されるものとなる。

$$-\sum \frac{dG_i}{dt} = \sum \Phi_i \quad (2)$$

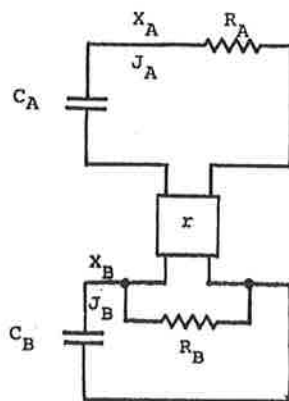
ここでパワー散逸 Φ_i は各々の過程でのエントロピー増大を示すものであるが、具体的には一般化された抵抗体 R_i での散逸を示し、 $R_i J_i^2$ または X_i^2/R で表現できるものになる。ここで J_i は R_i での流れ、 X_i は R_i での駆動力を示すものである。自由エネルギー変化 dG_i/dt は一般化された容量体 C_i 、または慣性体 I_i でのエネルギー蓄積（または放出）で表現される。連結が存在するときには各々の散逸と各々の自由エネルギー変化は必ずしも相対応するものとはならない ($-dG_i/dt = \Phi_i$)。これは相互にパワーが変換伝達されるためであって、変換伝達による連結パワーを P_i^{TD} とすると、次の等式表現になる。

$$P_i^{TD} - dG_i/dt = \Phi_i \quad (3)$$

(3)式の総和は(2)式になることから、 $\sum P_i^{TD} = 0$ の関係が得られる。すなわちパワー連結による変換伝達過程は保存的であって、保存的なパワー変換素子で表現できる。変換体はパワー種を変換伝達するもので具体的には変圧器型変換 (TF) とジャイレーター型変換 (GY) が考えられる。変換体はパワーポートを2つもつ素子であって、前者 (TF) は一方のパワーポートの流れの r 倍を他方のポートの流れとし、力の $1/r$ 倍を力として変換伝達するものである。後者 (GY) は一方のパワーポートの力の g 倍を他方のポートの流れとし、流れの $1/g$ 倍を力として変換伝達する形式の素子である。膜輸送系にみられる変換体は前者の変圧器変換である。すなわち変換において流れは流れに、力は力に比例する関係がある。上記パワー変換体素子と、散逸抵抗体および自由エネルギー蓄積体を用い、さらに素子の流れ変数と力変数間の独立変数の選択に関する因果律を考察すると、接続法も決定でき、システムの回路網モデルが完成する。この回

路グラフにキルヒホッフの電圧則，電流則を適用すると自動的に連立常微分方程式が得られる。グラフはエネルギー論的に完結しているのので，それから導かれる連立常微分方程式はシステムを記述するに必要かつ充分なものとなる。

パワー連結過程の最小単位は2種のパワーの存在する系での連結であって，この回路網表示は基本回路となる。今，A，Bの2種のパワーが連結している系を考える。各々の自由エネルギー変化をポテンシャルエネルギーが変化する一般化された容量体 C_A ， C_B で表現する。各々のパワー散逸は抵抗体 R_A ， R_B で表現する。さらに2つのパワー過程の連結において，流れは流れに，力は力に比例する変圧器型変換体をもって表現すると，第1図の回路網モデルとなる。変圧器型変換体の因果律は一方の「流れ」を独立変数とすると他方のポートの「力」が独立変数となるものであるのので，一方のポートを直列に接続すれば，他方のポートは必ず並列に接続しなければならないという拘束を生じる。したがって，上記の素子群を用いた基本回路は，第1図の1種のみであって他のパターンは存在しない。実際の応用においては具体的事象に合わせて，A，Bの割り当てを行う。



(第1図)

2 膜輸送系の回路網シミュレーション

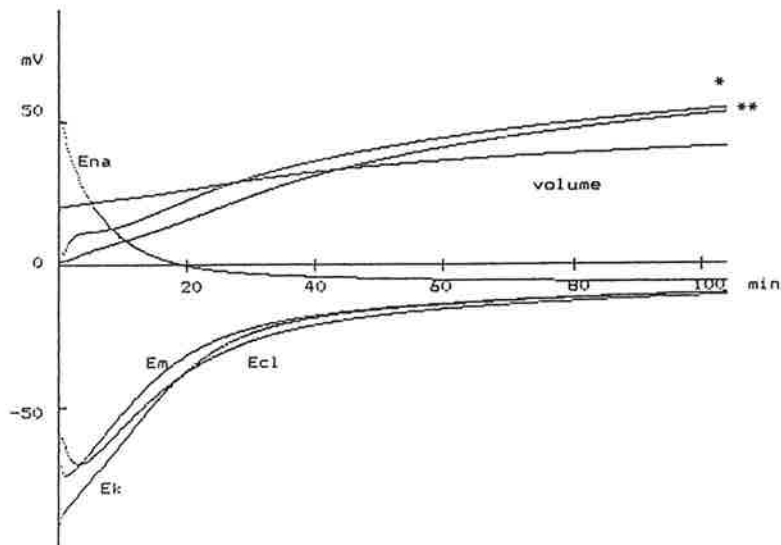
第1図の基本回路をいくつか組み合わせることにより現実に近い膜輸送系の回路網モデルを作ることができる。具体的に1枚の膜と2つの溶液区画からなり， Na^+ ， K^+ ， Cl^- の輸送と，水輸送が進行している系を考える。この膜輸送系の回路網モデルでは，水輸送に関する水力学的パワーとイオン輸送に関する Na^+ ， K^+ ， Cl^- の拡散パワーおよび電気的パワーの5種のパワーを考えることになる。パワー連結については溶媒牽引と呼ばれる水—イオン連結，およびイオン—電荷の連結を考える。完成したモデルから導かれた膜輸送方程式は次のものであり，容積流 (J_v) の方程式の中には電気浸透圧の項が含まれて来る。

$$\begin{aligned} J_v &= L_p (\Delta P - \sum \sigma_i \Delta \pi_i + \sum (1 - \sigma_i) \bar{c}_i z_i F \Delta \phi) \\ J_i &= (1 - \sigma_i) \bar{c}_i J_v + \omega_i \bar{c}_i \Delta \mu_i \\ I &= F \sum z_i J_i \end{aligned} \quad (4)$$

(但し， $i = \text{Na}, \text{K}, \text{Cl}$ ， $\Delta \mu_i = \Delta \mu_i + z_i F \Delta \phi$)

(4)式を連立差分方程式として各係数を定めて、初期値を設定すると、step by stepのコンピューターシミュレーションができる。これは Donnan 平衡に向う経過のシミュレーション結果の1例を第2図に示す。**は静水圧変化、*は実効浸透圧と電気浸透圧の和を表現していて、Donnan 圧 ($\Delta p = \Delta \pi$) に至る経過もみられる。

さらに、Na-K能動輸送を含む系についても回路モデルを作り、シミュレーションを行い、定常状態が出現することを明らかにした。



(第2図)

〔文献〕

- 1) G. F. Oster, A. S. Perelson and A. Katchalsky (今井・村上・吉田 訳).
回路網熱力学—生物物理系の動的模型化— 喜多見書房(東京) 1980.
- 2) Y. Imai : Circuit model of membrane transport system including coupled flows,
J. theor. biol. (submitted).

一次元 Poisson の方程式における爆発解

品川嘉也(日本医大・生理)

膜電位の成因は根本的には Poisson 方程式

$$\frac{d^2 V}{dx^2} = - \frac{F}{\xi \xi_0} (C_f + C_1 - C_2) \quad (1)$$

によって論じられる (C_f は固定電荷, C_1 は cation, C_2 は anion の濃度) が, 通常一次元のモデルで取り扱われる, すなわち適当な変数変換により

$$\frac{d^2 \psi}{d \xi^2} = -\theta + \rho_2 - \rho_1 \quad (2)$$

とおいた形で解かれる。ところが点電荷や双極子を一次元的に配置した場合, 物理的に明らかのように電位が無限大となる点が現われることが避けられない。これは数学的には爆発解の問題であるが, これについて簡単に考察を加えてみたい。なお膜電位を定めるための Nernst - Planck - Poisson の方程式が爆発解を持つことは, 級数解の方法により報告した¹⁾。またこのため膜電位に関する各種の近似式が合理的根拠を失うことも報告した²⁾。

膜の厚さを数十 Å, 膜の両端 $\xi = \pm C$ に分極荷電を置く, 液相では $\theta = 0$, 境界条件を $\psi(\infty) = \psi_\infty$, $\psi'(\infty) = 0$ とおき ξ の充分大きいところで Verwey の古典的な解に一致するような解を求めると, 有理関数を使って

$$\psi'(\xi) = -\frac{c^2 \psi'(0)}{\xi^2 - c^2} \quad \text{とおき} \quad \psi(\xi) = c \psi'(0) \frac{\coth^{-1} \frac{\xi}{c}}{\text{tauk}^{-1}} + \psi_\infty \quad (3)$$

が得られる。これは明らかに $\xi = \pm C$ で爆発を示す。膜電位は $\psi_M \equiv \psi_\infty - \psi_{-\infty}$ で与えられ膜内の拡散電位との関係が求められないことになるが, これは爆発点があるため, 膜内 $-C < \xi < C$ の電位を液相に接続する適当な方法がないために起こる, 当然の結果である。(3)式の相同の式を膜内について求めることはできるが $\xi = \pm C$ での境界条件を合理的に定めることができないので, 膜内の電位分布も求まらないということでもある。従来, ふつうに使われて来た一次元モデルは放棄しなければならないのであろうか。

[文献]

- 1) Y. Shinagawa (1979) J. theor. Biol. 81 : 333.
- 2) Y. Shinagawa (1980) J. theor. Biol. 83 : 359.

電子スピン共鳴のベクトル的な考え方

亘 弘 (生理研), 下山雄平 (北教大・物理)

電子スピン共鳴 (EPR) の一次あるいは二次高調波スペクトルは 1 個の積分をおこなうとき零である。マイクロ波を強くすると飽和電子移動 EPR スペクトルが得られるが, 1 個の積分によって有限の値を持つ。図 1 にスピラベル (TEMPOL) グリセリン-水 (85 : 15) 混合溶液の 2 次高調波スペクトルを 10° 毎に位相を変えて測定したものと, これらの積分を同時に示す。位相が 110° 付近のスペクトルは 1 次高調波のスペクトルとはならず, かつ積分値を持っていることがわかる。これらのスペクトルの積分値を位相検波増幅器の角度に対してプロットしたものを図 2

に示すが、正弦波的に移動し特定の位相を持つ。またこれらスペクトルの peak to peak 値を同じ様にプロットしたものを同時に示してあるが前者の位相とは異っている。このことは各磁場で位相が異っていることを示している。

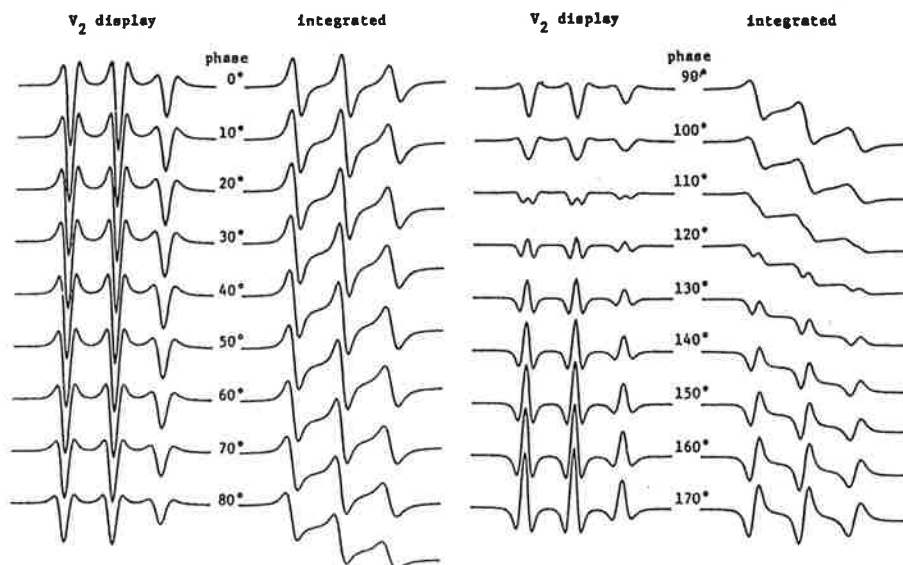


図1. TEMPOL のグリセリン-水 (85:15) 溶液の二次高調波 EPR スペクトル (100 kHz で磁場変調, 50 kHz で位相検波)。室温, マイクロ波強度 164mW での結果を示す。各スペクトルの右側は二次高調波 EPR スペクトルの積分したもの示す。

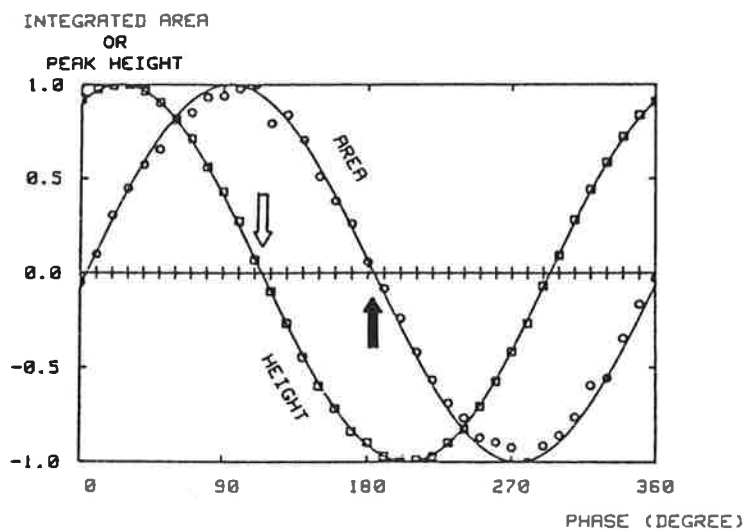


図2. TEMPOL 溶液の EPR スペクトルの積分値(○)と吸収ピーク値(□)と位相角度変化。図1のスペクトルから計算し実線は最小二乗法によってフィットさせた。

EPR 測定では磁場変調によって得られる信号を位相検波し、磁場を掃引して EPR スペクトルを得る。一次あるいは二次高調波として観測するいずれの場合にも、前置増幅器からの出力は正弦波であり、ベクトル量、つまり振幅と位相、が求まっている。つまりある磁場 i における EPR 信号は振幅 P_i と位相 θ_i とを成分とするベクトルなので、これを磁場の関数としてスペクトルを求めればよいと考えられる。スペクトルの振幅が磁場によって変化するのは当然であるが、位相が磁場によって変化していることは理解しがたい。周波数が同じで異なった振幅と位相を持つ正弦波の和は、これらの幾何学的関係より求まる振幅と位相をもった同じ周波数の正弦波である。したがって二つ以上の異なった位相を持つスペクトルにより合成されているスペクトルは、各磁場での位相検波増幅器出力信号の位相角度が変化するのは当然のことである。たとえばこの現象を 1 回の積分で零になるスペクトルと 1 回の積分で有限の値を示すスペクトルとが共存すると考えれば理解できる。

図 1 は位相検波増幅器の位相角度 X_j を 10° ごとに变えて 36 個の EPR スペクトルを測定したものの半数であるが、ベクトル的に処理する。ある磁場 i で、 $X_j (= (j-1) \times 180/n)$ ($j = 1, 2, \dots, n$) における信号強度が Y_{ji} であるとする。振幅 P_i と位相 θ_i は最小二乗法をもちいて、

$$P_i = (2/n) \left(\left(\sum_j Y_{ji} \cos X_j \right)^2 + \left(\sum_j Y_{ji} \sin X_j \right)^2 \right)^{1/2} \quad (1)$$

$$\theta_i = \arctan \left(\left(\sum_j Y_{ji} \sin X_j \right) / \left(\sum_j Y_{ji} \cos X_j \right) \right) \quad (2)$$

が得られる。この式を用いて振幅スペクトルおよび位相スペクトルを計算でき、これらを図 3 に示す。また図 3 をベクトル的に示したものを図 4 に示す。

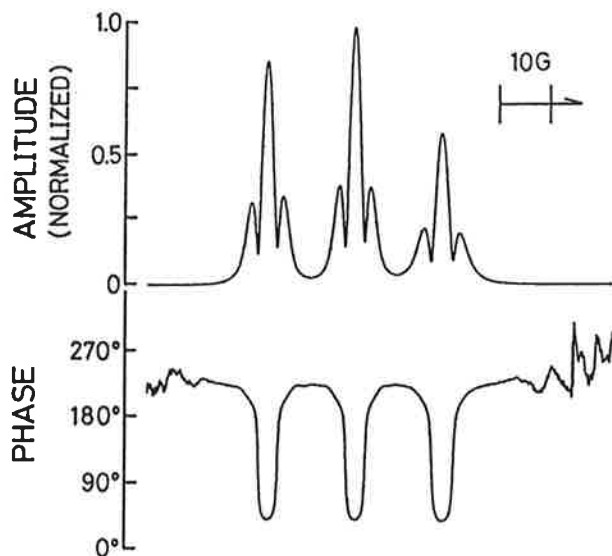


図 3. TEMPOL のグリセリン-水 (85:15) 溶液の振幅 EPR スペクトル(上)と位相 EPR スペクトル(下)。図 1 のスペクトルから式(1)および(2)を用いて計算した。

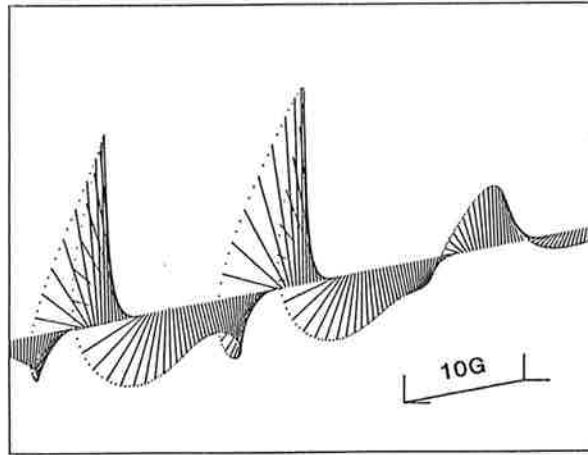


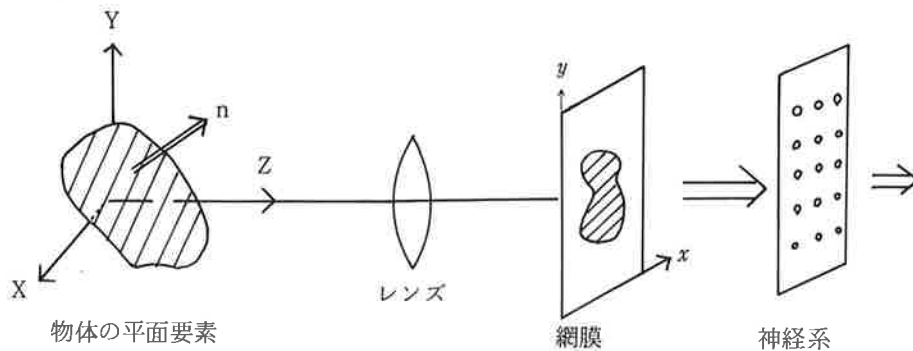
図4. TEMPOLのグリセリン-水(85:15)溶液のEPRスペクトルのベクトル表示。図3のスペクトルを用いて計算した。

この様に、EPR スペクトルのベクトル的な表現によって、飽和移動EPRの表示が簡単におこないうる。この物理的な意味損失角が吸収の大きさに依存しているものと考えられる。

動的物体の認識——その数理的基礎

甘利俊一(東京大・工学), 丸山 稔(三菱電機)

3次元物体を認識するのに、人間はこれを一度網膜上の2次元画面に投影し、この投影像から種々の特徴を抽出して計算を行っている。このため、立体視を行うには二枚の異った視点からの投影像が必要になる。3次元物体が外界で運動を行っている場合には、一枚の画面を用いても、像の変形の時間経過を追うことにより、3次元物体の立体構造を認識できる。そのみならず、3次元物体の剛体運動も同時に認識できる。テレビや映画の動画像をリアルに感じるのはこのためである。



ここでは、動的物体認識の数理的基礎を探るため、外界の局所線形特徴量とその変化とをもとに、物体の立体構造と剛体運動とを認識できるための条件を求め、その計算法を明らかにする。ここで、局所というのは、外界の対象物体の構成要素である（傾いた）平面要素に着目していることを意味する。物体はこのような平面要素を曲げながらつないだものであり、人間は経神場において各部分に対応する局所特徴の相互作用を通じて、物体全体の認識に至るであろう。ここでは、このような全体的認識の第一段階としての、局所特徴からの認識を明かにする。

いま、外部の平面要素を考え、その法線ベクトルを $\mathbf{n}$ 、並進運動速度を $\dot{\mathbf{v}}$ 、回転運動速度を $\dot{\mathbf{w}}$ とする。ここで、運動速度をまとめて 6 次元のベクトル

$$\dot{\mathbf{v}}_i = (u_1, u_2, u_3, w_1, w_2, w_3)$$

で表わすことにする。外界の点 (X, Y, Z) は網膜上の点 (x, y) に

$$x = \frac{X}{R-Z}, \quad y = \frac{Y}{R-Z}$$

で移る。ここに R は像の縮小率であり既知の量として扱う。この写像により、外界の物体は網膜上の光度分布 $s(x, y)$ を誘起する。外界の物体が運動すれば、光度分布が変化する。

物体の運動は 3 の自由度の並進、3 の自由度の回転を組み合わせた 6 次元のリー群をなす。この生成素（無限小変換、リー環の基底）を $\bar{g}_i (i=1, \dots, 6)$ とする。対象局所平面が与えられたとき、変換の各生成素は網膜上の射影点の変化をひき起こす。この変換を $\tau_i(\mathbf{n}) (i=1, \dots, 6)$ と書く。物体の運動の速度を $\dot{\mathbf{v}}_i$ （これは並進速度 $\mathbf{u}$ と回転速度 $\mathbf{w}$ を成分とする）とすれば、画面では

$$\dot{\mathbf{x}} = \sum \dot{\mathbf{v}}_i \tau_i(\mathbf{n}) \mathbf{x}$$

の速度で対応点に変化する。これが光流（optic flow）である。画面での明るさの変化は

$$\frac{\partial s(x, y, t)}{\partial t} = -\dot{\mathbf{x}} \cdot \text{grad } s$$

である。

さて、画面から得られる線形特徴の組 $f_\kappa (\kappa=1, 2, \dots, n)$,

$$f_\kappa = \int m_\kappa(x, y) s(x, y, t) dx dy = \langle m_\kappa, s \rangle$$

に着目しよう。いま、 τ_i の共役を $\tau_i^*(\mathbf{n})$ と書くと、 f_κ の変化率は

$$\dot{f}_\kappa = -\sum \langle m_\kappa, \dot{\mathbf{V}}_i \tau_i s \rangle = -\sum \dot{\mathbf{v}}_i \langle \tau_i^* m_\kappa, s \rangle$$

と書ける。ここで、 $\mathbf{n}$ によらない x, y の関数 $k_{i\kappa\lambda}(x, y)$ が存在して

$$\tau_i^*(\mathbf{n}) m_\kappa = \sum_\lambda C_{\lambda}(n) k_{i\kappa\lambda}$$

が成立しているときに、特徴量として f_κ の他に、

$$h_{i\kappa\lambda} = \langle k_{i\kappa\lambda}, s \rangle$$

をも測定できるものとする。このとき

$$\dot{f}_\kappa = -\sum \dot{\mathbf{v}}_i C_{\lambda}(n) h_{i\kappa\lambda}$$

を解くことにより、立体構造 $\mathbf{n}$ と運動 $\dot{\mathbf{v}} = (\mathbf{u}, \mathbf{w})$ が得られる。

m_κ として何を選べば上記の条件が満たされるか、具体的な計算法、神経回路網による実現な

どについて論ずる。

〔文献〕

- 1) S. Amari, Feature spaces which admit and detect invariant signal transformations, Proc. 4th Int. J. Conf. Pattern Recognition, 1978, pp. 452 - 456.
- 2) 丸山, 甘利, 動的物体の認識についての基礎的考察, 電子通信学会パターン認識と学習研究会資料, 1984年1月.

生体高分子のコンホメーション解析に水の効果を考慮する新しい方法

磯貝芳徳（京都府医大），西川 建，大井龍夫（京都大・化研）

蛋白質や核酸などの生体高分子の生理機能は，その特異的な構造に荷なわれている。

従って溶媒環境変化に伴う生体高分子の構造変化や，立体構造形成過程等を解析する，いわゆる，コンホメーション解析は生体機能を解析する上で大変大切な課題となっている。生体高分子のコンホメーションを決める因子として分子内相互作用と溶媒との相互作用が考えられる。特に環境の変化に柔軟に反応することを使命とする生体高分子にとって，溶媒との相互作用は極めて重要である。しかし従来のコンホメーション解析，特に理論的な解析では主として分子内相互作用に注目し，溶媒との相互作用は無視するか，極めて不十分な形で組み込むことが多かった。我々は生体高分子が溶媒に露出する表面積に着目し，この表面積から溶媒との相互作用の自由エネルギーを算出する方法を考案し，この方法の開発を進めてきた。

溶媒中の生体高分子の自由エネルギーは高分子を構成する各原子面の相互作用と，各原子と溶媒分子との相互作用の和で表わされる。両相互作用とも，おおまかには原子の表面を介して及ぼし合っていると見ることができる。高分子がある構造から他の構造に転移する際，各構成原子の溶媒への露出表面積（Accessible Surface Area, 以下 ASA と略記）も変化し，構造転移に伴う自由エネルギー変化は ASA の変化量に比例すると考えられる。もし自由エネルギー変化と ASA の変化量との間の比例係数（当該原子が溶媒中に単位面積だけ露出した場合の自由エネルギー変化に相当する。以下 g と略記）が既知であるならば，任意の構造の自由エネルギーを ASA から算出できることになる。この比例係数 g を実験データに基づいて各種原子（疎水性原子，極性原子，イオン性原子等）について定め，溶媒の効果を考慮した自由エネルギー計算への道を拓こうという目論見である。

比例定数 g を定めるに当たり基礎とした実験データは，ポリペプチドのヘリックス・コイル転移のパラメータ s である。このパラメータはヘリックスからコイルへの転移の自由エネルギーを直接的に反映したパラメータで，容易に自由エネルギーの変化量に変換できる。15種のアミノ酸の s 値が Scheraga グループによって報告されており，彼らの実験データを採用し，次の手順で比

例定数 g を求めた。15種のアミノ酸に対してそれぞれヘリックス構造とコイル構造を計算機内に構築し、全構成原子の ASA を求める。次いで、ヘリックスとコイルの ASA の差 ($\geq \text{ASA}$) を各原子について求める。全構成原子をその属性に応じて5種類のグループに分け、各アミノ酸 (i) の各グループ (j) に属する原子の $\geq \text{ASA}$ の和を $\geq \text{ASA}(i, j)$ とし、 i 種アミノ酸のヘリックス・コイル転移に伴う自由エネルギー変化を $\geq G(i)$ とする。次のような target function F を定義し、 $g(j)$ を変数として J の極少化を行い、 $g(j)$ の最適値を探索する。

$$F = \sum_{i=1}^{15} \left\{ \sum_{j=1}^5 g(j) \cdot \geq \text{ASA}(i, j) - \geq G(i) \right\}^2$$

この操作を各温度毎に繰り返すことにより、各グループの原子に対する g を温度の関数として得ることができる。

こうして得た g の値から逆にヘリックス・コイル転移のパラメータ s を温度の関数として計算してみると、Scheraga らの実験データを良く再現することができた。また各 g の値は当該原子が溶媒中に単位面積だけ露出した場合の自由エネルギー変化量を与えるわけで、この g の温度依存性より相当するエンタルピー変化、エントロピー変化、比熱等の熱力学量も計算することができた。例えば疎水性の原子が溶媒中に露出することによる自由エネルギー変化は正、エンタルピー変化は負、エントロピー変化は負となり、過去の知見と一致する結果を得た。

今後、本研究で開発した手法を各種現象に適用し、その有効性を検証し、またその限界についても調べる必要がある。当面、蛋白質の熱変性の現象に本法を用い、実験データとの比較を行う予定である。

コンパートメントシステムによる物質の生体内動態のモデル化

楠岡英雄，井上通敏（大阪大・医），児玉慎三（大阪大・工学）

コンパートメントシステムは、コンパートメント（区画）と呼ばれる機能ブロックが移行係数により結合されている複合システムで、医学・生物学においては、生体に負荷された物質の時系列情報を移行係数などで集中定数化することにより表現し、生体機能を解析するためのモデルとして広く応用されている。しかし、このモデルは、コンパートメント間を物質等が質量保存の法則に相当する物理学的法則に支配されて移行する状況すべてに対して適用できる。したがって、医学・生物学における生体内の物質動態、たとえば、ラジオアイソトープで標識した物質の動態解析（Tracer Kinetics）や薬剤の動態解析（薬動力学）のためのモデルとして用いられる以外に、疫学・生物学・経済学などの種々の分野において、人口や物の変動・移動のモデルとして広く採用されている。

コンパートメントシステムにおけるコンパートメントとは、生体においては血液・臓器などより構成される仮想的空間である。各コンパートメント内では、物質は瞬時に、均一に拡散するものとされ、さらに、システム内およびシステムと外部との間には物質の保存則が成立していなければならない。また、コンパートメント間の物質の移行量は受け側のコンパートメント内の物質量（あるいは濃度）には依らず、送り側によってのみ規定される（donor - controlled）。この移行量が移行係数を定数とした物質の量あるいは濃度に比例する場合は、コンパートメントシステムは線形ダイナミカルシステムの種類となり、各システム理論による検討が可能となる。しかし、コンパートメントシステムは一般のシステムとは異なり、物理的条件による制約を繁栄して次のような特徴を持つ。

1. 入力は物質量を表わすため常に非負である。
2. 各コンパートメント間の移行係数が、やはり非負値をとる。
3. 1と2の結果、状態変数は常に非負である。

コンパートメントシステムをモデルとした実験解析において最も重要な問題は、物質動態に与する機能分布相の数や、機能を表現するコンパートメント間の移行係数を推定することであるが、これはシステムの同定問題に相当する。ところが、コンパートメントシステムには前述のような非負システムという特徴があるため、システム同定問題に関連して以下のような問題について特別の検討が必要になる。

- (1) 構造可同定性：構造可同定とは、システムの構造と入出力部位が与えられたとき、出力からシステムのパラメータを一意的に決定できることをいう。すなわち、構造非不同定なシステムをモデルに用いておれば、実験の結果得られた伝達関数からモデルの移行係数を一意的には決定できないことになる。このような場合には、用いるモデルの変更、あるいは入力部位や観測部位の変更などが必要となる。したがって、実験の計画にあたっては、用いるモデルの構造可同定性の検討が必要である。
- (2) 実現可能性：一般にいう実現問題は、伝達関数などの形で入出力応答特性が与えられ、それから状態方程式を決定する問題であるが、ここで考える実現可能性では、実現されるべき状態方程式がコンパートメントシステムの制約条件を満足するものに限られることになる。この問題を複雑にしている要因の一つは最小実現がつねに可制御かつ可観測であるという保証がないことであり、このような点にコンパートメントシステムの特異性が現われている。
- (3) 可到達性：可到達性とは、目的点の状態と最終時刻を与えた時、そのシステムが最終時刻までに目的の状態をとりうることをいい、可到達性の検討はシステムを制御しようとするときに重要となる。すなわち、システムを適当な非負入力によってある状態に制御しようとする場合、もしその状態が可到達でなければ制御は不可能である。

コンパートメントシステムについては以上の問題以外にも、最適制御問題、定常状態の解析、最適サンプリング条件、パラメータの推定精度などについて検討が加えられている。これらの問題の多くはコンパートメントシステムの持つ非負システムという特殊な性質の結果発生したもの

であり、したがって、コンパートメントシステムを生体機能のモデルとして用いる際にはこれらの点についての検討が必要になる。そのなかにはいまだ一般的に解決されておらず、数値計算により検討せざるをえない問題もあり、そのためのプログラム・パッケージも開発されている。しかし、未解決の問題が残されているが、コンパートメントシステムは生体のモデル化にとって、簡単で、かつ、極めて有用であり、今後も医学・生物学領域において広く使用されるものと考えられる。

〔文献〕

- 1) 児玉慎三：コンパートメントシステム解析と線形システム理論，システムと制御，22：200—208（1978）.
- 2) 楠岡英雄，祖川伊知郎，井上通敏：コンパートメントアナリシスのためのプログラムパッケージ VACSの開発に関する研究，行動計量学，9：39—46（1982）.

『筋収縮と細胞運動：相違点と類似点』

昭和59年 3月9～3月10日

杉 晴夫（帝京大・医・生理）

我国における筋収縮および細胞運動の分野は伝統的に多くのすぐれた研究がおこなわれているにもかかわらず、これらの研究に従事する筋生理学者と細胞生理学者間の交流は必ずしも緊密ではない。本会合は筋収縮と細胞運動両分野の生理学者が相互に研究対象の相違点と類似点について率直に論議することにより情報を有効に交換し、相互理解を深め、将来の研究の一層の発展をはかることを目的としておこなわれた。会合はワークショップ形式でおこない、発表者および討論者は本会合の主題に論議を集中するよう求められた。発表および討論の内容は以下のようである。

I. 電気現象と力学的反応 司会：杉 晴夫・堀田 健

原生動物における膜電位変化と繊毛打

内藤 豊（筑波大・生物）

後生動物繊毛細胞における膜電位変化と繊毛打

高橋景一（東大・理・動物）

討論：精子鞭毛運動と Ca^{2+}

真行寺千佳子（東大・理・動物）

植物細胞の原形質流動における膜電位変化と流動停止反応

田沢 仁（東大・理・植物）

骨格筋線維における膜電位変化と収縮

堀田 健（名市大・医・生理）

討論：平滑筋細胞収縮時の細胞内 Ca^{2+} 分布変化

杉 晴夫

心筋細胞における活動電位発生のイオン機構

入沢 宏（生理研）

II. 動力学的性質 司会：平本幸男・高橋景一

骨格筋線維における張力過渡現象の多分節模型による解釈

杉 晴夫

討論：斜紋筋の長さ張力関係

岩本裕之（東大・理・動物）

粘菌変形体の律動的収縮の生理機構

神谷宣郎（阪大・理・生物）

鞭毛の微小管の滑り速度と滑り力の測定

高橋景一

鞭毛運動の解析による微小管滑り力の測定

Ⅲ. 収縮模型および運動のシミュレーション 司会：山田和広

繊毛運動パターンのシミュレーション

内藤 豊

討論：骨格筋線維の正弦波応答のシミュレーション 村瀬雅俊（東大・薬）

骨格筋線維における等張性収縮速度の過渡現象のシミュレーション

土屋禎三（帝京大・医・生理）

アクトミオシンモーター

矢野雅文（東大・薬）

討論：植物細胞のアクチンシートの利用による原形質流動模型

新免輝男（東大・理・植物）

粘菌アクトミオシン系の収縮

神谷宣郎

討論：細胞分裂模型

吉本康明（基生研）

Ⅳ. 分子の機構 司会：田沢 仁・柳田敏雄

ダイニンアームおよびクロスブリッジの運動機構に関する電子顕微鏡的研究

月田承一郎（東大・医・解剖）

チューブリン・ダイニン系による原形質流動

黒田清子（阪大・理・生物）

クロスブリッジの運動機構に関する蛍光プローブによる研究

柳田敏雄（阪大・基工）

筋収縮の高速X線回折法による研究

杉 晴夫

筋収縮の超音波弾性率測定による研究

八田一郎（名大・工・応物）

筋収縮の核磁気共鳴法による研究

山田和広（大分医大・生理）

討論：筋肉の熱発性の赤外線サーモグラフィーによる測定

小林孝和（帝京大・医・生理）

討論： Ca^{2+} とパルプアルブミンの反応熱測定

田之倉優（大分医大・生理）

全体として本ワークショップの発表と討論は主題である筋収縮と細胞運動の間の相違点と類似点をめぐって終始しきわめて活発に展開され、所期の目的を十分に達成することができた。参加者の方々の熱意と御協力に深く感謝いたします。ワークショップにより得られた主な結論を列記すると以下のようである。

1. 筋肉の収縮弛緩は筋線維内の Ca^{2+} 濃度によって調節されているのにたいし、繊毛および鞭毛運動ではその打ち方のモードの変換が Ca^{2+} によって調節されている。ゾウリムシの繊毛打方向逆転反応は Ca^{2+} スパイクによる外液 Ca^{2+} 流入による。同様な Ca^{2+} スパイクは精子でもおこらしい。
2. 原形質流動の流速は $[\text{Ca}^{2+}]$ 増大とともに減少し、ついには停止する。原形質流動の停止反応は Ca^{2+} スパイクによる Ca^{2+} 流入によりおこる。
3. 繊毛打の頻度は Ca^{2+} 以外の未知の物質により調節されている。筋収縮の場合も Ca^{2+} 以外の調節物質の関与がありうるのではないか？
4. 繊毛運動の場合、個々のダイニンアームが発生する力は1～数 pN であって、筋収縮のさい個々のクロスブリッジの発生する力とはほぼ等しい。
5. 微小管の間の滑り速度は筋収縮と同じく荷重の増大とともに減少する。
6. 粘菌変形体の律動的収縮は経過が筋収縮に比してはるかに遅く、これと同期して細胞内 [ATP] あるいは pH の変化等が測定される。筋収縮ではこのような測定は不可能であり、多くの示唆が得られる。
7. 繊毛運動のシミュレーションから、繊毛打のモードは9本の微小管の基部から発する活性の波の時間のずれによって決まることが示唆される。
8. 筋線維のクロスブリッジと同じく、繊毛のダイニンアームが微小管長軸にたいちてなす角度は静止状態と硬直状態とで明らかに異なる。
9. 海産のある種の藻類の原形質流動はアクチン系でなくチューブリン・ダイニン系によっておこる。
10. 植物細胞のアクチンシートを利用した原形質流動模型は流動の分子的機構解明に有用な材料である。

このように、筋収縮、繊毛鞭毛運動、原形質流動の間には相違点とともに多くの類似点があり、これらすべてに共通な分子的機構の存在が強く示唆された。今後もこのような会合を定期的にもつことは我国におけるこの分野の研究の発展に大きく貢献すると考えられる。

『血液生理学—酸塩基平衡，血球，血液構成蛋白質の構造と生理的機能』

昭和59年 3月12日～3月13日

循環血液量の調節機転

森本武利（京府医大）

血液炭酸ガス平衡曲線測定法とその目的

上田至宏・中馬一郎（阪大・医）

呼吸性アシドーシスに対する緩衝過程

本田良行（千葉大・医）

腹水中の白血球の変性条件

八木舎四（岩手医大・医）

赤血球膜の機械的脆弱性とその病態生理学的意義について

上坂伸宏（日本医大）

塩 栄夫（京大・医）

赤血球の変形能と局所粘性

小山富康（北大・応電研）

血液のレオロジー：赤血球と血漿タンパクの相互作用

前田信治・滋賀 健（愛媛大・医）

ヘモグロビンの高次構造とヘム近傍構造ならびにその圧力依存性

森島 績（京大・工）

哺乳動物ヘモグロビンのアロステリック定数

今井 清博（阪大・医）

血漿アルブミンの構造転移とメルカプト・ノンメルカプト変換

曾我美勝・恵良聖一・長岡俊治・桑田一夫（岐阜大・医）

免疫グロブリンの高次構造と機能

荒田洋治（東大・理）

$^1\text{H-NMR}$ による血漿アルブミン構造転移の研究

長岡俊治・恵良聖一・曾我美勝・桑田一夫（岐阜大・医）

亘 弘・志賀 潔（生理研）

フィブリノーゲンの構造と機能

佐々木勲（名保衛大・医）

組織性プラスミノーゲンアクチベータのフィブリン分解特性

松尾 理（近畿大・医）

循環血液量の調節機転

森本武利, 能勢 博, 伊藤俊之 (京都府立医大・生理)

循環血液量の調節は, 循環血の量および浸透圧の変化を感知し, 飲水量および尿量を変化させることによって行われる。一方容積受容器への入力は, 細胞外液の脈管内での分布変化, 脈管伸展度の変化および細胞内液の細胞外液への移行などによっても影響を受ける。そこでこれらの因子の定量化を試みた。

まず脈管内外の水の動き, および脈管系の伸展性 (compliance および delayed compliance) の定量には, イヌの循環血液量を ^{51}Cr ラベル赤血球希釈法により, Hct 値を電導度法により, また血液膠質浸透圧を針型膠質浸透圧計によりそれぞれ連続的に測定する方法を用い, リンガー液の輸液を加えた際の変化を動静脈圧の変化とともに測定した。一方脈管内外の水の動きを記述する7つの式から成る数式モデルを作成し, 輸液時の上記測定値の変化を非線形最小二乗法により fitting させることによって, 脈管系および間質系の compliance ($C_{\text{vas}} = 5.1$; $C_{\text{isf}} = 1.9 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$) および delayed compliance ($\eta_{\text{vas}} = 5.2$, $\eta_{\text{isf}} = 7.5 \text{ mmHg} \cdot \text{min} \cdot \text{kg} \cdot \text{ml}^{-1}$), 生体全体から見た脈管の透過係数 ($0.17 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) を求めた。

さらに品質負荷による細胞内からの水の動きを定量化することを目的として, $^{51}\text{Cr-EDTA}$ をトレーサーとし, イヌシャント血中のカウント数より細胞外液量を連続的に測定する方法を開発し, 上記の測定法に加えて用いた。これらの測定値を mannitol 輸液時の各体液区分の量, 膠質および品質量, 静水圧の変化を記述する数式モデルに fitting させることにより, 生体全体としての脈管水分透過係数 ($0.18 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$), 細胞膜での水分透過係数 ($0.028 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$) を求めた。

これらの値を用いることにより, 液, 品質および膠質負荷後の血液量, 膠質浸透圧, 血圧等の経時的变化を予測することが可能となる。

血液炭酸ガス平衡曲線測定法とその目的

上田至宏, 中島一郎, (大阪大・医・生理)

少量の試料で炭酸ガス平衡曲線を自動的, かつ連続的に求める装置を示し, その測定方法, 解析方法及び目的について明らかにした。まず Acid-Base Algorithm について, その理論的側面をのべ, それから導かれる炭酸ガス平衡曲線を示す式を示した。炭酸ガス平衡曲線 (溶液中の $p\text{CO}_2$ の連続的変動にもとづく, pH, 総 CO_2 量, Cl^- イオン量 etc 等の変化) を水, 各種塩溶液, Plasma, 及び全血について測定を行なった。各溶液でのパラメーター (溶解度, pK^1 , 緩衝価 β , 血球内外 pH, Donnan 比 γ 等) は大型計算機「Sals」を使って決定した。緩衝価, pK^1 , とも pH の函数であること, 標準状態での各値は Siggaard-Andersen のデータと近似することを示した。さらに血球内酸塩基平衡についても求められることを示した。

呼吸性アシドーシスに対する緩衝過程

本田良行, 波多奈美子, 秋山節子 (千葉大・医・生理)

生物は炭酸分圧の増加に対して, 体液 pH の恒常性を維持するため HCO_3^- の増加によって極めてよく適応しているように思われる。たとえば, water breather の炭酸分圧の 2 ~ 3 mmHg から air breather の 30 ~ 40 mmHg に増加すると, HCO_3^- も 3 ~ 4 mM から 20 ~ 40 mM に増加する。ヒトにおいても, 慢性呼吸器疾患で炭酸分圧の上昇が 60 ~ 90 mmHg の状態が続くと, 著明な HCO_3^- の上昇を伴うことが知られている。この HCO_3^- 増加の過程は経時的に, 1) 血液と組織液とによる物理化学的緩衝過程と緩衝塩基の再配分, 2) 細胞内の緩衝過程, 3) 腎臓による代償過程, 3 期に分類される。

われわれは, 血液とともに細胞内緩衝過程の結果をより直接に反映と思われる胸管リンパ液を採取し, 12% CO_2 吸入に伴う酸塩基平衡の変動の推移を 90 分まで追跡した。その結果, 上述の 1) の時期においても既に 2) の細胞内緩衝過程の関与が示唆された。その程度は, CO_2 吸入開始後 60 分で全緩衝経過のおよそ 10% と推測された。また, 1) の過程の主要な緩衝過程である赤血球内の緩衝結果の発現を block する SITS を投与したところ, in vitro では明らかに全血緩衝価の低下が見られたが, in vivo では有意の低下を認めなかった。目下その原因につき検討中である。

腹水白血球の変性条件

八木舎四（岩手医科大・医・生理）

腹水白血球は、生理食塩水の腹腔内注入による腹水に $10^4/\mu\text{l}$ ほど浮遊する円形の遊離細胞で、ギムザ染色にて抹消血白血球と区別できない。その3～4時間経過標本は、90%が好中球で体重1kg当りの乾燥量にてイヌから約1g、ネズミから約0.3g回収される。ブドウ糖を基質とするガス代謝では酸素消費より解糖作用が優勢で、乳酸脱水素酵素活性が筋標本の数倍高く、他方、チトクロームC濃度が心筋標本の1/100と低く、酸可溶性ヌクレオチドのクロマトグラムが文献に見られる肝の成績と近い。その硝子器内生活は、本来、半日でも多用な変性経過をとるが、その代謝特性が基質レベルよりも酸素活性化反応に律速されるので、生理食塩水のみ液体培地を基本として、燐酸塩によるpH7.4, 37℃では胞体が円形のままで蛋白放出が肝標本の3倍も多く、他方、重炭酸ソーダを加えたpH6.8, 30℃では蛋白放出も少なく胞体が繊維化するという2方向に変性が指向する。

赤血球膜の機械的脆弱性とその病態生理学的意義について

上坂伸宏（日本医科大・生理）

塩 栄夫（京都大・医・神経内科）

最近、我々は、弾性管内に密封した赤血球浮遊液に対して、外から衝撃的な圧力（インパクト・ホース）を加えることによって、赤血球膜の機械的脆弱を調べる新しい方法を開発した。この方法（インパクト法）は、生理的条件下（例えば、等張液、正常ヘマトクリット〔Hct〕値）での実験が可能で、用いる刺激も生体内で生じ得るものであり、簡易かつ定量的な方法である。インパクトにより赤血球は形態変化（echinocyte-spherocyte transformation）を示し、遂には破片化して溶血に致る。インパクト法による溶血の特徴について、インパクト-溶血曲線、Hct値の効果、ヒト赤血球膜とラット赤血球膜の比較、湿度効果、ビタミンE欠乏ラット赤血球膜の機械的脆弱性、スピンドラベル法による膜流動性）によっては得られない新しい知見であることを示した。更に、我々が開発した全血を用いる血小板凝集測定法（Screen Filtration Rate法）を紹介し、血小板凝集に及ぼす赤血球の作用（例えば、赤血球膜の損傷によって血小板凝集が促進される）について検討して、血栓形成における赤血球膜の機械的脆弱の病態生理学的意義について考察した。

赤血球の変形能と局所粘性

小山富康, 菊池佑二, 荒磯恒久 (北海道大・応用電気研・生理)

自家血しょうに浮遊させた赤血球の変形態をニュクリポア膜 (孔径 $5\ \mu\text{m}$) にたいする通過性を指標として検討した。通過性に及ぼす陽イオンの影響を, 放射性同位元素でラベルしたアルブミンの血球, 血しょう配分を測定することにより検討した。その結果, Na^+ と K^+ とは赤血球の $5\ \mu\text{m}$ 小孔通過性にたいして異なった影響を与えること, 赤血球のアルブミン吸着性にたいして異なった作用をすることが見出された。吸着アルブミンの量の差が通過能に影響するとみられる。グルタルアルデハイド (GA) 処理赤血球は $5\ \mu\text{m}$ の小孔を通過しなかった。

このような変形能の微視的機構を調べる目的で, 赤血球膜脂質二重層のちょう密性と局所粘性 (η) とを, DPH を加えた赤血球膜ゴーストにて, 自家製の偏光蛍光消光計を用いて測定した。無処置の脂質膜は 37°C でちょう密性の指標である DPH の揺動角 (θ) が 40° , η が 0.4p であった。GA 処理はちょう密性を増すが局所粘性を減少させるという成績がえられた。これは小孔通過性の激減というマクロな指標と一致しない。動的微細構造の微視的粘性に関してきわめて示唆に富む成績であった。

血液のレオロジー：赤血球と血漿タンパクの相互作用

前田信治, 志賀 健 (愛媛大・医・生理)

赤血球は低流速領域では血漿タンパク存在下に集合して粘度を上昇させ, 高流速領域では可逆的に離散する。このような赤血球の集合現象を透明円錐—平板粘度計・倒立顕微鏡・画像処理装置・コンピューターを組合わせ, 速度論的にその支配要因を解析した。

(1) 赤血球数：多くなれば集合体を作りやすい。(2) 変形能：spectrin を S—S 結合により重合化させると, 変形能は低下し, 集合体形成は抑制される。(3) 表面荷電：シアル酸による陰性荷電を除き, 赤血球間の静電反発力を減らすと集合体形成は促進されるが, 血漿タンパク (fibrinogen など) は必須である。(4) 形態：赤血球が有棘化すると集合体形成は抑制される。(5) 血漿タンパク：fibrinogen は極めて効果的な架橋剤である。免疫グロブリンでは $\text{Ig M} > \text{Ig A} > \text{Ig G}$ の順で集合体を形成しやすい。Albumin は fibrinogen による集合体形成に補助的に働く。(6) 多発性骨髄腫 (Ig M), 各種免疫グロブリン製剤 (特に F(ab')_2), 各種血漿代用薬 (分子量 7 万をこえる多糖類) による集合体形成促進を観察した。赤血球の集合体形成には架橋剤が必須で, その分子量, 分子形態, 荷電状態などが関与している。

ヘモグロビンの高次構造とヘム近傍構造の相関性 ならびにその圧力依存性に関する研究 —NMR法によるアプローチ—

森島 績 (京都大・工)

1. 低スピン Valency Hybrid Hb の 3 次および 4 次構造に及ぼす IHP の効果。

ベルツは、 O_2 結合に伴うヘム鉄のヘム面への動きが $R \rightleftharpoons T$ 4 次構造転移をもたらすことを提唱し、さらにこれを酸化型 (Fe^{3+}) Hb (met Hb) に拡張した。すなわち、Hb の 4 次構造を誘起する高スピン met Hb は IHP 添加によって T 型へ転移するのに対し、低スピン met Hb は T 型へ転移しないことを示し、T 構造へヘム鉄 (Fe^{3+}) がヘム面から浮き上った構造に現われる高スピン状態との関連性を示した。一方我々の本研究において、ヘム鉄に N_3^- 、イミダゾール (Im) の配位した Hb および Valency Hybrid Hb ($\alpha_{co} \beta_{N_3}^+$, $\alpha_{N_3}^+ \beta_{co}$, $\alpha_{co} \beta_{Im}^+$, $\alpha_{Im}^+ \beta_{co}$) はいずれもヘム鉄が低スピンであるにもかかわらず IHP によって $R \rightarrow T$ 転移を起すことが NMR スペクトル測定より明らかにされた。また、これら Hb のヘム近傍構造をモデル化したポルフィリン鉄錯体の NMR スペクトルとの比較から、T 型 4 次構造ではヘム鉄—ヒスチジン結合に歪みがかかっていることも判明した。^{1, 2)}

2. ヘモグロビンの 3 次, 4 次構造に及ぼす圧力効果

O_2 Hb, CO Hb, deoxy Hb の NMR スペクトルを 1~2,000 気圧の種々の圧力下で測定した結果、いずれも β 鎖のヘム近傍構造のみが特異的に変化し、4 次構造に変化は生じなかった。一方ニトロシルヘモグロビン (NO Hb) のように R, T 両構造が平衡状態にて存在している場合には、高圧下で T 構造に変化が生じ、サブユニット間水素結合が弱くなることが明らかとなった。³⁾

〔参考文献〕

- 1) Neya, S. and Norishima, I., J. Biol. Chem., **256**: 793-798 (1981).
- 2) Morishima, I. and Hara, M., *ibid.*, submitted for publication.
- 3) Morishima, I. and Hara, M., *ibid.*, **258**: 14428-14432 (1983).

哺乳動物ヘモグロビンのアロステリック定数

今井清博 (大阪大・医・生理)

4 種の哺乳動物 (ヒト, ウサギ, ウマ, ウシ) のヘモグロビンの精密な酸素平衡曲線を種々の溶液条件下で測定し、それらから非線型最小二乗法によって、四段階酸素化平衡定数 K_i ($i =$

1～4) や、Monod-Wyman-Changeux (MWC) モデルのパラメータ等の値を決定した。4種のヘモグロビンの K_i の、溶液条件 (pH, Cl^- , DPG, IHP) に対する依存性には、基本的には共通のパターンが見られたが、微妙な差異も見られた。とくに、ウシ・ヘモグロビンの K_i は、DPGやIGPに対して、弱い応答性を示した。アルカリ条件で、IHPの存在しない場合には、MWCモデルの3個のパラメータ (K_T , K_R , L_i) の間に、 $\log L_o + 4 \log K_T = \log L_4 + 4 \log K_R = C$ (一定) なる関係の存在すること、 L_4 と K_R は本質的には溶液条件に依存しないことが見出された。その結果、MWCモデルは、唯一個の可変パラメータ (L_o または K_T) によって、異なる条件下で測定した複数個の酸素平衡曲線を同時に記述することが分かった。 C , K_R , L_4 はヘモグロビンに雇用のアロステリック定数であり、種による微妙な違いがみられた。

血漿アルブミンの構造転移とメルカプト・ノンメルカプト変換

曾我美勝, 恵良聖一, 長岡俊治, 桑田一夫 (岐阜大・医・生理)

ヒト血清アルブミン (HSA) は高速液体クロマトグラフ (HPLC, PGP 2000 カラム) により、SH基を持つメルカプトアルブミン (HMA) とSH基のないノンメルカプトアルブミン (HNA) に分離し得る。このHPLC法により、血液透析患者 (慢性腎不全) の透析前の血中ではHNAが増加し、透析後HMAが増加することを見出した。血液透析前に、血中Cystine, homocysteine-cysteine mixed disulfide等が増加し、式(1)に示すように反応してHNAを生ずる (メルカプト・ノンメルカプト変換)。XSHは容易にXS·SXに酸化され、式(1)の反応が進行する。血液透析により、XS·SX, XSHが減少するとHNAはHMAに変化する (ノンメルカプト・



メルカプト変換)。しかしながら、HMA, HNA混合溶液を、患者と全く同一条件で透析してもノンメルカプト・メルカプト変換を示さない。これらの結果より、血液透析によりXS·SX等が減少すると、生体内の何れかの臓器において、HNAがHMAに変換されるのだろう。

HMAは生体内において、含硫アミノ酸のcovalent carrier proteinの作用を持ち、血中の非結合の酸化型含硫アミノ酸の濃度を下げる作用を持つのだろう。

〔文献〕

- 1) Sogami, M., Nagaoka, S., Era, S., Honda, M. & Noguchi, K. (1984) Resolution of human mercapt- and nonmercaptalbumin by high-performance liquid chromatography, *Int. J. Peptide Protein Res.* 23. (in press)

免疫グロブリンの構造と機能

荒田洋治（東京大・理・生物化学）

免疫をつかさどる IgG 分子が抗原（非自己）を認識し、排除するため補体系を活性化する機構は今もって謎である。この際、抗原認識は V ドメイン、補体第 1 成分 C1g との結合は C_H2 ドメインが担う。このように、各機能は空間的に隔たったドメインに明確に分配されている。この 2 つのドメイン間に存在し抗原認識の情報を C_H2 ドメインに伝達していると目されているのが Hinge 領域である。実際、Hinge 領域を持たない IgG 分子種や Hinge 領域の 2 本のジスルフィド結合を切断した IgG 分子種には補体活性化能は無い。また、Hinge 自体、ドメインの集合体である IgG 分子の中において非常に flexibility に富んだ独自の構造を持っていることも大いに示唆的である。ここでは、この Hinge 領域に対する理解を深めるため、ヒト IgG 1 分子から実際に Hinge fragment (Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu)₂ を精製しその構造の解明および Native な状態との比較を試みた。

各アミノ酸残基の化学シフトについて Hinge Peptide と IgG およびそのフラグメントとを比較した結果、Hinge Peptide N 端側の Thr 225 について若干の変化が認められるものの、全体としてはきわめてよく一致していることがわかった。また、今回帰属した Cys 226, 229 のスペクトルを見ると両者は等しい構造をとっていると考えてよい。さらにビシナルスピン結合定数より C_α—C_β まわりのコンホメーションは一方のビシナルプロトンがトランスに、もう一方がゴーシュになるように固定されていることが明らかとなった。Huber による IgG の X 線結晶回析のデータによると、シスチン残基の C_α—C_β まわりは正にこのコンホメーションをとっている。以上より Hinge 領域はたとえ切り出されても本質的にはタンパク分子に結合している場合と同じ構造をとっていること、溶液中におけるヒンジの構造は結晶について得られた形と本質的には同じであることがわかる。さらに、Hinge Peptide の精製過程の G—25ゲルろ過（分画範囲 MW 1,000～5,000）で、Hinge Peptide が void に溶出されることから実際の分子量（3,000弱）よりつっぱった（Stokes 半径の大きな）形態をとっていることがわかる。この原因としてシスチンの S—S 結合が 2 本も存在する点、および Pro 含量の高い点（全 24a.a 中、Pro は 8 残基）が考えられる。実際、上で述べたように Cys の C_α—C_β まわりの回転は抑えられており、その結果、Cys-Pro-Pro-Cys は rigid でその C 端側に続く Pro-Ala-Pro もつっぱった形態をとり、Hinge Peptide の特徴的なコンホメーションを実現していると考えられる。この点は S—S 結合を還元アルキル化した IgG が補体活性化能を失うことと考え合わせると興味深い。

¹H-NMR による血漿アルブミン構造転移の研究

長岡俊治, 恵良聖一, 桑田一夫, 曾我美勝 (岐阜大・医・生理)

亘 弘, 志賀 潔 (生理研)

ウシメルカプトアルブミン (BMA) の N-F 転移 (pD 4.15 ~ 4.90), N-B 転移 (pD 7.4 ~ 9.4) を 360MHz ¹H-NMR を用いて研究した。F 型 (pD 4.03) では N 型 (pD 5.32) に比し -CH₃ 等の脂肪族側鎖, His, 芳香族側鎖のスペクトルはシャープで変性状態の蛋白質, 酸膨潤型 BMA に似たスペクトルを示す。N-F 転移における α -ヘリックス含量の減少は 72% から 60%, 固有粘度の変化は, ほとんどない。これらの結果と酸滴定データの解析より, NMR スペクトル変化は N-F 転移において, 側鎖が可動化, 無秩序化 (side chain melting) することを示唆している。

スピン拡散測定 (HDO シグナルより -7.18ppm, $\gamma H_2/2\pi \sim 107\text{Hz}$ 照射) より交叉緩和時間 (T_{is}) を求めた。一般にどの側鎖でも T_{is} (F 型) > T_{is} (N 型) で, N 型が F 型に比し, かたいことを示している。HDO より 2.40ppm (芳香族側鎖), $\gamma H_2/2\pi \sim 69\text{Hz}$ 照射によるスピン拡散測定でも, 同様の結果を得た。また, T_{is} (N 型) ~ T_{is} (B 型) で, N 型, B 型にはかたさの差はないだろう。

T_1 (HDO) の N 型, F 型 BMA 濃度依存性より結合水量を求めた。N 型, F 型の水和量は, それぞれ 1.3 g/g, 1.0 g/g であった。

フィブリノーゲンの構造と機能

佐々木勲 (名古屋保健衛生大・医・生理)

血漿フィブリノーゲンは均一なタンパクであると長い間考えられてきた。しかし, 最近 10 年ほどの間に, 電気泳動, クロマトグラフィーによって heterogeneity が想像されるようになった。すなわち, 正常ヒトフィブリノーゲンの 30~40% の部分は, 分子量のやや小さい分画より成ることを示す事実が提示された。

我々は, これらのフィブリノーゲン各分画を容易かつ大量な採集する方法を初めて開発した。すなわち, 正常ヒト血漿を, イオン強度 0.2 及び, 1.4 のもとでグリシンで塩析すると, 前者では高分子分画が, 後者では低分子分画が容易に高い純度で採集されるのである。

こうして得られた二分画の各々は, 電気泳動的にも超遠心的にも単一のピークを示す。二分画の間の化学構造の差としてこれまでに判明したものは, 低分子分画においては, 一本の α 鎖の C 末端から分子量 37,000 に相当する部分が欠損している点である。これ以外の点では, N 末端に

も、2次構造にも、両者の間に差は認められない。

しかし両者の凝固能の間には大差がみとめられる。すなわち、高分子画分が正常の凝固能を示すのに対して、低分子画分は凝固速度、生成したフィブリンの機械的強度、線維の太さ、などの点で著しく劣っている。また生理的条件下で高分子デキストラン硫酸エステルと共存した場合、低分子フィブリノーゲンが全く沈澱を与えないのに反して、高分子フィブリノーゲンの60~70%が沈澱する。

このように生理機能に大差のある低分子画分が正常人フィブリノーゲンの30%を占めている事の生理的意義は何であるか、また低分子画分はいかなるメカニズムで生ずるのか、これらの点について、さらに研究を進めつつある。

組織性プラスミノーゲンアクチベータのフィブリン分解特性

松尾 理（近畿大・医・生理）

線溶現象に対する理解は、 α_2 -プラスミンインヒビター、 α_2 -アンチプラスミン（以下APと略）の発見と、さらにその先天性欠損患者の病態生理解明を契機として飛躍的に発展した。すなわち、APはプラスミンと瞬間的に反応してプラスミン活性を阻害し、またAPは活性型第XⅢ因子の作用によりフィブリンと架橋結合し、フィブリン分解に対して阻止的に働く。また、フィブリノーゲン（以下fgと略）がフィブリンに転換するさい、血漿中のプラスミノーゲン（以下plgと略）がその分子構造中に有するlysine binding sites（以下LBSと略）を介して吸着される。また血漿中ではAPの約30%がplgとLBSを介して可逆的な複合体を形成している。

血栓溶解療法は血栓の主たる構造蛋白であるフィブリンを線溶系の酵素により分解させる目的で行われるが、現在使用されているウロキナーゼ（以下UKと略）やストレプトキナーゼ（以下SKと略）は血漿中のfgなどを分解し、出血蛍光に陥る欠点がある。したがってフィブリンのみを特異的に分解し、fgを分解しない酵素が望まれるところである。本報告では、その目的で開発された組織性プラスミノーゲンアクチベータ（以下TPAと略）のフィブリン分解特性について述べる。このTPAはフィブリンという「固相」上に限局して線溶活性化を惹起させ、「液相」である血漿中では線溶活性化を惹起させない性質を有する。すなわち、TPAはフィブリン上にLBSを介して結合したplgを活性化させプラスミンを生じさせフィブリン分解を惹起させる。このプラスミンはそのLBSがフィブリンあるいはFDPにより占拠されている間フィブリン分解作用を発揮する。フィブリン上ではAPが架橋結合しているため、AP作用は血漿中に比して非常に緩徐である。フィブリンが分解されるとプラスミンが血漿中に放出され、APにより瞬間的に失活させられる。従来のUKおよびSKが「液相」中での線溶活性化を惹起させるのと著しい対比をなしている。このようなTPAのフィブリン分解特性は、in vitro実験およびin vivo実験のみなら

ず、臨床例においても観察され、今後、広範な臨床応用が可能になると思われる。しかしながら、フィブリン分解特性を発揮させる構造的裏付けは未だ解明されていない。

分光学的測定によるプラスミノーゲンの立体構造の研究

高田明和（浜松医大・生理）

プラスミノーゲンはN末端にグルタミン酸をもつ Glu-plg が生体内に存在するが、生成されたプラスミンにより67ヶのN末端ペプチドが切断される。ANSを用いるとN末端、切断された Lys-plg はタンパク表面が若干 hydrophilic になることがわかる。また plg には2本の糖鎖をもつ plg I と糖鎖を一本もつ plg II が存在するが、CD、蛍光分光等で plg I の方が plg II より tight な構造をしており、リガンド（リジン等）が結合した際の立体構造の変化は plg I の方が大きい。蛍光偏光の解消を用いると plg にリジン類似物質（EACA 等）のようなリガンドが結合するとN末端の部分の動き（ブラウン運動）がよくなり、構造変化の一因をうかがわせる。リガンドの影響としてはEACAとトラネキサム酸はリジンの α アミノ基が除かれたような形をしており、plgのH鎖のリジン結合部位（LBS）と結合するがトラネキサム酸はEACAにくらべplgとの結合定数が大のみでなく、構造変化をおこす程度也大であり、その変化は3次構造のみでなく2次構造にもおよぶ。

CCK-PZ およびそのアナログの二次元 ^1H -NMR

中沢 隆（奈良女子大・理）

亘 弘（生理研）

Cholecystokinin-pancreozymin (CCK-PZ) は33個のアミノ酸残基からなり、消化管ホルモンとして単離され構造決定されたが、そのC末端オクタペプチド（CCK-8）が脳内にも多量に存在し、中枢神経系でneuromodulatorとしての機能を持つことがあきらかになった。CCK-8の構造は $\text{H-Asp}^1\text{-Tyr}^2(\text{SO}_3\text{H})\text{-Met}^3\text{-Gly}^4\text{-Trp}^5\text{-Met}^6\text{-Asp}^7\text{-Phe}^8\text{-NH}_2$ でチロシンのフェノール性水酸基が硫酸エステル化され、C末端がアミドになっていることが特徴的で、かつ活性発現に必須である。また、グリシンからC末端まで5個のアミノ酸配列はガストリン（胃液分泌促進作用を持つ消化管ホルモン）の末端構造と一致している。さらにC末端テトラペプチド（CCK-4）とCCK-8とは膵消化酵素素に関して異なる放出活性を示す。このようなCCK-PZとそのフラグメントの多様な生理作用は、主として異なる種類の受容体の存在によるものとして説明されているが、各々の受容体に識別されるべき安定な部分構造がCCKにいくつか存在することも考えられ

る。したがって CCK-8 についての立体構造と上に示した多様な生理機能との相関を探ることが必要である。

二次元スピノエコー相関 $^1\text{H-NMR}(\text{SECSY})$ と二次元 NOE 相関 $^1\text{H-NMR}(\text{NOESY})$ を用いて CCK-8 の全シグナルの帰属を行った。さらに N 末端あるいは C 末端を欠いた数種のアナログについても同様にシグナルの帰属を行ない、CCK-8 の結果と比較した。その結果、活性の著しく低いアナログがかなりランダムな構造をとるのに対し、CCK-8 のみに Tyr² のアミドプロトンと Met⁶ のカルボニル基との間に分子内水素結合が存在し、環状構造を取ることが結論された。この構造によれば Met³、Trp⁵ および Met⁶ の Hydrophobic な側鎖が分子内部に集まり極性側鎖がそのまわりをとりかこんでいる。C 末端の Phe⁸ はこの rigid な部分からつき出ている。これによって Asp⁷ のアミドプロトンについて観測された水分子との強い相互作用が近傍の解離性基の影響によるものと説明することができる。また水の存在によってこの構造が大きく影響を受け、NMR スペクトル上では Gly⁴ の α -プロトンの非等価性において顕著にあらわれる事が見出された。つまり Hydrophobic な環境ではグローブラーなコンホメーションをとり、Hydrophilic になるとランダムな構造になるという知見が得られた。

『自律神経中枢機構の研究会』

昭和59年 3月16日～17日

3月16日（金）

開会挨拶

（生理研）入沢 宏

視床下部下垂体機能の加齢変化

（横浜市大・生理）有田 順

CRF 脳室内投与と交感神経副腎髄質系反応

（都老人研・生理）黒沢美枝子

視床下部による下垂体機能の調節

（京大・医・内科）加藤 譲

視床下部と自律機能 —— HRP を用いた視床下部の自律系への入出力を中心に

（佐賀医大・解剖）千葉胤道

中枢内カテコールアミンとセロトニンニューロン —— 視床下部を中心に

（京都府医大・解剖）河田光博

中枢内ペプチドニューロン —— 視床下部を中心に

（京都府医大・解剖）井端泰彦

最近の睡眠物質研究について

（生理研・所長）内菌耕二

3月17日（土）

下垂体後葉機能の最近の研究の動向

（産業医大・生理）河南 洋

中枢性ノルアドレナリン線維とペプチドの共存 —— NTY について

（信大・生理）大橋俊夫

下垂体後葉系の性差

（新潟大・生理）佐久間康夫

性行動と大脳皮質

（生理研）栗生修司

視床下部スライス標本を用いた最近の研究の動向

（佐賀医大・生理）堀 哲郎

無麻酔動物における視床下部の研究

（循環器病セ）二宮石雄

脳循環調節と NTS —— 一部 ADH 分泌の研究についても

(循環器病セ) 中井正継

尿道外括約筋支配の運動ニューロンの電氣的性質

(東大・医・脳研) 佐々木光美

自律神経中枢機構

佐藤昭夫 (東京都老人研・生理)

概要

本年度の「自律神経中枢機構」に関するセミナーは、生理研の入沢宏教授の御協力により、視床下部機能に重点をおいて、プログラムを作成した。

まず、今回のセミナーで取り上げられた重要な問題について個条書きで述べ、続いて個々の演者により書かれた抄録を紹介する。

A. 今回のセミナーにおける話題の焦点

- 1) 中枢神経系に、特に視床下部を中心に化学伝達物質について考慮する必要がある。アミン系物質とポリペプチド系物質について、例えば、ノルアドレナリン、アドレナリン、ドーパミン、セロトニン、オキシトシン、バゾプレシン、CRF、VIP、TRF、NT、GRP、エンケファリン等々について。
- 2) 上に述べた伝達物質の組織学的存在と機能との相関について。
- 3) 中枢の解剖と生理の一致について。
- 4) 自律神経中枢と内分泌中枢とについて。
- 5) 自律神経系の中枢を考える際に末梢系の機能についても関連させながら、考えることが大切である。
- 6) 中枢を研究するにあたって slice 実験の意味について。自律機能と運動機能との対比の必要性について
- 7) 末梢における異なる種類の化学伝達物質の Co-existence について。
- 8) 中枢実験における無麻酔動物を使用する必要性。
- 9) 自律機能研究における反射性反応解析の重要性と中枢の電気刺激実験のもつ意味。

B. 以下、各演者の抄録を発表順に紹介する。

視床下部垂体機能の加齢変化

有田 順（横浜市大・医・生理）

老齢ラットにおいて見られる高プロラクチン血症の発現機構に、プロラクチン分泌抑制因子であるドーパミンが視床下部及び下垂体において、どの様に関与しているかについて検索を行なった。老齢ラットの高プロラクチン血症は、少なくとも、視床下部の tyrosine hydroxylase (TH) 活性低下を伴う、門脈血へのドーパミン放出減少によることが明らかとなった。この TH 活性の低下は、TH 陽性ニューロンの数の減少によるものではなく、TH のチロシンへの親和性の低下によるものであることが示唆された。一方、下垂体組織中のドーパミン濃度の増加、ドーパミン受容体数の上昇、プロラクチン細胞中の非プロラクチン分泌顆粒—低密度分画中のドーパミンの選択的増加の結果は、下垂体におけるドーパミン処理機構も、加齢に伴って変化することを示唆している。

CRF 脳室内投与と交感神経副腎髓質系反応

黒沢美枝子（東京都老人研・生理）

〔目的〕

ストレス時には、副腎皮質ホルモンと副腎髓質ホルモンの分泌高進がおこる。その際、副腎皮質ホルモン分泌高進は、視床下部からの CRF (Corticotropin Releasing Factor) が下垂体前葉からの ACTH 分泌を賦活した結果起こることが明らかにされている。他方、副腎髓質ホルモン分泌増加に関しては、その分泌を支配する副腎交感神経活動増加の中枢内機序がこれ迄のところ不明である。米国の Brown らは、CRF 交感神経—副腎髓質系をも賦活する可能性を示唆しているが、まだその直接的証拠はない。そこで、ストレス時に CRF が視床下部から放出されると考えて、ハロセン麻酔下でラットの副腎交感神経遠心性活動と副腎からのカテコールアミン（エピネフリンとノルエピネフリン）分泌を測定し、それに対する CRF 側脳室内投与の効果を調べた。この際、循環系に対する CRF の効果をも知る目的で、その大半が血管壁を支配すると言われる腎臓交感神経の遠心性活動も同時記録した。

〔結果及び考察〕

CRF 0.5nM, 5 nM 脳室内投与により、副腎交感神経遠心性活動は、徐々に増加し、投与後30～40分後に、各々30%, 40%の増加に達した。増加した活動は、その後減少の傾向を示したものの、投与後90分を経ても、もとの level に戻らなかった。副腎髓質からのエピネフリン、ノルエピネフ

リン分泌も CRF 投与により、同様な増加を認めた。また、CRF は副腎髄質機能ばかりでなく、腎臓交感神経活動も同様に高進させた。

以上の結果より、CRF は ACTH—副腎皮質系のみならず、交感神経—副腎髄質系を賦活することが明らかにされた。これらの結果は、CRF がストレス時に、内分泌系および交感神経系の活動を変える共通の mediator として働きうることを示唆するものと考えられる。

視床下部による下垂体機能の調節

加藤 譲（京都大・医・内科）

下垂体プロラクチン (PRL) の分泌は、視床下部の PIF (prolactin inhibiting factor) によって抑制的に、一方 PRF (PRL releasing factor) によって促進的に調節されている。PIF の本体は dopamine と考えられる。PRF の本体はなお十分明らかではないが、TRH, VIP, PHI など候補にあげられる。ヒトやラットにおいて、セロトニン (5-HT) の前駆体 5-HTP を末梢投与したり、ラットの脳室内に 5-HT を注入すると PRL 分泌は促進される。この反応は、reserpine や α -methyl-p-tyrosine の前投与によって脳内カテコラミンを減少させたラットにおいても認められ、PIF の変化を必ずしも伴わない。下垂体前葉細胞を用いる in vitro の系では 5-HT の添加は PRL 分泌に影響を与えない。従って 5-HT は PRF 分泌を促進させることによって PRL 分泌を亢進させると考えられる。VIP は下垂体門脈内に高濃度に存在し、下垂体前葉細胞に直接作用して PRL 分泌を促進する。下垂体門脈血中 VIP は 5-HT の脳室内投与によって増加する。視床下部切片を用いる in vitro の灌流系においても、5-HT の添加は視床下部 VIP 放出を促進する。この反応は cyproheptadine によって阻害される。さらに抗 VIP 家兔血清を脳室内または単一下垂体門脈内に注入したラットにおいては、正常家兔血清投与群にみられる 5-HT 脳室内投与に対する PRL 分泌は明らかに抑制される。従って 5-HT による PRL 分泌促進機序の少なくとも一部は視床下部 VIP 分泌を介するものと結論される。現在知られている 3 群の opioid peptides はいずれも PRL 分泌を促進する。Met⁵-enkephalin の誘導体 FK33-824 は静脈内投与によっても強力な PRL 分泌促進作用を有する。しかしこの作用は reserpine, α -methyl-p-tyrosine または pimozide の前投与によって脳内カテコラミンとくに dopamine 機序を阻害したラットにおいては認められない。In vitro の系では FK33-824 の添加は単独で下垂体 PRL 分泌に影響しない。また dopamine の PRL 分泌抑制作用にも拮抗しない。従って FK33-824 は視床下部 dopamine の分泌を抑制することによって PRL を促進させると考えられる。一方 GRP や TRH の誘導体 DN-1417 の脳室内投与は FK33-824 による PRL 分泌を抑制する。視床下部切片灌流系を用いる in vitro の実験においても GRP や DN-1417 の添加は dopamine 分泌を促進する。従って GRP, DN-1417 は視床下部 dopamine 放出を介して opioids の PRL 分泌作用を抑制すると推定され

る。

視床下部と自律機能＝HRP 法による視床下部自律系の入出力

千葉胤道（佐賀医科大・解剖）

神経線維連絡の研究法としてはHRPが広く用いられているが、その摂取、輸送のメカニズムの解析は不十分である。従って、変性法、組織化学的方法等他の手段による成績との対比や、結果の評価に問題を残している。WGA-HRP 法は、通過線維よりの取込みが無視出来ること、順行性によく運ばれること、感度が高いことなどの特徴を有する。視床下部視索前野内側核を例に、WGA-HRP 注入による線維連絡の結果をみると、A)視床下部外との連絡 1)相互性結合のある核―側座核、中隔核（外側、内側）、分界条床核、扁桃体（内側核、中心核）、海馬、脚傍核、縫線核、2)出力のある核―尾状被殻、手綱核（外側）、視床、外側視索前野、不定帯、黒質、背外側被蓋核、結合腕傍核、楔状核、3)入力のある核―海馬鉤、B)視床下部の連絡 1)相互性結合のある核―室傍核、背内側核、腹内側核、弓状核、後核、2)出力のある核―乳頭体上核、正中隆起、3)入力のある核―腹側前乳頭体核となる。この大部分の結合の伝達物質は不明で、縫線核より5-HTが、視床下部前核外側よりP物質線維の入力が知られるのみである。延髄よりの入力があるという報告を確認することは出来なかった。中脳への出力は両側性であった。起始細胞、終末の核内における局在、シナプス構造など詳細な対応関係の解析が残された課題と思われる。また、いわゆるAV3V領域の視束前野中心核の線維連絡とその血圧調節中枢としての役割についても考察した。

視床下部におけるカテコールアミンならびにセロトニン線維の分布

河田光博（京都府立医大・解剖）

アミンニューロン系の形態学的研究法は、近年、蛍光組織化学法から免疫組織化学法へと変わりつつある。免疫組織化学法には、アミンそのものの抗体を用いる方法と、アミン合成酵素に対する抗体を用いる方法の二種が区別される。今回のセミナーでは、蛍光組織化学法（FIF, GA）と、ドーパミンからノルアドレナリンへの転換酵素であるdopamine- β -hydroxylase (DBH)に対する抗体ならびにセロトニン抗体を用いるPAP法により、視床下部におけるカテコールアミンおよびセロトニン線維分布を報告した。動物種による差異は認められるが、一般的に室傍核、視索上核、弓状核にはセロトニン線維は極めて少なく、交叉上核（サルを除く）、視束内側核、腹内

側核，乳頭体核には豊富なセロトニン線維が終末していた。これに対しカテコールアミン線維は，セロトニン線維の分布と相補的關係にあり，セロトニン分布の少ない領域にはカテコールアミン線維は豊富に分布するが，セロトニン線維が多く存在している部位にはカテコールアミン線維は少数しか認められなかった。また，室傍核，視索上核では，パソプレッシンニューロンの細胞体にとくに密なノルアドレナリンの線維終末が観察された。

中枢内ペプチドニューロン

—視床下部を中心に—

岡村 均（京都府立医大・解剖）

視床下部内には多種類のペプチドが存在し，その数は10数種類にも達している。一方免疫組織化学の導入により，それらのペプチドニューロンの形態学も非常に進展した。その結果，今まで一様なニューロンからなると思われてきた一つの神経核の内に，数種類のペプチドニューロンが存在することがわかった。たとえばラット視交叉上核には，パソプレッシン，VIP，ソマトスタチン，GRPの4種のペプチドニューロンが存在する。各々のペプチドニューロンの核内における分布には特徴があり，パソプレッシンニューロンは内側背側に多く，核の吻側端から尾側端まで存在している。VIPニューロンは外側底部に多く，核の尾側部には存在しない。ソマトスタチンニューロンは，パソプレッシン及びVIPニューロンに比して非常に数が少ない。GRPニューロンはVIPニューロンと非常によく似た分布を示す。ラット視交叉上核のペプチドニューロンの個体発生を検索すると，VIPニューロンは胎生18日より出現し，生後第2週に成熟ラットと同じ像を呈する。これに対し，パソプレッシンニューロンは，生後3日から9日の間に出現し，急速に成熟する。

これらのペプチドがアミンと1つのニューロン内に共存することは現在までいろいろな種類のペプチド・アミンについて言われているが，視床下部においては，弓状核においてドーパミンとニューロテンシンが共存する。

この様に同一細胞内に2種類の物質が存在することは，ペプチド・アミンのみならず，ペプチド・ペプチドの共存も現在検索されており，これらの神経伝達物質，神経修飾物質の機能解明に重要な示唆を与えると思われる。

視床下部室傍核による循環系調節

河南 洋・山下 博（産業医科大）

視床下部室傍核（PVN）は、下垂体後葉からのバソプレッシン・オキシトシン分泌調節以外に自律機能、特に循環系の神経性調節に関与していることが示唆されている。このPVNへの循環末梢受容器からの求心経路およびPVNから延髄と脊髄への下行性投射経路について電気生理学的に調べた。延髄腹外側部ニューロンが循環系圧受容器からPVNバソプレッシン分泌ニューロンへの求心経路に介在していること、またPVNニューロンは迷走神経背側核群および脊髄中間外側核へ直接投射していることが判明した。PVNは神経内分泌系および自律神経系を協調的に統御し、循環系の恒常性維持に働いているものと思われる。

中枢性ノルアドレナリン線維とペプチイドホルモンの共存——NPYについて

大橋俊夫（信州大・医・生理）

最近、自律神経学の研究にいくつかの大きな進歩がみられ、その1つに中枢ならびに末梢のアミン作動性神経・神経節細胞におけるノルエピネフリンとpancreatic polypeptide (pp) 共存の発見がある。特に自律神経中枢・視床下部において、ventralならびにdorsal noradrenergic fiberとppがきわめて顕著に共存していることが組織化学的に証明されてきた（Jacobowitz & Olschowska, Peptides 3; 569-590, 1982）。同時に、ppと同族のアミノ酸配列を持つ新しい脳ペプチイドホルモン、neuropeptide Y (NPY) もこうした自律神経中枢部に多量分布していることが γ -radioimmunoassay法を用いた生化学的検索より明らかになってきた（Adrian et al., Nature 306, 584-586, 1983）。またppとNPYは免疫学的に交差反応を示すことも知られ、両物質に共通するC末端より6つのアミノ酸結合部（-Leu-Thr-Arg-Pro-Arg-Thr-NH₂）に免疫活性の存在することが判ってきた。一方、交感神経末端に共存するppはバースト様電気刺激によって分泌される可能性も示唆されている（Olschowska & Jacobowitz, Peptides 4; 231-238, 1983）。そこでわれわれは、両物質共存の生理学的意義を解明するために、この共存が最も顕著に証明されているラット輸精管を用いて実験を行った。その結果、NPYならびにpp（特にbovineならびにhuman PP）は交感神経末端に分布するペプチイド受容体を介してノルエピネフリン分泌を長時間にわたってnegative feedback的に制御するneuromodulatorとしての作用を有していることが判明した（Ohhashi et al., Peptides 4; 381-386, 1983）。

視床下部一下垂体後葉系における性差：出生直後の男性ホルモン投与による エストロジェン感受性の変化

赤石隆夫，坂口武夫，佐久間康夫（新潟大・医・生理）

従来エストロジェンによるオキシトシン分泌の促進は，内側視索前野などからの経シナプス性効果と考えられてきた。我々は成熟後に卵巣を摘除した雌ラットにおいて，ウレタン麻醉下に下垂体後葉に投射する室傍核ニューロンを逆行性に同定し，放電パターンから散発型と群発型の2群を分類した。この2群の間で，実験前2日間にわたって投与した $20\mu\text{g}$ のエストラジオール・ベンゾエートの効果を逆行性興奮閾値，反応潜時，不応期および自发放電頻度を指標として比較したところ，オキシトシン産生細胞に相当するとされている散発型放電群においてのみ，経シナプス性入力に加え個々の細胞レベルでも興奮性が有意に上昇している所見を得た。出生後第5日にテストステロン・プロピオネート 1.25mg を投与し連続発情とした雌ラットで成熟後同様の比較を行ったところ，エストロジェンは経シナプス性の促進は起こしたが，細胞レベルでの効果は見られなかった。オキシトシン細胞については自律神経性調節への関与が近年示唆され，我々も室傍核神経分泌細胞の選択的興奮が経神経性に胃運動を抑制することを認めている。血糖値や酸分泌反応において雌雄ラット間に見られる性差と今回の観察の関連について今後検討を進めたい。

サル性行動の中枢調節機構

栗生修司（生理研）

サルの性行動の中枢調節機構の解析のため，破壊および刺激実験でその関与が示唆されているオスアカゲザルの内側視索前野および視床下部背内側核のニューロン活動を性行動遂行中に記録した。

発情オスザルの内側視索前野ニューロンの約70%は性行動の開始前に活動が亢進しており，メスの接近から性行動遂行中（マウント／スラストを3—30回反復）にかけて活動が持続的に低下した。射精後活動はさらに低下し10—60分の経過で回復した。ニューロン活動の回復と行動的不応期の回復との時間経過が一致した。一方，視床下部背内側核ニューロンの約60%はマウント／スラスト遂行時に一致して活動が上昇した。非発情オスザルの内側視索前野では，メスザルの呈示で活動変化するニューロンは約20%しか存在せず，しかも興奮性反応であった。以上の結果は内側視索前野と背内側核が性行動の制御においてそれぞれ欲求系および遂行系に関与していることを示唆する。内側視索前野の電気刺激が副交感系の反応を起し，背内側核の刺激が交感系の反

応を起すことが知られているが、自律神経系と行動の相互関係を考えると興味深い。

視床下部スライス標本を用いた最近の研究の動向

堀 哲郎（佐賀医科大・生理）

摘出脳スライス標本に電気生理学的手法が導入されたのは1961年であるが、世界的に広汎に用いられるようになったのは最近の10年間である。in vivo 標本や組織培養標本と比較してこの方法が備えている利点と限界をわきまえた上で、研究目的と研究対象部位の特殊性を考慮に入れ、様々な実験が視床下部ニューロンにおいて行われている。ここではそれぞれの特徴を生かして行われた Glucoreceptor ニューロン（大村，小野ら），室傍核および視索上核ニューロン（Mason，山下，Hattonら）や視交叉上核ニューロンにおける生体リズム機構解析（大村ら）などの研究を簡単に紹介し，更に我々が行っている視床前野の温度感受性ニューロンのスライス標本における知見を述べた。その結果，①視床前野にはそれ自体，温度に反応する primary の温度感受性ニューロンと直接は温度に反応しない 2 次ニューロンとが存在する。②発熱物質，解熱薬，各種アミン，ペプチドなどに反応し，その反応の方向はこれら物質が惹起する体温調節反応の方向とよく対応する。③視床前野の温ニューロンの約半数が局所高滲透圧（閾値 5 mOsm/kg 以下）で抑制され，これが脱水時の熱放散反応の抑制の少くとも一部は説明でき，温度ニューロンは体温調節のみならず，広い意味の環境適応性の自律性及び行動性反応に関与する可能性も指摘した。最近の動向としてスライス標本と whole body 標本との知見が相互に強化し合う様に，また組織学的，神経化学的あるいは免疫学的手法を組み合わせる多角的に攻略する方向へと研究が特に視床下部において進展しつつある。

視床下部による循環調節の研究

二宮石雄（国立循環器病センター研究所）

心臓および血管は自律神経系を介して高位中枢神経系によって調節されているが，その詳細は未解決である。そこで，高位循環中枢として重要な役割を演じていると考えられる視床下部について，主として電気刺激実験から導かれた結果をもとに無麻酔下での関与について述べてみたい。

〔方法〕

家兎（2.5～3.0kg），軽度ネブタール麻酔下，パンクロニウムブロマイドで不動化し，人口呼吸下で血液ガスを正常値に保ちながら下記の実験を行った。

視床下部の電気刺激は同軸刺激電極 ($\phi=0.1\text{mm}$), 負の矩形波電流 (2.5V, 2.0msec, 40Hz) で, 正中面から左右2mm, 外側:前後6mmにわたり, 各1mmおきに, それぞれ73点を選び刺激した。全例で, 心臓交感神経活動 (CSNA), 腎交感神経活動 (RNA), 心拍数 (HR) および動脈血圧 (AP) を同時に計測し, 刺激に応答した変化を調べた。

〔結果および考察〕

CSNA, RNA, HR, および AP はそれぞれ73点の刺激に対して特徴的に変化した。この様に刺激の場所に対応した応答は, もし無麻酔下で各種の行動等と関連して, 刺激点の近くの細胞あるいは線維の興奮した場合, それぞれ異なった組合せの心・血管運動制御信号の発生と心拍および動脈血圧の変動が出現することを示唆している。

CSNA および RNA の増加, 不変, 減少の応答から9つの組合せのパターンに分類し, それぞれの出現頻度を調べると約60%が定性的に異なる応答を示した。CSNA の減少と RNA の増加の組合せパターンが14~17%にみられた。その多くは前と後視床下部の中間部であった。一般に, CSNA を増加さす領域は RNA を増加さす領域よりも限局しており, 主として後視床下部にみられ, 抑制さす領域によってとりかこまれている。又, 心拍を増加させる領域も動脈圧を増加さす領域よりも限局している。

CSNA を増加さす領域と HR を増加さす領域は大体一致しており, 後視床下部の興奮による HR の増加は直接 CSNA の増加を介して行われていることを示しており, 他方, 動脈圧を上昇さす領域と RNA を増加さす領域は極めてよく似た分布を示している。これは視床下部による各種の行動と関連した動脈圧の決定が, 心拍数の増減よりもむしろ末梢血管抵抗の増減に基づいていることを示唆している。

孤束核を起始とする中枢神経統合の VASOPRESSIN 分泌及び脳血管の調節機能

中井正継 (国立循環器病センター研究所循環動態機能部)

心臓血管反射性機序の脳血管に対する影響は僅かであり, また自然発症高血圧ラット (SHR) では, 反射性機序によって調節されている VASOPRESSIN の分泌機能の異常が SHR の高血圧の成因及び維持に関わらないと言われている。我々は反射弓求心性線維の終末が集中している孤束核 INTERMEDIATE PORTION を電気刺激する事によって, 遠心脚の持つ脳血管及び VP 調節機能を評価した。笑気麻酔, 人口吸収下のラットを用い, 頸髄と迷走神経を切断し, 脳血流量 (CBF) は Kety 法, 血清 VASOPRESSIN 濃度 (pVP) は RADIOIMMUNOASSAY 法によって計測したところ, 閾値の2.5倍の刺激は大脳皮質 CBF を1.8倍 ($n=21$) に増加し, $50\mu\text{A}$ の刺激は pVP を WISTAR ラットで 416 ($n=16$), SHR で 681pg/ml ($n=11$) まで増加させた。従来は反射性機序全体の機能を評価し否定的な結論を得ているが, その遠心脚は脳血管に対しては拡張

性に調節し、VP分泌機能についてはSHRでは異常に亢進している事が分った。

ネコの外尿道および外肛門括約筋運動ニューロンの電氣的膜特性

佐々木光美（東京大・医・脳研・生理）

外尿道および外肛門括約筋は横紋筋で構成されているが、膀胱や直腸と密接に関連して働いている。また括約筋は脊髄性ショックからの回復が早いことなどが報告されており、骨格筋運動ニューロンとは何らかの点で異なる特異的な性質をもつことが示唆される。本研究ではこの点に着目し、ネコの括約筋運動ニューロンから細胞内記録を行って逆行性活動電位及び矩形波通電による過渡応答などの膜の電氣的性質を解析するとともに、細胞内にHRPを注入してニューロンの形態を観察し、後肢運動ニューロンと比較検討した。軸索伝導速度(CV)と膜入力抵抗(R_N)及び細胞体の大きさの関係をみると、CV(16-80m/S, 平均 35 m/S)が遅い細胞ほど R_N (2.6-9.0M Ω)は大きく、細胞体(23-33 μ)も小さいという相関がみられた。 R_N 及び細胞体の大きさをCVに対してプロットすると、両者とも下腿三頭筋運動ニューロンの回帰直線の延長線上にあった。このことは、CV及び R_N は支配する筋の種類によらず細胞の大きさの指標になりうることを示している。一方後過分極(AHP)、時間(60-155ms)は R_N と相関を示したが、AHP時間は下腿三頭筋運動ニューロンと同じ範囲にあるにも関わらず R_N ははるかに大きかった。後肢では早い筋を支配する運動ニューロンほどAHP時間が短いことが知られており、小型である括約筋運動ニューロン群にもこのような対応があるものと思われる。従ってAHP時間は細胞の絶対的な大きさの指標にはならず、むしろ筋の機能に関係した指標になることが示唆される。等価シリンダーモデルから推定した ρ (樹状突起と細胞体のコンダクタンス比)は後肢運動ニューロンの約1/3の値を示し、樹状突起の拡がりが小さいことが推察されたが、形態学的にも一致する結果が得られた。膜時定数(2.5-11ms)も R_N と正の相関を示した。単位膜容量を一定と考えると、 R_N の大きい細胞ほど単位面積あたりの膜抵抗(R_m)が大きいことが示唆され、細胞が小さいだけでなく、 R_m の増大によっても R_N を増大させているものと考えられる。過分極性矩形波通電を次第に強くすると、膜電位はピークに達した後指数関数的に減衰して定常状態に達し、 R_N も小さくなっており、著明な異常整流機構の存在が認められた。この異常整流作用により、過分極性あるいは抑制性入力は弱められることとなり、一方、興奮性入力が入ってきた場合、脱分極方向で膜抵抗は大きく、細胞が小さいことと合わせて大きな興奮性を起こすものと考えられる。この事は、括約筋が脊髄性ショックからの回復が早いことの一つの説明になるものと思われる。

〔昭和57年度研究会・追加〕

『画像処理の現状と問題点』

昭和57年 3月19日～ 3月20日

浜 清（生理研）

塚原伸晃（生理研）

〔発 表〕

- | | |
|----------------------|---|
| 1. 福村晃夫（名大・工学部） | 濃淡画像と線画像の処理 |
| 2. 田村進一（阪大・基礎工学部） | 三次元表示手法 |
| 3. 桐谷道雄（阪大・基礎工学部） | ステレオ観察の実際と効用 |
| 4. 若林健之（東大・理学部） | 蛋白質分子の電顕像のフーリエ解析による画像処理及び三次元再構成 |
| 5. 渡 仲三（名市大・医学部） | |
| 6. 堀田康明（名市大・医学部） | 医学，生物学特に形態学分野におけるパーソナルコンピュータの応用 |
| 7. 岡田幸助（岩手大・農学部） | ヘルペスウイルスコアの立体構造の解析 |
| 8. 馬場直志（千葉大・工学部） | 電顕投影像からの立体像再生 |
| 9. 斎藤基一郎（筑波大・基礎医学系） | 神経細胞とシナプスの計量形態計測システムの開発
—半自動対話型計算機— |
| 10. 大村 裕（九大・医学部・生理研） | 単一ニューロンの形態と機能 |
| 11. 植田 夏（京大・化学研究所） | 高分解能電顕像への画像処理 |
| 12. 前田 純（生理研） | 画像処理システムを用いた神経細胞の形態計測
—光顕標本処理システムと電顕写真の画像処理— |
| 13. 高木幹雄（東大・生産技術研究所） | 東京大学生産技術研究所における顕微鏡画像処理に関する研究 |

〔討論参加者〕

西村陽三・斎藤多久馬・中 研一・日比野倫夫・藤吉好則・川人光男
中村 真・井上芳朗・藤沢浩四郎・内菌耕二・山岸俊一・有井達夫

概要

電子顕微鏡像，光学顕微鏡像等による試料観察において，とくに細胞内粒子の定量化や立体像

の再構成は生物試料における細胞および細胞内の各種構成要素の形態および機能の解明に多大の寄与をすると考えられる。これら情報の処理方式の問題は、これからの重要課題と思われる。この問題点について方式の面からと応用の面からそれぞれ専門の研究者に出席して頂き「画像処理の現状と問題点」に関しての研究発表および討論を通して新しい研究展開の糧とすることを期待した。

(浜 清)

1. 濃淡画像と線画像の処理

福村晃夫 (名古屋大・工学部)

画像処理の現状を示す目的で、従来われわれの研究グループでおさめて来た次の研究成果を紹介する。

(1) 胸部X線写真自動読影システム

間接撮影胸部X線写真の自動読影を目的として開発されたソフトウェアシステムは、AISC-R-V3と呼ばれ、写真中から異常陰影を検出することを目標とする。はじめにシグネチャ法により解析範囲を決定し、ついで、1次、2次差分フィルタを用いて肺野および心臓輪郭線を抽出する。このとき、細線化、その他のアルゴリズムが使用される。このようにして限定された処理範囲の中で、一方では肋骨境界線、血管影が抽出され、他方では異常陰影候補領域が抽出される。これらの処理の基本操作は2次差分フィルタである。最後に、候補領域の位置、大きさ、濃度の情報に基づいて異常、正常の判定が行われる。

(2) 生体組織電顕写真像の処理

(a) か粒の半径と数の計測 与えられた写真は典型的なテクスチャ像であり、目視によって分類された4つのパターンについて濃度ヒストグラムを求め、それに基づいてか粒領域を決定する。か粒の抽出はしきい値操作に基づくが、2個以上のか粒のつながりと、表層から沈んでいるか粒の除外の問題を解かなくてはならない。前者は距離変換で解決し、後者は2種のしきい値処理と、半径計測で解決する。

(b) テクスチャによって生じる線状領域の抽出 この種の対象に対しては、在来の線抽出法はほぼ無効である。そこで、モザイク・タイルを張りのぼしていくという方法を採用する。

(3) 標高データからの構造線抽出

標高値の集合として与えられた地形データを濃淡画像の濃度値とみなし、地形の構造線を抽出する。3×3の近傍領域の中央の点と近傍の点の間の標高の大小関係で中央点の状態を分類する(2値画像処理による。分類結果は、平坦点、頂点、谷点、尾根線点、谷線点、鞍部点、平坦斜面点となる)。ついで、分類の結果得られる各種領域に対して細線化等の処理をほどこし、さらに

意味的な修正を行って、頂点、谷点、鞍部点、尾根点、谷線点の抽出を終える。

(4) 気象図の処理

典型的な線図形として新聞紙面に掲載される気象図を取り上げ、経緯線、海岸線などの固定情報の抽出からはじめ、天気記号、風力図、漢字記号、前線、等圧線などを抽出する一連の処理を示す。

(5) 3次元CT像

2次元頭部CT像から3次元像を構成した例を示す。原像は方形格子点における画素濃度によって与えられるが、これらの画素を円柱座標系の標本点に変換する。水平断層像から垂直断層像を導出すること、陰面消去、方形 voxel を2次元平面に射影するさいの陰影の決定などが主な計算となる。

2. 三次元表示手法

田村進一（大阪大・基礎工）

立体表示ないし三次元表示は古くより人々の注意を引き、数多く研究されてきた。近年、計算機・画像入出力機器の発展、価格の低下により各分野での応用研究が一層盛んとなってきた。三次元表示は複雑な構造をもつ物体、組織の形態認識に有効であるが、また三次元計測、画像の再構成などと一体をなすもの（三次元画像情報処理^{1), 2)}）である。

1. 立体表示・三次元表示方式^{3)~5)}

広義三次元画像表示方式の分類を行う。

① 奥行き画像表示方式（単眼式）

立体視の要因のうち単眼情報だけで奥行感を得る方式で、通常二次元画像1枚で表示される。これには透視図、広視野画像、三面図、回転表示などがある。

② 立体画像表示方式（二眼式）

両眼視差の要因を利用した表示方式で、右眼画像、左眼画像の組を利用するものである。欠点は一方向から見た画像しか表示しにくく、回り込みができないか制限されることである。

③ 狭義の三次元画像表示方式

空間のある場所に被写体の再生像が浮び上って見えるもの。この場合、頭を動かせば回り込んだ側面の有様も見えてくる。ホログラム、Integral Photographyなどで実現される。

2. 三次元像の特性

三次元像を特徴づける要素として次のようなものがある。

- ① 実時間性：撮像から表示まで、もしくは表示が短時間でできるか。動画表示は可能か。
- ② 奥行き精度：連続断層像のように奥行き方向に関して画像枚数が少ないか、多いか。
- ③ 加工度：連続断層像などの原画像をそのまま表示するか、もしくは特定の対象物を抽出し、そのみ表示するか。また、対象物の表面だけ表示するのか、その内部構造もわかるような形で表示するのか。
- ④ 視野角：とくに狭義の三次元画像に関しては、多人数で見たり、対象物の側面の様子も多少見えるためには観察可能範囲（視野角）が広いほうがよい。さらに表示窓の大きさも大きいほうがよい。少なくとも眼の巾は必要である。
- ⑤ 奥行き度：対象物は近くに見える程、また対象物が大きい程、立体感が大きい。これを表わす量として、対象物の奥行き方向の長さを眼から対象物までの平均距離で割ったものが一つの指標となる。

3. 医学・生物学への応用

対象別に分類するとつぎのようになる。

① 顕微鏡像

神経細胞のようなミクロな構造を持ったものを対象に、その三次元構造を知り、神経細胞の構造や結合の状態などを明らかにする。

② 光学像

顕微鏡像よりもっと大きな構造をもったものを対象に普通の光学像を使ってその三次元構造を解析・表示する。

③ X線像

上記のほか、多方向より撮影したX線像（投影図）を重ね合わせるにより断層像を合成（Tomosynthesis：一種のIntegral Photography）したり、1枚ないし2枚の投影図より臓器形状を推定することが行われている。

④ CT像

CTで得られた断層像を立体的な構造がよくわかるような方法で表示し直す。また、CT向き放射線治療も行われている。

⑤ 超音波断層像

超音波トモグラフィにより得られた連続断層像をもとに、三次元表示、立体表示、任意断面合成、容積計測等を行うシステムを筆者らは開発した。

4. 顕微鏡像

顕微鏡像のうち、神経細胞の立体視および三次元構造解析は最も盛んに研究され、実用化されている分野である。例として図1にキンギョ^{6), 2)}の杆体シナプスの再構築により得られた立体像を示す⁷⁾。また、同時に表面積、体積、シナプス面積、断面積、接合面積、シナプス分布なども求めら

れている。

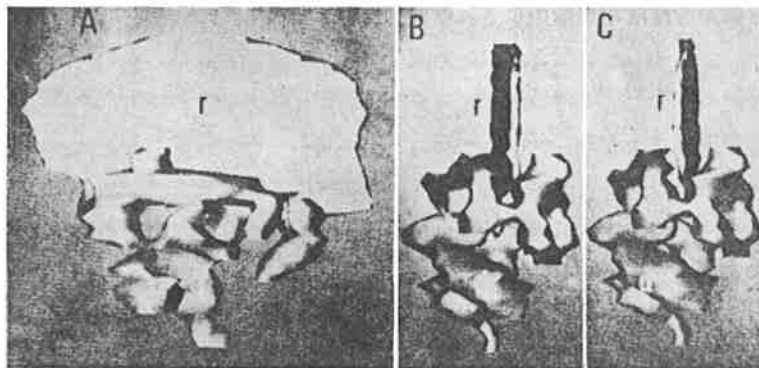


図1. 計算機で再構成した杆体水平細胞(d)と杆体リボンシナプス(r)
Aではリボンシナプスが横に広がっているが、それを直角方向から見る
(B, C)と壁構造であることがわかる。BおよびCは両眼立体視用の
ペアにもなっている。

5. 超音波断層像

筆者らは超音波連続断層像をもとに、心臓の立体表示⁸⁾(図2)、任意断面の合成(図3)⁹⁾、心
室容積計測¹⁰⁾などを行った。また、断層像立体合成・表示・計測のための専用システムの開発^{11), 12)}、
(表示例は図4：手前の断層像は明るく表示されている)、3ないし5層をもつ多層式3次元表
示装置を開発している。^{13), 14)}

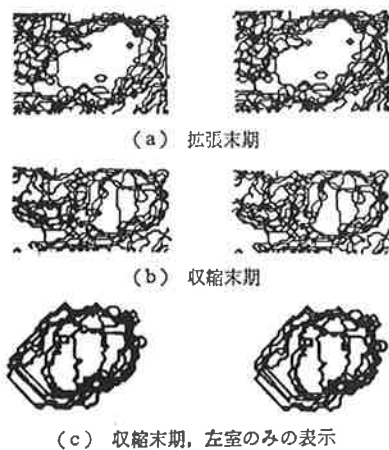


図2. 心臓の立体表示。

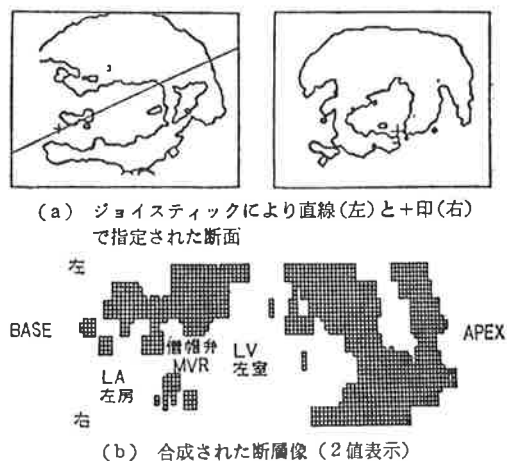


図3. 任意断面像の合成、健常例拡張末期。

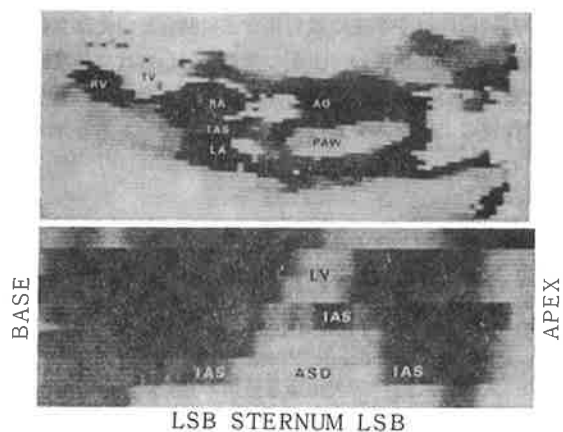


図4. 超音波断層像の立体表示（上）および合成前額面断層像（下）（ASD）。

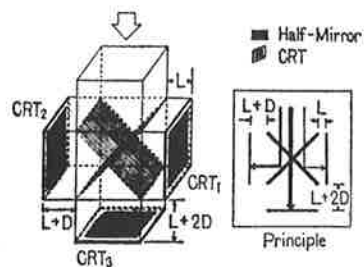


図5. 多面式三次元ディスプレイ。

6. むすび

三次元表示は形態認識に有効であるが、対象に適した表示法をとる必要がある。また表示に止まらずに、計測、合成などと組み合わせることが望ましい。

〔文献〕

- 1) 田村他, 断層像を用いた立体視, 情報処理 20, Dec. (1979).
- 2) 田村, コンピュータ・アナトミイ, 伊藤編・脳の統御機能5, 医歯薬出版 (1980).

- 3) 大越, 三次元画像工学, 産業図書 (1972).
- 4) 大越, 画像ディスプレイ, コロナ社 (1975).
- 5) 畑田, 生理光学, 応物光学談話会編, 朝倉書店 (1975).
- 6) Lindsay, R. D (Ed), Computer Analysis of Neuronal Structures, Plenum Press, N. Y. (1977).
- 7) Stell, W. K. et al, 生体の科学, 30 (3) : 173-177, (1979).
- 8) Nakatani, H. et al, IEEE Trans. BME-26 : 65-68, (1979).
- 9) Tamura, S. et al, Comp. in Bio. and Med. 9 : 345-355, (1979).
- 10) 同上 11 : 141-152, (1981).
- 11) Matsumoto, M. et al, J. Clin. Ultrasound, 9 : 157-165, (1981)
- 12) K. Tanaka et al, in Special Computer Architectures for Pattern Processing (K. S. Fu et al Ed.) CRC Press (1982).
- 13) Tamura, S. et al, App. Opt. 17 : 3695-6, Dec. 1, (1978).

3. ステレオ観察の実際と応用

桐谷道雄 (大阪大・基礎工)

1. はじめに

電子顕微鏡に限らず, ある種の操作を通してわれわれの視覚にうったえる観察方法の多くは, 立体的なものを平面に投影した形で行われている。これはわれわれが二つの位置的に離れた眼を持ち, これによって立体, すなわち遠近の感を持ちえているのに対し, 情報収集法としては逆行するものと言える。電子顕微鏡を単眼の検鏡手段としてではなく, われわれの自然の形である双眼の観察研究手段として用いるよう努力するのがよいのではなかろうか。私は生物の観察の経験は皆無であるが, 結晶性物質を長年観察してきた経験の中から一つでも共通点を見出せば幸である。

2. 透過電子顕微鏡によるステレオ観察

二つの相異なる方向から眺めた図形, いいかえれば二つの相異なる方向に写影した図形を合成することで立体感を得るのがステレオ観察法の原理である。顕微鏡観察ではごく限られた走査型電子顕微鏡を除いては同時に二方向から観察することができないため, 試料の方を傾けて二つの観察を行い, 記録された二つの写真を一方を左眼で他方は右眼でみて, これらを重ね合わせて立体感を持つ図形として認知する方法をとる。左眼でみた2点の間隔と右眼でみた同じ2点の間隔の差を Δ , 観察した方向の角差を θ とすると, 2点の遠近の差は $\alpha \simeq \Delta / \tan \theta$ となるが, われわれの眼は理屈ぬきで経験による判断 (感覚の一部となっている) と結びつけるところが面白い。

立体感を得るための最も適切な試料の相対的な傾斜角は、人間の両眼の距離D (6.5~7cm) と一般に物を直接肉眼で観察しやすい距離R (~50cm)を目安とすれば、 $\theta = 2 \tan^{-1} (D/2R) \simeq 7.5$ 度と同程度にしたのがよい。得られた写真を観察する際に、眼から写真までの実効距離を上に見定したRと同一としたとき、写真の倍率にかかわらず、感じとしての深さあるいは奥行き倍率は写真の倍率と同一となる。

きわめて薄い試料内での観察対象の分布や、厚い試料内でも平板状に局在している対象の場合等には、故意に傾斜角を大きくすることにより深さ方向の倍率を上げて立体感を強調することができる。これは後に述べる深さ計測の場合の感度(精度ではない)を上昇させることになる。深さ方向の分布が深いものに対して角度差を大きくとりすぎると、左右の図形を合体させて観察しようとするときにそれぞれの図形の相対的な移動距離(視差)が大きくなりすぎて合せにくくなる。この見掛け上の視差は同一傾斜角度差の観察でも倍率が大きいほど大きく、逆にいえば倍率を上げて観察しなければならないものほど小さな傾斜角度差での観察を行わなければならない。

3. 立体分布定量測定法

ステレオペア写真による観察対象物の試料内深さ位置の測定は、試料の回転軸と直角方向への像位置の相対的ずれ(視差)を利用するもので、原理的には何の装置も必要ではなく、二つの写真にセロファン紙でも置いて対象物の位置を写しとり相互のずれを測定しさえすればよい。このプリミティブな方法は簡単なようであるが、手続きも大変で精度の点でも不十分である。

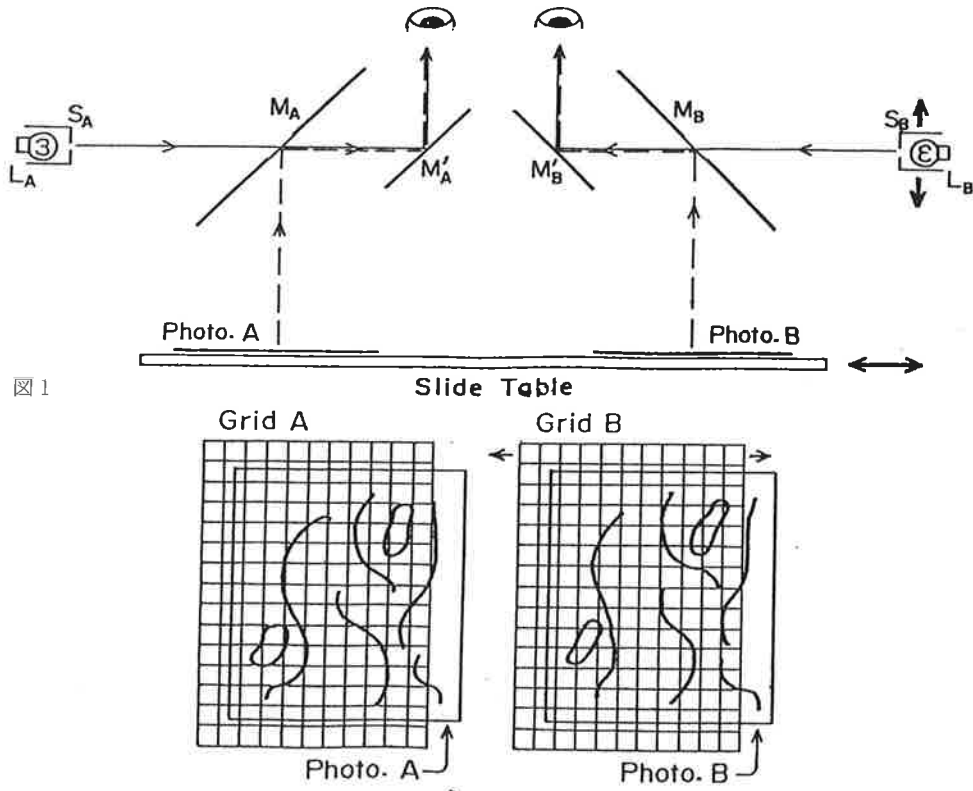


図 1

図1に示した種類のステレオ観察装置が使用できる場合の深さの簡便な計測法を考えてみる(ランプのない場合)。写真A, Bをステレオ立体感が充分あるように位置調整し、両写真の上に図2のごとく厳格に同一な格子を画いた透明なシートを重ねる。写真A, Bの立体観と同時に両格子が重なり一体として観察されるよう一方の格子を移動させる。一体化した格子の像は、互に近づけると手前に移動し、離すと遠方に遠ざかる。観察の対象となる写真上の点が格子面と同一深さになるようにBの格子を調整しこの位置を記録した後、他の観察対象点が格子面と同一深さにみえるように格子Bを左または右に移動する。この二つのB格子の位置の移動距離が視差となり、深さの差が計測できる。

さらに進んだ計測方法の一つは図1の平面鏡 M_A と M_B の中央部を半透明鏡とし、左右の豆ランプ L_A, L_B からの光を極小スリット S_A と S_B を通して反射鏡 M_A' と M_B' とに導き、観察する左右の眼に別々に反射させ、左右の写真上の同一観察対象点に光点を一致させるために必要な光源Bの垂直移動距離を正確に計測することにより視差を得るものである。光源の移動距離はマイクロメーターなどを用いて正確に測定することが必要で、筆者は歪計を直結してデジタル直読できるように工夫している。

上記の深さ測定は、写真上の近接した二つの対象物間の深さの差の測定としてはほぼ正確であるが、試料の(写真上の)はなれた位置にあるもの同志の比較としては見掛け上の値を示すにすぎない。また透過電子顕微鏡によりステレオ観察された試料内の観察対象物は空間に浮遊しているように観察され、対象物間の相対的位置関係は認識できるが、試料表面からの距離という絶対位置は一般には観察または測定できない。試料表面に直接関連する像が存在するときには、当然それとの差として対象物の深さを計測することができるが、試料表面を示すマーカー的像の存在しない場合、またはより精密な測定を行いたい場合には、表面に人為的にマーカーを設定する必要がある。筆者らがよく行う方法は、真空蒸着により金その他の重金属の微粒子を表面に付着させる方法である。

4. ステレオ観察の実例

生物関係のものでなく恐縮であるが、ステレオ観察とそれによる定量測定がいかに有効に材料内固体反応の理解に役立ってきているかの実例を示したい。本稿では述べなかった結晶性物質のステレオ観察に必要な特殊条件を簡単に述べ、次いで金属や半導体の電子照射損傷、イオン照射損傷、高温からの焼入れ、塑性加工などの実例を示すことにする。

5. 医学・生物学，特に形態分野におけるパーソナル・コンピューターの応用

渡 仲三・堀田康明（名古屋市立大・医）

1. はじめに

医用画像と呼ばれる多くの画像情報の中で，われわれは，細胞，組織の顕微鏡像，特に電子顕微鏡写真を用いて，画像の定量化等に取り組んできた。医学・生物学の分野における形態計測の分野は，歴史的には1847年のDeleseによる法則の一般化に始まり，現在ではかなりシステムが自動化され，実用化されてきている。われわれの研究室ではグラフィック・ディジタイザーを入力装置に用いたパーソナル・コンピューターシステムを製作し，動物を用いた実験肝傷害における肝細胞の小器官や細胞封入体（脂肪滴など）の量的変動を定量化する研究を行ってきた。今回，これらについてまとめて報告したいと思う。

2. システムの概観

われわれの画像処理システム（愛称HOWCOM-EM）は，8bitsのパーソナル・コンピューター（TANDY/TEAC, PS-80）に，グラフィック・ディジタイザー（武藤工業，BIT-PAD），ミニ・フロッピー・ディスク装置，CRT・ディスプレイ，プリンター，X-Yプロッター（渡辺測器，WX4671）から構成されている。画像情報の入力は，グラフィック・ディジタイザー上に，電子顕微鏡写真を載せ，スタイラスを用いて輪郭をなぞることによって行われる。各種の処理プログラムはBASIC言語を用いて組んであるが，マイクロ・ソフト社の「Basic Compiler」を用いてコンパイルしてから実行させるため，実行速度はかなり速い。

3. われわれの研究室における応用例

a) 肝臓の細胞小器官等の定量への応用

動物（マウス・ラット）の実験肝傷害における細胞の超微形態学的研究にHOWCOM-EMを用いて，ミトコンドリア等の細胞小器官や，脂肪滴の定量を行ってきた。また，急性カドミウム中毒ラット，アルコール投与マウスに関して肝小葉を小葉中心静脈領域，小葉中間部，小葉周辺領域の3領域に分けて検討した。

急性カドミウム中毒においては，特に小葉周辺領域において，マイクロボディー，グリコーゲン顆粒が著明に減少し，ゴルジ装置は拡大した。またミトコンドリアに付ては，大きさの変化はないが，その数が全体的に増加していることが明らかとなった。一方，アルコール投与マウスのミトコンドリアでは，特に小葉周辺において巨大化することが，定量計測により明らかになった。

四塩化炭素中毒実験のラット肝細胞に付ては，脂肪滴の小葉内分布に関して計測を行ない，四塩化炭素中毒による脂肪滴の増加が，漢方薬甘草のエキスであるグリチルリチンの併用投与によって押えられることが判明した。

b) 連続切片法による三次元像再構築への応用

超薄切片法による連続切片から得られた連続写真を、HOWCOM-EMに入力し、三次元図形処理を施して、三次元再構築像をX-Yプロッターによって描かせた。ラット肝臓の類洞内に存在するPit-cellの連続写真を用いて、あらゆる方向から見た立体像が座標変換により再現できた。

c) その他の応用

この他に、HOWCOM-EMを用いて、写真の処理のみならず、各種実験データの統計処理や、図表、グラフの作成なども可能である。

4. 問題点と今後の方向

形態学、特に形態計測の分野へのパーソナル・コンピュータシステムの応用に際しては、第1に、計測に供する試料作成上の問題があげられる。すなわち、組織の固定、脱水、包埋から、切片の作製、染色に至る全過程を標準化することが必要である。このことは、将来、電子顕微鏡検査を臨床診断へも広く利用しようとする場合に、非常に重要になってくるであろう。また、統計処理上での問題点もクローズ・アップされてくる。可能な限り多くのデータを、しかもランダムに蒐集することが重要であり、システムには、そのためにも、データ入力自動化と、速い処理スピードが要求されるであろう。

さて、このような画像処理システムを自動化する上での必要条件として、安価であること、対話型であること、処理スピードが速いことなどが挙げられる。われわれは、現在のシステムでグラフィック・ディジタイザーに頼っている画像入力方法に、TVカメラを併用することによって、自動化を図るシステムと、SEMからの映像信号をとり込むインターフェースを検討中であり、近い将来、自動化されたシステムを安価に実現できると考えている。また、市販されている8 bits パーソナル・コンピュータシステムもグラフィック性能が強化され、安価になってきているし、16 bits のパーソナル・コンピュータも徐々に発表されてきているので、どこの研究室でも、それぞれの研究に見合った画像処理システムを自作することが可能であろう。

7. ヘルペスウイルスコアの立体構造の解析

岡田幸助（岩手大・農）

1. はじめに

ヘルペスウイルス感染細胞の核内にはさまざまな形態の未熟ウイルス粒子が認められる。われわれはその立体構造に興味を持ち1970年より今日まで一つの研究テーマとしてマレック病ウイルス(MDV)および七面鳥ヘルペスウイルス(HVT)がどのような形態をしているか、特にその立体構造について取り組んできた。今回はこれまでの立体構造検索方法を順を追って紹介し、その

特徴と像解釈上の留意点について述べてみたい。

2. 材 料

MDVとしてはCal-1株のType 1および2, ならびにJM株を用いた。HVTはFC-126株を用いた。それぞれヒナ腎細胞やウズラ線維芽細胞に培養し, 5~11日目の最も良くウイルスが増殖した細胞を電顕観察の材料に供した。

細胞はプラスチック・シャーレからはがして, 3,000rpm, 10分間遠沈した。ペレットを6.25% glutaraldehyde (0.1Mセコジル酸ナトリウムの緩衝液)で1時間固定した。次に, 同じ緩衝液で洗浄後, 1%オスミック酸 (0.1Mリン酸緩衝液)で1時間再固定し, エタノールで脱水, Epon包埋を行った。超薄切片はPorter-Blum MT-1型 Ultramicrotomeで薄切し, 銅製150メッシュにすくい, 酢酸ウランおよび鉛の二重染色を行った。

3. 電子顕微鏡と傾斜装置

電子顕微鏡で立体構造を検索するためには試料傾斜装置が必要である。試料傾斜装置には試料筒を上から落し込むトップエントリー方式と試料ホルダを横から挿入するサイドエントリー方式がある。最も多く用いたのはHU-12A型電顕にトップエントリー方式のHK-6型全方位高角度傾斜装置を取り付けて観察した。この装置は試料を電子線に対し 0° を中点として $\pm 35^{\circ}$ の範囲で任意の方位に傾斜することができる。

一方サイドエントリー方式の装置としてはJEM100CX型のサイドエントリーゴニオメーターに回転ホルダを組合せて観察した。この装置は $\pm 60^{\circ}$ まで傾斜できる点と傾斜軸と試料面を調整することにより像が逃げないという特徴がある。

立体構造の検索という性質上, その切片内に直径100nmのウイルスが完全に含まれる必要があり, 約100~500nmの厚い切片を作製した。その切片を傾斜させるため電子線の透過する実際の厚さはさらに厚くなる。従って加速電圧は100kV~125kVが望ましい。

4. ステレオスコープによる立体構造の観察

一つのウイルス粒子をさまざまな角度から撮影し, 適当な角度の差($7\sim 15^{\circ}$)を持った写真を2枚選びステレオスコープで観察した。この角度の差が小さすぎても, 大きすぎても立体像は観察できない。ステレオスコープにはさまざまなタイプがあるが航空写真用の反射鏡式実体鏡Ⅲ型(トプコン)を用いた。

また一部の立体像の観察には陰画像の方が適していた。そこで電顕のネガフィルムを一度リスオルソフィルム(富士, タイプV)に反転し, それを原板として焼き付け, 明暗の反転した陰画像を作製し, 立体像の検索に用いた。一方, 立体観察の結果をもとに, アクリル板で模型を作製し, 電顕写真と比較検討した。ヘルペスウイルスの未熟粒子はカプシドとコアからなる。カプシドの中に1~2本の桿状物と, それらと直角に電子密度の低い何らかの構造物が交差しているものをpeculiar-shaped coreと呼んだが, これは検索の結果2枚の円盤ないしドーナツ状リングが互いに直角に交差したものと思われた。この成績を1972年に発表したのが, われわれとはほぼ同時にアメリカの学者がHerpes simplex 1型でウイルスコアは1個の円環体とそれを貫通する1個の電

子密度の低い円柱状物からなると報告し、その後 MDV でも同様形態のモデルが発表された。彼らは通常の電顕観察からの推測であるのに対し、われわれはステレオ観察であったので自信があったが、当時のわれわれの失敗は一方向にしか傾斜していないことであった。三次元構造の確証には4方位に傾斜させることが必要である。サンプルを4方位に傾斜させることによって再検討した結果、円柱と円環体からなるコアが確認され、1979年に訂正した。

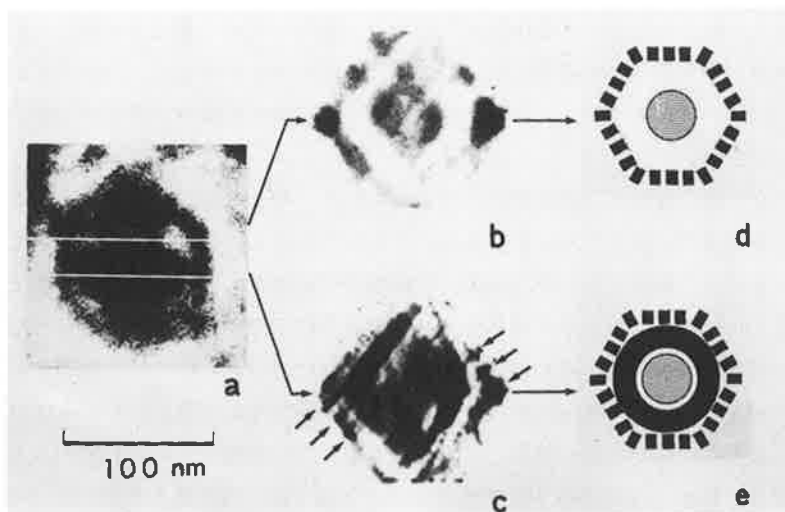
5. コンピューターによるコア断面像の再生

次にコンピューターによる立体構造の再構築を試みた。その原理は近年医学の分野で大いに威力を発揮しているコンピュータトモグラフィ（CTスキャン）とよく似ている。電顕像も電子線を線源とした投影像であり、それから断面像を再生することは理論上可能ではあるが、電顕の試料の傾斜角度は後述のごとく実用上 $\pm 36^\circ$ 程度であり、 180° 全域にわたって観察ができない。そこで逐次近似法またはmaximum entropy法という計算方法を用いて処理した。この点については共同研究者である馬場が次演題で詳しく述べる。

検索方法としてはまずサンプルを傾斜させることにより、 -36° から $+36^\circ$ まで 3° 間隔で計25枚の写真を撮影し、検索したい部分についてデンシトメーターでフィルム上の濃度を測定した。次に大型計算機により 62×62 の画素からなる断面像を計算し、Flying Spot Scannerのブラウン管上に断面像を再生させた。

電顕撮影上の注意点として1)全ての写真が同じ条件で撮影されること、2)撮影が長時間に亘るため、液体窒素などを使用しサンプルのコンタミネーションを防止すること、3)どの方向に傾斜されているかを予備試験で確認しておくこと、4)なるべく高角度まで傾斜させて撮影すること、等である。しかし4)については高角度にすれば像質が悪くなり $\pm 36^\circ$ 以上のものは使用に耐えなかった。

断面像再生の結果、上述の円環体と円柱からなるコアが確認された(下図)。しかし一部像の再生が不十分であるためこの点の改善が望まれる。

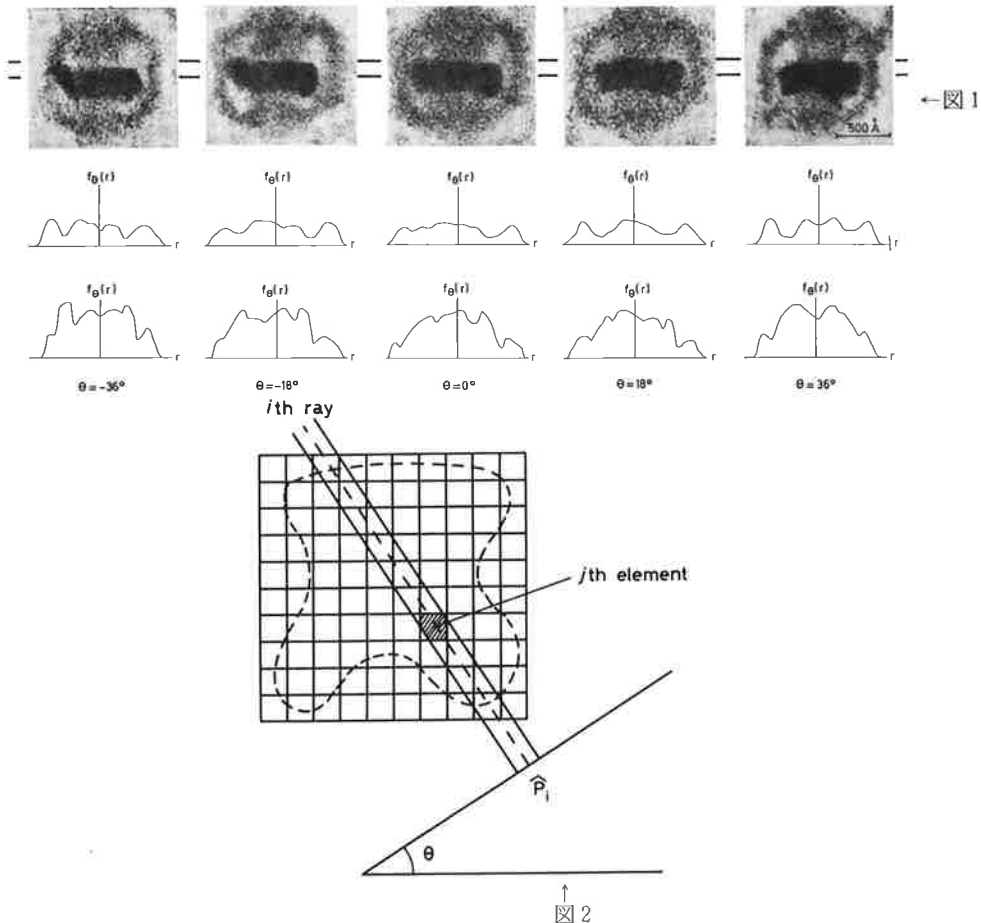


8. 電顕投影像からの生体像再生

馬場直志 (千葉大・工)

1. はじめに 試料物体を電子顕微鏡で観測して得られる像は、電子線に沿った被検物体の投影像とみなすことができる。したがって種々の角度方向から電子線を試料に照射することによって得られる2次元の電子顕微鏡写真群から、試料各断面の像が再生でき3次元的な像を再構成することができる。

一般に電子顕微鏡の試料傾斜装置は、 $\pm 90^\circ$ の角度領域にわたって試料を傾けることは難しく限られた角度領域内の試料物体の投影像しか得られない。このような場合、像再生のアルゴリズムにはコンピュータ・トモグラフィで用いられているコンボリューション法あるいは filtered back projection 法を適用するよりは、級数展開法もしくは逐次近似法がよい。ここでは ART



(Algebraic Reconstruction Technique) 法¹⁾および MEM (Maximum Entropy Method) 法²⁾による像再生について述べる。さらに外形が既知な物体の場合、像再生に Gerchberg-Saxton のアルゴリズム³⁾を適用する方法について述べる。

Ⅱ. 投影データと像再生法 電顕投影像からは、試料物体の電子線に沿った電子線吸収率分布の線積分値が得られる。これを投影データとよぶ。図 1 にヘルペスウィルスコアの $\pm 36^\circ$, $\pm 18^\circ$, 0° 方向の電顕写真と、2 断面に関する投影データを示す。これらの投影データより像再生するには再生される画像を N 個の画素に分け、各画素値 $\hat{f}_\ell$ を計算投影値

$$\hat{P}_i = W_{i1} \hat{f}_1 + W_{i2} \hat{f}_2 + \cdots + W_{iN} \hat{f}_N \quad (i = 1, 2, \cdots, M)$$

が実測投影データ P_i に近くなるように逐次求めていけばよい。

Ⅲ. ART 法 ART 法は、各画素値を次の反復演算式に基づいて求めていくアルゴリズムである。

$$\hat{f}_\ell^{q+1} = \hat{f}_\ell^q + W_{k,\ell} (P_k - \hat{P}_k^q) / N_k \quad (N_k = \sum_{\ell=1}^N W_{k,\ell}^2, \quad q = 0, 1, 2, \cdots)$$

ここで、 $\hat{f}_\ell^q$ は q 回の iteration を行った後の ℓ 番目の画素の推定値で、 $w_{k,\ell}$ は ℓ 番目の画素と k 番目の ray との交差面積に比例する量である。ART 法に基づき、図 1 のごとき投影データ (角度範囲 $\pm 36^\circ$, 角度間隔 3°) より再生した結果の断面像は本抄録岡田氏の稿を参照されたい。

Ⅳ. 最大エントロピー法 (MEM) 最大エントロピー法は、画像のエントロピーを

$$S = - \sum_{j=1}^N \log \hat{f}_j$$

と定義し、これを最大にする様かつ、実測投影値と計算投影値との差が小さくなる様に各画素値を次式にしたがって求めていく。

$$f_\ell = (B_\ell + \sqrt{B_\ell^2 + A_\ell}) / A_\ell, \quad A_\ell = 2 \lambda \sum_{i=1}^M W_{i\ell} / \sigma_i^2,$$

$$B_\ell = \lambda \sum_{i=1}^M \beta_i W_{i\ell} (P_i - \sum_{m \neq \ell} W_{im} \hat{f}_m) / \sigma_i^2$$

ここで、 λ はラグランジェの未定係数、 σ_i^2 の投影データ P_i の分散、 β_m は緩和係数である。

Ⅴ. 外形が既知な場合の像再生⁴⁾ ある方向の投影データをフーリエ変換すると、物体のその方向のフーリエスペクトルを推定できる。したがって角度領域が限られた投影データからは、その角度領域内の物体のフーリエスペクトルを推定できることになる。これに物体の外形情報をいれて FFT, 逆 FFT を繰り返すことにより再生像を求めることができる (図 3)。この方法の計算機

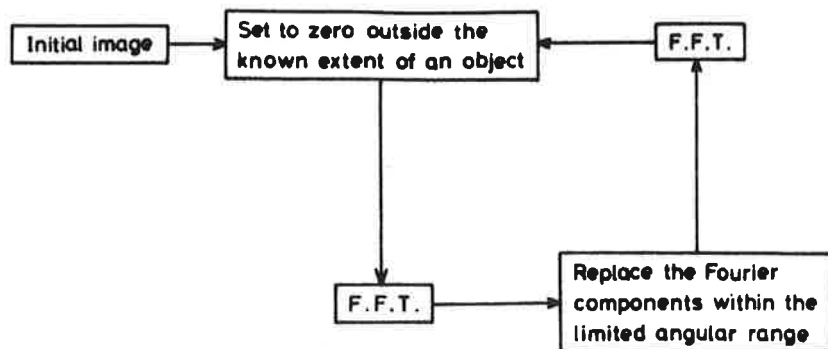


図 3

シミュレーションを図4に示す。図4で左が物体で、この物体の $\pm 35^\circ$ 、角度間隔 5° でnoisyな投影データが得られ物体の外形が既知とする。物体の外形情報なしでART法とメディアンフィルタリングによる再生像が図の真中で、外形情報を用いて本方法で再生像を求めたのが図の右の写真である。



図4

〔文献〕

- 1) R. Gordon, R. Bender & G. T. Herman, J. Theor. Biol. 29 (1970) 471 ; Baba, N et al., Optik 54 (1979) 97.
- 2) S. J. Wernecke & L. R. D'Addario, IEEE Trans. Computer C-26 (1977) 351 ; Baba, N et al., Optik 58 (1981) 233.
- 3) Gerchberg R. W. & Saxton W. O., Optik 35 (1972) 237.
- 4) Baba N. & Murata K., Optik 60 (1982) 327.

9. 神経細胞とシナプスの計量形態計測システムの開発

—半自動対話型計算機—

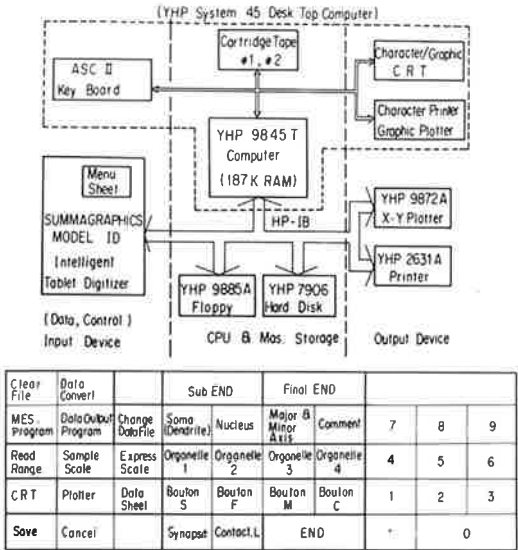
斎藤基一郎（筑波大・医）

はじめに 神経細胞とシナプスの形態がその機能と強い相関をもつことはカハールの「ニューロン説」以来よく知られている。また近年の微小電極法の開発でシナプスにおける興奮と抑制の伝達メカニズムと神経細胞の統合機序の解析が細胞レベルで飛躍的に進んだ。同時に生理学的に明らかにされたこれらの興奮性、抑制性シナプスに対応し、超微形態学的にもシナプス部位に差異（Gray 1959 ; Uchizono 1965 ; Bodian 1966, 1970 ; Larramendie ら 1972 ; Christensen 1976 ; Neale ら 1978）が見い出されるに及んで神経細胞をニューロンネットワーク上における神経素子と見る考えが生じた。従って、個々の神経細胞の素子としての働きを知るには、神経細胞とそれらを取りまく興奮性、抑制性シナプスの詳細な数量的解析が超微形態レベルで必要となる。ところが従来の光学顕微鏡では樹状突起、細胞体、軸索突起を見ることが出来るが、神経信号の伝達

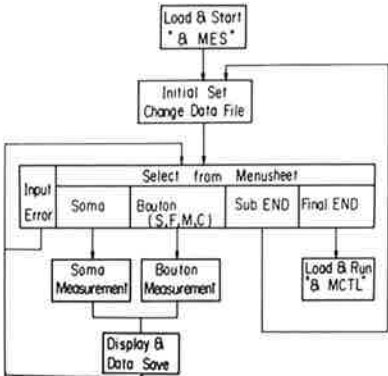
の場であるシナプスについての情報が得られず、一方電顕ではシナプスの微細構造を見ることが出来るものの、拡大率に比例して視野狭搾が生ずるため神経細胞全体像の中でシナプスを位置づけ数量的かつ総合的に研究することが出来なかった。



(計量形態・計測・解析システム概観)



(計量形態・計測システムの構成図とメニューシート)



(神経細胞測定フローチャート)

研究の背景 そこで私どもはこの点に留意し、中枢神経組織の電顕モニター写真（HRPで標識）を基に神経細胞とシナプスの画像情報を点・線・面の各種パラメータに変換しPlanimeterとCurvimeterでそれらに形態計測をほどこし、神経細胞間の特性値を求める作業を続けてきた。しかし、この手法では測定に膨大な労力と時間がかかり誤差が大きく、データ間の比較検討の際にも再入力せねばならなかった。そこで計算機の導入により研究者のこのような負担を軽減し、神経細胞とシナプスの計測がまるごと行え信頼性の高いデータの迅速な収集と統計解析などの一貫した演算処理が容易に出来る半自動対話型計算機システムとソフトウェアをここに開発した。

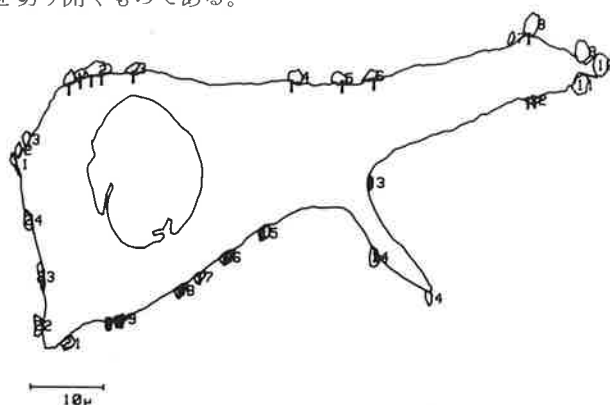
システム機成 YHP System 45 Desk Top Computerを中心に、その制御下に Table Digitizer, X-Y Plotter, 高速ラインプリンターと外部大容量記憶装置からなる。Tablet Digitizerは1 m四方もある電顕モニター写真から各種のパラメータを研究者が計算機に読む込むための入力装置である。本システムは電顕像のコントラスト不足、複雑な神経のテクスチャを考慮し、その自動化は現在困難なので、研究者の経験豊かなパターン認識の力を借りる半自動対話型システムとした。

ソフトウェア Tablet上のメニューシートをカーソルで指示し、研究者がタブレット面に対峙したままプログラムの選択と測定項目を計算機と対話方式で行う。神経細胞とシナプス測定ではその電顕モニター写真を基に、それらの外形、周長、面積その長一短軸長、個々の神経活動の



背景となる糸粒体, Golgi 装置等の細胞内小器官数, シナプスの興奮性, 抑制性等のタイプ別, 位置をカーソルを用いて Tablet とメニューシートから計算機に読み込む。個々の測定結果は CRT で内容チェック後ファイルに加え, シナプスの量的詳細目録を作成する。本システムにファイル構造と管理を持たせることにより, 形態計測中にハードウェア構成や実際のファイル名等を研究者が把握管理することなく, 自動的にプログラム上で管理される。測定結果は OUT プログラムでモニタージュの精密プロットと計算簿出力が得られる。必要に応じ YHP 基本統計パッケージに接続し, データ間の比較検討が出来る。

まとめ 本システムは正常脳のニューロン説に基づく素子としての働き, 興奮性, 抑制性シナプスの局在と分布を数量的に知るための系統的研究に役立ち, 各種実験条件下での形態の変化を数量的にとらえ, その統計量の比較を通し脳機能との対応が求められ, 今後, 本システムは神経科学の分野に新しい道を切り開くものである。



COMMENT : File No. 8842-8854

NO.	CONTACT	AREA	CIRCUMFERENCE	DIAMETER (μm)	DIAMETER (μm)	SYNAPSE	(1)	(2)	(3)	(4)	COVERING RATIO	CIRCULARITY
SUBT 13		178.17449	98.53217	18.22588	48.88487		87	39	9	8		
B 1 B		.64869	.68687	3.57528	.94686	.62119	0	1	0	0		
B 2 B		.74845	.53688	3.24849	1.21848	.59834	0	1	0	0		
SUBT 2		1.38914	1.14264	6.04577	2.15665	1.21953	8	2	8	8	.81534	.61315
B 1 F		1.48817	1.43878	4.99489	1.83173	.98717	1	4	8	8		
B 2 F		.68804	.32893	2.58519	.68151	.68945	0	0	0	0		
B 3 F		1.21446	.68584	3.68399	1.21375	.81829	1	2	0	0		
B 4 F		.90245	.63348	3.11394	1.62887	.66294	1	8	8	8		
B 5 F		.81691	.32597	2.64481	1.82843	.32882	1	8	8	8		
B 6 F		.67833	.44520	2.81866	.88894	.63443	1	8	8	8		
B 7 F		.90146	1.68385	4.37295	1.89163	1.17849	8	2	8	8		
B 8 F		1.19589	.53642	3.43999	1.24834	.52672	1	1	8	8		
B 9 F		.93544	.54778	3.85232	1.88416	.45221	1	8	8	8		
B 10 F		1.41466	1.82889	4.71881	1.57421	.63967	2	2	8	8		
B 11 F		2.82895	1.21637	5.62484	2.81638	.85917	8	4	8	8		
B 12 F		1.27265	.54896	3.23197	1.26419	.62859	1	1	8	8		
B 13 F		1.39586	.26453	3.52888	1.34238	.29556	1	8	8	8		
B 14 F		.93888	2.48282	8.98778	1.88288	1.88218	1	4	8	8		
SUBT 14		15.99534	11.57853	57.58863	17.89742	18.58788	12	22	8	8	.17448	.61421
TOTAL 14		17.38449	12.72119	64.43241	28.85487	11.72793	12	24	8	8		
COVERING RATIO F BOUTON AREA RATIO R C NO. SYNAPSE PER 100 MICRON												
		.19283	.68982	.91618	9.88888	8.88888					13.25496	

10. 単一細胞の形態と機能

大村 裕 (九州大・医・生理研)

a) 研究目的

ラットの摂食行動リズム形成が、どのような神経機構の活動によって発生するかを明らかにする。

b) 研究成果

日周リズム発生に重要な神経要素である視交叉上核 (SCN) と、摂食調節系である視床下部腹内側核 (VMH) および外側野 (LHA) との間の機能的関係を、in vitro の脳切片および in vivo の麻酔下で調べた。

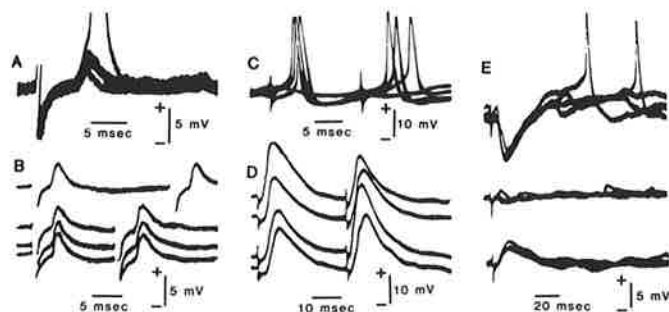
- 1) VMH ニューロン反応：VMH での細胞内記録を容易にするため SCN と VMH 内側野を含む厚さ300~400 μ m 切片を用いた。VMH で細胞内記録した96ニューロン中24個が SCN の電気刺激により反応した (EPSP 14 ; IPSP 様反応 4 , 逆方向性反応 6)。(1) EPSP の10個は反復刺激による潜時が一定で、単シナプス性と考えた (図 1 , A および B)。平均潜時は $3.3 \pm 0.7 \text{ msec}$ ($\bar{x} \pm \text{S D}$) であった。SCN から VMH まで 1.5mm とし、シナプス遅延 0.5msec とすると、SCN→VMH 線維の伝導速度は約 0.5m/sec であった。残り 4 個の EPSP は反復刺激で潜時が変動するから多シナプス性であった (潜時, $4.9 \pm 0.4 \text{ msec}$) (図 1 , C および D)。(2) IPSP 様過分極反応は、比較的小さな過分極通電で脱分極反応へと逆転した (図 1 , E)。また 25mV 以下の小振幅リバウンド放電を伴なった (図 1 , E)。さらに明瞭な EPSP を示すニューロンが傷つけられたような場合にこれと同様の反応が見られた。これらから、IPSP ではなく EPSP の逆転したものではないかと考えた。(3) 逆方向性反応 (図 2 , A および B) は潜時が一定で、0.5mA の過分極通電で IS-SD ブロックを起こした (図 2 , A)。さらに、この反応は、200Hz の高頻度刺激に対しても追従した (図 2 , B)。反応の平均潜時 $2.8 \pm 0.3 \text{ msec}$ から、VMH→SCN 線維の伝導速度は約 0.5m/sec となった。

VMH で細胞内記録した96ニューロン中14は HRP による細胞内染色により、その形態を明らかにできた。つまり、VMH には multipolar 型と fusiform 型の 2 種類のニューロンが存在し、機能を異にしている。図 3 , A は multipolar 型で、3 本以上の主冠状突起に多数の棘を有し、細胞体径は約 12 μ m。図 3 , B は fusiform 型で、2 本の主冠状突起を有し棘は少ない。細胞体径は約 8 μ m で multipolar 型より小さい。細胞内染色した 5 個の multipolar 型ニューロン中 3 個は SCN 刺激により単シナプス性 EPSP を起こした。一方 fusiform 型 9 個はすべて SCN 刺激に対して無反応であった。

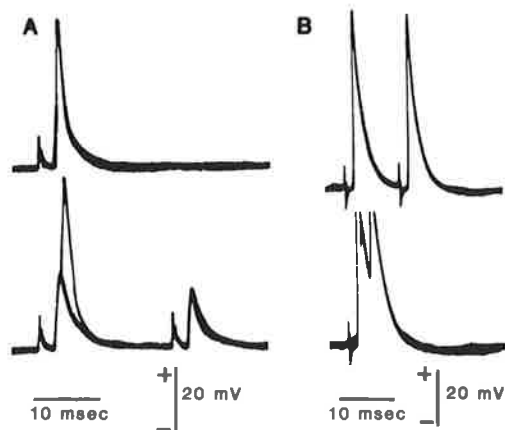
- 2) SCN 刺激による LHA ニューロン反応：in vivo による急性実験で SCN 刺激による LHA ニューロン反応を調べた。細胞内記録した126ニューロン中54ニューロンが IPSP , 20個が

EPSP, 5個が逆方向性反応を起こした。また, 順方向性反応のすべては多シナプス性であった。逆方向性反応を示すものは, その潜時から2群となり, 線維の伝導速度は 2m/s および 0.2m/s であった。すなわち, (1) SCNはLHAに多シナプス性の入力を送り, 大部分は抑制である。(2) LHAは伝導速度の異なる群のニューロンでSCNに入力する。

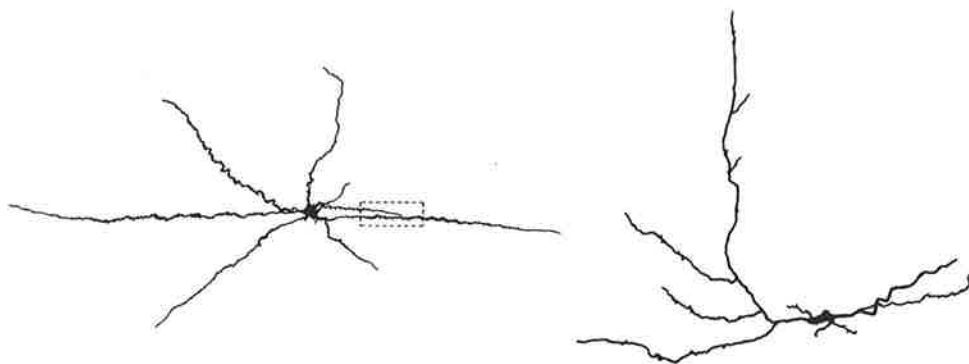
- 3) 以上の結果から, SCN活動が上昇している日中はVMHが興奮し, LHAが抑制されることになる。この関係は夜にはVMHにおける脱興奮およびLHAにおける脱抑制によつて逆になると考えられる。摂食行動の日内リズム形成にSCNから視床下部摂食調節部位への神経性入力が一因となることを示唆している。また, SCN刺激で単シナプス性応答を示したVMHのmultipolar型ニューロンがブドウ糖受容ニューロンの形態的特徴と類似していることは興味深い。



第1図. SCN刺激に対するVMHニューロンの順方向性応答。A, B単シナプス性EPSP, 反応潜時は常に一定。C, D多シナプス性EPSP, 潜時は明らかに一定していない。Dでは, EPSPの振幅増大のために 1.0nA の過分極通電。E, IPSP様の応答。中段, 下段はそれぞれ 0.1nA の過分極電流を与えたことによる反応極性逆転。



第2図. SCN刺激によるVMHニューロンの逆方向性反応。A, 3回重ね撮り。 0.5nA の過分極通電でIS-SPブロックが見られる。(下段)。B, 別のニューロン, 間隔 5msec の2発刺激に追従。



第3図. HRPで細胞内染色したVMHニューロン
 A. 多数の主樹状突起と多数の、棘を要する。この型のニューロンは
 SCN刺激により単シナプス性に応答。
 B. 2本の主樹状突起を有し、棘は少ない。この型のニューロンは、
 SCN刺激により応答しない。

c) 研究発表

1. Oomura, Y., et al : Hypothalamic control of feeding behavior : Modulation by the suprachiasmatic nucleus. Biorhythm and Its Central Mechanism, ed. M. Suda, O. Hayashi & H. Nakagawa : 258, Elsevier, Amsterdam (1979).
2. Oomura, Y., et al : Functional connection from the suprachiasmatic nucleus to the hypothalamus. 日本生理誌 41 : 315 (1979).
3. 大村裕等 : ラット視交叉上核から視床下部外側野および腹内側核への連絡. 第56回日本生理学会. 大会予稿集 : 63 (1979).

〔文献〕

Kita, H., Shibata, S., Oomura, Y., and Ohki, K. (1982) Excitatory effects of the suprachiasmatic nucleus on the ventromedial nucleus in rat hypothalamic slice. Brain Res. 235 : 137-141 (1982).

11. 高分解能電顕像への画像処理

植田 夏 (京都大・化研)

最近の電子顕微鏡は装置としての安定度が高く、得られる像も電子の波動光学的結像理論で直接解釈が行えるまでに進歩している。例えばその本質的な特性である分解能 δ は、光源の波長を λ , 対物レンズの球面収差係数を C_s とすると、Scherzerによって

$$\delta = 0.63 C_s^{1/4} \cdot \lambda^{3/4} \quad (1)$$

で与えられたが、実際にもこの理論に従って装置が設計され成果を見せている。かくて式(1)により、顕微鏡には装置に賦与された極限の分解能があり、最良焦点像に関しては通常これを超えられない。ところがこれより焦点のずれた像中に返って δ より微小な構造の情報が含まれているので、これらを抽出して集積し、装置本来の特性より常に高い解像度を持つ像を再合成する画像処理の手法を紹介したい。

1. 電子顕微鏡像の結像と分解能

試料物体の各原子で散乱した波長一定の電子波は、互に干渉しつつ対物レンズで屈折し、その後焦点面で回折像となり、さらに伝播して像面で再干渉し像を結ぶ。対物レンズが無収差であれば、通過する波は試料の構造によって決まる振幅と位相を保持するが、球面収差があると、散乱角 α や焦点のずれ Δf によってその位相が $\exp [i X(\alpha)]$ だけ変化する。ここに X は波面収差といい次式で与えられる。

$$X = 2\pi (C_s \alpha^4 / 4\lambda - \Delta f \cdot \alpha^2 / 2\lambda) \quad (2)$$

電子の波長変動や可干渉に位相変化もさらに変調されるが、その総合的な散乱角(α)依存性を表わす関数 $H(\alpha)$ を透過関数と云う。図1は、JEM-500(京大化研, $\lambda = 0.014$, $C_s = 1\text{mm}$)の場合の $H(\alpha)$ をいろいろの Δf で計算したもので、 α に対して位相は ± 1 の間を盛んに往復する。

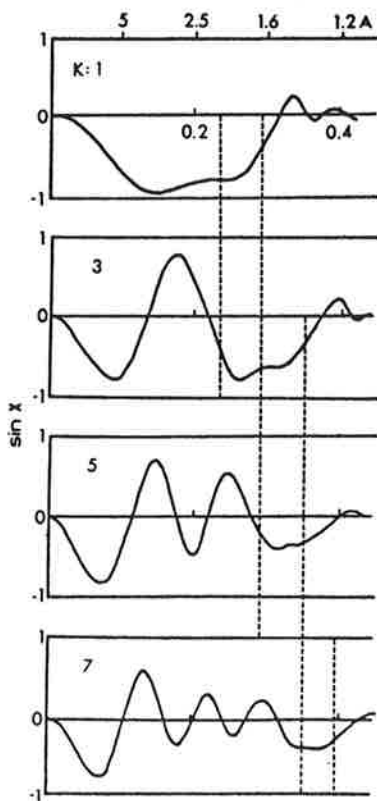


図1. 透過関数

Abbeの理論から δ を小さくするには大きくすべきであるが、(a)のようにある散乱角まで位相が一定となる Δf があり、このときの $\alpha_{\max}$ から(1)式が得られる。ところが他の Δf でも $\alpha_{\max}$ より大きい散乱角の位置で、位相が一定となる領域が現われるので、結ばれた像から此の領域に於ける散乱波の情報を抽出できる。 Δf を変えてスルーフォーカス像を撮り、画像処理を行い、高い解像度の像を再合成するのがこの手法の原理である。

2. 電子顕微鏡像の画像処理

一度写真に記録された像から散乱波の情報を抽出するのは、像の強度分布を測定、数学的にフーリエ変換し、人工的な回折を行わせるとよい。試料物体についての合成波を $\phi(r)$ とし、バックグラウンドの明るさを1とすると、像全体は $1 - i\phi(r)$ で与えられる。像の強度分布 $I(r)$ は ϕ の複素共役を ϕ^* とすると、次式で与えられる(r は試料面内の座標)。

$$I(r) = (1 - i\phi)(1 + i\phi^*) = 1 - i(\phi - \phi^*) + \phi\phi^* \quad (3)$$

$1 \gg \phi$ の場合、最終項 $\phi\phi^*$ を無視し、フーリエ変換を行うと、反射波を $F(\alpha)$ として、

$$F'(\alpha) = F(\alpha) \cdot H(\alpha) = \int f(\alpha) \exp \cdot 2\pi i (\vec{\alpha} \cdot \vec{r}) dr \times H(\alpha) \quad (4)$$

各像の Δf が判明すれば $H(\alpha)$ も計算され正しい散乱波の振幅と位相 $F(\alpha)$ が得られ、高い α までのデータでもう一度逆フーリエ変換を行えば、計算で結像過程を辿ることになり、より高い分解能の像を再合成することができる。

しかし実際の像にはノイズが多く、その統計的な取扱いが必要になる。ノイズの量を $n_j(r)$ とし、 m 個のスルーフォーカス像についてそれぞれノイズを現わす項を考えると、 β 番目の像のフーリエ変換 $J_\beta(\alpha)$ は、 $n_j(r)$ のフーリエ変換を $N_\beta(\alpha)$ とすると

$$J_\beta(\alpha) = H_\beta(\alpha) \cdot F(\alpha) + N_\beta(\alpha) \quad (5)$$

となる。(4)式のときは、 H_0 の所を選んで $H(\alpha)$ で割ることで $F(\alpha)$ が得られるが、(5)式になると、逆フィルター関係 $Q(\alpha)$ を定義し、次の形で $F_\beta(\alpha)$ を求める。

$$F_\beta(\alpha) = Q_\beta(\alpha) \cdot J_\beta(\alpha) \quad (6)$$

このとき $Q_\beta(\alpha)$ は、透過関数の結像に寄与する $\sin x$ を用いると、次の形となる。

$$Q_\beta(\alpha) = \sin x_\beta(\alpha) / [n(\alpha) + \sum_{r=1}^M \sin^2 x_r(\alpha)] \quad (7)$$

ここに $n(\alpha)$ は S/N 比の逆数である。

実際に解析は、最良焦点像をふくむ4～5枚の不足焦点像(アンダーフォーカス)を撮影し、各々を縦横512×512の画素に分割して高速マイクロデンストメーターで強度をよみとり、FFTを用いてフーリエ変換を行う。電子線の波長、球面収差係数、光源の波長分布、可干渉性を示す照射電子の開き角等は極めて正確に測定し、 $H(\alpha)$ の精度を高めることが実際的には極めて重要である。図2は実際にJEM 500で撮影された塩化フタロシアニン銅結晶中の分子像のスルーフォーカス像で、(a)の最良焦点像では、菱形に見える各分子の中央のCu、周囲のClなどの原子像が明瞭に認められる。図のfは上記の手法を応用して再合成された同じ分子像で、Cu、Cl原子の像はシャープになり、4個のCl原子で囲まれたベンゼン環もその姿が認められるようになって、明らかに像の解像力が向上したことが判る。

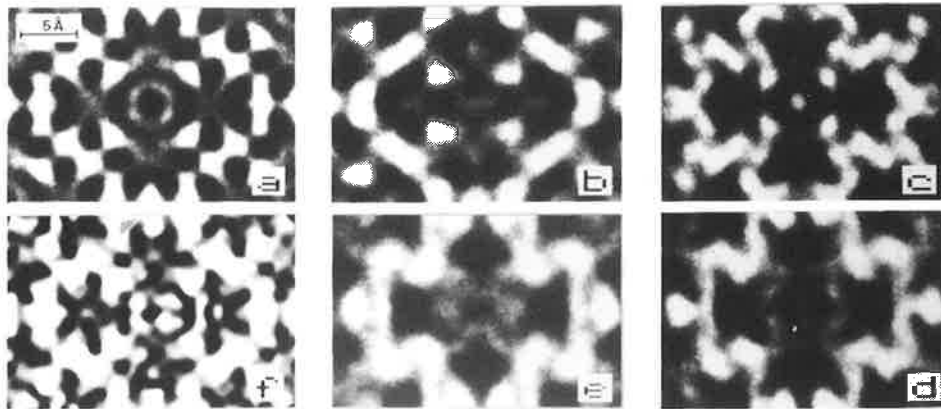


図2. a～e : Through Focus 像 f : 再合成像。

12. 画像処理システムを用いた神経細胞の形態計測

前田 純 (大阪大・基礎工：生理研)

神経細胞の形態を計測し、量的なパラメータを得ることは、形態学的研究及び神経活動のシミュレーションを行う上で重要であり、その計測精度の向上、処理の自動化への要求が高まっている。発表者と塚原は、この要求を満足させる光顕画像処理システムを開発し、神経細胞樹状突起の精度の高い形態計測を行っている。さらに発表者は、電子顕微鏡写真からの対象物の抽出に関する実用性の高いアルゴリズムを開発し、連続切片標本の3次元表示のためのプロセスの中で使用し、処理体系を確立した。

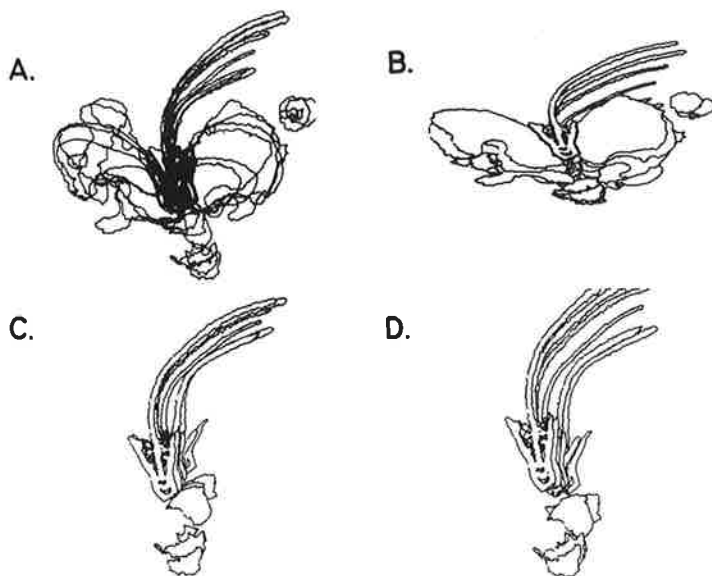
光顕画像処理システムは、載物台のX-Y方向と、焦点の移動をパルスモータで制御する3次元ムービングステージを開発し、光顕本体(NIKON BIOPHOTO)の鏡筒に直結したTVカメラ(浜松テレビ C-1000-01, カルニコン管), 計算機本体(NDG NOVA3, FDOS), それに独自に開発した画像入力インターフェイスとグラフィックディスプレイ制御部とから構成される。TVカメラからの画像は、画面中の幾何学的歪や光量変化の少ない中央部を縦・横256×256の画素に標本化され、各画素は10ビットに量子化される。画像モニターには、サンプリング格子に対応する画素をもった2値画像を重ねて表示し、対象物の抽出の確認を容易にしている。

本システムで計測を行っているものは、ネコの中脳赤核細胞のHRP細胞内染色標本である。赤核細胞の樹状突起は細胞体中心から500 μ m以上にも及ぶので、一枚の画面で全細胞を抽出することは測定精度の点で实际的でない。そのため、一辺50 μ mの正方形部分画面で、細胞体及び樹状突起の抽出を行い、後にそれらの部分画面を重ね合わせるにより、全体像を再構成することにした。この手法により非常に高い分解能(1画素は一辺0.2 μ m)で樹状突起全体を抽出できた。

各部分画面での樹状突起の抽出は、濃淡レベルによる2値化の手法を用いる。すなわち、対話的に設定される閾値より暗いものを1（対象物）とし明るいものを0（背景）とする。画像のコントラストを高めるため光学フィルター（KODAK 47B）を用い、さらに、サンプリング時に、4～16回の量子化グレイレベルの加算平均を行いS/N比を高めている。標本の厚さは100 μ mで、その中で樹状突起は3次元の拡がりをもっているため、部分画面内の樹状突起に一樣に焦点を合わせることは不可能である。そこで、抽出は、画面全体を一度に行うのではなく、焦点の合った領域だけをカーソルで指定し、2値化する。このようにして抽出された画面には、排除しにくいノイズ（赤血球等）が存在する場合もあるので画面エディターで修正した。となり合う部分画面の合成には、3つの手がかりを用いる。第一は、すでに抽出した部分画面を移動させて表示し、それに合うように標本を移動させて次の部分画面とする。第二は、2つの部分画面を合成して表示し、そのずれを修正する。第三は、3次元ムービングステージにとりつけた2軸のデジタル・マイクロメータで実際の移動量を得る（分解能1 μ m）方法である。第一と第二の方法は、つながった樹状突起のサンプリングと後処理の過程で相補的に使用し、第三の方法は、切片が細胞体を含まず、樹状突起がとぎれている場合、それぞれの樹状突起間の位置関係を知るのに用いた。このようにして抽出された樹状突起から、その太さの細胞体中心からの距離に対する変化を計測した。まず、樹状突起の中心線を定義するために Medial Axis Skeletonning 法を用いて骨格化した。細胞体中心も同様にして、それぞれの樹状突起の中心線が収束する所として定義される。樹状突起中心線上の任意の点の細胞体中心からの距離は、この中心線を通る長さで定義し、樹状突起の太さのプロファイルを計算する。この計算結果から、赤核細胞の樹状突起の太さは、細胞体中心から2～300 μ m、太さが2～3 μ mになるまで単調に減少し、分岐間で一定径を保っている訳ではないことが明らかになった。神経細胞の電気活動のシミュレーションを行う上で、より精度の高いデータを与えるものである。

一方、電子顕微鏡写真からの対象物の抽出は、濃淡レベルによる閾値処理では困難である。しかし、抽出したい対象物は、特定の濃度をもっているか、周囲を膜で囲まれており、対象物の画像の統計的性質は比較的一様である。これを利用して、まず原画像を4×4画素ずつ圧縮した副画像を作る。副画像の各画素は、元の4×4画素の平均値と分散の2つのパラメータを有する。操作者は、対象物内の一点をカーソルで指定し、それに対応する副画面の点から、平均値と分散の2つのパラメータを元に領域を拡大して行く。この手法を実際に応用したのが下図である。標本は、アメリカナマズ、網膜のリセプターのリボンシナプスの6枚の連続切片で、基生研・酒井助手から提供されたものである。A図に抽出された水平細胞及び双極細胞からのプロセスとリボンと重ね書き、B図に下60度より見た3次元表示、C・D図にリボンと双極細胞だけを2つの異なる方向から表示したものを示す。

本研究から、画像処理の手法が、神経細胞の形態計測において、光顕・電顕標本に共に有効に使え、精度の高い量的なパラメータが抽出されることが明らかになった。今後の計算機アーキテクチャーの進歩、演算速度の高速化により、より高度の処理が可能になることが期待される。



13. 東京大学生産技術研究所における顕微鏡画像処理に関する研究

高木幹雄（東京大・生産技術研）

1. はじめに

東京大学生産技術研究所の小生の研究室において行って来た顕微鏡関係のデジタル画像処理について紹介したい。デジタル画像処理の研究は、1969年より始め、主としてミニコンピュータを用いた対話型画像処理システムによって研究を行っている。

2. 高精度オンライン顕微鏡の開発

顕微鏡画像処理の研究を始めるに当り、顕微鏡画像を写真に撮り、写真から入力することは、写真を介するために、情報が歪み、手間も掛り、かつ、計算機に顕微鏡画像を直接入力できるものが入手できなかったので、高精度オンライン顕微鏡を開発した。この顕微鏡では高分解能のTVカメラで撮像し、ビデオ信号をデジタル化して、計算機に入力できる。又、顕微鏡系もX、Y軸のステージ移動、焦点合せも直流モータによる駆動、ロータリーエンコーダによる読取の組合せによって計算機制御が可能である。染色された標本を能率よく処理するためには、対象物の波長特性を解析し、処理を容易にする波長の選定や波長を変えた複数の画像により画像中の特定部分の抽出を行うために分光器を計算機制御し、単色光で照明が行えるようにした。ミニコンピュータを用いた対話型処理システムを構成し、1台のミニコンピュータにより、顕微鏡系の制御、画像の入出力の制御、対象物の走査、画像の計測、解析、分類を行うことができる。その後位相着用としても用いられるようにしたが、落射照明は未だ取付けていない。

3. 染色体の解析

通常染色法による正常な染色体の核型分類をデジタル画像処理によって行うことを試みた。染色体は2値画像として取扱えること、腕長の計測、着糸点の位置決めによって解析が行え、ミニコンピュータを用いて対話型で修正する方式を開発した。対象としては、重なりや接しているものは除外し、分離しているもののみを処理したが、ほぼ満足の得られる結果が得られた。分染法については試みていない。

その後、環境因子による染色体の異常、特に低線量放射線による異常をモニタすることは、低線量放射線の最も鋭敏な指標として原子力の開発に関連して重要であると考えて試みた。疫学的に評価するためには、低線量放射線による異常が非常に低い率で発生すること、バックグラウンドとしての自然放射線によるものと識別するためには、多量の検査を行わねばならぬことから、高速化を念頭に置いて研究を進めたが、現在は人手の点から中断している。

4. 白血球の分類

白血球の分類も画像処理の研究に着手した際に始めたが、写真を介す方法では実用的ではないこと、当時 flow method が発表され高速であり、形態学的な手法では時間が掛ることから、中断していたが、オンライン顕微鏡を開発してから分類のアルゴリズムにつき検討を行った。

5. 脾細胞顆粒の移動の解析

東京大学医学部第3内科より脾細胞顆粒の移動の解析を行いたいという申出があり、研究を行った。動画像処理の問題として面白い対象であり、追跡のアルゴリズムを検討した。又、重なり合った粒子の分離する問題も非常に興味のある問題であったため、専ら興味がそちらに移ってしまい、脾細胞顆粒の解析の実用化は等閑にしてしまったが、重なり合った粒子の解析では反復演算による方法を開発し、脾細胞顆粒、カーボン粒子、子宮癌細胞で試み、上手く行くことが判明した。

6. 多くの断面像からの立体像作成

多数の断面像から三次元情報を得て、立体表示を行うことを試みた。対象としては、胎児のスライドを用い、TVカメラで入力し、固定に用いた4個の穴を基準点として探し、アフィン変換によって位置合せを行った。位置合せした画像から輪郭を追跡し、表面の情報を得て、3次元表示を試みた。

7. 細胞分裂期における細胞内顆粒運動の解析

東京大学理学部植物学教室の依頼により研究を行っている。シダ原系体の細胞分裂期にみられる細胞内顆粒の運動を解析しようとするもので、VTRに駒落して記録されたデータを再成し、フレームメモリに固定して1駒ずつ計算機に入力して処理を行った。密集しているために脾細胞顆粒と同様な手法は用いられず、各画素毎に時間的な変動から画素毎の活動度を求め、それを疑似カラー表示することによって顆粒の運動を表現した。

8. GaP 発光ダイオードの通電劣化現象の解析

この研究は、東京大学生産技術研究所第3部のデバイスグループと共同で行われたもので、発

光ダイオードの微小転位欠陥による劣化機構を解明するため顕微鏡下で通電し強制劣化させた試料の画像をデジタル画像として入力し、各画素毎の発光出力の経時変化を観測し、各画素毎の劣化率を求め、これを画像化して表示することにより、光出力の低下の原因が、転位によるものであることが明らかになった。

9. 走査型電子顕微鏡からの画像入力装置の開発

これも上記のデバイスグループとの共同で行ったもので、走査電子顕微鏡の画像を写真を介さずに直接計算機に入力するための装置を開発した。マイクロコンピュータにより、走査型電子顕微鏡の走査を制御し、フォトマルの出力をA/D変換してホストコンピュータにデータを転送する。これにより、加等平均によるS/Nの改善、同一点における複数データの観測、試料の誘起電流のトランジェントを観測し、処理することが可能となった。

10. ブリスター状表面損傷の解析

この研究は日本原子力研究所の依頼によるもので、核融合炉材のブリスター状表面損傷を定量化するため、金属表面の電子顕微鏡写真からブリスターの直径を測定するもので、ブリスターの明るい部分と暗い部分を抽出し、直径を求めその分布を表示した。

〔セミナー報告〕

Electrophysiological evidence that the non-adrenergic inhibitory mediator
of the esophagus of opossum is neither a purine nor VIP
and acts on unusual K-conductance channels

昭和58年 4月22日

DANIEL, E. E.

(Department of Neuroscience, Faculty of Health Sciences
McMaster University)

Circular muscle of the body of the opossum (*Didelphis marsupialis*) was used in studies with microelectrodes in Abe-Tomita partitioned baths and in single and double sucrose gaps. Tissues were also studied by conventional thin section electron microscopy. This muscle contains no functional cholinergic or adrenergic intrinsic nerves; only non-adrenergic, non-cholinergic nerves which when stimulated cause hyperpolarization of the membrane. After cessation of stimulation there is an after depolarization, often accompanied by spikes and contraction. The muscle usually has no basal active tension and so hyperpolarization is normally not associated with relaxation. The muscle has many gap junctions (4 per 100 cross-sectioned (c-s) muscle cells) and is well coupled electrically; $\lambda = 2-2.5$ mm; $\zeta = 200$ msec. There is a dense innervation (20 nerve profiles per 100 c-s muscle cells) mostly by nerves with varicosities containing predominantly small (40-60 nm) agranular vesicles and a few large granular vesicles. There are also 3 interstitial cells of Cajal per 100 c-s muscle cells; they are usually closely innervated and make gap junction contact with smooth muscle cells and one another.

Junction potentials following stimulation of intrinsic nerves (usually 0.5 msec, 1 to 2 Hz, supramaximal voltage) have a delay of 100 msec (at all distances from electrode) in partitioned bath and 300 msec in the sucrose gap. They are unaffected by atropine, guanethidine or indomethacin. Purines (ATP, ADP, AMP, adenosine, 6-chloroadenosine) have little effect on the membrane potential but ATP depolarizes slightly and causes a contraction at high concentrations ($\geq 10^{-4}$ M). All and especially 6-chloro-adenosine decrease the size of the junction potential and appear to inhibit mediator release by acting on a prejunctional purine receptor. VIP (10^{-8} M) increased the after-depolarizations and caused oscillations of membrane potential with spiking and contractions during depolarization. Thus neither a purine nor VIP can be the inhibitory mediator.

The inhibitory junction potential (IJP) was reduced in magnitude with increased external K, (K_o), slope-60 mv/10 fold K increase. In the double sucrose gap, hyperpolarization by current clamp reduced the IJP and it was reversed at potentials 30mv more negative than the resting potential (ie at about -90 mv). Increasing external K decreased the IJP and reduced the hyperpolarization required to reverse the IJP. Both the IJP and the after-depolarization were accompanied by reduced membrane resistance, tested with small hyperpolarizing current pulses. Thus, the IJP appears to be caused by increased K-conductance. However apamin (10^{-7} to 10^{-9} M), 4-aminopyridine (1 to 10 mM) ; tetra-ethylammonium ion (10 to 30 mM) did not abolish and hardly affected the IJP, even though Tea depolarized the membrane, increased membrane resistance and caused spiking. Quinine (10^{-4} to 10^{-3} M) increased membrane resistance and reduced or abolished the IJP. However it did not prevent the initial hyperpolarization by $10\mu\text{g/ml}$ of scorpion venom; a toxin which holds Na channels open, releases mediator, depletes all synaptic vesicles and abolishes responses to nerve stimulation. Thus the mode of action of quinine is uncertain. And the K-channels opened during the IJP are resistant to most K channel antagonists.

Removal of external chloride (isethienate replacement) reversibly hyperpolarized the membrane and reduced the IJP as expected, but it abolished the after-depolarization and all effects of VIP to increase the after depolarization and cause membrane potential oscillations and contractions. The magnitude of after-depolarization ($\pm$ VIP) was increased with increasing chloride concentration up to 100 mM and unaffected by higher concentrations. Since the chloride equilibrium potential is about -35 mv in smooth muscle and chloride equilibrates rapidly, these data are inconsistent with an increase in Cl conductance as the cause of the after depolarization. Perhaps stimulation of the inward Cl pump or of influx of Cl-coupled with Na (in excess) is involved.

Conclusions. 1. The non-adrenergic inhibitory mediator of opossum esophagus is neither a purine nor VIP and causes opening of unusual K conductance channels. 2. VIP may be the mediator of the after depolarization and acts to activate a Cl dependent mechanism.

Supported by Medical Research Council of Canada.

Current studies on two aspects of motor cortical organization:
intracellular recording and cortico-spinal projection
of functionally different motor areas

昭和58年 5 月 9 日

KOSAR, E. M.
(Laboratory of Neurophysiology,
The Rockefeller University)

Taste reactivity and hyperglycemic responsibility to
glucoprivation in the chronic decerebrate rat

昭和58年 5 月12日

GRILL, H. J.
(Department of Physiology,
University of Pennsylvania)

慢性的に上丘部において除脳されたラットは、自発的に食物の摂取を行なうことはできない。しかし口腔内にカニューレを植え込み、それを通して栄養を補給することで生存可能である。我々はこうした除脳ラットが下顎および舌の運動により、口腔内に注入された各種液体に応じて、それを燕下したりあるいは、はきだしたりすることを確認した。この方法により調べてみると除脳ラットにおいても味覚刺激に対する反応は正常ラットと同様であり、ショ糖溶液は燕下するがキニンを混ぜるとはきだすという反応を示した。続いて我々は、2-deoxy-D-glucose（ブドウ糖類似体の一種であり、細胞内において代謝されない。このため細胞内低血糖をおこし交感神経副腎性に反応性の高血糖をおこす）の注入によって生じる高血糖が、上記の除脳ラットにおいても生じることを観察した。

以上のような結果により、上丘切除部より尾側の脳幹部に味覚刺激に応じて摂食あるいは拒食といった応答を行なう精神機構が存在し、また同様な場所において血糖のコントロールを行なうブドウ糖受容機構が存在する可能性が考えられる。

Myelin-associated extracellular spaces

昭和58年 5 月20日

平野 朝雄
(Montefiore Hospital and Medical Center)

Central gustatory mechanisms

昭和58年8月10日

NORGREN, Ralph

(Department of Behavioral Science.

The Pennsylvania State University)

電気生理学手法及びトリチウム化プロリンオートラジオグラフィーを用いて、ラット背側橋部の味覚中継ニューロンの視床及び扁桃体に対する投射を調べた。ラベルされた軸索は視蓋を経て視床の味覚領に向かう。線維の多くは同側性であるが、少数は吻側橋及び中脳で交叉し、残りは視床内で交叉する。多くの線維は視床味覚領の腹側を通り、内側毛帯を貫通して円包の背円側に沿って上向する。このレベルで視床下核及び視床下部外側野に分布する終末がある。ラベルされた軸索は無名質に分岐した後、外側に向い、扁桃体中心核の吻側から尾側に投射する。扁桃体尾側より分界条に向かう線維も観察され、これらは背側視床の上を通り分界条の床核に向かう。

電気生理学のデータによれば、橋の味覚ニューロンは扁桃体中心核の電気刺激によって逆行性に興奮する。これらのニューロンの多くが視床味覚領の電気刺激によっても逆行性に興奮する。このことからオートラジオグラフィーで投射された軸索の一部は味覚情報を視床下部及び扁桃体に送っていると考えられる。

(文責・山本)

Some cellular correlates of conditioning in awake cats

昭和58年8月10日

WOODY, C. D.

(Center for the Health Sciences UCLA)

ネコでは条件反射〔音（条件刺激）—前額を軽く打つ（無条件刺激）—瞬目反射〕の成立に500回ほどの試行を要する。このとき運動野ニューロンの活動を細胞内記録すると、条件反射の成立に対応してMCニューロンの膜の興奮性が変化して条件刺激に反応するようになる。これに視床下部外側野刺激（条件刺激—無条件刺激—視床下部刺激）を加えると条件反射成立が促進され20回以内で成立する。またMCニューロンの条件刺激に対する反応も行動と同じあるいはそれに先立ってあらわれる。この視床下部の効果はグルタミン酸およびアセチルコリンを介している可能性がある。

Pharmacological study of ionic channels in giant axons of insects and squid

昭和58年 8月12日

PICHON, Yves

(Laboratoire de Neurobiologie Cellulaire CNRS)

Regulation of transmitter release by Ca^{++} , Na^+ and peptide

昭和58年 8月19日

RAHAMIMOFF, Rami

(Prof. of Physiology and Dean of the Medical Faculty.

The Hebrew University)

Muscle Structure as Studied by HVEM

昭和58年 9月16日

PEACHEY, L. D.

(Department of Biology University of Pennsylvania)

Metabolic changes by artificial sex cycling

昭和58年 9月26日

RODRIGUEZ, R. R.

(University of Buenos Aires)

**Application of the Avidin-Biotin Interaction
to the Isolation of Hormone Receptors**

昭和58年10月18日

HOFMANN, Klaus

(Protein Research Laboratory

University of Pittsburgh School of Medicine)

The topic of this lecture is the development of affinity resins for the isolation of hormone receptors using the insulin receptor from human placenta as a model. The method

is based on the avidin-biotin system.

Avidin¹ is a minor constituent of hen's egg white having the ability to noncovalently bind the vitamin biotin (binding constant 10^{15} M). Avidin, a basic glycoprotein (mol. weight 68,000) is composed of 4 identical subunits (mol. weight 17,000) each containing a biotin binding site. Avidin binds nonspecifically to cell membranes and this interaction can be minimized by succinylation (suc-avidin)². The biotin binding affinity is not significantly altered by succinylation.

Our approach to the isolation of insulin receptor³ involves the synthesis of bifunctional molecules in which biotin is attached covalently to the N^α,BI-position of insulin (biotinylated insulins). Such molecules can be expected to interact with solubilized insulin receptors on the insulin end and to suc-avidin on the biotin end. The prototype was synthesized by us in 1976⁴ and was carefully characterized. Biotinylinsulin (I) is as active as insulin in stimulating lipogenesis in rat epididymal adipocytes and has the ability to bind to suc-avidin. While the addition of suc-avidin does not interfere with lipogenesis due to insulin, it inhibits lipogenesis due to biotinylinsulin. This result suggested that biotinylinsulin binds to the insulin receptors on the fat cell and interacts with suc-avidin; but presumably because of steric interference is not capable of interacting simultaneously on both binding sites.

Since it appeared logical to assume that molecules in which spacers are interposed between the avidin and the insulin could interact simultaneously with both suc-avidin and soluble insulin receptor we synthesized 6-(biotinylamido) hexanoylinsulin (II) and 6-(biotinyl-amidohexanoylamido) hexanoylinsulin (III) and tested their ability to stimulate glucose oxidation in rat epididymal adipocytes and to bind to suc-avidin. Both molecules are active and bind to suc-avidin. The addition of a 100 fold excess of suc-avidin (400 biotin binding sites) to compounds II and III lowered but did not abolish their activity. Thus we had available a bifunctional molecule capable of interacting simultaneously with suc-avidin and with insulin receptors on the adipocyte.

Binding studies with suc-avidin and the three biotinylinsulins provided interesting results. Surprisingly, biotinylinsulin dissociated rapidly from suc-avidin with a $t_{1/2}$ of approximately 3 hours⁵. The $t_{1/2}$ for dissociation of biotin from suc-avidin is approximately 127 days. We interpret this finding to mean that the attachment of the bulky insulin molecule to the carboxyl group of biotin exerts a steric impediment to binding to suc-avidin. The $t_{1/2}$ values for II and III are both 72 days. These compounds can be attached to AH-Sepharose 4B-immobilized suc-avidin and affinity resins of this type can be expected to bind solubilized insulin receptors but retrieval of receptor in its native state (full specific insulin binding) may be difficult.

For these reasons we turned to another approach aimed at the discovery of biotin analogs having less affinity for suc-avidin than biotin. In this connection we explored the compound dethiobiotin which is readily prepared from biotin by desulfurization with Raney Nickel catalyst⁶. We have prepared a series of dethiobiotinylated insulins analogous to the biotinylated insulins and have determined the rates of their dissociation from suc-avidin. Dethiobiotinylinsulin (IV) fails to form a complex with suc-avidin. The $t_{1/2}$ times for 6-(dethiobiotinylamido) hexanoylinsulin (V) and 6-(dethiobiotinylamidohexanoylamido) hexanoylinsulin (VI) were 6 hours. In addition we have prepared N^α,B¹- [N- [3- [[3- [6- [6- (5-methyl-2-oxo-4-imidazolidinyl) hexanamido] -hexanamido] propyl] amino] propyl] succinamoyl] insulin (VII) and its $t_{1/2}$ is 14 hours.

All the compounds stimulate glucose oxidation in rat fat cells and at a ratio analog/suc-avidin of 1:100 compounds V, VI, and VII still retain activity. Here, as with the biotinylated analogs, the longer the spacer arm the greater the ability to interact simultaneously with insulin receptors and suc-avidin.

Preliminary experiments have indicated that affinity columns in which analogs VI or VII are noncovalently attached to Sepharose 4B-immobilized suc-avidin are capable of binding solubilized insulin receptor and the analog-insulin receptor complexes can be displaced from the columns with 20 mM biotin.

Acknowledgment : This work was supported by grant #AM21292 from the U. S. Public Health Service.

References :

1. Green, N. M., Adv. Protein Chem. (1975) 29, 85.
2. Finn, F. M., Titus, G., Montibeller, J. A., and Hofmann, K., J. Biol. Chem. (1980) 255, 5742.
3. Hofmann, K., Finn, F. M. and Kiso, Y., J. Amer. Chem. Soc. (1978) 100, 3585.
4. Hofmann, K., Finn, F.M., Friesen, H-J., Diaconescu, C., and Zahn, H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1977) 74, 2697.
5. Hofmann, K., Titus, G., Montibeller, J. A., and Finn, F. M., Biochemistry (1982) 21, 978.
6. Melville, D. B., Dittmer, K., Brown, G. B., and du Vigneaud, V., Science (1943) 98, 497.

網膜神経節細胞に対する興奮性及び抑制性伝達物質

昭和58年10月29日

IKEDA, H.

(Vision Research Unit Rayne Institute.

University of London)

麻酔、非動化したネコの網膜神経節細胞の光に対する応答を記録しつつ電気泳動法により各種の伝達物質候補物質や拮抗物質を投与してその影響を観察し、神経節細胞に対する伝達物質を探究した。

X型神経節細胞のスパイク頻度はL-アスパラギン酸の投与により著明に増大し、NMDA レセプターに拮抗作用を有する 2-amino phosphono valeric acid (2APV) の投与によって減少した。Xon 型の細胞は GABA により抑制を受け、Xoff 型のは glycine により抑制を受けた。一方 Y 型の細胞は ACh によってスパイク頻度が増大した。

これらの結果から X 型細胞に対しては双極細胞からアスパラギン酸作動性のシナプス入力が直接に入っていること、X 型細胞に対する抑制は GABA 作動性或いは glycine 作動性アマクリン細胞から来ていることをうかがわせる。一方 Y 型細胞は双極細胞からの入力を直接受けず、コリン作動性のアマクリン細胞を介して入力を受けていると考えられる。

血液のレオロジー

昭和58年11月18日

宇佐美 駿一

(コロンビア大学・医学部)

大脳皮質視覚領の微細神経回路

昭和58年12月5日

GILBERT, C. D.

(Rockefeller University)

大脳皮質のニューロンは外側膝状体からの入力線維を受けて情報処理を行っている。膝状体入力線維と皮質ニューロンとの結合、及び皮質ニューロン間の結合をネコの17野について細胞内 HRP 標識法、HRP 電顕法、ラジオオートグラム法及び活動電位の相互相関法を用いて精査した。

単純型細胞はⅤ層上部とⅣ層に見出された。Ⅳ層の spiny stellate cell にはグルタミン酸やアス

パラギン酸の取り込みが見られ、Smooth stellate cellにはGABAの取り込みが見られた。Ⅵ層の錐体細胞の軸索はⅣ層のsmooth stellate cellの樹状突起と非対称型のシナプスを作り、また膝状体線維はⅣ層のspiny stellate cellの樹状突起と非対称型のシナプスを作っていた。水平方向に離れたⅥ層の2個の単純型細胞のスパイクの相互相関を取ると、高い相関を示す部位が飛び飛びに見られ、その部位では最適刺激の向きが一致していた。また高い相関を示す部位の分布はHRPで標識したⅥ層ニューロンの軸索末端の分布と一致していた。これらの結果は、Ⅳ層細胞は膝状体からの直接の入力の他にⅥ層ニューロンから興奮性入力を受けていること、同一の向きのカラムに属するⅣ層ニューロンは共通のⅥ層ニューロンから入力を受けていることを示唆している。

軸索膜の分化と細胞骨格構造の特殊化

昭和58年12月10日

ELLISMAN, M. H.

(Dept. of Neuroscience,

Univ. of California San Diego)

有髄神経の軸索膜と原形質中の線維性蛋白質との関連を、部位別に、超高圧電顕法及び凍結割断法を用いて調べた。有髄神経のランヴィエ絞輪間の軸索膜近傍の構造は、比較的単純で線維構造はまばらである。所々に、ひげ状の線維が膜から原形質中にかなり長く伸びており、微小管やニューロフィラメントに結合している。一方、絞輪部の軸索膜の内面はいわゆる絞輪下肥厚を伴っている。超高圧電顕鏡下にこの肥厚を観察すると、約40Åの細い線維が高い密度で並んでいるのがわかる。絞輪部の軸索膜直下には、細長い形の房状膜構造がみられる。この構造は微小管やニューロフィラメントと接触部位をもち、多くは軸索の長軸方向に伸びるように広がっている。凍結割断法で見ると、絞輪部の軸索膜に直径0.1μm程の開孔がいくつかみられることがあり、これが軸索内の房状膜構造に連なっている像をうることもできる。これらは、細胞骨格によって運ばれてきた膜の材料が、代謝回転の速いであろう絞輪部の軸索膜へ補給される姿であると解釈できる。絞輪周囲部分ではニューロフィラメントが軸索長軸に沿って走るが、軸索膜の近くではほぼ一定の間隔で並び、細い短い線維によって軸索膜と結合している。軸索の外側にはミエリンの終端ループが重なっているが、この終端ループの細胞質中にはチューブ状の膜構造と70Åの太さのマイクロフィラメントが、膜に接するように、かつ、軸索内のニューロフィラメントの走向とは直角の方向に走っている。これらの構造の相互関係は、厚い切片を超高圧電顕鏡下に立体的に観察することによって、よく把握することができる。絞輪周囲部の軸索膜には、直径の小さな膜内粒子がぎわめて高い規則性をもって配列していることが知られているが、この規則性は、以上のような軸索内線維と終端ループ内の線維の配列と深く関係していることが推測される。

(寺川 記)

The methodology and the use of membrane fractionation techniques
for various physiological and pharmacological studies
on the control of smooth muscle function

昭和59年 1 月26日

KWAN, Chiu-Yin

(Department of Neuroscience, McMaster University)

Mechanism of the β -catecholamine-induced
hyperpolarization of cardiac cells

昭和59年 1 月30日

GADSBY, David C.

(Rockefeller University)

The regulation of peripheral blood flow in man

昭和59年 2 月10日

RODDIE, I. C.

(The Queen's University of Belfast)

Forgetting and Rediscovery in Biology

昭和59年 3 月10日

HUXLEY, Andrew F.

(Royal Society of London)

Charles Darwin の進化論は Thomas Huxley (演者の祖父) などの努力で、世を風靡したが、その後 Mendel の法則と違背するものとされ、一時下火となった。しかし、変異が一般的現象であることが理解されるとともに Julian Huxley (演者の異母兄) などによって再興された。これは一つの説が時の流れとともに盛衰を繰返した例である。

世に喧伝された大発見も、歴史を遡ると遥か以前に記載されていることが多いが、その一つは、演者が Hodgkin, Katz とともに確立した神経興奮のナトリウム説は、既に1902年 Overton が筋内において記述されていた。

また一つの発見乃至発明が全く独立に処々で行われていることが屢々ある。演者は特殊な干渉

顕微鏡を製作して、スライド説の有力な証拠を提出したのであるが、この種の干渉顕微鏡の発明は、演者以外に同時に世界で五カ所で行われていた。

スライド説は1954年演者及びHugh Huxleyによって提出されたが、その大きな根拠となったのは、収縮時A帯に変化がないという事実である。このことは19世紀に数多く研究者によっていろいろな証明が提出されていたが、20世紀に入り、生理学者の殆どすべてがA帯が収縮するという誤った考えになったことは不思議なことであった。

科学の進展は実験事実に基づくことはいうまでもないが、大切なことはそれを無理なく説明することである。更に科学全般について広く深い知識が必要で、これによって一つの領域が不当に突出することが避けられよう。

19世紀の先駆者の業績は誠に素晴らしいが、それが完成されなかったことは、個々の問題としてでなく、当時の科学の進展を背景にして考えるべきことである。（なお本題には関係ないが、演者が今後の大きな課題は量子力学的コンピューテーションによる蛋白内部構造の解明にあたると強調したことは注目してよい——要約者注）。

針麻酔物質について

昭和59年 3月12日

周 郛

（中日友好病院 臨床医学研究所）

【 超高压電子顕微鏡
共同利用実験報告 】

超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告

〔目 次〕

超高圧電子顕微鏡による細胞化学的研究（小川和朗他）	433
成人T細胞白血病ウイルス（HTLV）の微細構造（大舘祐治）	434
超高圧電子顕微鏡を用いた立体観察による外分泌腺房細胞の マイクロチュブル系、導管系及び腎尿細管細胞のマイクロビライ系の 生理機能に関する研究（佐々木貞雄他）	435
超高圧電顕によるパーオキシゾームの観察（中村允之他）	436
脊椎動物網膜の視細胞間結合（神山暢夫他）	438
細胞膜とその内側と外側の立体微細構造（後藤隆洋）	439
哺乳動物の生体内受精現象の三次元的解析（年森清隆他）	440
筋内部膜微細構造の比較（堀田 健他）	441
心筋細胞内線維系の立体構造（柴田洋三郎）	442
ニューロンとパラニューロンの Z10 陽性形質内網系の立体微細構造（小林 繁他）	443
超高圧電子顕微鏡による細胞内小器官の立体構造ならびに その動態の研究（斉藤多久馬）	445
走磁性細菌内磁性体微粒子の高分解能観察（松田 強他）	446
アメリカナマズ網膜の双極細胞（中 研一他）	447
心筋 T-tubules の立体解析（浜 清他）	448
神経細胞およびグリヤ細胞突起の立体観察（浜 清他）	448
生体膜に関する細胞化学的研究（平野 寛他）	449
ウシ心筋チトクロム酸化酵素結晶ならびにチトクロム bci 複合体結晶の 電子線回折ならびに電子顕微鏡像の観察（小澤高将他）	451
結晶中の格子欠陥の立体観察（井村 徹他）	452

超高圧電子顕微鏡による細胞化学的研究

小川和朗・藤本豊士・藤本 和・野田 亨

山本厚太・酒井眞弘（京都大・医）

細胞の超微細形態を超高圧電子顕微鏡で観察するために、細胞化学的手法を用いて、特異的に、対象とする細胞小器官の電子密度を高くすることによって、より正確な立体観察および高分解能観察を試みた。

1. Zinc-Iodine-Osmium (ZIO) 染色による膵外分泌細胞ゴルジ装置の立体観察

我々は、従来より神経終末小胞の染色に用いられてきた ZIO 染色を膵外分泌細胞のゴルジ装置の観察に用いたところ、ゴルジ装置の特に cis 側層板が強く染め出され、他の鉛法を用いた酵素細胞化学的なゴルジ装置染色法以上の解像力をもって、ゴルジ装置を観察することが可能となった。しかも、他の細胞小器官も中等度の電子密度を有しているので、ゴルジ装置と他の小器官との関連が明確である。この方法によって染色した、マウス膵の 1 μ m 厚切り切片を、超高圧電子顕微鏡（H-1250M）で、stereo pair の写真を撮影し、立体視を行うと、超薄切片像からは得ることのできなかった、新たな知見が得られた。すなわち、超薄切り切片上では、ゴルジ装置は散在しているように観察されたが、超高圧電子顕微鏡による厚切り切片の観察によって、①ゴルジ装置はリボン状に広がりをもった層板が複雑に分枝し、かつ連続した細胞小器官であること、②そのリボン状構造には、cis 側、trans 側が存在し、特に cis 側層板には平均 50~100nm の fenestration が存在すること（図 1 a と b）、③さらに、このリボン状構造は、cis 側、trans 側という極性を保ったまま回転しうることを明らかにした。これらの知見はゴルジ装置の概念に新たな側面を加えた画期的な成果である。

2. Lysosomal wrapping mechanism (LWM) の立体観察

自己食食に伴ってライソゾームが形態を変化させ、細胞内を動くこと（LWM）が知られている。我々は、LWM の生理的な意義とその制御機構を解明するために、種々の条件下におけるマウス皮下組織球や脾食細胞のライソゾームの動態を観察している。本研究において、ライソゾームの示標酵素である酸性ホスファターゼ活性検出を行った試料の厚切り切片の、超高圧電顕観察ならびに、立体観察を行った。従来、超薄切片の観察から、LWM 発現時のライソゾームは垂鈴型、ドーナツ型など非常に多形性を示すことは明らかにされていたが、超高圧電顕観察によって、ライソゾームは非常に大きな連続した構造として観察され、細胞質の一部あるいは細胞小器官を取り込みつつある様な像が認められた。

3. ギャップ結合の高分解能観察の試み

ギャップ結合は、細胞間相互の情報交換の場としての機能があることが知られている。我々は細胞化学的に、ギャップ結合に adenylate cyclase, guanylate cyclase および Ca^{2+} -ATPase が存在することを証明した。これら酵素活性のギャップ結合における局在の高分解能観察を行ったが、包埋剤のノイズによって十分な結果が得られなかったので、凍結超薄切片の観察を試みる予定である。

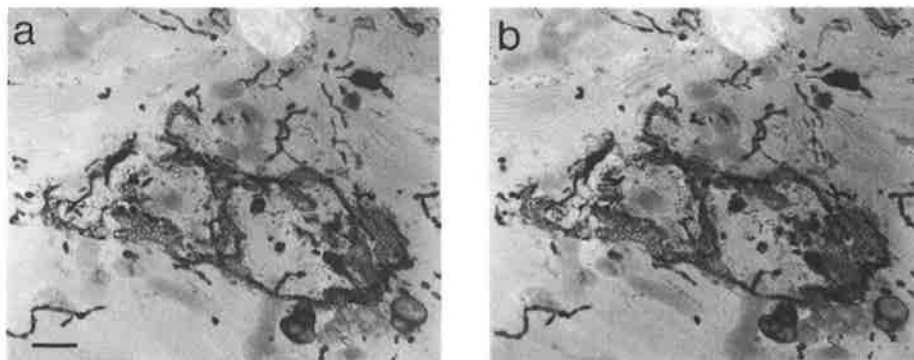


図1. a, b. マウス腺外分泌細胞、ZIO染色。1 μm 切片の超高压電顕像。

Stereo pair a: -8° 、b: $+8^\circ$ スケールは1 μm を示す。

成人T細胞白血病ウイルス (HTLV) の微細構造

大舘祐治 (高知医科大・病理)

〔目的〕 成人T細胞白血病 (ATL) ウイルス—Human T-cell leukemia/lymphoma virus (HTLV) が米国と日本で相次いで発見されて以来、HTLV粒子は、ATL及びATL関連細胞や抗HTLV抗体陽性日本ザルにおいても見出されている。HTLVの形態的特徴はC型粒子であるが、大きさ80-160nmと大小不同性が強く、成熟型が殆んどであり、少数の未熟、非常に稀な発芽粒子をみることに、表面にスパイク構造を有しないこと、細胞外で小顆粒や桿状構造物、空胞と共存することなどである。特にHTLVの粒子数に比し発芽像に乏しいことが大きな特徴の1つであり、通常の高圧電顕によりHTLVと細胞膜との密接な関係も示唆されるところから、この点を主体に超高压電顕によるHTLV産生細胞の観察を行なった。

〔方法〕 HTLVが通常の高圧電顕で多数見出されるヒト臍帯血T細胞由来MT-2細胞を、グルタルアルデヒド (GA)、四酸化オスミウム (Os) 固定の他にタンニン酸 (TA) を添加したGAで固定したもの、ルテニウム赤染色を行なったものをエポンに包埋した。1 μm 位の切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色後、日立製超高压電子顕微鏡 H-1250M 型 (加速電圧

1017KV) で -20° ~ $+20^{\circ}$ の傾斜角をかけて、直接倍率 $\times 50,000$ で細胞膜に近接したHTLVを観察した。

〔結果〕 今回の検索では以下のような所見が得られた。1) 図に示すように細胞膜から“ pinched off ” の pattern をとって出芽しつつある粒子がごく稀に見出された。核様体 (N) は網状構造を呈し、細胞質 (C) を挙上するように茎 (矢印) をもって細胞表面から細胞外に芽出している。2) 絮状物をはさんで細胞膜に近接しているHTLVがしばしば見出されたが、これらの粒子は傾斜によっても、細胞膜との連続性はみられなかった。近接部ではウイルス被膜と細胞膜部はやや電子密度が高くなっていた。3) 核様体が未だ明瞭に形成されていない出芽様粒子も稀に認められた。4) 大多数の粒子は細胞から遊離していたが、ウイルス被膜同志が融合したようにみえる粒子も存在した。以上、超高压電顕による立体観察からも出芽像はごく稀で細胞膜との密接な関係も限られた粒子においてのみ認められたことから、HTLVの生成過程は通常の電顕所見とも併せて、既知の動物由来C型ウイルスとは異なっており、更に形態的に観察する余地があると考えられる。

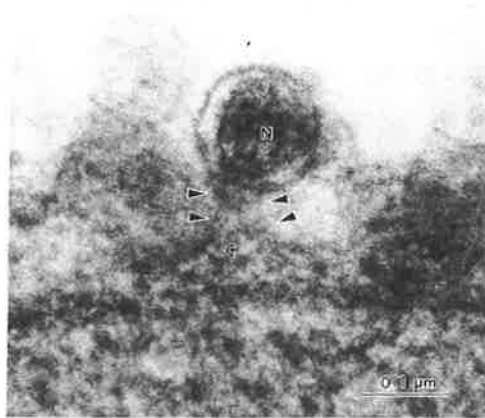


図. 発芽粒子の電顕像を示す核様体 (N) は網状構造をとり電子密度は高く、茎部 (矢印) は細胞膜から突出し細胞質 (C) を一部挙上させている。 $\times 108,000$ 。

超高压電子顕微鏡を用いた立体観察による外分泌腺腺房細胞のマイクロチュブル系、導管系及び腎尿細管細胞のマイクロビライ系の生理機能に関する研究

佐々木貞雄, 中垣育子, 今井雄介 (大阪医大・生理)
藤本 守 (大阪医大・生理), 田代 裕 (関西医大・生理)

家蚕後部絹糸腺細胞や犬顎下腺腺房細胞のような外分泌腺細胞の細胞内には、蛋白、イオン、

水の分泌を効率的に行なうための、分泌果粒輸送系（マイクロチュブル・マイクロフィラメント系）や細胞内分泌細管が発達していると考えられる。また両棲類の腎尿細管細胞にも、管腔より蛋白、アミノ酸、糖、水の再吸収を活発に行なう管腔側微絨毛系（マイクロビライ系）、細胞内ライソゾーム輸送系、および基底側細胞膜嚢入が発達している。今回超高压電子顕微鏡による立体的観察を行ない、これら細胞内輸送系の構造と機能を検討した。

家蚕後部絹糸腺、犬顎下腺、蛙腎の各試料小片をグルタルアルデハイド溶液（0.1M Na-cacodylate buffer, pH7.3 with 0.25M Sucrose）で前固定し、一部は酸フォスファターゼ反応あるいはATPアーゼ反応の細胞化学的処置を施し、他の一部はそのままオスミウム酸で固定した後、酢酸ウラニールのブロック染色を施し、脱水の後エポン包埋した。電子顕微鏡用超ミクロームで厚さ1～3 μm の切片を作製し、超高压電子顕微鏡（生理学研究所設置：Hitachi H-1250M型）に切片を入れ、 $\pm 8^\circ$ の傾斜角度を切片に与えて、1000KVの加速電圧の下に観察、写真撮影した。一視野につき $\pm 8^\circ$ の傾斜で撮影された二枚の電顕写真をステレオスコープで観察、ないしはテレビカメラで撮りコンピューターで画像解析する事によって、外分泌細胞および腎尿細管細胞を立体的に観察し、各輸送系の立体構造より機能の本態を検討する事を目標とした。

家蚕後部絹糸腺細胞の立体観察では、絹蛋白フィブリンの分泌障害時、分泌果粒の細胞内貯溜と分泌果粒輸送系（マイクロチュブル系）の消失が鮮明に観察された。犬顎下腺腺房細胞の立体観察より漿液細胞の作る細胞間細胞膜嚢入および細胞間分泌細管膜にNa, K-ATPase活性を認め、さらに分泌刺激時分泌細管が拡大するのが観察された。また蛙腎近位尿細管細胞の立体観察より、管腔側マイクロビライの基部での小胞による管腔内容物の細胞内への取り込み、細胞基底部でのライソゾームによる蛋白をはじめとする内容物の血液側への開口放出を観察した。以上輸送上皮細胞の厚切り切片の立体的観察でしか得られない新知見を、今回の超高压電顕共同利用実験で得ることができた。

超高压電顕によるパーオキシゾームの観察

中村允之、湊川洋介、城戸 亮（和医大・病態生化）

超薄切片では尾を持つ Peroxisomes がよく観察される。この尾が小胞体（ER）の一部であるとする考えと、Peroxisomes 間を連絡する“Peroxisomal reticulum”であるとの考えとがある。前者では Peroxisomal 蛋白はこの尾を通して直接ERから供給されると考えられている。他方、後者では Peroxisomes はERとは無関係で、独立に存在し尾によって互に連結され得る。そして Rough ER で形成された蛋白が膜を經由して局在化すると考えている。Peroxisomes の形態を正確に把握することがこれらの問題の解明につながるものである。現在までの超薄切片での電顕観

察では、尾の全体像を正確に捕えることは困難である。今回、Peroxisomesの正確な立体像とERとの関りを明らかにする目的でラット肝臓の厚切り切片 ($1\mu\text{m}$) を超高圧電顕で観察した。

〔実験方法〕 Wister系雄性ラットをクロフィブレート入りの餌で飼育し、その肝臓をグルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒド入り緩衝液で還流固定した。これを直ちに細切後Shioらの方法¹⁾でカタラーゼ染色、オスミウム酸処理を行いエポンに包埋した。これをウルトラミクロトームで $1\mu\text{m}$ の厚さに切り、ウラニール染色と鉛染色を施し、次いでカーボン蒸着した。これを超高圧電顕 Hitachi 1250 M を用いて、立体的観察のため試料台を回転させて写真をとった。

〔結果〕 直径 $1\sim 2\mu\text{m}$ の紡錐形あるいは楕円形の膨隆部とそれに続く $0.25\times 1.5\sim 2\mu\text{m}$ の桿状の尾を持った Peroxisomes が多数観察された。カタラーゼによる DAB 反応は膨隆部に強く、尾の部分は弱い。尾の部分には二条の縦走の線が認められ、これによって尾は $0.075\mu\text{m}$ 巾の三部に区切られている。この様な内部構造の存在は今までに報告されていない。立体的観察から、尾と尾が連ったものは皆無であった。また図 1 にみられる様に①桿状の尾だけのもの、②その約

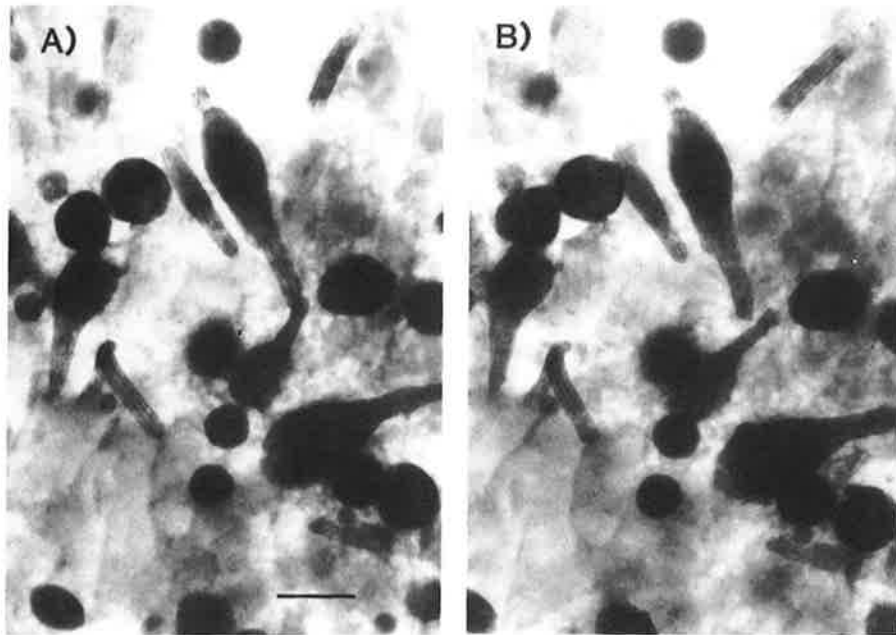


Fig. 1. Stereoscopic views of liver peroxisomes of chlofibrate rat.

Thick section ($1\mu\text{m}$) of the liver of chlofibrate treated rat was stained with DAB and fixed in osmium tetroxide, embedded in Epon, weakly stained with uranyl acetate and lead nitrate, and examined in Hitachi 1250M ultra high voltage electron microscope. Photographs, A and B, were taken at 20 degree rotated position of the microgrid. Bar represents $1\mu\text{m}$.

分の部分が少し膨らみ、DAB 反応もやや強くなったもの、③その部がさらに膨らんで大きくなり、それに伴ってDAB反応も強くなってはいるが、なお頭部に桿の一部を残しているもの、④

すでに頭部の桿がなくなり、尾だけを持っているもの、⑤尾もなくなって球状になったもの等 Peroxisomes の分化を示唆する一連の像が得られた。尾の部分のDAB反応が強いものも認められるが、この像を呈するものは尾の末端が次第に褪せている様に見える。ERとの関りについては研究を遂行中である。

〔文献〕

- 1) H. Shio & P. Lazarow, (1981) J. Histochem. and Cytochem., 29 : 1263-1272.

脊椎動物網膜の視細胞間結合

神山暢夫・渡辺宏助（東女子医大・生理）・大塚輝爾（生理研）

脊椎動物網膜の視細胞は軸索終末基底部に深く複雑な陥入を示し、ここに2次ニューロン（双極細胞と水平細胞）の樹状突起が侵入してシナプスを形成することが知られている。我々はHRP細胞内染色と薄切切片の電顕検索によりカメ網膜の視細胞—水平細胞間のシナプス結合を解析しているが、最近視細胞軸索終末に侵入する水平細胞の樹状突起の形態が両者の細胞体の近遠の距離によって異なっていることを見出した。2次ニューロンの軸索終末における形態は受容野形成の機構を理解する上で重要な手掛りを与えるので、水平細胞の樹状突起が視細胞軸索終末でどのような立体構造をしているかを調べる必要があった。そこで超高圧電顕を用いて樹状突起の立体像の再構築を試みた。

材料にはHRPを細胞内注入したカメ網膜のL型水平細胞を用いた。ゴルジ渡銀像に比べてHRP像は厚切切片のコントラストが乏しいという欠点があるが細胞内の微細構造の保存に優れていた。HRPの注入量や切片厚とコントラストの関係も併せて検討した。細胞内記録を行って単色光刺激によりL型水平細胞を同定した後、電子泳動的にHRPを注入した。網膜はパラフォルム・グルタルアルデヒドで固定しDABで発色した。後同定（オスミウム）、ブロック染色（酢酸ウラン）の後、Quetol 812に包埋した。網膜の水平断厚切切片（0.5から4 μm までの0.5 μm 毎に8種類）は超高圧電顕で観察した。

種々の切片厚を検討した結果、HRP標本は2 μm 厚が最適であった。この切片厚ではHRPでラベルされた水平細胞の樹状突起が細部に渡って観察出来、かつ視細胞軸索終末のシナプス結合の指標となる synaptic ribbon が識別出来た。2 μm 厚以上ではHRPのコントラストが乏しく、以下では樹状突起の立体像が得られにくかった。図1には水平細胞の細胞体に近接していた錐体視細胞の軸索終末の水平断像を示した。立体像から明らかなようにHRPを注入した水平細胞の樹状突起は錐体の軸索終末の直下まで単一の突起であるが終末部に侵入する直前に数本に分枝する。樹状突起はさらに軸索終末の陥入部の内壁に沿って籠状の構造を呈し、途中でシナプス結合していた。このように一本の樹状突起の先端が複雑個に分枝し、各々シナプス結合を形成す

ることは一個の錐体視細胞から効率良く信号を受取るのに適した構造であると考えられる。超高圧電顕の所見から薄切切片では困難であった樹状突起の立体構造が明らかになった。又 HRP 細胞内染色法による標本でも切片厚によっては充分観察することが出来た。今後さらに例数を増して視細胞—水平細胞間の信号伝達機構を形態学的側面から解明したい。

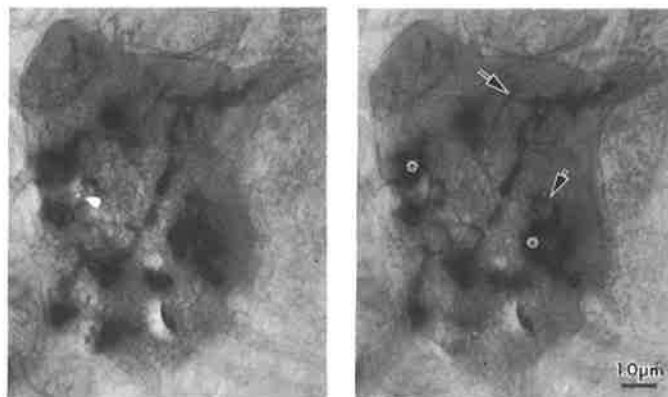


図1. カメ網膜錐体視細胞の軸索終末の水平断像。HRPでラベルしたL型水平細胞の樹状突起（＊）は他の2次ニューロンの突起を囲んで錐体視細胞軸索終末の陥入部の内壁に沿って上行し、途中でシナプス結合している。矢印は synaptic ribbon を示す。傾斜角、左右（ $\pm 10^\circ$ ）。

細胞膜とその内側と外側の立体微細構造

後藤隆洋（大阪大・医）

星状膠細胞の細胞膜に存在する四角形配列をした特殊膜内粒子（orthogonal arrays, OA, 構成粒子径約 7 nm）と細胞内外線維系との関係を凍結切断法によって検索した。まず、通常の凍結レプリカにより OA の分布をみるため、アルデヒド混液で灌流固定したモルモット脳の星状膠細胞膜を 100KV 透過電顕で観察した。OA は星状膠細胞の血管あるいはクモ膜下腔に接する細胞膜に密集していることが明らかになった。この部位から離れると OA の密度は急激に減少する。すなわち、OA は基底膜に接する部分の細胞膜に局限して密集する。この現象は OA と基底膜との間に何らかの関係が存在することを強く示唆する。OA は P 面での隆起像として検出されるが、E 面で明確な陥凹として識別可能なため、細胞膜を貫通し細胞膜外表面に突起していることが考えられる。従って OA と細胞膜に接する基底膜を構成する線維系との接触様式を把握するため、凍結切断した標本をさらにディープエッチングすることを試みた。血管周囲に比較して、脳表面を被う星状膠細胞膜は凍結切断法で広く割ることが可能なためこの部位での細胞膜と基底膜との関係をディープエッチング標本でステレオ観察した。100KV 電顕での観察所見は、個々の OA 分布密

度に比べて細胞膜に接着している個々の基底膜透明板を構成する線維は明らかに少なく、かつ細胞膜の真外表面にOAに呼応する突出粒子像がみられないことであった。すなわち、OAと基底膜線維系との直接的な形態学的対応は得られていない。また細胞質側の細胞膜真表面にもOAに対応する像は得られず、細胞内線維系との関係も明確でない。しかし、現在のところこの結論を出すのに十分な試料が得られていない。急速凍結に必須である液体ヘリウムの使用が困難であり、液体窒素で代用しているため、氷晶防止がかなり困難なため、細胞膜内外表面にOAの一部が突出しているかどうかを決定するにはまだ早いように思われる。このような試料作製条件の不安定さのため、今回は超高压電顕にまで試料をもって行くことができず、通常の100KVでの観察のみで終わらなければならなかったことは残念である。今後氷晶出現をできる限り防止した標本での超高压電顕による観察が上記した点に関して有力な手がかりを与えてくれるものと期待している。試料作製にあたり有益な御助言をいただいた浜清先生に感謝いたします。

哺乳動物の生体内受精現象の三次元的解析

年森清隆（宮崎医大）、有井達夫（生理研）

〔目的〕 超高压電子顕微鏡（HVEM）を用いて、マウスの生体内受精現象を三次元的に解析することを目的とした。卵管膨大部腔に上昇してくる精子数は極めて少数であるため、従来の超薄切片法では受精瞬間前後の精子頭部を観察することが非常に困難であり、三次元的解析も難かしい。従って、1 μm 厚切片をHVEMで観察し、受精する直前の頭部膜系の解析そして精子頭部と卵子細胞小器官との関連性について解析した。

〔材料と方法〕 ddY系雌マウスを排卵誘発剤を用いて誘発排卵し、雄と交配させた。交配後一定時間経過した雌の卵管を、灌流あるいは浸漬固定した後オスミック酸で後固定した。2%酢酸ウラニルを含む50%エタノール中でブロック染色した後、型の如く脱水してエボン包埋した。超ミクロトームで卵管膨大部の1 μm 厚連続切片を作成してトルイジンブルー染色し、光顕観察した。上記の目的に合う卵子を選別して、スライドガラスよりこれらの卵子を剥ぎ取り、鉛染色した。切片は、生理学研究所、超高压電顕室のH-1250M電顕を使用し、加速電圧1,000KVで傾斜装置を用いて最適角度で観察撮影した。三次元的解析は、ステレオスコープにて行った。

〔結果と考察〕 ①膨大部腔内に上昇してきた精子のうち、卵胞上皮細胞群の外にある精子の先体は残存していた。このことは、先体反応は、精子が卵胞上皮細胞群に進入する以前には起こらないということを示唆している。②胚卵腔に進入してきた精子の赤道部と先体後領域をおおう細胞膜は残存していた。この事実は、すでに著者（Toshimori, 1982）が加速電圧200KVの電顕で観察して報告したが、1,000KVの加速電圧を用いた今回の観察で明瞭に観察することができた。③精子が卵形質に進入した直後の頭部では、赤道部の先体膜が外側に彎曲し、そこに生

じた空間にミエリン様構造あるいは小胞状の構造物が見られた。この構造物についても、すでに著者ら (Toshimori and Oura, 1982) が報告したが、その由来については不明であった。今回の観察でも、これらの構造物が核膜に由来するか、あるいは卵子細胞小器官の膜系に由来するかを判別することはできなかった。

〔文献〕

- 1) Toshimori K. (1982) Biol. Reprod., 26 : 475-481.
- 2) Toshimori K. and Oura C. (1982) Biomed. Res., 3 : 350-352.

筋内部膜微細構造の比較

堀田 健, 大羽利治, 堀田康明 (名市大・医), 入沢 宏 (生理研)

骨格筋のT管と小胞体 (SR) の構造は、E-Cカップリングの場として筋の機能と密接に関与していると考えられる。アフリカツメガエル (*Xenopus*) はウシガエルやトノサマガエルに比べて発生張力が大きく、収縮速度が格段にはやい。我々はこれら3種のカエルについてT管に接続するSRの体積のサルコメアに対する比を比較してみたところ、ゼノパスは所のカエルに比して約2倍と大きなちがいのあることが判明した¹⁾。又トノサマガエル、ウシガエルのT管の直径の平均値は2.5~3 μm の程度であったが、ゼノパスのそれは細く、平均2 μm のものが多かった。又T管の走行は複雑で蛇行し、SRをとりまくように発達していた。このような構造が他のカエルとの力学的応答のちがいを作る原因になっているものと思われる。

われわれはT管の構造、走行のちがいを3種のカエル骨格筋について立体的にしらべ、triadにおけるT管とSRの接触面積を測定し、これを定量化して比較することを試みた。そのため、筋原線維全体を含む2~3 μm の厚切り切片を作り、超高压電子顕微鏡で観察した。現在までのところ、超高压の観察にたえ、十分なコントラストをもったT管の染色に問題があり、定量化は成功していない。今後処理方法を改良して、試料によって変ることのない一定のコントラストのある写真がとれるように努力する。

〔文献〕

- 1) Oba, T., Yamamoto, M., Aoki, T. and Hotta, K. : Mechanical, electrical and morphological characteristics of skeletal muscle fibers from *Xenopus* and other species of frog. Jpn. J. Physiol. 33 : 521-534(1983).

心筋細胞内線維系の立体構築

柴田洋三郎（九州大・医・解剖）

心筋を急速凍結ののち、ディープエッチングを行い、白金を全方向から二軸回転蒸着して深部におよぶ立体的なレプリカを作製し、収縮線維や細胞骨格などの線維走行を観察した。試料にはマウスの拍動中の心筋を瞬間凍結したもののほか、0.1%サポニンで処理して Cytosol を洗い出したものを用いた。

通常の切片像で認められる線維系のほか、細胞質中には複雑多様な線維状走行を示すものがみられたが、多くは解析困難であった。そのうち規則性をもち、常に認めたものとして筋原繊維の Z 帯を横に連結する線維があり、これらは最外側の筋原繊維では細胞膜に付着していた。介在板部の中間結合では、Z 帯から連続する線維が細胞膜の近傍で傘状に分岐して細胞膜に付着していた。ギャップ結合部位では、細胞質側膜表面（PS 面）に、PF 面の粒子と対応する低い敷石状の粒子模様を認めた（図 1）。時にこの斑状に線維を認めたが、これらは周囲の線維の断端と考えられた。このように今回用いたレプリカ試料の超高压電顕観察で判明したこととして、最も明瞭に観察できる切断最表面に配列する線維では、切断時またはエッチングにより走行が変化するものが多いことで、とくに他の構造に固定されてない遊離した線維の走行をレプリカ像からのみ判断するのは慎重を要することがわかった。

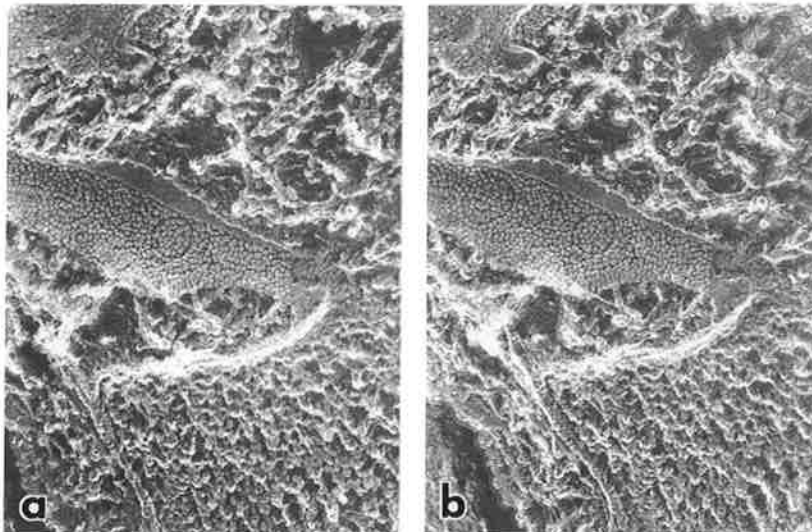


図 1. マウス心筋ギャップ結合部のステレオペア写真（傾斜角度 $\pm 8^\circ$ ）。切断膜の PF、EF とエッチングで露出した PS 面および周囲の線維が認められる。倍率 $\times 68,000$ 。

ニューロンとパラニューロンの ZIO 陽性形質内網系の立体微細構造

小林 繁, 内田 隆 (山梨医科大), 浜 清 (生理研)

いわゆる ZIO 染色はシナプス小胞の染色に用いられてきたが, 内田は独自にこの染色法を工夫して, Golgi 装置と滑面小胞体を選択的に染色される条件をみいだした¹⁾。ニューロンとパラニューロンは分泌果粒またはシナプス小胞形成のために, Golgi 装置と粗面小胞体をもっているが, このほかに ZIO 染色で陽性に染まる多数の管状または小胞状の特殊構造を含むようである²⁾。この構造の一部は Golgi 層板や被覆小胞と連続していることから, 分泌果粒およびシナプス小胞の開口放出にともなう果粒限界膜の取りもどしと, Golgi 装置への運搬に関与している可能性がある。本研究は, ZIO 法で染色された厚い ($0.5 \sim 3 \mu\text{m}$) 切片を超高圧電子顕微鏡で観察して, 上記の特殊構造の立体微細構造を解明することを目的とする。

〔材料と方法〕 成熟マウスの上頸神経節, 副腎髄質, ウサギの頸動脈小体について大略において Reinecke と Walther(1978)³⁾の方法に従い, なお若干の工夫を加えて ZIO 染色を行なった。3% グルタルアルデヒド・0.1 M リン酸緩衝液 pH7.2 で灌流固定後, 厚さ 0.5mm 以下の小片に組織を細切し, 次いでトリス・HCl 緩衝液 pH4.0~4.5 で 30 分間洗浄した。ただちに ZIO 混合液につけ, 4℃, 暗所で 5~12 時間浸漬して, ZIO 染色をおこなった。染色後の組織片はトリス緩衝液で再度洗浄し, アセトン脱水, アラルダイト樹脂包埋をおこなった。厚い切片 ($0.5 \sim 3 \mu\text{m}$) を作製し, 無染色にて生理学研究所の超高圧電子顕微鏡で検鏡した。

〔結果と考察〕 マウスの上頸神経節の神経節細胞, 副腎髄質のクロム親和細胞およびウサギの頸動脈小体の主細胞について代表的な電子顕微鏡写真を図 1~3 に示す。

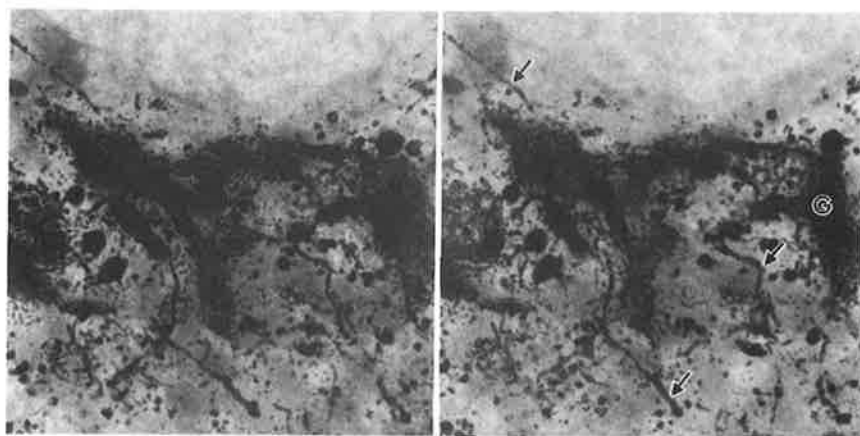


図 1. マウス副腎髄質の神経細胞のステレオ写真。厚さ約 2μ の切片を $\pm 10^\circ$ 傾斜した。ゴルジ層板 (G) と管状滑面小胞体 (矢印) が ZIO で染色されている。 $\times 11,000$ 。

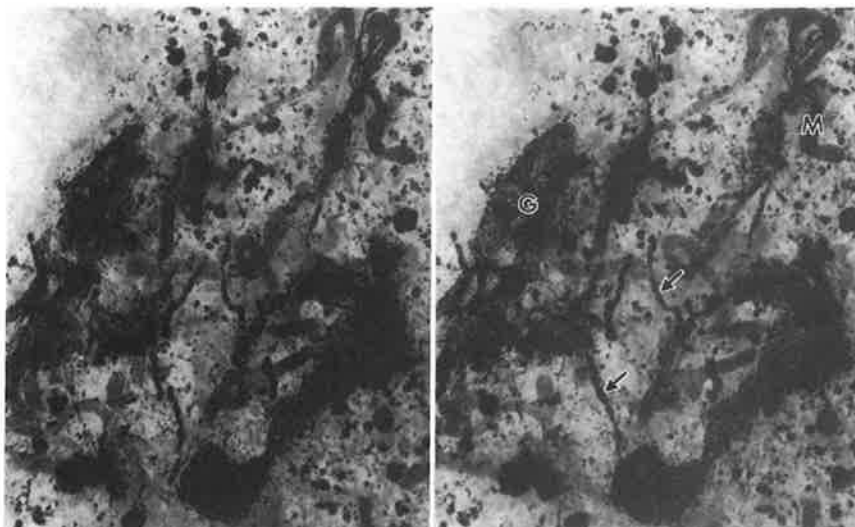


図2. マウス副腎髄質クロム親和細胞のステレオ写真。厚さ約 2μ ， $\pm 10^\circ$ 傾斜。管状滑面小胞体（矢印）は図1に比べて太い。糸粒体（M）も染色されている。G：ゴルジ層板。 $\times 8,700$ 。

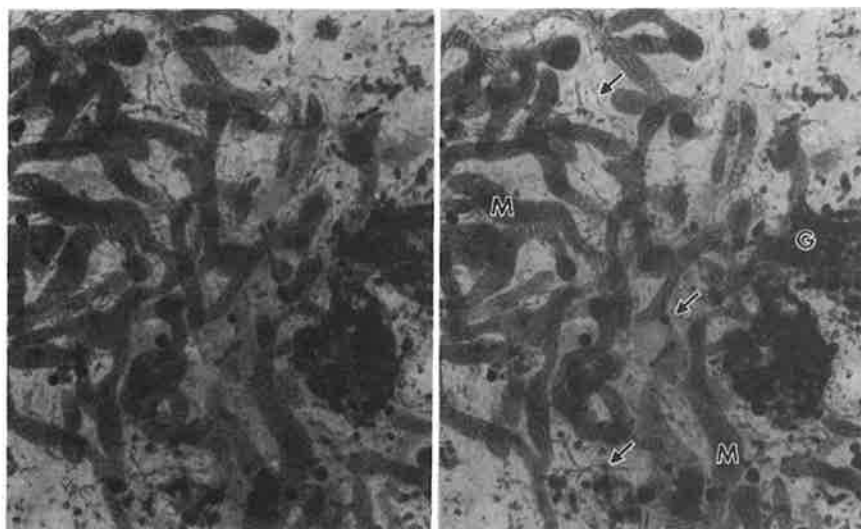


図3. ウサギ頸動脈小体主細胞のステレオ写真。厚さ約 0.5μ ， $\pm 14^\circ$ 傾斜。糸粒体（M）の周囲に非常に細い滑面小胞体（矢印）が多数存在する。G：ゴルジ層板。 $\times 11,000$ 。

ZIO染色で陽性に染色される構造としては各細胞とも，Golgi装置，滑面小胞体，糸粒体，シナプス様小胞および核膜であった。ZIO染色にはいわゆる“むら”がつきものであり，すべての細胞で上記の細胞内小器官が陽性に染まるとは限らない。ある細胞では糸粒体だけ，また他の細胞ではGolgi装置と滑面小胞体だけ染まるという現象がみとめられた。Golgi装置や被覆小胞と連続

する特殊構造については、度々これを認め、3次元的に広がる網工をなしていることが予想された。

この網工は、一種の形質内網系であり、すべてのニューロンとパラニューロンに含まれる基本構造と予想される。この形質内網系にも“膜流動”現象がともなうとすれば、Golgi装置、分泌果粒、穀あり小胞およびシナプス小胞の出現と消滅を仲介する機能が予想される。おそらく、ダイナミックな構造であり、細胞の種類やその機能状態によって変化するであろう。

〔文献〕

- 1) 内田 隆, 小沢英治: ラット切歯エナメル芽細胞の ZIO 染色性の変化について, 歯基礎誌, 21 (補冊) : 354, 1979.
- 2) Kobayashi, S. and T. Uchida : Tubulo-vesicular structures in the basal cytoplasm of gut basal-granulated cells revealed by zinc iodide-osmium tetroxide staining, *Folia anat jap.* 58: 1009-1018, 1982.
- 3) Reinecke, M. and C. Walther : Aspects of turnover and biogenesis of synaptic vesicles at locust neuromuscular junctions as revealed by zinc iodide-osmium tetroxide(ZIO) reacting with intravesicular SH-groups. *J. Cell Biol.* 78 : 839-855, 1978.

超高压電子顕微鏡による細胞内小器官の立体構造ならびにその動態の研究

斎藤多久馬 (自治医科大・医・解剖)

細胞内小器官の立体構造は透過形電子顕微鏡の観察が超薄切片上でなされているので三次構造はその平面図から想像されることが多かったといえる。細胞内小器官が決して静的存在ではなくその形、位置を動的に変化させて細胞内の代謝にあたっていることが指摘されるにおよんでその立体像の実際を明らかにすることは当面の急務となって来ている。電顕レベルにおける細胞内小器官の立体像は連続超薄切片を再構築することによってもなされるが細胞内小器官においてはそれぞれ特異酵素の局在が次第に明らかになって来ているので細胞化学的にこれら活性を検出厚切標本を傾斜装置を用いて超高压電子顕微鏡下に撮影した2枚の写真を立体視することにより明らかにすることが可能となる。

〔材料と方法〕 1. ラット精巣上体を2%グルタルアルデヒド固定40 μ 切片作成後酸性ホスファターゼ, チアミンピロホスファターゼ, ヌクレオシドジホスファターゼ, ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスファターゼ, K^+ -パラニトロフェニルホスファターゼ, グルコース-6-ホスファターゼ等の活性を検出し脱水後クエトール包埋をおこない1 μ -4 μ 切片を作成して各細胞内小器官の立体観察をおこなった。

2. ラット網膜を1.0-2.0%グルタルアルデヒド固定。40 μ 切片を作成してグルコース-6-ホ

スファターゼ、酸性ホスファターゼ、アデニレートシクラーゼ、グアニレートシクラーゼ、ホスフォジエステラーゼ等を細胞化学的に検出脱水後クエトール包埋をおこなった。

〔結果〕 1. ラット精巢上体上皮細胞内ゴルジ装置を酸性ホスファターゼの局在から観察しその立体像を明らかにした。今後は分泌を阻害・促進した場合の形態の変化を他の細胞内小器官との関連において明らかにしてゆくべく計画中である。

2. ラット網膜小胞体に活性が陽性となるグルコース-6-ホスファターゼ活性から小胞体の三次元構造を明らかにすべく観察をおこなった。小胞体は薄い層状の構造であるため大量の重金属沈澱物をもつゴルジ装置、ライソゾーム等に比較するとその立体像を超高圧電顕で明らかにするにはさらに努力を重ねる必要がある。

走磁性細菌内磁性体微粒子の高分解能観察

松田 強, 外村 彰 (日立中研), 有井達夫 (生理研)

Blakemore¹⁾ は、1975年に、地球磁場に沿って移動する性質（走磁性）を持つ細菌を発見した。この細菌は、 $0.1\mu\text{m}$ 程度の大きさの磁性体微粒子（マグネトソームと呼ばれている）を、数珠状に連ねた状態で体内に保持している。その後、Frankel²⁾等によりマグネトソームは、メスバウワースペクトルの測定からマグネタイト (Fe_3O_4) 粒子であることが確かめられた。その後も種々の走磁性細菌が観察され、その機能等が調べられている。

今回、我々は、淡水に棲む走磁性細菌を走査電子顕微鏡および透過電子顕微鏡を用いて観察した。形状の異なる3種類の細菌が見い出されたが、そのうち一種は、2～4個の球形体から成るピーナツ状の外形をしていた。この種の細菌では、30個程度のマグネトソームが、細菌の運動方向に沿って1列に配列しているのが、透過電子顕微鏡像において観察された。これらの微粒子を、加速電圧125KVで高分解能観察を行うと、それぞれの粒子に対して、一方向に種々の結晶格子像を観察することが出来た。又、超高圧電子顕微鏡 (H-1250M型) を用いて、同一粒子上に3方向に、交叉する $4.8\text{\AA}$, $4.8\text{\AA}$, $4.2\text{\AA}$ の結晶格子像を観察することが出来た。これらの高分解能観察の結果より、マグネトソームが、マグネタイトの単結晶微粒子であることを明らかにすることが出来た。又格子面の面指数を決定すると共に、このマグネトソームの結晶学的な形態が、6個の $\{110\}$ 面で囲まれた六角柱状で、その両端と稜が $\{111\}$ 面で切り取られた形であることを明らかにした³⁾。

〔文献〕

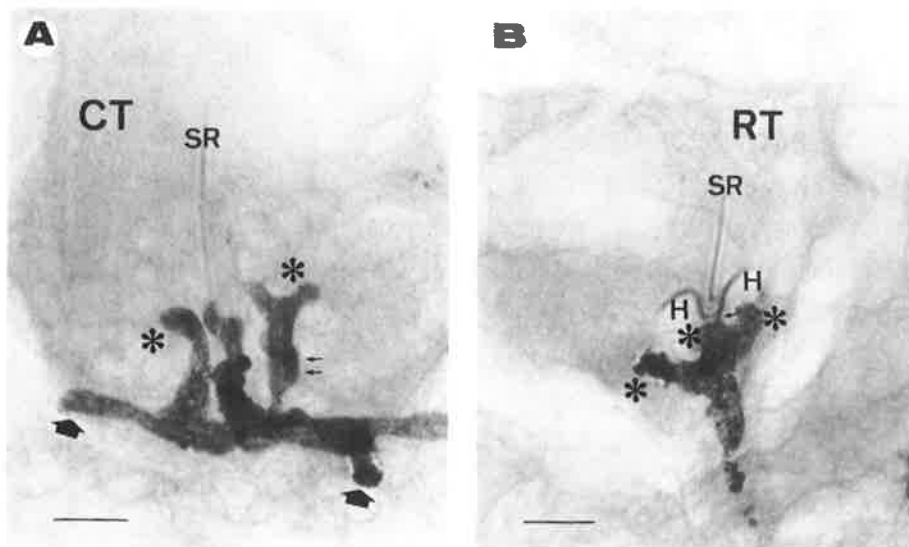
- 1) Blakemore, R : science, 190 : 377(1975).
- 2) Frankel, R. B. et al. : Science, 203 : 1355(1979).
- 3) Matsuda et al. : Nature, 302 : 411(1983).

アメリカナマズ網膜の双極細胞

中 研一, 日高 聡 (基生研)

脊椎動物網膜の双極細胞は視細胞から神経節細胞への伝達経路を形成する。網膜の外網状層は視細胞と水平細胞, 双極細胞の二次ニューロンとの間のシナプス伝達の場所である。我々は複雑な色彩弁別を行わないアメリカナマズ (*Ictalulus punctatus*) 網膜における, 視細胞と双極細胞との間のシナプス結合様式を解明するために, 双極細胞を Golgi 法により渡銀し, Famiglietti 等 (1977)¹⁾ の報告のもとに, 双極細胞の軸索の内網状層における終末位置の違いから, ON 中心型細胞と OFF 中心型細胞を分けて, そのおのおのの樹状突起終末の形態を Golgi-超高压電顕法²⁾ を用いて観察した。

アメリカナマズ網膜の双極細胞はすべて, 錐体末端と杆体末端の両方に樹状突起を送る混合型である。樹状突起が錐体末端に invaginate した場合は, ON 中心型, OFF 中心型の両方とも, 錐体末端内で複雑に分枝しており, OFF 中心型細胞では特異的な形態でシナプスリボンを直接接するプロセスがある (図A)。一方, ON 中心型, OFF 中心型細胞とも, 杆体に貫入した場合は, シナプスリボンに向う central process と, 杆体と水平細胞との間に入る lateral process の両方を形成する (図B)。



図A. CT は錐体末端。*はシナプスリボンと接していると思われる OFF 中心型双極細胞のプロセス。SR はシナプスリボン, スケールは0.5 μ m。

図B. RT は杆体末端。H は H2 水平細胞。両側の*は ON 中心型双極細胞の lateral process で, 真中の*は central process。

〔文献〕

- 1) Famiglietti, E. V. Jr., Kaneko, A. and Tachibana, M. (1977) Neural architecture of on and off pathways to ganglion cells in carp retina. *Science*, 198 : 1267-1269.
- 2) Hama, K., Hirose, K. and Kosaka, T. (1977) High voltage electron microscope in neuroscience. *Proc. fifth Int. Conf. on High Voltage Electron Microscopy*. (ed. by T. Imura and H. Hashimoto), Kyoto : 333-338.

心筋 T-tubules の立体解析

浜 清, 中村栄男 (生理研)

〔研究目的〕 心筋細胞の生理機能に重要な関りをもつ T-tubules の定量的解析はまだ充分に行なわれていない。本研究は超高压電顕による立体写真からの直接定量化を行なうことを目的とする。

〔方法〕 ラット心室心筋について Golgi 染色により T-tubules を選択的に染色し、2～3 μm のエボン切片を作製して試料とした。任意の角度に正確に試料台を傾けることによって得られた T-tubules のステレオ組写真像を 2 値化し、両写真像間の視野上の視差から空間上に定位化して計測した。

〔結果〕 我々は日立製作所の協力により、各傾斜角について 0.1° の誤差以内で正確に傾斜出来るサイドエントリーの試料台を得ることに成功した。この場合、 $\pm 10^\circ$ の傾斜を与えた場合の誤差は 0.5% 以内となり、3 μm の厚さの試料における Z 方向の解像力として約 150 $\text{\AA}$ を期待できる。 5×10^{-3} rad の有効絞り角を用いた場合、3 μm 厚さの $\pm 10^\circ$ 傾斜試料から期待できる解像は約 100 $\text{\AA}$ でほぼ XY 方向および Z 方向の解像力が一致する。これは超高压電顕による厚い試料の立体観察では画期的なことであった。本年度は Luzex 5,000 画像解析システムを用い、モデル標品および心筋 T-tubules 標本についての立体定量化を行っており、結果の一部は日本電子顕微鏡学会総会に発表予定である。

神経細胞およびグリア細胞突起の立体観察

浜 清, 小坂俊夫 (生理研)

〔目的〕 神経細胞およびグリア細胞の終末突起は繊維複雑を極め、連続超薄切片像からの立体再構築は到底不可能に近く、出来たとしても、不正確、不完全なものでしかあり得ない。我々は選択的に染色された神経細胞についての超高压電顕による立体観察法により、中枢ニューロパイ

ル内における神経細胞突起及びグリア細胞突起の立体構築を解析する目的で本研究を行っている。

〔方法〕 Golgi染色および免疫細胞化学染色を行った神経細胞およびグリア細胞について、3～5 μ mのエポン切片を作製し超高压電顕によって立体観察を行なう。

〔結果〕 我々は既に各種中枢ニューロンについて終末分枝の立体構成を観察し報告してきた。本年度はこれらの観察に加えて海馬グリア細胞の立体構成についての観察を行ない、結果は昭和58年度神経科学会に於いて報告した。海馬の放射グリア細胞について特に注目されたことは、同グリア細胞が異った細胞層に亘って長い突起を出しており、その突起終末部の形態が夫々の細胞層によって夫々異った形態を示すことであった。この事実はグリア細胞の形態がその存在部位の神経細胞要素の形態によって定められるという従来の説を裏付けするようにみえるが、実は更に神経細胞機能に対するグリア細胞の積極的関与を示すものと理解すべきであろう。中枢内星状グリア細胞突起の三次元的構成の詳細は本研究によってはじめて明らかにされたと言える。

生体膜に関する細胞化学的研究

平野 寛，高田邦昭，西山文朗，川上速人（杏林大・医・解剖）

山岸俊一（生理研）

細胞膜表面レセプターに種々の物質（レクチン，抗体，ホルモン，血清蛋白質，毒素，カチオン化フェリチン等）が結合すると，それらは細胞膜面上を移動し，クラスター，パッチ等を形成する（redistribution）。次いでこれらの物質は細胞内の小胞ないし空胞へと取り込まれてゆく（高田，平野：医学のあゆみ，199，911，1981）。こうした一連の細胞膜レセプターをそれに結合した物質の動態を電顕レベルで追究するには従来超薄切片法によるしかなかった。今回厚切Epon切片を用いてこれらの現象を超高压透過型電顕下で観察し，結合，再配置する物質の三次元的分布について解析を試みた。

マウス腹腔内よりマクロファージを採取して用いた。今回は細胞膜のコンカナバリンA（concanavalin A, Con A）結合部について検索した。まずCon A（50 μ g/ml），次いでHRP標識金コロイドと0℃でインキュベートし細胞膜のCon A結合部位を標識した。洗浄後PBS中に37℃にて保持し，時間を追って逐時固定した。細胞膜のコントラストを増強するため，Luft(1971)に準じてルテニウム赤（ruthenium red, RR）を含む液で固定した。試料は常法に従いEpon包埋し，0.1～3 μ mの切片を作成し，透過型電顕（100, 200, 1,000KV）にて観察した。厚い切片については試料を±8°傾斜させて撮影し，ステレオ観察をおこなった。

RRは細胞膜を透過しないため細胞膜表面のみが特異的に染色された。厚さ3 μ m切片をステレオ観察すると，細胞表面の凹凸に状態が十分なコントラストを呈して明瞭に観察された（図1）。細胞膜が細胞表面と連絡を保ちつつ細胞質中へ管状，袋状に深く陥凹している様子が明ら

かとなった。RR 染色により細胞膜のコントラストが強調されるので、金コロイドで標識した Con A 結合部位の細胞膜上での分布状態も明瞭に観察可能となった (図 2)。0℃で標識した場合、Con A 結合部位を表わす金コロイドは細胞膜の凹凸に関係なく細胞膜上に一様に分布していた (図 2)。一方37℃で保持すると、細胞膜上での redistribution や取り込みの過程の立体像が観察された。取り込み過程における細胞膜の動態の立体観察にきわめて有用な方法と思われる。

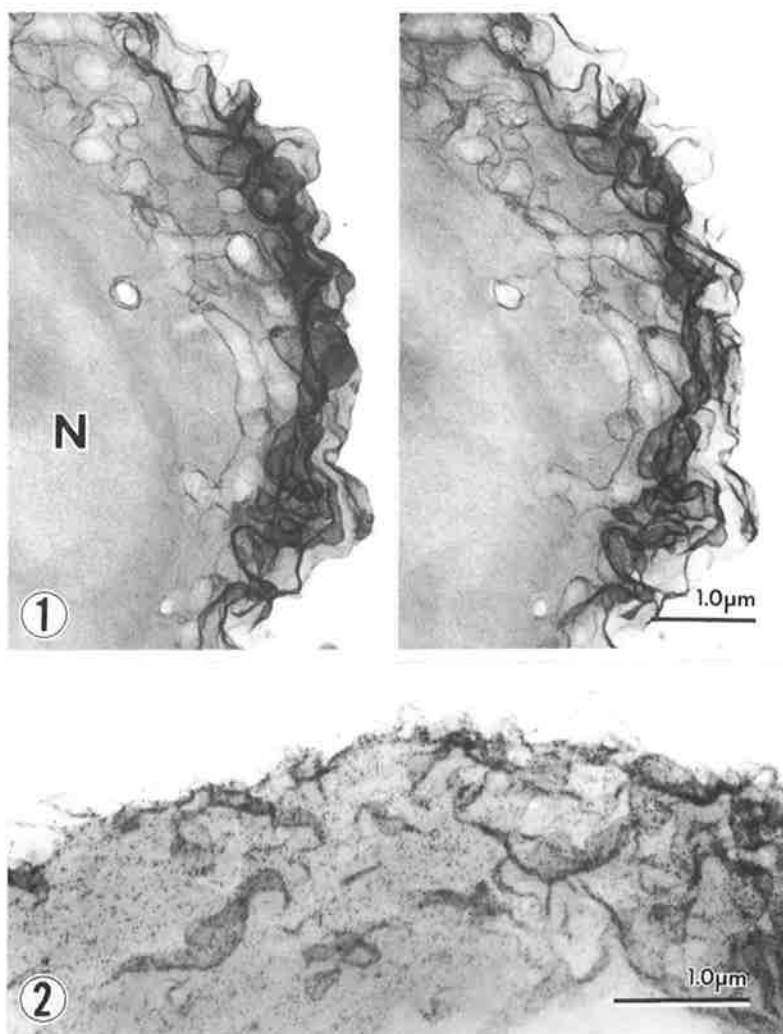


図 1. RR 染色したマクロファージ (厚さ 3 μm 切片) のステレオ対写真。細胞膜とその陥凹部が高コントラストに染め出されている。加速電圧: 1,000kV。スケール=1 μm, N: 核。

図 2. Con A 結合部を金コロイドで標識 (0℃) 後直ちに固定, RR 染色したマクロファージの細胞表面。厚さ 3 μm の切片。細胞膜上に一様に分布する金コロイド粒子が明瞭に識別できる。加速電圧: 1,000kV。スケール=1 μm。

ウシ心筋チトクロム酸化酵素結晶ならびにチトクロム bc₁ 複合体結晶の 電子線回折ならびに電子顕微鏡像の観察

小澤高将, 錦見盛光, 田中雅嗣 (名古屋大・医・生化学)

〔研究目的〕 膜固有蛋白質は生体膜にあってイオンをはじめとする種々の物質の透過・輸送・情報の受容・変換・伝達, さらに酸化的リン酸化および光合成などの生体におけるエネルギー転換に重要な役割を演じている。しかしながらこれらの膜固有蛋白質は強固に結合しているため単離精製が困難であった。我々はミトコンドリア電子伝達系酵素を疎水結合クロマトグラフィーおよびアフィニティクロマトグラフィーにより高度に精製した後, 可溶化に用いた界面活性剤を緩徐に除去することにより結晶化することに成功した。こうして得られたチトクロム酸化酵素ならびにチトクロム bc₁ 複合体の結晶構造を明らかにするために超高压電子顕微鏡を用いて像の観察および電子線回折を行った。

チトクロム酸化酵素の結晶は平均 $5 \times 5 \times 100 \mu\text{m}$ の大きさであったため, 通常の電子顕微鏡では電子線回折像を得ることが難しく, H-1250M 型超高压電子顕微鏡および HU-1000D 型超高压電子顕微鏡を用いて加速電圧 1,000KV で電子線回折を行った。結晶をバラホルムアルデヒドとホルムアルデヒドで固定後, モリブデン酸アンモニウムによりネガティブ染色による結晶表面の観察もあわせ行った。今回の実験では電子線量を最小限にし, 試料を任意の方向に傾斜させ, 良好な回折像を得ることをめざした。

その結果, チトクロム酸化酵素については結晶の単位格子の大きさおよび角が $a = 92 \text{ \AA}$, $b = 84 \text{ \AA}$, $c = 103 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 126^\circ$ である単斜晶型であることが明らかになった。一方チトクロム bc₁ 複合体の結晶の単位格子の大きさおよび角は $a = b = 113 \text{ \AA}$, $c = 132 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$ であり, 六方晶型であることが確認された。これらは既に報告した結果に一致した。(Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982, 79, 7175-7179, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983, 80, 921-925)。

従来結晶構造解析にはX線が用いられてきたがこれには比較的大きな結晶を必要とする点に問題があった。一方電子線回折には微細な結晶を必要とするため, これも試料調製に難点があった。比較的容易に得られる小結晶の構造解析には透過性の高い超高压電子線を利用することが良い方法であることを今回の結果は示している。

結晶中の格子欠陥の立体観察

井村 徹, 坂 公恭, 岡本信男 (名古屋大・工)

〔実験目的〕 結晶中には各種の格子欠陥（転位，点欠陥，不純物原子など）が存在し，それらの形態，分布は結晶の諸性質に大きな影響を与える。本研究は，超高压電子顕微鏡（HVEM）の秀れた物質透過能を利用して，結晶中の格子欠陥を立体観察し，その分布，形態に関して詳細な情報を得ることにより，結晶の性質の制御・改善を図って行こうとするものである。

〔実験方法と結果〕 長軸方位が $[\bar{1}23]$ の Cu-2at% Al 合金単結晶を，一定の交番ひずみ（この場合 $\pm 0.4\%$ ）で疲労変形し，4,000 サイクルの交番ひずみを与えて飽和硬化段階に達したものの内部における転位組織を立体的に示したものが図1である。このような立体的組織観察結果と，疲労変形に特有な表面組織の観察結果とを合わせ考察することにより，疲労による格子欠陥（この場合，転位線）の形態・分布が明らかとなる。また，図2に例示したものは，融液を超急冷して作成した Ni 系のアモルファス合金リボンを653Kでクリープ変形させた後，内部の原子的構造を高分解能観察したものであり，原子が規則的配列をした小さい領域が随所に発生してきている状況がうかがえる。

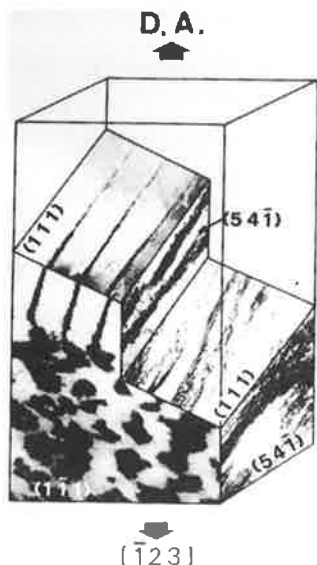


図1. 疲労変形した金属中の転位の立体的分布。

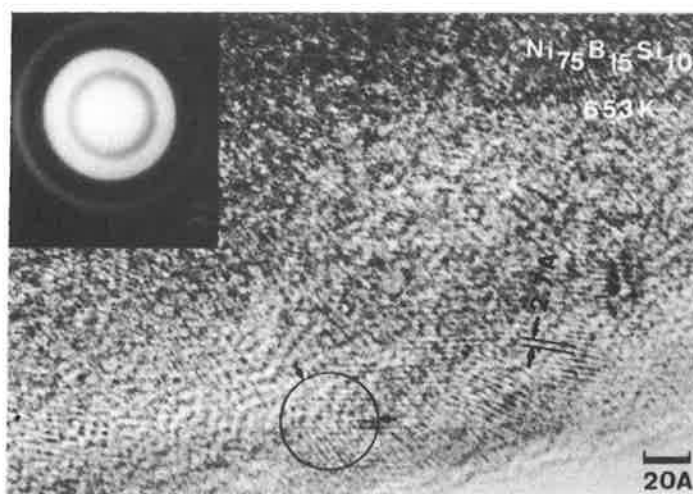


図2. 融液を超急冷して作った Ni 系アモルファス合金の653Kクリープ変形後に見られた規則的フリンズ。更に高温ではMS相（結晶中間相）が明らかになり，その内部の欠陥の立体観察が試みられた。

(索引)

索

引

【A】

A-Current (nerve cell)	217
A-V Node	242
Absorption (glucose, rat intestine)	308
Acetylcholine Channel	78, 83, 85
Acetylcholine Current	216
Acetylcholine Receptor	24, 428
Acid Phosphatase Activity	435
Acrolein	271
Acrosin-like Enzyme	187
Actinomycin D	328
Action Potential	242, 289
Action Potential Duration	238
Activation and Inactivation	277
Active Transport	45, 305
Acupuncture Anesthesia	179
Acyl Carnitine (long chain)	244
Adrenaline	233, 236, 279
Adrenaline Receptor (α_2)	293
After-depolarization (delayed)	241
Ag Ion	272
Aldehyde	271
Aldose Reductase	315
Alpha Receptor	294
Alpha Receptor (venous smooth muscle)	294
Alpha-1 Receptor	284
Amanitin (α -)	328
Ambiguous Nucleus	260
Amino Acid	309
Amino Acid Sequence	188
Aminoglycoside	207
Aminopyridine (4-)	217
Amiodarone	246
Amorphous Alloy	452
AMP	78
Amphibian Skin Peptide	185

Amygdala	221
Amylase	313
Angiotensinogen	186
Anomalous Rectification	55
Anti-arrhythmic Drugs	243, 246
Anti-arrhythmic Drugs (classification)	251
Antibody	189
Antigen (cell surface)	194
Aortic Smooth Muscle	293
APP (Avian pancreatic polypeptide)	296
Aquorine	277
AR-L (a new cardiac drug)	298
Arrhythmia	232, 239, 240, 243, 244, 245, 250
Arrhythmia Model	251
Arsenazo III	276
Ascidian Sperm	187
Aspirate (phonetics)	258
Astrocyte	65
Atomic Arrangement	452
ATP	8, 45, 49, 78, 171, 222
ATP Channel	80, 83, 85
ATP Site (low affinity)	49
Atrial Cell	85, 216, 234
Auditory Image	264
Auditory System (central)	211
Autoanalysis	12
Autofluorescence	59
Autonomic Nervous System	66
Autoradiography (electron-microscope)	92
Avian Peptide	183
Avidin	421
Avoidance (conditioned behavior)	223

【B】

Bacteria	446
Basal Lamina	439
Bat	261, 262

Bat (greater Japanese horseshoe)	72
Benzoquinone (p-)	197
Beta Cell (rat pancreatic)	318
Bethanidine	246
Bilinear Equation	346
Biosynthesis	14
Biotin	421
Bipolar Cell	54
Bungarotoxin (α -)	24

【C】

C-kinase (Ca and phospholipid dependent)	295
Ca (active transport)	45
Ca (intracellular)	19
Ca Channel	82, 234, 236, 272
Ca Channel (ATP and potential operated)	284
Ca Concentration (intracellular)	277
Ca Current	54, 85, 216, 237, 240, 284
Ca Ion	49, 281, 287, 288, 291, 330
Ca Regulation	1
Ca Release	290
Ca Spike	71
Ca Transient	278
Ca-activated K Conductance	71
Ca-ATPase	45, 49
Ca-binding	2
Ca-binding Protein	2
Ca-channel (potential-independent)	284
Ca-independent Contraction	291
Ca-induced Ca Release	282
Ca-uptake (La-resistant)	293
Caffeine	282, 290
Caffeine Contracture	293
Calmodulin	291, 295
Canary (bird)	262
Cardiac Cell	282
Cardiac Cell (cultured)	248
Cardiac Cycle	174
Cardiac Muscle	278, 297, 442
Carnitine (ℓ -)	244

Carp (fish)	204
Carrier Protein (covalent)	371
Catfish	347
Catfish Retina	447
Cationized Ferritin	200
Causal Calculus	346
Cell Culture	195, 198
Cell Sorter	3
Cerebral Ischemia	170
Cerebrospinal Fluid	179
Chemoreceptor (central)	225
Chimpanzee	264
Chlorpromazine	8, 12
Cholecystokinin	6
Chorda tympani	309
Chromomycin A3	328
Circular Muscle	417
Circus Movement Arrhythmia	241
Clinical Electrophysiology	249
Code Ligament	258
Colchicine (squid giant fiber)	38
Colloidal Gold	449
Compartment System	359
Concanavalin A	449
Conditioning	208
Cone (retina)	59, 204, 206
Contact Lens	172
Contraction	281, 287
Contraction Model	278
Contracture Staircase	289
Coronary Smooth Muscle	293
Correlation Analysis	333
Cortico-rubral Synapse	67
Coupling Transport	349
Creatine Phosphate	8, 273
Cyclic AMP	193, 292, 298, 319
Cytochemistry	445
Cytochrome bc ₁ complex	451
Cytochrome Oxydase	451
Cytochrome P-450	167

Cytoskeleton..... 38, 202, 425

【D】

D-Amino Acid Oxidase..... 4, 167

Dense Core Vesicle..... 92

Dichotic Hearing Test..... 263

Dictyostelium..... 340

Dielectric Constant..... 44

Dislocation Configuration..... 452

Dithiol Complex..... 271

DNA..... 328

DNA Replication..... 335

DNA Synthesis (rate of)..... 335

Dominant Hemisphere..... 263

Doppler Effect..... 262

Dorsal Root Ganglion Cell..... 217

Dye Coupling..... 207

【E】

Ear Movement..... 261

Echolocation..... 72

Elasticity (muscle)..... 274

Electrical Coupling..... 63

Electrogenic Na-Ca Exchange..... 283

Electrogenic Pump (membrane current)..... 238

Electron Probe..... 287

Energy Metabolism..... 8, 166

Enkephalin..... 180, 184

Erythrocyte..... 196

Erythrocyte Membrane..... 49

Etching Replica..... 442

Evoked Potential..... 225

Ex-vivo Autoradiogram..... 178

Ex-vivo Organ Perfusion..... 178

Exchange Sodium Current..... 283

Excitation-contraction coupling..... 271, 272, 276,
287, 297

【F】

Fatigue and Deformation..... 452

Feeding Behavior..... 219, 221, 223

Fertilization..... 440

Fiber Scope..... 258

Flavoprotein..... 4

Floridin..... 308

Fluorescence..... 190

Fluorescence Measurement..... 44

【G】

Galactose..... 312

Gap Junction..... 63, 207, 433

Gastrin Releasing Peptide (GRP)..... 183, 184, 185

Gating Current..... 192

Gel Formation..... 165

Giga-seal Electrode..... 86

Glial Protein (fibrillar, acidic)..... 65

Glucagon..... 184, 296

Glucose..... 305, 308, 310 ~ 320

Glucose Metabolism..... 311, 315

Glucose Synthesis..... 313

Glucose Transport..... 307

Glucose Uptake..... 311

Glutamic Acid (L-)..... 55

Glycoprotein..... 26, 194

Goldfish..... 53, 55

Golgi Apparatus..... 433, 443

Gonad..... 183

Grayanotoxin..... 192

Gut-brain Peptide..... 7

【H】

H Current (heart)..... 54

Halothane..... 290

Heart (dog)..... 243

Heart Hypertrophy..... 177

Heat Production of Muscle..... 273

High Energy Phosphorus Compound..... 174, 177

High K Solution..... 238

High Performance Liquid Chromatography

(HPLC)..... 45

High Resolution Image..... 94, 446

High Voltage Electron Microscopy	65, 94, 425, 434, 436, 440
Hippocampus	63
Hirschsprung's Disease	101
Horizontal Cell (retina)	55, 205, 338
Hormone Receptor	421
Horseradish Peroxydase	204, 205, 262
Hyperosmolarity-tolerant Cell	195
Hypertension	177
Hypoglossal Motoneuron	260
Hypothalamus	88, 183, 316
Hypoxia	242

【I】

Immunocytochemistry	208
Immunohistochemistry	184
Immunosorbent Assay (enzyme-linked)	197
Inferior Collicular Commissure	211
Inhibitory Mediator	417
Inhibitory Nerve	
(non-adrenergic, non-cholinergic)	296
Inhibitory Synapse	260
Inner Ear	266
Inotropic Action (positive)	298
Insulin	307, 319, 326
Intermediate Horizontal Cell	204
Interneuron	63
Intestine	66, 305, 308
Intracellular Dialysis	85
Intracellular Injection	78
Intracranial Self-stimulation	88
Intramembrane Particles	439
Inward Rectification	70
Inward Rectifier K Channel	81, 82, 84
Ion Channel	232
Ionic Current	242
Ischemia	242
Ischemia Model	243
Ischemic Heart	80, 244
Isi (slow inward current, frog heart)	298

Isoprenaline	292
Isoproterenol	240

【K】

K Activity (intracellular)	241
K Current	56
K-channel	19, 21, 23, 417
K-channel (voltage and Ca dependent)	218
K-contracture	303
K-contracture (biphasic)	277
Kidney (human)	195
Kidney (rat)	47

【L】

Labile Maintenance Heat	273
Laryngectomy	257
Laser (sarcomere length measured by)	280
Lateral Diffusion	325
Lateral Hypothalamic Area	90
Lateral-line Organ	213
Lattice Defect	452
Lectine	26
Leukemia Virus (human T-cell)	434
Leumorphin	17
Levi White Noise	342
LH-RH	184
Light Scattering	45
Liver	317
Lohmann Reaction	8
Loligo (squid)	198
Low Na Extracellular Solution	289
Low Temperature	286
Lysophosphatidyl choline	241
Lysosome	433

【M】

Macrophage	449
Magnetosome	446
Marcane (muscle necrosis caused by)	270
Medulla oblongata	225

Membrane (cell).....	200
Membrane (nitrocellulose).....	2, 31
Membrane Current	219, 222, 283
Membrane Potential	241, 326, 330
Membrane Proteins (crystallization of).....	451
Messenger RNA	28
Mg Ion	286
Microtubule-Microfilament System.....	435
Mitochondria	245
Modelling	349
Molecular Weight	45
Molluscan Neuron	218
Monoclonal Antibody.....	47, 194, 197, 198
Motivation	90
Motivational Behavior	223
Motoneuron	74, 212
Motor Cortex	88
Muscarinic Acetylcholine Receptor	26
Muscle	273, 307
Muscle (chemically skinned)	292
Muscle (frog).....	273, 274
Muscle Afferent	225
Muscle Contraction	276, 288
Muscle Model	278
Muscle Spindle	74
Muscle Tension	275
Mutant	66
Myenteric Plexus	66, 101, 180
Mynah (bird, voice of).....	264
Myocardium	283
Myogram	258, 259
Myosin Light Chain	295

【N】

N-B Transformation	165
N-F Transformation	165, 373
Na Ion on K-contracture	278
Na Spike	328
Na-Ca Exchange	248, 283
Na-channel	19, 42, 192, 201, 328

Na-free Medium (ventricular cell of heart).....	237
Na-inactivation	200
Na-K Active Transport	45
Na-K ATPase	45, 46, 47, 49, 197, 198, 238
Na-K Pump	248
Necrosis of Muscle Fibers	270
Nerve (optical properties of).....	31
Nerve Cells	328
Nerve Growth Factor	74, 212
Nerve Peptide (avian)	184
Nerve Peptide (mammalian).....	185
Network (two-dimensional)	338
Network Thermodynamics	349
Neuraminidase	241
Neuroblastoma (human)	14
Neurokinin (α -)	185
Neuron	342
Neuron Activity	90, 221
Nicotine	24
Nitroglycerine	292, 293
NMR	171, 174, 177, 273, 312
NMR (^1H)	172, 373
NMR (^2D)	7
NMR (^{31}P)	8, 166, 167, 196
Node of Ranvier	425
Non-adrenergic	417
Non-linear System	342
Noradrenaline	284, 286, 293
Norepinephrine	240, 294
Nuclear Overhauser Effect	8
Nucleus Tractus Solitarius	316

【O】

Oil Droplet	59, 206
On-center and Off-center	447
Oocyte	28
Opiate Activity	17
Opiate Substances	179
Opioid Peptide	17
Opossum	417

Optical Rotatory Power	31
Orbitofrontal Cortex	90, 223
Organ of Corti	207
Organella (cell)	445
Oriented Multilayer	10
Osmotic Pressure	275
Ouabain	238, 248, 297
Overdrive Hyperpolarization	238
Oxalate Method	281
Oxytocin	291

【P】

Pacemaker Current	82
Pacemaker K-current	81
Pacemaker Mechanism	84
Pancreas	318
Paraneuron	443
Patch Clamp	56, 217, 218, 236, 276, 279
PDE Inhibition (phospho-di-esterase)	298
Pepsinogen	188
Perfluoro Chemicals	178
Perfusion	8
Peristalsis	180
Peroxisomal Proliferation	436
pH (intracellular)	219
Phase Tension	10, 181
Phenylglyoxal	271, 297
PHI (VIP-associated peptide)	14
PHM (VIP-associated peptide)	14
Phonetic	258
Phosphatidyl Inositol	191
Phospholipase C	191
Phospholipid Metabolism	266
Pinna Movement	72
Plasma	213
Plasticity	67, 260
Polylysine (effects on axon)	23
Polysaccharide	308
Potassium (extracellular concentration)	237
Potential-dependent Channel Block	201

Precursor	14
Preoptic Area	219
Prepepsinogen	188
Preprochymosin	188
Preproenkephalin B	17
Probability Differential Equation	346
Procaine	270, 293
Prorenin	186
Protein (Ca-regulating)	1
Protein Gel	172
Protein of Excitable Membrane	43
Protein Synthesis	328
Psychotropic Drugs	12
Purple Intermediates	4
P ₂ Receptor	284

【Q】

Quail (bird, ultradian rhythm)	183, 184
Quercetin (Ca release)	290

【R】

Ranatensin	185
Rapid Cooling	276
Rapid Freezing	442
Receptive Area	225
Reconstructed Membrane	43
Red Nucleus	208
Reentry	239, 249
Refraction	46
Refractive Index (ATPase molecular weight)	46
Renal Tubular Cell	435
Reperfusion	245
Replicon	335
Resonance Raman Spectroscopy	4, 167
Retina	54, 59, 204 ~ 206, 338, 347
Reverse Substrate	187
Rhythmic Automatic Depolarization	241
Riboflavin	7
Riboflavin Binding Protein	7
Rigidity	275

Rigor	288
RNA	328
Rod (retina)	204
Rods and Cones (retina)	447

【S】

Sacculus (frog)	207
Salivary Gland	8, 171
Saponine	285
Sarcomere Length	280
Sarcoplasmic Reticulum	287, 290
Saturation Transfer ESR	10, 181
Screening	12
SDS-PAGE	202
Secretin	183, 296
Self-organization	209
Separated Clonal Domain	3
Serotonin (^3H -)	92
Serum Albumin	165
Sialic Acid	241
Signal Peptidase	188
Signal Peptide	188
Silk Gland (posterior)	435
Silver Ion	272
Simultaneous Differential Equations	349
Single Ca Channel	279
Single Ca Current	234
Single Cell	279
Single Channel Analysis	79 ~ 86, 234
Single Channel Conductance	327
Single Pacemaker Cell	84, 85
Single Ventricular Cell	78, 234
Sino-atrial Node	78, 83
Skeletal Muscle	289, 441
Skilled Movement	259
Skinned Fiber	274, 275, 285
Sleep Promoting Substance	252
Smooth Muscle (structure of)	166, 281, 285, 286, 296, 303
Smooth Muscle Contraction	1

Smooth Muscle Vasa Deferentia	284
Sodium	45
Space Character	338
Spectral Sensitivity (turtle retina)	59
Spectrin Actin	49, 196
Speech Rehabilitation	257
Spermosin	187
Spin Diffusion	165, 373
SPS-A (sleep)	252
SPS-B (sleep)	252
Squid Giant Axon	21, 38, 190, 191, 202
Stereological Observation	445
Stereomicroscopy	94
Stereoscopic View (peroxysomes)	436
Stimulation	349
Stimulation Model	335
Striated Muscle	208
Structure Identification	333
Submandibular Gland	435
Substance P	184
Sugar Phosphate	8
Sympathetic Ganglion	193
Synapse	74, 212
Synaptic Plasticity	208 ~ 210
Synaptic Transmission	193
Synaptic Transmitter	213
Synthetic Enzyme Inhibitor	187
Synthetic Enzyme Substrate	187
System Physiology	349

【T】

T-system	441
T-transformation	346
T-tubule	272
T-wave (positive)	239
Tachycardia (recurrent ventricular)	249
Tail Current	23
Taste	310
Taste Receptor	309
Tb Ion	190

Template	264
Tension	272
Tension-Velocity Relationship	280
Thermoregulatory Behavior	219
Three-dimensional Structure	65
Topical Magnetic Resonance (TMR)	171
Toyosoda 400SW	46
Tracer kinetics	359
Trans-commissural Axonal Regeneration	211
Transport	349
Triad	441
Triggered Activity	249
Trimmer	45
Triphospho-inositide (TPI)	189
Triton Shell	51
Trophic Factor	76
Trypargine	201
Tumor (experimental)	170
Tunicamycin	328
Turtle	59, 206
Twitch Contraction	278, 289
Type C Cell	347

【U】

Ultradian Rhythm	183
Ultrasonic	260, 261
Ultrasonic Sound	288
Ultrastructure	434
Undercoat	49
Uterus Smooth Muscle	286, 291

【V】

Vagus	317
Valinomycin	287
Vanadate	286
Vascular Smooth Muscle	292
Venous Smooth Muscle	294
Ventricle Cell	83, 84
Ventricular Action Potential	238
Ventricular Fibrillation	232

Ventricular Tachycardia	243
Verapamil	241, 249
VIP	14, 183, 184, 296
Visual Cortex	209
Vocal Center	262
Vocal Code (mammalian)	258
Vocal Image	264
Vocal Imitation	264
Vocal Learning	264
Vocalization	90
Voltage Clamp	86, 237, 284,
Volterra Kernels	333

【W】

Water Flow	21
Water Structure	172
Western Blotting	2
White Noise	342, 346
Wiener Kernel	333, 347

【X】

X-ray Micrograph	259
------------------------	-----

【Z】

Zinc-iodide-osmium Method	443
---------------------------------	-----

生理学研究所年報 第5卷

印刷 昭和59年7月20日

発行 昭和59年7月25日

編集者発行 亘 弘

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：電話〈0564〉54-1111

