

岡崎国立共同研究機構

生理学研究所年報

第 6 卷



1985

序 言

生理学研究所も建設時代を終え、成長期に入りました。しかし、行革の嵐は育ち盛り、食い盛りの本研究所も一切容赦しません。情勢はまことに厳しいものがあります。

ヨーロッパに目を移すと、我が国にも増して多くの難題を抱えているようです。殊に生理学のメッカであった英国の窮状は痛ましい限りです。しかし、米国は、問題があるとはいえ、建国以来の競争原理と1960—70年代の繁栄を何とか維持しています。お隣の中国は、文革の荒廃から漸く立ち直り、20才そこそこの若者が、踵を接して研究室に入り始めました。世界は大きく流動しています。

この様な激動の中、本研究所は我が国生理学の象徴として、どんな困難があろうと、眉をあげ、胸を張って前進しなければなりません。来年は一段と充実した年報をお届けしたい——それが内蘭前所長の創設の偉業にお応えする道かと思えます。

昭和60年 8 月

所長 江 橋 節 郎

主な職員（昭和59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 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 星 野 稔

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

客員助教授 太 田 英 彦
助 手 福 嶋 義 博

機能協同研究部門

教 授 渡 辺 昭
助 教 授 寺 川 進
助 手 中 山 孝
" 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 前 田 純

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 川 口 泰 雄

助 手 桼 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 粟 生 修 司

生 理 機 能
研 究 施 設

超高圧電子顕微鏡室

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

" 小 川 良 斎

技 官 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

小 原 正 裕

永 田 治

伊 藤 昭 光

稲 田 和 久

加 藤 勝 巳

藤 原 文 治

松 本 利 明

桜 井 律 子

古 賀 律 子

非 常 勤 講 師

成 瀬 達

松 田 博 子

特 定 領 域
奨 励 研 究 員

広 野 力

木 村 純 子

奨 励 研 究 員
(一 般)

八木沢 仁

流動研究員

西江弘

特別協力研究員

安井章裕

柴崎享

中山敏夫

藤田一郎

丹羽篤朗

文部省
外国人研究員

JANCZEWSKI, Victor

ANGELIDES, Kimon Jerry

昭和59年度 生理学研究所年報

目 次

序 言

主 な 職 員 (昭和59年度)

研究活動概要

分子生理研究系	1
細胞器官研究系	16
生体情報研究系	40
生体調節研究系	67
生理機能研究施設	83
動物実験施設	86
技 術 課	90

研 究 活 動

発 表 論 文	107
学 会 報 告	131

共同研究報告	155

研究会・セミナー報告	219

超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告	357

索 引 (Key Words)

【 研 究 活 動 概 要 】

研究活動概要

〔目 次〕

分子生理研究系

神経化学研究部門	1
超微小形態生理研究部門	4
細胞内代謝研究部門	8

細胞器官研究系

生体膜研究部門	16
機能協関研究部門	26
能動輸送研究部門	37

生体情報研究系

神経情報研究部門	40
液性情報研究部門	54
高次神経機構研究部門	59
情報記憶研究部門	62

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門	67
生体システム研究部門	75
高次液性調節研究部門	76

生理機能研究施設

超高压電子顕微鏡室	83
組織培養標本室	85

動物実験施設	86

技術課

機器研究試作室	90
電子顕微鏡センター	93
動物実験施設	96
電子計算機室	100

分子生理研究系

神経化学研究部門

概要

神経化学部門ではCaイオンによる細胞機能調節機構の解明を目的としている。細胞が神経刺激・ホルモン・薬物等の刺激に対して応答する時、これらの細胞外の情報を細胞内の機能タンパク系に伝達するメッセンジャーがCaイオンである。Caイオンの細胞内濃度の増減によって細胞機能が調節されていることは一般的かつ普遍的であるといっていよい。しかし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イオン機構が最初に発見されたのは骨格筋収縮制御でその基本機構は興奮・収縮連関の一部を除きほぼ明らかになった。一方平滑筋や非筋細胞のCa機構に関して基本過程に不明な点が多く残されている。平滑筋収縮制御・脳神経系のCa制御に関し、生化学的研究を中心にCa制御因子の精製を進めている。

平滑筋収縮のCa制御機構

江橋節郎, 三川 隆, 桑山秀人

鈴木 理, 古賀律子(生理研)

筋の種類に関りなく、筋収縮の制御は細胞内Caイオンによって行なわれるが、その制御の過程、さらにそれに関与する因子は筋の種類によって異っている。高等動物横紋筋のCa制御因子はトロポニンであり、下等動物ではミオシン自身が制御因子として働いている。高等動物平滑筋はこれらと全く異なる機構によって制御されている。その機構についてはCa依存性ミオシン軽鎖キナーゼによる軽鎖リン酸化が活性化機構の主たるものであるという考え方に対し、我々はアクチンに関係したライオトニン・トロポミオシン系による制御機構の存在を主張している。ミオシンキナーゼ系とライオトニン・トロポミオシン系との関係を明らかにするために以下の研究をおこなった。

- (1) ミオシン軽鎖キナーゼとライオトニンを明瞭に区別する手段を確立することを試みた。
各々を特異的に認識するプローブとして抗体の調製（ポリクローン抗体およびモノクローン抗体）を試み、現在数種類の抗体と用いて特異性の検定および検出法の確立をおこなっている。
- (2) ニワトリ筋胃平滑筋を中心に制御因子の精製をおこなってきたが、本年度は牛大動脈および胃平滑筋よりライオトニンとキナーゼの分離調製を試みライオトニン活性分画とキナーゼ

活性分画に解離のあることを見た。

- (3) ミオシン軽鎖キナーゼの Ca 依存性はカルモジュリンを介しておこなわれるが、ライオトニンによる基本的活性化はカルモジュリン不在下で観察される。現在ライオトニンによる活性化に Ca 依存性を与える Ca イオン受容部位の同定を進行中である。

フタホシコオロギ精子核中の DNA 構造と DNA 結合蛋白質置換

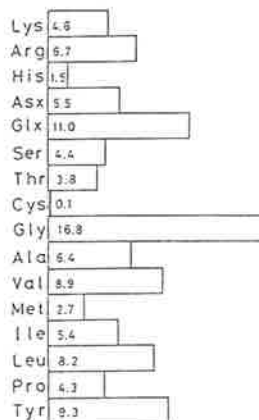
鈴木 理, 江橋節郎 (生理研)

精子核中の不活性遺伝子は特に DNA 構造と DNA 結合蛋白質に関して興味深い。筆者らがフタホシコオロギ (*G. bimaculatus*) 精子を用いて東大理学部において行った実験により,

1. この精子は長さ 20μ 直径 1μ の針状核を持つ事
2. DNA は精子長軸方向に走っており両端で曲がっている事
3. 成熟精子中にはヒストンは存在せず分子量17000程度の新種蛋白が存在する事がすでに示された。2 は DNA 結合色素を用いた蛍光偏光の実験, 3 は精包より調製した成熟精子よりの蛋白質の 0.4N 硫酸抽出による。

今回、本研究所における実験の結果、以下の事実が明らかになった。

有井達夫助教授との共同研究により精子核の超高压電子顕微鏡による電子線回折パターンを得る事に成功した。これは $3.6\text{\AA}$ 付近に DNA の塩基対間隔に対応すると思われるアークがある事を示しており、これにより核内で DNA が少なくともパラクリスタル状に配向している事が示される。またデフォーカス像との対応から配向方向が核長軸方向である事が分かる。また真空中でも B 型様の塩基対間隔が保持されている事は DNA 結合蛋白質による効果、もしくは DNA 配向効果によって水非存在下でも B 型が安定下されている事を予想させる。



The amino acids content of the 17k protein

17K蛋白のアミノ配分析の結果を図1に示す。これによりDNAとの結合に関与すると思われるアルギニン、リジン含量がさほど高くない事が分かる。しかし精巣よりの未成熟精子を含む分画には16.5K, 17.5Kに2種の高アルギニン型蛋白質が存在する事を認めた。これはポリアクリルアミドゲル中の蛋白質の無水酢酸処理によるリジン残基のブロックと酸性色素ファーストグリーンによるアルギニン残基の特異的染色法の開発によるものである。特に16.5K蛋白質は遺伝子活性阻止に重要であると思われ、そのDNA結合能は、核酸アフィニティカラムによる測定によれば、イオン結合においてどのヒストンよりも強く疎水結合においてH3, H4に次いでいる。以上の事実により16.5K, 17.5K蛋白がDNAに結合する事により遺伝子活性を阻止した後形態的にも完成した核中ではさほどDNA結合性の強くない17K蛋白におきかわるものと思われる。これは精子形成の際のDNAの保護と受精後のスムーズなDNA発現のためであろう。

同じ部内の三川隆, 桑山秀人両博士の援助に感謝します。アミノ酸分析に際して御助言下さった星野稔博士ならびに、分析室の服部, 小島両氏に感謝します。

超微小形態生理研究部門

概要

本年度には下記に掲げる研究が行なわれた。第一は非破壊的手法である NMR を用いての各種臓器における生理機能に関連したエネルギー代謝の研究で、精力的に推進された。また第二は、山野俊雄・大阪大学医学部・名誉教授らのグループと共同で、D-アミノ酸酸化酵素の紫色中間体の構造決定がレーザーラマン分光法を用いて行われた。この中間体は25年前に大阪大学医学部において、久保秀雄現名誉教授のもとで、亘が志賀 健教授（現愛媛大学医学部）とともに発見したもので、構造決定はこの時以来の懸案であり、結論を得たのはよるこばしい限りである。また、本部門では年度当初に志賀 潔助教授の熊本大学医学部・教授への昇任があり、また年度末近く二科安三助手の熊本大学医学部・助教授への昇任があった。このため、昭和60年度より新たな研究体制となる。

NOE を用いた複合反応系における反応経路検索の手法

— ローマン反応とミオキナーゼ反応の検討 —

亘 弘，二科安三（生理研），志賀 潔（熊野大・医）
瀬尾芳輝（京都府医大）

心臓・唾液腺にあっては摘出して灌流しつつNMR（核磁気共鳴）法によって、脳、腎臓にあっては生きたままで麻酔を行いつつTMR（局所磁場核磁気共鳴）法によって、灌流や血流の停止による無酸素状態での燐化合物の消長を観測してきた。灌流や血流の再開にあたって、ATPの元のレベルへの復帰と、クレアチン燐酸の急速な回復、即ちエネルギー貯留が見出された。ローマン反応（ $\text{ATP} + \text{クレアチン} \rightarrow \text{ADP} + \text{クレアチン燐酸}$ ）によりエネルギー貯留が行なわれるが、この反応がATP側に著しく傾いており、この反応のみでは無酸素状態後の酸素投与後のクレアチン燐酸合成反応の速さの説明が不可能である。このようなエネルギー貯留生理機能は不応期の短縮あるいは不応期をなくするために必要な機能であり、この機構の解明は生理機能理解の基本的なものである。生化学的手法により複合反応系を個々に分解して検索するものであるが、*in vitro* と *in vivo*での酵素機能が必ずしも同一ではないことに留意しなくてはならない。したがって核オーバーハウザー効果（NOE）を用いて組織あるいは臓器の生きたままでの状態で、細胞内に存在する燐化合物の相互交渉を検出し、さらに縦緩和時間に対する影響を求め、これらより心臓、唾液腺、脳、腎臓のエネルギー貯留機構の解明に応用することが本研究の目的である。

このため核オーバーハウザー効果（NOE）を利用する。ATPの γ 位の燐とクレアチン燐酸の燐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用い口径15mmの試料管内に設置しリンガー液を外部灌流し³¹P-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 5 mmol/kg であった。クレアチン磷酸から ATP 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が生成される反応（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 飽和時の信号強度比は 0.48 ± 0.12 となった。結果を図に示す。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と化学的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 2.8 および 2.6 mmol/sec/kg であった。もし、ミオキナーゼ反応 ($2 \text{ ADP} \rightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$) において ADP の β 位の磷と、ATP の α 位の磷との間に化学交換反応がおっているとすると、ATP はローマン反応とミオキナーゼ反応の各々に平衡しているコンパートメントが存在することになる。この様な場合ローマン反応の正、逆反応のフラックスを測定すると、正反応のフラックスは正しく求まるが、逆反応のフラックスは実際よりも小さく測定される。

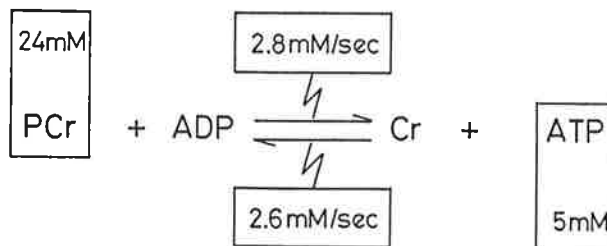
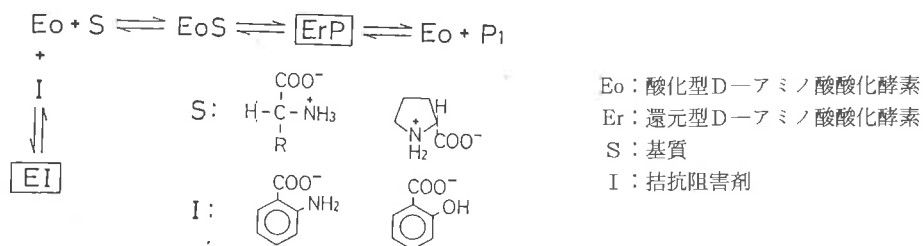


図. 蛙筋肉におけるローマン反応のフラックス測定 (24℃)

D-アミノ酸酸化酵素複合体におけるリガンドのプロトン付加状況について

二科安三, 亘 弘 (生理研), 志賀 潔 (熊本大・医)

図はフラビン酵素, D-アミノ酸酸化酵素の反応機構の概略である。E,P は基質との反応過程で生ずる中間体で紫色中間体と呼ばれるものであり、EI は酵素一拮抗阻害剤複合体である。酵素と基質が結合したとき、基質アミノ基のような官能基が neutral 型なのか、プロトンが付加した cation 型なのかを知ることは反応機構を分子レベルで解明するのに重要である。というのは、そ



の知見は酵素-基質間にどのような相互作用がはたらいっているかを知る為の有力な情報になるからである。

以前に、D-プロリンやD-アラニンを経質にした場合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、イミノ酸はN原子にプロトンが付加した cation 型であることを報告した。このことが一般的なことなのかどうか、共鳴ラマン分光法により他の基質を用いて調べた。N-メチルアラニン、D-ロジンを基質にした場合にもプロリンと同様、イミノ酸の C=N 伸縮振動のバンドは重水中で低波数シフトした。これは紫色中間体は還元型酵素が電子供与体、カオチン型イミノ酸が電子受容体の電荷移動錯体であることがかなり一般的なことを示唆している。

拮抗阻害剤であるO-アミノ安息香酸は基質類縁体であり酵素との複合体EIは酵素-基質複合体の構造を研究するのによいモデルである。このEIの共鳴ラマンスペクトルと、種々のpH領域でのO-アミノ安息香酸のラマンスペクトルとの比較からアミノ基は neutral であることがわかった。この複合体は酸化型酵素が電子受容体であり、O-アミノ安息香酸が電子供与体の電荷移動錯体である。またO-アミノ安息香酸の COO^- 基が複合に関与していることがあきらかになった。これは昨年報告した紫色中間体の場合のイミノ酸の COO^- 基の関与と同様であり、基質アミノ酸が酵素の触媒作用を受ける際に COO^- 基が重要な役割をしていることを示している。

脳内活性物質探索システムにおける multi-criteria の導入

東 晃史 (生理研)

ヒトを長期間の断眠状態に置くと、micro-sleepが頻繁に発生し、睡眠過労が覚醒状態に侵入し始めることが知られている (Dement 等: In Basic Sleep Mechanism: Chspter 12, Academic Press, 1974)。また、ネコは2-3秒の間に眠り、覚醒し、再び眠ることが確かめられている (Dement等: 同上) このように睡眠 - 覚醒状態 (state) が、状況に応じてダイナミックな変動を示すのであれば、相応の分離能を有するstageの変換の技術が必要であろう。しかるに、多相型

の睡眠 — 覚醒を示す小動物の評価基準 (criteria) の設定は、各研究者の任意性に委ねられている (松本淳治：神経精神薬理，6，155—179，1984)。

したがって、各研究者は stage 判定の評価基準をポリグラムによって示し、詳細な特徴を記述する。そして、長時間の記録像をそれぞれの criteria に照らして、単位時間 (epochtime) 毎に反復評価する研究者自身の scoring 能力の信頼度について言及するのが一般的である。このような慣行法に基づく研究の展開は、ヒトの睡眠諸現象との対比の上で便利である。しかしながら、永い伝統と国際的共通認識が確立されているヒトの睡眠分析においてさえ、コンピューターの自動診断に100%の信頼を与える研究者はいない。これは慣行法に基づく評価基準をシステム化する技術がいかに難しいかを物語っているといえよう。かくして、マウスを実験動物として用いる behavior の分析では、慣行法に基づく睡眠分析を断念し、コンピューター利用を優先できる方法と技術の開発が行なわれた。

センサーとして脳波用電極と小型加速度計を用い、睡眠相の深睡眠と覚醒相の運動を指標とする対になった時系列データを得て、behavioral stage をアルゴリズムによって自動分類し、これに基づいて睡眠 — 覚醒の評価を行う方法である。これはマウスを用いる場合の特殊な方法の一つであるが、睡眠研究の手法に限定されるものではない。マウスの behavior に関する一般的研究手法として位置付けられるものである。この方法に対して、動的行動状態分類法 (DBSAM) と名付け、その出力 (評価) 例が、生理学研究所年報第 4 巻 (1983) に、また応用例が第 5 巻 (1984) に示されている。

次いで、マウスの behavior の criteria と epoch time の両方を定量的に変更して、そのダイナミクスを多角的に評価する方法が開発された。これは micro-sleep と micro-wakefulness の持続時間を変数として、多様な分解能の criteria を作製し、マウスの behavior の多角的評価を可能にする処理法で、MMP と名付けてその特徴と効用について発表した。DBSAM と MMP を併用するマウスの behavior の自動評価法の確立が、生理学と行動学の新局面を誘発する契機となることを期待したい。

細胞内代謝研究部門

概要

各種神経ペプチドおよび関連ペプチドの化学合成，合成ペプチドを抗原とし特異抗血清の作製を行ない，ラジオイムノアッセイおよび免疫組織化学により，神経ペプチドの組織内分布，刺激放出動態および生合成過程について研究している。それらのなかで，ヒト神経芽細胞腫系においてVIPとPHIは同一前駆体から生成するが，その産生・放出動態が著しく異なることを明らかにした。また，トカゲ毒からVIPと極めて類似したペプチド（ヘロデルミン）を単離し，その一次構造を決定した。これは，爬虫類ではじめて発見されたVIP様ペプチドであった。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プロレニン部を初めて化学合成し，その生体内代謝を解析している。さらに，各種レセプターについてもその提出構造に基づき，結合部位・リン酸化部位に関連するペプチド配列を推定することにより，今後の研究展開に必要とする各種基質を化学合成した。

ヒト神経芽細胞腫培養細胞におけるVIPおよびPHMの産生・放出動態

星野 稔，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（静岡薬大）

PHM（ヒトPHI）は，VIP前駆体に存在するペプチド配列であり，すでにヒト神経芽細胞腫培養細胞NB-OK-1において免疫化学的に産生されることを示し，さらにVIPとPHMは免疫組織化学により同一細胞に共存することを明らかにした。本研究ではVIPとPHMの産生・放出動態について比較検討した。

PHMのラジオイムノアッセイ（RIA）には，C端部およびN端部をそれぞれ主要抗原認識部位とするPHM-C端特異抗血清およびPHM-N端特異抗血清を用いた。

種々の濃度のdibutyryl cAMPを添加，48時間培養後の細胞抽出物および培地中のVIPならびにPHM-N端免疫活性は，dibutyryl cAMP濃度の増加とともに上昇した。PHM-C端免疫活性は，細胞抽出物においてのみdibutyryl cAMP濃度の増加にともない増加したが，培地中では顕著な増加は認められなかった。また，いずれのPHM免疫活性もVIPに比較して約1/2～1/5であった。

次に，1 mM dibutyryl cAMP存在下，細胞中および培地中のVIP/PHM免疫活性の経時変化を検討した（図1）。dibutyryl cAMPの濃度効果の場合と同様に，PHM-N端免疫活性は，細胞内および培地中においてVIPと平行して培養時間の延長とともに増加した。一方，PHM-C端免疫

活性は細胞抽出物においてのみ増加し、培地中ではわずかの増加を認めたにすぎなかった。産生・放出される PHM 免疫活性は、VIP のそれと比較して明らかに低値 ($1/2 \sim 1/5$) であった。したがって、PHM 免疫活性は VIP 前駆体から生成されるにもかかわらず、生成量が VIP より少ないことが示された。さらに、PHM 免疫活性のうち C 端部を含む分子は細胞内の産生が極めて小さく、放出もほとんど認められなかった。

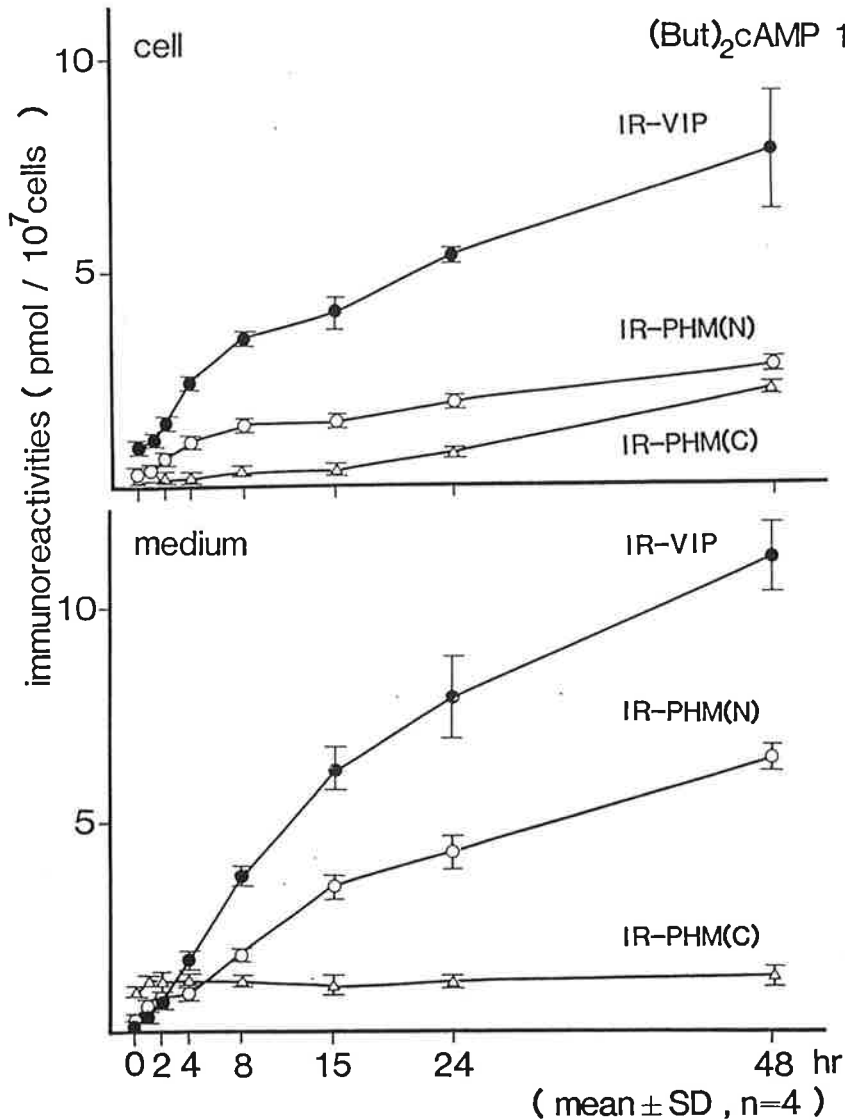


図 1. 細胞内および培地中の VIP/PHM 免疫活性の経時変化。
1 mM dibutyl cAMP 存在下で培養。IR-VIPはVIP 免疫活性、
IR-PHM(N)はPHM-N 端特異免疫活性、IR-PHM(C)はPHM-C 端特異免疫活性を示す。

Helodermin の生物活性

成瀬 達, 安井章裕, 喜志多達, 尾崎 毅, 星野 稔, 矢内原昇 (生理研)

アリゾナ産の毒トカゲ (*Heloderma suspectum*) より単離された helodermin は哺乳類以外で発見された最初の secretin/glucagon/VIP family のペプチドである。最近の免疫組織化学的研究より、このペプチドが哺乳類にも存在していることが示唆されている。ここに星野らにより提出された一次構造に基づき、helodermin およびそのフラグメントを化学合成し、イヌにおける血流および膵外分泌作用を指標として、合成 helodermin および関連ペプチドの生物活性を vasoactive intestinal polypeptide(VIP) および secretin のそれと比較検討した。

〔血流作用〕 VIP の生物活性検定法 (Said & Mutt, 1970) に準じ、ペプチドの血流作用を検討した。ビーグル犬 5 頭を用い、クロラロス麻酔下に大腿動脈を剝離し、その分枝より生理食塩水に溶解したペプチドを投与し、平均血流量の変化を電磁血流量計を用い記録した。VIP 1pmol/Kg 動脈内投与により有意の血流増加を認め、32pmol/Kg によりほぼ最大反応が得られた。helodermin にも VIP 様の血管拡張作用があり、その力価は VIP の約 1/16 であった。helodermin(Hd) の C 端フラグメント Hd(7-35)NH₂ および Hd(22-35)NH₂ には血流作用はなかったが、N 端フラグメント Hd(1-27)NH₂ には helodermin の約 1/2 の血流作用があった。helodermin の血流作用は VIP と異なり持続性があり、血流作用の半減期は平均 9.1 分であった。Hd(1-27)NH₂ では血流作用の持続性が失なわれ、半減期は 2.2 分と VIP の半減期 1.4 分と有意差がなかった。

〔膵外分泌作用〕 慢性胃瘻および膵瘻を造設したイヌ 4 頭を用いた。約 18 時間の絶食後、イヌをバブロフスタンドに固定し、非麻酔下で実験した。ペプチドは生理食塩水に溶解し、静脈内に投与した。secretin 2.5pmol/Kg により膵の水と重炭酸塩分泌量は有意に増加し、50pmol/Kg によりほぼ最大反応を得た。helodermin の膵外分泌刺激作用は VIP より強く (約 2.5 倍)、力価は secretin の約 1/7 であった。大腿動脈の血流作用と同様、C 端フラグメント Hd(7-35)NH₂ および Hd(22-35)NH₂ には膵外分泌刺激作用はなかったが、N 端フラグメント Hd(1-27)NH₂ の水と重炭酸塩分泌作用は helodermin の約 75% であった。helodermin およびそのフラグメントの膵蛋白分泌作用は、secretin と同様、ほとんど認められなかった。

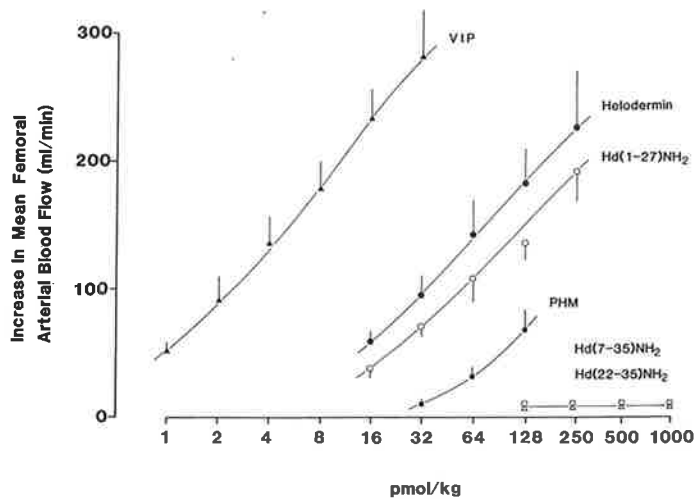


図1. helodermin の血流作用。mean $\pm$ s.e.(n=5)

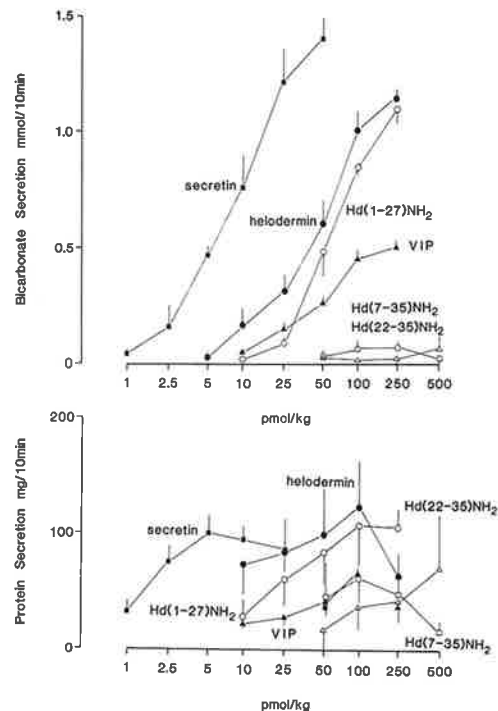


図2. helodermin の膵外分泌刺激作用。mean $\pm$ s.e.(n=4)

helodermin はイヌの血管に対しては secretin より VIP 作用が強く、イヌの膵に対しては VIP より secretin 作用が強いという興味ある性質をもつペプチドであることが判明した。また血管および膵に対する活性部位は主として N 端側に存在し、C 端側には直接作用が認められなかったが、血流作用の持続性に大きな役割をはたしていると考えられた。

迷走神経刺激による VIP/PHI の分泌動態

安井章裕, 成瀬 達, 尾崎 毅, 矢内原昇 (生理研)

井口和明, 望月 徹, 矢内原千鶴子 (静岡薬大)

1981年に Tatemoto と Mutt によりブタの腸管より単離された peptide histidine isoleucine (PHI) は免疫組織化学的研究により消化管のコリン作動性神経内に vasoactive intestinal polypeptide(VIP) と共存することが明らかとなった。その後, ヒト神経芽細胞腫培養細胞の VIP mRNA の構造解析により, VIP 前駆体内に PHM (ヒト PHI) 配列の存在が示された。これらの知見は VIP と PHI が共通の前駆体より生成され, 神経末端より共に放出され, 消化管機能を調節している可能性を示唆している。本研究ではイヌの迷走神経を電気刺激し, 門脈血内に逸脱した VIP および PHI を測定し, 両ペプチドの分泌動態を検討した。

雑種成犬を用い, 20時間の絶食後, クロラコースにより麻酔した。両側頸部迷走神経を (10 V, 5 msec) の矩形波で電気刺激 (2.5, 5, 10P/sec) し, 門脈および大腿静脈内留置カテーテルより経時採血した。血漿を分離し, その VIP および PHI 濃度をそれぞれ特異抗血清 R 502 およ

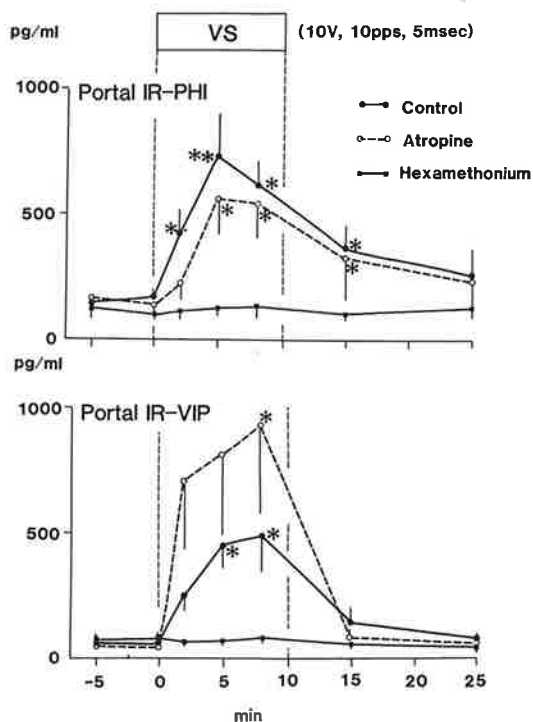


図1. 迷走神経刺激による門脈血中 PHI, VIP の反応。(Mean ± S.E., n=5) * p < 0.05, ** p < 0.01

びR8801を用いたラジオイムノアッセイにより測定した。

迷走神経電気刺激（10V，5 msec，10P/sec）により，門脈血中のVIPおよびPHIの免疫活性は有意に上昇したが，末梢血では両者共に有意の増加を認めなかった。門脈血中のVIPおよびPHIの濃度は迷走神経の刺激強度に比例し，いずれも刺激停止後，速かに元の値に復した。迷走神経刺激により誘発された胃および十二指腸運動を抑制するに十分な量のアトロピン（50 μ g/Kg-h）は門脈血中VIPおよびPHIの上昇を抑制しなかった。一方，ヘキサメソニウム（5 μ g/Kg-h）は消化管運動と共に，VIPおよびPHIの放出を完全に抑制した。迷走神経刺激時に門脈より採取した血漿のVIPおよびPHIの免疫活性のゲルろ過（Sephadex G50）パターンの主要ピークは，それぞれ合成ブタVIPおよびPHIの流出ピークと一致した。

免疫組織化学およびVIPの前駆体の遺伝子構造解析より推定されたように，VIPとPHIは迷走神経電気刺激により共に腸管神経より分泌されることが明らかになった。血漿中のVIPおよびPHIの免疫活性のゲルろ過パターンから，両者は共にVIPおよびPHIに相当する分子型であると推定された。VIPおよびPHIの分泌がアトロピンにより抑制されず，ヘキサメソニウムにより抑制されたことから，両ペプチドはともに迷走神経節後線維から分泌されると考えられた。VIPとPHIが消化管の神経細胞内で共通の前駆体より生成され，神経末端より共に分泌されていることを支持する本研究の結果は，両神経ペプチドがアセチルコリンと共に消化管機能調節に重要な役割をはたしていることを示唆しており，今後その作用の解明が必要と考えられる。

細胞器官研究系

生体膜研究部門

概要

生体膜研究部門は細胞膜上に興奮のイオンチャネルおよびシナプス受容体チャネルがどのように形成されるか、そしてイオンチャネルの機能発現のメカニズムはどのようなものか、を解明することを目標に研究を進めてきた。昭和59年度は、イカ巨大神経線維を用いた実験では細胞内Caイオン他の2価イオンがNaチャネルの活性化および不活性化過程をイオン種により異なる濃度で且つ作用特異性をもって制御していること、poly-L-lysineなど多価カチオンが特にNaチャネルの不活性化過程を特異的に修飾すること、Kチャネルは通常の興奮条件では細胞外膜表面にKイオンが蓄積するが、Kイオン蓄積の極めて少いイカ巨大神経線維標本および溶液条件をつくり、Kチャネルの特性を精密に解析した等の知見を得ることができた。またイオンチャネル形成に関するアプローチとして、ラット脳や電気ウナギ発電器官から抽出したメッセンジャーRNAをアフリカツメガエル卵母細胞に細胞内注入することにより、2～3日後にそれぞれ外来性のNaチャネル、ニコチン性およびムスカリン性アセチルコリン・リセプターが形成されることを電気生理的手法で確認し、反応機序やメッセンジャーRNAの特徴づけを行った。

Naチャネル活性化と不活性化に作用する細胞内2価イオン

山岸 俊一，古家喜四夫，久木田文夫（生理研）

興奮性細胞の細胞内に存在するCaイオンおよびMgイオンが興奮を担うイオンチャネルをどのように制御しているかを明らかにすることは興味ある課題の一つである。ここでは灌流イカ巨大神経を用いて、Naチャネルの活性および不活性化過程に対するCa, Mgイオンの基本作用および他の8種の2価イオンの基本作用について比較検討を試みた。これらの検討を通じて細胞内2価イオンが示す生理作用の意味と、2価イオン・チャネル蛋白相互作用がもたらす結果を推察しようとした。

実験標本としては人工海水（ASW; NaCl 510, KCl 5, CaCl₂ 50, Na・HEPES 10mM, pH 8.0）に浸したイカ巨大神経の細胞内を100mM K-glutamate（またはKF）および10mM TEA-Cl溶液（glycerolで外液と等張に調整, pH=7.4）で灌流したものを標準状態とし、これに0.3-30mMの2価陽イオンを加えたときの膜興奮のパラメーターの変化を計測した。

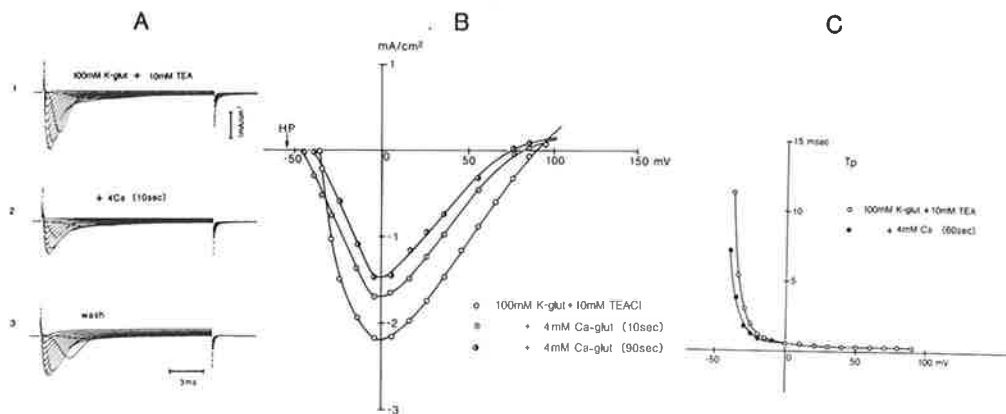


図1. 外液は人工海水, 内液は100mM K-glutamate+10mM TEA-Clを標準液とし, これに4 mM Ca-glutamateを加えたときの膜電流に対する効果, A) 電流曲線の変化, B) I-V曲線の変化, C) クランプ開始から内向き電流ピーク I_{Na} までの時間 (T_p) の電位依存性の変化。

(1) 100mM K 溶液中に1—4 mM Caを加えると内向電流は100mM K 灌流によるコントロール値と比べて低いクランプ電位で始まり, I-V曲線全体としては低電位側に平均7 mV シフトした結果が得られた(図1)。これはMg, Mn, Sr, Co, Baの場合にも観測され, Mg添加の場合の電位シフトが最大であった(最高20mV)。このI-V曲線の電位シフトの効果と電流刺激による活動電位閾値低下の効果とはよく対応している。

(2) Na 電流ピーク値に対し, Ca, Mgイオンはじめ, すべての2価イオンは電流抑制効果を示した。この抑制高はイオン種によって異なり, またそれぞれのイオンの濃度に依存している。10種のイオンは1 mM 2価イオン添加により, ① I_{Na} を75—95%に抑制するグループ; Ca, Mn, Ca, Sr, Ba, Zn, Niと, ② I_{Na} を10%以下に抑制するグループ; Cd, Beに大別できる。第1群と第2群で同じ抑制高を示す濃度比は約40:1であった。第1群ではクランプ開始からNa 電流ピーク値までの時間は殆ど変わらないが第2群では約3倍の遅れがあること, また第2群のCd, Beは細胞外投与の場合にも抑制効果を示すことが特徴である。

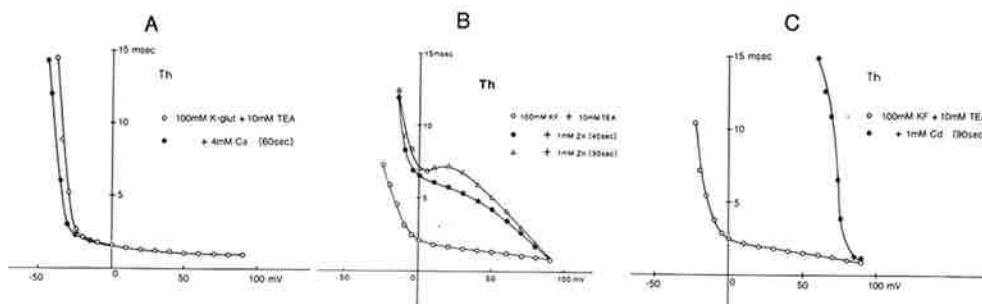


図2. 100mMK⁺+10mMTEA⁺を標準状態とし, これに(A) 4 mM Ca, (B) 1 mM Zn, (C) 1 mM Caを加えたときの, I_{Na} から $I_{Na}/2$ までの時間の膜電位依存性の変化。

(3) Na チャネル電流の不活性化過程をしらべるために、 I_{Na} ピーク値から、ピーク値の $1/2$ になるまでの時間を半減時間 (Th) としてプロットすると、Th に対する効果は 3 つの群に分けることができた (図 2)。即ち、①Th に変化がない群；Ca, Mg, Mn, Co, Sr, ②Th が数倍に延長する群；Ni, Zn, ③Th が数10倍以上に延長する群；Cd, Be とである。これらのうち、②の Ni, Zn はピーク Na 電流値を軽度抑制する 2 価イオンのうちから、特に不活性化過程を抑制するグループが別れてきたと云えよう。また Na 電流ピーク値を強く抑制する Cd, Be が Na 電流不活性化過程をも強力に抑制している。

2 価イオン添加による $I-V$ 曲線の低電位側へのシフトは細胞外 2 価イオンを増したときの高い電位側へのシフトとは逆の関係であり、膜内側面のネガティブ・チャージの中和効果と考えられる。ただ、2 価イオン添加により静止膜電位は殆ど変化を示さないで、チャージ効果は Na チャネル内側面のごく近傍で作用した結果によると推察される。

Ca イオンはじめ10種の 2 価イオンはそれぞれの特徴をもって Na チャネルに作用しているが、Ca イオンとはほぼ同等の作用を示すのが Mg, Mn Ba Co, Sr イオンであることが明らかとなった。Cd, Be イオンは Na 電流の活性化と不活性化過程を同時に抑制し、細胞外からも同様の作用をもたらすので、極微量で Na チャネル蛋白の機能発現サイトに結合し、機能を緩慢にしたのち停止させてしまうと考えられる。

イカ巨大神経線維内に灌流した多価カチオンによる ナトリウムチャネル不活性化の修飾

古家喜四夫, 山岸俊一 (生理研)

神経の興奮のメカニズムを担っているのは神経膜にあるイオンチャネルである。その働きは膜及びチャネルにかかる電圧によって制御されているが、そのメカニズムはほとんどわかっていない。イオンチャネルの近傍及び内部には負の固定電荷が存在し、その電荷（あるいはそのつくる表面電位）はチャネルの電圧感受部位に影響を及ぼしていると考えられている。我々は膜の細胞内表面及びイオンチャネルの細胞内側の部位にある負電荷を修飾する方法として、今までに報告されている pH やイオン強度の変化といった間接的な方法ではなく、カチオン化フェリチン (CF), ポリリジン (PLL), ポリアルギニン (PLA) といった多価のカチオンが静電気力によって直接結合することを用い、その負電荷の分布や電圧感受部位に対する影響を調べる実験を、灌流したイカ巨大神経線維を用いてここ数年行なってきた。

細胞内に灌流した CF (直径約130 Å, 約200個の正電位をもつ) はナトリウムチャネルの不活性化部位のみに作用し、その時定数をもとの 1 ms から 26ms に延長するといった特異的な作用のみを示した。電顕的には膜内表面に密で様な非特異性の結合がみられたにもかかわらず、チャネ

ルの電圧依存性にはほとんど影響がみられなかった（本年報第3巻）。このことはCF分子の大きさの故に、イオンチャネルの一番表面にあると思われる不活性化の部位には作用するが、内部にあると思われる電圧感受部位には作用できないためと考えられる。

一方同じ正電荷を有する分子でも PLL や PLA の作用は CF とまったく異った様相を示す。即ち、イオンチャネルの各種のパラメーターの電圧依存性に正電荷が結合したことを示す過分極側へのシフトがみられた。中でもナトリウムチャネルの不活性化の電圧依存性（ h_{∞} —Vプロット）の電圧軸シフトは数10mVと最も顕著であった（本年報第4巻）。図1の黒丸で示すように、PLLやPLAは保持電位-60mVではナトリウムチャネルをはほぼ数分で完全に抑制する。この作用は図2の dose-response プロットからわかるように、非常に特異的で神経毒的作用である。この電流の抑制はナトリウムチャネルの不活性化の電圧依存性の過分極側へのシフトによって引き起こされたもので、図1（白丸）で示すように保持電位を深くすることにより電流を回復させることができる。PLLの結合は保持電位の大小によってはずれることはないが、負電荷をもったポリグルタメート（PLG）を灌流することによってはずれ、電流も回復する（図1及び本年報第4巻）。

このPLLなどによって誘起されるナトリウムチャネルの不活性化は、それを取り除くのに数秒ないし数10秒の過分極プレパルスが必要とするいわゆる遅い不活性化である（図3b,c）。特に今回はこの遅い不活性化と PLL の作用について詳しい実験を行ない次の結果を得た。

1. ナトリウムチャネルの遅い不活性化過程は、PLLを作用させないコントロールの神経でも保持電位を-30mV程度に浅くし、チャネルにかかる電圧を小さくすることにより誘起される（図3a）。このことは Rudy (J. physiol. 283, 1—21など）らのいっているように遅い不活性化過程はチャネル固有のものであることを示している。通常の静止電位ではこの不活性化は取り除かれた状態にある。

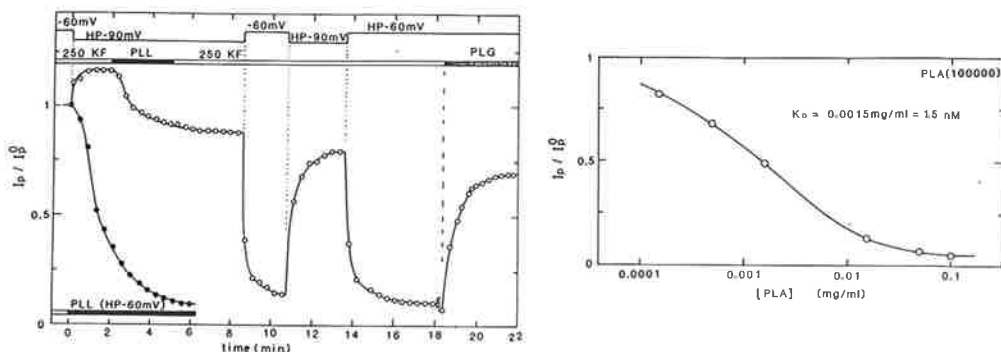


図1．内向きNa電流のピーク値でみたPLLの作用と保持電位の関係及びPLGによる回復。

図2．保持電位-60mVで測定した内向きNa電流のPLLによる抑制の用量反応曲線。

2. PLLなどはこの遅い不活性化の部位に一番特異的に作用し、その電圧感受部位を脱分極させる働きをする。図4に示すように、遅い不活性化の電圧依存性は過分極側に大きくシフトする。これにより通常の静止電位でも遅い不活性化が顕在化することになり電流は抑制される。

以上述べてきたことから、PLLなどの多価カチオンは遅い不活性化のメカニズム、そしてチャネルの電圧依存性のメカニズムを知る上で重要な役割を果し得る薬物であると考えられる。

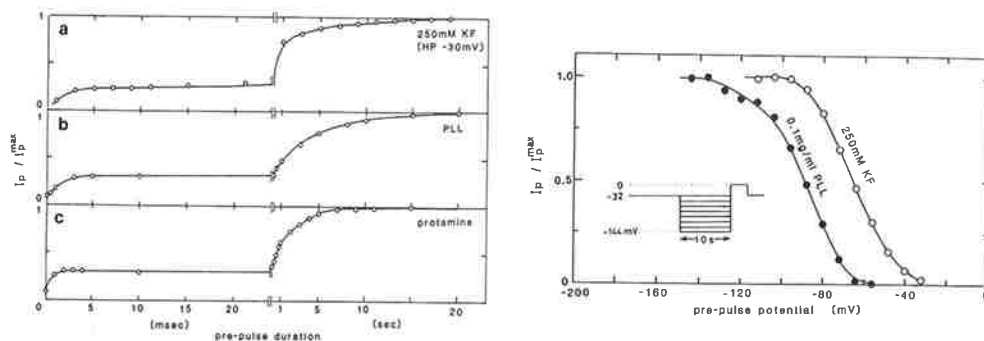


図3. -120mV のプレパルスの長さで内向き Na 電流の回復の度合。
a ; 250mM KF, 保持電位 -30mV にして不活性下, b; PLLによって不活性化, C ; プロタミンによって不活性化 (b,c はともに保持電位 -60mV)。

図4. 遅い不活性化の電圧依存性に対する PLL の作用。

Kイオンの蓄積のないイカ巨大神経線維標本のKチャネルの性質

久木田文夫, 山岸俊一 (生理研)

ヤリイカ (*Doryteuthis bleekeri*) 巨大神経線維のKチャネルの性質を膜電位固定法で解析する際には、細胞内から外向きのK電流に伴い流出するKイオンが細胞膜の外表面に蓄積するため、通常の条件ではK電流の時間経過の正確な解析を行うことは不可能である。つまり通常の条件では図のAに示すように、脱分極の時間が長くなるほど再分極時に流れる内向きの tail 電流が増大するが、これは -100mV に近い値をもつ V_K が細胞外表面のKイオン濃度の増加に伴い、 0mV に近づきを示しており、測定されるK電流はKチャネルの開く過程を正確に示していない。この神経線維に浸透圧差を利用して外向きの定常的な水の流れを作用させると、図のBに示すように内向きの tail 電流は小さくなり、その時間変化も小さくなることが分った。この現象は細胞外表面のKイオンの蓄積がなくK濃度が時間的に殆んど変化しないことで説明できる。このような条件ではKチャネルの外液Kイオンに対する感受性が増大し、Kチャネルの電流電圧特性は外向きに著しい整流性をもつようになり、 V_K の値もより負になることから、細胞外表面のKイオンの蓄積は殆んどないことが分かる。生理的イオン環境では細胞内のKイオンが細胞外のKイオン

に比べて2桁も多いが、このような条件では電流電圧特性が外向きの整流性をもつことは、イオンの透過性がイオン濃度と膜電位の指数とに比例するような、単純な細孔モデルから期待される性質である。いずれにせよ各時刻で V_K が変化し、且つ又 $I_K = g_K(V - V_K)$ という式も成立しないので、通常の場合では I_K の測定から g_K を求めることは難しい。しかしKイオンの蓄積がない場合には I_K そのものがKチャネルの活性化過程を示すと考えられる。このようにして得られた I_K は Hodgkin-Huxley の式 $\bar{I}_K(1 - e^{-t/\tau n})^4$ で良く近似できる。イオンの蓄積がある場合はK電流が実際より早く最大値に達するので、より次数の高い式が必要となる。

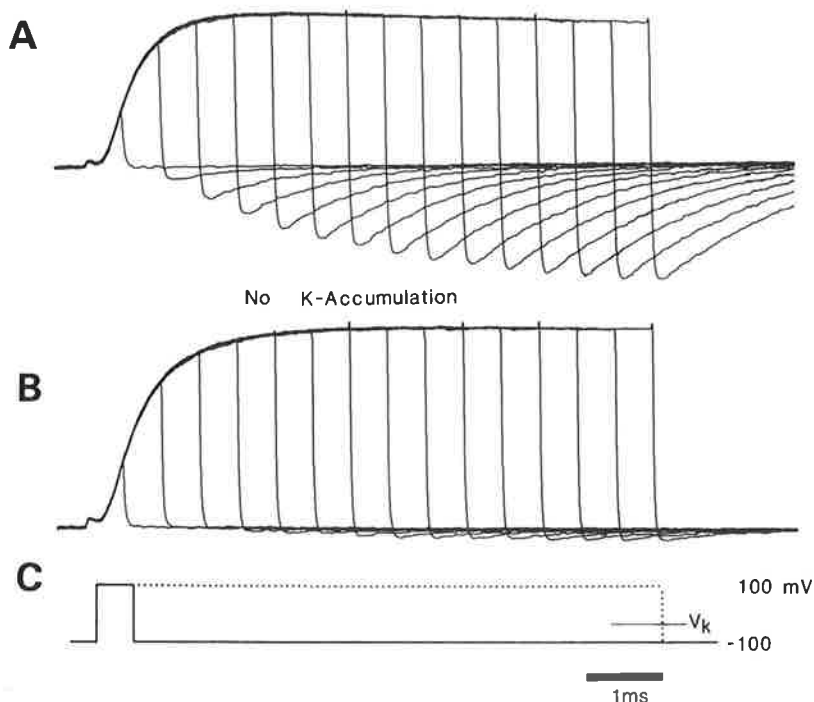


図. Cに示すように膜電位を-100mVから100mVに脱分極させると、脱分極の時間により再分極した場合のtail電流の大きさが異ってくる。通常の神経ではtail電流は時間と共に増大するが(A)、外向きの水の流れを与えるとtail電流は小さくなり、時間的にも変化しない(B)。

ラット脳及び電気ウナギ発電器官より抽出したメッセンジャー RNA の注入によるアフリカツメガエル卵母細胞での Na チャネルの発現

広野 力, 山岸俊一, 杉山博之 (生理研)

【研究目的】 アフリカツメガエルの卵母細胞に他の動物組織から抽出したメッセンジャー RNA(mRNA) を注入することによって発現するイオンチャネルがそのチャネル本来の生理機能

をもつことを確認する。さらにチャネル蛋白の構成要素とその大きさについてチャネル蛋白合成に必要な mRNA 種の側から推定する。

【材料及び方法】 mRNA はラットの脳及び電気ウナギ (*Electrophorus electricus*) の発電器官より、グアニジン・熱フェノール法により抽出し、オリゴ (dT) セルロースカラムを用いたアフィニティークラマトグラフィーによりポリ(A)⁺mRNA として単離した。通常はこのようにして得た mRNA の水溶液をそのまま卵母細胞に注入したが、研究の後半においてはラット脳 mRNA をシヨ糖密度勾配遠心法により 4 つの分画に分けたものを使用した。卵母細胞はアフリカツメガエル (*Xenopus Laevis*) 卵巣より少量ずつ取り出しコラゲナーゼ処理で濾胞細胞を除いたものを使用した。1 個の卵母細胞に 30 ないし 60 nl の mRNA 水溶液 (0.8 ~ 5 mg/ml) を注入し、Barth の medium (MBS) 中で 3 ~ 4 日培養した。電気測定は 2 本のガラス微小電極を刺入して行った。

【結果及び考察】 ラット脳 mRNA を注入した卵母細胞は MBS 中では mRNA を注入しない細胞と同様に静止電位が -60 mV 程度であり、電流刺激に対しても興奮しない。しかしベラトリン (0.5 mg/ml) 存在下では、脱分極し、時には自発的の反復興奮を示す (図 1)。また静止電位を直流通電により -100 mV に保っておき電流パルスで刺激すると活動電位を発生する (図 2 A)。電気ウナギ mRNA を注入した卵母細胞では図 2 B(b, c) に示すようにチャネルの活性化が少ない場合にサソリ毒 (20 nM) を加えると時間とともに活性化が促進される (図 2 B d ~ f)。これらの活動電位は 0.5 μ M テトロドトキシンによって完全に抑制され、また、10 mM リドカインによってもほとんど抑えられる。外液の Na を K, Li, Rb, Cs 等で置き換えることによって活動電位は減少しないし消失する。以上の結果より mRNA 注入により卵母細胞に発現したイオンチャネルは Na チャネルであり、神経や筋肉に存在する Na チャネルがもつ薬理学的・電気生理学的特徴を基本的にはすべて備えていることが判明した。

ラット脳 mRNA 注入により発現した Na チャネルの膜電位依存性を調べるために、膜電位固定法により膜電流を測定した。ベラトリン存在下で膜電位を -100 mV に保持しておき 10 秒の脱分極パルスを加えると -50 mV 以上では内向き電流成分がみられる。外液にテトロドトキシンを加えるとこの成分が完全に抑制された。図 3 はこれらの様相を電流電圧曲線で示したもので、 Δ はテトロドトキシン感受性の内向き電流成分すなわち Na チャネルを通る電流である。 $\blacktriangle$ は比較のために電気ウナギ mRNA 注入により発現した Na チャネルを通る電流を示した。電気ウナギ mRNA 注入の方がこの電流成分の逆転電位は低い。従ってベラトリン存在下ではイオン選択性が両者で若干異っていると思われる。

4 つの分画に分けた mRNA の各分画が Na チャネルを発現させる能力を比較するためにベラトリン存在下で膜電位固定法により tail 電流を測定した。膜電位を -100 mV から 1 秒ないし 2 秒の電圧パルスで -38 mV に脱分極させてから再び -100 mV にもどす操作を行った。このとき tail 電流は大部分がテトロドトキシン感受性をもつ成分であるため細胞膜上の Na チャネルの数を反映した大きさをもつとみなしてよい。図 4 には 4 つの分画 I ~ IV のそれぞれを注入した卵母細胞の

tail 電流の大きさを示す。この図より分画Ⅱ (30S~46S) が最大の Na チャネル発現能力をもつことがわかる。さらに表 1 に示すように分画Ⅰ, Ⅱ, Ⅲのうち2つを混合して注入したどの場合よりも分画Ⅱを水で薄めた場合のほうが Na チャネル発現能力が大きい。従って分画Ⅱは Na チャネル発現に必要な mRNA 種をすべて含み, もし存在すれば分画Ⅲに含まれるはずの分子量の小さい構成蛋白 (β_1 , β_2 等) に対応する mRNA 種は必要ではないことが示唆された。

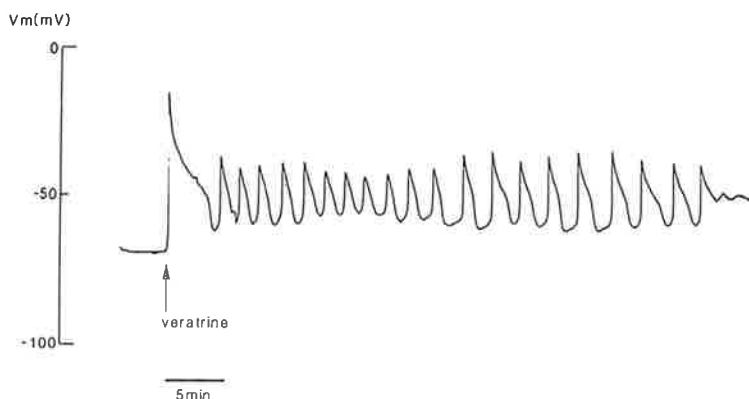


図 1. ラット脳 mRNA を注入したアフリカツメガエル卵母細胞の外液 (Barth の medium: MBS) に矢印の時点で 0.5mg/ml ベラトリンを加えたときに観測された自発的反復興奮。

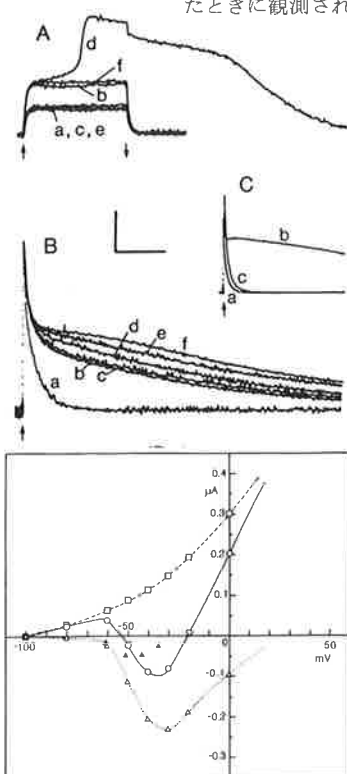


図 2. mRNA を注入した卵母細胞の電流刺激に対する電圧応答。すべて内向直流電流により -100mV に保っておき電流パルスで刺激した。A: ラット脳 mRNA を注入した卵母細胞の応答。(a, b) MBS 中でそれぞれ 0.02 μ A, 0.04 μ A の外向き電流を 2 つの矢印で示した時間 (10 s) とえた。(c, d) MBS + 0.5mg/ml ベラトリン中で同様の刺激を与えた。(e, f) MBS + 0.5mg/ml ベラトリン + 0.5 μ M テトロドトキシン中で同様に刺激した。スケールは 25mV, 5 s。B: 電気ウナギの発電器官の mRNA を注入した卵母細胞の電圧応答に対するサソリ毒の効果。電流刺激は 6 μ A の外向き電流を矢印の時点で 5 ms とえた。(a) 外液は MBS。(b, c) 外液を MBS + 0.5mg/ml ベラトリンに換えてからそれぞれ 20min, 28min 後, (d, e, f) (c) の後外液を MBS + 0.5mg/ml ベラトリン + 20 nM サソリ毒に換えてからそれぞれ 5 min, 10min, 17min。スケールは 25mV, 0.5 s。C: ラット脳 mRNA を注入した卵母細胞の電圧応答に対するリドカインの効果。刺激は B と同様。(a) 外液は MBS。(b) 外液を MBS + 0.5mg/ml ベラトリンに換えてから 20min 後。(c), (b) の後外液を MBS + 0.5mg/ml ベラトリン + 10mM リドカインに換えてから 10min 後。スケールは 50mV, 1 s。

図 3. ラット脳 mRNA を注入した卵母細胞の膜電流の内向きピーク値の電位依存。○は MBS + 0.5mg/ml ベラトリン中, □は MBS + 0.5mg/ml ベラトリン + 0.5 μ M テトロドトキシン中で測定した。△は○と□の差をとったものでテトロドトキシン感受性の成分。▲は電気ウナギ発電器官 mRNA を注入した卵母細胞で同様の操作を行い得られたテトロドトキシン感受性の成分。

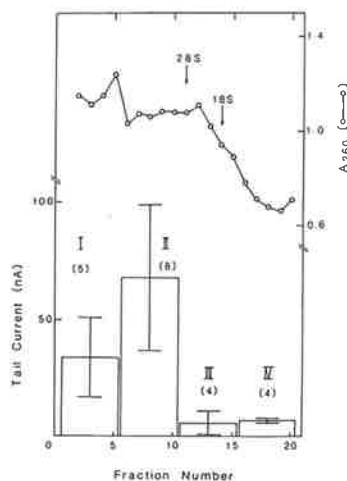


図4. ショ糖密度勾配遠心法によるラット脳mRNA分画の分け方と、各分画Ⅰ～ⅣのNaチャネル発現能力。膜電位を2秒間 -38mV に固定してから -100mV にもどした時のtail電流の平均値（長方形）と標準偏差の範囲（棒）を示す。分画Ⅰ～Ⅳの下〔 〕内の数字は測定した細胞の数。図の○—○はプールする前の分画ごとのmRNA濃度を260nm吸収で測定したもの。分画Ⅰ～Ⅳの細胞への注入量は60nlで濃度はそれぞれ1.19, 1.25, 1.55, 0.04mg/ml。

表1. ラットの脳mRNAの分画Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ(図5より)とその組合せの注入によるNaチャネルの発現能力。tail電流の大きさでNaチャネルの数を比較した。(a, b)分画Ⅰ, Ⅱをそれぞれ等量の H_2O で薄めて注入した。(c, d, e)分画Ⅰ～Ⅲのうち2つを等量ずつ混合した。注入量はすべて60nl。

mRNA 分画	注入量 (ng/oocyte)	tail 電流 (nA; 平均値±標準偏差)	測定数
(a) Ⅰ	36	17.3± 7.2	9
(b) Ⅱ	38	95.8±55.7	9
(c) Ⅰ + Ⅱ	36+38	38.3±16.9	9
(d) Ⅰ + Ⅲ	36+47	9.4± 3.1	8
(e) Ⅱ + Ⅲ	38+47	28.5±22.7	8

ラット脳 mRNA によるムスカリン性アセチルコリン反応性の誘導

杉山博之, 広野 力 (生理研)

ムスカリン性アセチルコリン受容体の反応機構を検討するひとつの方法として、ラット脳 mRNA を注入することによって、この受容体を介した生理反応系を、アフリカツメガエルの卵母細胞へ移植することを試み、また、このようにして発現したアセチルコリン反応の性質を検討した。

mRNA を注入しない卵母細胞では、アセチルコリンに対する反応性は全く検出されなかったの

に対し、ラット脳より抽出した mRNA を注入した細胞では、同一条件下で 90% 以上の細胞がアセチルコリンに反応し、膜電位応答を示した。応答は、アセチルコリン投与後数秒～数十秒の潜時を経て、内向き電流による脱分極として検出された。

アセチルコリン反応に関する $I-V$ 曲線を、種々のイオン組成をもつ溶液中で測定し、この反応の逆転電位を求めたところ、mRNA によって誘導されたムスカリン性アセチルコリン反応の逆転電位は、 Cl^- の平衡電位に極めて近く、かつ外液中の Cl^- イオン濃度の変化には大きく影響されたが、 Na^+ イオン濃度の変化には余り影響を受けなかった。このことから、このアセチルコリン反応は、主として Cl^- イオンによって生じていると考えられる。

このようなアセチルコリン反応性は、mRNA によっていかなる成分が誘導されることによってもたらされているかを検討した。卵母細胞をあらかじめ、ムスカリン性アセチルコリン受容体の非可逆的阻害剤で処理した後、mRNA を注入しても、誘導される反応の大きさは変わらないことから、mRNA は少なくともアセチルコリン受容体を誘導していると考えられる。また、mRNA によってアセチルコリン反応性を誘導した卵母細胞を、百日咳毒素 (IAP) によって処理すると、反応性は抑えられる。このことから、mRNA によって誘導されたアセチルコリン反応の細胞内反応機構には、少なくとも抑制性 G 蛋白質結合タンパク質 (Ni) が関与していると考えられる。

以上のように、ラット脳 mRNA によってアフリカツメガエル卵母細胞にムスカリン性アセチルコリン反応に関与する成分を移植することができることが分った。この細胞は、実験的に極めてアプローチし易く、かつ同一細胞で電気生理的測定と生化学的分析が可能であり、有効な材料と考えられる。

機能協同研究部門

概要

本研究部門では、興奮性膜のチャネルの活動を光学的方法で検出する目的で研究が続けられているが、本年度は、イカ巨大線維から旋光性変化を検出することに成功した。エビの神経での結果から予想されたように、この光学的信号は活動電位の立ち上り部に出現する短い経過の信号であった。一方、生化学的には、ラット脳からチャネル蛋白を抽出し、これについての光学的光学スペクトル（ラマン）を記録することができた。

SH 基修飾性試薬で染色した神経線維の旋光性シグナル

渡辺 昭（生理研）

神経線維の興奮の機序について、現在、一般に認められているものは、次のようなものと考えられる。神経線維を電気的に刺激すると、軸索膜の膜相内に埋もれているチャネル高分子がその形態を変化させ、その結果、膜の透過性が変化する。膜の透過性変化は、膜の起電力とインピーダンスの変化をひき起し、その結果、活動電位が発生する。以上のような興奮機序についての学説の一つの中心は、膜内高分子（チャネル高分子）の形態変化という仮定であるが、この仮定は、確からしいとはいっても直接に測定されたわけではなく、また、この考えが正しいとしても、形態変化の詳細については明らかにされていない。したがって、この形態変化を、電気生理学的手法とある程度独立した方法で検出することは、意味のあることと考えられる。

多くの高分子は、形態変化に伴って旋光性変化を起すので、旋光性変化は、高分子の形態変化の存在の直接的な証拠と考えられている。本研究においては、神経線維の興奮過程の分子の機序についての情報を得る目的で、SH 基修飾性試薬により染色された神経線維を用い、興奮に伴う旋光性変化の信号の誘導を試みた。

（方法） 用いた旋光測定装置については、昨年、の年報に詳述したものと同一のものを用いた。ただし、イカの巨大線維を用いた実験のさいには、偏光子を円偏光子から直線偏光子にかえ、また同時に光弾性モジュレータのレターデーションを、四分の一波長から二分の一波長にかえた。この変更の主な理由は、直線偏光子のほうが円偏光子に比して光学的により単純であるからである。図 1 に、この装置を蔗糖溶液によって校正した結果を示す。A は、Lock-In Amp の出力と、電圧変換器の出力との間に比例関係が成立していることを示す。これは、結局は、光検出器に入る光の強度と Lock-In Amp の出力とが比例することを示す。この比例係数を、かりに LQ

(Lock-In Quotient) と呼ぶことにする。Bは、LQ と、用いた蔗糖の濃度との間の比例関係を示す。蔗糖のかわりにサンプルとして果糖溶液を用いると、Lock-In の出力は反転する。これらの実験から、LQ と、サンプルの旋光性との間には比例関係が成立していることがわかる。蔗糖の旋光度は、波長の函数として正確に測定されているので (Lowry, 1935)、これを用いて LQ を旋光角に換算することができる。Cにおいて、500nm でこの換算を行ったさい、他の波長で LQ から推定した旋光角と、正しい旋光角との比較を示している。すなわち、用いられた旋光計は、波長をかえることによって正しい旋光角からのずれを生じ、その大きさは、100nm につき10%程度なる。したがって、正しい値をうるためには、各波長で、較正を行う必要がある。この誤差の主な原因は、偏光子の波長特性によるものと考えられる。

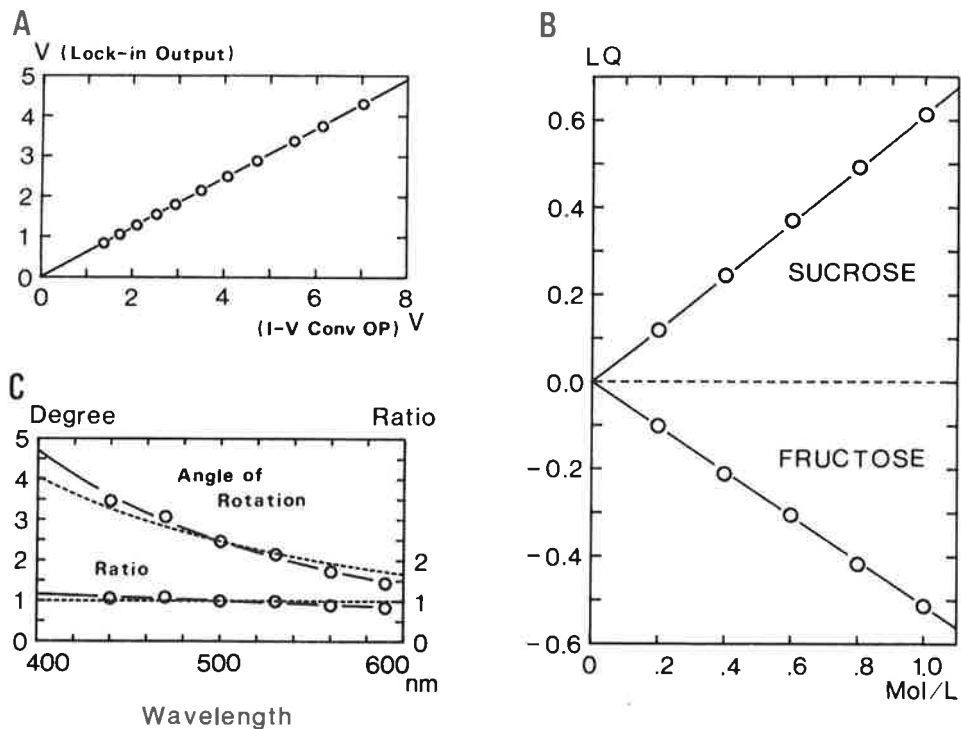


図1. 旋光計の較正。A. サンプルとして蔗糖溶液を用い、光源用ランプの電源電圧を変化させ、電流電圧変換回路の出力を横軸に、ロックインアンプの出力を縦軸にプロットした。B. ロックインアンプの出力を電流電圧変換回路の出力で割ったものをLQ(Lock-in quotient)と書き、蔗糖または果糖の溶液をサンプルとし、濃度に対してプロットした。C. 500nm で得られたLQを、蔗糖溶液の標準値 (Lowry, 1935) により角度に換算し、500nm 以外でのLQからの計算値と標準値とを比較し、使用した旋光計の波長特性を見たもの。上の曲線の白丸と実線は、実測よりの換算値、点線は標準値を示す。下の直線の白丸と実線は、測定値と標準値との比を示し、点線は、波長特性のない場合 (比が1) を示す。

以上の転正は、蔗糖溶液について行ったものであるが、神経線維を用いる場合には、神経線維の複屈折性に起因する大きな誤差がこれに加わる。もし、神経線維の光学的構造が一様で、複屈折性と旋光性とが混在しているとみなされる時は、複屈折性の影響は比較的少く、神経のレターデーションが 90° に及んでも、旋光性シグナルの大きさは60%に減少するのみである。もし、神経線維の構造が一様でなく、旋光性を持つ部分と複屈折性を持つ部分とが層状に重なるような構造を持つ場合には、旋光性シグナルの大きさは、複屈折性の大きさにより、一層強く影響を受け、レターデーションが 90° に及ぶと0となり、レターデーションが 90° を越えるとシグナルの方向は反転する。したがって、複屈折性のある材料を取り扱う場合には、シグナルの絶対値についての情報は、極めて限られたものとなる。しかし、シグナルの時間経過については、注意深く取り扱うとき、分子的变化についての正しい情報源となるものと考えられる。

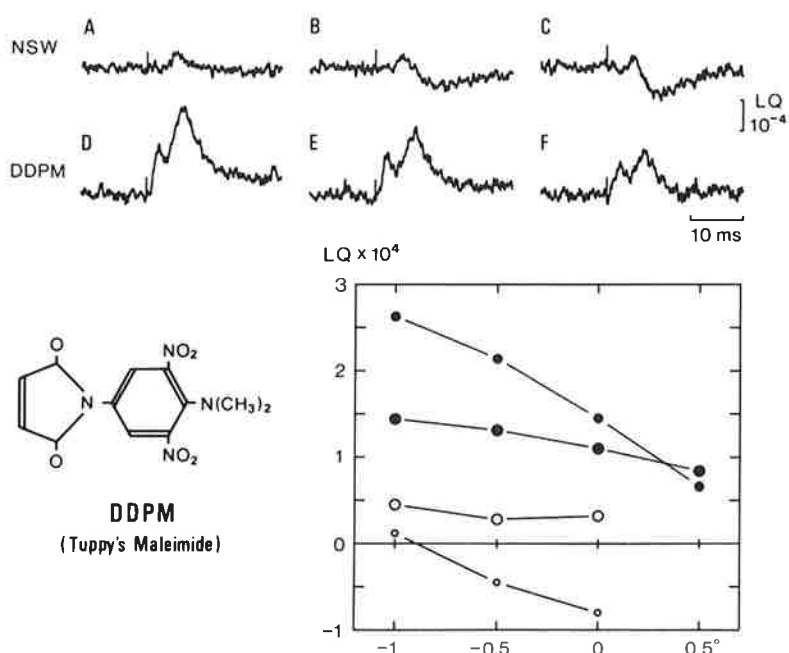


図2. 旋光性シグナルに対する染色の効果。材料は、エビの歩脚神経、色素はDDPMで、構造を左下に示す。A, B, Cは、染色前の旋光性シグナル。神経の長軸の方位角は、Aで -1° 、Bで -0.5° 、Cで 0° であった（ただし、方位角の標準は、光弾性モジュレータの振動方向にとり、検光子の透過軸の方位角は 0° にとった。また、マイナス値は、光に対し時計まわりの方向とした）。外液は自然海水。D, E, Fは、外液を、0.2mM DDPMを含む人工海水にとりかえたあとのシグナル、神経の長軸の方位角はそれぞれA, B, Cと同じ。14℃。下のグラフは、横軸に方位角をとり、縦軸に、シグナルの大きさをプロットした。白丸は染色前のデータで、大きな白丸は第1のピーク、小さな白丸は、刺激後14msでの値を示す。黒丸は染色後のデータで、大きな黒丸は第1のピーク、小さな黒丸は第2のピークを示す。

(結果) A. エビ歩脚神経線維より誘導される旋光性シグナル

エビ歩脚神経の旋光性シグナルは、染色しない材料を用いても得ることができるが、ある種の色素を用いて染色するとき、より大きなシグナルを得ることができる。図2に、SH基修飾性色素の一種、N-(4-Dimethylamino-3, 5-dinitrophenyl maleimide) (以後、DDPM と略称) で神経を染色したとき、ロックインアンプの出力変化のシグナル (L-シグナル) が変化する様子を示す。染色前のシグナルは、単一の小さいピークを持ち、神経の方位角を変化させるとき、シグナルの終りの部分の大きさと方向に変化が見られたが、はじめのピークは、ほとんど変化しなかった。したがって、はじめのピークの部分は、純粋な旋光性変化のシグナルであり、シグナルの終りの部分には、複屈折性のシグナルが重畳しているものと考えられる。外液を DDPM の溶液にかえ、約30分後に行った記録は、下のトレースに示されている。L-シグナルは、大きな二峰のシグナルとなり、神経の方位角を変化させると、第二のピークの大きさにある程度の変化が見られたが、第一のピークの大きさには、ほとんど変化が見られなかった。したがって、第一のピークは、ほとんど純粋な旋光性シグナルと考えられる。すなわち、DDPM による染色は、神経線維の旋光性シグナルを著しく増大させる。

B. イカ巨大神経線維より誘導されるシグナル

イカ巨大線維に見られる活動電位は、同じ温度でエビの神経に見られる活動電位よりはるかに速いので、これに伴う光学的シグナルも非常に速いものと考えられる。それ故、光学的測定は、すべて低温室内で行い、その温度を 0℃ 付近に設定した。ヤリイカの巨大線維を摘出し、周囲の細い神経繊維を、一對の柄つき針を用いて除き、光学用チェンバーに張った。光学用チェンバーは黒のプラスチックで工作したが、底に採光のための窓をあけ、これをカバーガラスで閉じた。照明された神経線維の長さは、約 6 mm であった。0.6M の KCl をつめたガラス毛细管電極を細胞内に刺入し、先端を照明部位の中央において膜電位変化を記録した。また、直径約 50 μ m の白金線を細胞内に刺入して細胞内刺激を行った。刺激電極の分極によって起るアーテファクトを避けるため、刺激電極は通常照射部位の外に置いたが、照射部位の中に刺激電極をおいた場合でも、今までの例では、刺激電流に直接由来すると考えられる光学的シグナルをみとめたことはなかった。

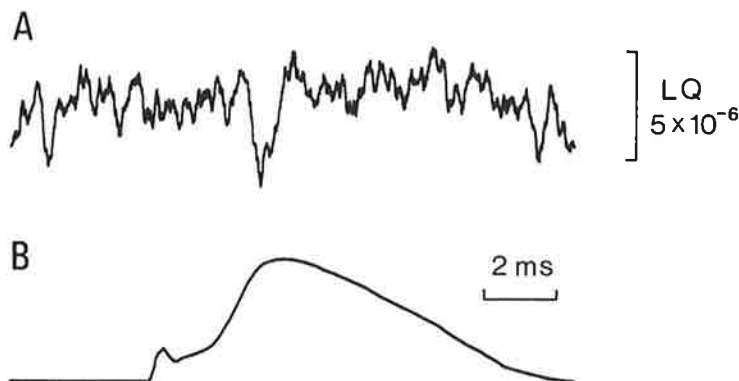


図3．イカの巨大神経線より誘導された旋光性シグナル。A．ロックインアンプの出力変化。蔗糖溶液による較正では、 $LQ \ 5 \times 10^{-6}$ は $9.0 \mu^\circ$ に相当し、上向きのは右旋性の増大を示す。ロックインアンプの時定数は $400 \mu s$ 。外液は $0.1mM$ DDPMを含む人工海水（Tris buffer, pH 7.9），外液の温度は $-1^\circ \sim -2^\circ C$ ，入射光の波長は $470, nm$ 積算回数は約24,400回である。B．細胞内活動電位。ピーク値は積算中に $110 mV$ から $70mV$ まで減少した。

図3に実験結果の一例を示す。活動電位の上昇期に、神経線維の左旋性が一時的に増加することがわかる。活動電位との時間的な関係を考慮するにあたっては、記録のさい、ロックインアンプの時定数を $0.4ms$ にとっていることを考えにいれる必要があるので、旋光性変化のピークは、ほぼ最大の立ち上がり速度の時点となる。

現在の条件下で見られる左旋性変化のピークは非常に時間経過が早く、おそらく、エビの神経において観察されている速い旋光性シグナルと同一のものではないと思われる。エビの神経でのシグナルは、信号は方向が一定していなかったが、イカの神経線維では、現在まですべて左旋性の増加として方向が一定していた。おそらく、エビの神経において方向がばらつく主な原因は、神経線維に内在する強い複屈折性のためと思われる。

このような速い旋光性変化に対応する膜内分子の形態変化が何か、という問題は最も重要であるが、電圧固定法・薬理学的方法により少しづつ解明してゆきたい。

Na⁺チャンネルのラマンスペクトル

Angelides, K. J. (フロリダ大), 寺川 進 (生理研)

神経が興奮する時には、細胞膜上のイオンチャンネルがその分子形態を変えることによって、イオン透過性を変えるのだと信じられている。しかし、実際にどのように分子形態を変えるのか

はまだ未解決の問題である。我々はこの問題に対する糸口を掴むために Na-チャンネルを精製しそのレーザーラマンスペクトルをとることを試みた。

Na-チャンネルの精製はほぼ Hartshorne と Catterall の方法に従った。30匹のラットから脳を取り出し、ホモジナイズ後遠心し沈渣を集め、これを低張溶液に露らしてシナプトゾームを得た。膜蛋白を Triton-X100 (TX) と phosphatidylcholine (PC) の存在下に可溶化し、DEAE-Sephadex カラム, hydroxylapatite カラム, WGA-Sephadex4B カラムを用いて精製した。最終段以外は全て蛋白分解酵素インヒビターの存在下で行なった。標本は TX, PC, N-acetylglucosamine を含んだ溶液として得られた。0.3mlの標本溶液をドラム型のキューベットに入れ日本分光 R-800型ラマン分光計にて514.5nm の波長を用い、1-4時間の測定によってスペクトルを得た。

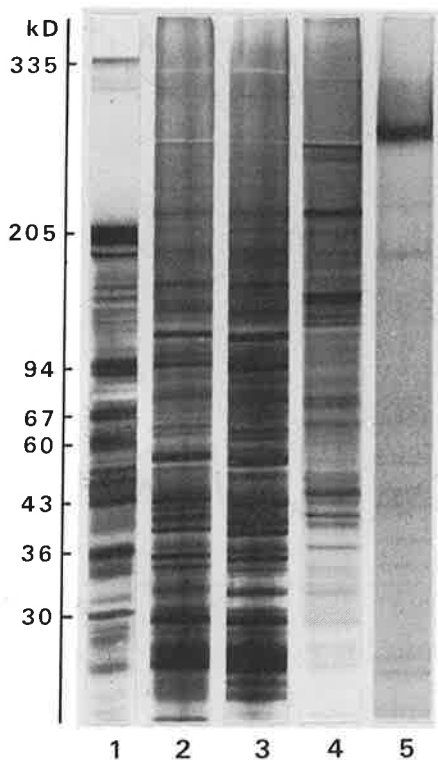


図1. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による蛋白成分の分析。

- 1, 分子量校正用の標準蛋白。
- 2, シナプトゾーム標本。
- 3, TX 抽出成分。
- 4, DEAE カラム溶出成分。
- 5, WGA カラム溶出成分。

縦軸は分子量 (キロダルトン) を示す。

Na-チャンネルの精製度は図1にあるように約95%程度であった。Catterallらのいう β -サブユニットは殆ど認められず、分子量約26万の単一バンドのみが認められる。この蛋白溶液のラマンスペクトルを図2のAに示す。溶液から Na-チャンネルだけを除いたもののスペクトラムが図2のBである。1060 cm^{-1} のピークはチャンネル蛋白を可溶化するために加えてある磷脂質の炭化水素に由来する。この両スペクトルを1642 cm^{-1} の水のピークを基準に正規化し、差を取ったものが図2のCのスペクトラムである。1638 cm^{-1} のアマイド I, 1427 cm^{-1} の C-H, 1225 cm^{-1} のア

マイド I I I, 1025cm^{-1} のトリプトファンまたはフェニルアラニン残基などが同定出来るように、ラマン分光法によって Na-チャンネルのコンフォメーション変化が追える可能性が示された。同じ標本に $1-10\mu\text{M}$ のテトロドトキシンを加えてみると、いくつかのピークが小さくなるような傾向がみられた。これは、Na-チャンネルがテトロドトキシンと結合した時にその構造をわずかに変化させることを示唆するものである。しかし、例外もあったので、得られた蛋白の毒素結合活性が低いためか、あるいはレーザーの出力不安定性があるためか、確かな結論は今後の研究を待たなければならない。今後、分光装置にコンピューターを接続してより S/N の高いシグナルを取り、チャンネルを活性化する薬物やアルカリカチオンの効果を調べる計画である。

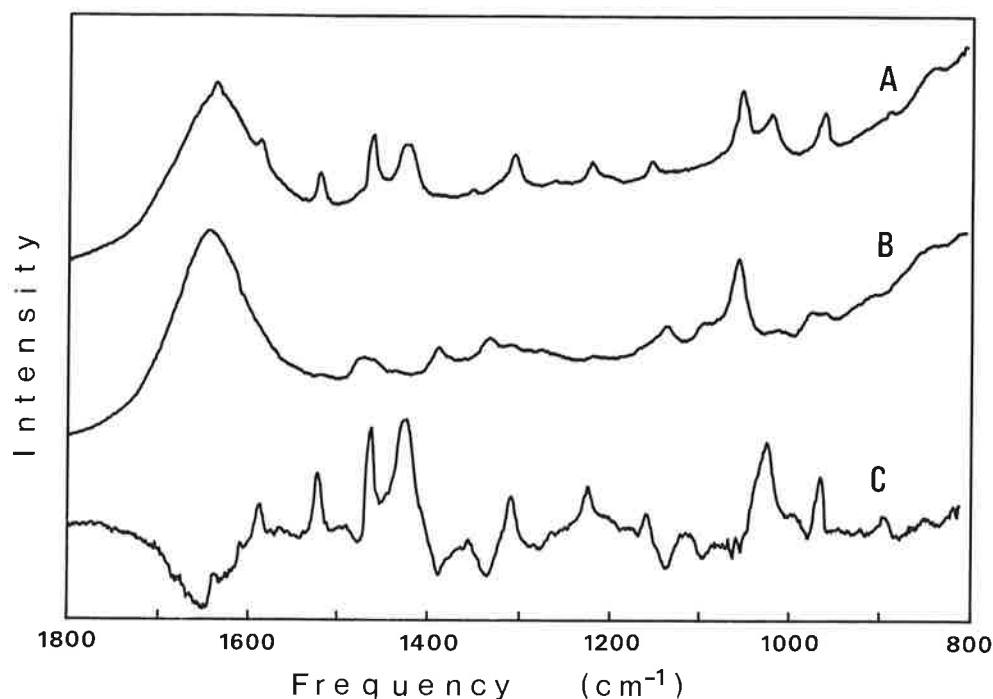


図 2. 精製された Na-チャンネルのラマンスペクトル。
A, バッファ溶液中の Na チャンネル。B, バッファ溶液のみ。
C, 正規化の後、A から B を差し引いたもの。

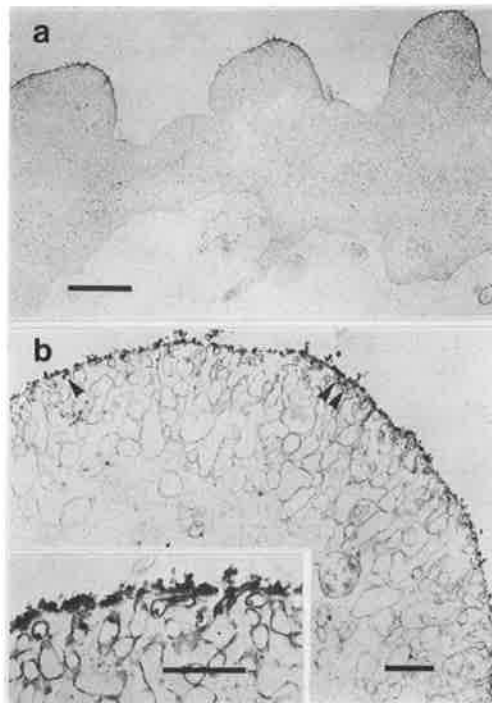
サソリ毒をもちいた, Na チャネルの組織化学

中山 孝, 古家園子 (生理研)

Na チャネルに特異的に結合し, 不活性化過程に作用するサソリ毒をもちいてデンキウナギ発電器官での Na チャネルの局在を調べた。

【方法】 サソリ毒を従来の方法により精製し, ビオチン・サクシイミドエステルと反応させることによりビオチン化サソリ毒を調製した。新鮮な発電器官の組織または凍結した組織より, スライサー, クライオスタットを用いて切片を調製した。切片をビオチン化サソリ毒とインキュベートした後, 結合しないサソリ毒を洗い去り, その後切片を固定した。ビオチン化サソリ毒の検出は, アビジン, ビオチン化ペルオキシダーゼ, DAB を組み合わせておこなった。

【結果】 図の a に見られるように同じ発電器官の細胞でも神経とシナプス結合している膜側だけにサソリ毒が結合しており, 他方には結合が全く見られない。また膜表面だけでなく, 内部へ向う陥入部の表面にも Na チャネルが存在することが観察された。(図 b の矢印および挿入図)



図の説明. a. 発電器官の Na チャネルは, 神経がシナプス結合している膜にしか存在しない。(スケール, $10\mu\text{m}$) b. 拡大写真 (スケール, $1\mu\text{m}$)

膜蛋白質の脂質 2 層膜への再構成

木村能章（生理研）

膜蛋白質を脂質 2 層平面膜に取り込む方法は、大別して 2 つ知られている。一つは 2 層膜を作る前に単分子膜の段階で膜蛋白質を取り入れておく事で、これはリポゾーム膜に再構成してこの懸濁液をチャンバーに入れておくと、水面に膜蛋白質を取り込んだ形で単分子膜が形成されるのを利用する。もう一方のチャンバーに脂質だけの単分子膜を作り会合させる。この時水面の膜蛋白質は、水相のイオン条件にも左右されるが、かなり方向が揃う事が知られている。もう一つは、脂質だけで 2 層平面膜を作って、後からリポゾーム膜や生体からのベジクル膜を融合させる。この時、リポゾーム膜を浸透圧で不安定にしておくか、脂質内のホスファチジルセリン (PS) と Ca^{2+} イオンの存在が融合を左右する事が知られている。リポゾーム膜が平面膜に吸着しても融和しない例が知られている（それでも見かけ上の応答が見える）。このように膜蛋白質の再構成・融合には、脂質の状態やイオン条件が重要な要素となる。これまで脂質の状態は、その流動性だけが調べられて来た。しかし、脂質極性部が大きい永久双極子モーメントを持っていたり PS のように電荷を持つものが重要な役割を果たす事から、電気的相互作用が重要な要素と考えられる。この事から、脂質 2 層膜極性部の誘電率を測定してみたところ、脂質流動性や Ca^{2+} などのイオン条件によって誘電率が 3—34 の範囲で大きく変化する事が見出された (図 1 a, 1 b)。この事は、更に重大な意味を帯びている。即ち、膜蛋白質が機能する時、膜内で蛋白質間やアミノ酸残基間で電気的相互作用をする時、その相互作用が、これらの局所誘電率を変化させるファクターによって 10 倍近く変化する事を示す。又、膜蛋白質又はその一部が、水相のものと作用する場合も同様の变化を受ける事になる。誘電率を一定と見なして静的な環境を想定して考えられて来たこれまでの生体膜の考えは、変更を求められるに違いない。

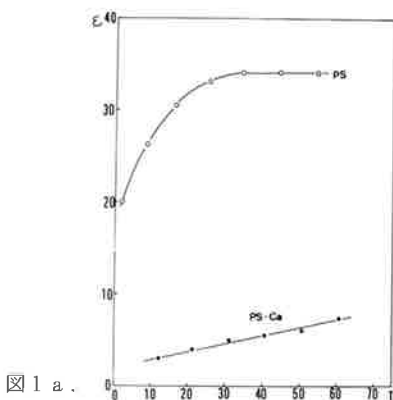


図 1 a.

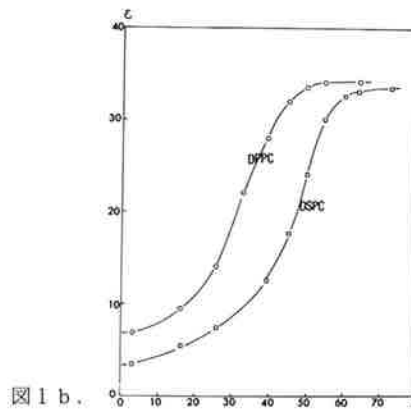


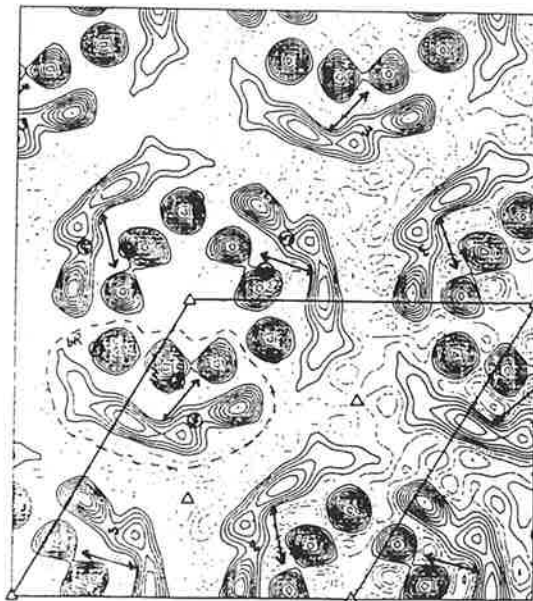
図 1 b.

紫膜の特定イオンサイトの研究

木村能章（生理研）

Nandini Katre, Robert M. Stroud, (University Colifornia, San Francisco)

紫膜は、高度好塩菌 *Halobacterium halobium* のプラズマ膜上の特定領域で、唯一種類の膜蛋白質と脂質で構成されている。この膜蛋白質は、視物質レチナールを持ち、光吸収後、哺乳類やイカ等の目で光吸収を担っている蛋白質ロドプシンと類似の光反応サイクルを示す。このことから、紫膜の蛋白質はバクテリオロドプシンと呼ばれている。好塩菌には、この他にレチナールを含む蛋白質としてハロロドプシン、スローロドプシンが存在する。これらは、好塩菌の中で光エネルギー利用の能動輸送や光センサーとして働いている事が示されている。レチナール蛋白質は、原生類のコナミドリムシ等でも、光センサーとして働いている事が知られるようになり、汎図及び汎重要性が認識されはじめています。筆者は、紫膜上に、ポリイオンが強く結合するサイトが2〜3つ存在する事を示し、このイオンを取ると青膜に変化する事、それに伴い特定の光中間体が消失する事を示して報告した¹⁾。更に筆者は、青→紫膜の再構成に於いて、 Ca^{2+} と2価重金属イオン Pb^{2+} で、滴定曲線が相同になる事を示した。紫膜は、バクテリオロドプシンが、2次元結晶状に配列している事から、結晶解析の手法を応用してその微細構造が知られているが、 Ca^{2+} 再構成膜、 Pb^{2+} 再構成膜でこの手法を使い、両者の差を調べる事により、それらのイオンサイトの決定に成功した（図1）。図中①、②、③は、滴定順になっている。興味深い事に、一番アフィニ



ティーの高いサイト①にイオンがついても、スペクトルの変化 (blue-purple transition) は起こらない。サイト②, ③が占められるとこの変化が起こる。但し, ②, ③両方がこの変化に必要なかどうかについては、疑問点が残っている。もう一つ重要な点は、②, ③が、蛍光法や中性子線回折³⁾を利用して決められたレチナールの位置のすぐ近傍に来ている事だろう。図中の直線がレチナールの位置を示す。

紫膜の機能は、光エネルギーを利用して水素イオンを能動輸送し、膜内外に電気化学ポテンシャル差を作る事だという事が示されている。サイト②, ③のイオンは、その能動輸送に積極的役割を担っているだろうか？ 筆者は、これらの特定イオンは、重要な役割を担ったアミノ酸残基（または、その集合）の対イオンだと考えている。対イオンとしての2次的影響が、観測されたスペクトル変化であり、O中間体の生成消滅を起し、能動輸送の停止に関与したものと考えられる。証明としては不十分だが、Gouy-Chapman理論で、blue-purple transitionの重要な側面を説明できる事が¹⁾、この考えを裏付けている。サイト②, ③の一次構造上の位置及び、その具体的役割の研究を予定している。

【文献】

- 1) Kimura, Y., Ikegami, A. and Stoeckenius, W. 1984 Photochem. Photobiol. 40: 641-646.
- 2) Kouyama, T., Kimura, Y., Kinosita, K. and Ikegami, A. 1981 J. Mol. Biol. 153: 337-359.
- 3) Jubb, J. S., Wordester, D. L., Crespi, H. L. and Zaccai, G. 1984 EMBO J. 3: 1455-1461.

能動輸送研究部門

概要

能動輸送部門はこれまでおもに Na, K-ATPase に関する研究をおこなってきた。これは ATP を利用する一次的能動輸送系のなかでも代表的な系であるからである。

Na, K-ATPase の研究はイオンの輸送機構の解明が最終的な目標でありすでにかんがりのことがわかってはいるがこれまでおこなわれてきた研究にもやりのこされた問題が少なからずあるように思われる。そのひとつは Na, K-ATPase の作用が重要な意味をもつ脳からの酵素の精製である。そこで種々の臓器から簡便かつ迅速に精製をおこなえるようなハフィニティークロマトグラフィー法を開発するため従来試みられなかった精製方法を検討した。

また上皮細胞の Na, K-ATPase は細胞を通過する能動輸送系の一部として生理的な意義をもつといえる。従って上皮細胞の極性が如何にして保たれているのか Na, K-ATPase がどのようにして細胞膜の一部に局在するのかという問題も能動輸送の研究の対象である。そのような研究に用いる目的でラット腎臓の Na, K-ATPase に対するモノクローン抗体を作製し性質をしらべた。

上皮細胞の能動輸送機構成分に対するモノクローン抗体

太田英彦（生理研・浜松医大）

目的：上皮細胞のように極性をもつ細胞は細胞膜が二つないしそれ以上のドメインにわけられ、Na, K-ATPase はそれらのドメインのうちのひとつに局在するとされている。膜蛋白質のそのような存在のしかたが如何にしておこるのか。その過程がどのような制御をうけているのかは現在おおきな関心をもたれている。膜蛋白質に対する抗体をもちいてその生合成、生構築過程をしらべることがこの問題を解明する手がかりとなるとおもわれる。

方法と結果：ラット腎臓の Na, K-ATPase を我々が簡略した Munson の方法で部分精製し、これにたいし Kohler & Milstein の方法によりモノクローン抗体を作成した。合計四株のハイブリドーマを得ていずれも腹水化することができた。これらのうち 0-1-33 と 0-1-41 は分子量約 5 万の蛋白質と結合し 0-1-23 と 0-2-88 は分子量約 10 万の蛋白質と結合した。これらの抗体の認識する抗原は種々のラット臓器にみいだされたが、ラット以外の動物の腎臓にも検出できた。0-1-33 と 0-1-41 および 0-2-23 と 0-2-88 は表に示した抗原の分布のちがいと ELISA 法の結果からそれぞれ異なる抗原決定基を認識していることが示唆された。ところがラット腎臓のミクロソームの膜蛋白質の一次元ペプチドマップをつくり抗体により染色したところ 0-1-33 と 0-1-41 および 0-2-23 と 0-2-88 はそれぞれきわめてよく似たパターン

をしめした。また0-1-33と0-2-88それぞれ結合した免疫アフィニティカラムをつくりラット腎臓のミクロソーム抽出物を分画するとカラムに特異的に結合する成分はそれぞれ0-1-41および0-2-23とも結合することが明らかになった。したがって0-1-33と0-1-41および0-2-23と0-2-88はそれぞれ同一分子の異なる部分を認識すること、およびそれらの抗原決定部位は一次構造上それぞれ比較的近接していることが示された。またヒト赤血球膜と結合する0-2-88をもちいて蛍光抗体染色しFlowCytometryにより測定するとこの抗体と反応する抗原は赤血球の外表にはないことがわかった。

0-1-41を除く三種の抗体はin vitroで極性を示すイヌ腎臓由来の培養細胞、MDCK細胞の細胞膜と結合することが免疫組織化学的に証明できたので今後この細胞をもちいて生合成の過程をしらべる予定である。

	Rat		Dog		Pig	Rabbit	Mouse		Human
	Kidney	RCM	Kidney	MDCK	Kidney	KNG 3	Kidney	RCM	RCM
0-1-33	+	-	+	+	+	+	+	ND	-
0-1-41	+	-	-	-	ND	-	<u>+</u>	ND	-
0-2-23	+	+	+	+	+	+	+	-	-
0-2-88	+	+	+	+	+	+	+	-	+

アフィニティークロマトグラフィーによる(Na⁺, K⁺)ATPaseの精製

福島義博, 中山 孝(生理研)

膜蛋白の精製は一般に、膜断片標品の可溶化後種々の分離操作をほどこすことによって行われる。しかし(Na⁺, K⁺)ATPaseの精製は多くの試みが報告されているにもかかわらずこの方法による精製は未だ成功していない。一方Jørgensenは、腎髄質外帯ミクロソームを、可溶化しない程度の低濃度SDS処理で活性化した後、蔗糖密度勾配ゾーナル遠心によって(Na⁺, K⁺)ATPase含有量の高い膜を集めた。この膜結合型精製法でも十分熟練すれば、ほぼ100%に近い純度を得ることが可能だとされている。しかし、この方法は出発材料の相対的(Na⁺, K⁺)ATPase密度が高いことが必須のため、ていねいに切り出された腎外帯に限って高度精製標品の調整が可能なのである。

そのため生物学的に興味ある、よりバリエーションに富んだ材料（例えば脳など）から任意に $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPase}$ を精製する一般的方法の開発が重要となってきた。本研究はこの目的のために、ウワバインをリガンドとして生物学的親和性を利用したクロマトグラフィーにより可溶性 $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPase}$ の精製法を確立しようとするものである。

粗膜分画の可溶性

哺乳動物腎、脳、または電気ウナギ発電器官から調整したミクロソームを、0.5 M NaCl, 1mM EDTA, 10mM HEPES（イミダゾールで pH7.0 に調整）存在下に 9 mM CHAPS 処理（水中）で可溶性化した。なおこの時ペプスタチン A、トリプシンインヒビター、ロイペプチンをそれぞれ $5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、および PMSF 0.1mM をも加えた。処理後 100,000 g で 1 時間遠心、上清を可溶性標品とした。可溶性化によって $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPase}$ の比活性は約 2 倍に増大する。

ウワバイン固定化樹脂の調整

アミノフェニールほう酸（PBA）と CN·Br 活性化セファローズ 4 B（ファルマシア）またはアフィゲル・10（バイオラッド）をカップルさせた。50% DMSO 洗浄により未反応ウワバイン及び非特異的吸着ウワバインを除去。pH8.5 でこの樹脂上の PBA をウワバインと結合飽和させる。ウワバイン結合量は $2-10 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ ゲルであった。あらかじめ PBA を結合させてある市販品（アミコン、シグマ）も使用可能である。ただしウワバイン結合量は表示されている PBA 基量の $1/10 \sim 1/20$ である。

アフィニティークロマトグラフィー

可溶性ミクロソームとウワバイン固定化樹脂を 1 mM MgCl_2 存在下 pH7.6（水中）で 30 分間インキュベートする。これをカラムに注ぎ込む。続いて 0.5 M NaCl, 0.9 mM CHAPS を含んだ HEPES (pH7.6) で洗う。洗浄は蛋白の吸収が無くなるまで徹底的に行う。これによってウワバインに親和性のない全ての蛋白は洗い出される。次にウワバインと結合した酵素は以下の 2 つの方法のいずれかによって、酵素・ウワバイン複合体の形で溶出される。

i) pH7.6 に保ったまま高濃度マニトールを加える。ウワバインはマニトールと置換されマニトールが PBA に結合する。ii) pH を 5.5 に下げると PBA とウワバインの結合が切断される。こうして回収された酵素・ウワバイン複合体を限外ろ過にかけ結合ウワバインを遊離させると活性な $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPase}$ が得られる。

結果

精製標品の SDS-PAGE は 2 つの蛋白染色帯しか示さなかった。それらの分子量は約 92,000 と 43,000 で、Jørgensen 標品で既に知られている $(\text{Na}^+, \text{K}^+)\text{ATPase}$ の α および β 鎖に相当する。比活性はミクロソームの約 10 倍に上昇した。しかし完全標品として期待される比活性の $1/6 \sim 1/7$ にすぎないので現在改良を進めている。おそらく収量増大が活性の保護になると思われる。従って高収量で種々の材料から本酵素を精製することが将来の目的である。

生 体 情 報 研 究 系

神 經 情 報 研 究 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研究課題とし、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。網膜は発生学的に見ても中枢神経系の一部であり、神経系における情報処理機構を研究するのに最も適した組織の一つである。網膜には6種類の神経細胞が3層に規則的に配列されており、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。当部門発足以来、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結果、完全とはいえないまでも、各網膜細胞の特徴や神経ネットワークの中における役割の概略を理解することが出来るようになった。

網膜研究における現在の最大の問題点は、網膜ニューロンの伝達物質を同定することにある。昨年度以来、われわれもこの問題を最重要課題として研究を行っている。金子と立花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、またさらに、パッチクランプの技術を応用して研究を進め、水平細胞が、赤感受性錐体および緑感受性錐体に対し、 γ アミノ酪酸 (GABA) 作動性のフィードバックシナプス結合を持っていることを明らかにした (Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1984)。この研究にはカメの網膜を用いたが、視細胞の同定に当たって、大塚が行ってきた錐体の油滴の色による視細胞のスペクトル感度の同定法 (J. Comp. Neurol. 印刷中) が重要な手掛りを提供した。

文部省在外研究員としてハーバード大学 (マサチューセッツ総合病院) へ留学中であった田内は、核酸染色性色素 DAPI で選択的に染色されたニューロンをさらに Lucifer yellow で細胞内染色する方法により、ウサギ網膜のアセチルコリン作動性ニューロンが極めて特徴的な形態を持っていることを突止め (Proc. R. Soc. B, 1984)、アマクリン細胞の機能と形態の対応を樹立する上で大きな貢献を行った。

カメ網膜視細胞の γ アミノ酪酸 (GABA) 感受性の分布と 細胞のサブタイプによる感受性の相違。

立花政夫, 金子章道 (生理研)

中心一周辺型受容野や、色対立型 (反対色型) 応答は、スペクトル感度の異なる視細胞とスペクトル応答の異なる水平細胞の特定のサブタイプとの間に、定まったシナプス結合が存在するた

めであると信じられているが、それを実証する実験事実は極めて少ない。水平細胞から視細胞へのフィードバックシナプスの存在を示唆するこれまでに報告されている最も有力な証拠は、Baylor (1971) らの実験である。彼らは、カメ網膜の水平細胞を電氣的に過分極すると、近傍の視細胞から、脱分極性の電位変化が記録できることを示したのである。

一方、水平細胞の一種ですべての波長の単色光刺激に対し過分極性の応答を示す单相性水平細胞はGABA作動性であることが、さまざまな報告によって示唆されている。そこで、われわれは水平細胞から錐体へのフィードバック仮説を確かめ、中心一周辺型受容野や、色対立型（反対色型）応答の起源を明らかにするためカメ網膜から単離した視細胞を標本として用い、GABA感受性の有無、その分布、また応答の性質などを分析した。

〔方法〕

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、カメの網膜にパパインを作用させて視細胞を単離し、実験に供した。暗順応したクサガメ (*Geoclemys reevesii*) の眼球を剔出し、6 unit/ml のパパインと 5 mg/ml のコラゲナーゼを含む溶液にインキュベートしたのち、網膜をピペティングして細胞を機械的に単離し、Concanavalin-A で表面コートした培養用シャーレに細胞浮遊液を移し、数時間静置して細胞がシャーレの底に付着するのを待って記録を行った。記録中は、15℃に保った灌流液 (NaCl 79, KCl 10, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1, グルコース 16, Hepes 2, 塩化コリン 37mM: pH7.4) を毎分約 2 ml、持続的に流した。細胞を位相差顕微鏡で観察し、パッチクランプ用電極を用いて whole cell クランプの条件下で記録を行った。ピペット内液の組成は KCl 120, EGTA 5, Hepes 10mM (pH7.4) で抵抗値は約 20MΩ のものを用いた。

抵抗値 300MΩ 以上のガラス微小電極に 1 M の GABA (pH4) を詰め、その先端を細胞表面のさまざまな部分に置いて通電し、電気泳動法によってこれを投与した。また、先端直径約 20 μm のガラス毛細管に既知の濃度の GABA を灌流液に溶かして詰め、これを細胞の近く (30~50 μm) に置いて、圧 (0.4 kg/cm²) を加えて投与した。

細胞の種類は大塚の観察にもとづき (Ohtsuka, J. Comp. Neurol., 1985: つぎの項, 「カメ網膜視細胞の色光感度」参照), 形態および油滴の色によって同定した。(表 1)。

Table 1. Morphological Features and Spectral Sensitivity of Turtle (*Geoclemys*) Photoreceptors

Color of the oil droplet		Spectral sensitivity
Single cones	red	red-sensitive
	orange	green-sensitive
	colorless (fluorescent)	red-sensitive
	colorless (non-fluorescent)	blue-sensitive
Double cones		
principal	yellow	red-sensitive
accessory	no oil droplet	red-sensitive
Rods	no oil droplet	scotopic spectral sensitivity

〔結果〕

赤色の油滴を持つ単一錐体（赤感受性錐体）はすべて高いGABA感受性を示した。圧投与法によって決定したGABAの最小有効濃度は $0.1\mu\text{M}$ であった。図1に示すように、GABAに対する感度は錐体小足部で最も高く、遠位端に行くに従って急速に減少した。すなわち、錐体小足部に比較して、軸索部では35％，細胞体部では13％，外節の付着部付近では1％以下であった。GABA感度が錐体小足部に局限しているため、細胞単離操作中に小足部が失われた細胞では極めて低いGABA感度しか観察されなかった。

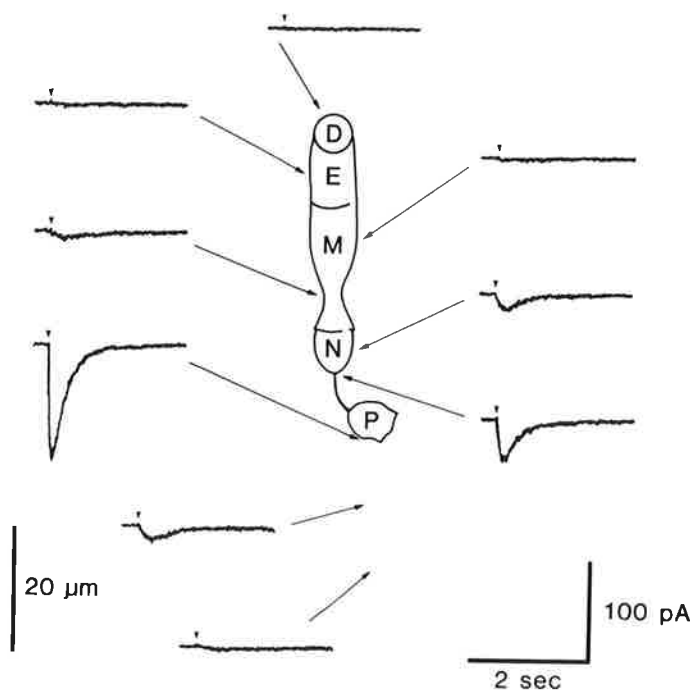


図1. 赤色の油滴を持つ単一錐体（赤感受性錐体）のGABAに対する応答。記録はパッチ電極を細胞体部にあてて、whole cellクランプ（電圧固定法）の条件下で行った。膜固定電圧は -60mV ，微小電極につめたGABAを電気泳動法的（5ミリ秒， 25nA の通電，ブレイキ電流 5nA ）に投与した。GABA電極を錐体小足部にあてて投与した際，最大の応答が得られたが，この際の投与量は最大応答を引き起す量の約 $1/3$ である。

- D. 油滴，
- E. エリブソイド，
- M. マイオイド，
- N. 核の存在する細胞体部，
- P. 錐体小足部．

GABA の投与量と応答の関係を図 2 A に示す。どの種類の細胞でも、応答の大きさは投与量（対数）にたいし S 字状の増大を示した。最低有効投与量（GABA 電極に流す通電量と時間との積）はほぼ等しく、約 0.01 nC であったが、最大応答量は細胞の種類によって異なり、赤感受性錐体と緑感受性錐体（オレンジ色の油滴を持つ錐体）が高く、青感受性錐体と杆体は低い値を示した。最大応答量によって細胞を分類した結果を図 2 B に示す。この図は細胞の最大応答量を 20 pA 単位にとり、個々の細胞をその最大応答量によって分類したものである。40 pA 以上の最大応答を示すものを高感度タイプ、40 pA 以下の最大応答しか示さない細胞を低感度タイプとすると、赤感受性錐体は（複合錐体の副錐体を除き）すべてのサブタイプで高い GABA 感受性を示し、緑感受性錐体も高感度タイプに分類された。一方、青感受性錐体と杆体は低感度タイプに分類された。

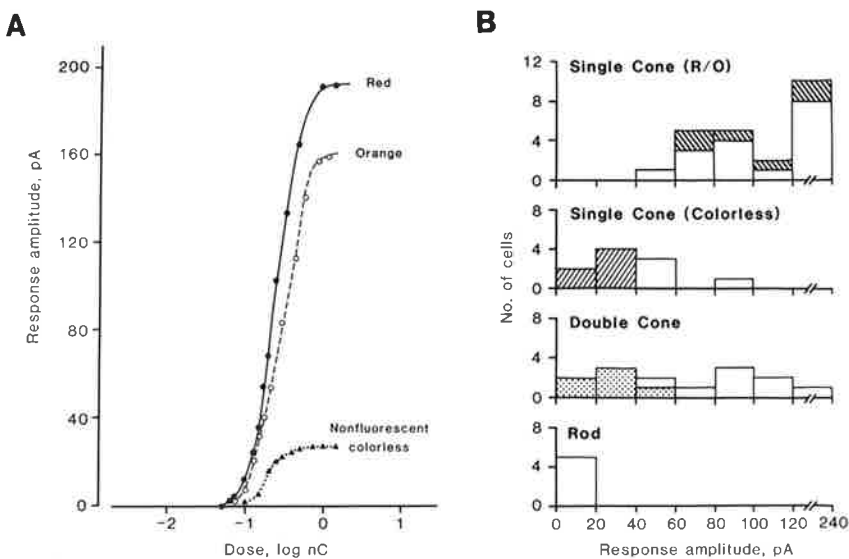


図 2 A. 3 種類の単一錐体に対する GABA の投与量一応答曲線。●赤色の油滴を含む錐体（赤感受性錐体），○オレンジ色の油滴を含む錐体（緑感受性錐体），▲非蛍光性無色の油滴を含む錐体（青感受性錐体）。どの細胞の場合でも GABA は錐体小足部へ投与した。投与量は GABA 電極へ通電量（電流値と持続時間の積）を nC 単位として対数表示した。B. 飽和量の GABA によって引き起こされた最大応答によって分類した GABA 感度ヒストグラム。各細胞の示した最大応答（20 pA 毎）によって細胞を分類し、その個数を示した。120 pA 以上の応答を示した細胞是一群として取り扱っている。最上段：赤色の油滴を含む単一錐体（赤感受性錐体），及びオレンジ色の油滴を含む単一錐体（緑感受性錐体，斜線）。第 2 段：無色蛍光性油滴を含む単一錐体（赤感受性錐体，斜線）及び無色非蛍光性油滴を含む単一錐体（青感受性錐体）。第 3 段：複合錐体（いずれも赤感受性錐体）の主錐体と副錐体（点を打ったもの）。最下段：杆体。

GABAによって引き起こされる応答は内向き電流であり、細胞を脱分極させるものであるから、水平細胞から視細胞へのGABA作動性シナプス抑制性がフィードバックシナプスであるとする考え方に反するように思われるかもしれない。パッチクランプ用の電極は先端開口部が大きく、そこから電極内のイオンが細胞内へ容易に拡散するため、whole cellクランプの条件下では、細胞内イオン濃度が急速に変化してしまう。そこで、GABAによって引き起こされる応答のイオン機構を明らかにし、in situの状態では、GABAが錐体に対しどのような作用を持つかを、次の2つの実験から考察した。まず第一に、応答の反転電位を求めた。コントロールの実験条件下での反転電位は $6.1 \pm 4.5 \text{ mV}$ であった。反転電位は外液のClイオン濃度に依存し、Clイオンをメタンсульホン酸で置換してCl濃度を10分の1に減少するとNernstの式から予測される通り、57 mV脱分極側へ移動した。従って、GABAはClイオンに対する透過性を選択的に増大させるものと考えられる。次に、電極内からClイオンが拡散して細胞内のClイオン濃度が上昇しない前にGABAを投与すれば、ほぼin situの状態に近いGABA応答を観察できるのではないかと考え、パッチ膜を破った直後からGABAを5秒毎に反復投与しながら応答がどのように変化するかを観察したところ、パッチ膜を破った直後には過分極性の応答が見られ、それが10~20秒で脱分極性に反転した。パッチ膜を破った直後の過分極性応答の反転電位は約 -45 mV と推定された。このことから、GABAは錐体に対し抑制性の効果を持つものと結論される。

〔考察〕

今回の観察は、カメ網膜水平細胞が赤感受性錐体と緑感受性錐体に対し、GABA作動性の抑制性シナプスを持つという仮説を支持するものである。すなわち、GABAはこれらの細胞に対し、 $0.1 \mu \text{ M}$ という低濃度で作用すること、作用部位が錐体小足部に局限していること、GABAが錐体に対し、抑制性過分極電位応答を引き起こすことなどの事実から、GABAが単相性水平細胞から放出される伝達物質である可能性が強く示唆される。水平細胞の突起は錐体小足部に陥入して双方向性のシナプスを作っており、GABA感受性が小足部に局限していることは、このシナプスの存在部位と良く一致する。

錐体から入力を受ける水平細胞には、単相性のスペクトル応答を示すタイプ、2相性のスペクトル応答を示すタイプ、3相性のスペクトル応答を示すタイプの3種類が存在することが知られており、それらが錐体と一定の結合関係を持つことによって特徴あるスペクトル応答が生じるものと考えられている(図3)。今回の実験結果はこのモデルの考えと良く一致しているが、このモデルによると、それらの応答は次のように説明される。錐体はいずれも光照射を受けない暗時に、脱分極しており、興奮性伝達物質(L-グルタミン酸であるとする説が有力である)が持続的に放出されており、これが水平細胞を脱分極させている。光照射を受けると錐体は過分極し、伝達物質の放出が減少する。これが水平細胞に脱促進的に作用し、過分極を引き起こす。単相性水平細胞は赤感受性錐体のみから入力を受けているので、そのスペクトル応答は赤感受性錐体のものと良く一致している。単相性水平細胞が赤感受性錐体へ負のフィードバックをしても、スペクトル応答は等しいので変化は起こらない。

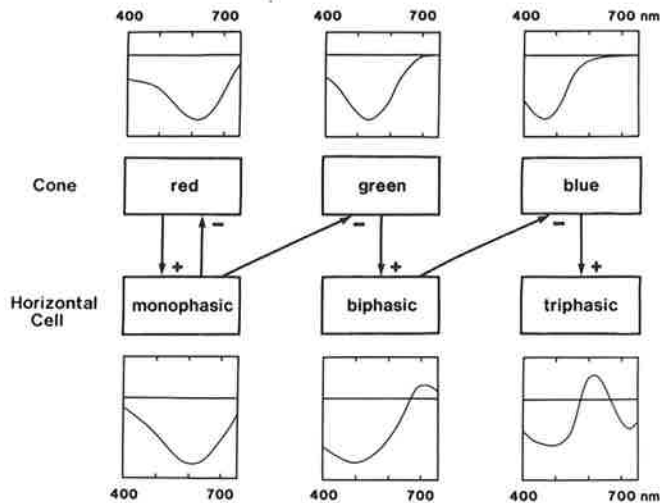


図3. カメ網膜外網状層のシナプス結合を示すモデル。矢印はシナプスの存在とその信号伝達方向を示す。+の符号はそのシナプスで信号の極性が保たれることを意味し、-の符号が信号の極性が反転するシナプスを表わす。細胞の上下に画いた曲線はそれぞれの細胞のスペクトル応答曲線（等光量子の単色光に対する応答振幅の包絡線）、横線は暗時の膜電位レベルを示す。スペクトル応答がこの線から下にあることは光応答が過分極性であることを意味し、上にあることは光応答が脱分極性であることを示す。信号の流れについては説明本文。

単相性水平細胞が緑感受性錐体へフィードバックすると、緑感受性錐体は光照射を受けない暗時に、（単相性水平細胞から持続的に放出された GABA によって）持続的な抑制効果を受け、弱い過分極状態にある。赤色の光照射に対し、緑感受性錐体自体は感度が低いので直接の作用は受けないが、赤感受性錐体が過分極し、それにとまって単相性水平細胞が過分極して GABA の放出が止まり、緑感受性錐体には脱抑制による脱分極が発生する。その影響が緑感受性錐体から 2 相性水平細胞へ伝達されてこれを脱分極させる。短波長光は緑感受性錐体を直接刺激し、これを過分極させ、それが 2 相性水平細胞に過分極性応答をもたらす。従って、2 相性水平細胞は短波長の光（青色光または、緑色光）に対しては過分極、長波長の光（赤色光）に対しては脱分極性の応答を示すことになる。2 相性水平細胞から青感受性錐体へのネガティブ・フィードバックと青感受性錐体から 3 相性水平細胞への興奮性入力によって 3 相性の応答が発生するものとされているが、2 相性水平細胞から青感受性錐体への伝達物質に関しては全く不明である。今後の研究に待たねばならない。

単相性水平細胞は近傍の同種の細胞と電氣的にカップルしているので、受容野が広い。単相性水平細胞から赤感受性水平細胞へのフィードバックによって、赤感受性錐体に中心周辺型の受容

野が形成され、これが、双極細胞など高次ニューロンへと伝達されて、これらのニューロンの受容野形成に役立っているものと考えられる。

カメ網膜視細胞の色光感度

大塚輝彌（生理研）

脊椎動物の網膜には、暗所で働く杆体と明所で働く錐体の2種類の視細胞がある。これらの視細胞は光刺激に対する応答様式と外節の形態が著しく異なるので、従来から多くの研究が行われてきた。一方、細胞内記録によって得られる赤・緑・青色光に感度の極大を示す3種の錐体は形態的特徴が乏しく、形の上から識別するのは困難であった。しかし、これらの錐体が形態学的に同定できれば、網膜における色光感覚の神経機構の解明が大きく前進することは言うまでもない。カメ網膜の錐体内節には種々の色の油滴が存在しており、顕微分光学的に各色の油滴と3種の錐体との関係が明らかにされてきた。最近さらに蛍光性油滴が発見され、この油滴を有する錐体は赤感受性であった（大塚，'84）。そこで、カメの視細胞の形態学的特徴、とくに油滴の有無・色と色光感度との対応関係を再度調べ直すことにした。

クサガメの錐体では吸収スペクトルの異なる5種類の油滴が知られており（藤本他，'57），これらの油滴は光学顕微鏡で容易に識別できる。そこで本研究では視細胞にガラス微小電極を刺入して色光応答を記録した後、蛍光色素を細胞内注入して視細胞の形態学的検索を行った。

〔方法〕

実験には暗順応または明順応したクサガメ（*Geoclemys reevesii*）の眼球杯標本を用いた。ガラス微小電極には5%のLucifer yellow (LY) 水溶液を詰め、視線状（visual streak）から約2 mm 背側に位置する視細胞に刺入した。スペクトル感度曲線を得るため、最大応答振幅が5 mV以上で、暗黒時の電位が安定している視細胞を選び、400nm から40nm 毎に700nm までの種々の単色光刺激（最大光子数： $1.4 \times 10^{12} / \text{cm}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ）を網膜全面に0.3秒間照射して視細胞の色光応答を記録した。杆体の記録では照射時間を0.6secにし、20nm 毎に単色光を照射した。各波長の感度は閾値（応答振幅：2—5 mV）に達するに必要な刺激光強度の逆数で求めた。この様にして得られたスペクトル感度曲線は視物質（ポルフィロプシン）の吸収曲線とクサガメの油滴の吸収スペクトル（藤本他，'57）から計算した『合成吸収スペクトル』と比較した。青、緑、赤視物質の最大吸収波長（ λ_{max} ）は各々460、520および620nm とした。

色光応答を記録した後、矩形波電流（3nA, 2Hz）を1—2分流してLYの細胞内注入を行った。注入を終えた網膜は色素上皮から剝離し、固定液（8%フォルムアルデヒドと10%アルコールを含む0.1Mの磷酸バッファー、pH7.4）に2—6時間に浸した。この網膜をスライドグラスに視細胞を上にして置き、LYを注入した視細胞は蛍光顕微鏡（励起光420nm）で、また油滴の有無

と色は可視光で観察した。さらにLYを注入した視細胞の細部を観察するため、網膜を脱水・包埋して厚さ10 μ mの縦断切片を作製した。52個の眼球から総数347個の視細胞の色光応答を記録して、LYの細胞内注入を行った。このうち、視細胞であることが形態学的に確認され、かつ最大の応答振幅が5mV以上の細胞、133個についてスペクトル感度曲線を解析した。

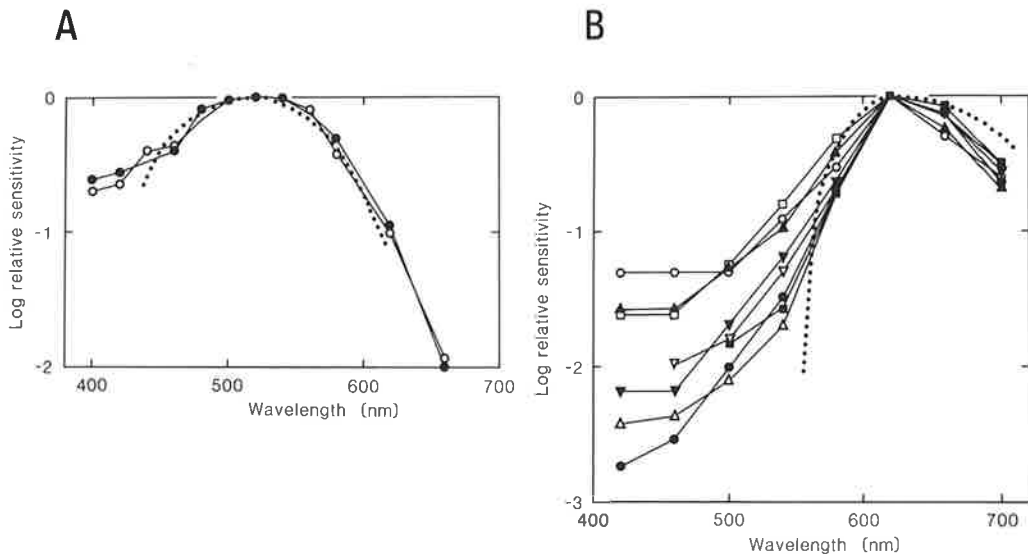


図1. A: 杆体のスペクトル感度曲線。2個の杆体から得られた曲線は感度極大が520nmにある緑視物質($\lambda_{\text{max}}=520\text{nm}$)の吸収スペクトル(点線)とよく一致した。B: 赤色油滴を有する単一錐体のスペクトル感度曲線。赤色油滴を有する9個の錐体はすべて620nmに感度の極大を示す赤感受性錐体であった。点線は赤視物質($\lambda_{\text{max}}=620\text{nm}$)と赤色油滴の吸収スペクトルから求めた合成吸収スペクトルを示す。540nm以下の短波長側では細胞によって大きな感度の違いが見られる(本文参照)。

〔結果〕

クサガメの視細胞は油滴の有無と色から7種類に分類される(表1)。杆体には油滴がなく、単一錐体には赤色、薄緑色、橙色、無色の4種の油滴が存在する。複合錐体の主錐体には黄色の油滴があり、副錐体には油滴が無い。薄緑色油滴は自家蛍光がある上に、無色油滴より大きいので可視光でも区別できる(大塚, '84)。これらの油滴の色と大きさは固定した網膜標本でも何等変化が見られなかった。

Morphological Type					Spectral Type		
Oil droplet							
	Color	λ_1 (nm)	Diameter (μ m)	Density (%)		λ max (nm)	Cell No.
Rod	None			10	Rod	520	19
Single cone	Red	572	8.5 $\pm$ 0.3	19	Red	620	51
	Pale-green	413	7.3 $\pm$ 0.4	10	Red	620	9
	Orange	530	7.4 $\pm$ 0.4	13	Green	540	14
	Clear	-	5.6 $\pm$ 0.4	6	Blue	460	3
Double cone							
Pr. memb.	Yellow	495	7.0+0.2	21	Red	620	22
Acc. memb.	None			21	Red	620	15

表1. クサガメの7種類の視細胞の形態学的特徴と色光感度。 $\lambda_1/2$ は油滴の吸収スペクトルの1/2吸収波長(藤本他, '57)を示す。油滴の直径は視線状から2mm背側に位置する錐体のものを計った。各値は30個の錐体の平均と標準偏差を表す。密度は同じ部位の0.047mm²内にあった全ての視細胞数を百分率で示した。複合錐体の主および副錐体は別々に数えた。全視細胞数は1mm²当たりに換算して11000個である。得られたスペクトル感度曲線のピーク波長とその細胞数を右端に示した。

暗順応した網膜から19個の杆体応答を記録し、LYを注入した視細胞には油滴が見られず内節から直径約4 μ mの太い突起が外顆粒層にのびて軸索終末を形成していた。スペクトル感度曲線のピーク値は520nmにあり緑視物質(λ max=520nm)の吸収スペクトルと良く一致した(図1A)。一方、明順応した網膜から77個の単一錐体の応答を記録し、LYを細胞内注入して含まれている油滴を観察した。最も多く得られたのは赤色油滴を有する錐体であった。スペクトル感度曲線のピーク値は620nmにあったので、錐体外節には赤視物質(λ max=620nm)が存在していると考えられる(図1Bの実線)。この錐体では入射光の短波長成分が外節に到達する以前に赤色油滴によって大半に吸収される。そこで赤視物質と赤色油滴の各々の吸収スペクトルから『合成吸収スペクトル』(図1Bの点線)を計算して、これと視細胞から得られたスペクトル感度曲線と比較した。細胞によって短波長側に感度の大きな差がみられるは、照射光の角度が錐体の光軸から外れるため油滴を通過する距離が異なる為であろう。この現象は杆体のスペクトル感度曲線には見られなかった。

10個の錐体には薄緑色油滴があった。この油滴はわずかに薄緑色に色付いており、無色油滴と比べて直径も大きいので容易に区別がついた。この視細胞のスペクトル感度曲線のピーク値は620nmにあった。赤視物質(λ max=620nm)と薄緑色油滴(遮断波長=404nm)より得られた合成吸収スペクトルの半値幅は180nmであるが、得られたスペクトル感度曲線の半値幅はそれより狭く110nmであった。短波長側では感度の低下が見られるのは網膜や錐体自体による自己吸収が関係するものと考えられる。一方、橙色油滴(遮断波長=506nm)の吸収スペクトルは緑視物質(λ max=520nm)のピーク値と重なるため、計算上では視物質と油滴の合成吸収スペクトルの

吸収極大が長波長に移動して540nmになる。実際、14個の橙色油滴を有する単一錐体から得られたスペクトル感度曲線のピーク値は540nm（11個）と580nm（3個）の2群に分かれた。スペクトル感度曲線の半値幅（60nm）は合成吸収スペクトルの半値幅（80nm）と近い値を示した。さらに、無色の油滴は全ての可視光を通過するため、記録した3個の錐体のスペクトル感度曲線は青視物質（ $\lambda_{\max}=460\text{nm}$ ）の吸収スペクトルとほぼ一致して、ピーク値も同じ460nmにあり、半値幅も同じく約75nmであった。

37個の複合錐体の記録のうち、22個は主錐体から15個は副錐体から得られた。複合錐体の一對になっている2つの錐体が同時に細胞内染色された例が見られなかった。LYを注入した主錐体は副錐体に沿って半月状の蛍光体として観察された。縦断切片像でもLYが複合錐体の片側の錐体のみ注入されていることが確かめられた。主錐体のスペクトル感度曲線のピーク値は620nmにあった。黄色油滴の遮断波長は474nmなので、この視細胞のスペクトル感度曲線には影響せず、外節には赤視物質が存在していると考えられる。半値幅は115nmで視物質と油滴の吸収スペクトルから計算される合成スペクトルの半値幅（180nm）よりやや狭かった。副錐体のスペクトル感度曲線のピーク値は620nmにあった。従来の報告とは異なり、副錐体には明らかに赤視物質が含まれていることを示唆している。

【考察】

本研究によってクサガメの7種類の視細胞は1種類の杆体と3種類の錐体から成ることが明らかになった（表1）。赤感受性錐体には4種類の錐体があり、全視細胞数の70%を占めていた。同じ620nmに感度極大のある赤感受性錐体にも油滴のある錐体とない錐体があり、さら遮断波長が異なる赤色、橙色、薄緑色の3種の油滴があることから、カメの赤感受性錐体は短波長側のスペクトル感度の異なる錐体から構成されていることになる。すなわちスペクトル感度曲線の、(1)広い錐体（複合錐体の副錐体と薄緑色油滴の錐体）、(2)中位の錐体（複合錐体の主錐体）、(3)狭い錐体（赤色油滴を有する錐体）の3群に分けられる。このような赤感受性錐体の分化とカメの色識別機能との関係については今後の課題である。

本研究は従来の定説を覆す2つ事実を明らかにした。薄緑色と無色の油滴を有する錐体は共に青感受錐体と考えられてきたが、前者は赤感受性であることが明らかになった。さらに、複合錐体の副錐体は緑感受性錐体であると信じられてきたが、本研究から赤感受性錐体であることが明らかになった。これらの誤りは、細胞の形態学的同定が不完全であったことによると考えられる。また複合錐体の主錐体と副錐体との間にgap結合を通して両者が電氣的に結合していると考えられてきたが、(1)主または副錐体に注入したLYが対になっている錐体に拡散しない、(2)主および副錐体は共に赤感受性である、(3)この両方の錐体から緑感受性錐体の記録がとれない等から複合錐体を構成する一對の錐体はお互いに電氣的結合がない赤感受性錐体であることが明らかになった。さらに複合錐体から赤色光と緑色光の両方に応答の極大を示す2峰性のスペクトル応答の記録が得られたという報告は2次ニューロンの変位双極細胞からの記録であることがわかった。

本研究によって色光感度の異なる3種の錐体は形態学的に明確に同定することが可能になった

ので、今後この結果を利用して網膜における色情報抽出の神経機構が明らかにされるのであろう。

〔文献〕

Fujimoto, K. et al. (1957)

Spectral transmittance of retinal colored oil globules reexamined with microspectrophotometer. Jpn. J. Physiol. 7: 339-346.

Ohtsuka, T. (1984)

Fluorescence from colorless oil droplets: A new criterion for identification of cone photoreceptors. Neurosci. Lett. 52: 241-245.

Ohtsuka, T. (1985)

Spectral sensitivities of seven morphological types of photoreceptors in the retina of the turtle, *Geoclemys reevesii*. J. Comp. Neurol. 237: 145-154.

Ohtsuka, T. (1985)

Relation of spectral types to oil droplets in cones of turtle Science. (in press)

脊椎動物網膜のコリン作動性アマクリン細胞の形態とその機能について

田内雅規（生理研）

ほとんどの脊椎動物網膜にはアセチルコリン（ACh）の存在が証明されており、それが網膜で合成されること、及び光刺激によって放出されることなどの事実からAChが網膜内の情報伝達に関わる神経伝達物質の一つであることは確実である。最近、ウサギの網膜ではAChによって神経節細胞が直接に駆動され、そのいずれもが光刺激の特に動きに対してのみ反応する性質を持つものであることが知られた。このようにその司る生理的役割が明確であるシナプス前細胞と後細胞の対を得たことは、特に機能分化の著しい網膜近位部ニューロン網の干渉を解析するに当たり極めて重要な機会であるといわざるを得ない。しかしながら、コリン作動性ニューロンの細胞種や形態は明らかでは無いし、また標的細胞と目される特定の神経節細胞についてもその形態は十分知られていない。最近、我々はコリン作動性の細胞の形態を明らかにするための手段を開発したのでここではそれについて報告する。

DNA 染色性の蛍光色素である 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI) は *in vivo* でウサギ網膜の神経節細胞層及び内顆粒層中にある一群の細胞の核を標識するが、この色素を取込む細胞が ACh 合成能を有し、且つ視神経からの逆行性色素輸送によっては標識されないこと等から DAPI は選択的にコリン作動性のアマクリン細胞（ACh 細胞）を標識する事が明らかになった。このように DAPI で標識された ACh 細胞の核は蛍光顕微鏡下で視認出来るので、拡散性の色素（lucifer yellow CH）を充填した硝子微小電極による刺入染色が可能である。この実験は生体標本

を用いた場合にも勿論，可能であるが，細胞体の大きさが $10\mu\text{m}$ 以下であることや，灌流による標本の揺れ等の為に多数の細胞に色素注入を行うという点に於て能率の低いものであった。それらの理由で我々が代わりに用いた方法は，生体標本に変えてアルデヒドで固定した組織を用いその中にある標識細胞に色素注入を適用するというものであった。

網膜を *in vivo* で DAPI によって標識し，2%パラフォルムアルデヒドと0.01%グルタルアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液中にて約1時間固定した後，標本は0.1Mリン酸緩衝液中にて低温下で色素注入まで保存した。この様な条件で固定された標本は長期間の保存に耐え DAPI 標識細胞はほとんど褪色しない。微小電極による細胞への刺入は組織の硬度が増すこともあり比較的容易に達成できた。固定細胞の細胞体へ圧力で注入された色素は拡散に時間を要し樹状突起の極く先端部までを染色するのは容易ではなく，もっぱら電気泳動法を用いた。この方法により色素の細胞内での移動が蛍光顕微鏡直視下で短時間の内に観察でき，過不足なく完全な細胞染色を達成することができた。一般に色素注入に要する時間は5—10nAの電流を用いた場合，3—5分であった。この注入法を用い網膜中心部から周辺部に至るまで系統的に約1200個の DAPI 細胞に lucifer yellow CH を注入しその形態を観察した。

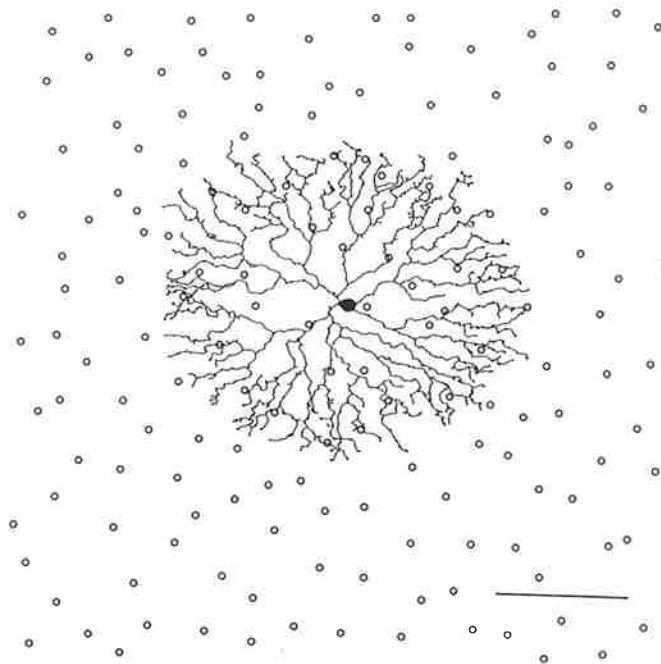


図1．拡散性蛍光色素 (lucifer yellow) によって染色されたコリン作動性アマクリン細胞の形態を whole-mount 標本で見たもの。周辺の白丸は同様な形態を有する細胞の網膜上での分布をその細胞体の位置で示してある。樹状突起は極めて効率よく網膜面を覆いその拡がりほぼ円形である。校正バー： $100\mu\text{m}$ 。

その結果、網膜中心部 (visual streak) に於いて細胞の樹状突起の広がり是最小で約 $230\mu\text{m}$ 、一方周辺部では $800\mu\text{m}$ を越えるものであることが分った。これらの多数の染色細胞の形態を網膜中心部から周辺部に至るまで連続的に分析した結果、その大きな樹状突起の広がり差にもかかわらず、DAPI 標識細胞は基本的に同一の特徴を持つことが明らかになった (図-1)。すなわち、これらの細胞はほぼ円形の樹状突起の広がりを持ち、2-7本の一次樹状突起は4-5回分枝し約80本の終末樹状突起を得た。この頻繁に分枝する樹状突起は互いに重なりあうことなく極めて効率良く網膜の面を覆っていた。また、樹状突起の内網状層中における分布は2-4 μm の網膜の各層に平行な薄い面に局限されていた。このような形態を持つ細胞が内網状層を挟みそれぞれ内顆層と神経節細胞層に鏡像の関係で配列していた (図-2)。

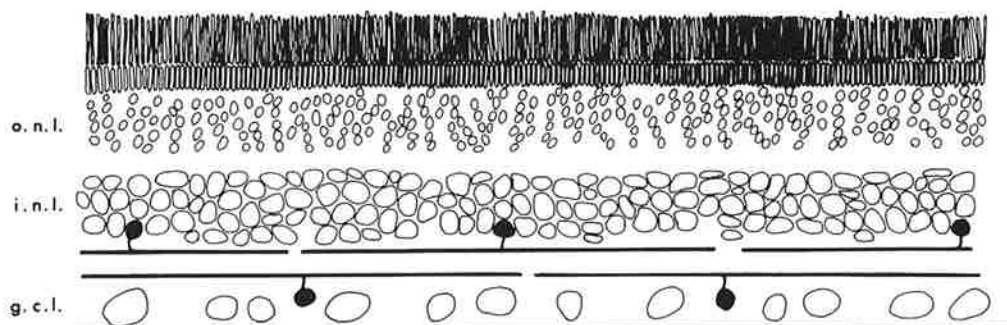


図2. コリン作動性アマクリン細胞の分布を網膜縦断面像として見たもの。内網状層を挟みそれぞれ神経節細胞層と内顆粒層に細胞体を持つものが鏡像の関係で対峙している。

DAPI 標識細胞から知られる ACh 細胞の密度と色素注入により明らかにされるその形態を組合せて、ACh 細胞の coverage factor (ここでは網膜上のある点をよぎる細胞の樹状突起野の平均数)を知ることが出来るが、この細胞の場合それは少なくとも30以上と網膜ではいまだかつて知られていないほどの高い値を示した。一方、アマクリン細胞ではその樹状突起上で入力と出力が極めて近傍に位置しているのが特徴で、信号伝達に際しては必ずしもそれは突起上を広く伝播する必要がなく、この種の細胞の電気的活動は樹状突起上の狭い範囲に局限されている可能性が強い；即ちこの種の細胞に於て反応のユニットは細胞全体ではなく、ある局限された範囲の樹状突起上に留まる (local subunit)。この考え方に基づくならば、ACh細胞は小さな受容野を持つ視細胞、双極細胞からの高分解能光イメージを伝える信号を多数の同細胞の樹状突起上で損うことなく受け取り、且つ強力に標的神経節細胞に送り出しているものと想像され、一般には分解能を下げるように働くと考えられる大きな coverage も実はそうではなく密な神経叢を形成するのに役立っているものと思われる。

〔参考文献〕

- 1) Masland, R. H. Acetylcholine in the retina. (1980) In Neurochemistry of the retina.

(ed. N. Bazan & R. R. Lolly), pp. -501-518 Oxford: Pergamon Press.

- 2) Ariel, M. & DAW, N. W. Effects of cholinergic drugs on receptive field properties of rabbit retinal ganglion cells. *J. Physiol., Lond.*, **324**: 135-160(1984).
- 3) Tauch, M. & Masland, R.H. The shape and arrangement of cholinergic neurons in the rabbit retina. *Proc. R. Soc. Lond B.* **223**: 101-119(1984).
- 4) Tauchi, M. & Masland, R. H. Local order among the dendrites of an amacrine cell population. *J. Neurosci.* (*in press*)

液性情報研究部門

概要

当研究部門では、現在中枢神経系における情報処理の基礎と考えられる局所回路の解明を主なテーマとして研究を進めている。特に局所回路の重要な構成要素である抑制性介在ニューロンの形態学的、免疫組織学的、生理学的手法による解析を海馬皮質、嗅球を中心として行なっている。昨年は海馬皮質における抑制性ニューロンと思われるnon-pyramidal cells間の電気的カップリングの場であるギャップ結合の存在の証明、及び支持細胞であるグリア細胞の超高压電顕を用いた三次元構造の解析を行なった。本年度は、更に抑制性ニューロンの解析を進め、海馬歯状回の顆粒細胞のスパイク発生部位への多数のGABA系入力の見出、海馬におけるGABA系抑制ニューロンの一部がcholecystokinin octapeptide (CCK-8), vasoactive intestinal polypeptide (VIP)等のペプチドを含有していることを明らかにした。更に、現在、海馬内の錐体細胞および顆粒細胞と局所回路ニューロン間の結合を調べる目的で、海馬切片を人工液中で生かしながら、電気生理学的に固定した神経細胞内にHRPを注入することによって、単一細胞の軸索投射およびそのシナプスの微細形態を明らかにする実験を行なっている。

ラット歯状回の顆粒細胞軸索初節部へのGABA系シナプス

T. Kosaka, K. Hama, J.-Y. Wu

ニューロンでの興奮発生の制御、特に抑制系の作用部位については従来非常に単純に、細胞体の上であると考えられてきた。しかし、我々が以前に報告した海馬皮質錐体細胞をはじめ大脳皮質の錐体細胞等で、スパイク初発部位そのものである軸索初節部 (IS) への抑制性入力が見出された。同様の抑制性入力が歯状回の顆粒細胞でも見出され、更にそれらの電顕的連続切片法及びそれからの再構築による解析、伝達物質の免疫組織化学による同定を行なった。

顆粒細胞の細胞体は4～7層が密に集まって顆粒細胞層をつくり、その細胞体の上極から数本の樹状突起が分子層に延び、下極からISが顆粒細胞層を貫くように多形層へと延びる。上下に重なり合う10個ぐらいの細胞体から出たISは集まって束を形成し、顆粒細胞層内で円柱状の領域として認められ、多数のシナプス終末がこの領域でIS上に対称性シナプスをつくっていた。連続切片法による解析により、顆粒細胞層上部の細胞では細胞体上に100～200、IS上に50～100ぐらいのシナプス、下部ではそれぞれ減少し、最下部の顆粒細胞では、ともに20ぐらいであった (図1, 表1)。GAD免疫細胞化学では、GAD陽性シナプス終末が顆粒細胞層に多数みられ、それらは細胞体上及びIS上の対称性シナプスをつくっている終末に一致した。以上より、顆粒細胞にお

いてはISも重要なGABA抑制性入力の場合であること、細胞体の層での位置によりGABA系入力の量が非常に異なることが明らかとなった。更に、他のニューロンと比較すると脊髄の運動ニューロンでは軸索初節部には抑制系を持たず、小脳のプルキーニユ細胞ではこの部位に電氣的抑制が考えられている。このようなスパイク初節部位における抑制系の差がどのように機能に関係しているかは今後の問題である。

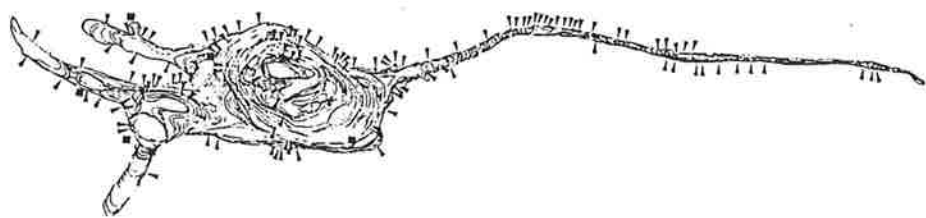


図 1

表 1

Number of synapses on granule cell soma and initial portion of axon

granule cell	soma			axon IP		
	total	symmetrical synapse	asymmetrical synapse	total	symmetrical synapse	asymmetrical synapse
A	186	143	43	90	89	1
L	98	94	4	47	47	0
F	70	57	13	34	34	0
I	24	19	5	16	15	1

ラット海馬皮質におけるCCK-8及びVIP免疫陽性GABAニューロン

T. Kosaka, K. Kosaka, K. Tateishi, Y. Hamaoka, N. Yanaihara, J.-Y. Wu., K. Hama

GABAは海馬皮質における主要な抑制性伝達物質であり、従来の特異的GABA合成酵素であるGlutamate Decarboxylase (GAD)に対する抗体を用いた免疫組織化学的方法により、GABAニューロンについて、その形態及び分布等が明らかとされている。一方、近年、多数のペプチド

が中枢神経系に含有されていることが明らかとなり、その個々のものについて分布も解明されている。海馬皮質においては特に、CCK-8, VIP, somatostatinが多く、それらが内在性のニューロンに含まれていることも明らかとなった。これらのペプチド含有ニューロンは、いわゆる介在ニューロンと思われる non-pyramidal cells であり、形態学的には GABA ニューロンに類似している。

このような形態学的類似は、これらのペプチドと GABA が同一ニューロンに含有されていることを示唆し、これを明らかにするために、GAD, CCK-8, 及び VIP に対する抗体を用い、免疫組織学的検討を行なった。

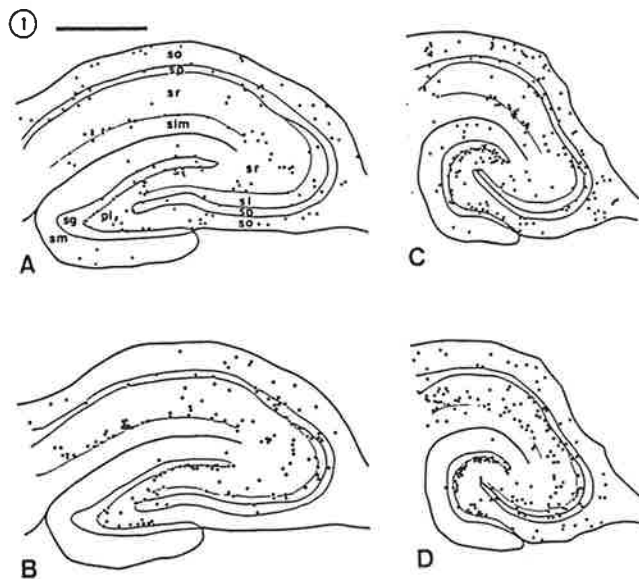


Fig.1 Camera lucida drawings of 40 μ m thick sections of dorsal (A,B) and ventral (C,D) parts of the hippocampus and dentate gyrus cut perpendicular to their long axes. To compare directly B and D with A and C, total numbers of cells in B and D are adjusted by superimposing some sections. Scale bar = 500 μ m.

A, C: GAD immunoreactive perikarya (dots) exposed to a cut surface. Triangles indicate perikarya immunoreactive for both GAD and CCK-8.

Total numbers of immunoreactive cells in A and C are 153 (so 41; sp 17; sr + slm 52; dentate gyrus 43) and 192 (so 56; sp 22; sr + slm 47; dentate gyrus 67), respectively.

B, D: CCK-LI perikarya (dots) derived from 2 (B) and 5 (D) adjacent sections, respectively. Total numbers of immunoreactive cells in B and D are 150 (so 15; sp 25; sr + slm 75; dentate gyrus 35) and 194 (so 31; sp 23; sr + slm 94; dentate gyrus 46), respectively.

ラットを灌流固定後、40 μ mの連続したスライスを作成し、それぞれを異なった抗体による免疫組織化学を行なった。二つの連続したスライスの相対応する面を比較することにより二つのスライスに分割される同一ニューロンが二種の異なった抗体で陽性か陰性が判定できた。その結果、CCK-8陽性ニューロンは、すべてGABAニューロンであること、及び前者は後者の約10%を占めていることが明らかとなった。Fig.1, および Tables 1,2 に示すように GABA ニューロンと CCK-8 ニューロンの分布はやや異なっている。これを更に解析すると、Tables 3,4 で示すように、CCK-8 陽性の GABA ニューロンは、歯状回、CA1, CA3野等の部位による差はほとんどないが層による著しい差がみられることが明らかとなった。

また、他のペプチド VIP についても、その約40%が GABA ニューロンであり、更に VIP ニューロンの約35%は CCK-8 ニューロンでもあり、それは CCK-8 ニューロンの10%に相当することが明らかとなった。このことは GABA ニューロンの約1%は、CCK-8 及び VIP を共に含有していることを示している。

GABA ニューロンはこのように、その含有するペプチドによって更に分類されるが、それがどのような機能的意味を有するかについては、今後の電子顕微鏡的、生理薬理学的研究が必要であると思われる。

Table 1.

Laminar distribution of GAD immunoreactive perikarya in the hippocampus. st. or.: stratum oriens, st. py.: stratum pyramidale, st.rad.-mol.: stratum radiatum + stratum lacunosum-moleculare. Total number of cells = 2670. N = number of rats. Values(%) = means $\pm$ standard deviation.

	st.or.	st.py.	st.rad.-mol.
CA1 (N=4)	36.6 $\pm$ 4.6	21.4 $\pm$ 3.8	42.0 $\pm$ 4.5
CA3 (N=4)	32.7 $\pm$ 5.2	25.4 $\pm$ 2.1	41.9 $\pm$ 5.8
CA1+CA3 (N=4)	34.8 $\pm$ 1.9	23.6 $\pm$ 1.2	41.6 $\pm$ 2.7

Table 2.

Laminar distribution of CCK-LI perikarya in the hippocampus. A shows the distribution of perikarya exposed to cut surfaces of sections. Perikarya analysed in Table 1 and Table 2A are located at the confronting planes of paired consecutive sections. Total number of cells in A = 305. B shows the distribution of whole perikarya in 40 μ m thick sections. Total number of cells in B = 1273. Comparison between A and B indicates that B is fairly well represented by A. Values (%) = means $\pm$ standard deviation.

A	st.or.	st.py.	st.rad.-mol.
CA1(N=4)	16.1 ± 5.1	17.7 ± 3.1	66.3 ± 5.2
CA3(N=4)	18.8 ± 3.2	22.9 ± 5.1	58.3 ± 6.0
CA1+CA3(N=4)	17.4 ± 4.1	20.1 ± 3.7	62.5 ± 5.4

B	st.or.	st.py.	st.rad.-mol.
CA1(N=4)	18.8 ± 5.1	19.7 ± 3.1	61.6 ± 4.1
CA3(N=4)	17.5 ± 3.8	21.1 ± 5.2	61.5 ± 3.3
CA1+CA3(N=4)	18.7 ± 2.7	20.1 ± 2.6	61.2 ± 1.7

Table 3.

Regional difference of the percentage of the GAD immunoreactive cells containing CCK-L immunoreactivity. Total numbers of GAD immunoreactive and CCK-LI cells are 3907 and 413, respectively. N = number of rats. Values (%) = means ± standard deviation.

	dentate gyrus	CA3 region	CA1 region
dorsal(N=4)	10.9 ± 3.3	11.1 ± 2.6	14.1 ± 3.3
ventral(N=4)	7.4 ± 1.9	8.9 ± 3.4	10.7 ± 1.7
dorsal+ventra(N=4)	9.2 ± 2.4	10.2 ± 1.8	12.4 ± 2.3

Table 4.

Laminar difference of the percentage of GAD immunoreactive cells containing CCK-L immunoreactivity in the hippocampus. Total numbers of GAD immunoreactive and CCK-LI cells are 2670 and 305, respectively. Values (%) = means ± standard deviation.

	st.or.	st.py.	st.rad.-mol.
CA1(N=4)	5.7 ± 2.1	11.2 ± 4.5	20.4 ± 2.7
CA3(N=4)	6.2 ± 2.9	9.6 ± 3.8	14.1 ± 1.6
CA1+CA3(N=4)	5.9 ± 2.4	10.1 ± 3.7	17.1 ± 1.4

高次神経機構研究部門

59年度までの研究の結果、ネコ赤核において、大脳皮質から赤核内介在ニューロンを介して、赤核脊髄路ニューロンに投射するGABA作動性抑制性入力が存在することをGADに対する抗体を用いた免疫組織化学法によって形態学的に証明した。また一連の電気生理学的及び形態学的実験からも小脳中位核破壊後に大脳皮質から赤核へ投射する興奮性入力が可塑的变化を示することが知られていた。今年度は、免疫組織化学法を度いた実験から、大脳皮質から赤核へ投射するGABA作働性入力、小脳中位核破壊後に可塑的变化をおこす、すなわち赤核ニューロン上においてGAD陽性シナプスが增加するということを形態学的に証明した。

神経成長に関与する新たな因子を求める実験を行なった。培養心筋細胞、条件培養液が、培養神経細胞のプロセスの生長を促すことがすでに知られていたが、その中で、培養血中にあらかじめコートしたポリオルニチンに結合し、条件培養液を洗い流しても、培養神経細胞のプロセスをのばす因子の潜在を、訴えたに見い出した”との特性を研究した。

神経細胞骨格の電気活動に伴う挙動を計測するための画像処理システムを開発した。培養神経細胞に細胞内注入した。ファロイジンローダミン色素による蛍光を測定し、アクチンの挙動を測定するため、SITテレビカメラを到立顕微鏡にとりつけ、蛍光像を撮像し、その画像を計算機画像処理を行なう。画像処理システムは、すでに神経細胞の形態計測のために開発したシステムに、SITテレビカメラとのインターフェイスを新たに作り、処理ソフトウェアも高速入力のために新たに作り直した。撮像されたノイズを除去する必要が生じ、カメラ雑音を効果的に減少させる空間フィルターのアルゴリズムを新たに開発した。

高等動物の発声係と聴覚係の相互関係を調べるため、キクガシラコウモリのエコーロケーション行動中の脳の活動の空間的パターンを $[^{14}\text{C}]$ Deoxyglucose像を用いて測定した。それによりエコーロケーション時の活動パターンは顕著な差量を示した。エコーロケーション時には発声に関与する活動性の高い2つのバンドが見い出され、さらに、その間に発声により抑制されてニューロン群が見い出された。これは、視覚に見られる側方抑制に相当するものと考えられ、側方抑制やマッハバンドが、感覚系に共通なものと考えられる。

発声による聴覚中枢の機能的変化

谷口郁雄（生理研・東京医歯大医）

最近の行動に関連した聴覚生理学の研究から、物理的性質が単純な音には応じにくい聴覚中枢のニューロンが種々固有の音声にはよく応じるという例が見出された。それ以来、音声のような

「生物学的に意味のある音」による刺激が注目されるようになった。発声系と聴覚系が密接な関係を持つとすれば、それは自然な傾向と考えられる。実際に、下等な動物では音声による適応行動に生得的な要素が多く認められ、遺伝学的にも発声系と聴覚系とが強い結びつきをもって発生することが証明されている。

この研究は、そのような観点から、キクガシラコウモリのエコーロケーション行動を利用して、哺乳類のような高等な動物の発声系と聴覚系の相互関係を調べるのが目的である。方法としては $[^{14}\text{C}]$ Deoxyglucose (DG)法(Taniguchi: Biomed. Res. 1:519-516, 1980)により、脳のオートラジオグラフを作成し、エコーロケーションを行っているときと、そうでないときの脳の活動の空間的パターンを比較する。

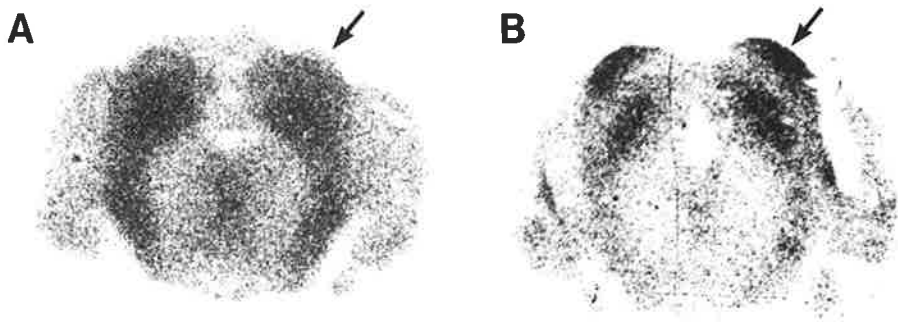


図1. DG法により作成したキクガシラコウモリの下丘レベルのオートラジオグラフ。Aは静止時、Bはエコーロケーション時。エコーロケーション時には、両側の下丘(矢印)にDGの取込みが増大する部分が二つのバンドとして現われる。下側のバンドは発声音の周波数よりやや高い周波数を最適周波数として持つニューロンが作る層状構造に相当する。その上のDGの取込みが少い層は発声により抑制されたニューロンの層で、側方抑制として機能しているのであろう。

作成した脳のオートラジオグラフはエコーロケーション時と、そうでないときとでは、脳の活動のパターンは驚くほど異なることを示した。コウモリが外界に関心を示さず、静止している状態のときは、生存し、その姿勢(ぶら下がった状態)を維持するのに最低限必要の中枢だけが活動しているように見える。そのような状態で聴覚系を生物学的に意味のない音で刺激しても、動物は関心を示さず、応答を示さないであろう。

第1図は下丘のレベルで作成したオートラジオグラフの例である。静止時とエコーロケーション時では下丘のニューロン群が示す活動の空間的パターンははっきり異なっている。黒い部分はDGの取込みが多い所で、活動性が高まっていることを示している。エコーロケーション時に現われる活動性の高い黒い二つのバンドは発声によって発現したもので、下方のバンドは最適周波数が発声音(パルス)の周波数よりも数百Hz高い66.3 kHzあたりのニューロン群によって形成された層状構造である。二つのバンドの間の白い活動性の低いバンドはパルスあるいは発声によっ

て抑制されたニューロン群である。この抑制は視覚にみられる空間的な側方抑制に相当する。これまでの聴覚系の抑制現象に関する報告のすべては単一ニューロンの周波数領域における抑制についてであった。ベケシーが考えていたように、側方抑制やマッハ・バンドは視覚に特異的な現象ではなく、感覚系に共通する性質のものようである。

さらに他の聴覚中枢や発声に関係する中枢についても検討中である。特に興味深いのはエコーロケーション時に、大脳皮質聴覚領に機能的な柱状構造が認められることである。聴覚系が発声によって影響される機序については今後の研究を待たねばならない。

神経細胞骨格の挙動の定量的解析

前田 純（生理研）

神経細胞骨格の生理的条件下における挙動を観察するため、超高感度テレビカメラ（SIT テレビカメラ）を画像処理システムと組み合わせたシステムを開発した。チツクの37期前後の脊髄後振の神経細胞を分離培養したものを用い、ファイジンローダシン色素等でアクチンを染色し、その蛍光像を観察する。光学系は到立型顕微鏡をもとに、電気活動と同期して紫外励起光を入射させるための電磁シャッターを用いた励起光学系、培養標本を維持するための保温、現像装置を製作した。蛍光像は顕微鏡に直結するSITテレビカメラにより撮像され、A/D変換器で量子化された後、概開発の神経細胞の形態計測のための画像処理システムにとり込んだ。これにより、テレビ画像内の任意の64×64画素を、約一秒でとり込めた。システムの評価を行なうため、分離培養した脊髄後根神経細胞の細胞膜をWGA-FITCで染色しその蛍光像を測定した。蛍光反応が微弱なため、SITテレビカメラの感度を最大にする必要があり、画像には蛍光像と、SITテレビカメラに起因する雑音が重畳したものとなった。雑音はランダム性の高いもので、くり返し撮像し各画素ごとの加算平均を行なうことにより抑制されるが、電気活動と関連した像を得る必要があり、一枚の画面から蛍光像を分離することが望ましい。一般的な空間フィルダーでは、ノイズを抑えるため空間的なローパスフィルタを用いるが、像のエッジが甘くなる傾向にある。そのため、3×3の部分画等において、エッジ部を検出し、エッジを含まない領域でのみフィルタリングの走査を行なうフィルタアルゴリズムを新たに開発し、評価した。これにより、8近傍の分散と平均グレイレベルと、中央のグレイレベルを比較し、中央のグレイレベルが、近傍と同じ領域に属するかを判断して、フィルタリングを行なうかどうかを決定する方法と、3×3画等の到底的性質の類似する領域のみをフィルタリングする方法が共に蛍光像からの雑音の除去に有効であり、エッジのボケも少ないことを見出した。

情報記憶研究部門

概要

哺乳動物の最も単純な反射弓である単シナプス性筋伸展脊髄反射経路は、筋紡錘由来のグループ Ia 感覚神経線維と脊髄運動ニューロンによって形成される。胎生期に筋を除去すると、その筋から由来する感覚神経細胞も、その筋を支配する運動ニューロンも死滅することが知られている。したがって、すくなくとも胎生期においては、筋は感覚神経細胞と運動ニューロンに対して栄養因子 (trophic factor) を供給していると考えられる。また、胎生期の感覚神経細胞に対する栄養因子の一つは、神経成長因子 (nerve growth factor : NGF) であることが知られている。昨年までの研究において、我々は、新生ラットの筋神経を切断すると、その筋由来の感覚神経から運動ニューロンへのシナプス伝達が著明に減弱し、この現象は、NGF の投与によって軽度になることを見いだした。この結果に基づき、NGF は生後の時期においても栄養効果を有するか否かを、感覚神経の細胞死と筋紡錘の再生を指標として検討した。これらの一連の研究は、神経系の可塑的变化と神経栄養因子の関連を具体的に明らかにすることを目的とする。

新生ラットの末梢神経傷害に伴う感覚神経細胞死と神経成長因子の効果

久野 宗 (生理研・京大医), 宮田雄平 (生理研・東京医歯大医), 樫原康博 (生理研)

〔研究目的〕

胎生期における交感神経細胞と後根神経節細胞の生存と成長には神経成長因子 (nerve growth factor; NGF) が必須であり、NGF に対する抗血清を胎生期に与えるとこれらの神経細胞のみが選択的に死滅することが知られている。交感神経細胞の NGF 依存性は生後にも見られ、成熟動物においても、交感神経節細胞は NGF の抗血清投与によって消失する。これに対し、後根神経節細胞の数と形態は生後の動物においては NGF の投与によっても、また、NGF の抗血清の投与によっても影響されないと報告されている。最近、我々は、新生ラットの筋神経を挫滅すると、その神経の刺激によって発生する脊髄運動ニューロンの EPSP は著明に減弱し、この EPSP の減少は NGF の投与によって有意に軽減されることを見いだした。この現象を説明する一つの可能性として、新生動物では末梢神経の傷害によって一部の後根神経節細胞が死滅し、この細胞死が NGF によって軽減されることが考えられる。本研究は、この可能性の検討を目的とする。

〔実験方法〕

1. 電気生理学的方法 : Wistar ラットの後肢の medial gastrocnemius (MG) の筋神経を生後 1

日あるいは4日の時期にピンセットで挫滅し、4—5週間後に電気生理学的実験を行った。Nembutal 麻酔下で脊髄を露出し、後肢を支配する第4—5腰髄の前根と後根をMG神経の挫滅をした側（左側）の後肢末梢神経と共に摘出し、灌流液下に維持した。図1に示すように、挫滅したMG神経と、正常なlateral gastrocnemius-soleus (LGS)の筋神経に記録電極を置き、後根（DR）あるいは前根（VR）刺激によって誘起した合成活動電位を記録した。神経の刺激及び活動電位の記録に際しては、標本を塩溶液上に重畳したパラフィンオイル層に移行させた。

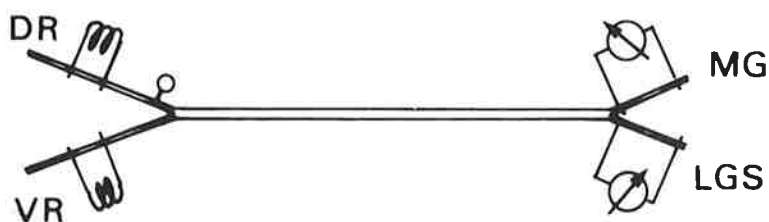


図1. 電気生理実験に用いた標本の模式図。NG及びLGS神経を坐骨神経、前根（VR）、後根（DR）と共に摘出し、前根あるいは後根を刺激して、合成活動電位をMGあるいはLGS神経から記録した。

2. 形態学的方法：MG神経の末梢切断端にHRPを1時間局所的に適用し、40時間後に動物を灌流固定して、軸索輸送のHRPによって染色された後根神経節細胞の全数を連続切片標本において観察した。末梢神経傷害側の対照として、対側の正常なMG神経にもHRPを適用して、同様に後根神経節細胞の数を算定した。

〔結果及び考察〕

筋神経から記録した合成活動電位は、記録条件によってその大きさが影響されるから、記録電位の絶対値の比較は困難であった。また、合成活動電位の最大振幅値は伝導速度の速い神経線維のグループのみを反映するので、合成活動電位の面積を指標として比較した。図2は、後根刺激による合成活動電位を、前根刺激による合成活動電位に対する比で示したものである。正常の動物（N）では、この比はMG神経（図2A）においては0.73であり、LGS（図2B）においては0.64で、差は見られない。MG神経を生後1日（1—D）に挫滅すると、この比（0.25）はMG神経におい有意に低下した。同様な傾向は、生後4日（D—4）にMG神経を挫滅した時にも見られたが、この差は統計的には有意でなかった。LGS神経においては、この比は、MG神経の挫滅によって影響を受けなかった（図2B）。この結果からだけでは、末梢神経傷害が運動神経線維に影響するか否かは不明であるが、すくなくとも、感覚神経線維により著明な変性過程が生じていることが示唆される。

合成活動電位の低下は、感覚神経線維の一部が変性して死滅した場合にも見られるであろうし、また、線維の萎縮だけでも観察される。後者の場合には、線維の伝導速度の低下が予測されるので、合成活動電位の起始点を指標として伝導時間を測定した。図3は、挫滅したMG神経の伝導時間を正常のLGS神経の伝導時間に対する比で示したものである。正常の動物（N）

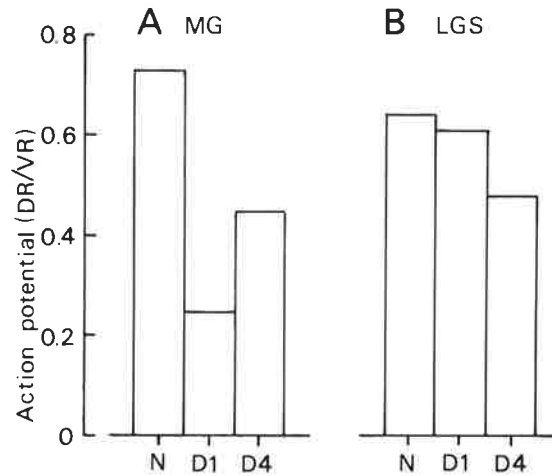


図2. A. 後根 (DR) 刺激によってMG神経から記録した活動電位の面積の前根 (VR) 刺激に対する活動電位の面積の比。B. Aと同様の比をLGS神経から記録した活動電位に対して示す。Nは正常グループ。D 1は生後1日にMG神経を挫滅したグループ。D 4は生後4日にMG神経を挫滅したグループ。

では、後根 (図3 A) も、前根 (B) も、MG と LGS 神経の間に差が見られないが、生後1日 (D-1) にMG神経を挫滅すると、MGの感覚神経 (図3 A) の伝導時間が著明に遅延した。しかし、生後4日 (D-4) にMG神経を挫滅した場合には、伝導時間の比に影響が見られなかった。一方、前根に関しては、生後1日あるいは4日にMG神経を挫滅しても、MGとLGSの伝導時間の比は正常と同様であった (図3 B)。図2と図3の結果から、新生ラットの筋神経に損傷を与えると、その筋から由来する感覚神経線維には変性効果が見られるが、その筋を支配する運動神経はすくなくとも著明な変性を示さないと結論される。

上記の感覚神経の損傷による変性過程が、線維の萎縮か、感覚神経細胞の死滅かを検討するために、生後1日に左後肢のMG神経を挫滅し、4-5週間後に、HRP法によってMG神経由来の後根神経節細胞の数を算定した。表Iは、6例の結果を示したものである。正常側のMG神経由来の感覚神経細胞の総数は平均120ヶであり、挫滅側では、この数は約50%に減少し、末梢神経損傷によって、感覚神経細胞が多数死滅していることは明らかである。表IIは、一側のMG神経に同様な手術を与えた後、NGFを投与した場合の結果である。NGF投与によって著明に細胞死が阻止された傾向を示す動物が2例あったが、表Iと表IIの全数を比較すると細胞死の程度には有意の差は見られなかった。

これらの結果から、新生ラットの末梢神経の損傷によって、感覚神経の約半数は細胞死を示し、この細胞はNGFの投与によって有意に阻止されないと結論される。新生ラットのMG神経を生後1日に挫滅すると、4-5週間後には、その筋神経刺激によって発生する脊髄運動ニューロ

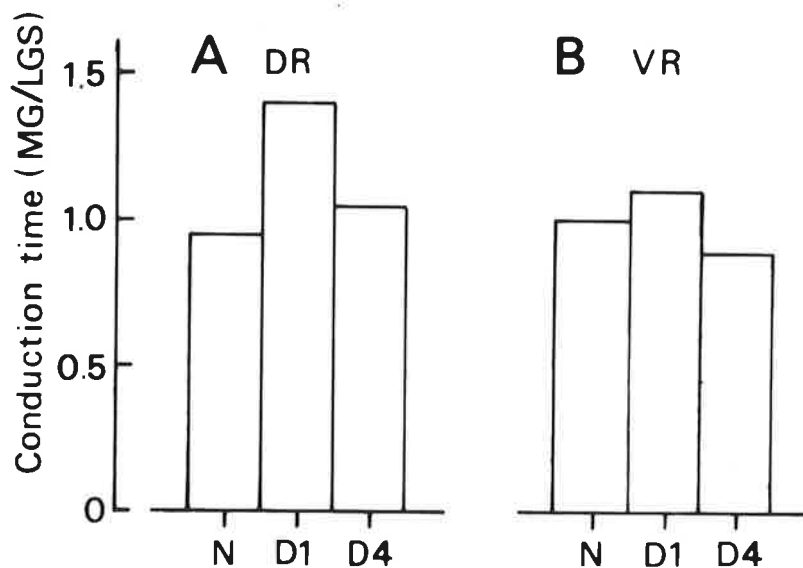


図3. A. 後根 (DR) 刺激によって合成活動電位を MG 及び LGS 神経から記録し, MG の伝導時間を LGS のそれに対する比を示す。B. A と同様の比を前根 (VR) 刺激に対する活動電位で測定した結果。N は正常グループ。D 1 は生後 1 日に MG 神経を挫滅したグループ。D 4 は生後 4 日に MG 神経を挫滅したグループ。

ンの EPSP は正常の約 10% に減少するが, NGF 投与群では, その減少は正常の約 30% であることを我々は昨年報告した。本研究の結果から, この差異は, 生存する感覚神経細胞数の相違によるのではないと結論される。NGF は, 多分, 感覚神経の中樞終末部における発芽を促進するのか, あるいは, 他の機構によって, その伝導物質の放出量を上昇させるものと推測される。

表 I. 生後 1 日に一侧の MG 神経を挫滅し, 4—5 週間後に生存している MG 感覚神経細胞の総数を HRP 法によって観察した 6 例の結果。

	Crushed side (A)	Control side (B)	A/B, % (C)
1.	19	143	13
2.	63	97	65
3.	65	100	65
4.	75	132	57
5.	48	98	49
6.	75	153	49
Mean±S.D.	58 ± 20	121 ± 23	50 ± 18

表 II. 表 I と同様。但し, NG 下投与群から得た結果。

	Crushed side (A)	Control side (B)	A/B, % (C)
1.	157	164	96
2.	64	159	40
3.	61	139	44
4.	110	132	83
5.	91	143	64
6.	79	127	62
Mean±S.D.	94 ± 33	144 ± 13	65 ± 20

生 体 調 節 研 究 系

高次神経性調節研究部門

概要

生体調節研究系は、高次神経性調節部門、高次液性調節部門、生体システム部門の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今年度に創設され、大森治紀教授が着任し外界に向けられたセンサー機能の一つである感覚受容細胞を一つのモデルとしてトランスダクション・チャンネル等の分子機構の解析を開始した。高次液性調節部門は、大村裕教授のもとに視床下部と摂食中枢の問題解決に精力的な努力を続けている。

高次神経性調節部門は昭和54年開設以来6年を経過した。生理研発足時の勝木機構長の論文によると、教授就任後6年を経ると教授は次のjobを求めて歩かねばならないと記されている。私達もその時期にきた。6年という年限が由来した経緯は知らないが、この年限は大変大きな重圧となってきた。今年度の年報を記するにあたり部門の6年を振り返ってみることにした。開設当初の2年間は入沢と野間が広島時代に試みていた洞房結節、房室結節の微小標本を作成し、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。循環系の調節機構を解明するためのこれまでの多くの研究は心拍数や血圧のような体外から測定できる指標を扱い、心ペースメーカー自身の調節機構にふれなかった。ところが、洞房結節には脳よりの自律神経が最も精密に分布しており、細胞レベルでの調律発生のメカニズムを探ればこの研究分野での新しい面が開けると考えた。

従って新しい方法の考えつかなかった自律中枢の研究を続けるよりもペースメーカー機転の研究に部門の研究の中心をおいたのである。初年度に鳥取大学から小竹寛、慈恵医大から国分眞一郎がいずれも大学院生として、西村昌雄が藤田学園大から研究に参加し、房室結節の自動能、アドレナリンの房室結節電流系への作用について研究がすすんだ。

2年次に倉智嘉久が東京大学から助手として研究に参加し、微小標本を用いてのNa-Kポンプ電流の測定が行われた。この年に大阪大学殿村研より谷口淳一が大学院生として研究に参加し、コラゲナーゼ処理による単一心筋細胞の研究を開始した。生理研コンファレンスでザール大学からIsenberg教授が参加され、その時に話し合った2・3のヒントをもとに岡崎方式の単離法が考案され実験が急速に軌道にのった。この間、学術振興会外国人研究員として、W. Trautwein教授が3ヶ月滞在され細胞内注入法に興味を示された。ドイツ的な複雑な注入法でなく、簡単な空気圧注入法が野間により考案され3年目は細胞内注入の時代となった。

3年次に東京大学第一生理より亀山正樹が大学院を終了して助手として研究に加わった。同時に京都大学第二内科より松田博子が研究に参加し、松田は細胞内にEGTAやカルシウムを注入して

一過性に出現する内向き電流の本態について詳細な実験をこころみた。この年にはペンシルバニア大学から Morad 教授、ザール大学から Osterider 博士が研究所に滞在し、Morad 教授により、結節細胞には存在しなかった内向き整流電流への展望がひらけた。野間と Morad とはペースメーカー電流についての長期間にわたる議論を行ない、その結果は Pflüger 誌上に発表された。3 年次の注入時代はつづいて灌流時代へと移行して行った。国分はこの時期に Brown 赤池による吸引電極をもちい心室細胞のカルシウム電流を記録するには ATP を電極内に灌流することが重要であるという報告をした。

4 年次には鹿児島大学より加計正文、自治医大より中山敏夫、Oxford の留学をおえた木村純子が加わり、韓国京城大学より Dr. Park が研究室をおとづれたが、この年に野間が Sakmann 教授と共同研究を行ったのをきっかけとして、微小電極時代は終幕となりパッチクランプ法の利用がはじまった。単一細胞分離の前段階をへていたため、この変化は極めてはやく、生理研臨時事業の応援もあって短時間のあいだに方法の確立が行われた。単一細胞とパッチ法：単一チャンネルとその平均加算によるアンサンブル分析法によって、心筋生理は新しい時代をむかえたといっても過言でない。

5 年次には慈恵医大より副島道正が大学院生として一年間滞在して、この間アセチルコリンチャンネルのまとめを行った。大分医大から清末達人が研究に参加し、亀山らと内向き整流カリウムチャンネルについての研究を行なった。また佐藤良一は日本医大より大学院生として研究に参加し、岐阜大より研究に加わった柴崎亨は野間・加計とともに ATP チャンルの新局面について実験を行った。東北大飯島俊彦はアセチルコリンのカルシウム電流への効果をみた。この年には生理研より 6 名が国際生理学会に参加し、野間は 2 シンポジウムに入沢は単一心筋のシンポジウムを主催した。亀山・加計・松田・副島はそれぞれポスター発表を行った。亀山は 2 年間の予定で Trautwein 教授のもとに留学をした。

6 年次には木村が再び研究に参加し、Na-K ポンプ、Na-Ca 交換電流の研究を行った。前者は文部省研究員として 2 ケ月間滞在した。D. Gadsby 博士が野間との共同研究により単一細胞における Na-K ポンプの単離に成功したことでこの研究はさらに進展が予期されている。

さらに、名大大学院生の坪井直也は野間と共にギャップ結合の電気抵抗を測定する新しい方法を考案した。従来ギャップ結合の調節については細胞内の Ca 又は PH によるという可能性が示されたのみで、定量的にこれらの影響を比較することは出来なかった。この新しい方法は生理研コンファレンスで発表されたが、この研究もさらに発展するだろう。6 年次における他の研究として倉智は Sakmann 教授の元から帰国して以来、内向き整流チャンネルの研究をつづけていたが一つの報告をまとめて、東京大学第二内科に復学した。Morad、倉智の研究により、今迄、洞房結節には存在がみとめられず、われわれにも関心がうすかった内向き整流チャンネルについても関連した実験を考えるようになった。

本年度のさらに一つの発展は、生理研特別協力員として 3 年間滞在した中山が残したものである。彼は洞房結節の単一分離標本をつかい一つ一つの電流系の電流密度を正確に測定して行った。

このデータはペースメーカー機転を考える際には不可欠の資料となると思われる。中山の他の貢献は一過性外向き流を房室結節の静止細胞に発見したことである。この電流系は神経細胞では i_A とよばれペースメーカー機序にも関係するといわれた。心筋ではプルキンエ細胞にみられただけであったため、その単一チャネル分析は、はじめての試みであった。中山の単一洞房結節の研究は *Pflüger* 誌に発表済みとなり、一過性外向き流の研究は *Circ. Res.* 上に印刷中となった。

松田は今年度より助手として研究を続けることとなった。松田はさきに野間と共に細胞内灌流法を用い、細胞内外から K イオンを除くことにより内向き Ca 電流を単離することに成功した。 Ca 電流は外液の Na をすべて除きトリス塩と置換し、さらに TTX 作用下においても変化をみなかった。すなわち Ca チャネルに Na は正常条件下でほとんど流れないことを明らかにした。 Na イオンは外液に Ca イオンがない時には Ca チャネルを通ることも明らかにした。この成績は *J. Physiol* に発表済みとなった。

6 年次には、英国生理学会のシンポジウムが Oxford 大学であり、生理研より入沢・野間・木村・中山・亀山がまた慈恵医大より国分が参加をした。亀山はザール大学より国分はベルン大学よりこの会に参加し、中山・木村・入沢はその後フランスのツール大学で行われたヨーロッパ心臓生理研究会に出席しポスターセッションで 2 論文を報告した。野間はゴードンカンファレンスでムスカリン性カリウムチャンネルについて講演した。

このようにして、本部間は開設以来 7 年目をむかえることになった。

過去 6 年の成績から従来、心筋細胞は構築が複雑で膜電流のレベルで議論をすすめることが出来ず、単一神経細胞や卵細胞の生理に比較すると、別の世界であると考えられていた時代が終ったことは明らかである。今や心筋の活動電位は種々の方法で分析の対照となっている。70 年代に大変困難であった電圧固定法は今やルチンの方法として実施されるようになった。また単一パッチクランプ法も利用が出来、パッチ電極の二重電極法も利用されるようになった。心筋は多細胞であってこそ心筋で単一細胞では心筋でないという考えについても、対細胞での実験がすすむにつれて、多細胞系の特長であった伝導の本質も論じられる時代に突入した。

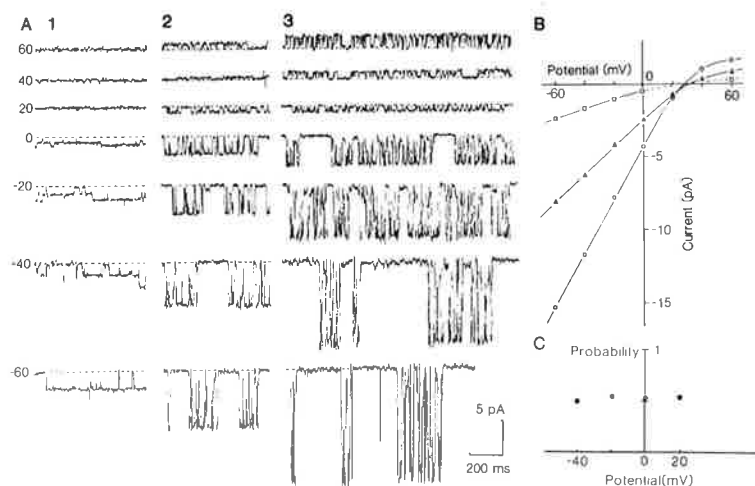
すなわち、心筋細胞の生理学は一般生理学の一環として理解されるようになった。循環生理学は 1930 年のはじめに、一般生理学に非常に大きな貢献をしたがその後大きな進歩がなく追証的な研究が多かった。今回の方法上の一展開により心筋生理学が一般生理学として生理学の概念に貢献するとすれば、第二回目の循環生理学の大きな展開がえられることとなる。心筋細胞は決して特殊な細胞ではなく神経細胞のもつすべての電流系をもっている細胞で、同じレベルでの議論ができる時にきたと思うのである。神経細胞と違うのは、収縮性の機械を内蔵しているため細胞の限界をこえると直ちに細胞が死滅し、実験が終ってしまう点である。これは広い範囲に亘って条件の変化を必要とする物理化学的な実験には不向きであるが、常に実験者を生体のもつ生理的範囲にとどめておき、生理的意義のある実験を要求される調節系の研究には極めて有利なことと言わざるをえない。

以下に今年中に発表された主な論文について短い報告をする。

細胞内 Na により活性化する K チャンネル

亀山正樹, 加計正文, 佐藤良一, 柴崎 亨, 松田博子, 入沢 宏 (生理研)

細胞内 Na^+ は正常では 10 mM 以下である。亀山らは細胞内 Na^+ が 30 mM 以上になると 200 ps 以上の時間非依存性の maxi-conductance をもつ K^+ チャンネルが活性化されることを見出した。このチャンネルは Na^+ により特異的に活性化され細胞内 Ca を 0.1 mM に上昇させても活性化されることはない。正常の細胞内 Na^+ 濃度に比較すれば非常に高濃度の Na^+ を必要とするのでこのチャンネルの開放は生理的なものとは言い難い。 Na^+-K^+ ポンプの作用が低下し細胞内 Na^+ が増加すると、 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換機序による Ca^{2+} の排泄が抑制される。このような場合に K^+ チャンネルが細胞内 Na^+ により活性化されると細胞の脱分極をおさえ $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交換機序を改善する可能性がある。このチャンネルは Ca により活性化する K チャンネル ATP により活性化する K チャンネルと同じか大きなコンダクタンスを持ち、単一コンダクタンスは $207 \pm 19 \text{ ps}$ ($n=16$) に達した。心室筋での 3 チャンネルを図示したのがこの図であって、1 は内向き整流チャンネル ($40-50 \text{ ps}$)、2 は ATP チャンネル ($60-70 \text{ ps}$)、3 は Na チャンネルで $100-200 \text{ ps}$ である。このチャンネルには電圧依存性はないことも一つの特徴であった。〔発表〕 Nature 309, 354, 1984.



細胞内 Na イオンにより活性化された K チャンネル (Kameyama et al., 1974, Nature)

A は単一チャンネル電流で 1 は内向き整流性 K チャンネル、2 は ATP 感受性 K チャンネル、3 は Na により活性化される K チャンネルを示す。B は 1 (□) 2 (△) 3 (○) の電流電圧曲線を示す。C は Na により活性化される K チャンネルの開口確立が膜電位に無関係に一定であることを示す。

単離した Na-K ポンプ電流：外液 K，内液 Na 及び 内液 ATP の影響

Gadsby, D (ロックフェラー大), J. Kimura & A. Noma (生理研)

超電性 Na-K ポンプの存在は心筋でも知られていたが Na-K ポンプ電流の形で単離することは出来なかった。それは今迄は心筋が単離できなかったばかりでなく、細胞内液を透析することが困難であった為である。この実験によって直接細胞外に濃度、細胞内 Na 濃度、ATP 濃度をかえることが出来、ポンプ電流を単離できるようになった。内液は 110 mM Cs-Asp, 10 mM ATP, 5 mM Cr P, 20 mM TEA, 5 mM Mg Cl₂ 及び 5 mM EGTA である。外液は 1 mM Na Cl₂ を含む Cafree Tyrode 液で 0.9 mM Ba Cl₂ を含み Na-Ca exchange 電流, K 及び Ca channel は block した。この条件下で 33.3 mM Na をピペット内に灌流すると保持電流は外向に移動し、それは外液 K をすべてとり去るか、又は 10^{-6} M ウアバインの作用によって抑制された。電流は普通の大きさの心室筋細胞約 100 乃至 200 pA。電流電圧関係は時間非依存性であった。

〔発表〕 J. Physiol. 358, 55P, 1984.

兎の単一ペースメーカー細胞膜電流

中山敏夫, 野間昭典, 入沢 宏 (生理研)

生きている単一步調取り細胞を単離した。1.8 mM Ca を含む正常タイロッド液中ではこの細胞は円形となったが規則正しいリズムで興奮を反復し、その頻度は約 150-260/分であった。膜電流は多細胞系の時の電流系と全く同様であったが電流の大きさは約 100 分の 1 であったため、多細胞系の時には標本内に約 100 箇近くのペースメーカー細胞が存在したと結論した。従って 100 箇近くの細胞が同期して興奮していたと考えられる。

膜抵抗は -35 mV の膜電位で $14.9 \pm 0.4 \text{ K } \Omega \text{ cm}^2$ ($n=12$), 膜容量は $1.30 \pm 0.24 \mu \text{ F/cm}^2$ ($n=18$) であった。カルシウム電流の不活性化は遅速の二様に分れた。前者は $46.6 \pm 15.3 \text{ ms}$, 前者は $6.7 \pm 0.6 \text{ ms}$ (+10 mV に於いて) となった。単一細胞を使ったため、はじめて電流密度を測定することが出来た。すなわち、カルシウム電流はピーク電圧で $18.2 \pm 8.4 \mu \text{ A/cm}^2$ カリウム電流は -40 mV で $3.3 \pm 1.4 \mu \text{ A/cm}^2$ であった。これらの値は今迄、柳原, 野間, 入沢のモデルで予期した値と大きく差がなかったことは興味深く思った。

単一心室筋の研究は非常に多いが歩調取り細胞の研究はすくなく、この報告を期にさらに研究の発展が期待される。

〔発表〕 Pfüger, 402: 248-257, 1984.

モルモット心室筋における ATP により調節される K 電流について

加計正文, 野間昭典, 柴崎 亨 (生理研)

先に野間 (Nature 305, 147-148, 1983) は細胞内 ATP 欠乏時に活性化する K チャンネルを報告したので, この K チャンネル及び全細胞のレベルで詳細にしらべた。この電流系のコードコンダクタンスは外液 K 濃度の 0.24 乗に比例して増加した。電流系は電圧時間非依存性で, 細胞内 ATP 濃度に依存した。単一チャンネルの開始時間は, ニコの指数関数によって示された。ATP 濃度がまずと open time ヒストグラムからえられる時定数は減少し closed-time ヒストグラムからのそれは増加した。その結果 open state 確率が減少した。このチャンネルは ATP, ADP, AMPPNP, GTP, UTP 等により block されたか AMP 又はアデノシンでは block されなかった。open 確率を ATP 濃度に対してプロットすると Michaelis-Menten 型の飽和キネツクスを示し $K_{1/2}$ は 0.5 mM となり, n は 3~4 とリセプター部位が数コあるつよい co-operativity を示すものであることを示した。

細胞内を ATP 欠乏液で透析すると外向き流が増加したが, この外向き流は E_K で逆転し内向き整流性を示した。かつ時間非依存性であった。ノイズ解析から単一チャンネル電流の振幅を推測すると, それは単一チャンネル電流の記録と大体一致した。その結果から ATP がチャンネルのレセプター部に結合すると K チャンネルがブロックされ, この K チャンネルが虚血時にみられる外向き流増加の一大原因であることが明らかとなった。この報告は 84 年の Gordon Res. Conf. で野間により報告された。

〔発表〕 J. Physiol. 352, 265-284, 1984.

兎ペースメーカー細胞と非ペースメーカー細胞との静止時にコンダクタンス

野間昭典, 中山敏夫, 倉智嘉久, 入沢 宏 (生理研)

ペースメーカー細胞と非ペースメーカー細胞との一つの大きな差は静止電位の差である。前者は -40 mV, 後者は -10 mV より負で E に近い値をとっている。この差が何によるかに今迄は推察の域を出なかったが, 今度の実験によって内向き整流チャンネルの数に大差のあることが明らかとなった。すなわち心室筋のような非ペースメーカー細胞では内向き整流チャンネルは平均 1 パッチあたり 2.3 箇所であるに対し洞房結節や房室結節のような細胞では 0.03~0.06 箇所と極めてすくない値をほした。この結果, 洞房結節の静止電位における接線, コンダクタンスはギガオームに達し, きわめて僅かな電流の変化に伴って, 充分大きな歩調取り電位が発生する可能性を示した。

〔発表〕 Jpn. J. Physiol. 34, 245-254, 1984.

兎ペースメーカー細胞の単離について

入沢 宏, 中山敏夫 (生理研)

兎のペースメーカー細胞を単離した所, 円形又は卵円形を呈することが明らかになった。この卵円形の細胞を Ca free 液中から追跡し, Ca free 中では小型の分岐の多い細胞であることを明らかにした。この細胞は $0.2 \mu\text{M}$ のアセチルコリンによって自発活動を停止し, 10^{-7} g/ml アドレナリンによって自発活動を誘発することが出来た。この種の円形細胞は洞房結節とその周辺, 房室結節とその周辺に多くみられるが, 洞房結節と房室結節とをむすぶ SARB 部や梁柱を示さない心房部にも僅かにみとめられた。この標本の微小形態は浜研の中村によって研究されている。

〔発表〕 Jpn. J. Physiol 34, 245-254, 1984.

単一心室筋細胞のカルシウム電流に対する細胞内 Ca イオンの作用

国分眞一郎, 入沢 宏 (生理研)

Ca 電流に対する細胞内 Ca 濃度変化の効果をモルモット単一心室筋を使って研究した。この研究はまだパッチ電極が利用される前の研究で run down がはやく困難な研究であったが, 外液の Ca を Ba や Sr にかえることによって比較的安定した電流を記録したものである。カルシウム電流の大きさは pCa を 0.9 から 6.8 に低下させることによって著明に減少した。しかし不活性の時間経過には大差がみえなかった。カルシウム依存性の不活性過程がみられた。細胞内 Ca 濃度の減少にもとづくカルシウム電流の減少はカルシウム電流の最大コンダクタンスを減少させることが明らかとなった。

さて, この実験はパッチクランプ法で当然繰返さねばならない。その理由は細胞内 Ca が非選択性に外向き流をますことが知られており, 最近のパッチ法による実験では pCa 6.8 ではカルシウム電流に大きな差をおこすことなく時間依存性の外向き流をますことが知られてきた (Sato et al 1985) 為である。方法の改良にともなって新しい結果が生まれることが予測される興味深い分野といえよう。

〔発表〕 Jpn. J. Physiol 34, 599-611, 1984.

今年度中に次の 3 総説が出版された。その 1 は J. Mol. Cell, Cardiol 16, 777-781, 1984 に発表された哺乳類心筋のペースメーカー電流についてで入沢と野間が editorial review として報告した。第 2 は単一心筋細胞の電気生理についてであって, 入沢が Jpn. J. Physiol, 34, 375-388, 1984 で J. J. P. にミニレビューが出来たことによって報告したものである。

さらに Dr. Sperelakis の Physiology and Patho-physiology of the Heart が出版され，その中の
分担としてペースメーカー電流について入沢，野間，国分，倉智の執筆になる一章が印刷された。

生体システム研究部門

大森治紀（生理研）

概要

本研究部門では、感覚受容細胞の機能、特に物理化学的エネルギーを電氣的エネルギーに変換する過程に興味を持って研究を進めている。本研究部門は、59年度末に設立され、これから研究に着手する段階であり本研究所における具体的な成果はまだ出ていない。従って以下に述べることは過去の研究成果と現在の研究課題である。

研究の対象としてヒヨコの内耳から単離した有毛細胞を用いる。有毛細胞は、音波、重力、加速度などによって感覚毛に加わる機械刺激をトランスデューサー電位に変換し、シナプスを介して中枢神経系に感覚情報として伝達する機能を持つ。膜電位固定下に、ガラス棒を用いて機械的に感覚毛を刺激することによって以下の事実が明らかになった。①トランスデューサー・イオン・チャンネルの開閉と感覚毛に加わる機械刺激の方向性との関係。即ち、機械エネルギーに応ずるゲート機構の性質。②トランスデューサー・チャンネルのイオン選択特性。③単位トランスデューサー・チャンネルの伝導度。こうした三種類の情報は、一般のイオンチャンネルを定義する i) ゲート, ii) イオン選択性フィルター, iii) 単一チャンネル伝導度にそれぞれ相当し、トランスデューサー・チャンネルのイオン透過性チャンネルとしての性質は既に明らかになったものと考えられる。

トランスデューサー・チャンネルでの機械エネルギーから電気エネルギーへの変換過程の解明を今後の目的の一つとし、以下の三点を当面の具体的な研究課題としたい。①エネルギー変換機構の周波数応答特性の解明。②感覚毛に加わる機械的偏位量と出力としての電圧、あるいは電流との定量性の解明。③有毛細胞体上でのトランスデューサー・チャンネルの存在部位の確認。

高次液性調節研究部門

概要

高次液性調節部門では無麻酔・行動下の動物（主にサル）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）で始まる摂食課題時の視床下部外側野および前頭眼窩野のニューロン活動を記録し、両部位の機能の違いを考察した。またサル扁桃核のオペラント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、グルコース、モルフィンあるいはカテコールアミン（ノルアドレナリン、ドーパミン）に感受性を有する神経群がそれぞれ特定の行動と相関した神経活動変化を示すことを明らかにした。本年度はさらに、脳幹の青斑核の摂食行動時のニューロン活動を調べた。なお昨年度に続き、性行動の中枢制御機構の解明をめざして、性行動時の視床前野や視床下部のニューロン活動を調べた。また新たに上記部位の電気刺激実験を開始した。

サル視床下部外側野ニューロンの摂食行動時の活動様式 およびカテコールアミンとオピエートの関与

大村 裕，西野仁雄，栗生修司（生理研），Carlos P. Salaman（九大・医）

視床下部外側野（LHA）には、ブドウ糖をはじめ、インスリン、遊離脂肪酸、生体アミンなどの生理活性物質に感受性をもつ化学感受性ニューロンが存在する。このニューロン群は内外の種々の情報（視覚・聴覚・味覚・嗅覚・内臓情報など）を統合し、摂食行動の体液性および神経性調節機構の中心に位置する。本研究では、レバー押し摂食行動下の、1）LHAニューロン活動、2）ニューロン活動と行動の相関および、3）カテコールアミンとオピエートの影響について調べた。摂食行動は、i）手掛かりランプ点灯（タスクの開始）、ii）レバー押し、iii）手掛かり音（報酬予告音）、iv）摂食、の各事象からなる。ニューロン活動はカーボンファイバーを充填した特殊多連微小電極により記録し、薬物は電気泳動的に投与した。

グルタミン酸の投与により活動が促進された171個のニューロン中94個（55％）は、上記摂食行動の事象のいずれか一つあるいはそれ以上に応答した。このうち15個（16％）は手掛かりランプに、73個（78％）はレバー押しに、17個（18％）は手掛かり音に、48個（51％）は摂食期に応答した。ドーパミンは興奮性と抑制性の両作用をもち、ドーパミンに感受性を示す（ドーパミン感

受性)ニューロンは非感受性ニューロンに比べ手掛かりランプおよび摂食によく応答した。この手掛かりランプ応答はスピペロンで拮抗された(図1, A)。ノルアドレナリンおよびモルフィンは主に抑制的に作用し, ノルアドレナリン感受性ニューロンは手掛かり音および摂食に, モルフィン感受性ニューロンはレバー押しおよび摂食によく応答した。そしてレバー押し期の応答はソタロールで(B), 手掛かり音応答はフェノオキシベンザミンで(C), 摂食期の応答はナロキソンで拮抗された(D)。

以上のようにレバー押し摂食に応答したLHAニューロンの多くはカテコールアミンおよびオピエートに感受性を示した。ドーパミンはタスクの開始に, ノルアドレナリンは動因の減弱に, オピエートは摂食時の報酬の認知に重要と考えられる。

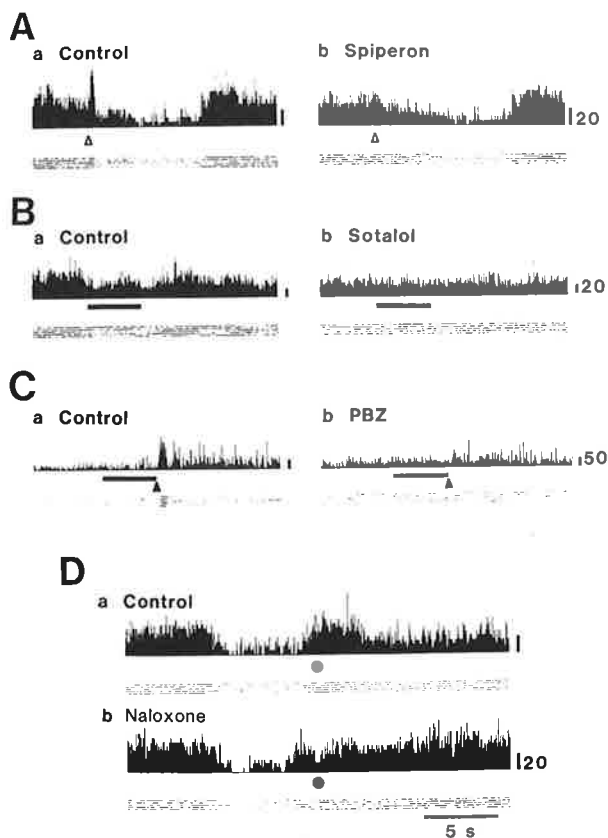


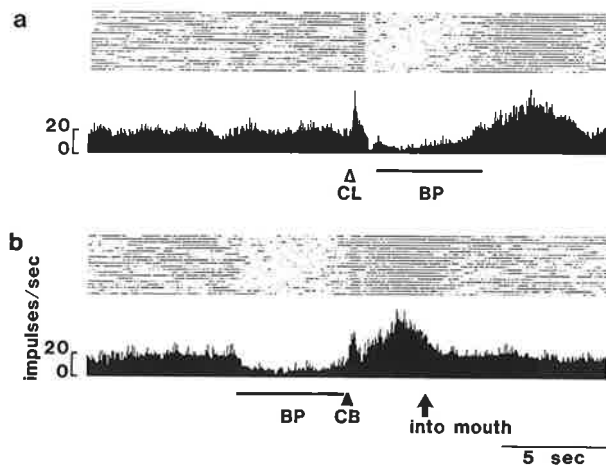
図1. サルLHAニューロンのレバー押し摂食行動に対する応答と遮断薬の作用。手掛かりランプ(Δ)に対する応答はスピペロンで(A), レバー押し期の反応はソタロールで(B), 手掛かり音に対する応答はフェノオキシベンザミンで(C), 食物が口に入り($\bullet$)その後の摂食中の応答はナロキソンで拮抗された。

サル青斑核の摂食課題時におけるニューロン活動

藤田一郎, 栗生修司, 山本智矢, 中野保彦, 西野仁雄, 大村 裕 (生理研)

青斑核 (LC) は橋被蓋背側部に位置し, その軸索を, 大脳皮質・扁桃体・視床下部・小脳・脊髄等へ広く投射している。LC の機能については, 従来, 睡眠-覚醒, 脳内自己刺激, 呼吸等に関与すると言われてきている。また, ノルアドレナリンが摂食行動やそれに関わるニューロンの活動に影響を及ぼすことから, ノルアドレナリン起始核の一つである LC が摂食行動に関与している可能性がある。しかし, 行動中の動物の LC ニューロンの活動を調べた研究は極めて少なく, 機能については不明の点が多い。そこで本研究では LC の摂食行動における働きを検討する目的で, 無麻酔ニホンザルの LC より, レバー押し摂食課題 (後述) 時の単一ニューロン活動を記録した。

LC ニューロンからの記録は, 記録電極から局所電気刺激 ($10-50 \mu A$, $500 \mu s$, 5 または 100 パルス) を行ない, 誘発される行動応答により電極先端の位置を推定し, そこから脳地図に基づいて電極先端を LC へ移動するという方法で行なった。例えば, 顔面神経, 外転神経核, 三叉神経運動核の刺激により, それぞれ, 顔面筋収縮, 眼球運動, 顎運動がひきおこされ, 良い指標となった。本実験で用いた摂食課題は, 手がかり光刺激によりサルがレバー押しを開始し, 20 回のレバー押しを行なうと, 手がかり音刺激に続いて報酬 (餌) がサルに与えられるというものであった。



青斑核ニューロンの摂食課題中の活動変化。

a は手がかり光刺激 (CL) の時点で, b は手がかり音刺激 (CB) の時点でトリガーした, ラスター表示 (上段) とヒストグラム (下段) を示す。両例とも 20 回の試行の加算。横線 (BP) はレバー押し期間を示し, 太い矢印は餌を口に入れた時点 (20 回の試行の平均) を示す。

記録した21例のLCニューロンのうち、16例(76%)は光刺激に、11例(52%)は音刺激に対して一過性の活動上昇を示した。8例(38%)は光および音の両刺激に対して活動上昇を示した。レバー押し中には6例(29%)が活動低下を示し、活動上昇を示すものはなかった。餌の呈示の際に活動上昇を示すものが16例(76%)、活動減少を示すものが1例(5%)あった。餌を口に入れた後の摂餌中には、6例(29%)が活動上昇を、2例(9%)が活動減少を示した。図は、LCニューロンの上記課題中の活動変化の一例を示す。このニューロンは、光刺激および音刺激で一過性の活動上昇を示し、また、餌が呈示された時にも大きな活動上昇を示した。レバー押し中には活動減少が見られ、摂餌中には活動変化はなかった。

以上のように、LCニューロンの殆んどは、視覚または聴覚の入力を受けており、また餌の呈示に対しても高率に応答した。即ち、LCニューロンは、外界の変化に敏感に対応して活動変化を示すと考えられる。レバー押し期は、サルが餌を要求している時期であり、また運動を行なっている時期であるが、この時期に活動上昇を示すニューロンは見つからなかった。この点については、記録ニューロン数が少ないので今後さらに検討を要する。

サル前頭眼窩野及び視床下部外側野の摂食行動の発現に果たす役割

山本智矢, 中野保彦, 西野仁雄, 粟生修司, 大村 裕 (生理研)

前頭眼窩野(OBF)は情動行動に、また視床下部外側野(LHA)は摂食行動の調節に重要な役割を持っていることが知られている。両部位は電気刺激によって発声行動が誘起され、また発声行動の最高中枢である帯状回とも線維連絡を持っている。

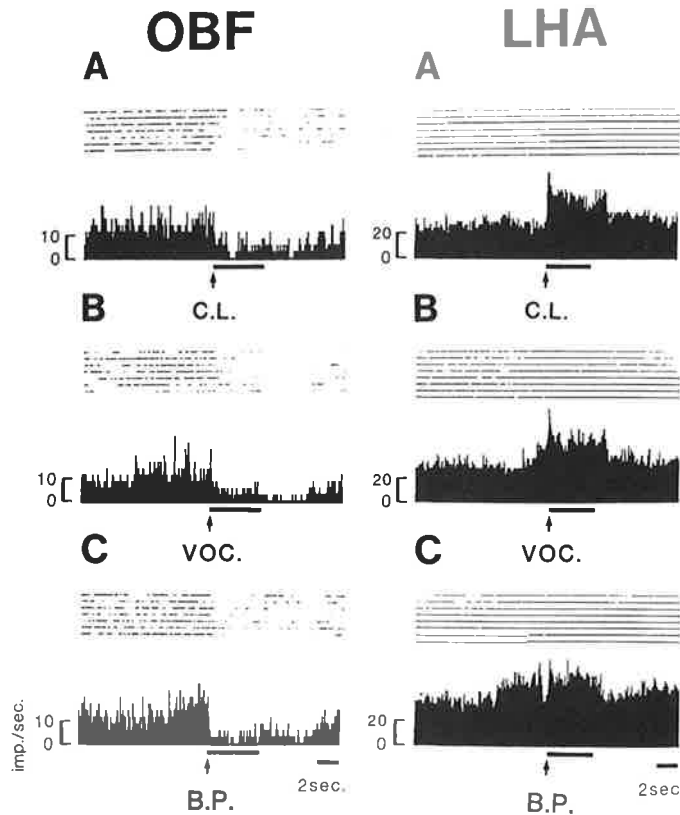
われわれはこの両部位の摂食行動発現の動機づけに果たす役割を解明するためにサルの要求によって始まる摂食課題を考案し、課題遂行時の単一ニューロン活動を記録した。この課題ではサルが課題の開始を発声行動またはレバー押しによって要求するとサルの前のパネルに赤ランプが点灯する。このときサルがレバーを30回押すと報酬予告音の後に報酬(食物)が与えられる。OBFでは58個、LHAでは55個のニューロンから安定な記録を得た。

その結果OBFでは24%(14個)のニューロンが課題開始を要求する発声に先立つ活動変化を示した。そのうち14%(8個)が活動上昇であり、10%(6個)が活動低下であった。LHAでは38%(21個)のニューロンが発声に先立つ活動変化を示し、その大半(35%, 19個)が活動上昇であった。

このような変化を示すニューロンのうちOBFでは78%、LHAでは80%のニューロンはレバー押しで課題開始を要求する摂食課題でもレバー押しに先立つ活動変化を示した。課題遂行時の活動様式はOBFのニューロンの方がLHAのニューロンより複雑である傾向があった。また発声に先立つ活動変化を示すニューロンの全例が発声に引き続く期間に何らかの活動変化を示したのに

対し、発声に先立つ活動変化を示さないニューロンのうち OBF では76%, LHA では62%のニューロンしか課題遂行中の活動変化を示さなかった。

また活動変化の開始が発声に対してどの位先行するかについて分析した。OBFでは先立つ活動上昇を示すものは -2530 ± 690 msec, 先立つ活動低下を示すものは -1860 ± 660 msecであった。



サル前頭眼窩野 (OBF, 左側) 及び視床下部外側野 (LHA, 右側) ニューロンの3種類の摂食課題遂行中の活動変化。上段はラスタ表示, 下段はヒストグラム表示。A, B, Cは同一ニューロンからの記録。A, ランダムに手掛け刺激の赤ランプ (C.L.) が点灯するとサルはそれに応じてレバーを30回押し (下線部), 報酬を得る。B, サルが発声 (VOC.) するとランプが点灯し, レバー押しの後, 報酬が与えられる。C, サルがレバーを押すと (B.P.) 赤ランプが点灯し, レバー押しの後報酬が与えられる。この OBF ニューロンは赤ランプ点灯からレバー押し期に活動低下を示すが (A), サルの要求によって始まる課題 B, C では発声 (B), レバー押し (C) に数秒間先行する活動上昇を示す。LHA ニューロンは発声 (B), レバー押し (C) に先行して活動が上昇するが, その上昇はレバー押し期まで続いている。これらのニューロンは摂食課題の発現に関係していると考えられる。

また LHA についてはそれぞれ -2320 ± 1280 msec, -1020 ± 39 msec であった。

これらの結果から以下のことが示唆された。

- ① OBF および LHA で記録された発声に先立つ活動変化は課題遂行に随伴した変化ではなく摂食課題を発現させる基本的な機構に関係している。
- ② OBF と LHA では課題発現に対する役割が異なり、OBF ではより複雑な処理がなされている。

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 カテコールアミン作動系の役割—扁桃体におけるカテコールアミン系の機能的意義

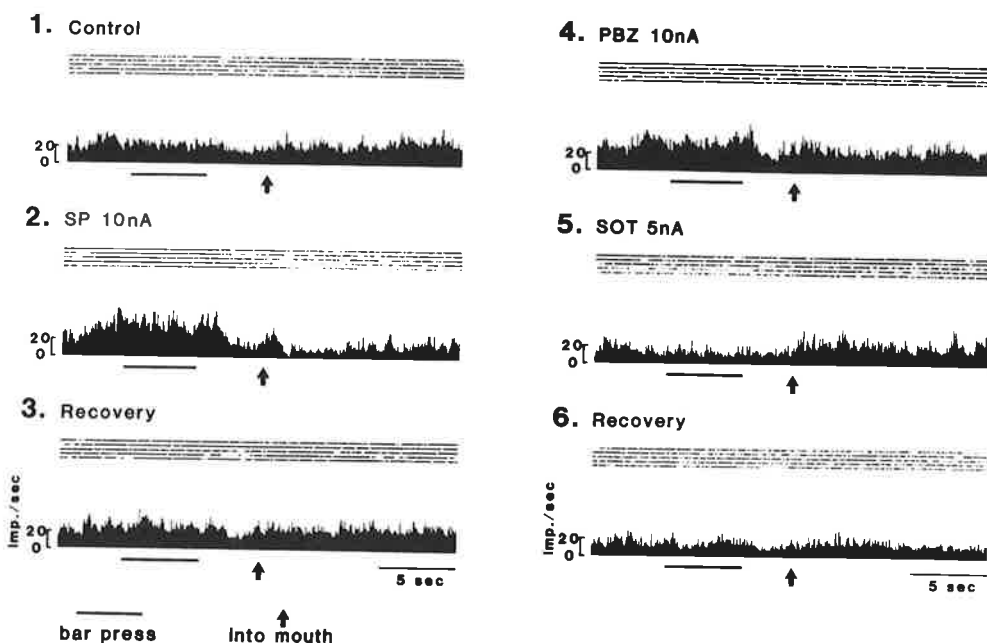
中野保彦, 大村 裕, 西野仁雄, 栗生修司 (生理研)

Laszlo Lenard (Pecs 医大), 山本智矢, 根本清二, 青柳和彦

Plata C. Salaman (九大医・一生理)

昨年度の共同研究により、我々はオペラント摂食行動時のサル扁桃体ニューロンの活動様式を同定すると共に、扁桃体に豊富に存在する各種神経化学物質の感受性を検討した。今年度は特に報酬に関連した行動及び学習、記憶の形成に関与するといわれているカテコールアミン (CA) 作動系に注目し扁桃体におけるその機能的意義について検討した。手掛け光刺激によりサルがレバー押しを行ない、一定回数 (FR 20) ののちに、手掛け音刺激に続いて餌が呈示されるというオペラント摂食課題を用い、その間の単一神経活動を記録するとともに、電気泳動的にノルアドレナリン (NA)、ドーパミン (DA) およびそれらの遮断薬を投与し反応性を調べた。摂食課題時の変化を調べた292個のニューロン中、198個 (68%) がいずれかの時期に対応した活動変化を示した。これを各時期に分けて比較すると、手掛け光刺激、レバー押し期、手掛け音刺激、報酬期にそれぞれ全体の21%, 43%, 6%, 24%が反応を示した。すなわち扁桃体ニューロンは従来指摘されていたような、報酬に関連した感覚刺激に相動的に反応するだけでなく、レバー押し期、報酬期にも持続性の変化を示すことが明らかとなった。自発性神経活動に対し投与した NA は主に活動の抑制を、一方 DA は約 2 : 1 の割合で活動の促進と抑制をきたした。また NA の抑制効果は α -遮断薬であるフェノキシベンザミン (PBZ) または β 遮断薬であるソタロール (SOT) で拮抗され扁桃体の NA レセプターは、 α 、 β 両方存在することが確かめられた。NA、DA に感受性を有するニューロンと、感受性をもたないニューロンとではタスク中の活動様式に大きな違いがみられた。NA 感受性ニューロンは非感受性ニューロンと比較して報酬期に活動の低下が観察されることが有意に多く、また逆に DA 感受性ニューロンは報酬期に活動の促進を示すことが有意に多かった。NA 感受性ニューロンにおける報酬期の活動低下は α 遮断薬では拮抗されず、 β 遮断薬の同時投与により消失した。また図に示すように一部のニューロンにおいては、報酬期に

NA および DA の両方の作用をうけ、結果的に活動変化が観察されないと考えられるものがありこの報酬期における CA 作動系の相反的役割が示唆された。以前より脳内 CA 系の化学的破壊により動物の各種条件付け行動の学習およびその学習後の記憶形成にさまざまな障害を起こすことが知られている。近年扁桃体および海馬の破壊によりサルにいわゆる短期記憶の障害モデルを作ること成功しており、記憶形成の重要な経路として扁桃体が注目されている。今回の実験結果はサル扁桃体において報酬期における神経情報処理が NA および DA によりそれぞれ反対の方向に修飾されている可能性を単一神経レベルで初めて明らかにしたものである。



報酬期の神経活動変化におよぼす NA および DA レセプター遮断薬の効果。

1～6 はすべて同一ニューロンよりの記録

1：報酬期（矢印以降）にはほとんど変化がみられない。2：DA 遮断薬（スビペロン, SP）投与により報酬期に著しい活動の低下が観察される。3：5 分後はば元のレベルに回復。4： α 遮断薬（PBZ）はほとんど影響を与えない。5： β 遮断薬（SOT）同時投与により全般に発火は減少したが、報酬期に有意の活動促進が認められる。6：20 分後、発火は依然として減少しているが報酬期の活動促進は完全に消失している。黒い太線、レバー押し。黒矢印、サルがエサを口に入れた時点を示し、これをトリガーとしたヒストグラムを示している。上段、ラスタ表示。下段、加算ヒストグラム（すべて 5 回の試行の加算）。

生理機能研究施設

超高圧電子顕微鏡室

超高圧電子顕微鏡の医学生物学への応用

有井達夫（生理研）

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対する共同利用実験が3年目に入った年度である。超高圧電顕の特徴を生かした応用研究の公募に対して全国から積極的な応募があり、年度を通して終始、活発な共同利用実験が行なわれた。これらは、主に、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の3課題に分けることが出来る。昭和59年度は、最終的に合計19課題が採択され実行された。これらの共同利用実験の成果に関しては、超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告の章に詳述されている。

実質的な超高圧電顕の利用日数は、共同利用実験等171日、修理、調整等39日であった。なお電顕フィルム使用枚数11,725枚、フィラメント点灯時間570時間であった。

超高圧電子顕微鏡室では、上記の共同利用実験計画を援助するとともに、これらの課題を支える各種装置の維持管理、解析法の開発、基礎データの集積、装置の開発等を重要な課題として次の共同研究を進展させて来た。

1. ステレオ像定量化に関連する画像処理解析について

超高圧電顕によるステレオ観察のための基本的諸量を前年度に引き続いて測定するとともに、試料中の三次元情報を解析するための処理法の開発に当って来た。視覚によるステレオ観察では、 $\pm \theta^\circ$ 傾斜の二枚の写真から、眼が対応点の自動認識を行い、対応点相互の視差から立体的情報を把握している。このため、この方法を、いかに計算機を用いた画像解析に応用するかが問題となる。

我々は、画像解析装置 Luzex5000を用い対応する2枚の電顕ステレオ写真を濃淡画像レベルで画像処理を行い特徴抽出を行って後、二値化画像を得た。さらに骨格化を行うことにより対応点の識別を容易とさせ、線状の物体においては、対応点の始点および終点を指示することにより平行投影近似の条件のもとに始点から終点までを任意分割して始点、分割点、終点の深さ方向の情報を求め、長さを決定することが出来るようにするとともに、二値化像を用い物体の形状に一定の近似を行うことにより表面積、体積等を測定出来るように計算機プログラムを発展させて来た。さらに、この方法による精度を超高圧電顕の諸条件、および、画像取り込み条件との関連におい

て検討を加えて来た。

通常、電顕写真においては、平行投影近似を用いることが可能であるので、解析法は比較的容易であるとされているが、その妥当性を検討するとともに、対物レンズの焦点距離はより長い方が有利であること、又、三次元座標決定にあたっては、対応点を決めることが出来れば、 $\pm 45^\circ$ 傾斜で、傾斜軸方向に直角の成分の値が同等の精度で決定出来ることを示すことが出来た。さらに計算機を用いて平行投影法によるモデル模様を作製し、回転した図形を得た後、上記の方法で解析することにより、対応点相互の位置の情報、表面積の測定が高精度で得られることを確認した。

しかし2枚のステレオ写真では、対応点決定に人為的操作が不可欠であり、今後より多くの写真を用いての自動追跡法開発が必要である。

Ⅱ．生物試料の高分解能観察について

昨年度より、シャッター法を超高圧電顕に用いた照射損傷低減法を提案し開発して来た。シャッター法自体が、当生理学研究所において超高圧電顕の分野に対して初めて成功した日常的に操作可能な自動均一露光法である。これは、超高真空排気系の実現に伴って初めて可能となったものであるが、これをさらに試料上部に設置した点に特徴があり、試料上及び回折レンズ下の電子線偏向系を用いることにより、試料を移動することなく照射時のみの高分解能写真の撮影が可能となった。この方法により有機物の単結晶であるアントラセンおよびナフトールイエローの2 Å台の格子縞の撮影に成功した。

又、当研究所に導入したパーキンエルマー社製高精度マイクロデンストメーターの設置及び、整備を行い、安定な運動形態を確立するとともにミニコンPDP11/34を用いて制御し、さらに一定の画像処理を行うと同時に、画像処理装置 Luzex5000と磁気テープを介して有機的に結合することに成功したので正確な光学濃度及び位置の情報を用いて画像処理解析を行えるようになった。今後、三次元画像解析、高分解能画像処理および未染色生物試料に対する画像処理を行うなどの積極的な応用が行えるであろう。

Ⅲ．生物試料の自然状態における観察について

クライオミクロームで作製した切片等を切片中の水分を蒸発させることなく観察するため、及び、常温における水分を含んだ状態の観察のための雰囲気試料室ホルダー開発に向けて共同研究を進めている。

又、自然状態における試料は、通常、染色剤としての重金属を伴わないためコントラストに乏しい。そこでこれらの像に対しては、照射損傷を防ぎつつ画像処理を行い濃淡を強調することが必要である。このため、超高圧電顕に直結したイメージインテンシファイヤーからの像を、各画素当り16bit (2^{16}) の深さを持つイメージフレームメモリーに取り込み・量子ノイズを取り除くとともに最小の照射量によるリアルタイム精算フレーム像の画像処理を可能とするシステムを開発中である。

組 織 培 養 標 本 室

古家園子（生理研）

概要

培養細胞の運動等の観察や記録は従来16mm 撮映装置で行っていたが今回、高感度カメラ及びタイムラプスビデオシステムに切り替えた。又、従来は分散された細胞の培養が主であったが、組織片や器官細胞も行えるよう、実験室の整備を進めている。

研究報告：神経グリア雑種細胞におけるセロトニンの合成と輸送

古家園子（組織培養標本室）

コリン作動性及びセロトニン作動性の性質をあわせもつNG108—15細胞において、セロトニンがどこで合成され、どの様に輸送されるかを、セロトニンの前駆物質である $[^3\text{H}]$ トリプトファン及び $[^3\text{H}]$ 5ヒドロキシトリプトファンを用いて顕微鏡及び電顕オートラジオグラフィーで観察した。

$[^3\text{H}]$ トリプトファンは細胞体で取り込まれ、後、突起に輸送されたが、 $[^3\text{H}]$ 5ヒドロキシトリプトファンは細胞体、突起をとわず、取り込みが見られ、チェイスにより突起に集中した。5ヒドロキシトリプトファンからセロトニンを合成する芳香族アミノ酸デカルボキシラーゼ活性を阻害すると、突起への集中はみられなくなること、 $[^3\text{H}]$ 5ヒドロキシトリプトファンを取り込んだ細胞を4℃でチェイスした場合、やはり突起への輸送はみとめられないことから、NG108—15細胞においてはセロトニン前駆物質はセロトニンになってから突起へ能動輸送されることが明らかになった。その際、含粒小胞（dense core vesicles）に含まれて輸送されるのか否かについては、目下、電顕オートラジオグラムの統計処理を行って検討中である。

動物実験施設

概要

動物実験施設は、陸生動物室及び水生動物室から成り、生理研・基生研で使用される実験動物の飼育と供給、並びに動物実験を行なうことを主な目的としている。研究手段の精密化・多様化にともなって、使用される実験動物も多種類・高品質のものが要求され、また飼育管理の程度も一段と質の高いものが期待されてきている。一方、自然界からの動物の採捕は今後ますます困難になるものと予想され、良質の個体の確保と共に、実験動物の開発や飼育技術の改良・開発が切実な課題となっている。実験動物をめぐる環境には、このほか感染症の予防や、人と動物の健康管理、飼育機器、設備の整備、労働力の確保など様々な問題をかかえている。このような状況をふまえて、現在(1)先天性 Aganglionosis rat の育成と無神経節腸管の病態に関する研究、(2)モルモット大脳皮質からのシナプス小胞の抽出と精製及び同定、(3)無脊椎動物の受精卵・胚の保存技術の開発と改良、(4)閉鎖循環方式による水生動物の長期飼育期間中の水質の維持とモニタリングなどの課題について、それぞれ取組みを進めている。

先天性 Aganglionosis rat の育成と無神経節腸管の病態に関する研究

尾崎 毅（生理研）

食物の消化や吸収にあずかる腸管の運動は、腸管の壁内神経叢によって調節・制御されており、腸管運動の中核のような役割を演じている。そして、この神経叢の機能不全は、腸管運動に重大な障害をもたらし、ヒトの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よって生ずる巨大結腸症の名で知られ、病因の解明が待たれている。近年、本邦で発見された先天性 Aganglionosis rat は、ヒルシュスプルング病類似の症状を現わし、同病のモデル動物として注目される。本研究は、このラットの腸管を用いて、壁内神経叢の発達と機能との関連を明らかにしつつ、腸管運動調節のメカニズムの解明を行なおうとするものである。

研究に用いるラットは、昭和56年に雌雄2組を導入し、これをもとにクローズドコロニーとして繁殖を行なった。ラットの Aganglionosis は、劣性遺伝子の支配による致死性の遺伝病であるので、繁殖には、同病の因子をヘテロに持つ個体を親として維持していく必要がある。現在、F₄ 及び F₅ 世代のオス16匹、メス32匹を種親として維持、繁殖に供している。F₂ 世代から F₅ 世代のこれまでの繁殖成績は、別表に示すとおりである。一般のラットの受胎率、分娩率（80%以上）に比べて、このラットの分娩率はかなり低い。産仔数においても平均（8以上）をかなり下まわる。繁殖成績の改善をはかるため、F₃ 世代以降のものについて、成績の悪いものを淘汰し、

産仔数の多い個体を選抜していった結果、世代が下るにつれて、産仔数、分娩率とも若干の成績の向上が認められた。一般に、近親交配を長く続けることによって近交係数が上昇すると、産仔数は減少すると言われているのでこのコロニーの近交係数が高くなっている事が考えられる。しかしながら分娩率が同時に低い事は、遺伝形質に関わる繁殖障害要因が存在する事も考えられ、この点について今後検討する必要がある。

Aganglionosis rat の無神経節腸管の病態については、形態学的検索とあわせて、腸管の機械的活動性に対するアセチルコリン、サブスタンス P、VIP などの生理活性物質の効果について検討をすすめている。

表 1 . Aganglionosis rat の繁殖成績

世 代	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	計
交 配 回 数	157	305	161	65	688
分 娩 回 数	102	215	113	53	483
分娩率(%)	65.0	74.5	70.2	81.5	70.2
総 産 仔 数	590	1162	627	330	2709
平均産仔数	5.8	5.4	5.5	6.2	5.6

シナプス小胞の分離精製とそのモノクローナル抗体について

西江 弘（順天堂大・医），小幡邦彦（郡大・医）

尾崎 毅，内菌耕二（生理研）

モルモット大脳皮質からシナプス小胞を分離精製した。皮質ホモジェネートから、まず粗製シナプトソーム画分（P₂）を得た。氷冷したリン酸緩衝液（10mM,pH7.3）に P₂ を再懸濁し、約30分保持することによって低浸透圧処理を行った。その間、細長いステンレス針を装着した注射筒を用いて吸引、噴出をくり返してシナプトソームからのシナプス小胞の放出を促進させた。その後、ショ糖密度勾配超遠心を2回施すことによって電顕的にきわめて純度の高いシナプス小胞画分を得ることができた。低浸透圧処理後の P₂ 再懸濁液はシナプス小胞以外の成分が大部分であるから、1回目の密度勾配超遠心によって不要な成分を可能な限り除くことが、2回目の密度勾配超遠心による精密な分画を助ける。1回目の超遠心後、0.32Mの上限界面の白濁バンドから0.32M—0.45M界面の白濁バンドまでを採取し、超遠心によりペレットにした。これを再懸濁して、密度勾配超遠心に重畳して2回目の超遠心を行った。0.16Mから0.32Mの層を採取し、電顕用ホルムバール膜グリッド上に分散させ、1%酢酸ウラニール液でネガティブ染色し電子顕微

鏡で観察した。2回のショ糖密度勾配超遠心によって精製採取したシナプス小胞画分はきわめて純度が高かった。シナプス小胞の直径は、320Å から650Å までの分布を示し、その中心部は高い electron-density を示すものが多かった。小さなものでも中心部の密度の高いものが多く見られた。中心部の密度の低いものもかなり有り、大きさは大小さまざまであった。二次元電気泳動による分析では、7個の主要な蛋白成分とその他の微量成分が観察された。シナプス小胞に対するモノクローナル抗体を作製させたところ6種の抗体(171B 5, 171E 8, 174D 12, 174H 11, 177A 2, 177H 11)が同定された。これらの抗体が結合するシナプス小胞の成分は、分子量が約40,000の蛋白であることも明らかにされている(SVS-40 proteinと命名されている, Obata et al., in preparation)。分離したシナプス小胞と前記抗体との反応は、アビジン化フェリチン粒子をマーカーにして電子顕微鏡的免疫反応法によって確認した。フェリチン粒子マーカーが“halo”状にシナプス小胞に結合しているのが明瞭に観察された。又、抗体のシナプス小胞に対する反応はきわめて特異性が高いこともわかった。

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活動に協力し、技術的な支援をするための所長に直属した専門組織である。昭和59年度には1名の増員が認められ、技術課の職員は計21名になった。

技術課の技官は、日常それぞれの担当職場に出向して専門業務に従事しているが、生理研サブリショップの管理など、研究所の維持や運営にかかわる共通的な業務にも従事している。また、技術課として技官相互の意思の疎通を計り、技術力を高めるための自主的な活動も実施しており、前年度と同様に、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などがその活動の主な柱となっている。

技術課ミーティングは毎週月曜日の朝（8：40～9：40）、技術課室に集合して種々の技術事務の打合せや研修を実施している。

生理学技術研究会は、本年度は第7回を昭和60年2月15日（金）～16日（土）の両日開催した。今回は初日に一般的な技術発表、2日目には専門別の分科会を企画した関係で技官の関心も高く、28医学系大学や医学部、研究所などから50数名の技官の参加があった。2日目の専門別の分科会では“これから求められる技術者像”を統一テーマにして第一分科会（生化学、R1管理、分析機器関係）、第二分科会（医用電子、電気生理、機械工作、電子計算機関係）、第三分科会（電顕操作、試料作製、写真技術関係）、第四分科会（実験動物飼育、管理関係）に別れて、それぞれ専門的な立場で討論し、その結果は各分科会の代表者が全体会議で内容の報告を行なった。



第7回生理学技術研究会（昭和60.2.15～16）

なお、第7回生理学技術研究会の詳しい内容と昭和59年度における技術課の活動内容については「生理学技術研究会報告」第7号においてとりまとめられ、昭和60年7月に発刊の予定である。

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取り組む研修活動で、技術課の技官は、企画されたプロジェクトのいずれかの一つに参画して研修することにしており、昭和59年度には次のプロジェクトを実施した。①走査電顕班、②HPLC班、③機器分析班、④スライド作製班。なお、これらのプロジェクト活動を通して修得した内容については「生理学技術研究会報告」の第7号の中の「生理研技術課プロジェクト活動」の中で報告されるし、成果を得たものについては「技術課技術報告」にまとめられる。技術課技術報告の第2号は、小原正裕技官他による「マルチ電極作製用プラー開発プロジェクト」(B5, 12pp.)を発刊した。

昭和59年2月に開催した第6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6号：1～60(B5, 9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、昨年度から技官が2名となり、委員長は昨年に引続いて金子教授が担当された。当試作室の運営も次第に軌道に乗り、研究者からの工作依頼件数は昨年に比べ2倍強となり、ペルティエ素子用熱交換器、サル摂食課題自動訓練装置、ガラス電極研磨機などの製作にもあたっている。本年度は、当試作室で軽度ではあるが機器破損事故が1件、フライス盤による指の創傷事故が1件あったため、その後は工作技術指導及び、機器・工具等の整備をして事故の再発防止に努めている。また、利用者に対しても事故再発防止をアピールし、非常時の連絡体制の充実(非常ベルの設置・電話改良工事等)も安全対策上行なった。

機器研究試作室委員会は、今年度2回行なわれ、以下のようなことが話し合われた。

5月8日(火)

- 58年度の予算執行報告及び、59年度の予算執行計画について
- 一般工作室に作業衣・腕カバー・安全メガネ等を設置することについて
- 名称変更の件を両研究所の教授会にはかることについて
- 事故防止のために、一般工作室に利用者に対する注意書きを作ることについて
- 共同研究者や大学院受託学生の方たちの機器研究試作室の利用について
- 一般工作室の利用時間及び、施錠について

12月18日（火）

- 名称変更が正式に認められたことの報告
- 12月6日に起こったフライス盤による創傷事故についての報告・経過及び、今後の事故再発防止について
- 8月16日に起こった施盤破損事故の報告及び、機器研究試作室の設置機器破損の際の修理費の支払い及び、今後の事故対策について
- 機器研究試作室技官の技術向上について

なお、機器研究試作室の昭和59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59年度）

	ボール盤	フライス盤	旋 盤	帯鋸盤	切断機	横切盤	その他	合 計
4 月	10	7	21	11	4	3	27	83
5 月	22	28	22	15	11	9	43	150
6 月	32	30	23	12	10	8	38	153
7 月	41	36	20	17	17	11	49	191
8 月	27	15	16	17	10	12	33	130
9 月	12	11	7	10	2	9	24	75
10月	15	19	13	10	5	6	21	89
11月	19	26	19	13	11	3	26	117
12月	13	6	12	10	2	6	22	71
1 月	14	12	20	6	2	3	22	79
2 月	4	7	9	7	1	5	22	55
3 月	14	12	5	12	6	3	27	79
合計	223	209	187	140	81	78	354	1272

機器研究施策室利用人数表

(昭和59年度)

	生理研 (人)	基生研 (人)	その他 (人)	合 計	延べ時間
4 月	39	8	6	53	113
5 月	65	13	2	80	248
6 月	85	6	1	92	271
7 月	100	8	2	110	276
8 月	68	7	2	77	112
9 月	36	7	4	47	62
10月	37	8	2	47	86
11月	60	3	3	66	105
12月	31	13	2	46	77
1 月	30	11	0	41	75
2 月	25	11	0	36	54
3 月	36	8	1	45	160
合計	612	103	25	740	1639

部門別利用状況

機能協関	111名	液性情報	103名	高次液性調節	78名
神経情報	73名	動物実験施設	70名	高次神経機構	65名
高次神経性調節	55名	電子顕微鏡室	12名	超微小形態生理	12名
生体膜	11名	技術課	11名	細胞内代謝	8 名
情報記憶	2 名	超高圧電子顕微鏡室	1 名		

エネルギー変換機構	19名	大型スペクトロ	14名	生殖	14名
行動制御	9 名	R I 実験施設	8 名	細胞増殖	7 名
感覚情報	6 名	分析室	6 名	情報制御	6 名
形態形成	4 名	計時機構	3 名	技術課	3 名
細胞機構	2 名	洗浄室	1 名	細胞分化	1 名

分子研その他 25名

2. 電子顕微鏡センター

大庭 明生

当センターは、昭和59年度をもって、7年間に亘る創設を終えた。この期間、各種の電子顕微鏡、附属装置、周辺機器を整備し、様々な研究内容に対応する為の体制をつくりあげた。

特に、装置の面で、昭和57、59年度において、従来のX線分析装置では検出できない超軽元素領域での検出感度が高い電子線エネルギー・アナライザーを附属させた透過型電子顕微鏡を配置し、細胞・組織内の元素の局在性の研究に新たな対応を考えた。また従来の高分解能、高倍率に主眼をおく電子顕微鏡の配置から、生物試料観察に必要な中低倍率で像のゆがみの少ない性能をもつ透過型電子顕微鏡と連続つなぎ合わせ写真の為のモニター・装置を配置し、生物の組織・臓器レベルの研究内容にも対応出来るようにした。

周辺機器では膜厚測定計付イオンコーターを配置し、高分解能走査電子顕微鏡観察の為の試料作製をより容易で、精密なものにした。

こうした中、センターを利用してなされた機構内の研究および外部との共同研究の件数は、55件あった。機構内で35件あり、国内で、大阪大学、順天堂大学を始めとして、16件あった。一方、国外では、アメリカ・メキシコ・フィリピンの外国研究者による利用が4件あった。下記の表はその大学・研究所と研究内容の一覧表である。

機 構 内

研 究 所	部 門	研 究 内 容
生 理 学 研 究 所	神 經 化 学	生体高分子機能の構造学的研究
	神 經 情 報	ガラス電極先端の二次電子像観察 カメ網膜視細胞の形態観察
	生 体 膜	神経膜構造の観察
	機 能 協 関	生体膜表面電荷の元素分析及び再構成膜の検定 イカ巨大神経の微細構造観察
	高 次 神 經 性 調 節	ガラス電極先端の二次電子像観察 心筋細胞の観察
	高 次 神 經 機 構	中枢神経系形態観察
	組 織 培 養 標 本 室	培養細胞の観察
	超 高 圧 電 顕 室	電顕像コントラストの解析
	動 物 実 験 施 設	シナプス小胞の観察
	技 術 課	昆虫類の表面構造の観察 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	動物組織及び培養細胞の微細形態観察 生体活性物質の分子構造の解析 動物細胞の組織構築及び培養下での形態形成の深 査 マウス胚の二次電子像観察 腫瘍細胞の観察 色素細胞及び色素胞の観察 細胞分画の観察, 細胞再集合体の観察
	生 殖	ウニ精子の先体反応の観察 魚類生殖巣の微細構造の観察 ヒトデ生殖細胞の微細構造の観察
	行 動 制 御	昆虫機械感覚毛の外部形態の観察 昆虫の筋肉・表皮の微細形態の観察 ショウジョウバエの感覚器の形態観察
	細 胞 増 殖	ウニ精子及び卵の微小管, ダイニンの観察 ウニ卵の微細構造の観察
	細胞内エネルギー変換	ラン藻細胞の微細構造の観察
	情 報 制 御	ミトクロムの構造と膜フィトクロムの存在状態 の観察
	細 胞 機 構	母性遺伝の機構の研究
	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

機構外（国内）

大 学 ・ 研 究 所	研 究 内 容
名古屋大学	脳浮腫のナトリウム，カリウム，カルシウムの局所元素分析 心筋の微細構造の観察 カエル筋紡錘感覚神経末端部の超微細構造の研究
東京都立大学	フィトクロムのロータリーシャドウィング観察
名城大学	果樹葉の葉緑体の観察
熊本大学	角膜内皮の培養栽培の観察
鈴峯女子短期大学	藻類の動物細胞内共生の観察
埼玉大学	フィブロイン遺伝子の観察
岡山大学	昆虫機械感覚毛の形態観察
順天堂大学	シナプス小胞の観察 筋肉のカルシウムの局在と元素組成の分析
立川短期大学	マウス海馬の細胞成分の観察
東北大学	昆虫視覚受容機構の形態観察
帝京大学	魚類生殖巣の分化過程の観察
大阪大学	シナプスの可塑性の研究
東京女子医大	カメ網膜視細胞と水平細胞間のシナプス結合の電顕的解析

機構外（国外）

大 学 ・ 研 究 所	研 究 者	研 究 内 容
フィリピン，国立水産研究所	J. D. Tan	卵成熟時における卵濾胞組織微細構造の観察
メキシコ，メキシコ大学	V. Tsutsumi	肝臓の amebic abscess formation の観察
アメリカ，インディアナ大学	F. W. Goetzi	金魚の卵濾胞組織の排卵時の微細構造変化の観察
アメリカ，ニューメキシコ大学	R. O. Kelley	色素上皮細胞の境界部のマイクロフィラメント束との結合部の微細構造の解析

3. 動物実験施設

小川 良斎

施設利用

陸生動物室

陸生動物室は実験室の利用が11部門のべ136件、飼育室の利用は18部門のべ38件（月）であった。搬入した動物は16種約6,000匹（昆虫は除く）と昨年度より大幅に増えている。またウサギ、ラット、マウスの長期飼育が増えておりこれは、免疫学的手法の生理学への応用が急速に普及しつつあることを反映しているものと思われる。飼育室の利用状況は年間を通して約80%と高く、とくにイヌ室、ウサギ室、マウス室では90～120%と高くなっている。

水生動物室

水槽及び飼育室の利用は10部門のべ11件、搬入した動物は18種約12,000匹（計数できないものは除く）であった。今年度より飼育室内の温度上昇（外気と機器等からの放熱）の対策として加熱冷却ユニットの水冷化（15基）の工事を行なった。主なるトラブルは、加熱冷却ユニットの冷媒抜け（2件）、加熱冷却ユニットのリレーこう着（15件）、その他貯水揚水ポンプの自動停止（過負荷による）等があった。貯水槽、利用実績については、別表を参照されたい。

検疫と治療その他

検疫は、イヌ27件、ネコ7件、サル6件の計40件について行なった。このうち検疫中に死亡したもの3件、治療を行なったもの4件はいずれも飼犬指導所由来のイヌで、死亡した3件と治療を行なったもののうち2件はパルポウイルス感染症の疑いによるものであった。

長期飼育中の動物における疾病の発生は、イヌ5件、ヤギ1件、ウサギ2件で、このほか、イヌ、ヤギで飼育室内における骨折事故各1件が発生している。原因不明の食欲不振（イヌ1件）を除き残りは全て細菌性または原虫による下痢症で全例治療によって治癒した。飼育中の動物の死亡事故としては、運動場で飼育中のビーグル犬3頭の凍死があり、前記の骨折事故と合わせて飼育施設に問題のあることが痛感された。その他咬傷或いは動物から人への感染事故などは起っていない。

手術・実験室月別利用件数

(昭和59年度)

室名 \ 月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	1	2	3	備 考
手 術 室	10	5	8	5	10	4	5	11	8	7	11	19	103	
生理実験室	* 3	1					1	1		1	1		8	長期使用を含む
生化学実験室						1		1					2	
測 定 室		6											6	
手術実験室	* 1												* 1	
解 剖 室	1												1	
レントゲン室	1			2	2	2							7	
そ の 他	* 1	3	1					1	2				8	長期使用を含む
計	17	15	9	7	12	7	6	14	10	8	12	19	136	"

*は長期使用

陸生動物月別動物種別搬入頭数

(昭和59年度)

動物種 \ 月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	計
ラ ッ ト	226	59	93	56	194	132	377	160	149	165	35	76	1722
マ ウ ス	170	53	104	114	122	98	185	109	115	117	117	183	1487
ヌードマウス	20	40	14	20	10				30		10		144
モルモット	37	57	77	60	132	127	119	81	78	64	104	65	1011
ウ サ ギ	25	9	15	9	17	10	9	5	6		21	18	144
ハムスター							2				13		15
イ ヌ	7	9	24	3					2			1	46
ネ コ	4				7		2		2	4		6	25
サ ル			8	3						1			12
ヤ ギ													0
カ エ ル	4	8	7		7			5					31
カ メ		50				79	100	48					277
ハ ト	66	23											89
ヘ ビ		20											20
コ オ ロ ギ			1000										1000
ザ リ ガ ニ	10			5									15
計	569	328	1342	270	489	446	794	408	382	351	300	349	6028

水生動物月別動物種別搬入数（昭和59年度）

動物種 \ 月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
ワ キ ン	217		55		20			50				200	562
コ イ			1							20			21
ア マ ゴ			13	11	30	41	36						131
ウ グ イ													
アメリカナマズ	18		30				24		80				152
マ ナ マ ズ										37			37
ド チ ザ メ	11							15					26
デ ン キ ウ ナ ギ							1						1
ゼ ノ ペ ス	23	8	26	18	50			10					135
イ モ リ		72											72
ウ ニ	300	400	60	90		180		45	100	500			1675
ヒ ト デ		1700				1100			2500			2000	7300
アメリカザリガニ	10			50							200		260
イ セ エ ビ	10									8			18
ワ タ リ ガ ニ										10			10
ホ ッ キ ガ イ			20										20
ヤ リ イ カ	30	23					28	41	14	83	86	66	371
カ メ		12											12
メ ダ カ			1000										1000

部門別・動物種別・搬入動物数（昭和59年度）

動物種	部門別	生体膜	機能協関	神経情報	液性情報	神経化学	細胞内代	生殖	感覚情報	細胞増殖	形態形成
ワ	キン			50	20			417	75		
コ	イ			21							
ア	マゴ							131			
ウ	グイ										
アメリカナマズ									152		
マ	ナマズ			37							
ド	チザメ				26						
デンキウナギ			1								
セ	ノバス	42					83	10			
イ	モリ										72
ウ	ニ									1675	
ヒ	トデ							7300			
アメリカザリガニ			260								
イ	セエビ		18								
ワ	タリガニ		10								
ホ	ッキガイ							20			
ヤ	リイカ		371								
カ	メ								12		
メ	ダカ							1000			

4. 電子計算機室

伊藤昭光

電子計算機室では、昭和58年度のミニコンピューター（VAX-11/750）導入を最後に、生理学研究所における電子計算機導入の当初計画が終了した。

昭和59年度においては、数年前より導入され始めたパーソナルコンピューターを使用したデータ収集やデータ解析、または汎用電子計算機やミニコンピューターの端末などに利用して行くことを検討し始めた。既に一部ではデータ収集やデータ解析に使用されているが、生理学研究所では従来ミニコンピューターをデータ処理システムにした構成が多く利用されて来ている。しかし、コンピューターにおける技術の進歩に伴ってパーソナルコンピューターの機能や能力が従来

のミニコンピューターに取って変わるほどに成った今、コストの面や操作性からも、見直されつつある。現在生理学研究所で使用されている例を二三上げてみると、マウスを使用した睡眠実験における24時間監視、従来ミニコンピューターで行っていたアナログデータの解析を同様にパーソナルコンピューターで行う、核磁気共鳴装置（NMR）等の測定装置から得られたデータを記憶媒体（磁気テープ等）に集録し、研究室にてそのデータの二次処理や解析を行う等である。

現時点では、ワードプロセッサ的な使い方がされていないが、実験にパーソナルコンピューターを組み込んで行くことを考えると共に中央のコンピューターとつなぐことによっていろいろな情報が得られるようにしたいと考えている。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59年度

	4月	5月	6月	7月	8月	9月
バッチジョブ	80	130	93	44	73	163
T S S	26	54	51	19	15	70
利 用 時 間	33:36	65:15	69:38	12:14	33:50	105:27
プリント OUT	834	1165	724	147	282	1183
	10月	11月	12月	1月	2月	3月
バッチジョブ	202	47	147	54	50	44
T S S	70	17	40	8	9	12
利 用 時 間	128:49	13:58	272:36	28:36	35:43	62:34
プリント OUT	1870	208	1497	360	212	281

(※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 報 告 (発表論文)

〔目 次〕

神経化学研究部門	107
超微小形態生理研究部門	107
細胞内代謝研究部門	110
生体膜研究部門	112
機能協関研究部門	113
能動輸送研究部門	114
神経情報研究部門	115
液性情報研究部門	116
高次神経機構研究部門	117
情報記憶研究部門	119
高次神経性調節研究部門	120
生体システム研究部門	121
高次液性調節研究部門	121
超高压電子顕微鏡室	127
組織培養標本室	127
動物実験施設	128

発 表 論 文

《神 經 化 学 研 究 部 門》

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

S. Ebashi (1984) Ca^{2+} and the Contractile Proteins: J. Mol. Cell Cardiol 16: 129-136.

S. Ebashi (1985) A New Simple Method of Preparing Actin from Chicken Gizzard: J. Biochem. 97: 693-695.

T. Obinata, T. Masaki, H. Takano-Ohmuro, T. Suzuki and T. Mikawa (1984) Myosin Light and Heavy Chains of Embryonic Chick Heart, Congenital Heart Disease: Causes and Processes. (ed. J. J. Nora and A. Takao.), Futura Publishing Co. New York: 113-121.

丸山 敬, 三川 隆 (1984) Ca^{2+} 結合タンパク質の検出法: 細胞 16(11) : 26-29.

《超微小形態生理研究部門》

Seo, Y., Yoshizaki, K., Nishikawa, H., Morimoto, T., Naruse, S., koizuka, I. & Watari, H. (1984) In vivo ^{31}P -NMR Studies on aerobic recovery of frog muscle following tetanus. Jap. J. Physiol. 34: 927-931.

Murakami, M., Seo, Y., Nakahari, T., Mori, H., Imai, Y. & Watari, H. (1984) Effects of Na^{+} depletion on fluid secretion and levels of phosphorus compounds as measured by ^{31}P -NMR inperfused canine mandibular gland. Jap. J. Physiol. 34: 587-597.

Naruse, S., Horikawa, Y., Tanaka, C., Hirakawa, K., Nishikawa, H. & Watari, H. (1984) In vivo measurement of energy metabolism and the concomitant monitoring of electroencephalogram in experimental cerebral ischemia. Brain Research 296: 370-372.

Tojo, H., Horiike, K., Shiga, K., Nishina, Y., Nozaki, M., Watari, H. & 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**: 1-6.

Tamatsu, H., Nakazawa, M., Imai, S. & Watari, H. (1984) ^{31}P -Topical nuclear magnetic resonance (^{31}P -TMR) studies of cardiotoxic effects of 5-fluorouridine (5-DFUR). Jap. J. Pharmacol. **34**: 375-379.

亘 弘, 成瀬昭二, 堀川義治, 田中忠蔵, 平川公義, (1984) In vivo ^{31}P -NMR による実験腫瘍の研究。放射線科 **3**(6): 376-382.

亘 弘 (1984) ^{31}P -NMR 映像法の展望。化学と工業 **37**(3): 236-237.

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 (1984) Topical magnetic resonance (TMR) による虚血脳の in vivo 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変化。BRAIN AND NERVE **35**(6): 603-609.

天野 肇, 河合憲治, 高橋捷充, 早野三郎, 長岡俊治, 曾我美勝, 亘 弘 (1984) ^1H -NMR によるソフトコンタクトレンズ水構造の研究。J. Jap. Contact Lens Soc. **26**(3): 237-244.

長岡俊治, 恵良聖一, 曾我美勝, 亘 弘, 志賀 潔, 赤坂一之 (1984) 高分解能 ^1H -NMR によるウシメルカプトアルブミンの構造変化に関する研究。岐阜大学医学部紀要 **32**(4): 663-679.

堀川義治, 成瀬昭二, 田中忠蔵, 樋口敏宏, 平川公義, 西川弘恭, 亘 弘, (1984) In-vivo ^{31}P -NMR 法による病態解析-TMR と Surface coil 法との比較—。NMR 医学 **4**: 128.

常岡 豊, 楠岡英雄, 井上通敏, 阿部 裕, 亘 弘 (1984) 左心室同期磷核磁気共鳴法による高エネルギー磷酸の心周期内動態の解析。NMR 医学 **4**: 132.

Sogami, M., Nagaoka, S., Shigemi, J., Era, S., Kuwata, K., Watari, H., Shiga, K. & Akasaka, K. (1984) ^1H -NMR studies on the water structure in gel of modified bovine plasma albumin (BPA). J. Physiol. Soc. Jap. **46**(8,9): 328.

Nishina, Y., Shiga, K. & Watari, H. (1984) On the structures of D-amino acid oxidase reaction intermediates. J. Physiol. Soc. Jap. **46**(8,9): 326.

Watari, H., Shiga, K., Nishina, Y., Seo, Y. & Nishikawa, H. (1984): Study on the Lohmann reaction in frog muscle by nuclear Overhauser effect of ^{31}P -phosphorus nuclear magnetic resonance. J. Physiol. Soc. Jap. **46**(8,9): 326.

Nagaoka, S., Era, S., Kuwata, K., Sogami, M., Watari, H., Shiga, K. & Akasaka, K. (1984) ^1H -NMR studies on various conformational states of bovine mercaptalbumin (BMA). J. Physiol. Soc. Jap. **46**(8,9): 327.

Watari, H., Seo, Y. & Murakami, M. (1984) Analysis of Lohmann reaction in living organs by phosphorus nuclear magnetic resonance. proceedings of International Symposium on Fast Reactions in Biological Systems: 82.

Nishina, Y., Shiga, K., Miura, R., Tojo, H., Miyake, Y., Yamano, T. & Watari, H. (1984) Resonance Raman study on the purple intermediates of flavoenzyme D-amino acid oxidase. Proceedings of the Ninth International Conference on Raman Spectroscopy: 152-153.

Shimoyama, Y. & Watari, H. (1984) Slow motional domain in the oriented multibilayers as revealed by saturation transfer ESR spectroscopy. Proceedings of 8th International Biophysics Congress: 84.

Murakami, H., Mori, H., Nakahari, T., Imai, Y., Seo, Y. & Watari, H. (1984) ^{31}P -NMR of canine salivary gland. Proceedings of 8th International Biophysics Congress: 315.

Watari, H. & Shimoyama, Y. (1984) Phase behaviors of saturation transfer ESR signals at high microwave field. Proceedings of 8th International Biophysics Congress: 83.

亘 弘, 下山雄平 (1984) リン脂質配向積層膜動的構造の EPR による解析. 生物物理 **24**: 236.

井上智子, 赤坂一之, 亘 弘, 阿部公恵, 甲斐莊正恒, 辻 尚志, 京極好正 (1984) プロトン緩和によるアミノ酸側鎖の存在状態—SSI の環状アミノ酸. 第23回 NMR 討論会講演要旨集: 232-235.

三浦 洌, 東条博雅, 三宅可浩, 山野俊雄, 亘 弘 (1984) D アミノ酸酸化酵素の複合体の共鳴ラマンスペクトルによる研究. 生化学 **56**(8): 953.

亘 弘, 二科安三, 志賀 潔, 下山雄平 (1984) 飽和移動電子スピン共鳴スペクトルの解析。
生化学 56(8): 996.

Nishina, Y., Shiga, K., Miura, R., Tojo, H., Miyake, Y., Yamano, T. & Watari, H. (1984)
Resonance Raman study on the complexes of D-amino acid oxidase. R. C. Bray et al. eds.
Flavins and Flavoproteins. Berlin: Walter de Gruyter: 291-294.

Tojo, H., Horiike, K., Shiga, K., Nishina, Y., Watari, H., & Yamano, T. (1984) Stoichiometry of
the self-association of D-amino acid oxidase R. C. Bray et al. eds. Flavins and Flavoproteins.
Berlin: Walter de Gruyter: 305-308.

《細胞内代謝研究部門》

Matsubayashi, S., Yanaihara, C., Ohkubo, M., Fukata, S., Hayashi, Y., Tamai, H., Nakagawa,
T., Miyauchi, A., Kuma, K., Abe, K., Suzuki, T. and Yanaihara, N. (1984) Gastrin-releasing
peptide immunoreactivity in medullary thyroid carcinoma. Cancer 53(11): 2472-2477.

Yanaihara, N., Sugiura, N., Kashimoto, K., Naruse, T., Yanaihara, C. and Solomon, T. (1984)
Synthetic and structure-function study on C-terminal segments of CCK and gastrin. Ulf
Ragnarsson ed. Peptides 1984. Stockholm; Almqvist & Wiksell International: 373-378.

Yamamoto, Y., Nokihara, K., Nishimura, K., Mochizuki, T., Yanaihara, C. and Yanaihara, N.
(1984) Synthesis of peptides related to α -subunit precursor of *Torpedo californica*
acetylcholine receptor and their immunological properties. E. Munkata ed. Peptide Chemistry
1983. Osaka: Protein Research Foundation: 263-266.

Nokihara, K., Yamamoto, Y., Tanaka, M., Mochizuki, T., Yanaihara, C. and Yanaihara, N.
(1984) Syntheses of PHM (Human PHI) and its related peptides. E. Munkata ed. Peptide
Chemistry 1983. Osaka: Protein Research Foundation: 303-308

Hoshino, M., Yanaihara, C., Ogino, K., Iguchi, K., Sato, H., Suzuki, T. and Yanaihara, N.
(1984) Production of VIP- and PHM (Human PHI)-related peptides in human neuroblastoma
cells. Peptides 5(2): 155-160.

Yanaihara, N., Yanaihara, C., Nokiara, K., Iguchi, K., Fukata, S., Tanaka, M., Yamamoto, Y., and Mochizuki, T. (1984) Immunochemical study on PHI/PHM with use of synthetic peptides. *Peptides* 5(2): 247-254.

Hoshino, M., Yanaihara, C., Hong, Y.-M., Kishida, S., Katsumaru, Y., Vandermeers, A., Vandermeers-Piret, M.-C., Robberecht, P., Christophe, J. and Yanaihara, N. (1984) Primary structure of helodermin, a VIP-secretin-like peptide isolated from Gila monster venom. *FEBS Lett.* 178 (2): 233-239.

Nokiara, K., Yanaihara, C., Iguchi, K., Fukata, S., Tanaka, M., Mochizuki, T., Tatemoto, K., Lundberg, J.M., Mutt, V. and Yanaihara, N. (1984) Synthesis of PHI (Peptide Histidine Isoleucine) and related peptides and immunochemical confirmation of amino acid residue in position 24 of PHI with use of the synthetic peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 106(25): 7909-7916.

Yanaihara, C., Matsumoto, T., Nishida, T., Uchida, T., Kobayashi, S., Moody, A.J., Orci, L. and Yanaihara, N. (1984) Chemical approach to develop glicentin C-terminal specific radioimmunoassay. *Biomed. Res.* 5 (Suppl.): 19-32.

矢内原千鶴子, 山下裕一, 松林 直, 大久保正士, 岩原邦宏, 矢内原 昇, 島崎英樹, 星野 稔 (1984) 神経ペプチド, GRP の作用. 脳-腸管ペプチド, 消化管ホルモン研究会編, 中外医学社: 212-223.

間中英夫, 矢内原千鶴子, 佐々木英夫, 矢内原 昇 (1984) 単離 rat 胰灌流系における insulin 放出動態に及ぼす VIP/PHI 関連 peptide の影響. *Peptide Hormones in Pancreas* 4, Biomedical Research Foundation: 171-180.

赤井裕輝, 矢内原 昇, 井口和明, 川村 誠, 矢内原千鶴子, 豊田隆謙, 後藤由夫 (1984) ラット単離胃灌流系における G34N 末端ペプチドの放出と胃前庭部粘膜におけるガストリン様物質の解析. *消化管ホルモン (N)*, 医学図書出版: 50-56.

矢内原 昇 (1985) 脳ペプチドの構造と生合成. *病態生理* 4(3): 171-179.

《生 体 膜 研 究 部 門》

Yamagishi, S. & Furuya, K. (1983) Effects of intracellular divalent cations on Na and K permeabilities in squid giant axons. Bretag, A. H. ed. Membrane Permeability: Experiments and Models. Adelaide: TECHSEARCH INC. 75-78.

Yamagishi, S. & Furuya, K. (1983) Effect of intracellular calcium on the excitation of squid giant axons. Proc. IUPS 15: 311.

Kawai, N., Saito, M., Miwa, A., Yamagishi, S. & Furuya, K. (1984) Effect of a spider toxin (JSTX) on the squid giant synapse. J. Physiol. Soc. Japan 46: 421.

Kukita, F. & Yamagishi, S. (1984) Rectification of K-channel in a squid giant axon induced by water flow. J. Physiol. Soc. Japan 46: 352.

Yamagishi, S. & Furuya, K. (1984) Effects of intracellular and extracellular Ca and other divalent cations on membrane excitability of squid giant axons. J. Physiol. Soc. Japan 46: 357.

Takata, K., Aarii, T., Yamagishi, S. & Hirano, H. (1984) Concanavaline A (Con-A) receptors in mouse macrophages demonstrated in thick sections with a 1,000 KV transmission electron microscope. Proc. Japan Acad. 60B: 273-276.

Takata, K., Aarii, T., Yamagishi, S. & Hirano, H. (1984) Use of colloidal gold and ruthenium red in stereo high-voltage electron microscopic study of Con-A binding sites in mouse macrophages. Histochemistry 81: 441-444.

Fukumoto, T., Kimura, H., Naito, M., Miyamoto, M., Yamashita, A. & Sugiyama, H. (1984) Monoclonal antibodies to rat liver cell membrane glycoproteins. Molec. Immunol. 21: 285-291.

Sugiyama, H., Yamashita, Y & Fukumoto, T. (1984) Characterization of monoclonal antibodies against acetylcholine receptors from *Narke japonica*. J. Biochem. 96: 1217-1221.

Urayama, S., Nakao, M., Nagamune, H. & Sugiyama, H. (1984) Coupling of membrane-bound and detergent-solubilized sodium- and potassium-activated ATPase to p-benzoquinone-trea-

ted microtiter plates. Anal. Biochem. 141: 194-198.

Conti, F., Inoue, I., Kukita, F. & Stuhmer, W. (1984) Pressure dependence of sodium gating currents in the squid giant axon. Eur. Biophys. J. 11: 137-147.

山岸俊一 (1984) 神経による情報伝達のしくみ。星猛編, 新生理学読本。東京: 日本評論社: 19-26.

八木沢 仁, 広野 力, 杉山博之 (1984) 生体膜成分としての受容体の検索-mRNA からの機能的受容体の再構成。臨床検査 28: 642-648.

杉山博之 (1984) ACh 受容体の構成と機能。医学の歩み 129: 882.

杉山博之, 広野 力, 山岸俊一 (1984) アフリカツメガエル卵母細胞への mRNA 注入によるイオンチャネルの誘導。生物物理 24: S 128.

久木田文夫, 山岸俊一 (1984) 水の流れのイオンチャネルに対する作用。生物物理 24: S 145.

西江 弘, 古家喜四夫, 志賀 潔, 山岸俊一 (1984) Tb イオンのイカ神経膜に対する作用。生物物理 24: S 146.

澄川勝美, 杉山博之 (1985) アセチルコリン受容体と遺伝子操作。蛋白質 核酸 酵素, 29: 1306-1316.

杉山博之 (1985) アセチルコリン受容体。大村・島津・伊藤編, 脳の構造と機能。東京: 医学書院: 258-268.

久木田文夫 (1985) 神経興奮と浸透圧。膜 (MEMBRANE) 10(1): 25-35.

《機能協関研究部門》

Watanabe, A. (1984) The optical activity signal recorded from a lobster nerve using a photoelastic modulator. J. Physiol. Soc. Jpn. 46: 351.

Terakawa, S. & Nakayama, T. (1984) Mechanical support of the excitable membrane by cytoskeletal proteins. *J. Physiol. Soc. Japan* **45**: 352.

Nakayama, T. & Terakawa, S. (1984) Affinity purification of Na-channels from the eel electric organ. *J. Physiol. Soc. Japan* **46**: 418.

Kimura, Y., Ikegami, A. & Stoeckenius, W. (1984) Salt and pH-dependent changes of the purple membrane absorption spectrum. *Photochem. Photobiol.* **40**: 641-646.

Kimura, Y., Fujiwara, M. & Ikegami, A. (1984) Anisotropic electric properties of purple membrane and their change during the photoreaction cycle. *Biophys. J.* **45**: 615-625.

Watanabe, A. (1984) The optical activity signal recorded from a lobster nerve using a photoelastic modulator. *J. Physiol. Soc. Japan* **46**: 351.

Terakawa, S. & Nakayama, T. (1985) Are axoplasmic microtubules necessary for membrane excitation? *J. Membrane Biol.* **85**: 65-77.

寺川 進 (1984) 巨大神経の細胞内圧測定法. *生物物理* **24**(4): 60-62.

中山 孝, 福嶋義博 (1984) Na^+, K^+ -ATPase の精製. *生化学* **56**(8): 963.

寺川 進, 田崎一二 (1985) 興奮—新しい解析法, 大村 裕, 島津 浩, 伊藤正男編集 脳の構造と機能 (上) 東京. 医学書院: 43-62.

《能 動 輸 送 研 究 部 門》

Abe, M. Yamazaki, N., Suzuki, Y., Kobayasi, A., Ohta, H., (1984) Effect of palmitoyl Carnitine on Na, K-ATPase and Adenylate Cyclase of Canine Myocardial Sarcolemma *J. Mol. Cell. Cardiol.* **16**(3): 239-245

《神經情報研究部門》

Tauchi, M., Yang, X.-L. & Kaneko, A. (1984) Depolarizing responses of L-type external horizontal cells in the goldfish retina under intense chromatic background. *Vision Res.* **24**: 867-870.

Kaneko, A. & Stuart, A. E. (1984) Coupling between horizontal cells in the carp retina revealed by diffusion of Lucifer yellow. *Neurosci. Lett.* **47**: 1-7.

Tachibana, M. & Kaneko, A. (1984) γ -aminobutyric acid acts at axon terminals of turtle photoreceptors: Difference in sensitivity among cell types. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 7961-7964.

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

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

Tachibana, M. & Kaneko, A. (1984) The blocking effect of L-glutamate on the anomalous rectifier K channels of solitary horizontal cells from *Carassius auratus*. *Neurosci. Lett. suppl.* **17**: S 163.

Tachibana, M. (1984) A voltage-clamp analysis of glutamate excitation in solitary horizontal cells isolated from goldfish retina. *J. Physiol. Soc. Japan* **46**: 435.

Kaneko, A. & Tachibana, M. (1984) Voltage-dependent membrane currents in solitary bipolar cells of the goldfish retina. *J. Physiol. Soc. Japan* **46**: 439.

Ohtsuka, T. (1984) Fluorescence from colorless oil droplets: A new criterion for identification of cone photoreceptor. *Neurosci. Lett.* **52**: 241-245.

Ohtsuka, T. (1984) Two chromatic types of cone photoreceptors containing colorless oil droplets in the turtle retina. *J. Physiol. Soc. Japan* **46**: 435.

Ohtsuka, T. (1984) Fluorescent oil droplets of cone photoreceptors in the vertebrate retina. *Dobutsu seiri* 1: 177.

Tauchi, M. & Masland, R. (1984) The shape and arrangement of the cholinergic amacrine cells in the rabbit retina. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 272: 101-119.

Tauchi, M. (1984) A cholinergic neurons in the retina. *Soc. Neurosci. Abstr.* 10: 922.

Tauchi, M. & Masland, R. (1984) The shape of the cholinergic amacrine cells in the rabbit retina: identification by injecting fixed, fluorescent neurons. *Invest. Ophthalmol. and Visual Sci., Suppl.* 25: 285.

金子章道 (1984) 単離・培養網膜細胞による生理学的研究. *神経眼科* 1: 156-158.

Kaneko, A. & Tachibana, M. (1985) A voltage-clamp analysis of membrane currents in solitary bipolar cells dissociated from *Carassius auratus*. *J. Physiol.* 358: 131-152.

Tachibana, M. (1985) Permeability changes induced by L-glutamate in solitary retinal horizontal cells isolated from *Carassius auratus*. *J. Physiol.* 358: 153-168.

Kaneko, A. & Tachibana, M. (1985) Effects of L-glutamate on the anomalous rectifier potassium current in horizontal cells of *Carassius auratus* retine. *J. Physiol.* 358: 169-182.

大塚輝彌, 神山暢夫 (1985) 細胞内染色. *病態生理* 4: 47-54.

《液 性 情 報 研 究 部 門》

Kosaka, T. & Hama, K. (1985) Gap junction between non-pyramidal cell dendrites in the rat hippocampus (CA1 and CA3 regions): A combined Golgi electron microscopy study. *J. Comp. Neurol.* 231: 150-161.

Nagahama, M., Ozaki, T. & Hama, K. A study of the myenteric plexus of the congenital aganglionosis rat, Spotting lethal. *Anat. Embryol. (in press)*

Nishimaru, N. & Kawaguchi, Y. (1984) Excitatory effects on renal sympathetic nerve activity induced by stimulation at two distinctive sites in the fastigial nucleus of rabbits. *Brain Research* 304: 372-376.

Kasako, K. (1984) The light and electron microscopic study of the fusion of facial prominences. *The Journal of The Stomatological Society* 51: 562-587.

《高次神経機構研究部門》

1. 川人光男, 浜口隆浩, 塚原仲晃 (1984) 神経細胞の棘シナプスの可塑性。第7回大阪大学BNE研究会コロキウム講演論文集: 11-16.
2. 山中 篤, 漆原誠一, 川人光男, 鈴木良次 (1984) 心筋イオンチャンネルモデルによる心電図の再構成。信学技報, MBE84-112: 115-160.
3. 漆原誠一, 川人光男, 鈴木良次, 入沢 宏 (1984) 房室興奮伝導のイオンチャンネルモデルによるシミュレーション。信学技報, MBE84-35: 39-46.
4. 松本修文 (1984) 生体センサー。脳の情報処理, 塚原仲晃編, 朝倉書店: 36-69.
5. 松本修文 (1984) コバルトトリジン複合体による細胞染色。生体の科学 35(4): 304-308.
6. 塚原仲晃 (1984) ニューロン・シナプス・神経網。脳の情報処理, 塚原仲晃編, 朝倉書店: 1-35.
7. 塚原仲晃 (1984) 高次脳機能。脳の情報処理, 塚原仲晃編, 朝倉書店: 226-261.
8. 塚原仲晃, 村上富士夫 (1984) 神経結合の可塑性。脳の構造と機能, 大村 裕, 島津 浩, 伊藤正男編, 医歯薬出版: 649-667.
9. 塚原仲晃 (1984) 脳の可塑性—最近の研究の展開。医学のあゆみ: 129; 663-669.
10. 塚原仲晃 (1984) 記憶・学習の神経生物学的基礎。神経精神薬理, 星和書店. 6: 299-323.
11. 塚原仲晃 (1984) 記憶の神経生理学的メカニズム。Clinical Neurosci, 中外医学社. 2: 153-158.
12. 小田洋一 (1984) シナプスの可塑性と学習。生物物理, 24: 24-35.
13. 塚原仲晃 (1984) 記憶の物質説とシナプス説。生体の科学, 医学書院, 35: 189-194.
14. 塚原仲晃 (1984) 生体信号と雑音。臨床検査, 器楽書院. 28: 1623-1630.
15. Murakami, F., Katsumaru, H., Maeda, J. & Tsukahara, N. (1984) Reorganization of corticorubral synapses following crossinnervation of flexor and extensor nerves of adult cat: an electron microscopic study. *Brain Res.* 306: 229-306.
16. Katsumaru, H., Murakami, F., Wu, J. - Y. & Tsukahara, N. (1984) GABAergic interneurons in cat red nucleus demonstrated with combined immunocytochemistry and

- anterograde degeneration method. *Neurosci. Res.* 1-1: 35-44.
17. Hultborn, H., Murakami, F., Tsukahara, N. & Gustafsson, B., with an Appendix by B. Gustafsson. (1984) Afterhyperpolarization in neurons of the red nucleus. *Exp. Brain Res.* 55: 333-350.
 18. Sakaguchi, H., Kubota, M., Nakamura, M., & Tsukahara, N. (1984) Effect of amino acids on cat red nucleus neurons in vitro. *Exp. Brain Res.* 54: 150-156.
 19. Kawato, M. & Tsukahara, N. (1984) Electrical of dendritic spines with bulbous end tweminals. *Biophys. J.* 46: 155-166.
 20. Kubota, M., Nakamura, M & Tsukahara, N. (1984) Calcium-dependent potntials in mammalian red nucleus neurons in vitro. *Neuroscience Res.* 1: 185-189.
 21. Kawato, M. (1984) Cable properties of a neuron model with non-uniform membrane resistivity. *J. Theor. Biol.* 111: 1-21.
 22. Oda, Y. (1984) Modification of the rubral activities during classical conditioning of the cat. In *Neuronal Growth and Plasticity*. ed. M. Kuno, Japan Societies Press. Toyko: 199-217.
 23. Tsukahara, N. (1984) Classical conditioning mediated by the red nucleus: An approach beginning at the cellular level. In *Neurobiology of Learning and Memory*, eds., G. Lynch, J. L. McGaugh, & N. M. Weinberger: 165-180.
 24. Fujito, Y., Watanabe, S., Kobayashi, H. & Tsukahara, N. (1984) Lesion-induced sprouting in the red nucleus at the early developmental stage. In *Early Brain Damage Neurobiology and Behavior*. 2: 35-47.
 25. Kawato, M., Hamaguchi, T., Murakami, F. & Tsukahara, N. (1984) Quantitative analysis of electrical properties of dendritic spines. *Biol. Cybern.* 50: 447-454.
 26. Kawato, M. & Tsukahara, N. (1984) Morphological changes in dendritic apines and synaptic plasticity. *Neuroscience Letters.* 17: s46.
 27. Kawato, M. & Tsukahara, N. (1984) Neuron model with nonuniform passive membrane properties. *J. Physiol. Soc. Japan* 46: 350.
 28. Tsukahara, N. & Yonemori, F. (1984) Long-term potentiation of corticorubral synaptic transmission and cAMP-induced slow depolarization. *J. Physiol. Soc. Japan* 46: 370.
 29. Kubota, M., Nakamura, M. & Tsukahara, N. (1984) Ionic conductances in red nucleus neurons in vitro. *J. Physiol. Soc. Japan* 46: 359.
 30. Taniguchi, I. (1984) A neuroanatomical study of the correlation between orientation-sound emission and pinna movements in the Japanese large horseshoe bat. *Neurosci. Lett., Suppl.* 17: 10.
 31. Hashimoto, T., Taniguchi, I., Tanahashi, T., Moriyama, T. and Saito, N. (1984) Plastic

reorganization of the commissure of the inferior colliculus after transection. *Neurosci. Lett.*, Suppl. 17: 1.

32. 田中英和, 谷口郁雄 (1984) モルモットの聴性事象関係電位. *Audiology Japan* 27: 214-219.
33. 田中英和, 谷口郁雄 (1984) モルモットにおける聴覚によるERPの基礎的検討. 日本音響学会講演論文集: 257-258
34. Bando, T., Tsukuba, K., Yamamoto, N., Maeda, J. and Tsukahara, N. (1984) Physiological Identification of Midbrain Neurons to Lens Accomodotion in Cats. *J. of Neurophysiology*. 52: 870-878.

《情報記憶研究部門》

Kuno, M. (1984). A hypothesis for neural control of the speed of muscle contraction in the mammal. *Adv. Biophys.* 17: 69-95.

Mishina, M., Kurosaki, T., Tobimatsu, T., Morimoto, Y., Noda, M., Yamamoto, T., Terao, M., Lindostrom, J., Takahashi, T., Kuno, M. & Numa, S. (1984). Expression of functional acetylcholine receptor from cloned cDNAs. *Nature* 307: 604-608.

Hironaka, T., Ikari, Y. & Miyata, Y. (1984). Development and growth of extensor carpi radialis longus muscle in normal and dystrophic chickens. *Exp. Neurol.* 83: 378-381.

Hironaka, T., Ikari, Y., Miyata, Y., Morimoto, S. & Tsunoo, A. (1984). Transplantation of extensor carpi radialis longus muscle in normal and dystrophic chicks. *Exp. Neurol.* 83: 392-402.

Miyata, Y. (1984). Specific terminal elimination at neuromuscular junctions during postnatal development. In: *Neuronal Growth and Plasticity*, ed. M. Kuno, Japan Scientific Societies Press, Tokyo: 83-95.

久野 宗 (1984). 運動神経発芽促進因子 医学のあゆみ 130: 259.

久野 宗 (1984). シナプス小胞仮説 生体の科学 35: 176-181.

宮田雄平 (1984). P物質 臨床神経科学 2: 1178-1179.

《高次神経性調節研究部門》

Noma, A., Nakayama, T., Kurachi, Y. & Irisawa, H(1984) Resting K conductances in pacemaker and non-pacemaker heart cells of the rabbit. *Jpn. J. Physiol.* **34**: 245-254.

Irisawa, H(1984) Electrophysiology of single cardiac cells. *Jpn. J. Physiol.* **34**: 375-388.

Kokubun, S & Irisawa, H(1984) Effects of various intracellular Ca ion concentrations on the calcium current of guinea-pig single ventricular cells. *Jpn. J. Physiol.* **34**: 599-611.

Kakei, M & Noma, A(1984) Adenosine-5'triphosphate-sensitive single potassium channel in the atrioventricular node cell of the rabbit heart. *J. Physiol.* **352**: 265-284.

Mastuda, H & Noma, A(1984) Isolation of calcium current and its sensitivity to monovalent cations in dialysed ventricular cells of guinea-pig. *J. Physiol.* **357**: 553-573.

Kameyama, M., Kakei, M., Sato, R., Shibasaki, T., Matsuda, H & Irisawa, H(1984) Intracellular Na⁺ activates a K⁺ channel in mammalian cardiac cells. *Nature*. **309**: 354-356.

Gadsby, D. C., Kimura, J. & Noma, A(1984) Voltage dependence of Na⁺/K⁺ pump current in isolated heart cells. *Nature*. **315**: 63-65.

Nakayama, T., Kurachi, Y., Noma, A & Irisawa, H(1984) Action potential and membrane currents of single pacemaker cells of the rabbit heart. *Pflügers Archiv.* **402**: 248-257.

Soejima, M & Noma, A(1984) Mode of regulation of the ACh-sensitive K-channel by the muscarinic receptor in rabbit atrial cells. *Pflügers Archiv.* **400**: 424-431.

Irisawa, H & Nakayama, T(1984) Isolation of a single pacemaker cell from rabbit S-A node. *Jikei kai. Med.* **30**: 65-70.

Irisawa, H & Noma, A(1984) Pacemaker currents in mammalian nodal cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **16**: 777-781.

Irisawa, H., Noma, A., Kokubun, S & Kurachi, Y(1984) Electrogenesis of pacemaker potential as revealed by AV nodal experiments. *Physiology and Pathophysiology of the heart*: 97-107.

入沢 宏 (1984) 第17回河口湖心臓討論会 単一心筋細胞を用いた実験。心臓第 16(4): 395-402.

入沢 宏 (1984) 心筋のイオンチャネルと膜電流。Pharma Medica 2: 101-106.

《生体システム研究部門》

Ohmori, H. (1984). Mechano-electrical transducer has discrete conductances in the vestibular hair cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81: 1888-1891.

Ohmori, H. (1984). Studies of ionic currents in the isolated vestibular hair cell of the chick. *J. Physiol.* 350: 561-581.

大森治紀 (1984) Ca チャネルのゲート機構 生物物理 24: 231-239.

大森治紀 (1984) イオンチャネルをみる 科学 54: 658-659.

《高次液性調節研究部門》

Hori, T., Kiyohara, T., Oomura, Y., Nishino, H. & Aou, S. (1984) Neuronal activity of the monkey orbitofrontal cortex during thermoregulatory and feeding behavior. *Neurosci. Lett. Suppl.* 17: S 6.

Ueno, S., Harada, K., Ji, C. & Oomura, Y. (1984) Magnetic nerve stimulation without interlinkage between nerve and magnetic flux, *IEEE Transactions on Magnetics*. MAG-20 (5).

Nishino, H., Ono, T. Sasaki, k., Fukuda, M. and Muramoto, K. (1984) Caudate unit activity during operant feeding behavior in monkeys and modulation by cooling prefrontal cortex. *Behav. Brain Res.* 11: 21-33.

Katafuchi, T., Yoshimatsu, H. & Oomura, Y. (1984) Responses of lateral hypothalamic neurons to simulative hypoglycemic condition induced by body suspension. *Brain Res. Bull.* **12**: 29-31.

Yamamoto, T., Oomura, Y., Aou, S., Nakano, Y. & Nemoto, S. (1984) A telemetry system for single neuronal discharge recording from behaving monkey. *Brain Res. Bull.* **12**: 129-132.

Nishino, H., Ono, T., Muramoto, K., Fukuda, M. & Sasaki, K. (1984) Caudate, pallidal and nigral unit activity during sensory integration and motor execution in bar press feeding behavior of monkey. Bandler, R. eds. *Neurol. Neurobiol.* **12**: 151-164.

Hattori, K., Akaike, N., Oomura, Y. & Kuraoka, S. (1984) Internal perfusion studies to demonstrate GABA-induced chloride responses in the frog primary afferent neurons. *Am. J. Physiol.* **246**: C 259-265.

Shimizu, N., Oomura, Y. & Sakata, T. (1984) Modulation of feeding by endogenous sugar acids acting as hunger or satiety factors. *Am. J. Physiol.* **246**: R 542-550.

Fujita, I., Satou, M. & Ueda, K. (1984) An evoked potential study of olfactory pathway in the carp. *Chem. Senses.* **8**: 248-249.

Shibata, S., Oomura, Y., Liou, S. Y. & Ueki, S. (1984) Electrophysiological studies of the development of suprachiasmatic neuronal activity in hypothalamic slice preparations. *Develop. Brain Res.* **13**: 29-35.

Aou, S., Yoshimatsu, H. & Oomura, Y. (1984) Medial preoptic neuronal responses to gonadal female in sexually inactive male monkeys (*Macaca Fuscata*). *Neurosci. Lett.* **44**: 217-221.

Aou, S., Oomura, Y., Lénárd, L., Nishino, H., Inokuchi, A., Minami, T. & Misaki, H. (1984) Behavioral significance of monkey hypothalamic glucose-sensitive neurons. *Brain Res.* **302**: 69-74.

Shibata, S., Liou, S. Y., Ueki, S. & Oomura, Y. (1984) Influence of environmental light-dark cycle and enucleation on activity of suprachiasmatic neurons in slice preparations. *Brain*

Res.: 302: 75-81.

Shibata, S., Oomura, Y., Hattori, K. & Kita, H. (1984) Responses of suprachiasmatic nucleus neurons to optic nerve stimulation in hypothalamic slice preparation. *Brain Res.* 302: 83-89.

Adachi, A., Shimizu, N., Oomura, Y. & Kobashi, M. (1984) Convergence of hepatportal glucose-sensitive afferent signals to glucose-sensitive units within the nucleus of the solitary tract. *Neurosci. Lett.* 46: 215-218.

Yoshimatsu, H., Nijjima, A., Oomura, Y., Yamabe, K. & Katafuchi, T. (1984) Effects of hypothalamic lesion on pancreatic autonomic nerve activity in the rat. *Brain Res.* 303: 147-152.

Oomura, Y. & Inokuchi, A. (1984) Effect of glucagon on feeding behavior. *Biomed. Res.* 4, Suppl. : 209-215.

Nakano, Y., Oomura, Y., Nishino, H., Aou, S., Yamamoto, T. & Nemono, S. (1984) Neuronal activity in the medial orbitofrontal cortex of the behaving monkey: Modulation of glucose and satiety. *Brain Res. Bull.* 12: 381-385.

Yamamoto, T., Oomura, Y., Nishino, H., Aou, S., Nakano, Y. & Nemoto, S. (1984) Monkey orbitofrontal neuron activity during emotional and feeding behaviors. *Brain Res. Bull.* 12: 441-443.

Shibata, S., Oomura, Y., Kita, H., Liou, S. Y. & Ueki, S. (1984) Field potentials in the suprachiasmatic nucleus of rat hypothalamic slice produced by optic nerve stimulation. *Brain Res. Bull.* 12:

Oomura, Y. & Yoshimatsu, H. (1984) Neural network of glucose monitoring system. *J. Aut. Nerv. Syst.* 10: 359-372.

Mizuno, Y. & Oomura, Y. (1984) Glucose responding neurons in the nucleus tractus solitarius of the rat: in vitro study. *Brain Res.* 307: 109-116.

Mizuno, Y., Oomura, Y., Hori, N. & Carpenter, D. O. (1984) Action of vasopression on CA1

pyramidal neurons in rat hippocampal slices. *Brain Res.* **309**: 241-246.

Oomura, Y. & Aou, S. (1984) Catecholaminergic and cholinergic roles in orbitofrontal neuronal activity during reward related behavior in the monkey. R. Bandler eds. *Modulation of Sensorimotor Activity during Altered Behavioural States*. New York: Alan R. Liss, Inc.: 269-290.

Oomura, Y., Yoshimatsu, H. & Aou, S. (1984) Hypothalamic neuronal activity during sexual behavior in male monkey. R. Bandler eds. *Modulation of Sensorimotor Activity during Altered Behavioural States*. New York: Alan R. Liss, Inc.: 231-250.

Inokuchi, A., Oomura, Y. & Nishimura, H. (1984) Effect of intracerebroventricular infused glucagon on feeding behavior. *Physiol. Behav.* **33**: 397-400.

Fujita, I., Satou, M. and Ueda, K. (1984) A field potential study of centripetal and centrifugal connections of the olfactory bulb in the carp, *Cyprinus carpio* (L.). *Brain Res.* **321**: 33-44.

Satou, M., Oka, Y., Kusunoki, M., Matsushima, T., Kato, M., Fujita, I. & Ueda, K. (1984) Telencephalon and preoptic area organize sexual behavior in hime salmon (landlocked red salmon, *Oncorhynchus nerka*): results of an electrical brain-stimulation experiment. *Physiol. Behav.* **33**: 441-447.

Hori, T., Kiyohara, T., Oomura, Y., Nishino, H. & Aou, S. (1984) Activity of preoptic neurons during thermoregulatory and feeding operant behavior in the monkey. *J. Physiol. Japan* **46**: 573.

Inoue, M., Oomura, Y., Aou, S., Nishino, H. & Sikdar, S. K. (1985) Reward related neuronal activity in monkey dorsolateral prefrontal cortex during feeding behavior. *Brain Res.* **326**: 307-312.

Sikdar, S. K. & Oomura, Y. (1985) Selective inhibition of glucose-sensitive neurons in rat lateral hypothalamus by noxious stimuli and morphine. *J. Neurophysiol.* **53**: 17-31.

Akaike, N., Hattori, k., Inomata, N. & Oomura, Y. (1985) γ -aminobutyric acid and pentobarbitone gated currents in internally perfused frog sensory neurones. *J. Physiol.*

(Lond.) 360: 367-386.

Akaike, N., Hattori, K., Oomura, Y. & Carpenter, D. O. (1985) Bicuculline and picrotoxin block γ -aminobutyric acid-gated Cl^- conductance by different mechanisms. *Experientia*. **41**: 70-71.

Akaike, N. & Oomura, Y. (1985) GABA-activated chloride channels in internally perfused frog dorsal root ganglion cells. *Biomed.* **5**, Suppl.: 115-132.

大村 裕, 片刈俊彦 (1984) 視床下部化学受容ニューロンに対する生理活性物質の作用. 消化管ホルモンの進歩 5. 脳-腸管ペプチド. 消化管ホルモン研究会編, 中外医学社 : 13-32.

大村 裕, 吉松博信, 水野勇司, 新島 旭 (1984) 中枢性ブドウ糖認識と糖代謝との関連. 糖尿病 **26** (12): 1256-1261.

大村 裕, 片刈俊彦 (1984) 中枢調節と肥満. 診断と治療 **72**(2): 1-5.

大村 裕 (1984) 脳における計測とその行動制御機構—神経化学センサーと行動制御—計測と制御 **23** (4): 361-369.

大村 裕, 清水宣明 (1984) 食欲の生理—視床下部化学センサーによる体液性摂食調節機構. 化学と生物 **22** (4): 228-241.

大村 裕, 中野保彦 (1984) 食欲不振のメカニズム. メディカルコンパニオン **4** (6): 729-732.

大村 裕, 清水宣明 (1984) カルチトニンと中枢神経. カルチトニン. 藤田拓男, 折茂 肇編, ライフサイエンス出版 : 113-120.

大村 裕 (1984) 摂食行動の調節物質. 続天然物質と生物活性, 新しい展開をめざして. 井村裕夫, 後藤俊夫, 中島暉躬, 村地孝編, 東京大学出版会 : 287-314.

吉村博信, 片刈俊彦, 大村裕, 新島旭 (1984) 視床下部外側野, 腹内側核の電氣的刺激および破壊に対する副腎交感神経の反応, 肥満研究会記録. 第37席 : 101-103.

井之口昭, 大村裕, 西村博行 (1984) 摂食行動に対するグルカゴン脳室内投与の効果, 肥満研究会記録, 第43席 : 118-119.

栗生修司, 大村裕, 西野仁雄, Laszlo Lénárd (1984) サルの摂食行動時の神経情報処理とオペート, 肥満研究会記録, 第44席 : 120-122.

西野仁雄, 小野武年 (1984) 動機づけ行動と神経生理学的制御, 代謝 21 : 107-118.

大村裕, 小野武年 (1984) 第4編 高次統合機能, IV, 動機づけ行動, A. 摂食行動, 脳の構造と機能, 下巻, 大村裕, 島津浩, 伊藤正男編, 医学書院 : 569-588.

大村裕, 西野仁雄 (1984) 第4編 高次統合機能, V, ホメオスタシス, B, 神経相関, 脳の構造と機能, 下巻, 大村裕, 島津浩, 伊藤正男編, 医学書院 : 627-642.

大村 裕, 島津 浩, 伊藤正男 (1984) 脳の構造と機能, 下巻編集, 医学書院.

大村 裕 (1985) シナプス前抑制とペントバルビタール. 麻酔 34(1): 2-8.

丸橋寿郎, 大村 裕 (1985) 第1編 神経系の構成要素, IV, シナプス, C. 受容膜の化学構造, 2. GABA およびグリシン受容体, 脳の構造と機能, 上巻. 大村 裕, 島津 浩, 伊藤正男編, 医学書院 : 268-302.

大村 裕 (1985) 第2編 情報の受容と伝達. 序論, 脳の構造と機能, 上巻. 大村 裕, 島津 浩, 伊藤正男編, 医学書院 : 399-409.

大村 裕, 島津 浩, 伊藤正男 (1985) 脳の構造と機能, 上巻編集. 医学書院.

栗生修司, 大村 裕 (1985) 高次連合機能—摂食行動下の連合野と自律神経系—. 医学のあゆみ 132(6): 432-439.

大村 裕, 柴田重信 (1985) 視交叉上核ニューロンの機能分化. 神経研究の進歩 29(1): 58-70.

《超 高 圧 電 子 顕 微 鏡 室》

Arii, T. (1984) Magnetic flux distribution in a fine iron particles with a shape of a rhombic dodecahedron. Proc. 3rd APEM (Singapore): 86-87.

Arii, T., Hama, K., Yamagishi, S., Uchizono, K. & Matsui, I. (1984) A New high voltage electron microscope for biological specimens. Proc. 3rd APEM (Singapore): 272-273.

Takata, K., Arii, T., Yamagishi, S. & Hirano, H. (1984) Concanavaline A (Con A) receptors in mouse macrophages demonstrated in thick sections with a 1,000kV transmission electron microscope. Proc. Japan Acad. 60B: 273-276.

Takata, K., Arii, T., Yamagishi, S. & Hirano, H. (1984) Use of colloidal gold and ruthenium red in stereo high-voltage electron microscopic study of Con-A binding sites in mouse macrophages. Histochemistry 81: 441-444.

Sasaki, S., Nakagaki, I., Imai, Y., Azuma, K., Arii, T. & Takagi, M. (1984) Elemental distribution and cytoskeletal system in the rod outer segments of octopus and frog retina. J. Electron Microsc., 33: 280.

Arii, T. & Hama, K. (1984) Low dose shutter for reducing irradiation damage to a specimen in a high voltage electron microscope. J. Electron Microsc., 33: 311.

Hama, K., Arii, T. & Nakamura, S. (1984) Three dimensional signal processing from HVTEM stereo images. J. Electron Microsc., 33: 311.

Kashihara, Y., Kashiwagura, N., Sakata, M., Harada, J. & Arii, T. (1984) Random distribution of Ga and Al atoms in MBE grown ($\text{Al}_{0.5}\text{Ga}_{0.5}$)As. Jpn. J. Appl. Physics. 23: L901-L903.

《組 織 培 養 標 本 室》

古家園子, 東田陽博 (1984) 神経グリア雑種細胞内の [^3H] セロトニンの局在. 解剖学雑誌 59: 396.

東田陽博・林要喜知・中川勇三・三木直正・古家園子（1984） 培養細胞におけるシナプス形成とその調節機構，蛋白質・核酸・酵素 神経生化学（下） 29: 1907-1918.

《動物実験施設》

Al-Samarrai, S. F., Ozaki, T., Nishiye, H. & Uchizono, K. (1985) A New Method for Scanning and Transmission Electron Microscopy of Synaptic Vesicles Isolated from the Cerebral Cortex. Arch. histol. jap. 48: 109-117.

研 究 報 告 (学会報告)

〔目 次〕

神経化学研究部門	131
超微小形態生理研究部門	131
細胞内代謝研究部門	133
生体膜研究部門	135
機能協関研究部門	137
能動輸送研究部門	137
神経情報研究部門	138
液性情報研究部門	139
情報記憶研究部門	140
高次神経調節研究部門	140
生体システム研究部門	141
高次液性調節研究部門	142
超高圧電子顕微鏡室	147
組織培養標本室	148
動物実験施設	148

学 会 報 告

《神経化学研究部門》

Ebashi, S.: "Sorting of cells descended from single blastomeres of *Xenopus* embryos." Lipmann Symposium; Cellular Regulation and Malignant Growth (Yamanashi) 1984. 5.

Ebashi, S.: "History of Calcium Regulation in Muscle and Non-muscle Systems." Gordon Conference on Muscle-1984 (U. S. A.) 1984. 7.

Ebashi S.: "Ca Regulation in Muscle Contraction and Cell Motility." 10th Yamada Conference on Motility II: Mechanism and Regulation (Nagaya) 1984. 9.

Ebashi S.: Introductory remarks: Cross-bridge mechanism (Yokohama) 1984. 10.

江橋節郎: 「カルシウムイオンと生命」 ロックフェラー大学サントリー・レクチャーズ '84; 生命科学と人間 (東京) 1984. 10.

Ebashi S.: "Impressions from the Japanese Perspective" U. S.-Japan Cooperative Science Seminar on Gastrointestinal Smooth Muscle in Health and Disease (U. S. A.) 1985. 1.

Mikawa, T. & Koseki, C.: "Sorting of cells descended from single blastomeres of *Xenopus* early embryos." The 3rd International congress on Cell Biology (Tokyo) 1984. 8.

三川 隆, 古関千寿子: 「セルソーターによる特定割球由来クローンの分離とクローン特異タンパクの分析」 第17回日本発生生物学会 (熊本) 1984. 5.

三川 隆, 古関千寿子, 広瀬宜郎: 「発生初期胚の外胚葉性特異タンパク」 第62回日本生理学会 (久留米) 1985. 3.

《超微小形態生理研究部門》

亘 弘: 「非破壊的方法による組織臓器の研究」 日本生化学会シンポジウム (金沢) 1984.

堀川義治, 成瀬昭二, 田中忠蔵, 樋口敏宏, 平川公義, 西川弘恭, 亘 弘: 「In-vivo ^{31}P -NMR 法による病態解析— TMR 法と surface coil 法との比較—」第4回核磁気共鳴医学研究大会 (筑波) 1984.

常岡 豊, 楠岡英雄, 井上通敏, 阿部 裕, 亘 弘 (1984) 左心室同期燐核磁気共鳴法による高エネルギー燐酸の心周期内動態の解析. 第4回核磁気共鳴医学研究大会 (筑波) 1984.

二科安三, 志賀 潔, 亘 弘: 「D-アミノ酸酸化酵素の反応中間体の構造の研究」第61回日本生理学会大会 (前橋) 1984. 3.

亘 弘, 志賀 潔, 二科安三, 瀬尾芳樹, 西川弘恭: 「 ^{31}P -NMR の NOE によるエネルギー代謝の研究」第61回日本生理学会大会 (前橋) 1984. 3.

長岡俊治, 恵良聖一, 桑田一夫, 會我美勝, 亘 弘, 志賀 潔, 赤坂一之: 「 ^1H -NMR による血漿アルブミンの構造転移の研究」第61回日本生理学会大会 (前橋) 1984. 3.

會我美勝, 長岡俊治, 茂見 潤, 恵良聖一, 桑田一夫, 亘 弘, 志賀 潔, 赤坂一之: 「 ^1H -NMR によるウシ血漿アルブミン誘導体のゲル中における水構造の研究」第61回日本生理学会大会 (前橋) 1984. 3.

Watari, H., Seo, Y. & Murakami, M.: "Analysis of Lohmann reaction in living organs by phosphorus nuclear magnetic resonance." International Symposium on Fast reactions in Biological Systems. (Kyoto) 1984.

Nishina, Y., Shiga, K., Miura, R., Tojo, H., Miyake, Y., Yamano, T., & Watari, H.: "Resonance Raman study on the purple intermediates of flavoenzyme D-amino acid oxidase." The IXth International Conference on Raman Spectroscopy. (Tokyo) 1984.

亘 弘: 「NMR の耳鼻咽喉科学における応用」第46回耳鼻咽喉科臨床会総会および学術会 (大阪) 1984.

Shimoyama, Y. & Watari, H.: "Slow motinal in the oriented multibilayers as revealed by saturation transfer ESR spectroscopy." 8 th International Biophysics Congress (Bristol) 1984.

Murakami, H., Mori, H., Nakahari, T., Imai, V., Seo, Y. & Watari, H.: " ^{31}P -NMR of canine

salivary gland." 8 th International Biophysics Congress. (Bristol) 1984.

Watari, H. & Shimoyama, Y.: "Phase behaviors of saturation transfer ESR signals at high microwave field." 8 th International Biophysics Congress. (Bristol) 1984.

Nishina, Y., Shiga, K., Miura, R., Tojo, H., Miyake, Y., Yamano, T. & Watari, H.: "Resonance raman study of reaction intermediates of flavoenzyme D-amino acid oxidase." Satellite symposium of Resonance Raman Spectroscopy. (Osaka) 1984.

亘 弘, 下山雄平: 「リン脂質配向積層膜動的構造のEPRによる解析」第22回日本生物物理学会年会 (横浜) 1984.

亘 弘, 瀬尾芳輝, 楠岡英雄, 常岡 豊: 「心周期におけるエネルギー代謝燐化合物の消長」第31回生理学中部談話会 (甲府) 1984.

井上智子, 赤坂一之, 亘 弘, 阿部公恵, 甲斐荘正恒, 辻 尚志, 京極好正: 「プロトン緩和によるアミノ酸側鎖の存在状態-SSIの環状アミノ酸」第23回NMR討論会 (鳴子) 1984.

三浦 洌, 東条博雅, 三宅可浩, 山野俊雄, 亘 弘: 「D-アミノ酸酸化酵素の複合体の共鳴ラマンスペクトルによる研究」第57回日本生化学会大会 (東京) 84.

亘 弘, 二科安三, 志賀 潔, 下山雄平: 「飽和移動電子スピン共鳴スペクトルの解析」第57回日本生化学会大会 (東京) 1984.

《細胞内代謝研究部門》

門脇 真, 矢内原千鶴子, 田中昌子, 矢内原昇: 「Insulin-like growth factor (IGF)-Iのラジオイムノアッセイとその精製」第104回日本薬学会 (仙台市) 1984. 3.

神谷保廣, 矢内原千鶴子, 矢内原昇, 橋本 俊, 由良二郎: 「ラット肝再生時における門脈血中VIP, Glucagon, Glicentinの動態」第7回 Gut Hormone カンファレンス (清水市) 1984. 7.

成瀬 達, 安井章裕, 尾崎 毅, 軒原清史, 矢内原千鶴子, 矢内原昇, 山下裕一, 宮田道夫: 「イヌ大腿動脈におけるPHIとVIPの血流増加作用について」第7回 Gut Hormone カンファレ

ンス（清水市）1984. 7.

矢内原千鶴子, 川村 誠, 矢内原昇, 杉浦信夫, 榎本和久, 近藤 満, 成瀬 達：「CCK-8合成誘導体をもちいる CCK-C 端活性部位における構造活性相関の検討」第7回 Gut Hormoneカンファレンス（清水市）1984. 7.

安井章裕, 成瀬 達, 尾崎 毅, 軒原清史, 井口和明, 矢内原千鶴子, 矢内原昇, E. E. Daniel：「迷走神経電気刺激によるイヌ血中 PHI と VIP の動態」第7回 Gut Hormoneカンファレンス（清水市）1984. 7.

成瀬 達, 安井章裕, 尾崎 毅, 矢内原昇, 杉浦信夫, 榎本和久, 矢内原千鶴子：「コレシストキニン誘導体の胆嚢収縮作用と膵酵素分泌作用の解離」第57回日学内分泌学会秋期学術大会（神戸市）1984. 10.

成瀬 達, 安井章裕, 尾崎 毅, 矢内原昇, 杉浦信夫, 榎本和久, 矢内原千鶴子：「コレシストキニン（CCK）誘導体の胆嚢収縮作用と膵酵素分泌作用」第26回日本消化器病学会大会（千葉市）1984. 10.

安井章裕, 成瀬 達, 尾崎 毅, 矢内原千鶴子, 二村雄次, 矢内原昇：「迷走神経刺激による PHI/VIP の放出動態のその機序」第26回日本消化器病学会大会（千葉市）1984. 10.

Yasui, A., Naruse, S., Yanaihara, C., Daniel E. E. & Yanaihara, N. "Release of peptide histidine isoleucine (PHI) concomitant with vasoactive intestinal polypeptide (VIP) by vagal stimulation in the dog." The 5th International Symposium on Gastrointestinal Hormones. (Rochester, Minnesota, U.S.A.) 1984. 10.

荻野晃一, 星野 稔, 井口和明, 矢内原千鶴子, 矢内原昇：「ヒト神経芽腫培養細胞における VIP および PHM/PHI 免疫活性の産生と放出について」第57回日本生化学会（東京）1984. 10.

星野 稔, 鈴木利光, 矢内原昇, 荻野晃一, 井口和明, 矢内原千鶴子：「TPA のヒト神経芽腫培養細胞における VIP/PHM の産生・放出に対する作用」第57回日本生化学会（東京）1984. 10.

星野 稔, 矢内原昇, 井口和明, 矢内原千鶴子：「ヒト神経芽腫培養細胞系における VIP および PHM（ヒト PHI）の産生・放出動態」第8回神経科学学術集会（大阪市）1984. 11.

安井章裕, 成瀬 達, 矢内原千鶴子, 矢内原昇: 「迷走神経電気刺激によるイヌ血中PHI, VIPの放出動態」第8回神経科学学術集会(大阪市) 1984. 11.

星野 稔, 鈴木利光, 矢内原昇, 荻野晃一, 井口和明, 矢内原千鶴子: 「ヒト神経芽細胞腫培養細胞におけるVIP・PHMの放出動態について」第62回日本生理学会(久留米市) 1985. 3.

成瀬 達, 安井章裕, 尾崎 毅, 矢内原昇: 「CCKと迷走神経による胆汁排出調節」第62回日本生理学会(久留米市) 1985. 3.

桑原厚和, 瀬川 潤, 矢内原昇: 「CCK誘導体の消化管運動に及ぼす影響について」第62回日本生理学会(久留米市) 1985. 3.

《生体膜研究部門》

Yamagishi, S. & Furuya, K.: "Effect of intracellular calcium on the excitation of squid giant axons." 29th IUPS Congress. (Sydney) 1983. 8.

山岸俊一, 古家喜四夫「細胞内外のCaその他2価イオンによる膜興奮性制御」第61回日本生理学会(前橋) 1984. 3.

久木田文夫, 山岸俊一「水の流れによるイカ巨大神経線維Kチャネルの整流性」第61回日本生理学会(前橋) 1984. 3.

川合速史, 斉藤光義, 三輪昭子, 山岸俊一, 古家喜四夫「イカ巨大シナプスに対するクモ毒(JSTX)の遮断作用」第61回日本生理学会(前橋) 1984. 3.

Yagaisawa, H., Yamagishi, S., Yamashita, Y. & Sugiyama, H.: "Muscarinic acetylcholine receptor: modulation of receptor affinity by lectins." 第3回国際細胞生物学会(東京) 1984. 8.

八木沢仁, 山岸俊一, 杉山博之「ムスカリン性アセチルコリン受容体の性質: アゴニストおよびアンタゴニスト結合親和性のレクチンによる修飾」第57回日本生化学会(東京) 1984. 10.

杉山博之, 荻野信義「ラット脳の [^{3} H] ニコチン結合部位」第57回日本生化学会(東京) 1984. 10.

杉山博之, 広野 力, 山岸俊一「アフリカツメガエル卵母細胞への mRNA 注入によるイオンチャネルの誘導」第22回日本生物物理学会 (横浜) 1984. 10.

久木田文夫, 山岸俊一「水の流れのイオンチャネルに対する作用」第22回日本生物物理学会 (横浜) 1984. 10.

西江 弘, 古家喜四夫, 志賀 潔, 山岸俊一「Tb イオンのイカ神経膜に対する作用」第22回日本生物物理学会 (横浜) 1984. 10.

橋本 亨, 谷口郁雄, 山岸俊一「聴覚受容器の音響—電気変換および電気—音響変換の相対性」第8回神経科学学術集会 (豊中) 1984. 11.

山岸俊一, 古家喜四夫, 久木田文夫「Na チャネル活生化と不活生化に作用する細胞内 2 価イオン」第62回日本生理学 (久留米) 1985. 3.

杉山博之, 広野 力「ラット脳 mRNA により *Xenopus* 卵母細胞に誘導されるムスカリン性応答の性質」第62回日本生理学会 (久留米) 1985. 3.

久木田文夫, 山岸俊一「イカ巨大線維 K チャネルに対する K イオンの影響」第62回日本生理学会 (久留米) 1985. 3.

広野 力, 山岸俊一, 杉山博之「ラット脳 mRNA による *Xenopus* 卵母細胞での Na チャネルの発現」第62回日本生理学会 (久留米) 1985. 3.

橋本 亨, 谷口郁雄, 山岸俊一「蝸牛管の電圧制御」第62回日本生理学会 (久留米) 1985. 3.

会沢勝夫, 酒井治正, 斉藤弘子, 坂井朗子, 大畑 進, 西江 弘, 山岸俊一, 松下和弘「Tryptophan の Tb³⁺ 結合状態の解析」第62回日本生理学会 (久留米) 1985. 3.

《機能協関研究部門》

渡辺 昭「光弾性モジュレーターによる神経の光学的シグナル」第22回生物物理学年会（横浜）1984. 10.

渡辺 昭「イカ巨大線維の旋光性シグナル」第62回日本生理学大会（久留米）1985. 3.

寺川 進, 中山 孝「微小管はチャンネル活動に役割をもつか？」第217回生理学東京談話会（東京）1984. 6.

寺川 進「神経興奮と膜の力学的変化」膜学会講演会（東京）1984. 6.

寺川 進, 中山 孝「微小管は興奮性に関与するか？」第22回生物物理学学会年会（横浜）1984. 10.

寺川 進, 中山 孝「繊維性蛋白による神経膜の支持補強作用」第22回生物物理学学会年会シンポジウム（横浜）1984. 10.

寺川 進「一位カチオンによる単イオン性興奮」第31回生理学中部談話会（甲府）1984. 10.

寺川 進「一位カチオンによる単イオン性興奮」第62回日本生理学大会（久留米）1985. 3.

中山 孝, 福嶋義博「 Na^+ , K^+ -ATPase の精製」第57回日本生化学会（東京）1984. 10.

《能動輸送研究部門》

Ozawa, K., Sato, A., Kumei, Y., Nakao, M. & Fukushima, Y.: "Membrane function of hyperosmolarity-tolerant cells from rabbit kidney." 3rd International Congress on Cell Biology. (Tokyo) 1984. 7.

Nakayama, T. & Fukushima, Y.: "Purification of Solubilized Na, K-ATPase by ouabain affinity chromatography." 4th International Conference on Na, K-ATPase.(Cambridge)1984. 8

中山 孝, 福嶋義博「Na, K-ATPase の精製」第57回日本生化学会（東京）1984. 10.

熊沢紀之, 浜田泰一, 辻本 毅, 中尾 真, 福嶋義博「リン脂質 2 分子層膜のガラスピペットへの形成」第62回日本生理学会（留米）1985. 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Ⅱ」第57回日本生化学会（東京）1984. 10.

福本哲夫, 玉腰勝敏, 山下 昭, 前田幸次, 太田英彦「ラット肝細胞膜表面抗原の単クローン性抗体による解析（第四報）」第57回日本生化学会（東京）1984. 10.

福本哲夫, 玉腰勝敏, 前田幸次, 太田英彦, 宮本 愛, 山下 昭「ラット肝細胞に対する単クローン性抗体—膜抗原の単離」第13回日本免疫学会（大阪）1984. 12.

藤田道也, 太田英彦（1984）「生構築ラインにおける輸送機構」第10回生体エネルギー研究会（大阪）1984. 12.

《神 経 情 報 研 究 部 門》

Tauchi, M. & Masland, R. "The shape of the cholinergic amacrine cells in the rabbit retina; identification by injecting fixed, fluorescent neurons." ARVO annual meeting, (Sarasota) 1984. 5.

Tauchi, M. "A cholinergic neurons in the retina." Society for Neuroscience 14th annual meetign, (Anaheim) 1984. 10.

Kaneko, A. & Tachibana, M. "Synaptic transmission in the outer plexiform layer: Studies on solitary retinal cells." Sixth International Congress of Eye Research, (Alicante) 1984. 10.

金子章道, 立花政夫: 「網膜視細胞の GABA 感受性」日本神経科学協会第 8 回学術集会, (大阪) 1984. 11.

Tachibana, M. "The sensitivity to Gamma-aminobutyric acid in solitary photoreceptors dissociated from turtle retina." Table Ronde Roussel-Uclaf 51, "Mechanism of Vision",

(Paris) 1984. 11.

大塚輝彌：「脊椎動物網膜錐体視細胞の蛍光性油滴」第6回動物生理学会大会（筑波）1984. 11.

Kaneko, A. "Neuronal circuitry subserving color opponent responses of retinal horizontal cells." Japan-China Symposium on Sensory Mechanisms and Behavior, (岡崎) 1985. 1.

金子章道：「網膜のシナプス伝達」第62回日本生理学会大会シンポジウム I, (久留米) 1985. 3.

田内雅規：「網膜 ACh 作動性アマクリン細胞の形態と機能」第62回日本生理学会大会シンポジウム I, (久留米), 1985. 3.

立花政夫：「視細胞・水平細胞間のシナプス伝達——単離細胞による研究——」第62回日本生理学会大会シンポジウム I, (久留米), 1985. 3.

金子章道, 立花政夫：「カメ錐体 GABA 応答の性質」第62回日本生理学会大会, (久留米) 1985. 3.

大塚輝彌：「カメ網膜錐体の色光感度と油滴の対応関係の再検討」第62回日本生理学会大会, (久留米) 1985. 3.

神山暢夫, 大塚輝彌：「カメ網膜 C 型水平細胞と視細胞のシナプス結合」第62回日本生理学会大会, (久留米) 1985. 3.

《液性情報研究部門》

小坂俊夫, 浜 清, J.-Y. Wu：「ラット歯状回の顆粒細胞軸索初節部への GABA 系シナプス」第89回日本解剖学会総会（仙台）1984. 4.

小坂克子, 江藤一洋, 浜 清：「マウス顔面突起の癒合時にみられる特殊な上皮細胞の組織学的観察」第89回日本解剖学会総会（仙台）1984. 4.

浜 清, 小坂俊夫："Three dimensional organization of the astrocyte in rat brain" The Fortieth Annual Meeting of the Japanese Society of Electron Microscopy (仙台) 1984. 6.

有井達夫, 浜 清: "Low dose shutter for reducing irradiation damage to a specimen in a high voltage electron microscope." The Fortieth Annual Meeting of the Japanese Society of Electron Microscopy (仙台) 1984. 6.

浜 清, 有井達夫, 中村栄男: "Three dimensional signal processing from HVTEM stereo images" The Fortieth Annual Meeting of the Japanese Society of Electron Microscopy (仙台) 1984. 6.

《情報記憶研究部門》

Miyata, Y., Kuno, M., Homma, S. & Ogawa, M. (1984). "Enhancement of spinal Ia synaptic transmission by nerve growth factor." *Neurosci. Let. suppl.* 17: s23.

Yawo, H. & Kuno, M. (1984). "Repair mechanisms of injured nerve membrane." *Neurosci. Let. Suppl.* 17: s45.

Miyata, Y., Kuno, M., Homma, S., Ogawa, M. & Kashihara, Y. (1984). "Maintenance of Ia synaptic function by a trophic factor in the muscle spindle." *Jap. J. Pharmacol.* 36: Suppl. 135.

Harada, Y., Wang, Y. Z. & Kuno, M. (1984). "The chemoreceptor response of the rat respiratory center in vitro." *J. Physiol. Soc. Japan* 46: 531.

Yawo, H. & Kuno, M. (1984). "Calcium dependence of membrane resealing process in ruptured nerve axon." *J. Physiol. Soc. Japan* 46: 418.

《高次神経性調節研究部門》

倉智嘉久, 入沢 宏: 「心室筋内向き整流カリウム電流に対する Ba 及び Cs によるブロック機構」第7回神経科学学術集会 (千葉) 1984. 1.

松田博子, 野間昭典, 入沢 宏: 「細胞内灌流下モルモット単一心室筋 Ca チャネルのイオン選択性」第61回日本生理学会大会 (群馬) 1984. 3.

倉智嘉久, 入沢 宏: 「単一結節心筋細胞におけるムスカリン性アセチルコリン電流」第61回日本生理学会大会 (群馬) 1984. 3.

野間昭典, 加計正文, 柴崎 亨: 「心筋の細胞内ATPとイオンチャネル」第61回日本生理学会大会 (群馬) 1984. 3.

中山敏夫, 倉智嘉久, 野間昭典, 入沢 宏: 「心筋単一ペースメーカー細胞の電気的特性」第61回日本生理学会大会 (群馬) 1984. 3.

Noma, A: "The potassium channel activated by muscarinic acetylcholine receptors in the nodal tissue of the heart." Gordon Conference on Ionic channels in muscle and other excitable tissues. (New London, N. H. U. S. A.) 1984. 9.

Irisawa, H., Nakayama, T. and Noma, A: "Membrane currents of single pacemaker cells of the rabbit heart." Symposium on the Electrophysiology of single cardiac cells. The Physiological Society. Oxford Meeting. (England) 1984. 9.

Takei, M., Noma, A. and Shibasaki, T: Membrane currents through adenosine triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. Symposium on the Electrophysiology of single cardiac cells. The Physiological Society. Oxford Meeting. (England) 1984. 9.

木村純子, 野間昭典, 入沢 宏: 「細胞内灌流法により単離した心室筋の $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ポンプ電流」第31回生理学中部談話会 (山梨) 1984. 10.

柴崎 亨, 野間昭典, 入沢 宏: 「細胞内ATP欠乏時の膜電流の変化」第31回生理学中部談話会 (山梨) 1984. 10.

《生体システム研究部門》

大森治紀: 「ヒヨコ内耳有毛細胞における機械刺激受容チャネル」第62回日本生理学会 (久留米) 1985. 3.

大森治紀: 「単離した有毛細胞でのトランスデューサー電流」第22回日本生物物理学会年会 (横浜) 1984. 10.

大森治紀：「単離有毛細胞の機械刺激受容チャネルのイオン選択性」第8回神経科学学術集会（大阪）1984. 11.

《高次液性調節研究部門》

西野仁雄，小野武年，村本健一郎，佐々木和男，福田正治，高橋二郎，「サルのレバー押し摂食行動と腹側被蓋野（VTA）ニューロン活動」第7回神経科学学術集会（千葉）1984. 1.

Hori, T., Kiyohara, T., Oomura, Y., Nishino, H. & Aou, S.: "Central neuronal activity of monkey during thermoregulatory behavior." 10th International Congress of Biometeorology. (Tokyo) 1984. 1.

西野仁雄，小野武年，佐々木和男，福田正治，村本健一郎，高橋二郎，「サルレバー押し摂食行動における前腹側淡蒼球（VGP）の意義」第61回日本生理学会大会（群馬）1984. 3.

藤田一郎，佐藤真彦，上田一夫，「コイの終神経節細胞における過分極性電位」第61回日本生理学会大会（群馬）1984. 3.

大村裕，「血中及び脳内化学物質による摂食調節機構」第2回高砂シンポジウム（東京）1984. 5.

Oomura, Y. & Aou, S.: "Catecholaminergic and cholinergic roles in orbitofrontal neuronal activity during reward related behavior in the monkey." The USSR-USA International Pavlovian Conference "in memoriam P. K. Anokin". (Moscow) 1984. 6.

西野仁雄，高橋二郎，森口幸栄，福田正治，小野武年，「サル前頭前野損傷後の遅延反応障害に対する s-adenosyl-L-methionine の作用」第65回日本薬理学会近畿部会（金沢）1984. 6.

Shibata, S. & Oomura, Y.: "Observations of suprachiasmatic neuronal activity in relation to circadian rhythm in neonatal and adult rats using hypothalamic slice." Sapporo Symposium on Biological Rhythm. (Sapporo) 1984. 8.

Oomura, Y.: "Newly identified sugar acids and some peptides acting as feeding modulators." The 9th International Symposium on Neurosecretion. (Susono) 1984. 9.

- Oomura, Y., Shimizu, N., Inokuchi, A. & Puthuraya, K. P.: "Modulation of feeding by the direct actions of glucagon calcitonin and the endogenous sugar acids on the hypothalamic chemosensitive neurons." A Satellite Symposium of the 1984 Neuroscience Society Meeting. The Neural and Metabolic Bases of Feeding. (Napa) 1984. 10.
- Akaike, N. & Oomura, Y.: "GABA activates three types of the receptor-ionophore complex with their relative distribution." Society for Neuroscience. the 14th Annual Meeting. (Anaheim) 1984. 10.
- Aou, S., Woody, C. D., Oomura, Y. & Nishino, H.: "Effects of reward-related hypothalamic stimulation on neuron activity of the motor cortex in the monkey." Society for Neuroscience. the 14th Annual Meeting. (Anaheim) 1984. 10.
- Minami, T., Oomura, Y., Sugimori, M. & Llinas, R. R.: "Electrophysiological properties of ventromedial hypothalamic neurons in guinea pig and their responses to glucose—a vitro study." Society for Neuroscience. the 14th Annual Meeting. (Anaheim) 1984. 10.
- Oomura, Y., Nakano, Y., Lénárd, L., Aou, S., Yamamoto, T. & Nishino, H.: "Distribution of neurons sensitive to neurochemicals and its functional involvement in the monkey amygdala." Society for Neuroscience. the 14th Annual Meeting. (Anaheim) 1984. 10.
- Shimizu, N., Oomura, Y., Puthuraya, K. P., Nemoto, S., Sakata, T. & Okukado, N.: "Newly identified sugar acids acting as feeding modulators." Society for Neuroscience. the 14th Annual Meeting. (Anaheim) 1984. 10.
- Sugimori, M., Shibata, S. & Oomura, Y.: "Electrophysiological basis for biorhythmic activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat: an in vitro study." Society for Neuroscience: the 14th Annual Meeting. (Anaheim) 1984. 10.
- Inokuchi, A. & Oomura, Y.: "The Effects of prostaglandin D₂ and sleep-promoting substance on rat hypothalamic neuronal activity." The 8th International Symposium. Humoral Control of Sleep and Its Evolution. Division of Brain Sciences/The Taniguchi Foundation. (Ohtsu) 1984. 10.
- Nishino, H., Ono, T., Fukuda, M. & Muramoto, K.: "The ventral tegmental area and

motivated feeding behavior in monkey.” 14th Neurosci. Satel. Symp.: The Neural and Metabolic Basis of Feeding. (San Francisco) 1984. 10.

井上真澄, 徳富直史, 赤池紀扶, 大村 裕, 丸橋寿郎: 「GABA agoist と antagonist の作用機序」第35回西日本生理学会 (佐賀) 1984. 10.

葉師寺隆, 猪俣則夫, 赤池紀扶, 大村 裕, 倉岡俊助: GABAで発生する I_{Cl} への2価陽イオンの効果」第35回西日本生理学会 (佐賀) 1984. 10.

井之口昭, 大村 裕: 「ラット視床下部ニューロンに対するプロスタグランジン D_2 及び睡眠促進物質の効果」第35回西日本生理学会 (佐賀) 1984. 10.

大坂寿雅, 河南 洋, 笠井聖仙, 山下 博, 吉松博信, 大村 裕: 「無麻酔・無拘束ラットの7気圧環境における視床下部ニューロンの活動」第35回西日本生理学会 (佐賀) 1984. 10.

片浏俊彦, 吉松博信, 大村 裕, 佐藤昭夫, 坂田利家: 「ラット副腎からのカテコラミン分泌に対する視床下部刺激および破壊の影響」第35回西日本生理学会 (佐賀) 1984. 10.

荒瀬高一, 坂田利家, 藤本一眞, 大村 裕: 「3-Deoxypentonic acid 光学異性体による摂食誘発の作用差異」第35回西日本生理学会 (佐賀) 1984. 10.

鍋倉淳一, 水野勇司, 井上真澄, 南 武嗣, 大村 裕: 「扁桃体中心核および外側核の電気生理学特性と入力様式の相違」第35回西日本生理学会 (佐賀) 1984. 10.

西村博行, 井之口昭, 水野勇司, 南 武嗣, 清水宣明, 大村 裕: 「視床下部および扁桃体の電気刺激に対する孤束核および迷走神経背側運動核の反応」第35回西日本生理学会 (佐賀) 1984. 10.

水野勇司, 南 武嗣, 鍋倉淳一, 大村 裕: 「迷走神経背側運動核ニューロン電気生理学的特性と化学感受性」第35回西日本生理学会 (佐賀) 1984. 10.

南 武嗣, 杉森睦之, 大村 裕, 水野勇司, 鍋倉淳一, 丸橋寿郎: 「モルモット視床下部腹内側核ニューロンの膜特性と化学感受性」第35回西日本生理学会 (佐賀) 1984. 10.

荒瀬高一, 坂田利家, 藤本一眞, 寺田憲司, 倉田一夫, 大村 裕: 「短鎖有機酸と摂食行動」第

8回神経科学学術集会（大阪）1984. 11.

堀 哲郎, 清原壽一, 大村 裕, 西野仁雄, 粟生修司: 「サル視束前野ニューロンの体温調節行動時の活動」第8回神経科学学術集会（大阪）1984. 11.

水野勇司, 南 武嗣, 鍋倉淳一, 大村 裕: 「迷走神経背側運動核ニューロンの入出力様式と摂食関連物質の作用」第8回神経科学学術集会（大阪）1984. 11.

中野保彦, 大村 裕, 西野仁雄, 山本智矢, 青柳和彦, L. Lénárd: 「サル扁桃体ニューロンのカテコールアミン感受性およびその摂食行動における意義」第8回神経科学学術集会（大阪）1984. 11.

西野仁雄, 小野武年, 高橋二郎: 「黒質線条件ドーパミン路破壊ラットの回転運動に対する胎児能ドーパミン細胞の移植の効果」第8回神経科学学術集会（大阪）1984. 11.

大村 裕, 粟生修司, 吉松博信: 「性行動中の雌ニホンザル視床下部単一ニューロン活動」第8回神経科学学術集会（大阪）1984. 11.

清水宣明, 大村 裕, Carlos Ramon Plata Salaman: 「カルチトニンの中枢性摂食抑制作用」第8回神経科学学術集会（大阪）1984. 11.

冨田安信, 長谷貴将, 木村 宏, 矢内原昇, 井之口昭, 大村 裕: 「グリセンチン含有神経の絶食による変動」第8回神経科学学術集会（大阪）1984. 11.

山本智矢, 大村 裕, 西野仁雄, 粟生修司, 中野保彦, 小山純正, 藤田一郎: 「自発的発生に始まる摂食課題時のサル前頭眼窩野および視床下部外側野ニューロン活動」第8回神経科学学術集会（大阪）1984. 11.

Akaike, N., Yoshimatsu, H. & Oomura, Y.: "CNS-induced regulation of the active NA-K transport in hypokalemic rat skeletal muscle." International Symposium on Neuronal and Endogenous Chemical Control Mechanisms on Emotional Behavior. (Fukuoka) 1985. 2.

Hori, T., Kiyohara, T., Shibata, Nakashima, T., Oomura, Y., Nishino, H. & Aou, S.: "Behavioral significance of hypothalamic thermosensitive neurons. International Symposium on Neuronal and Endogenous Chemical Control Mechanisms on Eehavior. (Fukuoka) 1985. 2.

Nishino, H., Oomura, Y., Lénárd, L., Aou, S., Nakano, Y. & Yamamoto, T.: "Activity in monkey lateral hypothalamus during operant feeding." International Symposium on Neuronal and Endogenous Chemical Control Mechanisms on Emotional Behavior. (Fukuoka) 1985. 2.

Ono, T., Yamatani, K., Nishino, H., Fukuda, M. & Nishijo, H.: "Prefrontal cortex relation to learning, single neuron activity in monkey." International Symposium on Neuronal and Endogenous Chemical Control Mechanisms on Emotional Behavior. (Fukuoka) 1985. 2.

Oomura, Y., Shimizu, N. & Puthuraya, K. P.: "Regulation of feeding by endogenous sugar acids through their modulation of hypothalamic chemosensitive neurons." International Symposium on Neuronal and Endogenous Chemical Control Mechanisms on Emotional Behavior. (Fukuoka) 1985. 2.

Sugimori, M., Shibata, S. & Oomura, Y.: "Electrophysiological basis for rhythmic activity in the suprachiasmatic nucleus of the rat." International Symposium on Neuronal and Endogenous Chemical Control Mechanisms on Emotional Behavior. (Fukuoka) 1985. 2.

井上真澄, 赤池紀扶, 大村 裕: 「GABA拮抗薬の作用機序」第62回日本生理学会大会(久留米) 1985. 3.

薬師寺隆, 赤池紀扶, 大村 裕: 「GABAで惹起される I_{Cl} への無機および有機化合物の効果」第62回日本生理学会大会(久留米) 1985. 3.

徳富直史, 赤池紀扶, 大村 裕: 「GABA惹起 Cl^- 電流のpentobarbitalおよびdiazepamによる増強機序」第62回日本生理学会大会(久留米) 1985. 3.

藤田一郎, 栗生修司, 山本智矢, 中野保彦, 西野仁雄, 大村 裕: 「サル青斑核の摂食課題時におけるニューロン活動」第62回日本生理学会大会(久留米) 1985. 3.

大村 裕, 西野仁雄, 栗生修司, C. R. P. Salaman: 「サル視床下部外側野(LHA)ニューロン応答性とカテコラミン系の関与」第62回日本生理学会大会(久留米) 1985. 3.

鍋倉淳一, 水野勇司, 南 武嗣, 井上真澄, 大村 裕: 「扁桃体中心核ニューロンの電気生理学的特性と化学感受性」第62回日本生理学会大会(久留米) 1985. 3.

山本智矢, 大村 裕, 西野仁雄, 中野保彦, 藤田一郎: 「自発的摂食課題時のサル視床下部ニューロン活動」第62回日本生理学会大会 (久留米) 1985. 3.

古賀知行, 石川友衛, 宮澤多恵子, 粟生修司, 大村 裕, 西野仁雄: 「サル前頭眼窩野ニューロンの識別関連応答と扁桃体能波活動」第62回日本生理学会大会 (久留米) 1985. 3.

中野保彦, 大村 裕, L. Lénárd, 山本智矢, 西野仁雄: 「サル扁桃体ニューロンのACh感受性および摂食行動に果す役割」第62回日本生理学会大会 (久留米) 1985. 3.

西野仁雄, 小野武年, 高橋二郎, 福田正治, 木村通郎: 「ラット背側ドーパミン (DA) 路破壊後の回転運動と DA 細胞移植による回復過程」第62回日本生理学会大会 (久留米) 1985. 3.

寺田憲司, 坂田利家, 大村 裕, 小山内たか, 永井克孝: 「Encapsulated 2-deoxytetric acid の摂食抑制作用」第62回日本生理学会大会 (久留米) 1985. 3.

南 武嗣, 杉森睦之, 大村 裕, 水野勇司, 鍋倉淳一: 「モルモット視床下部腹内側核ニューロンの膜特性と化学感受性」第62回日本生理学会大会 (久留米) 1985. 3.

西村博行, 井之口昭, 水野勇司, 南 武嗣, 清水宣明, 大村 裕: 「視床下部の電気刺激に対するラット孤束核および迷走神経背側運動核の反応」第62回日本生理学会大会 (久留米) 1985. 3.

清原壽一, 堀 哲郎, 大村 裕, 西野仁雄, 粟生修司, 柴田政章: 「サル視束前野温度ニューロンの非温熱および体温調節行動時の活動」第62回日本生理学会大会 (久留米) 1985. 3.

《超高压電子顕微鏡室》

佐々木貞雄, 中垣育子, 今井雄介, 東 克, 岩崎尚彦, 有井達夫, 高木雅行: 「頭足類, 両棲類の網膜桿体の元素分布および細胞骨格」第40回日本電子顕微鏡学会 (仙台) 1984. 6.

有井達夫, 浜 清: 「超高压電子顕微鏡に対する試料損傷低減用シャッター導入の試み」第40回日本電子顕微鏡学会 (仙台) 1984. 6.

浜 清, 有井達夫, 中村栄男: 「誘過電子顕微鏡によるステレオ写真からの三次元情報解析に

ついて」第40回日本電子顕微鏡学会（仙台）1984. 6.

Arii, T.: "Magnetic flux distribution in a fine iron particles with a shape of a rhombic dodecahedron." The 3rd Asia-Pacific Conference of Electron Microscopy. (Singapore) 1984. 8.

Arii, T., Hama, K., Yamagishi, S., Uchizono, K & Matsui, I.: "A New high voltage electron microscope for biological specimens." The 3rd Asia-Pacific Conference of Electron Microscopy. (Singapore) 1984. 8.

有井達夫：「ステレオ写真からの二次元構造解析」第30回日本電子顕微鏡学会シンポジウム（松山）1984. 10.

《組織培養標本室》

古家園子，東田陽博：「神経グリア雑種細胞内の [^3H] セロトニンの局在」第89回日本解剖学会（仙台）1984. 4.

《動物実験施設》

尾崎 毅，横山正松：「腸管蠕動におけるエンケファリンの関与」第62回日本生理学会大会（久留米）1985. 3.

成瀬 達，安井章裕，尾崎 毅，矢内原昇：「CCKと迷走神経による胆汁排出調整」第62回日本生理学会大会（久留米）1985. 3.

【 共 同 研 究 報 告 】

共同研究報告

〔目 次〕

脳のカルシウム — カルモジュリン依存性ミオシン 軽鎖キナーゼ (桑山秀人他)	155
平滑筋への核磁気共鳴法の応用 (富田忠雄他)	156
ペプチド結合の特異的切断によるタンパク質構造の変化と その安定性 (赤坂一之他)	157
NMR による唾液腺の燐酸代謝の研究 (今井雄介他)	158
¹ H-NMR 測定による血漿アルブミン分子の構造転移と molecular aging の研究 (曾我美 勝他)	161
生体膜系酸化還元酵素複合体の機能発現と高次構造に関する 分子生理学的研究 (山野俊雄他)	162
生体膜のゆらぎと動的構造 (下山雄平他)	164
心筋内高エネルギー燐酸の代謝に関する研究 (井上通敏他)	165
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 (早野三郎他)	167
生体膜燐脂質の秩序的配列への金属イオンの影響 (西川弘恭他)	167
In vivo 31P-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)	168
脳内活性物質と針麻酔の関連性についての研究 (森 和他)	170
両生類幼生における生理活性ペプチド産生細胞の 分化・発達に関する研究 (石 龍徳他)	173
CCK-8 および関連ペプチドの胃運動に及ぼす影響について (桑原厚和他)	174
ヤリイカ巨大神経線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)	175
多価性リガンドと結合した興奮性膜の形態と機能 (平野 寛他)	176
海馬の垂鉛に関する研究 (小野 哲他)	178
上頸部交感神経節のシナプス伝達活動と神経系特異タンパク含量の 変動 (永田 豊他)	179

Cl チャネル蛋白の精製と分析 (葛西道生他)	181
聴覚受容器の電気—音響変換および音響—電気変換の双対性 (橋本 享他)	181
哺乳類の耳音響放射に関する研究 (田中康夫他)	182
興奮膜に対するテルビウムイオンの効果と結合部位 (西江 弘他)	183
蝸牛コルチ器の電流による動きの観察 (柳次慧二他)	184
クラウンエーテル化合物によるイカ神経 Na チャネルの 閉塞機序 (瀬山一正他)	185
甲殻類における神経分泌機構の研究 (長野みさ子他)	186
腎由来高張耐性細胞のナトリウムポンプと耐塩適応機序 (佐藤温重他)	187
(Na ⁺ , K ⁺) ATPase の脂質平面膜 (黒膜) への再構成 (熊沢紀之他)	188
ナトリウムイオンの膜内移動機構 (原 諭吉他)	189
感覚器内シナプスにおける求心性神経伝達物質の同定・血漿中の 活性因子の性質 (小原昭作他)	190
カメ網膜の視細胞—双極細胞間のシナプス結合 (大塚輝彌他)	192
細胞内染色法と電顕観察による水平細胞の同定と杆体との 結合様式の解析 (塚本吉彦他)	193
筋紡錘神経末端におけるイオン・チャネルの 超微形態学的研究 (伊藤文雄他)	194
神経ペプチドの局在に関する超微形態学的研究 (小坂俊夫他)	195
樹上突起の三次元的構造の解析とその情報処理機能の 理論的解析 (村上富士夫他)	195
新生ラット筋紡錘に対する除神経と神経成長因子の効果 (久野 宗他)	197
前根由来の感覚神経の中樞効果 (久野 宗他)	201
Catecholamine の心筋単一 Na channel に 及ぼす効果 (有田 真他)	202
Angiotensin II の心臓洞房結節細胞の自発活動電位に 対する作用 (河合春郎他)	202

単離心筋細胞に不整拍動を誘起させる物質の収縮及び 膜電流に対する効果（小林正紀他）	203
平滑筋・心筋における細胞内カルシウムの局在 （北澤俊雄他）	203
摂食条件行動に関する条件結合についての研究 （石川友衛他）	204
成長ホルモン分泌抑制に関与する扁桃核－視床下部系 （加藤昌克他）	206
単一 Cl^- チャネルレベルにおける GABA 作用の 増強メカニズム（赤池紀生他）	208
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 －視束前野温度感受性ニューロンの非温熱刺激応答（堀 哲郎他）	209
大腸運動に対するエンケファリンの役割（横山正松他）	211
ラットの先天性無神経節腸管の発生機序について （沖 充他）	212

脳のカルシウム-カルモジュリン依存性ミオシン軽鎖キナーゼ

桑山秀人（旭川医大），江橋節郎（生理研）

ミオシン軽鎖キナーゼ（MLCK）はミオシン分子の分子量20Kダルトンのサブユニットを Ca^{2+} およびカルモジュリン（CaM）に依存して特異的にリン酸化するプロテインキナーゼであり，種々の筋組織からの単離法はすでに報告されている。今回，脳からの単離精製をおこなった。実験材料としては牛大脳をもちい，MLCK活性測定はトリ筋胃ミオシンを基質としてもちいた。

1 kgの脳に3容量の50mM リン酸緩衝液(pH7) を加えホモジナイズし遠心した。上清の活性分画は2回のDEAEセルロース（2ℓ，0.5ℓ），Phosphoセルロース（0.3ℓ）によるイオン交換クロマトグラフィー，及びCaM セファローズ（80ml）をもちいたアフィニティークロマトグラフィーにより約 10^4 倍まで部分精製した。この分画について，トリ筋胃ライオトニン（超沈殿活性化因子）活性を阻害するモノクロナル抗体をもちいてイムノブロットをおこなうと分子量159Kダルトン成分のみが免疫交差性を示した。そこで次に159K成分の単離を試みた。上記の操作を10回繰り返して得た分画（10kg大脳より約200ml）を濃縮脱塩後3度目のDEAEセルロース（3ml）によるクロマトグラフィーをおこなった。MLCKの活性分布は159Kを含む分画Aと含まない分画Bに分離された。A分画はさらにゲルろ過クロマトグラフィーをおこない159K成分が単離された。159K成分の脳内分布およびその生理的機能については今後の研究課題である。またMLCKの活性量は分画Bの方が多いことから，脳の真のMLCKは分画Bに含まれている事が予想された。

牛大脳10kgより159 k成分の単離

	全容 (ml)	全蛋白量 (mg)	MLCK 活性 (nmol/mg/min)	精製倍率 (n-fold)	収率 (%)
抽出	27,000	179,000	0.006	1	100
1 stDE	20,000	42,600	0.024	4	96
2 ndDE	3,000	21,100	0.046	8	91
Pーセルロース	3,000	3,330	0.282	47	88
CaM カラム	2.5	12.4	74.1	12,400	86
3 rdDE	5.0	0.76	198	33,000	14
AcA34	0.5	0.05	1,232	205,000	5.7

実験材料の入手にあたり御援助をいただいた動物実験施設の尾崎助教授に感謝します。モノクロナル抗体を提供してくれた鈴木理氏に感謝します。当教室においての三川隆博士の援助と，免疫交差性を指摘して下さった古賀律子さんに感謝します。

平滑筋への核磁気共鳴法の応用

富田忠雄, 高井 章 (名古屋大・医), 瀬尾芳輝 (京都府医大)

亘 弘 (生理研)

2次元化学交換 NMR 法 (NOESY) を用い, モルモット結腸紐平滑筋における高エネルギー磷酸化合物相互間の化学交換反応について解析, 検討を加えた。モルモット結腸紐 (約0.2g) を摘出後, 径10mmの NMR tube 内に設置し, 95% O₂/5%CO₂ を飽和したリンガー液 (24℃) を15 ml/min の流速で灌流した。³¹P-NMR スペクトル測定には Bruker 社製 WM-360wb を用い, 磷の共鳴周波数145.8MHzを用いた。2次元 NMR スペクトルは3パルス系列 (90—展開時間—90—混合時間—90FID 採取—緩和待ち時間) を用い, 256種類の展開時間について各64回の積算を行った。測定に13時間を要した。

2次元化学交換 NMR スペクトル測定の前後に通常の1次元 ³¹P-NMR スペクトルを測定したが, 13時間の2次元化学交換 NMR スペクトル測定前後でスペクトルの変化は認められず, 灌流により平滑筋は一定の条件に保たれていたと考えられる。2次元化学交換 NMR スペクトルのシグナル強度等高線図を示す。2次元スペクトルには2種類の共鳴線が認められる。すなわち一つは対角ピーク (I, II, III, IV, V, VI) であり, もう一方は非対角ピーク (A, B) である。非対角ピークは反応する2つの対角ピーク間の化学交換反応による結合を示す。非対角ピーク A と B はクレアチン磷酸と γ -ATP 間の磷酸の交換反応存在を示している。即ち, 骨格筋と同様にクレアチンキナーゼによるローマン反応が平滑筋のエネルギー代謝において役割を果していると考えられる。またミオキナーゼ反応から予測される γ -ATP と β -ADP との化学交換反応は検出されていない。現在2次元化学交換 NMR 法により反応の flux を求めることを試みている。また測定条件を検討し, ミオキナーゼ反応の検出を試みている。

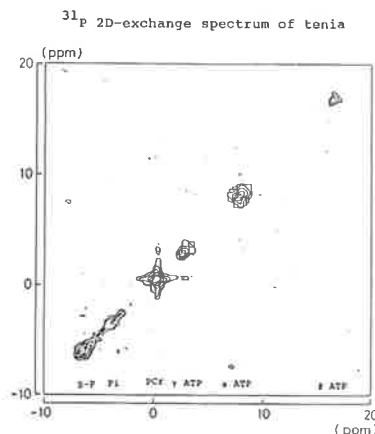


図. モルモット結腸紐 2次元化学交換 NMR スペクトル。

ペプチド結合の特異的切断によるタンパク質構造の変化とその安定性

赤坂一之（京都大・理）

亘 弘（生理研）

Streptomyces subtilisin inhibitor (SSI) は、2 個の等価なサブユニットより成る。各々のサブユニットは223個のアミノ酸残基から成り、そのうち芳香族アミノ基は Tyr 3 個、Phe 3 個、His 2 個、Trp 1 個の計 9 個である。この SSI の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、領域においても重なりが大き過ぎるので、選択的重水素化によってスペクトルを単純化した。

線型の温度依存性

SSI-Phe, Trp, Tyr $_{2,6}^{-d}$ および SSI-Phe, Trp, Tyr $_{3,5}^{-d}$ について $\sim 0^\circ\text{C}$ まで温度を下げて測定を行ったが、それぞれの Tyr について各一本の吸収線しか観測されなかった。このことは 3 個の Tyr ring がいずれも、3 位と 5 位のプロトン間および 2 位と 6 位のプロトン間のシフト差に比べて十分速い速度（遅くとも 10^2sec^{-1} 程度以上であろう）で 180° flip していることを示すものである。

結晶構造から考えると、Tyr 7 及び Tyr 75 はかなり露出しており、 180° flip に際しての立体的な障壁は小さいと予想され、上の結果は一応妥当なものであると言える。しかし、Tyr 93 についてはその周辺環境はかなり密であり、結晶構造を維持したままでは ring の回転は起こり得ない。従って、この Tyr 93 についても ring の flip が起こっているということは、それを可能にする様な、周囲の原子団協調的な運動が SSI のコア領域に存在していることを意味している。

選択的 T_1

SSI-Phe, Trp, Tyr $_{2,6}^{-d}$ について、芳香族領域のシグナルのみを選択的に反転させて、Tyr の 3, 5 位プロトンの T_1 を測定した。その結果、 25°C 、 $\text{pH } 7.0$ では Tyr 7 で 0.82sec 、Tyr 75 で 0.39sec 、Tyr 93 で 0.25sec という値が得られた。

これらの選択的 T_1 値を比較することによって、残基間相互作用の大きさは Tyr 93 > Tyr 75 > Tyr 7 の順になっていることがわかる。これは X 線から得られる結果 (93 > 7 > 75) とは異なっているが、これまで溶液中で測定された化学修飾のされ易さや、 $^1\text{H-NMR}$ から得られた Tyr 水酸基の pK_a 値と良い一致を示す。

〔学会発表〕

井上智子, 赤坂一之, 亘 弘, 阿部公江, 甲斐荘正恒, 辻 直志, 京極好正, “プロトン緩和によるアミノ酸側鎖の存在状態 SSI の環状アミノ酸”

第23回 NMR 討論会（仙台）1984年11月

NMR による唾液腺の磷酸代謝の研究

今井雄介, 村上政隆 (大阪医大), 瀬尾芳輝 (京都府医大)

亘 弘 (生理研)

外分泌腺は、その分泌過程において酸素消費速度が著しく上昇し、熱産生も増加して、エネルギー代謝が活発になることが知られている。ここで消費されるエネルギー（酸素、ブドウ糖等）はそのエネルギー形態を様々な形に変え、物質輸送に供給されると予想される。さらに、分泌圧と分泌速度の関係を調べてみると、このエネルギーのうち分泌仕事として外界にする仕事はごくわずかで、 Na^+ 等の電解質の輸送に供されるエネルギー流がかなりあると予想される。ことに輸送機構とエネルギー供給機構の接点には、ATPの加水分解により駆動される Na/K ATPaseが存在しており、種々の分泌条件下で Na/K ATPaseと腺の高エネルギー磷酸化合物（ATP、クレアチン磷酸等）の働きを知ることが重要となる。

外分泌腺のモデル臓器としてイヌ顎下腺を Krebs Henseleit Ringer で血管灌流し、これに磷核磁気共鳴法を適用し、アセチルコリン刺激時の分泌量とATP、およびクレアチン磷酸の組織レベルを経時的に測定した。灌流液に $5 \times 10^{-6} \text{M}$ のアセチルコリン (ACh) を加えると、腺から著明な唾液分泌が観察できる。この様な分泌状態にある腺ではATP、クレアチン磷酸の減少とpHの低下、ADP, Piの増加が観察された。灌流液からAChを除去すると、唾液分泌は停止し、各磷酸化合物のレベルは元に戻る。この様にAChによる分泌刺激はATP, PCrの消費とADP, Piの産生を促進し、エネルギー代謝が昂進するものであることが示された。

さらに ^{31}P -TMR法によりin situ状態で正常血流条件下のイヌ唾液腺の磷酸化合物の動態を調べた結果、人工的に灌流した唾液腺と同様の結果が得られ灌流条件が適切であることが示された。灌流液の Na^+ を完全に Li^+ で置換すると、ACh刺激をしても少量の唾液が一過性に分泌するのみで、腺組織のATP, PCrは変化しない。ATP, PCrレベルが減少しないことは細胞外に Na^+ のない条件下ではAChによる刺激もエネルギー代謝を昂進させないことを示すもので興味深い。 Na^+ を含む灌流液に戻すと刺激がないにもかかわらず、僅かな分泌とATP, PCrレベルの減少が見られた。これらの結果は、NaClおよび水の輸送を主たる機能とする唾液腺上皮膜組織における磷代謝には Na^+ は必須のイオンであり、 Na^+ を完全に Li^+ で置換するとATP, PCrの消費は抑制されることを示し、分泌機構の解明に役立つ情報となる。

一方灌流イヌ顎下腺を材料にした場合、1) 腺が大きく、30mm径の試料管を用いねばならず、2) 腺の大きさや血管構築に個体差があり、3) 手術に時間がかかる等の欠点があった。本研究において、ラット顎下腺(0.15~0.2g)を灌流しつつ10mm径の試料管を用い ^{31}P -NMRの測定が可能となった。この結果、1) 腺の個体差が少なく、2) 手術時間が短縮し、3) 10mmの試料管内での灌流のため磁場の均一度が良くなって分解能が向上し、4) ^{31}P のみならず、これ以外の核

種 ^{23}Na , ^1H , ^{13}C 等の測定ができ、5) 飽和移動の実験が可能となる、等の利点が得られた。しかし腺が小さいので分泌量が少なく、超伝導磁石の外部に唾液を導出しての分泌量同時測定ができない欠点がある。腺は HEPES で pH 7.4 にした Krebs 液で 2 ml/分の流速で灌流し、イヌ顎腺と同様の燐化合物（糖燐化合物、無機燐 Pi, クレアチン燐酸 CrP, ATP 等）の吸収を同定した。結果を図 1 に示す。灌流停止により、ATP, CrP 減少, Pi 増加が観測され、図 2 に示す様に、これは灌流再開で元のレベルに回復した。また、刺激物質であるアセチルコリン (Ach) の濃度を変え ^{31}P -NMR を適用した。 10^{-6}M Ach 刺激では CrP が減少, Pi が増加したが ATP は僅かな減少にとどまった。 10^{-7}M Ach の刺激では、これらの変化程度は少なくなった。さらに 10^{-3}M Ach の刺激では、CrP は一過性の減少と回復がみられたが ATP は減少を続け、Pi は著明に増加した。この高濃度 Ach の効果は ATP とクレアチン燐酸の間の関係が Ach の濃度によって変化したことを示すもので、他にまだ報告されていない。10mm ϕ 試料管中の灌流ラット唾液腺の NMR 測定が可能になったことによって核オーバーハウザー効果を利用した唾液腺エネルギー貯留の研究を推進することが可能になった。

^{31}P -NMR 法によりラット顎下腺の灌流を試料管内で行なった。高い精度で腺組織内の無機リン酸、クレアチンリン酸、ATP 及び ADP が測定できた。長時間（一時間）の Achetyl Choline ($10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-3}\text{M}$) の刺激時の経過の追跡を行い、唾液分泌との関係を調べた。無機リン酸の増加、クレアチンリン酸の減少が分泌時の特徴であった。

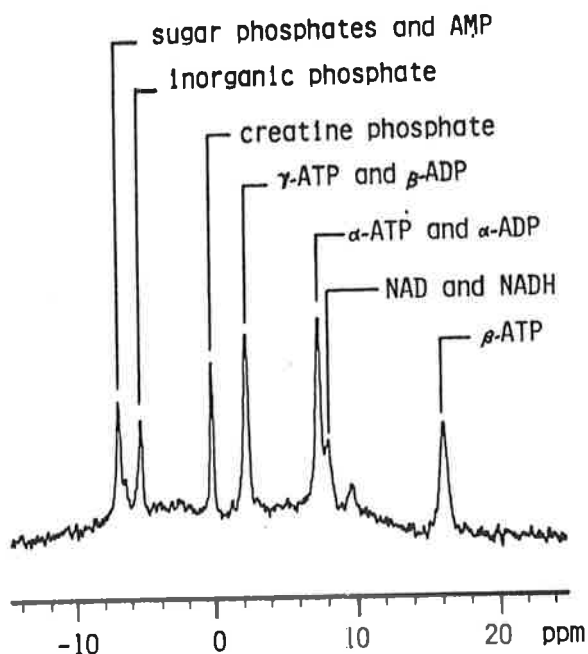


図 1. 灌流ラット顎下腺の ^{31}P -NMR スペクトルと差スペクトル。Pi: 無機燐, CrP: クレアチン燐酸

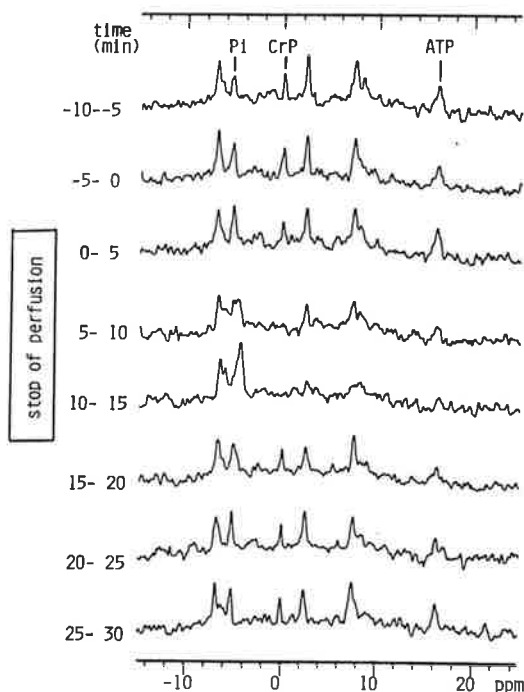


図2. 灌流停止による灌流ラット顎下腺磷化合物の変動。

〔発表〕

M. Murakami, Y. Seo, Y. Nakahari, H. Mori, Y. Imai and H. Watari. in "Secretion: mechanisms and control" eds. Case, Lingard & Young, : 17-21, Manchester University Press, (1984).

I. Nakagaki, S. Sasaki, M. Shiguma and Y. Imai Pfluger Arch. 401: 340-345(1984).

H. Mori, T. Nakahari and Y. Imai. Jpn J. Physiol. 34: 1077-1088(1984).

Y. Seo, K. Yoshizaki, H. Nishikawa, T. Morimoto, S. Naruse, I. Koizuka and H. Watari Jap, J. Physiol. 34: 927-931, (1984).

M. Murakami, Y. Seo, T. Nakahari, H. Mori, Y. Imai and H. Watari Jap, J. Physiol. 34: 587-597, (1984).

¹H-NMR 測定による血漿アルブミン分子の構造転移と molecular aging 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 (生理研), 志賀 潔 (熊本大・医), 赤坂一之 (京都大・理)

血漿アルブミン分子は0.01M NaClにおいて, N-F 転移 (pH 4.5~3.8), N-B 転移 (pH 7~9) を示す。また, pH 7~9 で, N-A 異性化反応 (分子内 SH,S-S 交換反応で Molecular Ageing と呼ばれる) により, A型 (aged form) に変化する。このA型構造研究の基礎として, N-F 転移, N-B 転移, F型構造のゲル化について, ¹H-NMR を用い, スペクトル, 縦緩和時間 (T_1), 交叉緩和時間 (T^*) を測定した。

1. N-F 転移と Molten-Globule State

N型 (pD 5.32), F型 (pD 4.03), E型 (pD 3.02) の固有粘度はそれぞれ3.7, 4.4, 8.3 ml/g (Tanford et al (1955), α -helix 含量は約7060, 50%であるが, F型の¹H-NMR スペクトルはE型に近い。すなわち, disordered form のスペクトルに近い¹⁾。この結果は酸滴定解析より得られたN-F 転移における荷電側鎖間のイオン結合 (約40対) の開裂に対応している。また, 飽和移動より求めた交叉緩和時間の増加も, F型構造において分子の flexibility (intramolecular motility) の増加を示唆している。このように, F型は分子容があまり増加せず, α -helix 含量も高く, flexibility も増加し, Molten-Globule State [Ohgushi, M. et al. (1983) FEBS Lett. 164, 21-24, Dolgikh, D. A. et al. (1981) FEBS Lett. 136, 31 1-315] に近い構造である重水置換した sodium dodecyl sulfate をモル比で 1 対10 (AD₁₀) にすると, N-F 転移において分子容が増加せず, α -helix 含量も変化せず, 酸滴定で約40対の側鎖間のイオン結合が開裂し (side chain melting), 交叉緩和時間の増加 (intramolecular flexibility の増加) したアイデアルな Molten-Globule State にF型は対応している²⁾。

2. N-B 転移 (pH 7~9)

この転移において, $[\alpha]_{300}$, $[\alpha]_{233}$, $[\alpha]_{268}$, $[\alpha]_{262}$ は変化するが, α -helix, β -等の含量はほとんど変化せず, 飽和移動より求めた交叉緩和時間も, N型, B型間に差がなかった。すなわち, スピン拡散速度より測定した分子の rigidity に変化がなかった。他方, B型は各種の薬物などに対する結合能が増加し, 血漿アルブミン分子は hinge (1分子当り3箇所) を中心に subdomain 間のゆらぎを増すと説明されている。これらの結果より, B型では, S-S 結合の二面角の変化, 芳香族側鎖微環境の変化が認められるが, α -helix, β -構造などの二次構造変化のあまりない, また, ¹H-NMR 的にも subdomain の rigidity に変化のない hinge 領域³⁾を介しての subdomain の揺ぎの増加した構造と考えられる (Subdomain-Breathing State)。

3. BPA*-Gel 中の水構造

市販ウシ血漿アルブミン (BPA) には, F型 (pD 4) 構造を特異的に加水分解する protease が

少量含まれ、cys-391とCys-435の間で1～2箇所切断しBPA*と呼ばれる構造になる（Ⅰ，Ⅱ項の実験はproteaseを含みぬ精製したウシメルカプトアルブミンを使用している）。BPA*は8%以上ではゲル化し、HDOの縦緩和時間（ T_1 ）は異常に短く、 $1/T_1$ の蛋白質濃度依存性より求めた水和量も以上に多い。また蛋白質よりHDOへの緩和移動より求めた交叉緩和時間は側鎖とほぼ同一で、BPA*-Gel中での水和量が多いことを示唆している4）。また、蛋白質溶液のゾルゲル変換における水構造変化を癌組織のモデル系として研究を進めている。

〔発表〕

1. Nagaoka, S., Era, S., Kuwata, K., Sogami, M., Shiga, K., Watari, H. & Akasaka, K. (1984) 8th Int. Biophys. Cong. Abstract : 65
2. Era, S., Nagaoka, S., Sogami, M., Watari, H. & Akasaka, K. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. (*in press*)
3. Era, S., Ogura, S., Itoh, K. B., Nagaoka, S., Kuwata, K., Sogami, M. & Watari, H. (1985) China-Japan Bilat. Symp. Biophys. Abstract: 15-17
4. Sogami, M., Nagaoka, S., Era, S., Inouye, H., Kuwata, K., Kida, K., Watari, H., Shiga, K. & Akasaka, K. (1985) Int. J. Peptide Protein Res. (*in press*)

生体膜系酸化還元酵素複合体の機能発現と高次構造に関する分子生理学的研究

山野俊雄，東条博雄，藤井 茂（大阪大・医），三宅可浩，三浦 洸（環境器病セ・研究所）
堀池喜八郎（滋賀医大），志賀 潔（熊本大・医），亘 弘（生理研）

生体膜酸化還元酵素としてはD-アミノ酸オキシダーゼ，及び，チトクロームP-450系酵素を用いて研究を行い，モデル酵素として，リボフラビン結合蛋白について検討した。D-アミノ酸オキシダーゼの反応中間体である紫色中間体の構造は同位体気質を用いた共鳴ラマンスペクトルの解析から，還元型酵素と気質中間体であるイミノ酸の charge transfer(ct) 複合体であることが，昨年度の本研究班によって示されたが，今回は ^{13}C , ^{15}N を含むFAD, $[4\alpha\text{-}^{13}\text{C}]$ -, $[4, 10\alpha\text{-}^{13}\text{C}_2]$ -, $[2\text{-}^{13}\text{C}]$ -, $[5\text{-}^{15}\text{N}]$ -, $[1, 3\text{-}^{15}\text{N}_2]$ -FADを合成し，補酵素として反応させ，その紫色中間体の共鳴ラマンスペクトルを測定した。その結果，ラマン線の動態シフトの解析から，この中間体がやはり還元型酵素とイミノ酸の複合体であることが結論された。

本酵素の生理的意義に関連して，豚の各組織臓器における含量の比較を酵素免疫法により行い，大脳，心臓では検出されないが，腎臓，肝臓，小脳に存在し，免疫化学的差のないこと，また，本酵素の自殺基質であるD-プロパルギルグリシンをSHRに腹腔内注射し，対照と動揺に糖尿，アミノ酸尿が観察されたが，対照ラットに見られた Na^+ 排泄の増加， K^+ 排泄の減少傾向は見

られないことなどが判明した。²⁾

フラビン酵素における酵素蛋白とフラビンの相互作用のモデルとして、卵白リボフラビン結合蛋白とリボフラビンの相互作用を $[2-^{13}\text{C}] - [4, 10-^{13}\text{C}_2] - [4\text{a}-^{13}\text{C}]$ - リボフラビンを合成して ^{13}C -NMR による解析を行った。図1. は $[4, 10-^{13}\text{C}_2]$ リボフラビンを用いたときの NMR スペクトルを示したものである。その他の結果と合わせて、リボフラビン結合蛋白は中性型リボフラビンと結合し、結合リボフラビンの N(3) 付近の疎水性環境によって中性型リボフラビンが安定化することが示された。

副腎皮質の P-450 については P-450_{11 β} による 18-ビドロキシデオキシコルチコステロンから 18, 19-ジヒドロキシデオキシコルチコステロン生成反応における生成物の NMR による構造決定と反応機構の解析が行なわれた。³⁾

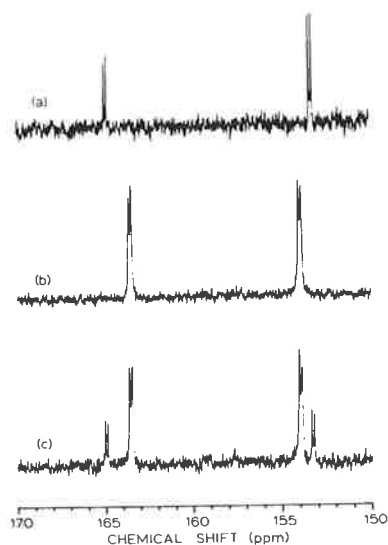


図. (a)遊離, (b)結合 $[4, 10\text{a}-^{13}\text{C}]$ - リボフラビン及び(c)両者混合物の pH 7.09 における ^{13}C -NMR スペクトル(a) ^{13}C -リボフラビン, 0.21 mM; (b)リボフラビン結合蛋白1.6mM; (c) ^{13}C -リボフラビンやや過剰, 積算回数(a)116,000; (b)73,000; (c)56,000.

1. Nishina, Y., Shiga, K., Miura, R., Tojo, H., Ohta, M., Miyake, Y., Yamano, T. and Watari, H. (1984) Proceedings of the Ninth International Conference on Raman Spectroscopy : 152-153, Tokyo
2. Miura, R., Tojo, H., Fujii, S., Yamano, T. and Miyake, Y. (1984) J. Biochem., **96**: 197-206
3. Fujii, S., Momoi, K., Okamoto, M., Yamano, T., Okada, T. and Terasawa, T. (1984) Biochemistry **23** : 2688-2564.

生体膜のゆらぎと動的構造

下山雄平, 松木貴司, 高橋伸幸 (北海道教育大・函館)

相馬純吉 (北海道大・工), 亘 弘 (生理研)

本研究は、飽和移動 (ST) 電子スピン共鳴法 (ESR)¹⁾ と、新しいパルス ESR 法である二次元電子スピンエコー法 (2D-ESE)²⁾ を用いて、配向脂質膜 (OBM) の動的解析を行い比較的遅い時間領域での脂質分子の運動を検出した。また、カフェリイ等によるシンクロトロン放射超強力×線源を用いた OBM の相転移挙動の解析との比較検討を行ったのでその概要を報告する。

生体膜は主に磷脂質と蛋白質よりなる複合系である。その基本的骨格は二重層構造であり、ファンデアワールスカや親疎水結合によって決定される。このような構造を利用して、生体膜の諸機能を発現するが、その機能は流動性といわれる動的性質に支配されている。現在、流動性の重要性は認識されているがその異方的性格と Time Scale については未確定で、目下磁気共鳴法とくにスピン・ラベリング法によって研究されている。

コーネル大学の G. ミルハウザー等によって開発された、2D-ESE はパルス ESR 法の一つで、電子スピン系のダイナミックスの能動的測定法である。これによって、従来では不可能とされていた多重緩和現象を同時に測定することができるようになった。生体膜系に 2D-ESE を応用するさいに、ほとんどのマイクロ波エネルギーが生体膜系にとどくことなく、水に吸収されるという欠点が明らかとなった。そのため空洞共振器のマイクロ波場の照射範囲を広くする事が対策として考えられた。そこでルーギャップ型共振器の開発を行い、2D-ESE を測定の困難な生体膜系に応用できるように改善した。ルーギャップ型共振器は J. ハイド博士によってすでに連続波 ESR に応用されている電子機器であるが、この研究によってパルス ESR にも非常に有効であることが明らかとなった。

2D-ESE をスピン・ラベリングした脂質膜に適用して、次のような結果を得た。①膜分子の異方的運動が並進運動と回転運動とに分けることができ、ブラウン運動型の回転運動が支配的であることがわかった。②ミリ秒程度の比較的遅い運動が検出できた。③ゲルでは、脂質分子の運動は首振りよりも、軸回転が優勢であることがわかった。

シンクロトロン放射光による超強力×線源を用いた OBM の相転移挙動の解析と 2D-ESE 法による結果の比較より次のことがわかった。①OBM のゲル相では長距離相互作用が膜面内 (二次元シート) と膜面に垂直方向の二方向に働いていることがわかった。②しかしゲル相膜の面内での脂質分子の秩序はかならずしも高くなく、局所的に短距離相互作用も理論的予測はど強くない事がわかった。③膜面に垂直な方向で14次までの高次の多重反射がえられた。これより膜の層構造が一様ではなく、膜面内でのアンデューレーションまたは、膜の局所的なモザイク構造が存在することがわかった。この反射線の張る角度より秩序度が計算でき、ESR 法より求めたそれとほぼ

同一であった。このことは、測定法の Time Scale からみて意義ある結論である。

本研究は、北海道教育大と生理学研究所にて主に遂行されたが、一部、コーネル大学ベーカー研究所、J. H. フリード教授研究グループとの共同研究が含まれる。フリード教授とファインゲンソン教授に感謝の意を表する。

〔発表〕

1. H. Watari and Y. Shimoyama (1985) Bruker Report 1 ; 24.
2. Y. Shimoyama and H. Watari (1985) Appl. Spectr. 39 ; 170
3. Y. Shimoyama and J. H. Freed (1985) Biophys. J. (*in press*)

心筋内高エネルギー燐酸の代謝に関する研究

井上通敏, 楠岡英男, 常岡 豊 (大阪大・医), 亘 弘 (生理研)

本研究の目的は、各オーバーハウザー効果 (NOE) を用いて、摘出灌流心における心筋内燐化合物の相互干渉を検出し、ローマン反応によるエネルギー貯留の機作を明らかにする点にある。しかし、ローマン反応の反応速度を NOE により解析するためには極めて安定した代謝状態を長時間にわたり維持することが必要であり、摘出灌流心ではこの条件の達成は困難であった。そこで、心時相に同期させた NMR 計測法を新たに開発し、心周期の各時相における心筋内のエネルギー代謝を検討することにより、心臓におけるエネルギー貯留の検討を行った。

1. 心周期に同期させた ^{31}P -NMR 測定心臓は、周期的に収縮・弛緩を繰り返し、その仕事量が周期的に変動する臓器であり、したがって、心筋内のエネルギー動態も心周期に同期して変動すると考えられる。しかし、この変動はさほど大きくないと予想され、従来の生化学的分析手段では、個体間の変動に埋もれてしまい、観測は極めて困難であった。そこで、本研究では、NMR 計測の利点である非破壊性、連続性に着目し、左心圧に同期させて ^{31}P -NMR 計測を行うシステムを新たに開発した。体重約 100 g の雄性ラットより摘出し、酸素化した灌流液により 100 cm 水柱の圧にて Langendorff 式に灌流した。灌流液は、葡萄糖 11.1 mM, ピルビン酸 2.0 mM を含む Krebs-Henseleit 変法液を使用した。この心標本の左室内に挿入した長さ 5 cm のカテーテルを、心標本の外部にてトヨタ社製カテーテル先端型圧トランスデューサに接続し、左室圧 (LVP) の測定を行った。これは、圧トランスデューサを NMR 信号検出コイルの検出領域外に留置することにより、外部からの高周波雑音の NMR 信号への混入を防止するためであるが、測定された圧の周波数特性への影響はほとんど認められなかった。

作成した NMR 制御装置は、左室圧の上昇開始時点を検出し、NMR 計測を開始させるパルス信号を任意に設定された遅延時間の後に NMR 測定装置に送るもので、任意の心時相における

- NMR 計測が可能である。また、測定開始後の一定時間はパルス信号の割込みを禁止することにより、不整脈の影響を除外した。この装置では3種類の遅延時間は順次繰り返しながらデータを蓄積できるので、1回の実験により心周期の3時相における磷の NMR スペクトルを観測しうる。この灌流心標本と圧トランスデューサを共に外径15mmの NMR 試料管に挿入し、NMR 測定装置 (Bruker 社 WM-360wb)、磁場強度8.5Tesla、P の共鳴周波数145.8MHz) 内に納めた。また、心臓より流出した灌流液をポンプにて吸引し、30秒毎に測定して冠流量とした。
2. 心筋内高エネルギー磷の心周期内変動 本システムにて観測された磷 NMR スペクトルより、心筋内のクレアチン磷 (PCr)、無機磷 (Pi) は、それぞれのピークの面積から、ATP は $[\beta\text{-P}]$ ATP のピークの面積から定量した。ADP は、 $[\gamma\text{-P}]$ ATP と $[\beta\text{-P}]$ ATP との面積の差として求め、さらに、細胞内 pH をクレアチン磷を基準とした無機磷の化学シフトから同定した。なお、定量に際しては、データ収集時に設定した各遅延時間の差に基づく NMR 信号の強度変化を、既報のシュミレーションに従って補正した。上記の NMR 測定システムを用いて観測した心筋内磷化合物の動態の13例を求めた。1心周期を7分割し、収縮開始直後の値を基準として、その相対的变化で表した。心筋内のクレアチン磷は、収縮早期 (14%点) と収縮末期 (43%点) において有意に減少し、逆に、無機磷と ADP はこれらの時相において有意に増加した。ATP は収縮末期 (43%点) においてのみ有意に減少し、細胞内 pH も収縮末期に6.95と低下した。すなわち、心筋内のエネルギー関連磷化合物は心周期に同調した周期的変動を示し、クレアチン磷、ATP は、収縮期に減少し、拡張期に増加するが、無機磷、ADP は、これと逆位相で変動することが明らかとなった。また、心筋細胞内における ATP 加水分解に対する親和性の指標である $[pi]/[PCr]$ 、 $[ADP] \cdot [Pi]/[ATP]$ を上記の結果より算出したところ、収縮早期 (14%点) において有意に増大しており、この時相におけるエネルギー消費が亢進していることが示唆された。以上の結果より、心室の圧発生に伴うエネルギー消費の増加により、心筋内磷化合物の周期的変動が惹起されているものと推測された。
3. まとめ 心筋におけるエネルギー代謝に関しては、従来、生化学的手法により多くの検討が加えられている。しかし、心周期に同期した解析はほとんど報告されておらず、電気的刺激による心収縮に同期させた生化学的手法により心筋内の高エネルギー磷化合物の心周期内変動を検討した報告がわずかにあるのみである。これは、生化学的手法が破壊的測定法であるため、微小な変動の検出が極めて困難であることによると考えられる。この点、NMR による計測に期待されるが、大動脈圧にて NMR を制御した例があるのみで、左室圧を直接モニターし、これにより測定の制御を行ったのは本研究が最初である。本システムでは、左室圧にて NMR 測定装置を制御して、同一灌流心標本において任意の心時相における心筋内の磷化合物の測定が可能となった。

本研究において、灌流液にピルビン酸を基質として添加している系を用いて心筋内高エネルギー磷の周期的変動が観測されたことは、この周期的変動が、従来予想された解糖系におけるエネルギー貯留は、心収縮に伴うエネルギー供給の遅延に基づくものではなく、クレアチン

磷酸による細胞内エネルギー伝搬の遅延に基づくものと推定された。以上の結果より、心筋内におけるエネルギー貯留は、心収縮に伴うエネルギー消費の亢進により減少し、拡張期に充満されること、また、このエネルギー充満はクレアチン磷酸によるエネルギー伝搬により行なわれているものと推定された。

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, 高橋勝因, 曾我美勝, 長岡俊治 (岐阜大・医)

亘 弘 (生理研)

生体内における水分子のNMRによる研究はNMR-CTの基礎として多くのグループにより研究されている。高分子系における水構造研究のモデル系としてソフト・コンタクトレンズ (SCL), 蛋白質ゲル中の水構造を NMR を用い, 水分子の化学シフト, 縦緩和時間 (T_1), 交叉緩和時間 (T_{ρ}) などを解析し, 興味ある結果を得た。すなわち 1. 円柱状 SCL 中の水分子の NMR スペクトルは 4.73ppm (線幅は小) と 4.47~4.55ppm (線幅は大) を示す。SCL 表面の 4.73ppm の水分子は重水中に浸すことにより, 容易に大部分を除去 (重水と交換しうる) しうる。4.47~4.44ppm の水シグナルは SCL 高分子膜目内の結合水と重水によるものと思われる。2. 表面の 4.73ppm の水の縦緩和時間 (T_1) は 2.7~2.8sec, SCL 高分子膜目内の水 (結合水と自由水の混合) の縦緩和時間は 0.56sec~0.63sec で含水率の多いものほど大きい。3. SCL 高分子プロトンから水分子への飽和移動 (スピン拡散) 速度, 交叉緩和時間 (T_{is}) を測定し, SCL 高分子膜目と水分子の相互作用について推定した。高磁場側の水 (4.47~4.55ppm) へは 0.37~0.40sec でスピン拡散した。この結果は 4.47~4.55ppm の水が高分子膜目とかなり強く相互作用していることを示唆している。4. BPA-gel (ウシ血漿アルブミンゲル) 中の水 (HDO) は 4.73~4.74ppm で線幅が大きく, 縦緩和時間 (T_1) も短く, ウシ血漿アルブミン分子より効率よくスピン拡散をしているが, SCL 表面の水は質的には BPA-gel 中の水に似た性状を持っている。

生体膜燐脂質の秩序的配列への金属イオンの影響

西川弘恭 (京都府医大), 中沢 隆 (奈良女大・理), 亘 弘 (生理研)

人工扁平多重層リン脂質膜のリン-NMR スペクトルでは, リン脂質極性部位のリンの化学シフトの異方性のため, リン脂質回転長軸と静磁場のなす角度への依存性がみられる。この依存性は生体膜であるウシ脊髄白質ミエリンでもみられる。本研究では, ミエリン脂質 NMR スペクトルの NMR 緩和時間をその秩序的配列の指標とし, 金属イオンによるその配列への影響を検討し

た。

立方体（1辺：6 mm）に切ったウシ脊髄白質を試料とした。測定装置はjeolPFT-100NMR（リン：40.3MHz）を用いた。NMR緩和時間測定は T_1 および T_2 パルス系列で行った。測定温度は24℃であった。 T_1 緩和時間について：リンガー氏液中に置いた場合、始めと2 hr後の T_1 値に変化はなく、383msecであった。10mMEDTA添加リンガー氏液に置いた場合、 T_1 値は695msecであった。これに10m Ca^{2+} を加えたリンガー氏液に置いても T_1 値は各々499msecと489msecであった。 T_2 値について： T_1 緩和時間測定条件と同じ場合、 T_2 は2.5～2.9msecであった。スペクトルによる化学シフトの異方性の角度依存性について：上記いずれの測定条件においても、角度依存性に変化はみられなかった。

速いリン脂質極基部位の運動を表す T_1 値はEDTA処理により増加を示した。これは2価陽イオンによる極性基部位の速い運動に対する制約を意味する。一方、遅いリン脂質の運動を表す T_2 値はいずれの場合も変化なく、影響はみられない。また、pHによる T_1 、 T_2 値の変化もなく、角度依存性でも変化がないことから、ミエリンの陽イオンの影響は、リン脂質の配列ではなく、極性基部位の速い運動に主としてみられるといえる。

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，田中忠蔵，樋口敏宏（京都府医大），亘 弘（生理研）

動物を生かしたまま、局所のエネルギー代謝を測定できる in vivo ^{31}P -NMR 法を用いて実験的脳虚血および移植脳腫瘍の代謝動態を研究した。

実験モデルとして次のものを用いた。①脳虚血モデル：体重約80 g の Mongolian gerbil 25尾を用い、pentobarbital 35mg/kg腹腔内投与またはエーテル麻酔下に、右総頸動脈を露出し、その周囲に外科用結紮糸を回してかけた。この糸を結紮する前後（虚血前・後）および、結紮した糸を再び解いた後（再開通後）の脳内エネルギー代謝変化を連続的に in vivo ^{31}P -NMR で測定した。なお、虚血時間を30分間～6時間まで種々に変化させて、観察を行った。②移植脳腫瘍モデル：CD Fisher rat 23尾を用い、EA285 rat glioma 細胞 10^{6-7} 個を腰部皮下に移植した。腫瘍直径が1 cm以上になった時点で腫瘍の in vivo ^{31}P -NMR スペクトル変化を観察した。

in vivo ^{31}P -NMR 測定にはGX-200 spectrometer (JEOL, Japan) を用いた。静磁場4.8 Tesla(^{31}P 共鳴周波数80.7 MHz) の垂直型超伝導磁石内に有効口径7 cmのプローブを有し、 $\phi 0.8$ cmの表面コイルにて in vivo ^{31}P -NMR スペクトルを得ようになっている。通常、パルス幅14 μ s (約60° パルス)、繰返し時間1.9秒、データ point 2048個、スペクトル幅7096 Hz, acquisition time 1.5 sec, 400回の加算を行った。得られたFIDに30Hzのexponential noise filterをかけてフーリエ変換してスペクトルを得る。次のような結果が得られた。

1. 脳虚血モデル25尾中、右総頸動脈結紮後 in vivo ^{31}P -NMR 測定中に死亡したものが6尾あり、結紮しても ^{31}P -NMR に変化のなかったものが11尾あった。残りの8匹に、結紮後 ^{31}P -NMR スペクトル変化が認められた。すなわち、総頸動脈を結紮すると、ATP、クレアチンリン酸 (PCr) の高エネルギーリン化合物のピークが低下し、無機リン酸 (Pi) のピークの増大と高磁場側への若干のシフト (組織の酸性化を示す) が認められた。しかし、それらの変化の程度および時間的経過は個体によりばらつきがあり、結紮直後から ATP, PCr のピークは消失し、Pi のピークのみになるものもあれば、一過性に ATP, PCr の低下と Pi の増大を示し、その後正常のスペクトルパターンに戻るものなど、種々であった。虚血にて Pi のみのスペクトルを示していても、再開通を行うと、全例で1時間以内に ATP, PCr は回復し、Pi は減少し元のスペクトルパターンに戻った。このスペクトル回復は、虚血時間が6時間に及ぶ例でも、認められた。我々が、すでに発表したウイスターラットの4動脈結紮による脳虚血モデルによる再開通後の ^{31}P -NMR スペクトル変化とは異なった所見を呈していた。この相違は、虚血中のわずかな側副血行路の多少の差に起因すると考えられた。脳虚血状態ではエネルギー代謝の回復が可能となる critical level の血流量の存在が考えられる。今後、血流量とエネルギー代謝との関連について、より詳細な in vivo の検討が必要となろう。
2. 移植脳腫瘍 腫瘍の ^{31}P -NMR のスペクトルは脳のそれとは異なっていた。すなわち、PCr のピークは低く sugar phosphate, ATP のピークが高く認められた。また、腫瘍の stage が進み、壊死部が多くなると、ATP ピークは減少し Pi が増大した。今回用いたモデルでは、この stage の進行がゆっくりしており、自然変化を生じるには長時間 (2ヶ月位) かかり、次に述べる各種治療方法の効果判定検定モデルとしては良いと言える。各種抗腫瘍剤投与 (化学療法) 後の腫瘍の ^{31}P -NMR スペクトル変化に興味深い所見が得られた。すなわち、cyclophosphamide 300mg/kg 静脈内投与、vincristine 2 mg/kg 静脈内投与、MTX 100mg/kg 静脈内投与大量投与群では、投与後2~3時間後に ATP ピークが約半分になり、10~12時間後には、完全に消失し、Pi のみのパターンになった。この時点では、形態学的には変化は認められなかった。それ以後、経過を追跡できた例では5日後まで Pi のみのパターンがつづいていた。この時点では、組織全体に壊死像が認められた。同じ動物でのスペクトルには終始変化が認められなかった。各薬剤とも少量投与群 (上記大量投与群の約1/10量) では ^{31}P -NMR スペクトルの変化は認められなかった。以上から腫瘍の in vivo ^{31}P -NMR 測定にて、腫瘍のエネルギー代謝は正常脳のそれと異なっていることが判明し、さらに ^{31}P -NMR は各種治療剤の効果判定を鋭敏にしかも担癌動物を生かしたまま経時的に行えることが明らかになった。

〔発表〕

- 亘 弘, 成瀬昭二, 堀川義治, 田中忠蔵, 平川公義, 放射線科, 3 (6), (1984)
S. Naruse, Y. Horikawa, C. Tanaka, K. Hirakawa, H. Nishikawa and H. Watari, (1984)
Brain Research, 296: 370-372.
S. Naruse, Y. Horikawa, C. Tanaka, K. Hirakawa, H. Nishikawa and H. Watari (1984)

Neurol Res. 6:169-175.

成瀬昭二, 堀川義治, 田中忠蔵, 平川公義, 西川弘恭, 亘 弘 (1984) NMR 医学, 4 : 66-74.

S. Naruse, Y. Horikawa, K. Hirakawa, C. Tanaka, T. Higuchi, S. Ueda and H. Watari (1985) Magnetic Resonance Imaging 3: (in press)

S. Naruse, K. Hirakawa, Y. Horikawa, C. Tanaka, T. Higuchi, S. Ueda and H. Watari (1985) Cancer Res: (in press)

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)
尾崎 毅, 矢内原昇, 星野 稔, 内藺耕二 (生理研)

【研究目的】

針麻酔による鎮痛効果がナロクソンリバーサルを有することから針麻酔の発現に内在性オピエートが関連するといわれている。特に β -エンドルフィン, Met-エンケファリンなどの内在性オピエートが針麻酔時の疼痛抑制物質として注目されている。

しかしながら針麻酔物質としていくつかの候補物質 (内在性オピエート, 5-HT, GABA, グリシンなど) があがっているにもかかわらず, 未だ決定的な脳内活性物質は抽出されていない。そこで我々は, 針麻酔に関連する新しい脳内活性物質を抽出, 同定することを目的に研究を進めているが, 今年度は先ず針麻酔に関連する既知物質の変動について検討したので報告する。

【研究方法】

実験対象は雑種成犬20頭, 一週間管理飼育された後, 実験に供した。実験方法は, 無処置コントロール時と針麻酔時の脳脊髄液 (CSF) 中の β -エンドルフィン, Met-エンケファリン及び血清中のサブスタンス-P, プロスタグランジンE, コルチゾールの量を測定した。CSFは第1頸椎下から採集し, 採集したCSF, 血清は凍結保存とした。無処置コントロールと針麻酔は2日間あけて実験を行ない, 針麻酔は石崎方式 (刺激部位=前肢・後肢の4ヶ所, 刺激頻度=15Hz, 刺激強度=軽度の筋攣縮が生ずる程度1.5V~3.0V, 刺激時間=20分間通電) とし, 鎮痛効果の判定は全身6ヶ所 (頭部, 顔面部, 背部中央, 前肢, 後肢, 腹部) の鉗圧テスト (鉗子による圧迫刺激) を施行し, 逃避行動や鳴声の有無から判定した。なお物質の定量法として β -エンドルフィン, Met-エンケファリン, サブスタンス-PはRIA・PEG法で, プロスタグランジンEはRIA・DCC法で, コルチゾールはRIA固相法で行なった。

【研究結果】

1. 無処置コントロール群に比して針麻酔群のCSF中の β -エンドルフィン ($p < 0.005$), Met-

エンケファリン ($p < 0.05$) は有意に増加した (図 1)。

2. 無処置コントロール群に比して針麻酔群の血中コルチゾール ($p < 0.02$) は有意に増加したが、プロスタグランジンE, サブスタンス-P は若干増加傾向を示したものの有意な増加は認められなかった (図 1)。

3. 同一供試犬における無処置コントロールと針麻酔を比較検討した結果, β -エンドルフィン ($N=13$, $p < 0.005$), Met-エンケファリン ($N=7$, $p < 0.05$), 血中コルチゾール ($N=6$, $p < 0.02$) は有意に増加したが、プロスタグランジンE, サブスタンス-P は有意な増加は認められなかった。

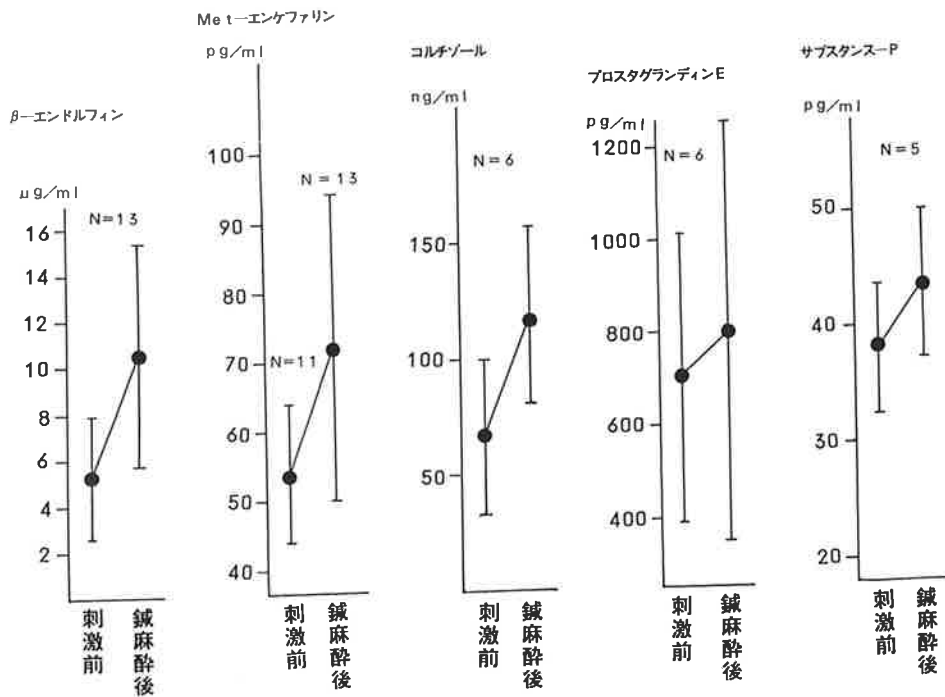


図 1. 無処置コントロール群と針麻酔群における β -エンドルフィン, Met-エンケファリン, 血中コルチゾール, プロスタグランジンE, サブスタンス-P の比較。

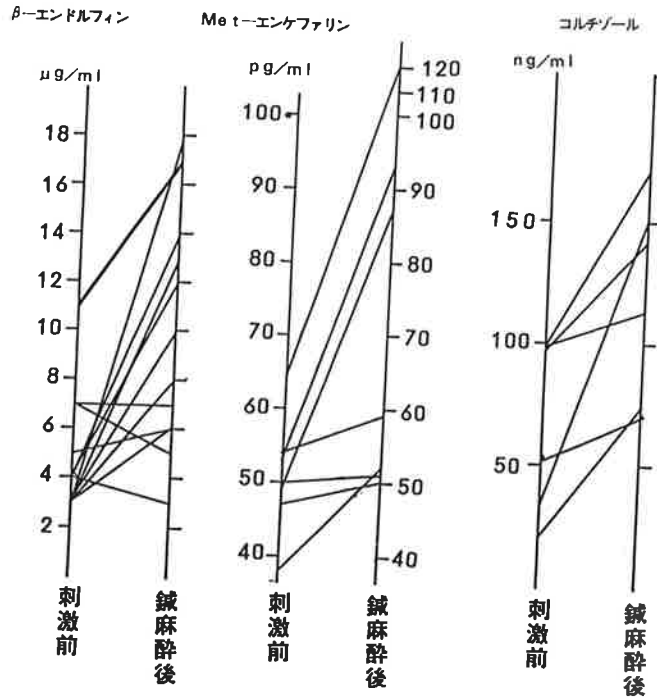


図2. 同一供試犬における無処置コントロールと針麻酔の β -エンドルフィン, Met-エンケファリン, 血中コルチゾールの比較。

【考察】

針麻酔の発現に内在性オピエートを中心とする各種脳内活性物質が関連するといわれているが、本研究結果も従来の報告と同様であった。したがって β -エンドルフィン, Met-エンケファリンは明らかに針麻酔の関連物質として鎮痛作用を演じるものと考えられる。一方、血中コルチゾールの増加は針による下垂体-副腎皮質系の賦活を意味するもので、ストレス抵抗性の増加とみなすことができよう。また、 β -エンドルフィンもストレス刺激に応じて分泌され、しかも下垂体ホルモン(リポトロフィン)と密接な関連があるといわれている。つまり、針麻酔は生体に対し適切な干涉刺激として作用することによって各種ストレスに対する抵抗性を高めるとともに鎮痛効果を発現するものと考えられる。

しかしながら針麻酔物質として5-HTなどのアミン説もあり、未だ明らかではない。今回の実験で β -エンドルフィン, Met-エンケファリンの内在性オピエートが関連することは明白になったが、プロスタグランディンEやサブスタンス-Pも著明に変動する例もあり、さらに詳細に分析する必要があると考える。

【結論】

針麻酔により β -エンドルフィン, Met-エンケファリン, コルチゾールは有意に増加した。

両生類幼生における生理活性ペプチド産生細胞の分化・発達に関する研究

石 龍徳, 菊山 栄, 並木秀男 (早稲田大・教育)

矢内原昇 (生理研, 静岡薬大)

両生類の脳や消化管には、哺乳類の脳-腸管ペプチドと類似のアミノ酸配列をもつペプチドが存在することが、ラジオイムノアッセイ法や免疫組織学的手法により明らかにされている。また、両生類では、皮膚から脳-腸管ペプチドと類似の生理活性ペプチドが単離されている。これらの生理活性ペプチドを有する脳・消化管・皮膚は、幼生の発生・変態の過程で、その形態や機能が著しく変化する。本研究では、発生・変態過程において、ペプチド産生細胞がどのようにして分化・発達するのかを解明することを目的としている。本年度は、とくに、この目的にあった適当な組織・ペプチド・方法を検討した。

まず、哺乳類の脳-腸管ペプチドに対するラジオイムノアッセイ系を用いて、アフリカツメガエルの脳・消化管・皮膚に存在するペプチドを検出した。Vasoactive intestinal polypeptide (VIP), Peptide histidine isoleucine (PHI), Met-Enkephalin-Arg-Gly-Leu, Glucagon, Gastrin-17 (G-17), Cholecystokinin-8 (CCK-8) について調べたところ、免疫活性のあったペプチドは、脳では VIP・PHI・G-17・CCK-8, 消化管では VIP・PHI・Glucagon・G-17・CCK-8, 皮膚では G-17・CCK-8 であった。また、試料の希釈曲線が標準曲線と平行で測定可能なペプチドは、Glucagon・G-17・CCK-8 であった。そのうち、皮膚中の G-17・CCK-8 は、ラットの消化管と比較すると、免疫活性が濃度にして100倍以上あった。そこで、生理活性ペプチド産生細胞の分化・発達過程を研究するには、測定可能なペプチドを高濃度に含む皮膚が適していると考えた。ところで *Hyla caerulea* というカエルの皮膚から単離された caerulein というペプチドは、C末端のヘキサペプチドが G-17・CCK-8 と同じアミノ酸配列であることが知られている。したがって、アフリカツメガエル皮膚中の G-17・CCK-8 免疫活性は caerulein に由来する可能性が高い。そこで、皮膚抽出物中のペプチドを Sephadex G-50 により分離し、各画分の G-17・CCK-8 免疫活性を調べたところ、その活性の溶出曲線のピークが合成 caerulein と一致した。免疫活性のあった画分中のペプチドを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって分離したところ、2つのピークが得られた。合成 caerulein のピークは溶離時間の長い方のピークと一致した。しかし、両ピークとも G-17・CCK-8 免疫活性があった。また、両ピーク中のペプチドのアミノ酸組成は同一であった。溶離時間の短いペプチドは、チロシン残基に結合しているスルホン酸基が解離した caerulein である可能性が高い。今後は抽出法などをもう一度検討する必要があると思われる。

以上より、発生過程における皮膚中の caerulein 含量の変化をラジオイムノアッセイや HPLC によって調べることが、生理活性ペプチド産生細胞の分化・発達を解明するためには適していると結論した。

CCK-8 および関連ペプチドの胃運動に及ぼす影響について

桑原厚和（岩手大・農），矢内原昇（生理研，静岡薬大）

Cholecystokinin (CCK)は胆嚢収縮，膵外分泌あるいは消化管運動調節に関与している典型的消化管ホルモンである。しかしながら，最近の著しい免疫組織化学の発達により，CCKは消化管ばかりでなく，神経系にも広く分布していることが明らかにされた。これらの所見は，CCKが単に消化管ホルモンとしての機能を有するばかりでなく，化学伝達物質あるいは調節物質として多様な機能を有することを示唆している。本研究ではCCK-8およびそのアナログを使用し，胃運動に及ぼす影響について検討した。

初めに，CCK 1—27抗血清を使用し，幽門洞粘膜上皮内にCCK様免疫活性を示す細胞を組織化学的に確認した。そこで本研究では，ペントバルビタール麻酔下の犬を用い胃壁に分布する動脈にカニューレを挿入し，これを介してペプチドを局所的に注入し胃運動の変化を観察した。刺激には，CCK-8とそのアナログ3種類（Glt-CCK-8, pGlu-CCK-8, Suc₁-MePhe₈ CCK-7），及びペンタガストリンを使用した。CCK-8により誘発される胃運動は用量に比例して増大し，そのED₅₀は 3.5×10^{-9} Mであった。CCK-8のアナログのED₅₀は，Suc₁-MePhe₈ CCK-7を除き，ほぼCCK-8と同様の値を示した（Table I, n=6）。なおSuc₁-MePhe₈-CCK-7のED₅₀は 13.8×10^{-9} MとCCK-8の3～4倍の値を示した。ペンタガストリンで誘発される胃運動はCCK-8により誘発される胃運動の約1/3の値しか示さなかった。また本研究で用いた用量の範囲（1～20 ng/ml）では，ペンタガストリンにより誘発される胃運動は用量に依存しなかった。CCK-8及びペンタガストリンにより誘発される胃運動はヘキサメソニウム（5 mg/Kg）投与後も観察されたが，アトロピン（100～200 μg/Kg）の前処置により完全に抑制された。これらのことから，CCK-8は局所的な調節物質として，壁内に存在するコリン作働性神経を介して胃運動に影響しているものと考えられる。

TABLE I. D₅₀ of CCK-8 and related peptides in the gastric antrum

peptides	x10 ⁻⁹ M
CCK-8	3.5
Glt-CCK-8	4.5
pGlu-CCK-8	3.7
Suc ₁ -MePhe ₈	
CCK-7	13.8

ヤリイカ巨大神経線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 (名古屋市大・薬), 山岸俊一 (生理研)

Bacillus thuringiensis 菌の精製ホスファチジルイノシトール分解型ホスホリパーゼC (PIase), *Bacillus cereus* 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), 精製スフィンゴミエリン分解型ホスホリパーゼC (SMase) の三種類のホスホリパーゼCを, ヤリイカ巨大神経線維に作用させて, その興奮と伝達にどのような影響が現われるかを調べた。巨大神経軸索内灌流液としては, 100mM KF, 100mM K-glutamate (いずれも 2mM K-Hepes buffer, pH7.4 を含み, 12% グリセロールにて外液と等張にしたもの) を用い, 外液としては, ASW I (510mM NaCl, 5mM KCl, 50mM CaCl₂, 20mM Na-Hepes, pH8.0), ASW II (485mM NaCl, 40mM MgCl₂, 20mM CaCl₂, 20mM Na-Hepes, pH8.0) を用いた。

外液は ASW II, 内液には 100mM KF を用い, これに PCase (200mU/ml of KF) を神経に作用させたところ, 約 7 分後に活動電位は完全に消失した。その後, 軸索内を 100mM KF で洗ったが, 活動電位の回復は見られなかった。また静止膜電位は, PCase 処理により上昇した。静止膜電位を -70mV 付近に保持し, 内液を 100mM K-glutamate とし, PCase (200mU/ml of K-glu) を作用させると, 約 4 分後に活動電位は消失した。軸索内を 100mM KF で洗っても, 活動電位の回復は見られなかった。この PCase 処理により, 膜抵抗は, 処理前の膜抵抗の 10% 以下となった。また PCase (1.2U/ml of ASW II) を軸索外から作用させたところ, 約 40 分後には活動電位が消失し, 膜抵抗は PCase 処理前の約 50% に減少した。この時, 軸索外を ASW II で洗っても, 活動電位, 膜抵抗の回復は見られなかった。次に外液として ASW I, 内液として 100mM KF を用い, PIase (6U/ml of KF) を作用させたが, 活動電位, 静止膜電位に変化は見られなかったが, 内液を 100mM K-glutamate にし, PIase (5U/ml of K-glu) を作用させると, 10 分後に活動電位が消失し, 膜抵抗は, 当初の 30% になった。この後, 軸索内を 100mM KF で洗浄したところ, 活動電位は PIase 作用前の 70% 程度まで回復した。また膜抵抗については顕著な回復は見られなかった。軸索内, 外に SMase を作用させた場合には, 顕著な影響は見られなかった。

以上のことより, PCase 処理による活動電位, 静止膜電位の変化は, 膜抵抗の減少が大きいことより, 軸索膜が, PCase により破壊され, 膜としての機能を失ったことによるものと考えられる。また PIase 処理により, K-glutamate 中では, 膜機能が正常な状態に保てないような一般的構造に変化しているが, 静止膜電位を一定に保持した実験でも活動電位に影響を与えており, イオンチャンネルと膜ホスファチジルイノシトールとの相互関係があることを示唆する。

多価性リガンドと結合した興奮性膜の形態と機能

平野 寛, 川上速人, 西山文朗, 高田邦昭 (杏林大・医)

山岸俊一, 古家喜四夫 (生理研)

培養神経芽細胞腫細胞 (NG108-15) を材料とし, 細胞膜表面の細胞化学的特性を予備的に検討した。即ち①マンノース系糖鎖と特異的に結合する concanavalin A (ConA) 及び②陰性荷電の検索に cationized ferritin (CF) を用い, 各々の結合パターンを電顕的に検討した。

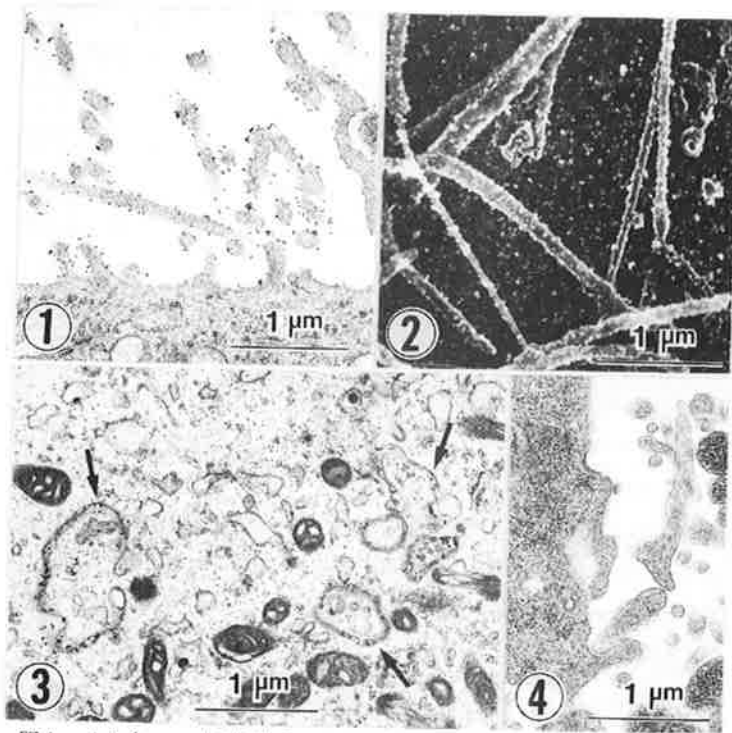


図1～4: 金コロイド標識 ConA と反応させた培養神経芽細胞腫細胞。

図1, 2. 前固定した後に反応。透過像 (図1) 及び走査像 (図2)。細胞表面より突出する大小様々の突起表面に, ConA 結合部を示す金コロイド粒子が一様に分布している。一方細胞体表面における結合部は突起部分に比較して少ない。

図3. 未固定のまま37℃, 30分間反応。細胞表面に結合した金コロイド標識 ConA は, 細胞内に取り込まれ, 主として管状の構造 (矢印) の中に見出される。

図4. 対照実験。0.2M α -methyl-D-mannoside 添加。ConA 結合は完全に阻止されている。

1. 細胞膜表面糖鎖

神経芽細胞腫培養細胞をアルデヒド前固定後又は未固定のまま、金コロイド標識 ConA と 0℃ 及至 37℃ で 30 分間反応させた。オスミウム酸による後固定を経て透過型及び走査型電顕下にて観察した。前固定後反応させると、ConA 結合部を示す金コロイド粒子は突起部分を含む細胞膜表面に一様に分布する（図 1, 2）。未固定のまま 37℃ で反応すると、ConA は細胞内に取り込まれ、小管状をなす空胞内に金粒子が見出された（図 3）。かかる反応は、特異的反応阻害剤である α -methyl-D-mannoside 添加により阻止される（図 4）。

2. 細胞膜表面電荷

アルデヒド前固定後又は未固定のまま、CF と 0℃ 及至 37℃ で 30 分間反応させた。後固定、脱水を経て樹脂包埋薄切標本を作製、透過型電顕下で観察した。

前固定標本では CF 粒子は突起部位を含めた細胞膜表面に一様に層をなして結合分布した。未固定のまま 37℃ で反応させると、CF により架橋（crosslink）されるような形で、突起は相互にかみ合い、いわば束状をなす（図 5）。また細胞内にも CF は多数取り込まれた（図 6）。

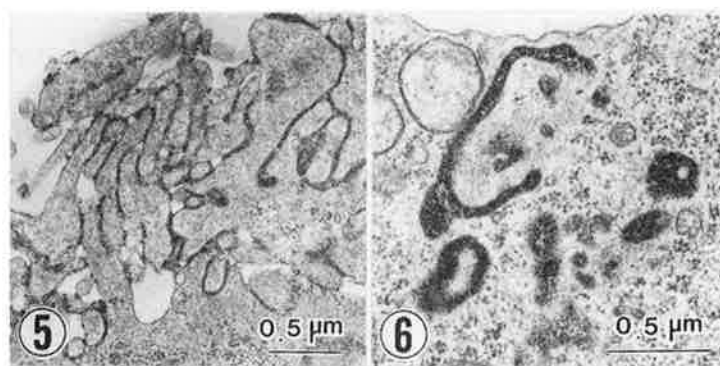


図 5, 6. 未固定のまま CF と 37℃, 30 分間反応させた神経芽細胞腫細胞。細胞表面に結合した CF の作用により、突起が束状に集合している（図 5）。また細胞内部に取り込まれた CF 粒子は、管状または胞状の構造内に見出される（図 6）。

（注）神経芽細胞腫培養細胞（NG108—15）は、生理学研究所組織培養標本室より提供を受けた。

海馬の亜鉛に関する研究

小野 哲（都立立川短大），山岸俊一（生理研）

尾崎 毅（生理研），内菌耕二（生理研）

〔目的〕 動物にジチゾンを投与すると、膵の β 細胞のほかに、海馬を中心として辺縁系が紅染されるが、この原因物質は亜鉛であることが知られている。しかし、紅染される亜鉛の存在状態およびその生理的意義については未だはっきりしていない。そこで海馬における亜鉛（化合物）の意義を知るため、その存在状態を電子顕微鏡により、また亜鉛化合物を生化学的・行動分析学的に追求する。

〔方法〕 電子顕微鏡的に亜鉛の存在状態を調べる場合は、ラット又はマウスをリンゲル液で灌流後、硫化水素飽和グルタルアルデヒド液で固定後、以前我々が開発したTimm改良法により染色した。また生化学・行動分析学的方法是、海馬を等張蔗糖液を用いた分画法により分画し、行動分析によるバイオアッセイを試みた。行動分析法にはシドマン法を用い、これに改良を加えた。その要点は、これまでのシドマン法にマイクロコンピュータを導入し、実験の能率を上げると共に、実験動物の行動を1秒毎に記録し、このデータをマイコンにより分析する方法を取った。

〔結果〕 海馬の亜鉛の存在状態について、改良Timm法による観察を行なったが、従来多くの研究者によって発表された事実以上の成果は得られなかった。また亜鉛（化合物）を精製する際の指標として用いるため行動分析法の改良を行なったが、その結果は次の通りである。Apple II型マイコンを用い、同時に8個のスキナーボックスをコントロールできるようにした（シドマン法の条件はR-R time 30秒，S-R time 5秒）。ラットを用いて訓練したところ、従来、機械的に1台ずつ行っていたデータとほぼ同様の成績を上げることができた。次にマイコンによる行動分析は、これまでシドマン法で行なわれてきたResponse(R)数，Shock(S)数のみならず，R-R間隔，S-R間隔毎に頻度を求め、試料投与前後の頻度の平均値をも検定で比較するプログラムを作成した。予試験的にウシ海馬凍乾物の20%ホモジネートの3000rpm，20分間遠心Supをラットの腹腔内に投与してみた。その結果R数はやや減少，S数はやや増加したが，上記プログラムで解析すると，S-R time 1～4秒のレバー押し数が有意に増加していた。

〔考察〕 ラットに海馬抽出物を投与して得られた結果は，罰としてのショックのあと，投与以前よりも少し遅れてレバーを押すようになったことを意味しているが，この意義は現在はっきりしていない。しかし，今回開発した行動分析法は亜鉛（化合物）精製の際のバイオアッセイ系として利用できる可能性を示唆するものと思われる。今後は，海馬を染色される部分と非染色部分にわけ，この方法で行動分析を行なうこと，分析プログラムを改良してさらに様々な角度から行動分析できるようにするなど，行動分析法を亜鉛（化合物）精製の指標として利用できる方向へ努力したい。

上頸部交感神経節のシナプス伝達活動と神経系特異タンパク含量の変動

永田 豊, 安糖正人, 三輪正人 (保健衛生大・医)

杉山博之 (生理研)

〔研究目的〕 神経組織はエノラーゼ・アイソザイム(α および γ -enolase isozyme)やS-100タンパクなどを特徴的に高濃度含んでいるが、これら神経系特異タンパク (NSP) と神経機能との関連性についてはほとんど知られていない。そこで、生体から摘出後も神経伝達活動を観察できる白鼠上頸部交感神経節 (SCG) に種々の神経刺激を与えたとき、組織内のこれら NSP 含量の変動を測定した。そして、神経活動におけるこのタンパクの機能的意義を明らかにしようと試みた。

〔実験方法〕 成熟白鼠より上頸部交感神経節を摘出し、cholinergic 刺激として ACh(1mM)+eserine(0.1mM)を、adrenergic 刺激として norepinephrine(NE, 0.05mM)を溶液中に添加して37℃で好氣的にインキュベートした。SCG 内の NSP 含量は α -および γ -enolaseならびにS-100タンパクの特異抗体を用いての高感度 enzyme-immuno assay で測定した。

〔結果と考察〕 (1) 電気ならびにAChによる刺激効果：節前あるいは節後神経からの通電による神経節細胞の興奮では、SCG内の $\alpha\alpha$ および $\gamma\gamma$ -enolase isozymeならびにS-100タンパク含量は全く変動が認められなかった。したがって、SCG内 neuronではZomzely-Neurathらが示唆している enolase 相互間の変換反応 ($2\alpha\gamma \rightleftharpoons \alpha\alpha + \gamma\gamma$) は、cholinergic 刺激によってひきおこされないものと考えられた。

(2) NEによる刺激効果：NEを溶液中に添加してincubateすると3時間以上経過するとSCG内の $\alpha\alpha$ および $\alpha\gamma$ -enolaseは著明に増大し、 $\gamma\gamma$ -enolase量は減少した(図1)。このような変動は、adrenergic antagonist(propranolol 10 μ M)やタンパク合成阻害剤(cycloheximide 10 μ g/ml)添加によって抑制されるので、adrenergic receptorを介するcyclic AMP依存性のタンパク生合成過程の促進によることが強く示唆された。NEやcyclic AMPの添加によってやはりSCG内のS-100タンパク含量の増大が30分以内の短時間のincubationで明らかに認められた(図2)。SCG内のS-100タンパクは水溶性と膜結合性とが約2:1の割合で認められており(2:1) NEやcyclic AMP添加によって結合型が急速に水溶型に移行することが示された(図3)。このNEによって増大したSCG内のS-100タンパク量はpropranololやcyclic AMPによって完全に抑制されたが、これはタンパク合成の阻害によるものではなくて、組織内のS-100が溶液中に漏出するためであることが認められた(図4)。

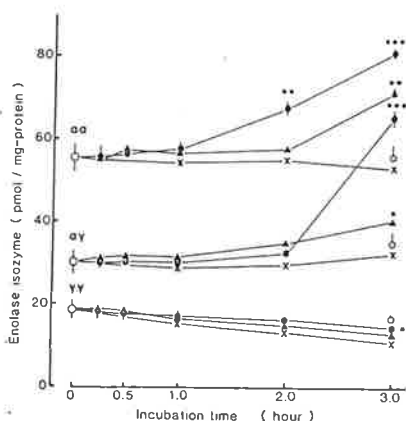


図1 norepinephrine(●; NE, 50 μ M), NE + propranolol (▲; 10 μ M) および NE + cycloheximide (×; 10 μ g/ml) を作用させたときの 3 種の enolase isozyme 含量の経時的変動 (*印は無添加群(○)に対して統計的に有意差のあることを示す。* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, 各値の上下の垂直線分は S.E.M. を示す。)

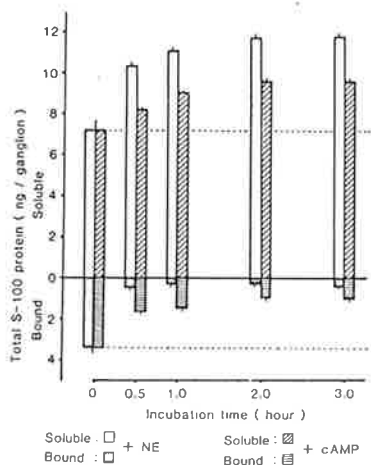


図3 norepinephrine (NE, 50 μ M) あるいは cyclic AMP (cAMP, 1mM) を添加してインキュベートしたときの SCG 内水溶性 (soluble) および結合型 (bound) S-100 タンパク量の経時的変動 (各値の上下の垂直線分は S.E.M. を示す。)

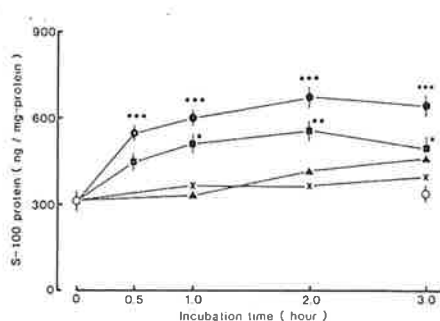


図2 NE(●), cyclic AMP(■), NE + propranolol (▲) および NE + cycloheximide (×) を含む溶液中で SCG をインキュベートしたときの組織内水溶性 S-100 タンパク含量の経時的変動 (*印は統計的に有意差のあることを示す。* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001, 各値の上下の垂直線分は S.E.M. を示す。)

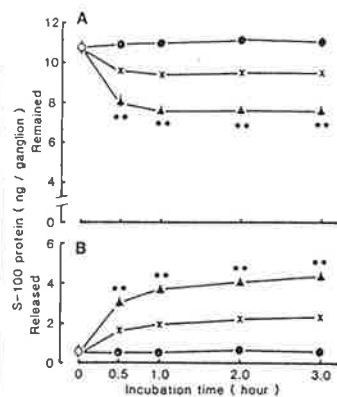


図4 A: norepinephrine(●; NE, 50 μ M), NE + propranolol (▲; 10 μ M) および NE + cycloheximide (×; 10 μ g/ml) 添加時の SCG 内総 S-100 タンパク含量の経時的変動 B: A と同一条件下でインキュベートしたときの SCG から溶液中に漏出する S-100 タンパク量の経時的変動 (*印は無添加群(○)に対して統計的に有意差のあることを示す。** P < 0.01, 各値の上下の垂直線分は S.E.M. を示す。)

このような実験成績は、SCG 内に含まれる adrenergic な small intensely fluorescent (SIF) cell を介するシナプス伝達過程と神経節内の多分グリア細胞における α -enolase 生合成ならびにそのレセプター、第二次メッセンジャー系を介する S-100 タンパクの溶性化とが、密接に関連している可能性が強く示唆された。Nagata, Y., Ando, M., Miwa, M. & Kato, K.: J. Neurochem. 43: 1205 (1984)

上頸部交感神経節 (Ⅲ), 神経系特異タンパク (α -および γ -enolase isozyme, S-100 タンパク) ノルエピネフリン

Cl チャネル蛋白の精製と分析

葛西道生、金政利率（大阪大・基礎工）、杉山博之（生理研）

シビレエイ *Narke japonica* の発電器官には、アセチルコリン受容体のカチオンチャネルが大量に含まれているが、その他にアニオン（主として Cl^- ）チャネルも含まれている。我々はこれまでに、このアニオンチャネルの蛋白質としての同定と部分精製、また細胞膜小胞を用いたイオンフラックス測定による反応機構の解析等を行って来た（葛西ら）。これとは別に、イオンチャネルの解析にアフリカツメガエル *Xenopus* の卵母細胞を利用し、mRNA によって各種イオンチャネルをこの細胞に誘導し、その性質を電気生理学等の方法で検討することも有力なアプローチであり、この方法でこれまでにいくつかのイオンチャネルを解析して来た（杉山ら）。その中のひとつとして、ムスカリン性アセチルコリン受容体と共役した Cl チャネルがある。

本共同研究では、シビレエイ発電器官を主材料とし、ここに含まれるアニオンチャネルの精製を更に推し進め、またアフリカツメガエル卵母細胞を用いた方法等を適用してその反応機構のより詳細な解析を行うことを目的とする。今年度は、本件が年度末に追加課題として開始されたばかりであることもあって、予備的検討を行った段階であるが、精製方法のおよその方針をかなりの程度しぼることができた。

視覚受容器の電気—音響変換および音響—電気変換の双対性

橋本 享（東京医歯大・医用研）、谷口郁雄（生理研・東京医歯大）、山岸俊一（生理研）
田中英和（東京医歯大・難治研）、森山俊男（独協医大）、棚橋汀路（名大・分院）

内耳蝸牛における音刺激受容と、近年見出された鼓膜からの音響放射現象とを、トランスジューサーの双対性という観点から統合的にとらえ、受容器のトランスジューサーとしての変換機能の本態を明らかにすることが、本研究の目的である。

ネンブタール麻酔したモルモットの蝸牛管中央階に、蝸牛マイクロホン（CM）電位の記録と電流刺激が加えられるように、二本の電極を挿入し、蝸牛管中央階の電圧制御によって音刺激に対応して流れる受容器電流の直接測定を試みた。中央階に現われる電位変化を一方の電極により記録し、その電位が中央階直流電位に保たれるように、膜電位固定装置を経由して他方の電極にフィードバック電流を流すという回路を構成する。この方法により、音刺激の受容に伴い発生する CM 電位に対応して、基底膜を横切り流れる電流を観測することができた。

中央階直流電位を制御して、それぞれの電位に対応する受容電流を測定し、直流電位と CM 電

流との間に比例関係が存在することを見出した。Davis が視覚受容のメカニズムについて20年余り以前に提案した可変抵抗説によると、蝸牛周辺の局所回路を流れる電流がCMの源で、基底膜振動に対応して変化する電気抵抗に中央階直流電位や有毛細胞の膜電位を電源とする電流が流れ、CMが観察できるとされている。このモデルにしたがって、蝸牛管のインピーダンスを実測しようという試みはいろいろあったが、直流的にせよ交流的にせよ、すべて電圧降下法による報告であった。音刺激に対応して流れるCM電流そのものを測定したのは、本報告が初めてのものである。

CM電位とCM電流の測定値を併せて、回路解析により、基底膜とりわけ有毛細胞に生じると考えられている可変インピーダンスを推定した。聴覚受容のメカニズムについて、Davisの説は第一近似モデルとしては、CMの発現を予測するには十分なものであるが、定量的には不十分なものであるとする報告も見れるので、CM電流に含まれる高調波成分をスペクトル分析して、非線形性の所在を探りあててことを目指している

モルモットを実験材料とした音響放射現象の観測はかなり困難で、末に十分な実験結果を得ていないが、クランプ電流、電気-音響変換出力の関係を明らかにしたいと考える。

哺乳類の耳音響放射に関する研究

田中康夫（獨協医大・越谷）、山岸俊一、谷口郁雄（生理研）

柳沢慧二、浅沼 厚（鶴見大・歯）、新井寧子（獨協医大）

耳音響放射はKemp（1978）によってヒトの外耳道からはじめて記録された音響現象である。潜時が長いこと、結合音現象がみられること、実験のおよび臨床的内耳障害では記録し難いことなどから、この現象は内耳に発生し、中耳を経て外耳道に到達した音響的な反応と推測されている。哺乳類の耳音響放射を観察し、内耳の電気現象と比較することにより発生源を明らかにし、内耳性難聴や耳鳴の検査および治療に対する基礎的な資料を提供することを目的とした研究である。今回は日本人の正常耳の音響放射を記録し検討した。

鼓膜所見が正常でティンパノグラムにより鼓膜および耳小骨の可動性も正常であると確認できた聴力正常者17名34耳（うち男性9名、女性8名、年齢の範囲は19才～37才）を対象とした。外耳道にダブルバレルのプラスチック製音響プローブを挿入し、歯科用印象剤でシールを行った。プローブの片法の管の一端にはマグネチックイヤホン（Danavox, SMW-68）を装着し、他方にはマイクロホン（Knowles, EA-1843）を内蔵させた。音響刺激には、立上り、立下り時間各1ms、全持続時間3msのトーンバーストを用い、刺激の開始から20msまでのマイクロホン出力を256回、加算した。加算平均および記録は聴性誘発反応用のシグナルプロセッサ（Sanei, 7S11）を一部改変したものによった。音響刺激の周波数はファンクションゼネレータ（NFCircuit,

FG21B)を用い、連続可変とした。

外耳道に挿入した音響プローブにより刺激音に追従した遅延振動波形を記録し得たものは、呼吸音と思われる雑音が大きく判定不能であった1耳を除く33耳中31耳(93.9%)であった。1名2耳(男性、30才)で反応を記録できなかった。31耳中20耳(64.5%)において遅延振動波形の振幅が最大になる周波数は1.4kHz~1.8kHzの間にあった。その周波数が左右で一致したものは15名中5名(33.3%)で、左右差が ± 0.2 kHzにあったものは8名(53.3%)であった。その周波数における見かけの閾値は-5dB~40dB(nHL)の間にあり、個人差が大きかったが、5dBにピークをもつ閾値の低い1群と、25dBにピークをもつ閾値の高い1群のあることが認められた。入出力曲線を見ると前者は非線形(17耳)、後者は線形(14耳)であった。しかし後者においても、見かけの閾値近辺では完全な線形ではなく、閾値の高い非線形の反応が混在していることも認められた。見かけの閾値の個人差が大きかったが、各人の両耳差でみると、15名中13名(86.7%)が両耳差10dB以内であった。以上の成績から、見かけの閾値だけの比較は個人差が大きく、内耳機能の指標とするには適当でないことがわかったが、入出力曲線については非線形である場合は勿論、たとえ線形に近い曲線を呈する場合でも閾値の両耳差は小で再現性もよいことから、十分指標とすることが可能で、本反応の記録により易傷性の基底板振動の状態を推測できる。

興奮膜に対するテルビウムイオンの効果と結合部位

西江 弘(順天堂大・医・生理)、会沢勝夫(東京医大・生理)

山岸俊一、古家喜四夫(生理研)

イカ巨大神経線維では、Tbイオンによって静止膜電位が減少し膜抵抗が増加する。また活動電位は減少するし、膜興奮の閾値は増加する。膜電位固定法による膜電流の測定から、内向きNa電流も外向きK電流も抑制されることが著者らの研究で明らかにされている。細胞内灌流法によってTbイオンを作用させた場合、膜興奮に対する作用は洗浄後急速に回復するが、細胞外からの作用では活動電位は徐々に減少し洗浄後も回復はほとんど認められなかった。Tbイオンは種々のCa結合蛋白の結合部位に結合し特有のスペクトルを持つ蛍光をだすことが知られている。膜興奮に対するTbイオンの作用は、細胞膜にあるCa結合部位などにTbイオンが結合して起こると推定されたので、Tb結合の有無や結合状態の解析を蛍光測定により試みた。巨大神経線維の細胞質をしごき出して細胞内をしばらく灌流した後に、0.3%のデオキシコール酸を含む内液で細胞内灌流し細胞膜をその近傍成分を含めて可溶化させ溶出サンプルを得た。蛍光測定は、この可溶化サンプルを200倍から300倍に希釈し蛍光分光光度計を用いてphotocellに入れて測定した。295nmの光励起によって、335nmにピークを持つ蛋白固有の蛍光を発することがまず確認された。Tbイオンを種々の濃度で加えて、結合の有無を545nmにシャープなピークを持つTbの特徴

的な蛍光スペクトルによって測定した。 10^{-6}M 以上のTb濃度で結合が認められ、Tb結合を示す蛍光強度は 10^{-3}M あたりでプラトーに達した。イカ巨大神経線維を用いた実験でも蛋白成分へのTb結合が観測された。この場合の蛍光測定は、神経線維試料が光路中に安定して保持されているようにして行なった。この場合も 10^{-6}M 以上のTb濃度で結合が認められ、蛍光強度は $3 \times 10^{-3}\text{M}$ あたりでプラトーに達した。Tbの545nm蛍光に対する励起光波長スキャンでは、233nmのピークと250nmから390nmまでの範囲に9つのピークが認められた。各ピークはTb濃度が増すにつれてシャープになり光強度も増加を示した。233nmのピークは215nmへシフトするのが認められた。また、外液のK濃度を25mM, 50mMに増加させるとTbの蛍光強度や励起光波長スキャンのスペクトグラムに興味深い変化が見られた。さらに、モデル実験からTb結合における作用部位は蛋白のトリプトファン残基ないしはヒスチジン残基であることも推定された。

蝸牛コルチ器の電流による動きの観察

柳沢慧二, 浅沼 厚 (鶴見大・歯), 寺川 進 (生理研)

蝸牛基底膜の振動様式の研究は、蝸牛における周波数弁別の機構を知る上で重要である。ところで、近年この基底膜の振動に対してコルチ器が能動的に動くことが寄与しているのではないかという考えが提案され、その運動を発生する候補者として外有毛細胞が注目されだした。この考えに対する直接的な証拠として、外有毛細胞に電流を流すとその長さが変化することが報告されている。そこで本研究では、生理学研究所において開発された、光学用ガラス線維を用いた微小変位検出装置を用いてコルチ器及び外有毛細胞標本に電流を流したときに変位が生じるかどうかを検討した。

モルモット内耳の蝸牛より1) コルチ器, 2) 5—20個の外有毛細胞の集合をできるだけ損傷が少ないように注意しながら分離して、生理的緩衝液中においた。それぞれの組織上に厚さ $10\mu\text{m}$ 以下の金箔の薄片をのせて反射板とし、反射型ガラス繊維センサーを用いた微小変位検出装置でその動きを観察した。2本のガラス管微小電極を用いて、それぞれの組織に10msのパルス状の電流または400Hzの交流電流を流した。電極と組織、反射板の関係を色々に変えて測定した。

その結果以下のことが明らかになった。

- 1) 報告にあるような通電条件で両標本の100—200Åの動きが検出できた。
- 2) 変位の大きさは電流量を増加すると大きくなり、パルスの極性を反転すると反転する場合と、極性を反転しても反転しない場合とあった。
- 3) コルチ器の変位は時間経過とともに小さくなる傾向を示した。しかし、数時間後でも明らかな変位を示した。
- 4) 変位は、2.5%グルタルアルデヒドで30分間組織を固定した後にも明瞭に認められた。

5) 血管条, 骨壁等の組織では, 同程度の動きは検出できなかったが, 電極の先端に直接金箔をおいてその動きを調べると同程度の動きが認められた。

以上の結果から, コルチ器や外有毛細胞等が通電によって動きやすい組織であることがわかったが, この動きが生じる原因の第1は電極内での電気分解であると思われる。この電極からの影響を受けない条件下で本当に外有毛細胞に動きが起こるかどうか, 今後の検討が必要である。

クラウンエーテル化合物によるイカ神経Naチャンネルの閉塞機序

瀬山一正, 焼広益秀 (広島大・医), 渡辺 昭, 寺川 進 (生理研)

一つの channel に特異的に作用する化学物質は薬理学的道具としてその channel の機能的分子機構を明らかにする際有用である。Na channel を細胞外及び細胞内より特異的に閉塞する分子の持つべき1つの必要条件として分子内におけるグアニディニウム基の存在が指摘されている。今回クラウンエーテル環にアルキル基を介してグアニディニウム基を有する Guanidyl-side armed cyclam (G-cyclam) の Na channel への作用機序について調べる機会を持った。実験はイカ巨大神経において細胞内灌流法及び膜電位固定法を用いて行なった。 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ の G-cyclam を細胞外より投与すると Na current (I_{Na}) 及び K current (I_{K}) いずれにも影響は表われなかった。一方細胞内より同じ濃度のものを投与すると I_{Na} のみに影響が現われた。即ち peak current のわずかな減少と不活性化過程の促進が認められた。しかしながら h_{∞} 曲線への影響を調べた結果, 正常と比較して変化がないので不活性化過程そのものには影響を与えないといえる。この事是不活性化過程の促進された原因は G-cyclam が channel につまった結果生じたのではないかと推察させる。もう一つの gate 定数である m に対しても影響は認められなかった。そこで更に実験系を単純化し G-cyclam の Na channel への作用をより明確にするため無 K^+ 人工海水と無 K^+ , Cs 細胞内灌流液中で実験を行った。その上 Na channel の不活性化過程を Pronase 処理で取り除いた。このような環境下で axon に G-cyclam を投与すると I_{Na} は抑制されその時間経過は single exponential であった。この事は G-cyclam が Na channel を閉塞する反応は open state $\xrightleftharpoons[k]{k}$ occluded state で表現出来る事を示唆している。G-cyclam 作用下での I_{Na} の減少の時定数と Na channel の閉塞が定常状態になった際の I_{Na} と正常 I_{Na} の比から rate constant を決定できる。その結果 K は膜電位に依存する事なく $8 \times 10^{-3} \text{msec}^{-1} \cdot \text{mmole}^{-1}$ となったが, l は膜電位依存性を示し $l = 0.5 \times \exp(-0.014V) \text{msec}^{-1}$ (V : 膜電位) という関係があった。外液 Na^+ 濃度の変化は k 及び l の値に影響を与えなかった。それ故 Dose-response curve は当然の事ながら膜電位依存性を示し $K_D = 7.02 \times 10^{-5} \exp(-0.014V)$ となった。以上の事実は G-cyclam が細胞内より Na channel に特異的に作用している事を示し Na channel の機能的構造を知る上での薬理学的道具として利用出来る事が解った。

〔発表〕

Nakao, M. & Seyama, I. (1984) Effect of α -dihydro-grayanotoxin-II on the electrical activity of the rabbit sino-atrial node. J. Physiol., 357: 79-91.

Seyama, I., Yamaoka, K., Yakehiro, M., Yoshioka, Y. & Morihara, K. (1985) Is the site of action of grayanotoxin the Na channel gating of squid axon? Jpn. J. Physiol. (in press)

Seyama, I., Yakehiro, M. & Nakajima, T. (1985) Trypargine blocks the sodium channel only from the inside of squid axon. Jpn. J. Physiol. (in Press)

甲殻類における神経分泌機構の研究

長野みさ子（琉球大・医），寺川 進（生理研）

甲殻類の神経分泌細胞であるX-organ-sinus gland system(XOSG)を用いて，細胞内活動電位測定と Lucifer Yellow(LY)あるいはHRPの細胞内注入とを同一細胞にて行い，XOSGの細胞内活動電位とその形態との間に何らかの相関があるかどうかを検討した。実験にはガザミ (*Portunus trituberculatus*) の眼柄を用いた。結果は以下のようである。1) X-organでは電気生理学的にまた形態的に通常の神経分泌細胞とは区別出来るニューロンが存在する。即ち，細胞体では普通，静止電位が約 -60mV で overshoot のない活動電位を伴い，約 $50\mu\text{m}$ の直径を有し，1 mm以上の長い軸索を経て sinus glandへ至り分泌終末を形成する。一方，これとは異なり，静止電位が約 -70mV で全く活動電位の認められないグループでは，はっきりした細胞体がなく，樹状突起様の network が X-organ に限局して存在する。2) X-organ の端にあたり，sinus gland 側に最も近い部分には burst 型の活動電位を発するやや直径の小さな細胞体があり，ここから X-organ, sinus gland 両方へ分枝し，特に X-organ 側では無数の枝が network を形成している。3) HRP の細胞内注入から二つの細胞体が連続している像が観察され，また，sinus gland 側でも axon 間に連絡があることが示唆された。これらのことから形態学的，電気生理学的に X-organ には普通の神経分泌細胞の外に少なくとも2種のニューロンが観察され，中枢神経からの情報を入力し，細胞体間を連絡して，神経分泌細胞の調節機構の役割を担っていることが示唆された。LY と HRP の細胞内注入の結果を比較すると LY では短時間に XOSG の全体へ拡がるのに比べて，HRP では短時間の注入では局所近辺に留まることが多く，全体像を得ることが出来なかった。HRP 注入では細胞体近辺の樹状突起あるいは軸索の細かい枝分れは一部の例外を除いて観察されなかったことから LY と HRP の拡がりの程度の違いは細胞体近くの軸索の細い部分を HRP が十分に通過出来なかったことによると推察される。LY と異なり HRP は gap junction を通過出来ないと言われているが，XOSG における gap junction の可能性は今後の研究に待たねばならない。

腎由来高張耐性細胞のナトリウムポンプと耐塩適応機序

佐藤温重, 佐藤和子, 桑井康宏 (東京医歯大・歯)

中尾 真 (東京医歯大・医)

太田英彦, 福島義博 (生理研)

哺乳類腎髄質部には体液の数倍の高浸透圧環境で生存, 増殖する特殊な細胞が存在する。佐藤らがウサギ腎髄質部より分離し継代培養している KNG 3 細胞系の高張適応時の NaK ATPase 活性, 細胞周期回転の変化及び種々溶質で作成された高張環境における細胞増殖について検討した。

1. KNG 3 細胞の高張適応時の NaK ATPase 活性

KNG 3 細胞は25cm² プラスチックフラスコを用い HamF 12, 30% 牛胎児血清, 4.2g/l グルコース, 50 IU/ml ペニシリン, 50 μ g/ml ストレプトマイシンからなる培地中で 3% CO₂, 97% 空気気相下で同型培養した。confluent になったところで培地を NaCl を加えて作成した 600mOsm/l 高張培地に移しその 1, 2, 4, 8 時間後の細胞内 NaK ATPase 活性を測定した。対照群 (等張培地) では Na ATPase 活性は 1, 2 時間では高値を示し, 4, 8 時間では下降したが, 高張培地中では高い値を示し 4 時間後の NaKATPase 活性は等張培地で 0.786 ± 0.312 に対し高張培地では $1.554 \pm 0.388 \mu$ g Pi/mg protein/hr であった。高張耐性機構として NaK ATPase は何らかの役割をもつ可能性が示されたが, 細胞周期の相が異なることに起因する可能性もある。

2. KNG 3 細胞の高張適応時の細胞周期回転

1 と同様プラスチックフラスコ中で KNG 3 細胞を培養し, 対数増殖期に培地を等張または NaCl の加えた 600mOsm/l 高張培地と交換し 1, 2, 4, 8 時間培養後に細胞を単離しアルコール固定後, プロピジウムヨードイト染色し, DNA 分布とサイトフルオログラフで測定し, 小杉らのアルゴリズムに従って G₁, S, G₂+M 期の分布 (area%) を検討した。高張培地に暴露された細胞の細胞周期回転は等張培地と異なり, 1, 2, 4 時間後では S 期細胞の増加と G₂+M 期細胞の減少が, 8 時間後では S 期, G₂+M 期細胞の減少があった。高張培地中では細胞増殖が遅延するが, S 期から G₂+M 期への転入および G₁ 期から S 期への転入も抑制されることに原因する。細胞周期各相における NaK ATPase の活性の変動を明らかにする必要がある。

3. 高張培地中での KNG 3 細胞の増殖

1 と同様にプラスチックフラスコ中に細胞を培養し対数増殖期中に urea, mannitol, NaCl, sucrose のいずれか 1 つを加えて作成した 600mOsm/l 高張培地中で 2 日間培養し細胞数を計測した。urea, mannitol, NaCl, sucrose を加えた高張培地中での相対細胞増殖率はそれぞれ 66.4, 56.4, 37.1, 20.7% であった。溶質の差による高張耐性数機序について検討が必要である。

(Na⁺,K⁺)ATPase の脂質平面膜（黒膜）への再構成

熊沢紀之（和歌山県医大・医），寺田 弘（徳島大・薬），中尾 真（東京医歯大・医）

太田英彦，福岡義博（生理研）

〔はじめに〕 細胞膜能動輸送に重要な役割を果たす (Na⁺,K⁺)ATPase を脂質平面膜に再構成しその挙動を電気生理学的手法を用いて解析しようとする試みが近年報告されている^(1,2)。しかし，これらの報告では膜内に有機溶媒が残存するために組み込まれた蛋白の ATP 分解活性が阻害されている。本研究では，パッチクランプピペットの先端に単分子層膜をはり合わせて有機溶媒を含まない 2 分子層膜を形成する方法⁽³⁾を用いて (Na⁺,K⁺)ATPase の組み込みを試み，その電気生理学的挙動を検討した。

〔方法〕 (Na⁺,K⁺)ATPase はイヌ腎ミクロソーム分画並びにこれを Jørgensen の方法に従いさらに精製をおこなった酵素を用いた。膜形成溶液は 10mg 大豆レシチン（シグマ社—type IV-S），5mg コレステロールを 1ml n-ペンタンに溶かしたものをを用いた。夫々 4ml のメデウム（90mM NaCl, 10mM KCl, 1mM MgCl₂, 0.1mM MEDTA, 5mM Hepes-Tris pH7.3）を直径 35mm のプラスチックシャーレ A, B に加える。A にメデウムを満たしたパッチクランプピペットを挿入する。夫々 1μl の膜形成溶液を A, B の気液界面に展開し，溶媒蒸発のために 5 分間以上放置した。A にミクロソーム分画の場合 200μg, Jørgensen-酵素の場合 20μg の (Na⁺,K⁺)ATPase を加え 10 分間以上放置した。この後ピペットを A から引き上げ B に挿入し，ピペット内外に電位差を加え膜を通過する微小電流を測定した。ピペットは外径 2mm のガラス管を伸展し抵抗が 50～100MΩ のものを使用した。

〔結果・考察〕 〔1〕蛋白を添加せずに形成した膜は電気的物理的に安定であり，その抵抗は 2～10GΩ 程度であった。

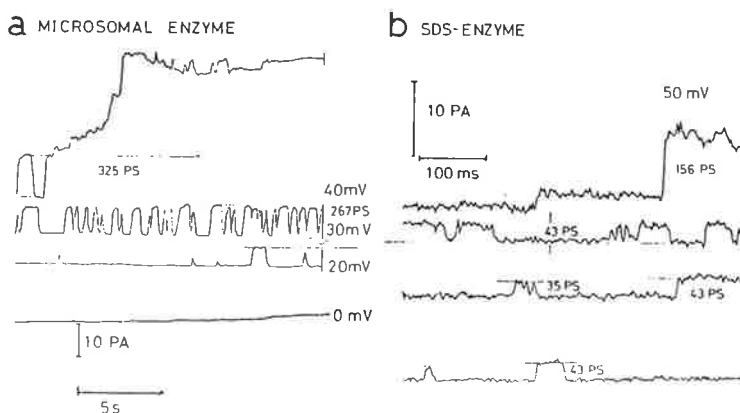


図 1. 詳細は本文に示す。

〔2〕ミクロソーム分画並びに Jørgensen- 酵素を組み込んだ結果を図 1 a, b に夫々示す。ミクロソーム分画の場合 30mV 程度の電圧印加でチャンネルが開閉を繰り返す。40mV 印加では、多くのチャンネルが開閉し、30mV で単一チャンネルの如く見積られた 270PS 程度の電気伝導度より小さいステップの変化も見られた。従って、30mV での挙動は数個のチャンネルが協同的に働いていると考えられる。ここでより高純度の Jørgensen- 酵素を用いて測定した。(図 1 b) この場合も 40mV 付近の電圧印加によりイオンチャンネルとして働き、その最小(単一)チャンネル当りの電気伝導度は、約 40PS と見積られた。

〔3〕ATP の効果、ウアバイン等阻害剤の影響については現在検討中である。

〔文献〕

- 1) T. A. Last, M. L. Gentzer, & C. D. Tyler. 1983. J. Biol. Chem., 258 : 2399—2404
- 2) R. Reinhardt, B. Lindermann, & B. M. Anner. 1984. Biochim. Biophys. Acta, 774 : 147—150
- 3) R. Coronado, & R. Latorre. 1983. Biophys. J., 43 : 231—236

ナトリウムイオンの膜内移動機構

原 諭吉, 浦山 修, 佐藤真悟, 中尾 真(東京医歯大・医)

太田英彦, 福島義博(生理研)

目的: Na^+ ポンプの作用機作は, ATPase として酵素反応速度論的に詳しい解析が行われているが, イオンがどのような様式で結合部位に作用し, 膜内を移動するかについてはほとんど知られていない。近年 occluded イオン型酵素中間体の存在が確認され (Beauge, Glynn, 1981, Glynn, Hara, Richard 1983), Na^+ は E_1P ・ Na 型で, K^+ は E_2K で occluded 型となる事が分った。この occluded イオン型とは, イオンが酵素分子内あるいは膜内にうづもれた状態であり, おそらくイオンが膜を越えて輸送される途中の状態—輸送中間体であると思われる。従い occluded イオン型酵素の生成, 分解過程の解析及び occluded 型でのイオンの結合状態を調べることによりイオンの膜内輸送機構を知ることができる。本研究では Na^+ の occluded 型を単離し性質を調べる目的で, E_1P ・ Na を安定化する方法について検討を行った。

Na^+ , K^+ -ATPase のリン酸化中間体 (EP) は, Mg^{++} の代りに Ca^{++} を用いて EP 形成し, Ca^{++} をキレーターで除くことにより安定化できることが報告されている (福島, Post, 1979)。しかし, 彼らの条件では① Na^+ 濃度が高いこと② E_1P の分画が少ないことからそのままでは本研究に用いることができない。 Na^+ 濃度を下げると E_1P 分画はさらに低下するので, $\text{E}_1\text{P} \rightarrow \text{E}_2\text{P}$ 変換を阻害する必要がある。この目的のため, ブタ腎 Na^+ , K^+ -ATPase を N-エチルマレイミド処理し, $\text{E}_1\text{P} \rightarrow \text{E}_2\text{P}$ を阻害した酵素標品を得, これを低 NaCl 濃度下, Ca^{++} 存在でリン酸化し, 安定

な E₁P を得ることを試みた。

結果： 1mM NaCl, 0.5mM CaCl₂, 20 μM [γ-³²P] ATP 存在で形成される EP は、NEM 処理酵素を用いると 80% 以上が E₁P であった。

EP 形成後充分量の GEDTA 添加し、EP の安定性を 0℃ で追跡したところキレーター添加後 30 分は安定であった。しかし安定化された EP レベルは、キレーター添加前のレベルの数分の 1 になった。安定化された EP に Mg⁺⁺+ADP を加えるとすみやかに分解した。一方 Mg⁺⁺+K⁺ 添加ではゆるやかな分解が見られた。

キレーター添加後に安定される EP レベルが低いのは、NEM 処理標品を低 Na⁺, Ca⁺⁺ 存在下でリン酸化した EP の脱リン酸化速度が著しく速いことによる。脱リン酸化速度が遅くなるような pH やイオン条件を用いるなどの検討がさらに必要ではあるが、E₁P. Na を安定化する基本的な手段は得られたと考えられる。

感覚器内シナプスにおける求心性神経伝達物質の同定：血漿中の活性因子の性質

小原昭作，梅北峻一，岡野桂樹（帝京大・医）

金子章道（生理研）

ゴンズイ電気受容器（特殊側線器）の求心性伝達物質について、提唱されてきたグルタミン酸 (Glu) などの候補物質はすでに否定した。内耳でも、同様に、未知の候補が想定されている。

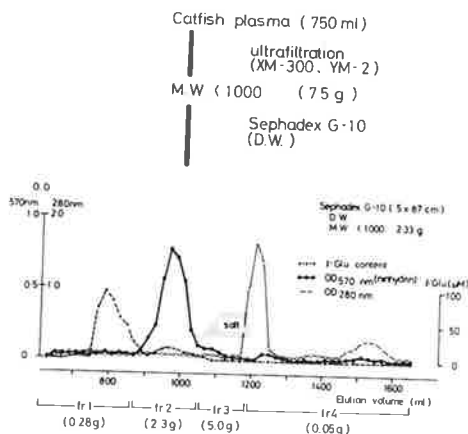
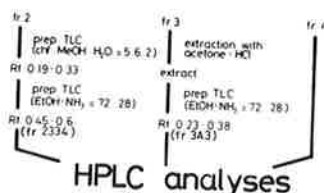


図 1. ナマズ血漿中の活性因子の精製。

M.W. < 1000 の画分（限外濾過）をセファディクス G-10 で再分画する。

fr 1 ~ 4 はいずれも活性を示す。

fr 2 は再ゲル濾過した後の活性画分について精製を試みた。



電気受容器の求心神経放電を指標とする生物検定によれば、いくつかの生物由来の活性因子が存在する。このうち、ナマズ類の血漿中に含まれる活性因子は以下の点で伝達物質（刺激・放出実験による）に類似する。1）TLC 上の挙動。2）JSTX で阻害されない。この血漿中活性因子（M.W.<1000）の精製法を検討し、HPLC による成分分析（アミノ基の高感度分析法）を行った。

日本ナマズの血漿約1.4 l について分離・精製を試みた（図1）。ゲル濾過後、以下の画分を得た。fr 1：酸性アミノ酸（Glu など）を主とする。fr 2：ほとんどのアミノ酸を含む。fr 3：塩画分。fr 4：280nmの吸光が顕著。これらはいずれも、電気受容器、半規管による生物検定で活性を示し、特に fr 4 が最も強い。

fr 2 は再ゲル濾過後、fr 3 はアセトン・塩酸（主に脱塩が目的）抽出後、TLC に展開・分取した。HPLC 分析では、fr 2 より fr 2334 中には、積算数 mM（生物検定時の濃度）の多数のアミノ酸が認められた。しかし fr 3A3, fr 4 では、顕著なピークは少なくわずかに、タウリン $0.71 \mu\text{M}$ 、ヒスチジン $5.5 \mu\text{M}$ (fr 3A3) また、タウリン $0.49 \mu\text{M}$ 、メチオニン $3.3 \mu\text{M}$ 、フェニルアラニン $305 \mu\text{M}$ (fr 4) を同定したのみであった。二つの画分のクロマトグラムと、電気受容器の刺激・放出液のそれを比較すると（図2）、未知の微量成分中に類似が認められる（図2 B, C の挿入図）。

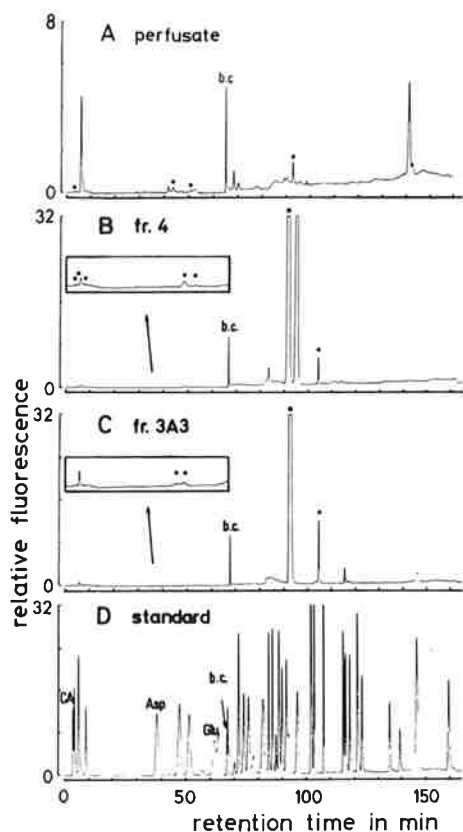


図2. HPLC による生体アミノ酸分析。

A：ゴンズイ電気受容器の刺激・放出液。

B：fr 4(5P/ml, 5倍濃縮)

C：fr 3A3(30P/ml, 30倍濃縮)

D：標準アミノ酸（主に $50 \mu\text{M}$ ）

●：未同定物質。

■：リンゲル中の HEPES 由来？

b.c.：分析中の buffer change による。

A 及び B, C の挿入図は 4 倍高感度。

なお、これら活性画分はJSTX投与後でも活性が認められ、Gluのアゴニストによる活性ではない。

HPLCの結果は血漿中の活性物質が、アミノ基を含むなら、 μM またはそれ以下の濃度で有効なことを暗示する。事実、fr 4の活性は、重量換算でGluより強力である（半規管）。

fr 4は条件により活性を失い、その再精製には至っていない。今後、活性物質の安定な保存法と精製法を検討していく。

カメ網膜の視細胞—双極細胞間のシナプス結合

大塚輝彌（生理研），神山暢夫，渡辺宏助（東女医大・生理）

カメ網膜の外顆粒層には視細胞の細胞体の他に2次ニューロンの双極細胞の細胞体が存在する。従来、視細胞電位として解析されているものの多くは、光刺激に対する応答様式から両者を判定していた。これらの研究では光応答の細胞内記録は、記録電極が視細胞の細胞体に刺入されていると考えられてきたのである。ところが、細胞内記録を行って光応答を解析した後に蛍光色素を注入してみると、外顆粒層から得られた細胞内記録の内の $\frac{1}{4}$ は双極細胞であり、これらの多くは応答様式から視細胞と区別がつかなかった（生理研年報・p.×××参照）。そこで、外顆粒層に細胞体のある双極細胞、すなわち『偏位双極細胞』の密度と細胞体の大きさを調べるため、光顕と電顕の連続切片を作成して外顆粒層の細胞の種類を定量的に解析した。

2種類の淡水産カメ、クサガメ（*Geoclemys reevesii*）とアミミガメ（*Pseudemys scripta elegans*）の網膜を用いた。甲羅長が約20cmのカメから剝離網膜標本を作り、視線条から約2mm背側部を切り出して、固定、脱水しエポンに包埋した。網膜の連続水平断切片は、まず視細胞の外節から外境界膜までを光顕用の厚切り切片（厚み $1\mu\text{m}$ ）とし、続いて外境界膜から外網状層までの外顆粒層を含む約 $20\mu\text{m}$ を電顕用の薄切水平断切片とした。外顆粒層に見られる細胞体が視細胞に属するか、偏位双極細胞に属するかを判定するため、検索する部位を $175\times 150\mu\text{m}$ に定めて、この中に含まれる全ての細胞体（総数約500個）の立体再構築を行った。

カメの視細胞は内節の形態や含まれる油滴によって、杆体、単一錐体、複合錐体の3種に分類される（本年報・p.×××参照）。これらの細胞体は外顆粒層に層状構造を呈していた。単一錐体と複合錐体の細胞体は外顆粒層の遠位層にあり、核の遠位端の $\frac{1}{2}$ は外境界膜から突出していた。錐体の細胞体は水平断の最大直径が約 $8\mu\text{m}$ あり、軸索終末とは細い軸索（直径約 $1\mu\text{m}$ ）で結ばれていた。一方、電子密度が際立って高い杆体の細胞体は外顆粒層に直径約 $8\mu\text{m}$ の円柱状を呈していた。杆体の核は、この円柱のほぼ真中に位置していた。

通常、双極細胞の細胞体は内顆粒層に位置するが、外顆粒層に細胞体のある双極細胞は多くの脊椎動物の網膜で報告されており、特に偏位双極細胞と呼ばれている。カメの偏位双極細胞の細

胞体は水平断直径が約 $10\mu\text{m}$ あり、外顆粒層の近位層に見られた。

このようにして形態学的に同定された偏位双極細胞と3種類の視細胞数を表1に示した。カメの外顆粒層に見られる細胞体の $\frac{1}{3}$ は偏位双極細胞に属し、さらに視細胞と双極細胞の細胞体の大きさに差がないことから、外顆粒層からの細胞内記録の中には、偏位双極細胞から得られたものが含まれている可能性が高いことを示唆している。実際、蛍光色素の細胞内染色を行って、偏位双極細胞と視細胞の刺入数の比をとると、本研究の結果とほぼ等しかった。

今後は、外顆粒層からの細胞内記録は細胞内染色などによって、細胞を形態学的に確認する必要があるであろう。

Cell type	<i>Geoclemys</i>		<i>Pseudemys</i>	
photoreceptor	319	(68%)	378	(67%)
Rod	62		10	
Single cone	186		272	
Double cone	71		96	
Displaced bipolar cell	150	(32%)	188	(33%)
Total cell number	469	(100%)	566	(100%)

表1 カメ網膜の外顆粒層に見られる細胞の種類と数。

2種類のカメ（クサガメ*Geoclemys*とアカミミガメ*Pseudemys*）とも、視線条から2mm背側の網膜に一定の枠（ $175 \times 150\mu\text{m}$ ）を設けて、その枠内の外顆粒層にある細胞体の種類と数を調べた。視細胞は杆体、単一錐体と複合錐体に分類した。1mm²あたりに換算した全視細胞数はクサガメで17,900個、アカミミガメで21,600個であった。

Quantitative morphological study of the outer nuclear layer in the turtle retina.

N. Kouyama and T. Ohtsuka, Brain Res. 1985 (*in press*)

細胞内染色法と電顕観察による水平細胞の同定と杆体との結合様式の解析

塚本吉彦（兵庫医大）、山田雅弘（電総研）、金子章道（生理研）

昨年度に継続して、コイ網膜における杆体入力型の中間水平細胞の立体構築の解析をHRP電顕法を用いて行なった。

目的の神経細胞にHRPを注入する際、しばしば隣接する細胞が重なって染色される。特に、1本の長い軸索突起をもつ外水平細胞が中間水平細胞とともに染まった場合には、網膜の垂直方向からの観察だけでは突起の有無や形状に関して解釈が困難となる。実際、長い突起が2本認めら

れた5例について、再包埋後網膜の放射断の切片を作り層別に観察すると、3例で明らかに外水平細胞が染まっており、1本の突起は外水平細胞に由来することが確かめられた。視細胞側から中間水平細胞に電極を接近させる場合に必ず外水平細胞層を通らなければならないことが誤った多細胞染色の根本の原因であるが、細胞内刺入のために用いる容量補償による発振がHRPの漏れを引き起こす可能性もある。そこで発振法の代りにjolting法を用いて細胞内刺入を行ない、中間水平細胞内でのみ通電したところ、比較的漏れの少ない試料が得られた。

超高压電顕の観察により、杆体視細胞シナプスリボンの両側へ陥入する中間水平細胞の突起の先端は胞状をなすことが示唆された(図1)。超薄切片の連続観察からもその突起の先端が薄膜様になって胞状に広がることが確認された。このような形態は視細胞終末と水平細胞突起の接触面積を広く保つものであるが、機能との関連は今のところ不明である。

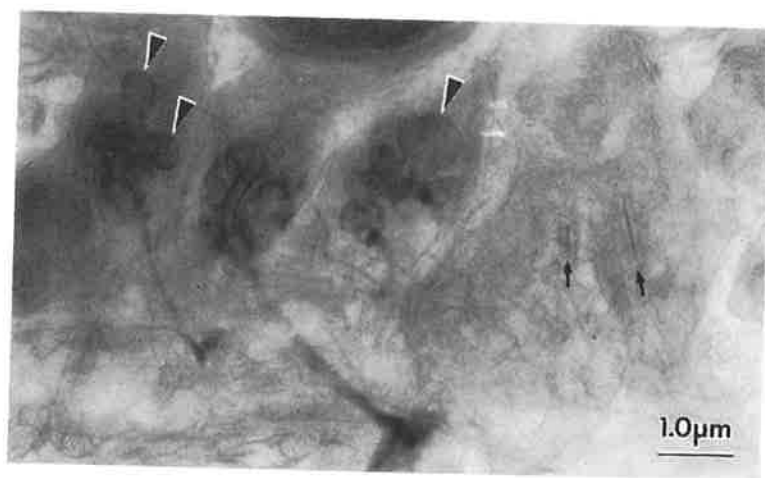


図1. コイ視細胞終末部の超高压電顕像。左側に3個の杆体シナプス部に陥入するHRPで染まった中間水平細胞の突起が見られる。いくつかの突起の先端は胞状に広がっている(矢頭)。右側に2本のシナプスリボン(矢印)の見られる錐体シンプス部があるが、HRPの染まりはない。切片は2 μ m, 縮尺は1 μ m。

筋紡錘神経末端におけるイオン・チャンネルの超微形態学的研究

伊藤文雄(名大・医), 藤埴規明(名工・工), 浜 清(生理研)

カエル筋紡錘神経末端でCa spikeが起こることを見出して以来、種々の電気生理学的研究で、その末端にCa channelがあることは確実にになった。最近ではmechano-transductionも g_{Ca} の増大による可能性も示唆されている。この無髄神経末端は、直径0.1 μ m, 長さ100 μ m以上もあって、空間固定が不可能なために、電気生理学的にCa channelを立証することは出来ない。本研究

は超微形態学的にこれを明らかにしようとするものである。

本年度は、単離したカエル筋紡錘について Freeze fracture 法によって神経末端の細胞膜にある particle の直径を計測し、それらの分布を明らかにして ionic channel を推測することを行なった。

神経ペプチドの局在に関する超微形態学的研究

小坂俊夫（生理研），遠山正弥（阪大・医），篠田 晃（阪大・医）

近年の免疫組織化学的手法の進歩により脳内には20種を超える神経ペプチドの存在が確認され脳機能調節に重要な役割を有することが想像されている。本研究は、神経ペプチドの意義を明らかにする一環として各種ペプチドを豊富に含む扁桃核をとりあげ、電顕下にて、この領域でのペプチド回路について免疫組織化学的手法を用いて解析する。

本年度は、通常電顕及び免疫電顕により、扁桃体内サブスタンス P，ニューロテンシン，エンケファリン，CCK 等の含有線維および細胞の特徴を電顕を用いて検討した。

樹状突起の三次元的構造の解析とその情報処理機能の理論的解析

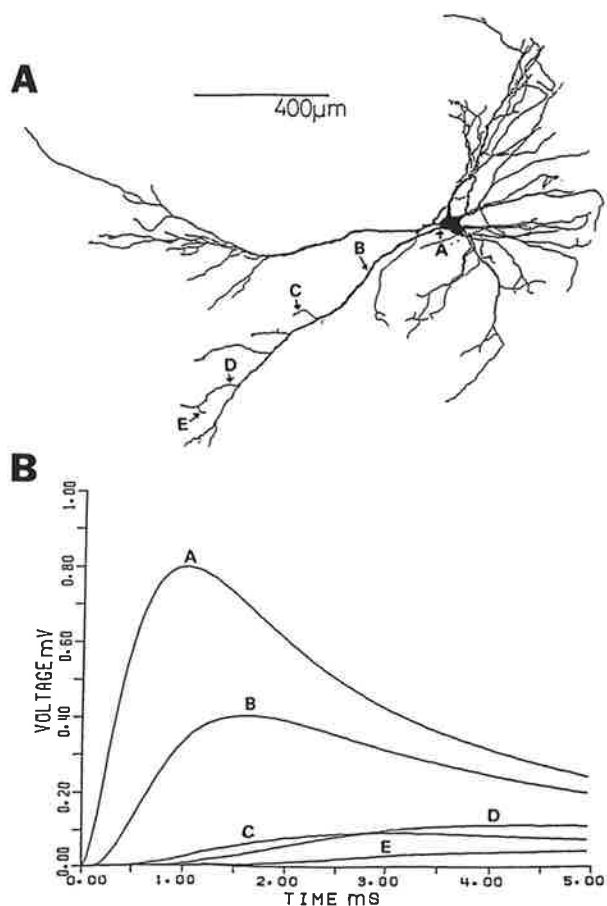
村上富士夫，川人光男，塚原伸晃（阪大・基礎工）

近年の HRP 細胞内注入法の導入によって、神経細胞の樹状突起の空間的広がり詳細にわたって明らかにされてきた。しかしその複雑さのために、その機能的役割を理解することは容易ではなかった。Rall の等価円筒モデル(1)は特殊な分岐パターンをとる樹状突起を有する神経細胞には有効であるが、それ以外の細胞には用いることができない。一方、1974年に Butz と Cowan によって発表された理論は(2)いかなる形態の神経細胞にも適用可能であったが、この理論にしたがって解を得るには実用上不可能な程膨大な計算が必要であった。しかし昨年、川人らは(3)アルゴリズムの改善によって比較的容易にこの解を得る方法を見出したため、本研究では HRP の細胞内注入によって染色した赤核細胞に Butz と Cowan の理論を適用して、赤核細胞におけるシナプス電位の統合の機構の解析をおこなった。

材料はネコの赤核細胞を用い、先端を1〜2ミクロンになるように折ったガラス管微小電極に HRP を充填して、これを電気泳動的に注入した。また HRP を注入した細胞の膜のパラメータを決定するために、同時に時定数や入力抵抗の測定をおこなった。その後灌流固定をおこない、100μの厚さの切片をつくり、DAB で反応させたのち、エポキシ樹脂に包埋した。その後顕微鏡に取付けた描画装置を用いて連続切片から細胞の再構築をおこない、樹状突起の直径と長さの測

定をおこなった。

Butz と Cowan の理論に基づいて計算をおこなうには神経細胞の形態の他に、膜抵抗 (R_m)、膜容量 (C_m) と細胞質の比抵抗 (R_i) の値が必要である。これらの値を決定するために① R_i/R_m を実際の細胞内記録で得られた樹状突起のケーブル性を再現できる値に選び、② R_i と R_m の絶対値は細胞内記録で測定されたこの細胞の入力抵抗を再現できるような値を選んだ。③ さらに C_m は膜の時定数と②で決定された R_m の値とから決定した。



図は再構成した赤核細胞 (A) とその樹状突起の様々な部位にコンダクタンス変化を与えた時に細胞体部に生ずる電位変化 (B) を示す。A 図にアルファベットの A から E までで示した部位にコンダクタンス変化を与えた時の細胞体部での電位変化の対応するものに、B 図でやはり A ~ E のアルファベットが付してある。コンダクタンスの発生部位が細胞体部から遠ざかるにつれて EPSP の立上り時間が遅れ、振幅が小さくなるという点はこれ迄の等価円筒モデルによる解析結

果と変りないが、これ迄は知り得なかった細胞体部からの実距離や、分枝による EPSP の伝わり方の違いなどが明らかになった。今度この方法を用いることによって単一細胞における情報処理に関する知見が一層深まることが期待される。

〔文献〕

- 1) Rall, W. (1962) Ann. N. Y. Acad. Sci. 96 : 1071.
- 2) Butz, E. G. and Cowan, J. D. (1974) Biophys. J. 14 : 661.
- 3) Kawato, M., Hamaguchi, T., Murakami, F., and Tsukahara, N. (1984) Biol. Cybern. 50 : 332.

新生ラット筋紡錘に対する除神経と神経成長因子の効果

久野 宗 (生理研, 京大・医), 宮田雄平 (生理研, 東京医歯大・医)
本間信治 (新潟大・医), 関谷伸一 (新潟大・医)

〔研究目的〕

哺乳動物の筋神経を切断すると、数週間後には、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。昨年度の研究報告において、この効果は新生ラットにおいて特に著明であり、生後一日に筋神経を挫滅すると、4週間後にその筋神経の刺激によって誘発する EPSP は正常の10%以下であることを記載した。さらに、この EPSP の減弱は、筋神経傷害後に神経成長因子 (nerve growth factor ; NGF) を投与することによって軽度になることを報告した。新生ラットの筋を除神経すると、神経が再生してもその筋の筋紡錘は再生しないと言われている (Zelena, 1957 ; Zelena & Hnik, 1960)。傷害筋神経の刺激によって発生する運動ニューロンの EPSP の減弱が、その感覚神経の末梢受容器である筋紡錘の消失と関連しているとすれば、NGF の EPSP に対する効果は筋紡錘の再生の亢進によって説明することが可能である。この可能性を検討するために、新生ラットの筋神経傷害後の筋紡錘の数と形態の変化及びそれに対する NGF の効果を観察した。

〔実験方法〕

Wistar ラットの下肢の medial gastrocnemius(MG) 神経を生後1日の時期に筋の近傍でピンセットで挫滅し、4—5週間後に MG 筋を固定し、連続切片を作製して、筋紡錘の総数と個々の筋紡錘の形態を観察した。対照として、他側の正常の MG 筋を用いた。NGF は雄マウスの顎下腺から抽出し (2.5S-NGF)、神経傷害後、毎日体重 gr あたり、2 μ g を腹腔内に注入した。最初の1週間以降は、NGF の投与は隔日に行い形態観察の前日まで継続した。また、マウス 2.5S-NGF を家兎に皮下注射することにより、NGF に対する抗血清を作製した。NGF 抗血清 (体重 gr あたり 10 μ l) は生後1日から1週間連続投与し、1週間の休止期後、さらに1週間連続投与

した。

〔結果及び考察〕

ラットの正常 MG 筋における筋紡錘の総数は、平均、19ヶであり、大多数の筋紡錘は2本の核袋錘内筋線維と2本の核鎖錘内筋線維を有していた。図1は、一側のMG神経を生後1日に挫滅し、4—5週間後に、手術側と正常の対側のMG筋の筋紡錘の総数を連続切片標本において観察した結果を示す。図1Aに見られるように、術側の筋紡錘の数は対照側と比較して差異は見られなかった。同様な手術を行った後にNGFを投与したグループでは、対照側の筋紡錘の数には変化が見られなかったが、術側の筋紡錘の数は正常の約2倍に増加していた(図1B)。

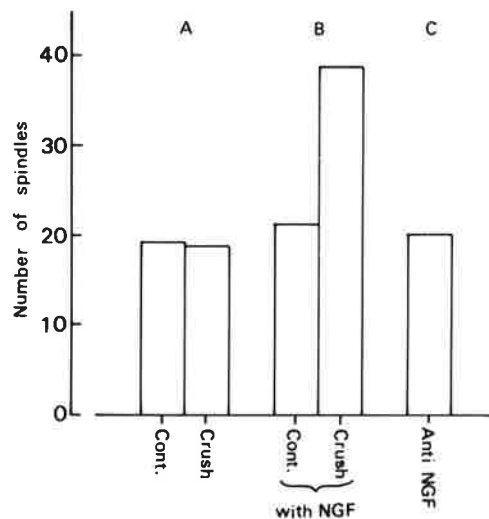


図1. 連続切片によって観察したMG筋の筋紡錘の総数。A. 一側のMG神経を生後1日に挫滅し、4—5週間後に挫滅側と対照側から得た結果。B. Aと同様の観察をNGF投与群に対して行った結果。C. NGF抗血清を投与した動物の正常神経支配を有するMG筋から得た結果。

NGF抗血清の投与は、神経支配を有する筋の筋紡錘の数に影響を与えなかった。生後1日における筋神経の損傷は再生した筋紡錘の数は正常のレベルにあったが、形態的には著しい萎縮を示した。図2は、筋紡錘の赤道面における最大直径の分布を示す。図2Aに見られるように、筋神経損傷側の筋紡錘の直径(白丸)は、対側の正常筋(黒丸)と比較して半分以下に減少していた。また、この萎縮は、NGFの投与によって軽減されなかった(図2B)。筋紡錘の神経損傷による萎縮は、その長さにおいてさらに著明であった。図3は、筋紡錘の長さの分布を示したものである。筋神経損傷側の長さ(図3A, 白丸)は対側の正常筋(黒丸)の約1/3であった。この長さの萎縮もNGFの投与によって軽減する傾向は見られなかった(図3B)。

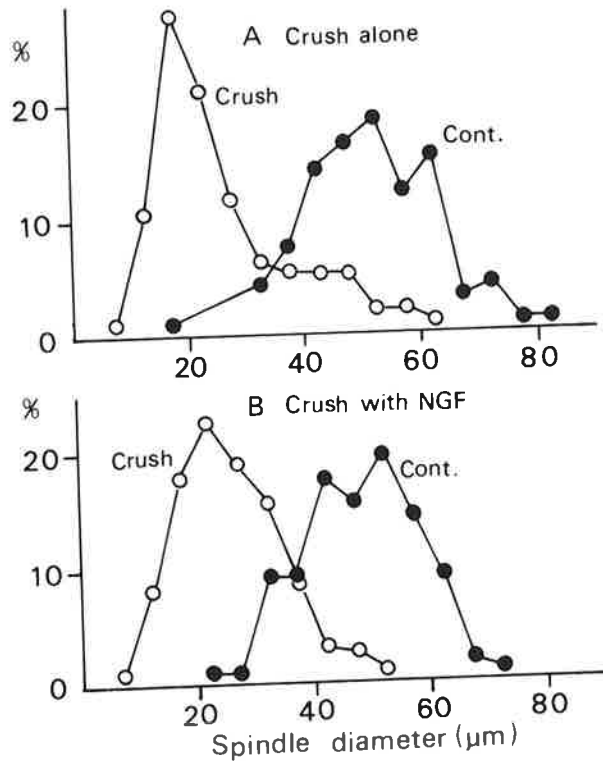


図2. 赤道面における筋紡錘の最大直径の分布。A. 生後1日に一侧のMG神経を挫滅し、4—5週間後に、挫滅側（白丸）と、対照側（黒丸）を比較した結果。B. Aと同様。但し、NGF投与群から得た結果。

本研究において予想外の結果は、新生ラットの筋神経の損傷によって筋紡錘の消失が見られなかった点と、NGFの投与によって筋紡錘の数が正常の約2倍に増加したことである。過去に報告された実験では、新生ラットの坐骨神経を挫滅していたのに対し、本研究では、神経を筋の近傍において挫滅した。本研究の実験条件下では、筋の神経の再支配がより速みやかであり、除神経された筋紡錘が完全に変性する前に再生感覚神経が到達して、筋紡錘の消失を阻止したと推測される。しかし、生後1日にMG神経を挫滅すると、この筋から由来する感覚神経細胞の約半数が死滅することが観察された（部門研究報告参照）。それにも拘わらず、再生筋紡錘の数が正常と同一であるという結果は、筋肉内で、Ia感覚神経線維が分枝し、一本のIa線維が複数の筋紡錘を支配していることを示唆する。

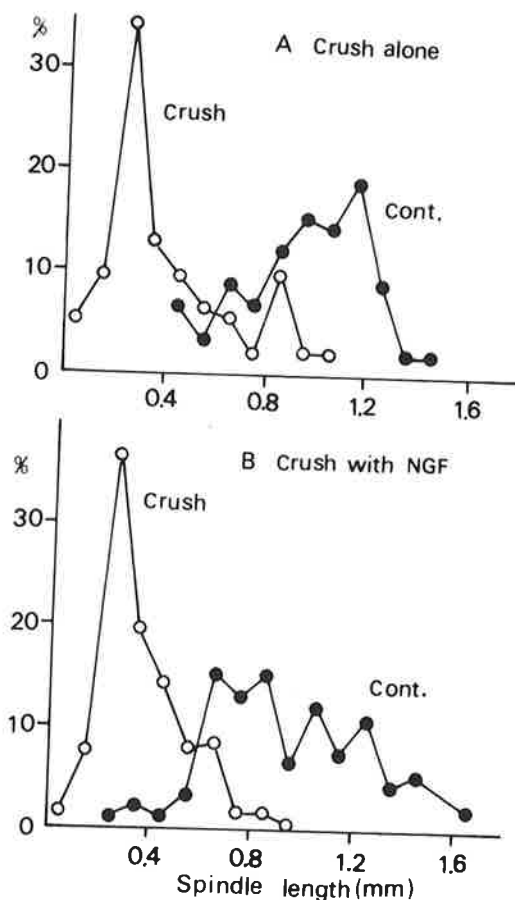


図3. 図2と同様。但し、MG筋の筋紡錘の長さを計測した結果。

NGF投与群では、筋紡錘の数が正常以上に増加しているから、この条件下でde novoの筋紡錘が形成されていることは疑いない。如何にしてde novoの筋紡錘が形成されるかに関しては全く不明である。損傷されたIa感覚神経が筋に再生し、その筋内における分枝能力がNGFによって亢進して、その結果、新たな筋紡錘が前駆細胞とIa線維の分枝の相互作用によって形成されると推測される。MacKenson-Dean等(1981)は、元来筋紡錘を有していない筋に、筋紡錘を有する筋を支配していた神経を再生させると、de novoの筋紡錘の形成が見られることを報告している。したがって、筋紡錘の形成には明らかに、その数に相当する特異的な神経線維あるいはその分枝が必要である。NGFの投与は新生ラットの末梢神経損傷による感覚神経細胞の細胞死を阻止しないが(部門研究報告参照)、末梢あるいは中枢の分枝を促進させ、その結果、筋肉においては筋紡錘の数を増加させ、中枢においてはEPSPの亢進を惹起すると仮定される。しかし、図1から明らかなように、このようなNGFの効果は、損傷を受けていない正常の感覚神経に対しては発現されない。

前根由来の感覚神経の中樞効果

久野 宗（生理研・京大医），遠藤克昭（京大・医），樫原康博（生理研）

〔研究目的〕

哺乳動物の感覚神経線維は主に後根を經由して脊髄に投射し，運動神経線維は前根を經由して末梢の骨格筋等を支配することは，一般法則として古くから認められているが，最近に於ける電子顕微鏡，HRP，免疫組織化学的手法等を用いた詳細な研究により，前根には有髄（数％）及び無髄（10—40％）の感覚神経線維も多数含まれることが確実視されるに至った。本研究は，未だ解明されていない前根由来の感覚神経線維の脊髄内に於ける中樞効果を検討し，その機能的意義の手掛りを得ることを目的とする。

〔実験方法〕

ペントバルビタールで麻酔したラット（80—150 g）或いはネコ（3—4 kg）を用いた。人工呼吸下で筋弛緩剤の投与により動物の非動化した状態で，腰髄の運動ニューロンに微小電極を刺入し，切断した前根の末梢端の単一刺激により発生するシナプス電位の記録及び解析を行った。刺激強度は有髄神経線維（パルス巾 0.1 msec，1—10 V），或いは無髄神経線維（パルス巾 1 msec，5—20 V）を刺激するに十分な強さを用いた。

〔結果及び考察〕

ラットの運動ニューロンに於ては，切断した前根の末梢端を刺激すると，調べた53例のうち，26例から，7—24 msec の潜時で EPSP 或いは IPSP が記録されたが，筋弛緩剤の追加投与により，その大部分が消失或いは著明に減少した。この結果から，前根末梢端の刺激により運動ニューロンに発生するシナプス電位は，殆ど全て， γ 運動神経線維の刺激により生ずる筋紡錘の求心性放電により誘発されたものであって，前根に含まれる感覚神経線維の活動に由来する成分は少ないことが判明した。今後，さらに，麻酔の種類或いは動物の加齢との関係，詳細な形態学的所見等を検討する必要があると考えられる。

一方，ネコの運動ニューロンに於ては，切断した前根の末梢端の刺激により，調べた78例中69例から，12—65 msec の潜時で，屈筋運動ニューロンに主として EPSP，伸筋運動ニューロンに IPSP が記録された。これらのシナプス電位は，ラットに於ける所見と異なり，筋弛緩剤の追加投与により影響を受けず，また，有髄神経線維に対する最大刺激では発生しないことから， γ グループの活動により誘発される可能性は否定された。さらに，後根を切断した場合，或いは，刺激強度を無髄神経線維の閾値下に弱めた場合に，これらのシナプス電位は消失することから，ネコに於ては，前根に含まれる無髄性の感覚神経線維の活動が，後根を經由して多シナプス性に運動ニューロンにその効果を及ぼすと結論された。（これらの結果は Neuroscience Letters に投稿し，現在，印刷中である。）

Catecholamine の心筋単一 Na channel に及ぼす効果

有田 真, 清末達人 (大分医大)

入沢 宏, 野間昭典 (生理研)

コラゲナーゼ処理により単離したモルモット単一心室筋細胞にパッチクランプ法を適用し, 単一 Na チャンネル電流の記録を行なった。細胞外液及び, 電極内液として, 同一組成の Tyrode 液 (Na, 140mM) を用い, 温度は 10℃ に保った。Cell attached mode での記録から, 次の事柄が明らかになった。①閾値電位よりも脱分極側 30mV の範囲で記録した単一 Na channel 電流の振幅は 1.1~1.4pA であった。②各電位における 30~50 個の電流記録を平均加算して求めた。平均の Na 電流の振幅及び, 活性化, 不活性化の速度は, 保持電位を一定とした場合, 脱分極するに従って増加した。また, 脱分極レベルを一定とした場合, 保持電位を過分極側に移動すると, 活性化, 不活性化の速度は変えずに平均電流の大きさが増加した。単一チャンネル電流の実験と平行して, 細胞全体の Na 電流を正確に測定する目的で, 二本のパッチ電位を用いる膜電位固定法のための増幅器, 電極の開発を進めているが, 現在までのところ, Na 電流のピークでの膜電位固定が十分に行なえておらず, さらに工夫を重ねる必要がある。

Angiotensin II の心臓洞房結節細胞の自発活動電位に対する作用

河西春郎, 福田 潤 (東大・医), 倉智嘉久, 入沢 宏 (生理研)

〔目的〕 Angiotensin II (AG II) は血管平滑筋を強く収縮させることが知られているが, 心筋に対する生理作用はよく調べられていない。今回我々は心臓のペースメーカー活動に対する AG II の作用を調べた。

〔方法〕 家兔の心臓より洞房結節を切り出し, これを剃刀で細く切り, 更に両端を糸で縛って直径 0.3mm の微小標本を作った。標本を記録槽に固定して Tyrode 液 (37℃) で灌流した。この標本からガラス微小電極により細胞内誘導を行うと, 同調した自発活動電位を数時間安定に記録することができた。AG II, Adrenaline 及び 8Br-cAMP を灌流液中に投与した。

〔結果〕 AG II は濃度により 2 種類の作用を示した。10P~10nM では自発活動電位の頻度 (HR) が最大 10% 上昇した。この際, 最大拡張期電位 (MDP) は変わらなかった。この変化は AG II 投与後約 2 分で平衡に達し, 対照溶液に戻すと同様にすぐ消失した。これに対し, 50n~10μM では MDP が脱分極し HR が減少した。減少の程度は標本によって異なったが 13 例中 5 例の標本では自発活動が消失し, -20~25mV の膜電位に静止した。この抑制性の変化の時間経過は遅く AG II 投与後約 10 分で平衡に達し, 対照溶液に戻しても回復するのに 20~30 分かかった。AG II の

この抑制性の作用はAdrenalinが存在するとより低濃度から現われた。即ち、AG II (10nM) は単独に与えるとHRは増加するが、Adrenalin (0.5 μ M) を与えている標本 (HRは約10%上昇) にAG IIを同時に与えるとHRは逆に減少した。Adrenalinのこの効果は8Br-cAMPで置き換えることができなかった。即ち、8Br-cAMP (100 μ M) を与えている標本 (HRは約10%上昇) にAG IIを同時に与えるとHRは対照と同様に増加した。

〔考察〕 これらの結果から、心筋の洞房結節細胞には作用と親和性の異なる2種類のAG II受容体があることが示唆された。既にAG IIの結合実験により心筋には親和性の異なる2種類のAG II受容体 (解離定数=2.4pMと9.4 μ M; Mde. Pharmac.24 (83) 213) があることが報告されており、本実験の結果に対応するのかもしれない。またAG II抑制性の作用は、Adrenalineで増強するが細胞内cAMPを直接上昇させても変化がなかったことから、adenylate cyclaseの抑制を介している可能性がある。

単離心筋細胞に不整拍動を誘起させる物質の収縮及び膜電流に対する効果

小林正紀, 大泉 康 (三菱化成生命研), 入沢 宏 (生理研)

モルモット及びラットの心臓をランゲルドルフ法を用いてコラゲナーゼ処理することによって単離心筋細胞を調整した。単離細胞を1.2mM Ca^{2+} を含むタイロード液 (37 $^{\circ}\text{C}$) 中で電気刺激して、拍動の様子を顕微鏡下で観察した。モルモット摘出心筋標本に対して強心作用を示す海産シガテラ毒素 (>10 $^{-8}$ g/ml), ウワバイン (>10 $^{-6}$ M), アコニチン (>10 $^{-7}$ M) などは、単離細胞に対して強心作用を示すとともに不整収縮を誘起させた。海産シガテラ毒素の単離心筋細胞に対する作用はベラパミルによって顕著に抑制された。パッチ電極を用いた単一チャンネル電流記録法を用いて、単離心筋細胞の膜電流に対する上記物質の初果に関する基礎的検討を行なった。

平滑筋・心筋における細胞内カルシウムの局在

北澤俊雄 (順天堂大・医), 入沢 宏, 江橋節郎 (生理研)

細胞の活動に伴う細胞内Caイオンの動きは、細胞内微細構造に一致したCaイオンの定量分析により初めて明らかとなる。すなわち細胞を各活動状態で瞬間凍結し、その超薄切片を電子顕微鏡で観察しながら、その微細構造に含まれるCaを電子線で照射し、そこから放出されるCaのX線量を測定することにより知ることができる。すでに骨格筋においては、その電子プローブ、マイクロアナリシス法を用いて、収縮弛緩に一致した細胞内のCaの動きがすでに電子顕微鏡レベ

ルで測定されている。しかし平滑筋や心筋では細胞内Caの局在やその生理的収縮に必要なCaイオンが何処に由来するのかなど明らかではない。そこでまず、現有のJEOL ZOOCXとKavex 7000を用いて定量分析が可能かどうか検討した所、いくつかの問題点が明らかとなった。

1) 真空度：電子顕微鏡内の真空度は測定に直接に影響する。全真空度は、cold trapを用いた条件で $3 \sim 4 \times 10^{-7}$ torrであったが、これはまだ1桁は低いようである。事実100~200秒の照射でcontaminationが生じた。また定量分析を行うようになった場合には試料を-100℃以下に冷却する必要があるので、水蒸気圧も重要な因子であるが、分析器がないため測定できなかった。

2) 電子線の強度と径：試料を観察しながら分析を行うにはTEMモードで使用する必要がある。またその時の電子線の強度として1nA以上が超薄切片を用いた場合必要となろう。しかし本装置では電流が1nA程度の場合、その電子線の径は1μmにもなり、径を0.1μmまで絞ると電流はその1/100程度になってしまう。カエル骨格筋の筋小胞体(TC)の径は80nm程度であり、心筋・平滑筋の筋小胞体は更に小さいのでそれらの測定は不可能である。またミトコンドリア内の元素を測定することも困難である。

3) 試料ホルダー：X線検出器と試料表面の作る角度により測定されるX線量は異なる。現有の低バックグランドホルダーを用いた場合一定量のX線を得るために試料面を30度以上傾斜することが必要であった。この様な高角度は像をはなはだ歪めるだけでなく、空間分析能を著しく悪くする。これはホルダーの形状によるためであり、生物試料を測定する場合、そもそもX線量が少なく、電子線により損傷を受けやすいので、Be製冷却ホルダーがなければならない。

4) その他：定量化のためにコンピューターは必要不可欠である。その他定量化のための基準に達しない点がいくつか明らかとなったが紙面の関係上割愛する。

電子プローブ、マイクロアナリシス法による生物試料の定量分析は現時点では不可能であることがわかった。

摂食条件行動に関する条件結合についての研究

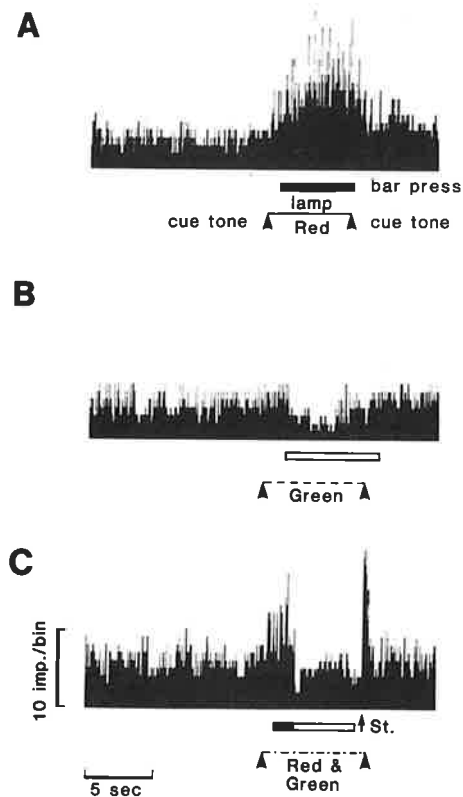
石川友衛, 古賀知行, 宮澤多恵子 (日本大・医)

粟生修司, 大村 裕, 西野仁雄 (生理研)

2種類の手がかり刺激に対する視覚性弁別から摂食条件行動および通電刺激に対する回避条件行動に移るように訓練したサルを用いて、手がかり刺激後で行動の発現前である識別期にみられる前頭眼窩野(OBF)での神経細胞活動の変化を記録し、行動との対比検討を行った。

〔方法〕 サルの両側耳側眼底に赤および緑色に切り換えられるスポット光を与えて手がかり刺激とした。赤の手がかりランプでは30回の反復レバー押し(BP)をすると報酬としてパン切れが与えられ(摂食課題)、緑のランプでは点灯後2.5秒以内にレバーを押し始め持続的に5.5秒以上

押し続けなければ罰として後頭部に通電刺激が加わるようにした（回避課題）。ランプはEOGを監視しながらサルが中央を固視している時に点灯した。2種類の課題については各々1カ月半以上の強化を行ってほぼ100%の確率で遂行できるように訓練した。OBF細胞活動はタングステン電極を用いて記録し、㉑手がかりランプ点灯時、㉒最初のBP(1st. BP)時、㉓消灯による行動終了時を各トリガー点とした3種類の発射頻度のタイムヒストグラムを作製した。



図A：両眼に赤色手がかり光を与えた摂食課題時の発射頻度加算平均（3回）ヒストグラム。黒バーは反復レバー押し、三角は開始、終了合図の Cue tone、その間の実線は赤色光呈示期間を示す。

図B：両眼に緑色手がかり光を与えた回避課題時のヒストグラム。白抜きバーは持続レバー押し、破線は緑色光呈示期間を示す。

図C：左眼に緑、右眼に赤色光を与えた時のヒストグラム。バーは反復レバー押し（黒）から持続レバー押し（白）に変わったことを、一点鎖線は、緑、赤色光呈示期間を示す。矢印St.は持続レバー押しが短かったための罰刺激を示す。

〔結果〕 安定してその活動が記録できたOBF細胞は90個で、前回報告*同様、摂食課題では手がかり刺激から1st. BPまでの識別期に活動が増加するものが殆んどであった。しかし、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し BP 中も持続的に増加を示すのに（図 A）、緑の回避課題では BP 中に発射頻度の減少を示すような（図 B）異なるパターンの細胞活動も一部記録された。このようなサルに左右で異なる手がかり刺激を同時に与えると約90%の確率で回避条件活動が優先して現れた。しかし数例では、手がかり刺激の直後に数回の反復 BP を行って（摂食行動）、急な持続的 BP（回避行動）への切り換えがみられた（図 C）。この例では左眼に緑、右眼に赤色光を与えた。この時の OBF 細胞活動を観察すると、初めに摂食行動時と同様の活動性の増加が約 2 秒間続いてから回避行動時と同様の活動性低下に変化し、直ちに条件行動上でも変化が現れている。即ち回避行動では持続 BP 開始前から OBF 細胞活動の抑制があり、赤緑同時呈示の時には摂食行動時の興奮が抑制されることにより回避行動の発現がトリガーされることも考えられる。以上から、OBF 細胞の一部は手がかり刺激の弁別と意志決定に関連して条件行動の発現に何らかの形で関与しているものと推論した。

*前回報告：石川友衛，古賀知行，宮澤多恵子他 3 名：岡崎国立共同研究機構生理学研究所年報（第 5 巻）：223—225，1984

成長ホルモン分泌抑制に関与する扁桃核一視床下部系

加藤昌克，鈴木光雄（群馬大・内分泌研），大村 裕（生理研）

下垂体前葉からの成長ホルモン（GH）分泌は二つの視床下部ペプチド，GH 分泌促進因子（GRF）とソマトスタチン（SRIF）によって制御されている。GRF は促進的に，SRIF は抑制的に働く。GH 分泌抑制に関与する SRIF ニューロンの細胞体は視床下部室周核に局在し，正中隆起に投射している。ネンブータル麻酔下のラットでヒト臍臓腫瘍由来の GRF (hp GRF) を静注すると血中 GH は図 1 黒丸のように 10 分で前値（20ng/ml）から頂値（760ng/ml）に達し，その後漸次減少する分泌型を示した。この hp GRF に対する反応は終板器官および視床下部の室周核，腹内側核，外側野，腹側前乳頭体核の電気刺激で各々抑制された（Kato et al, 1985）。同様に内側扁桃核の刺激も hp GRF に対する反応を抑えた（図 1）。この抑制は SRIF ニューロンの局在する室周核を破壊したラットではみられなかった。また分界条を破壊したラットにおいても刺激は無効であった。以上のことから，内側扁桃核の刺激は分界条を介して室周核の SRIF ニューロンを活性化し，その結果，下垂体門脈に SRIF が放出され，GH 分泌の抑制がおこったと考えられる。上記の可能性を検証する目的で，内側扁桃核に西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）を電気泳動で注入し，その順向性輸送を Mesulam の TMB 法で観察した。図 2 は内側扁桃核の HRP 注入部位である。図 3，4 の矢印は HRP 陽性線維を示す。HRP 陽性線維は分界条を介して視床下部に入り前視床下部と腹内側核，腹側前乳頭体核に投射するのがみられた。これらの HRP 陽性線維が室周核の SRIF ニューロンとシナプス結合しているのかが問題となるが，その点は

SRIF の免疫電顕法を導入して、今後明らかにしていきたい。

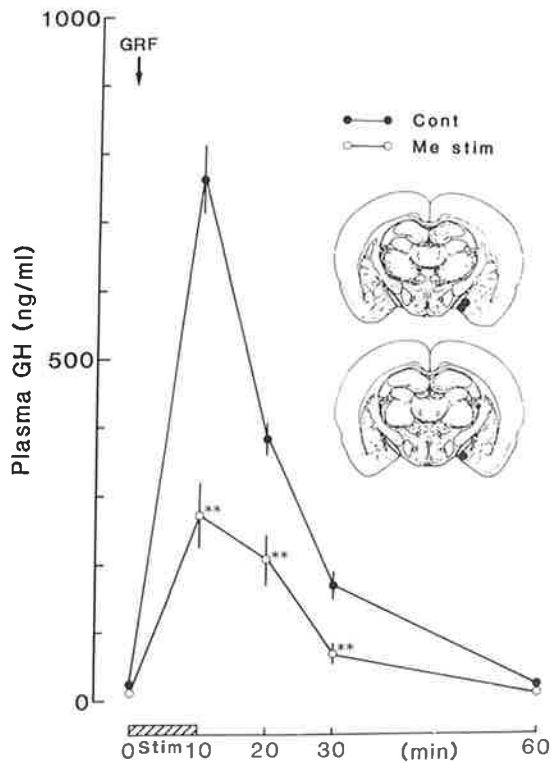


図1. hp GRF ($10 \mu\text{g}/0.3\text{ml}$ 生食) 静注に対する血中GHの反応と内側扁桃核刺激によるその抑制。



図3. 分界条 (ST) に観察される HRP 陽性線維 (矢印)。HIPP: 海馬

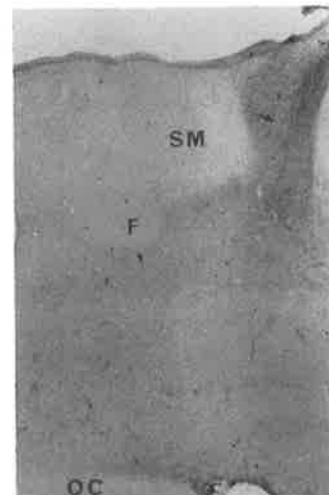


図4. 分界条と視床下部に観察される HRP 陽性線維。SM: 視床髓条。下: 脳弓, OC: 視交叉

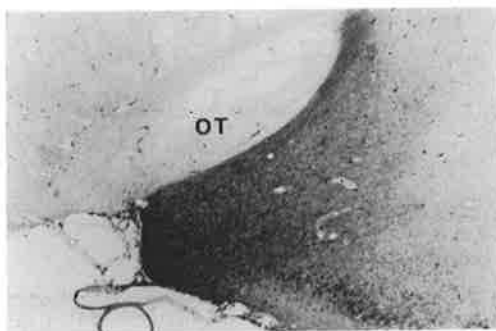


図2. 内側扁桃核の HRP 注入部位。ラット脳前額断面: 図左, 内側; 右, 外側; 上, 背側; 下, 腹側 (図3, 4も同じ)。OT: 視索。

〔文献〕

Kato, M., M. Suzuki, and T. Kakegawa: *Endocrinology*, 116: 382-388 (1985)

単一 Cl^- チャネルレベルにおける GABA 作用の増強メカニズム

赤池紀生, 猪俣則夫, 小山純正, Carlos P. Salaman (九大・医)

Puthuraya K. P. (バンガロー医大), 大村 裕, 粟生修司 (生理研)

〔方法〕

ウシガエル後根神経節より単離した知覚神経細胞体を吸引電極法によって Na^+ , K^+ , Ca^{2+} 無し榮

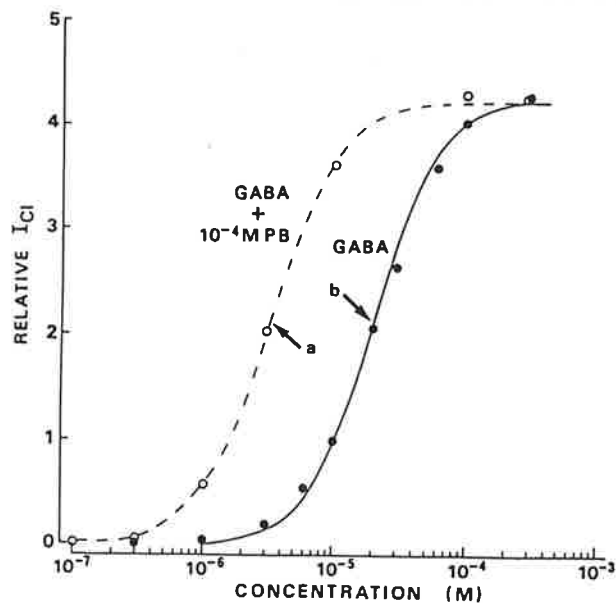


図 1.

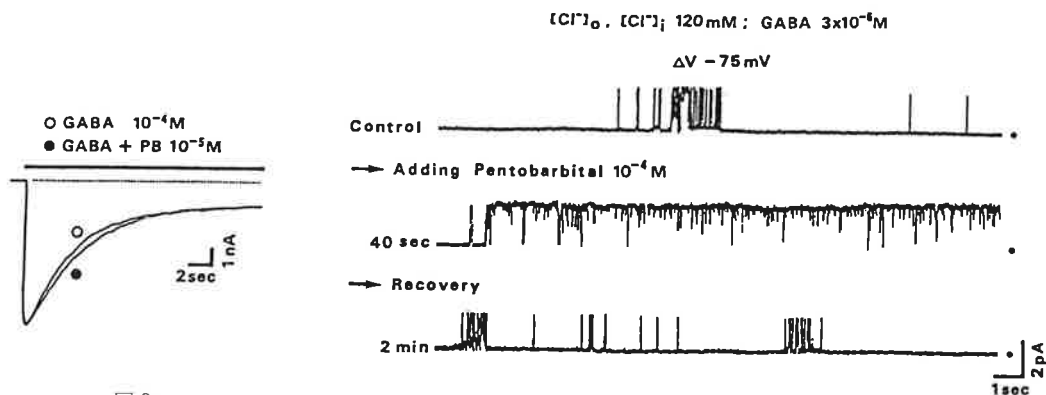


図 2.

図 3.

養液にて細胞内外を灌流し、GABAによってCl電流 (I_{Cl}) のみが惹起されるようにした。引き続き、‘concentration clamp’法にてニューロン周囲の外液をGABA単独液、またはpentobarbital(PB)やdiazepam(DZP)の一つとGABAを含む液と瞬時に交換し、GABA単独下の I_{Cl} 立上がりや脱感作時の時定数(それぞれ τ_m と τ_h)がPB又はDZPの存在下にいかに変化するかを検討した。また微視的にはパッチ・クランプ法にてパッチ電極内液交換を行い、GABAで惹起される単一Cl⁻チャネル電流(i_{Cl})のopenならびにclosed timeがPBやDZPによっていかに変化するかも合わせて実験を行った。

〔結果〕

10⁻⁵M GABAでの I_{Cl} のピーク電流値を1としたときのGABA単独およびGABA+PBの用量反応曲線において、PBはGABA最大反応値を変化させることなく、用量反応曲線を左方へ移行した(図1)。また、10⁻⁵M GABA単独とGABA+10⁻⁴M PBで起こされた I_{Cl} を‘concentration clamp’法’を使用して比較すると、PB存在下において I_{Cl} の増強と脱感作の緩徐化が特に注目された(図2)。そしてPBによるmacroscopic I_{Cl} の増大と脱感作の緩徐化は単一Clイオンチャネル電流のopen timeの延長とclosed timeの短縮によることがパッチ・クランプ法による解析から明らかになった(図3)。DZPによるGABA用量反応曲線も左方へ移行を示す。PBによる増強と同じようにGABA単独による最大反応値を変化することはない。DZPによる増強はPBのそれに比較して軽度である。興味あることには、DZPはGABA単独最大反応の脱感作(不活性化)を促進する。他方図2に示したようにPBはそれを抑制する。このようなKinetics上でのちがいも、PB又はDZPによるGABA作用増強率のちがいとして反映されるのかもしれない。なお単一Clチャネル電流のopen timeの増大についても、DZPの効果はPBよりも著しく弱い。

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

一 視束前野温度感受性ニューロンの非温熱刺激応答 一

堀 哲郎, 清原寿一, 柴田政章(佐賀医大)

大村 裕, 西野仁雄, 栗生修司(生理研)

従来の生理研共同研究において、サルの前頭眼窩野(OBF)及び視束前野(POA)ニューロンが体温調節行動発現の動機づけ及び報酬認知に重要な役割を果たしている事を明らかにした。魚類から哺乳類のPOAには、局所視床下部温に直接反応する温度感受性ニューロンが存在する事が判明している。昨年度の共同研究では、サル体温調節行動中のPOAニューロン活動の動態を解析した。その際、POAニューロンの環境温反応性の有無を確認したが、局所視床下部温(Thyp)反応性を調べていない。POA温度(Thyp)感受性ニューロンは体温調節中枢機構の中心であるが、サルについては未だ記録されていない。本年度は、無麻酔サルのPOA温度感受性ニューロンの基

本的性質，特に非温熱刺激や非温熱行動に対する反応性を調べた。

ニホンザルの一側のPOAにサーモド管2本とThyp測定用熱電対を入れるステンレス管を麻醉下で慢性埋込みし，1週間後より実験に供した。ガラス絶縁タングステン微小電極をPOAに刺入し，ニューロンの単一活動を記録した。電極の位置は刺入トラックの最深部で2方向から撮影したレントゲン写真により毎回確認した。

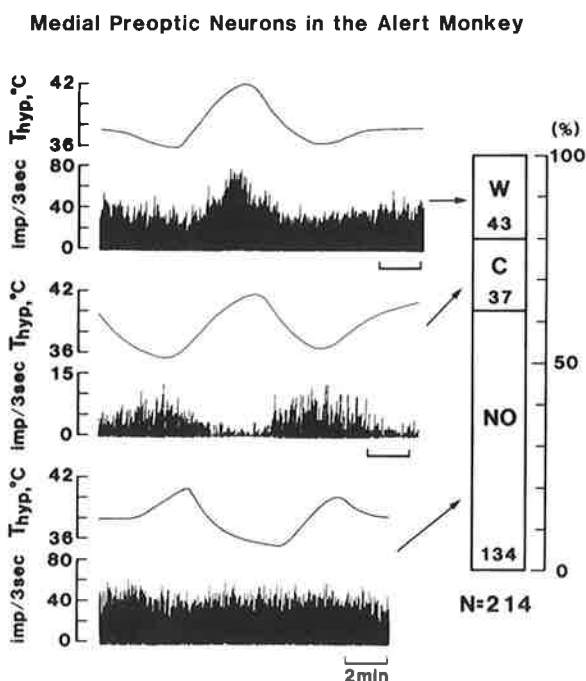


図1. 無麻醉サル内側視床前野ニューロンの視床下部温応答。

Thyp, 視床下部温. W, 温ニューロン.

C, 冷ニューロン. NO, 非温度ニューロン.

合計214個のPOAニューロンについてThyp変化(33—41℃)に対する反応性を調べた。そのうち，43個(20.1%)が温度上昇により活動増加を示す温ユニット，37個(17.3%)が逆の反応をする冷ユニットであった。温度感受性や38℃における放電頻度などの基本的性質は麻醉下の他種の動物のPOAニューロンのそれと大差はないが，冷ユニットの数が少し多い事と様々の非温熱性刺激やサルの行動や情動変化などにより影響を受け易い事が特徴的であった。そこで，POA温度ニューロンの非温熱性刺激に対する反応性を更に検討してみた。シリンジに入れたジュース，食塩水，水道水や食物片，Air puffer，玩具ヘビなどを提示したり与えるなどのclinical testを行なった。その結果は次の通りである。①温・冷ニューロンの54%が上記の情動刺激のいずれかの提示に反応したが，非温度ニューロンでは26.9%しか反応しなかった。②ジュ-

スや食塩水の入ったシリンジをサルの口に近づけてやり、サルがこれをなめようと口を開け舌を突き出す時あるいは食物片を指でつかまえる時に対応して活動抑制を示す反応が温・冷ニューロンの60%、非温度ニューロンの43%にみられた。上記の運動が起こる時に必ず反応がみられたが、飽満状態などでサルの意欲が低下したと思われる時は反応が減弱し、運動が起こってもニューロン反応が全く消失する事も見られた。③報酬性刺激と嫌悪性刺激とに分けてみると、それらの提示や口内へ入った時のニューロン活動は両種刺激で同方向に変化し、両者に対し、識別に反応するものは少なかった。この様に、POA温度ニューロン活動は情動状態により影響をよく受ける事から、体温調節行動動機づけ発現の基盤を形成しているとともに、情動性自律反応の賦活にも関与があると想像される。

大腸運動に対するエンケファリンの役割

横山正松（福島医大）、尾崎 毅（生理研）

腸管の蠕動発現時におけるエンケファリンの役割を調べる目的で次の様な実験を行なった。

モルモットの大腸及び小腸を、約6cmの長さで剔出し、その一端にクレブス液を満した昇圧ビンを接続し、腸管内圧を上昇させて蠕動を生ぜしめた。生じた蠕動運動は、圧トランスデューサーを介して継続時間、圧の大きさなどを記録し、各種の薬物による影響について検討した。その結果、次のようなことが解った。(1)内圧の上昇によって生ずる蠕動は、内圧を一定にしておくと、腸管の部位に依存する継続時間の後停止する。すなわち、十二指腸、空腸では短く、回腸と大腸では長い。(2)蠕動発現時に、メチオニンエンケファリン (10^{-8} Mol) を投与すると、すべての例で蠕動は停止する。また、予め投与しておくと、蠕動を起こす内圧の閾値が上がる。(3)サブスタンス P (2×10^{-9} Mol) は、蠕動を起す内圧の閾値を下げる。エンケファリンによって停止した蠕動は、サブスタンス P の投与によって回復する。(4)ナロクソン (10^{-7} Mol) を投与すると、蠕動継続時間はすべての例で延長する。延長の程度は、十二指腸、空腸、回腸、大腸の順に大きくなる。

上述の成績は、大腸、小腸の蠕動がエンケファリンによって抑制されることを示している。近年、免疫組織化学的手法を用いた観察により、エンケファリン含有神経細胞が腸管の壁内神経系に多数存在し、その神経線維は主に輪走筋に分布することが示されている。蠕動は、輪走筋、縦走筋が協調して収縮と弛緩をくり返す一連の局所反射であり、壁内神経系中の種々のニューロンが介在する。エンケファリンは、これらのニューロンの活動のどこかに作用して蠕動を抑制するものと考えられ、その一つとしてサブスタンス P の遊離の抑制があり得ると考えている。

ラットの先天性無神経節腸管の発生機序について

沖 充, 堂本時夫, 権田辰夫 (島根医科大学)

亘 弘, 尾崎 毅, 矢内原昇 (生理研)

本研究で用いた Hirschsprung 病のモデルラットは, 腸管の無神経節部に一致して, 狭小化がみられる。今回は, この腸管狭小化を起こさせる因子, またはその関係因子を明らかにする目的で, 狭小部腸管の形態計測学的解析を試みた。

〔材料と方法〕 先天性無神経節腸管ラット (生後20日と28日齢) と, その同腹の正常腸管ラット各10匹を用いた。動物を pentobarbital (50mg/kg; i. p.) で麻酔し, 左心室より Zamboni 固定液または2.5% glutaraldehyde 液で灌流後, 結腸と直腸を摘出し, パラフィンまたは spurr に包埋した。形態計測は, 厚さ 5 μ m の横断切片について, 最終倍率72倍の光顕写真を作製し, 画像解析装置 (Meiwa; MA-Ⅲ) を用いて腸管の内腔, 粘膜, 粘膜下層, 筋層などの断面積を測定した。両筋層の厚みは90°ごとに4ヶ所で測定し, その平均値を求めた。平滑筋細胞の断面積は, 核レベルで横断された筋細胞の電顕写真を作製し, 最終倍率12,000倍に拡大し, 測定をおこなった。

Table 1.

Morphometric analysis of Rectum and Colon
in Normal and Aganglioneosis rat

		Cross sectional area ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)		
		Whole layer (A)	Muscle layers (CM+LM) (B)	Mucosa and submucosa (C)
Rectum	Normal	3,731	1,133	1,964
	Aganglioneosis	2,207	299	577
Colon	Normal	5,527	711	2,542
	Aganglioneosis	2,651	237	1,199

Table 2.

Morphometric analysis of Rectum and Colon in Normal and Aganglioneosis rat

		Thickness of muscle layers (μm)		Cross sectional area of circular muscle cells (μm^2)	Number of muscle cell layer		Number of nerve terminals and blood capillaries (per 25 μm square grid)	
		CM	LM		CM	LM	nerve	capillary
Rectum	Normal	128	36	18.7	25-35	7-10	4.9	0.56
	Aganglioneosis	48	21	16.0	15-23	5-8	0.26	0.27
Colon	Normal	49	22	14.5	16-23	4-8	3.07	0.31
	Aganglioneosis	37	15	12.9	14-20	3-6	0.08	0.15

【結果と考察】 無神経節腸管ラットは、同腹の正常ラットと比べると、37～46%の体重の低下がみられた。この両者の直腸と結腸から得た形態計測値を表1と2に示す。無神経節群の直腸と結腸では、筋層、粘膜、粘膜下層の断面積に著しい減少がみられた。また輪筋層と縦筋層の厚みも減少していて、特に直腸の輪筋層では著しい(表2)。筋層を形成する平滑筋細胞の層数も両筋層で減少しているが、これも直腸に著しい。輪筋層を形成する平滑筋細胞の断面積も減少している。神経節が皆無であっても、直腸の筋層内には神経終末を認めることがある。多くは単一軸索のvaricosityであって、これを取り巻くシュワン細胞を欠き、浮腫状に膨化し、小型無顆粒小胞や大型顆粒小胞が稀に認められる。骨盤神経叢又は仙髄由来の外來性神経の終末であろう。結腸の筋層内には神経終末が認められない。筋層内の毛細血管の分布密度は正常群に比べると半減している。また、内皮細胞の著しい肥厚と内腔の狭小化がみられる。毛細血管を含まない区域(mesh-grid)には壊死像を呈する平滑筋細胞が多い。しかし、その比率は全細胞の1%に満たない。筋層では有糸分裂期の細胞も散見されるが、結合組織の増生は認めがたい。以上の知見から、無神経節腸管では、胚子期において神経節の無形成のために筋層の形成不全が起きたものと考えられる。輪筋層が分化するためには、神経組織の存在が必要なのであろう¹⁾。出生後の細胞死は微小循環障害が成因としてあげられる。筋には細胞浮腫も散見された。筋の興奮性や興奮伝播性の低下が考えられる。外來神経線維の種類と分布については既に報告した²⁾。

1) 沖 充. 他 自律神経13:235 (1976).

2) 権田辰夫. 他 日本平滑筋学会雑誌19:351 (1983).

【 研 究 会 報 告 】

研究会報告

〔目 次〕

光受容と視覚情報処理に関する総合的研究（代表者：森 滋夫） （昭和59年 8 月 9 日～ 8 月11日）	219
最近の生理学の進歩と高血圧症の解明（代表者：入来正躬） （昭和59年 8 月17日～ 8 月18日）	222
Intercellular Junction 細胞間接合部の通路（代表者：菅野義信） （昭和59年 9 月 3 日～ 9 月 4 日）	227
発声と音声認識の比較生理学（代表者：斉藤 望） （昭和59年 9 月 4 日～ 9 月 5 日）	241
正常及び病態下での心筋の伝導機構に関する研究会（代表者：平岡昌和） （昭和59年10月 4 日～10月 5 日）	247
睡眠促進物質研究会（代表者：井上昌次郎） （昭和59年10月25日～10月26日）	260
各種臓器におけるブドウ糖分子受容識別機構と生理機能発現に関する研究 （代表者：仁木 厚）（昭和59年12月 1 日）	262
蛋白質の性質，生体膜および細胞の機能（代表者：北里 宏） （昭和59年12月21日～12月22日）	275
感覚・知覚の神経機構（代表者：岩村吉晃） （昭和60年 2 月 8 日～ 2 月 9 日）	296
生理学における数学的方法（代表者：磯本昭夫） （昭和60年 2 月22日～ 2 月23日）	300
筋収縮の基本的機構（代表者：山田和宏） The 10th Seiriken Conference on "Advances in Nerve, Synapse, and Muscle Physiology" （代表者：山岸俊一） （昭和60年 3 月 9 日～ 3 月10日）	328
〔セミナー報告〕 EHRINBIRG, Anders 他	333

『光受容と視覚情報処理に関する総合的研究』

ー現象からメカニズムへ

昭和59年 8 月 9 日～8 月11日

カエル網膜視物質の分布およびA 2 視物質変動メカニズム	鈴木龍夫（兵庫医大）
視物質の退色中間体について	東 真美（大阪教大）・東 克（大阪医大）
視細胞外節における cGMP の生理機能	篠沢隆雄（京大・理）
視細胞光感度調節の分子機構（c-GMP 代謝系の役割）	河村 悟，村上元彦（慶応大・医）
視細胞 off 応答について	安藤啓司（神戸大・医）
生物情報現象の物質的基礎と視細胞における Synhymenosis	塚本吉彦（兵庫医大）
光を用いた電位固定法による水平細胞の DC 分光感度測定	山田雅弘（電総研）・安井湘三（基生研）
カメ網膜視細胞の色光感度と形態	大塚輝彌（生理研）
カメ視細胞の GABA感受性	立花政夫（生理研）
単離水平細胞より抽出された膜イオン電流成分に基づく	
水平細胞応答の再構成	池野秀利，村瀬一之，臼井支朗（豊橋技科大）
キンギョ網膜より単離・培養した双極細胞の膜電流	金子章道（生理研）
取り込みおよび放出を指標とした網膜神経伝達候補物質の検索について	加藤 聖（金沢大）
コイ網膜双極細胞の電気生理学的性質	斉藤建彦（聖マリアンナ医大）
アマクリン細胞の応答特性：特にスペクトル応答を中心にして	橋本葉子（東京女子医大）
ナマズのアマクリン細胞	桜永昌徳（日本医大），中 研一（基生研）
光感受性松果体とサーカディアンリズム	田畑満生（名大・農）
網膜の神経素子の形態と機能との相関について	斉藤秀昭（NHK 基礎研）
硬骨魚類における視覚系の形態学	伊藤博信（大阪大・医）
細胞内記録によるカエル視蓋ニューロンの光応答の解析	松本修文（大阪大・基礎工）
鯉の背光反射行動に関する神経機構	森 滋夫（名大・環研）

目 的

我が国の視覚研究は、先達の活躍と新進気鋭の研究者の輩出によって国際的に高いレベルを保持している。最近、視覚研究が現象記載の積み重ねの段階から機能解明の段階に入りつつあることを反映して、工学系の分野からの関心が高まり、新しい展開が期待される。しかし一方、受容器官である網膜自身において、現在なお、いくつかの基本的問題が未解決のままであり、新しい研究方法の導入や、新しい観点からの研究推進による早期解決が希求されている。そこで今回、これらの問題の中から、① 視細胞における光化学的興奮過程と電位発現の関連、② 視細胞

胞—水平細胞—双極細胞の相互干渉の機能的意義, ③ アマクリン細胞の機能的役割, に焦点をあてるとともに, 中枢機能および視覚的行動への結びつきをも考慮した総合的研究会を企画した。研究会では, 比較的低位の動物を対象をしぼり, 自らの分野に一領域を確立しつつある研究者が, 形態学, 生化学, 生理学, 行動学の広い分野から最新の研究を報告し, 問題点を提起し合って討論を深め, 相互の研究の接点, 不連続点を確かめると同時に共同研究の可能性を探ることを目的とした。

成 果

発表は, 目的に沿って4つのセッションに分けて行った。各セッションの内容は以下の通りである。なお, この“プログラム”及び“発表のレジメ”を付し本冊子とした。

セッション1: A_1 , A_2 視物質の網膜内分布状態とこれを変化させる環境要因, メタロドプシンⅢ生成・分解における問題点, サイクリック GMP 分解に関する最近の知見および電位発現機構との関連, 視細胞順応に伴う緩電位変化のイオン機構, ならびにこれらの情報の数理的解析一般化に関する基本的概念, 等について討論が深められた。

セッション2: 視細胞とその2次ニューロンである双極細胞, 水平細胞との結合様式を機能的に調べるための新しい手法として, 2次ニューロンの光による細胞電位固定法, 油滴をもつ視細胞の形態学的特徴と色光応答対比による分類とこれを利用した2次ニューロンとの結合様式の解析法, さらに単離・培養細胞を用いた膜の電気的特性, 薬物感受性に関する最新の知見など, 最先端の研究の紹介があり, 今後の研究の動向や単離細胞を利用した研究の将来像などについて熱い討論がかわされた。

セッション3: 難門とされている, 網膜内神経伝達物質, ON型, OFF型双極細胞興奮のイオン機構, アマクリン細胞の応答様式について最近の研究が紹介された。それぞれ長年築きあげられてきた最高の手技をもって解析が進められているにもかかわらず, なお混迷の色合いが濃く, 研究者のため息を感じるセッションであった。

セッション4: 網膜外光感受性器官である松果体の光受容伝達様式とこの器官の機能的役割について, 硬骨魚の視覚系中枢投射に関する最近の形態学的知見および魚の光依存性行動に関する中枢神経機構について, 視覚行動発現に関する視蓋ニューロン応答の様式について, さらに哺乳類における網膜の光信号→神経インパルス信号までの変換様式を概括し, より低位の動物の視覚系と比較するなど, 中枢側から網膜研究との接点を求める形で意見がかわされた。

反 省

3日間にわたる研究会の討論と反省の中で出された興味ある意見を以下にまとめ, 今後の参考とした。

1. 今回のように広い分野からの参加による研究会は, 自分の研究を位置づける意味において非常に有意義であり, 今後もこのような企画を望みたい。

2. 最近のエレクトロニクスの技術進歩の中には網膜研究に有用と考えられるものはいくつかあり、これを研究会に組み込んだらよい。
3. 網膜研究をさらに発展させるためには、例えば免疫化学などの最新技術の導入を推進する必要がある。
4. 網膜の組織培養技術をもっと高めるべきである。
5. 網膜研究の対象となっている被験動物は偏りすぎており、将来、中枢神経系への結びつきを考えると不利である。
6. 今回のような研究会は、若手研究者への教育的一面をもっと強調した方がよい。

『最近の生理学の進歩と高血圧症の解明』

昭和59年8月17日～8月18日

(進行) 星 猛	
病態モデルについての考え方	松下 広 (和歌山県立医大)
(進行) 入来正躬	
高血圧症の成因における神経血管性因子	増山善明 (和歌山県立医大)
(進行) 本田西男	
Arterial Baroreceptor Denervation と長期的血圧調節	熊田 衛 (筑波大・基礎医学系)
Angiotensin II, Propranolol と血圧反射	入来正躬 (山梨医大)
(進行) 熊田 衛	
腎と高血圧	本田西男 (浜松医大)
(進行) 入沢 宏	
無麻酔時の血圧調節	二宮石雄 (循環器病センター)

研究会参加者

入来 正躬	山梨医科大学・教授
入沢 宏	生理学研究所・教授
大村 裕	九州大学医学部・教授
熊田 衛	筑波大学基礎医学系・教授
鈴木 泰三	東北労災病院・院長
菅 弘之	国立循環器病センター・部長
中馬 一郎	大阪大学医学部・教授
富田 忠雄	名古屋大学医学部・教授
二宮 石雄	国立循環器病センター・部長
福原 武彦	慈恵会医科大学・教授
星 猛	東京大学医学部・教授
本田 西男	浜松医科大学・教授
本田 良行	千葉大学医学部・教授
増山 善明	和歌山県立医科大学・教授
真島 英信	順天堂大学医学部・教授
松下 広	和歌山県立医科大学・教授

研究会の目的

本研究会は本年度で3回目を迎える。

昭和57年度に「正常および異常時における生体調節機能」の研究会を開き、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検討が行われた。病態生理の基本的事項、医学教育における病態生理教育のあり方、および病態生理の共同研究のあり方などが討議された。

昭和58年度は「最近の生理学の進歩とpatho physiological conditionsの解明」の研究会を開き、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り、これがまた生理学の学説にどのように貢献しているかについて検討が行われた。さらに病態生理学の教育に役立てるために、case study of medical physiologyを翻訳して出版し、教材として提供することとした。

これらの成果をもととし、本昭和59年度は、①病態生理研究における病態モデルを用いての研究の役割について検討し、さらに②種々のpathological conditionsの中から高血圧をモデルとしてえらび、臨床医学研究者とともに、その病態生理について討論することを目的として本研究会を開催した。主な話題について、話題提供60分、討論30～60分となるように企画し、病態生理の立場から充分に検討されるようにした。

病態モデルについての考え方

松下 広（和歌山県立医大）

1. 日本における疾患モデル動物の現況を紹介した。(Exp. Anim. 33 (3), 369-397, 1984).
2. マウスを用いての病態モデルの世界における歴史と現況について紹介した。
3. マウス病態モデルの一つ、肥満・糖尿病モデルマウスの病態の特徴についてのべた。Parabioseなど液性因子の作用が重要であろう。
4. マウス病態モデルの一つ、筋ジストロフィー症モデルマウスの病態の特徴についてのべた。膜を構成するproteaseの異常が特徴的である。protease inhibitorの一つForphenicnolは発症を抑制し、さらに遺伝子の発現因子にも作用する。
5. 新しい病態モデルの作成・発見法とその困難点について、また病態モデルの遺伝子バンク、胎児バンクの有用性について紹介された。特にマウスで高血圧病態モデルが作れないことに興味がもたれた。

高血圧症の成因における神経血管性因子

増山善明（和歌山県立医大）

1. 高血圧症におけるrenin-angiotensin系、catecholamineなど液性因子と、自律神経の神経性因子の関与について概観した。高血圧症は、高血圧発症の初期と高血圧持続の持続期でその病態が

異なる。

2. 高血圧症におけるノルアドレナリン Nad 系の関与につき, Nad とその代謝産物(DOPEG と DOMA など)の血中濃度を測定して検討した。Nad と DOPEG は初期に高値を示す。しかし持続期には健常値に戻り, 何らかの代償機序が働いているものと考えられる。

3. 末梢神経刺激および外因性 Nad に対する神経平滑筋の応答を, 腸間膜動脈一支配神経標本を用い, 標本の昇圧反応と Nad-overflow を指標として検討した。例えば Goldblatt 型慢性高血圧動物では神経末端からの Nad 放出が低下する。そのほか Ca^{++} や種々の庶断剤の作用も検討した。高血圧症で末梢因子の関与するものがある。

Arterial Baroreceptor Denervation と長期的血圧調節

熊田 衛 (筑波大・基礎医学系)

1. 高血圧における中枢神経の役割りについて考察する。
2. 頸動脈洞神経と大動脈神経の除神経後血圧は一時的に上昇する。その後慢性的に上昇しつづけるとの報告が多いが, 近年上昇が続かずもとの戻るとの報告が出始めている。我々の自由運動下家兎で血圧を連続記録して行った実験では除神経後の血圧上昇は持続しない。
3. 自由運動下の血圧は, 拘束または麻酔下での血圧より変動が大きい。血圧の頻度分布は安静時と体動時の二峰性となる。
4. 除神経後の血圧変動の特徴につき, 体動時や日変動など紹介した。
5. これらの結果は, 中枢神経系は高血圧の発生に関与する; しかし高血圧の維持には関与せず, 維持には腎, 体液系が重要であるとの Guyton の説を支持する。
6. 高血圧動物の血圧反射の異常は, ①受容器と②中枢での resetting によると考えられる。

Angiotensin II, Propranolol と Baroreflex

入来正躬 (山梨医大)

1. 無麻酔家兎の血圧反射の基準血圧と利得・反応幅を, 腎交感神経—平均血圧曲線を用いて解析した。
2. Angiotensin II 持続注入による血圧上昇時には, 基準血圧は高血圧側に移動し, 利得・反応幅は有意に減少する。
3. Propranolol 持続注入による血圧低下時には, 基準血圧は低血圧側に移動する。しかし利得・反応幅に有意な変化は認められない。
4. 両物質の血圧反射経路への作用機序について考察した。

腎と高血圧

本田西男（浜松医大）

1. 高血圧症における腎の役割についての考え方を歴史的に概観した。
2. 腎性高血圧症は腎血管性と腎実質性に大別される。ここでは腎血管性高血圧症についてのべた。
3. 腎血管狭窄による腎血管性高血圧症は、実験的に一側腎動脈をクリップを用いて狭窄した Goldblatt 法によりえられる。腎血管狭窄による血圧上昇には Renin-angiotensin が関与する。その後の上昇血圧維持には Nad も関与する。その後に Na 貯蓄が関与する時機が来る。
4. 腎血管性高血圧症に関与する液性因子として、renin-angiotensin, カテコラミン以外の vasopressin, PG, Kinin 及び関連する因子について紹介し、討議された。
5. 単一ネフロン、特にメサンジウムに対する液性因子の作用についての最近の結果について紹介した。

無麻酔時の血圧調節

二宮石雄（循環器病センター）

1. 自律神経系を除神経したときの血圧は約60 mmHgである。立位にするとさらに低下し血圧は維持されない。したがって、血圧を約100 mmHg に維持しており、立位でこれが変わらないように維持しているのは自律神経系の作用による。
2. 起立による応答の無麻酔下と麻酔下の相異：麻酔下では血圧の変動が大きい。血圧上昇時には血圧反射による心拍数減少と腎交感神経活動性低下がおこる。
無麻酔下では血圧の変動が少ない。血圧上昇に心拍数増加（ヒト）と腎交感神経活動性増加（猫）がともなう。これは血圧反射によるものでなく、高位中枢の作用による。
3. 無麻酔下での交感神経活動性変化はより細く調節されており、時々刻々変化する。
4. 腎血管と兎耳血管の除神経による血管径変化をX線を用いて直接測定し、各血管の部位における神経支配の強さを比較した。

成果のまとめ

- ① 病態モデルを用いての生理学的研究は、病態の機序に関する研究とともに、生理学の基本法則の研究にも有益であろう。研究の目的に役立つ病態モデルの開発と維持が望まれる。
- ② 高血圧症の発症と維持に多様な神経性因子、液性因子、末梢因子の関与することが明らかに

された。これらの因子は正常の血圧維持の因子でもあり、血圧調節機構についての生理学研究の進歩と、高血圧症に関する研究の進歩とは相補的なものであろう。この研究において、次の点の研究の重要性が強調された。

方法について

1. 無麻酔，無拘束の自由運動下動物を用いる。
2. 血圧，交感神経活動など生理学的指標の連続記録。
3. 液性因子の微量定量法の確立。
4. 刺激または負荷の標準化，とくにヒトとの関連。(起立，運動，頸部圧変動，下半身圧変動などの方法についての検討)

目 的

5. 神経性，液性，末梢性因子の各因子の作用機序の解明。
6. 上記各因子の高血圧発症と維持における生理的役割りの度合い。
7. 各種実験的高血圧モデル動物の比較。よりよい高血圧症モデルの開発。とくに人の高血圧症との対比の視点より。
8. 高血圧症の種類と期の適切な分類。

以上のように本研究会において、高血圧症についての研究の現状とともに、今後望まれている研究方向を理解することが出来た。これらの研究領域は、生理学者が大きな役割を果しうる領域であり、今後の生理学の研究の進展が期待される。

『Intercellular Junction 細胞間接合部の通路』

昭和59年 9 月 3 日～9 月 4 日

MORPHOLOGICAL CHANGES OF CELL JUNCTIONS DURING AMPHIBIAN EMBRYOGENESIS.

Mi-Pai Tseng

Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica

ELECTRICAL COUPLING IN EARLY EMBRYONIC CHICK HEART MONITORED BY MULTIPLE-SITE OPTICAL RECORDING OF ACTION POTENTIALS.

Toshihiko Yada

Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

EFFECT OF CHELATING AGENTS ON ASSOCIATION OF ZAJDELA ASCITIC HEPATOMA CELLS.

P. D. Gupta

Centre for cellular & Molecular Biology, Hyderabad, India

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS ON JUNCTIONAL COMPLEXES OF SERTOLI CELLS.

Toshio Nagano

Chiba University, Chiba, Japan

GAP JUNCTION BETWEEN VISUAL CELLS IN THE SQUIRREL RETINA.

Shingo Hara

Fukuoka University, Fukuoka, Japan

GAP JUNCTION OF HORIZONTAL CELL IN THE CARP RETINA: ACCESS BY THE COMPLEMENTARY REPLICATION.

Akira Tonosaki

Yamagata University, Yamagata, Japan

MODULATION OF INTERCELLULAR COMMUNICATION BETWEEN HORIZONTAL CELLS BY DOPAMINE AND CYCLIC AMP IN THE FISH RETINA.

Koroku Negishi

Kanazawa University, Kanazawa, Japan

JUNCTIONS BETWEEN LENS FIBER CELLS ANALYSIS WITH MONOCLONAL ANTIBODIES.

Ross G. Johnson

University of Minnesota, Minnesota, U. S. A.

POSSIBLE ROLE OF BLOCKED GAP-JUNCTIONAL COMMUNICATION IN TUMOR PROMOTION.

Hiroshi Yamasaki

Centre International de Recherche sur le Cancer Lyon, France

INHIBITION OF GAP JUNCTIONAL COMMUNICATION BY PHORBOL ESTERS: STUDIES ON MECHANISM.

A. W. Murray

The Flinders University of South Australia, Adelaide, Australia

MORPHOLOGICAL CHANGES OF CELL JUNCTIONS DURING AMPHIBIAN EMBRYOGENESIS

Tseng Mi-pai (Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica)

We started our works on the changes of cell junctions during embryogenesis of *Cynops orientalis* with the ectoderm cells of early gastrula. Observations of the freeze-etching replicas showed that they were provided with well developed tight junctions at the apical borders. Gap junctions appeared beneath the tight junctions, and according to the arrangement of the connexons probably they were not in the functional state. By observations of ultra-thin sections, desmosomes, the basal elements of the junctional complex commonly found in the adult epithelial cells were not found in the early as well as in mid-gastrula. It was in the neurula well developed desmosomes appeared in the ventral epithelial cells.

As it is well known that ectoderm cells of early gastrula are undergoing active morphogenetic movements and they should be well coordinated. Desmosomes are commonly considered as sites of cell-to-cell adhesion and are responsible for holding cells together, but well developed desmosomes appear only after gastrulation. Very probably during gastrulation tight junctions of the ectoderm cells not only act as permeability barriers between the external environment and the intercellular spaces but also play important role in maintaining the cohesiveness of the ectoderm cells to move coordinately in the morphogenetic movements.

In order to follow the developmental fates of the cell junctions and to find out how the cells are coordinated during late gastrulation and neurulation, observations of freeze-etching replicas of presumptive neuroepithelial cells and neuroepithelial cells were carried out. From yolk plug stage to the closure of neural tube, six stages were chosen. To ensure the cells

fractured and observed were only from neuroepithelium, material to be used was isolated microsurgically from living intact embryos and fixed.

The persistent occurrence of both tight and gap junctions were observed in the presumptive neuroepithelial and neuroepithelial cells during the entire process of neurulation, and both of them were undergoing active dynamic changes. As for the tight junctions, the degree of tightness of the sealing strands varied, not only in number but also in arrangement. Such variations usually occurred at different portions of a single cell. The changes of gap junctions might be seen from the variations of their sizes and the presence of scattered particles around the junctions. It seemed that assembly and disassembly of the connexons with which the junctions were consisted took place continuously.

Just as in case of gastrulation, it might be the tight junctions which ensure the coordination of the individual cells of the neural plate to move as a whole during the process of the closure of neural tube.

What we have found about gap junctions of epithelial cells of older embryos during impulse conductivity offer an example to illustrate morphological changes represent different functional activities. The epithelial cells of these embryos were found to be capable of conducting impulse and this impulse conductivity appeared only during certain stages. In *Cynops orientalis*, at stage 26 with pronephros just appearing and 6-7 somites already formed, the epithelial cells display conductivity. At stage 38, when the branching of the first pair of external gills appears, the conduction property is lost. The period of conductivity lasts about 180 hours from stage 26 to 38, at 20 ± 1 °C. In order to find the structural basis of conductivity freeze-etching studies were carried out. To summarize briefly, gap junctions were observed at all the stages chosen. They differed, however, not only in size and in frequency of appearance but also in connexon array. Connexons of the stage before the acquisition of conductivity and of the stage when the conductivity was no longer present were arranged tightly in a more or less regular array, while those of the stage when conductivity was at its maximum were arranged loosely and more irregularly. With the conception that the contraction of the connexon lattice are directly to the opening and closing of the gap junctional channel, the morphological differences of the gap junctions of these stages correlate well with the conductivity' of the embryonic epithelial cells. The same differences were observed between the non-excitable atypical epithelium and the epithelium grafted to a normal embryo and rendered excitable.

ELECTRICAL COUPLING IN EARLY EMBRYONIC CHICK HEART MONITORED BY MULTIPLE-SITE OPTICAL RECORDING OF ACTION POTENTIALS.

Toshihiko Yada, Tetsuro Sakai, Hitoshi Komuro, Akihiko Hirota, and Kohtaro Kamino
(Tokyo Med. and Dental Uni. Sch. of Med.)

Electrical propagation in early embryonic precontractile chick hearts were studied optically using a voltage-sensitive merocyanine-rhodanine dye. Spontaneous optical signals, corresponding to action potentials, were recorded simultaneously from 25 separate regions of the 8-9 somite embryonic primitive heart using a square photodiode array. Electrical coupling was assessed by analyzing the timing of the signals obtained from different regions. Electrical coupling in the heart was suppressed by either lowering or raising extracellular Ca^{2+} . Similar effects were produced by a Ca^{2+} -ionophore (A23187). We also have found that electrical coupling across the primordial fusion line at the midline of the heart was strengthened by elevation of the external Ca^{2+} and weakened by lowering the external Ca^{2+} . One possible interpretation is that electrical coupling in the embryonic precontractile heart is regulated by the level of the intracellular Ca^{2+} -concentration, and the electrical coupling across the primordial fusion line depends on the external Ca^{2+} .

INTERNUCLEAR CONNECTION IN SPLEENOCYTES

P. D. Gupta (Centre for Cellular & Molecular Biology)

While working on semithin sectioning technique for transmission electron microscopy a new structural feature - two nuclei of adjacent spleenocytes are connected by internuclear tubules - was observed in glutaraldehyde fixed, araldite embedded, 0.5 μm thick sections in transmission electron microscope operated at 120 kv. A survey of samples showed that about 10% cell nuclei show these connections. At some places many nuclei are connected in a row forming a "chain of connecting nuclei". Sometimes one cell nucleus is connected to three or more nuclei of adjacent cells by such tubules. The pregnancy of occurrence of such tubules is dependent on thickness of a section. In decreases in both the cases i.e. by decreasing or increasing the thickness of the sections.

Internuclear tubular connections are tissue specific; after the similar treatment to other tissues such as liver, intestine testes, pituitary, thymus, lymphnodes bone marrow such

connections were never observed. However, these connections are present in spleen of rat mouse, guinea pig and rabbit. It looks as if the nuclear connections in spleenocytes are not dependent on age of the animal; since they have been observed in spleen of 17 day old embryo, neonate, normal young adult and old rats.

Further they have been observed in male and female rats. However, an extensive network of nuclear connections have been observed in spleen of pregnant rat.

No conclusive results were obtained by uridine or thymidine uptake study. With Giemsa, these connecting tubules were stained blue.

Physiological significance of these connections is not very clear. The only conjecture which can be postulated with the present data is that during the processing of lymphocytes in spleen, "the information" from one cell to another cell is transferred without the involvement of the cytoplasm.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS ON JUNCTIONAL COMPLEXES OF SERTOLI CELLS

Toshio Nagano (Chiba Univ.)

The junctional complexes between the Sertoli cells constitute the blood-testis barrier forming a particular environment for postmeiotic germinal cells during spermatogenesis. As was well known, the junctional complexes display unique morphological characteristics. Following points will be presented using the method of freeze-fracture :

During postnatal development of the rat, mouse and guinea pig, there are relatively many numbers of gap junctions before spermiogenesis proceeds. The gap junctional particles are arranged in quasi-hexagonal fashion and several particle-free regions are found in the junctional patch. The tight junctions are arranged in a meshwork, in which the gap junctions are situated. As spermiogenesis proceeds, the gap junctions are decreased in size and number, while many parallel tight junctions can be seen around the lateral surface of the Sertoli cell. In the adult, the small gap junctions of rectangular outline are hardly found in the junctional regions. The particles of the Sertoli tight junctions show discrete rows predominantly on the E face groove. On the P face, linear furrows without particles are frequently found. In the experimental cryptorchid testis, in which developing spermatogenic cells are in degeneration, the Sertoli cell tight junctions appear to be intact but the gap junctions appear to be increased in number and size, though a quantitative analysis remains to be made.

These features of the Sertoli junctional complexes described above are based on the

results obtained by glutaraldehyde fixation. However, quite similar results are obtained without glutaraldehyde fixation which is believed as a cross-linker for the junctional elements. Therefore, it is concluded that both particle distribution in the gap junction and tight junctions in the Sertoli cell junctional complexes are relatively insensitive against glutaraldehyde comparing with those of other epithelial cells, such as hepatocytes, intestinal and epididymal epithelial cells which are sensitive against glutaraldehyde.

Although biochemical studies on both isolated gap (Goodenough and Stoeckenius, 1972) and tight (Stevenson and Goodenough, 1984) junctional elements of the hepatocyte have been reported, the chemical nature of the Sertoli junctional complexes remains to be studied.

GAP JUNCTIONS BETWEEN VISUAL CELLS IN SOME VERTEBRATE RETINAS

S. Hara & M. Miyoshi (Fukuoka Univ. Sch. Med.)

Ultrastructural examination of retinæ in some vertebrates has shown that the visual cells are in specific arrangement by species and also associated with each other by gap junctions. The present study was undertaken to elucidate the relationship between the arrangement of visual cells and the development of their gap junctions. Visual cells in the squirrel (*Tamias sibiricus*) and the snake (*Elaphe quadrigata*) were studied by the transmission electron microscopy (TEM) of thin sections and freeze-fracture replicas.

The squirrel retina contained two types of visual cells: rods and cones. Sporadically distributed rods were surrounded by four to six cones. Gap junctions occurred at the level of the synaptic terminals of the visual cells. The gap junctions were formed between rods and cones, and between cones. However, no junctions were seen between rods. The rods were in contact with all the surrounding cones by gap junctions. These findings suggest that a rod and its surrounding cones constitute a structural unit.

The snake retina contained four types of visual cell: large single cones, small single cones, and double cones consisting of a chief cone and an accessory cone. The visual cells were arranged in a regular manner as alternating rows of double cones and large single cones. Gap junctions occurred between the inner segments of adjoining cones. The chief cones of the double cone were essentially similar in structure to the large single cones. The gap junctions were found between large single cones and between chief cones in addition to between large single cones and chief cones. However, in this species, the relationship between the unique organization of the visual cells the development of gap junctions has remained obscure.

GAP JUNCTION OF HORIZONTAL CELL IN THE CARP RETINA: ACCESS BY THE COMPLEMENTARY REPLICATION

Akira Tonosaki, Hiroshi Washioka, Hidenori Nakamura, & Koroku Negishi*
(Yamagata Uni. Sch. of Med., *Kanzawa Univ. Sch. of Med.).

Witkovsky et al. (1983) gained access to quantitative analysis of the gap junction (GJ) areas in the turtle external horizontal cell (EHC) by means of freeze replication. In the present work, we try similar investigation of GJ areas in the carp EHCs in the light of complementary replication, comparing them with the innermost large horizontal processes (LHPs) (Fig. 1) according to a diagram published by Mitarai et al. (1974).

Dozens of replicas with some or other defects were excluded off the course of methods. Complementary pairs called EHC-27, EHC-41, and LHP-170 survived such selection for the final examination (Table 1). 1. The chance to see fracture faces of plasma membranes was considerably smaller in EHC than LHP. 2. Between a pair of complementary replicas, fracture faces of GJ areas were not necessarily shared equally. One case of EHC-27 showed an expected value ca. one to one. 3. Proportion of GJ areas in total for the plasma

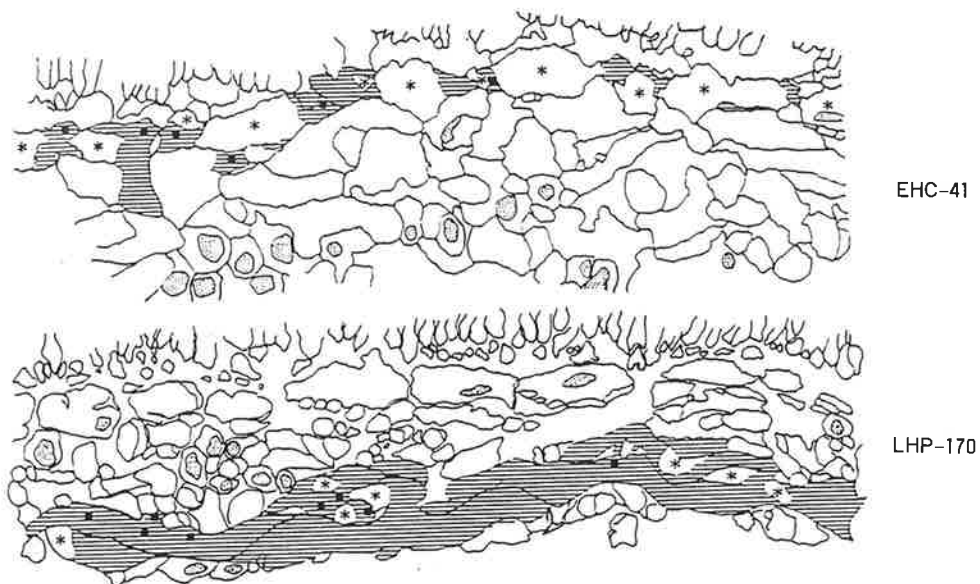


Fig. 1. Plasma membranes fractured and replicated are marked with striation. Solid square (■) indicates a site of gap junction area, asterisk (*) fractured cytoplasm. Reduced from tracing sketches of electron micrographic montages.

membrane was by about ten times larger in EHC than LHP. 4. Size of an individual GJ areas measured in EHC as $1.34 \mu\text{m}^2$ (average of 36 areas) in contrast to $0.68 \mu\text{m}^2$ (34 areas) in LHP. Two thirds of LHP GJ areas were $0.5 \mu\text{m}^2$ or smaller in size while those of EHC were distributed in a broader range from $0.1 \mu\text{m}^2$ to over $10 \mu\text{m}^2$. 5. Distribution density of PFF particles was estimated higher by 10 % in EHC GJ areas than those of LHP.

References

- Mitarai, G., Asano, T., and Miyake, Y. (1974) *Jap. J. Ophthalmol.*, 18: 161-176. Witkovsky, P., Owen, W. G., and Woodworth, M. (1983) *J. Comp. Neurol.*, 216: 359-368.

Table 1. Results from examination of the complementary replication of the carp retina.

	EHC-27		EHC-41		LHP-170	
RW (μm)	477		850		358	
PM (μm^2)	388		311		2293	
GJ (μm^2)	$\frac{16.4}{16.3}$	32.7	$\frac{10.5}{20.8}$	31.3	$\frac{6.5}{21.9}$	28.4
GJ/PM (%)	8.4		10.0		1.2	
DP (μm^{-2})	4629		5435		5805	

DP, distribution of gap junction particles; GJ, summation of gap junctional areas (share of complementary replicas in top and bottom on the left, total on the right); PM, plasma membrane fractured; RW, retina contained in replicas in circumferential width.

MODULATION OF INTRACELLULAR COMMUNICATION BETWEEN HORIZONTAL CELLS IN THE FISH RETINA BY DOPAMINE AND CYCLIC AMP

K. Negishi, T. Teranishi & S. Kato (NIRI, Univ. of Kanazawa Sch. of Med.)

Horizontal cells in the fish retina are electrically coupled via gap junctions in a given cellular layer, so that intracellularly injected Lucifer yellow CH (LY) into a cell normally diffuses to several neighboring cells. Dopamine applied into the residual vitreous fluid under the isolated retina increased the amplitude of center responses of horizontal cells to light

spots, reduced the lateral spread and restricted the injected dye to single cells. Similar effects were produced by intravitreal application of dibutyryl cAMP, forskolin, a GABA antagonist bicuculline (Bcc) and amphetamine. The effects of DA, Bcc and amphetamine but not of cAMP and forskolin were antagonized by a DAergic blocker haloperidol. Prior destruction of DAergic interplexiform cells with 6-hydroxydopamine (6-OHDA) resulted in much reduced amplitude of center responses but wider lateral spread, while the injected dye diffused extensively to numerous neighboring cells. However, DA, dibutyryl cAMP and forskoline, applied to such DAergic cells-deprived retinas, restored the normal behavior of horizontal cells, while similarly applied Bcc and amphetamine did not. Therefore, the effect of DA on horizontal cells reflects a modulatory function of DAergic interplexiform cells and is mediated by the DA-1 type receptor via an adenylate cyclase-cAMP system in the horizontal cell membrane. Furthermore, the state of gap junctions between horizontal cells was found to be modified probably by changes in the intracellular pH (pH_i). Gap junctions appeared to be uncoupled by low pH_i (CO_2) and coupled by high pH_i (NH_3). DA may increase both gap-junctional and non-junctional resistances of horizontal cells, while CO_2 appears to increase gap-junctional resistance alone.

JUNCTIONS BETWEEN LENS FIBER CELLS— ANALYSIS WITH MONOCLONAL ANTIBODIES

Ross. G. Johnson (Univ. of Minnesota)

The elongated fiber cells, which make up the bulk of the vertebrate lens, are highly differentiated cells. They have stopped dividing, lost cytoplasmic organelles, accumulated high concentrations of crystallins, and formed extensive cell-to-cell junctions (1). Since the junctions cover approximately half of the fiber cell surface in the chicken and since a 26,000 dalton membrane protein (MP26) is equally abundant, this protein has been implicated as a junctional component (2).

We are interested in these junctions, because fiber cells are electrically coupled, and dye coupled as well (3). The junctions in this avascular tissue may serve to conduct metabolites between fiber cells and between these cells and lens epithelial cells on the anterior lens surface. These latter cells comprise a monolayer, which in some respects is more active metabolically than the fiber population.

We seek to determine whether the extensive lens junctions qualify as "gap junctions" and, if so, to define the role they play in this tissue. Because of a controversy in the

literature over the localization of MP26 (4,5), I will begin by discussing our data which indicate that MP26 is a junctional protein. I will then illustrate our monoclonal antibody approach for examining different domains on the MP26 molecule. These various domains likely serve different functions; for example, extracellular domains in recognition and junction formation, with domains on the cytoplasmic side of the membrane dealing with regulatory issues.

The first monoclonal, termed B2 (6), is considered specific for MP26 for several reasons: 1) it recognizes only one protein, MP26, on "Westerns" or immunoreplicas of embryonic chicken lenses, 2) it does not react with cytoplasmic proteins, 3) its determinant is aggregated in SDS at 100°C, as is MP26, 4) its determinant forms oligomers, and 5) it binds to a cyanogen bromide fragment of MP26. Protease studies show that B2 binds to a site less than 20 residues from the C-terminus. EM studies localize it to the cytoplasmic side of the junctional membrane. These studies utilize indirect immunolabeling with peroxidase and colloidal gold markers. Quantitative analysis, with five labeling categories, reveals that 85% of the junctions examined after B2 treatment are in the top category. With control treatments, 80% are in the lowest category. Controls include unconditioned hybridoma medium, myeloma medium, and a monoclonal antibody for ovalbumin. The results suggest that both types of lens junctions observed (approximately 12 nm vs. approximately 16 nm in total cross-sectional thickness) label with B2, supporting the idea that MP26 is a junctional protein. We are currently developing methods to inject B2 into cultured lens cells.

To enhance our chances of obtaining antibodies to "extracellular" domains, we examined procedures for splitting lens junctions. We found that treatment at a pH of approximately 2.5 was effective (7). Following this treatment we found 1) junction profiles absent in thin sections for EM, 2) no change in membrane density, 3) loss of the typical limit to proteolysis for MP26 in membranes (approximately 21 kd), and 4) substantial binding of a monoclonal antibody which had been prepared against split junctional membranes. This monoclonal is called A4. It binds in the middle of the MP26 molecule, presumably on the extracellular surface of an intact membrane. Studies are in progress to document this latter point. A4 will be examined to determine whether it alters lens junction formation.

To utilize antibodies like those described here, we have developed a lens culture system, involving trypsin-dissociated chicken embryonic lens cells (8). Differentiation is marked and extensive, with the products being structures termed "lentoids." Lentoid cells are a good model for lens fiber cells, since they possess all of the differentiated fiber cell features noted above.

References

- 1 . Piatigorsky, J. (1981) Differentiation 19: 134-153.
- 2 . Benedetti, E. L., et al. (1976) Biochim. Biophys. Acta 457: 353-384.
- 3 . Rae, J. (1979) Curr. Top. Eye. Res. 1: 37-90.
- 4 . Bok, D., et al. (1982) J. Cell Biol. 92: 213-220.
- 5 . Paul, D., et al. (1982) J. Cell Biol. 96: 625-632.
- 6 . Sas, D., et al. (1984) Submitted.
- 7 . Sas, D., and R. Johnson (1983) J. Cell Biol. 97: 84a.
- 8 . Menko, A.S., et al. (1984) Dev. Biol. 103: 129-141.

POSSIBLE ROLE OF BLOCKED GAP-JUNCTIONAL COMMUNICATION IN TUMOR PROMOTION

Hiroshi Yamasaki, Taira Enomoto (International Agency for Research on Cancer).

Yoshinobu Kanno (Hiroshima Univ. Sch. of Dentistry).

Takeo Kakunaga (Osaka Univ. Res. Inst. for Microbial Diseases).

Gap junctional intercellular communication is considered to play an important role in the control of cell differentiation and cell proliferation. Although relationship between modulation of gap junctional communication and carcinogenesis has long been speculated, there is no convincing evidence that modulation of gap junctional communication is involved in the mechanisms of carcinogenesis. Most of the work reported earlier about the relationship between gap junctional intercellular communication and carcinogenesis, dealt with the capacity of intercellular communication of cancerous cells in comparison to that normal counterparts, and such studies have given an equivocal result whether cancerous cells have or have not intercellular communication. Some investigators reported that cancerous cells do not have intercellular communication capacity but others reported they do have intercellular communication among themselves. In order to study the possible involvement of modulation of gap junctional intercellular communication in the process of carcinogenesis, we have been using *in vitro* cell culture systems, and we have recently obtained several lines of evidence which support the idea that block of intercellular communication is involved in the later stage of cell transformation.

Our results can be summarized as follows: 1) Tumor promoting phorbol esters but not non-promoting derivatives inhibit intercellular communication and enhance transformation of Balb/c 3T3 cells; 2) Hamster embryo cell lines which are resistant to phorbol ester-induced

morphological transformation, are also resistant to phorbol ester-mediated inhibition of intercellular communication. 3) Inhibitors of tumor promotion, such as retinoic acid, glucocorticoids and cyclic AMP, inhibit the effect of phorbol esters on intercellular communication; 4) A clonal line of Balb/c 3T3 cells, which is highly sensitive to chemically-induced transformation, but not a transformation-resistant clone, loses its intercellular communication capacity when it reaches confluence; 5) Chemically transformed Balb/c 3T3 cells do not communicate with surrounding non-transformed counterparts.

We believe these evidences suggest that intercellular communication is an important determinant in the promotion phase (expression) of carcinogenesis.

INHIBITION OF GAP JUNCTIONAL COMMUNICATION BY PHORBOL ESTERS: STUDIES ON MECHANISM

Andrew W. Murray, D. James Fitzgerald, Peter M. Tapley & Helen St. C. Gainer
(Flinders Univ. Sch. Biological Sciences)

It is now well established that phorbol ester tumor promoters cause a marked inhibition of the transfer of low MW compounds between cultured mammalian cells via gap junctions. In our own studies we have used mouse epidermal HEL-37 cells and rat glioma G-6 cells.

In our most recent studies we have used the transfer of microinjected fluorescein or Lucifer Yellow between contacting cells as a measure of junctional transfer. Phorbol esters strongly inhibit dye transfer after a lag of about 5 min; inhibition is complete within 20 min.

We are particularly interested in the mechanism of the phorbol ester inhibition. Several recent studies have indicated that a Ca^{2+} and phospholipid-dependent protein kinase (protein kinase C) is a major phorbol ester-binding protein in many cells. *In vitro* studies have shown that in the presence of phosphatidylserine (PS) and low Ca^{2+} concentrations this enzyme is activated by diacylglycerol (DG), which transiently accumulates following inositol lipid breakdown. Phorbol esters also activate protein kinase C (probably by acting as a DG mimic) both *in vitro* and *in vivo*. In intact cells incubated with phorbol esters, this activation is a consequence of the movement of protein kinase C from the cytosol to cellular membranes.

As a consequence of these findings it has been widely speculated that activation of protein kinase C is responsible for many of the phorbol ester-mediated biochemical changes. We are exploring the possible involvement of protein kinase C in regulating gap junctional permeability in 2 ways:

1. Exposure to cell lines to phorbol esters for 24 h renders the cells refractory to phorbol

ester-inhibition of junctional communication. Refractory cells lose essentially all of their protein kinase C activity. We have carried out an extensive series of experiments correlating the development of refractoriness and the loss of kinase activity.

2. The possibility that membrane associated proteins, including gap junctional protein, are direct substrates for protein kinase C is being examined.

A STUDY OF DESMOSOME ASSOCIATED PROTEINS DURING DESMOSOME FORMATION IN AGGREGATING CHICK CORNEAL CELLS

Jane Overton (Univ. of Chicago, Dep. of Molecular Genetics and Cell Biology,)

When corneal epithelial cells of 15-1/2 day chick embryos are dissociated, the separated desmosomal plaques lie on the surface initially but are then rapidly internalized. If the cells are dissociated and cultured with cytochalasin B (CB), however, single plaques remain on the cell surface and during aggregation, new desmosomes will form three times faster than controls cultured without the drug. This suggests that some component of the desmosome remaining on the cell surface signals the apposing cell to form a junction. Using antisera to specific desmosome components 3 groups of proteins have been identified corresponding to the desmosome intercellular region, the plaque and the associated tonofilaments. The behavior of these proteins upon dissociation and aggregation of corneal cells with and without CB has been followed using ^3H -leucine incorporation and fluorography. After 30 min in culture, control cells lose 60% of the membrane fraction protein made prior to dissociation while cells treated with CB lose only 25%. However, after 6 hr in culture, the control cell membranes recover several proteins made prior to dissociation including the desmosome associated proteins. During the first 30 min in culture, the control cells incorporate more than twice the amount of membrane fraction protein than the CB treated cells, including more of all the desmosome associated components. During the third hour, when desmosome formation begins, the cells cultured with or without CB incorporate intercellular and plaque proteins into the membrane fraction in a similar manner except that controls incorporate more of these proteins. During the sixth hour, when junctions are forming rapidly, the CB treated cells are making significantly more of the intercellular region and plaque proteins than the controls.

These results show (1) that desmosome components are synthesized in the relatively coordinated manner, and (2) that some desmosome associated proteins are recycled. Because there was an overlap in the molecular weight range of the protein groups studied, the

process of recycling was analyzed further. A sequential extraction procedure has been used to selectively solubilize three sets of desmosome associated proteins from isolated membrane fractions and whole cells from the corneal epithelium of 15-1/2 day chick embryos in order to follow their fate during aggregation. The proteins of the intercellular region of the junction are solubilized by 1 hr incubation in 1% NP-40, the keratin containing tonofilaments by 5 min incubation in 9.5 M urea (urea+) and the plaque proteins by 3 hr incubation in 9.5 M urea (urea-). We have used pH gradient, non-equilibrium gel electrophoresis to further characterize these components. All of the desmosome associated proteins display the predicted isoelectric mobilities. The fate of junctional proteins incorporated into the membrane fraction by cells in the intact tissue upon dissociation has been followed by incubating the tissue 1 hr in ³⁵S-methionine then dispersing the cells and allowing them to aggregate in cold medium. The proteins of the membrane fractions of the tissue and aggregates were then extracted and analyzed by 2-dimensional gel electrophoresis and fluorography. The membrane fraction lost 60% of the labeled protein during the first 30 min following dissociation primarily due to loss of urea soluble proteins, specifically the keratins. After 6 hr the membrane fraction has recovered some of the radiolabeled protein which was lost upon dissociation. The urea soluble fraction (urea+) recovered a significant amount of the keratin proteins synthesized prior to dissociation. There was a continued loss of labeled protein from the NP-40 and urea insoluble (urea-) fractions. However, proteins of the desmosome plaque also appear to recover some of the radiolabeled protein lost upon dissociation, while the proteins of the desmosome intercellular region remain constant. These results support the hypothesis that desmosome components removed from the membrane by endocytosis following cell dissociation return to the cell surface after aggregation. However, the possibility that proteins of the desmosome intercellular region are not removed, but become dispersed in the cell membrane, has not been excluded.

『発声と音声認識の比較生理学』

昭和59年 9月4日～9月5日

音声認識の工学と生物学の間の問題

齊藤収三（工学院大）

有声音と無声音の識別

広瀬 肇（東京大・医）

顎口腔機能の協調性

高田 充（徳島大・歯）

音声と言語の生物学

亀田和夫（北海道大・歯）

鳥類の音声認識

齊藤 望（独協医・大）

音声認識の工学的展開と生物学的背景

齊藤収三（工学院大学）

音声はヒトの脳における言語メッセージが情報源となり、これが音声器官へ指令して音声波を生成する。言語メッセージは記号的、離散の情報であるが、音声波には音声器官の運動における物理的高速や、音声器官の個体差によって、その音響的性質に調音結合や個人差が付加されることになる。音声器官で生成される連続的な音声情報を分析して言語メッセージに復号する処理が（狭義の）音声認識技術であり、音声器官の個体差を判別する処理が話者認識技術である。

音声認識処理には、音声の言語的特徴に関する標準パターンをあらかじめ記憶していて、これに基づいて認識処理を行う形式と、標準パターンは使わないで、言語的特徴に関する2者択一の判別を階層的に繰返し、最終的に言語記号例に変換する形式とがある。現在は前者の形式が主に使われている。音声入力が比較的少数の単語に限定される場合には単語の音響的特徴をそのまま用いて標準パターンを表わすことが多い。しかし語彙数が多い場合や文音声の認識では、音素や音節の音響的特徴を用いて標準パターンを表わすのが普通で、この場合には単語辞書や構文・意味情報などの言語的知識を併せて記憶していて、これらの記憶情報を総合して最終的な音声理解を実行するようにしている。特に文音声の認識処理では、文音声における鍵単語以外の音声入力の音響的特徴が変形し易いので、言語記号例へのタイプライターの的な変換を指向しないで、鍵単語の系列の認識を通じて文音声の理解を実行することを指向している。そうして音声合成器を併用して対話形式にすることにより、曖昧な認識を補正したり、認識誤りを修正するようにしている。

音声入力には、発話者の音声器官の個体差に基因する音響的特性の変動が含まれるので、音声認識に用いる標準パターンはこの変動に適応できる必要がある。最も、簡単な適応処理は、認識すべき単語、あるいは音素や音節について、発話者ごとにその標準パターンをあらかじめ学習

する処理である。このようにすれば200単語の語彙ならば認識誤りは1～2%以下にすることが可能である。

しかし認識語彙数が増すにつれて、学習に多大の時間と労力を要することになると、標準パターンの能率の良い学習処理が必要となる。このため、標準パターンは音素や音節の音響的特徴で表わすことにして、(1)認識単語のうちから標準パターンを作成するのに最適な一部の単語を選定して発話し、学習処理する。(2)音素毎の音響的特性には発話者に特有の相関があるので、この相関性に基づいて学習できていない音素の標準パターンを推定する。(3)簡単な音声入力によって発話者の声道長や周波数スペクトルの概形を推定し、これを用いて発話者の音声入力を正規化して、平均的音声に変換する。このようにすれば標準パターンは平均的音声についての標準パターンで良い。(4)多数の発話者の音素毎の音響的特性の分布データに基づいて、複数個にクラスター化した標準パターンを作り、発話者の簡単な音声入力からどのクラスターを使うかを選択する。などの種々の学習処理が考案されている。

しかし何れの方法を用いても、すべての認識単語について学習処理する場合に比べると認識誤りが若干多くのものが現状である。標準パターンの学習処理を高能率化、ないし自動化するのが当面もっとも重要な研究課題である。

音声波を音響分析することによって、発話者の言話メッセージを復号するというこれまでの音声認識処理では、発話者ごとの音響的特性の個人差を何等かの手段で正規化することが是非とも必要となる。人話者には大脳からの言話メッセージが神経指令の形で音声器官に送られているので、この神経指令を抽出できるようになれば、音声器官の個体差による音響的特性の変形は考慮する必要がなくなり、音声認識処理がより容易になるものと思われる。大脳からのメッセージに関するモーターコマンドを抽出する生物学的研究の進展が期待される。

有声音と無声音の識別

広瀬 肇（東京大学・音声研）

言語音の知覚と生成の研究において、有聲・無聲の対立に関しては従来多数の報告がある。とくに子音については調音点、調音様式が同じで有聲・無聲の違いによって分類される組合せがいくつある。日本語では、p : b, t : d, k : g, s : zなどがこれにあたる。

今回は有聲・無聲の識別に関与する音響的な手掛り(cues)について概観し、またこれに対応する生成面での生理的特徴についてまとめてみたい。さらに各種の言話における対立の表われ方や、病的発音における知見についても言及する。

まず音響的なcueについては、調音閉鎖中の静態振動の有無が重要であることはいうまでもない。このほか破裂音では調音破裂直後のホルマント遷移の性状、破裂から声帯振動開始までの時

間 (voice onset time:VOT) の意義が重視されている。他にもいくつかの cue が指摘されているが言語の種類によっても差があると思われる。

言語差に関しては、たとえば無声音同志でも VOT の値にかなりの違いがあることが知られており、有声・無声の識別についても各言語特有の境界があると考えられている。なお、韓国語のように 3 種の破裂音が語頭ではすべて無声である言語もあり、その識別には、有声・無声という次元以外の要素を考えねばならない。

一方生成面でみると、有声・無声の差は喉頭調節の違いにきわめて明瞭にあらわれるもので、有声音では声門閉鎖と声帯振動がみられ、無声音では声門が開大する。語頭においても、後続する母音へ向っての声門閉鎖パターンに違いがある。これらの喉頭調節の違いはいずれも内喉頭筋の活動様式の差によって説明できる。VOT の違いの成立についても喉頭調節と附属管腔レベルの調節のタイミングの差で解釈でき、このような生成面にあける特徴が、識別に直接役立っていると考えられる。

病的例として、発語失行症における有声・無声の混乱、および喉頭摘出後の食堂発声者における有声・無声の調節の問題についてふれてみたい。

顎口腔機能の協調性

高田 充 (徳島大・歯・生理)

そしゃく運動時或いは発音時には、顎筋と舌筋とは共範して律動的な運動を遂行する。浅麻酔ネコで三叉神経第 3 枝を刺激すると、口が開く運動と舌のひっこめ運動がおこる。すなわち、感覚神経の単発刺激で Jaw opening reflex と Lingo-hypoglossal reflex とが共範する。それぞれのニューロンより舌神経刺激により誘発されるシナプス後電位を記録すると、開口筋運動ニューロンでは EPSP が、閉口筋運動ニューロンでは IPSP が誘発され、多くの舌ひっこめ運動ニューロンでは EPSP が、舌つきだし運動ニューロンでは IPSP が、三叉神経知覚核ニューロンでは EPSP が、記録される。また、舌神経からのインパルスは三叉神経脊髄路核においてシナプス前抑制を受ける。以上が下位中枢における情報処理であるが、大脳皮質顎、舌運動領の刺激ではより複雑な協調性運動をおこすことができる。今回は顎口腔機能の協調性についての研究成果を発表する。

音声と言語の生物学

亀田和夫（北海道大学・薬・生理）

脊椎運動は、その進化の過程において多くの変化を経過してきた。そのなかでも、体幹や四肢は複雑な形態のなかでも原始的な体節構造を辿ることができるし、系統発生的にも比較的一定方向の進化をしてきた。これに反し頭部は、大節的な由来をもつものと鰓弓由来のものとが混在し、系統発生的にもある方向がゆきずまると逆転して別の方向に向うこともしばしばである。このことはある器官の形態や可能について考える場合に注意しておかなければならないことである。

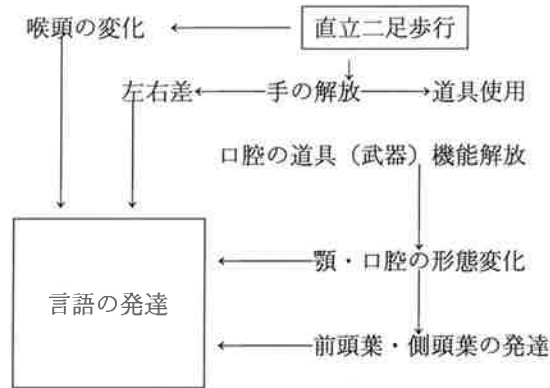
声帯を振わせ、あるいは声帯を振わせることなく肺から排出される空気を用いて、さらにあるいは空気の入りがない場合も含めて、言語音を形成する主要なオペレータは口腔である。ヒトの口腔は消化器としてはその形態は退化している。一般にこれはヒトが煮炊きを知り、堅いものを食べずに済むためとされている。しかしヒトが火を使う前からこの傾向は始まっていてすこし疑問の余地がある議論である。むしろ口腔はそしゃくと並んで、かみつく武器であり、保持する道具であったものが、ヒトでは道具使用のできるようになったために口腔を道具として用いる必要がなくなったことを考えた方がよい。そして、口腔の形態変化は退化でなく言語機能に対応する進化とも考えられるのである。

ホミニゼーションの第一歩として直立二足走行によって何か起こるであろうか？ 第一の結果は前肢が走行から解放されて独立の用途に用いるようになったことであり、第二は喉頭の形態がわかり、喉頭と口腔を結ぶ管を考えると、それが逆L字形におれまがることである。後者は発声に際し二つのフォルマントを形成するには有利であろう。

手が自由になり、道具の使用が始まると口腔は道具としての役割が軽減され、顎が突き出す必要はなくなり、犬歯も歯牙と同一の平面になりそしゃく筋はその力を減ずる。顎が突出する代りに前頭部が前に出て皮質（前頭葉）の発達する余地を作る。また側頭筋の起始部は頭頂であったものが、こめかみの線にまでおりてきて側頭葉の発達を促す。また犬歯の変化によって、それまで開閉運動のみをしていた顎の前後、左右への運動が可能になる。鋭いV形からU形になった口腔はこの顎関節の変化によってその形状を複雑に変化できるようになった。

歩行肢に左右のアンバランスがあると、動物は前進する代りに回転してしまう。左右対称は歩行運動のために特に重要である。歩行から解放された手は左右の形態的対称を放棄するには至っていないけれども、機能的な左右差・左右の役割分担が発生した。

これらのすべての事情な言語の発生と発達にとって有利である。この関係を図示すると次のようになる。



視覚信号でなく聴覚信号を選んだことは、果して有利であったろうか。ある一瞬に受け取られる情報量は視覚の方が大きい。視覚経は第8神経よりもぐっと太い。舞台の上での演技はいくつかの事件が同時進行できるが、セリフの方は同時には出せない。しかも聴覚信号は次の瞬間に消えてしまう。しかし聴覚は時間的分解能においては遥かにすぐれている。音響信号は時間的に一方的に進行して逆戻りしない。そのために順序関係は明確である。われわれの理論の原点である因果関係の認識には時間の前後がその出発点にある。

おもに視覚的心像からできている夢は極めて非論理的になりうる。非言語的思考というものも潜在するけれども、ヒトの思考は圧倒的に「内言語」に頼っている。言語的思考によって、断片的な想念が順序だてられ、体系化される。同時進行を許さないという音声言語の性質は、文字の発明後も引きつがれた。何本もの指が同時に働きうるピアノに反して、タイプライターはウムラウト記号すら同時に打つことができない。スイスの言語学者ソシュールは、言語のこのような性格を「線性」と呼んだ。同時進行から許されない性格から、その中枢制御は一側性になってくる。大脳半球機能の非対称性と「利き手」とどちらが先行したかは難しいけれども、よく呼応しているように見えることは事実である。

広く読まれている「言語の生物学的基礎」のなかで、レネバーグは言語はヒトの種特異的行動であるといっている。他のすべての種特異行動と同じく、言語行動の発現には形態的基盤があり、またこのような形態をもつ動物・ヒトとしては言語を持つ以外の選択はありえなかった、とも考えられる。

鳥類の音声パターン認識

齊藤 望（独協医大・生理）

鳥類を鳴きん類とその他に分類すると、後者は、前者に比較して、一般に単純な音声パターン

を発声している。後者のパターンを地鳴き (call) という。前者は地鳴きもあるが、それに加えてさえずり (song) がより複雑なパターンを示す。しかし地鳴きの場合、それぞれの行動パターンと関係が明瞭であり、音声認識のはたらきがよく理解出来る。

後者の例となる、オオセグロカモメの場合、親と仔の関係は音声で強く結ばれている。オオセグロカモメは狭い区域に集団営巣し、巣の分布密度は高く、隣の巣とのトラブルが多い。親は警戒音と給餌音を発声して仔の行動を貰うために、親に寄りそう。しかし隣の親と識別するため、仔は自分の親の給餌音を個体識別している。もし隣の親の巣に行くと攻撃され、生命の危険があるので仔にとって個体識別は重要である。警戒音には生得的に反応するが、給餌音に対する反応は学習による。共に80~8000Hzの範囲のフォルマント構造の音声であるが前者は断続音であり、後者は持続音である。給餌音はフォルマントの要素によって個体識別されていると云われている。

もう一つの、集団営巣する海鳥としてコシジロウミツバメがある。これは夜行性のために音声コミュニケーションは必要不可欠である。エコロケーション、種の識別、番行動などに対応した発声パターンがある。夜行性で捕食者がいないためか、警戒音はない。日中は土中の巣穴に雌雄の番でこもり、夜間のみ穴から出入している。したがって、音声を手がかりとして巣穴を識別していると考えられる。

上述の集団営巣する海鳥と異なって、鳴きん類はさえずりによる音声認識が主役となる。鳴きん類は集団営巣せずに、他種のいり交るなかに個体でなわばりをつくって営巣する。したがって、さえずりのパターンは複雑であり、一つの発声パターンのなかに種の識別と個体識別を同時にもり込んでいる。これは矛盾する機能であるが、一つのパターンのうちで次元の異なるパラメーターを使うことで解決している。

さえずりは生後の学習により、生得のパターンがいろいろと修飾されると考えられる。新しく修飾されたパターンが生得的パターンからいきにして得られるかは興味ある問題である。音声パターン認識機構がこの学習過程にかかわっているという考えは示唆的である。

『正常及び病態下での心筋の伝導機構に関する研究会』

昭和59年10月4日～10月5日

心筋 Gap junction の形態学的特徴

柴田洋三郎（九大）

心臓の発生進化と細胞間結合

平光厲司（埼玉医大）

心臓形成の初期過程における興奮伝播パターンと細胞間連絡

神野耕太郎（東京医歯大）

病態下にみられる心筋細胞間結合の変化

河村慧四郎（大阪医大）

Gap junction での色素の透過性

入沢 宏（生理研）

今永一成（福岡大）

走査及び透過電子顕微鏡観察によるP-M接合部の形態

島田達生（大分医大）

ヒト心筋の刺激伝導系におけるミオシンの変化

矢崎義雄（東大）

プルキニエ線維内伝導速度に対するジギタリスの作用

橋本敬太郎，元村定成（山梨医大）

β -受容体を介するNaチャンネルブロック

久留一郎，有田 真（大分医大）

興奮伝導性と細胞間抵抗

児玉逸郎，外山淳治（名大）

虚血類似条件下における心筋活動電位変化と細胞内イオン活性

中谷晴昭（北大）

アセチルコリンの房室結節に及ぼす陰性変導機序

西村昌雄，渡部良夫（保険衛生大）

房室伝導遅延に関する計算機シミュレーション

鈴木良次（大阪大）

Ordered-reentry の特徴について

沢登 徹（東京医歯大）

心外膜マッピング法による亜急性期（7日）

心筋梗塞犬でリエントリー性心室頻拍の解析

小川 聡 (慶応大)

心室内マッピングによる delayed-potential と reentry

笠貫 宏 (東京女子医大)

ENTRAINMENT について

松尾博司 (東大)

副伝導路の伝導様式に関する検討

加藤貴雄 (日本医大)

平岡昌和 (東京医歯大・難治疾患研)

入沢 宏 (生理研)

解剖学者 4 名を含め、生理学・薬理学・工学・内科学などの幅広い領域から約 45 名の参加を得て、活発な討議が行なわれた。主な討議事項は、心筋の伝導に重要な役割りを果たすと思われる gap junction の微細形態と発生分化、病態時の細胞間結合の変化、プルキンエー心室筋接合部の微細構造、など形態学面の最近の知見、機能面より分離心筋を用いての gap junction の抵抗変化、胎生化の心房内リズム形成とその興奮伝播、房室伝導のシミュレーション、虚血その他の異常状況下での伝導特性の変化や薬剤作用・伝導異常からくる不整脈の代表としてリエントリーをとりあげ、その特徴や臨床例での問題点、などが話し合われた。2 日間の討議を通じて、伝導の基本的構造と機序については、形態学と機能的検討を同じ実験条件下で行うことの必要性が痛感せられ、同時にこれが方法論的に可能性のあることが認識されたこと、及び、生体心での検討については臨床例も含めて、新しい方法論の開発ないし発展の望まれることなどが感じられた。

プルキンエ線維内伝導速度に対するジギタリスの作用

橋本敬太郎 (山梨医大)

イヌのプルキンエ線維を用い、ジギタリスの興奮伝導速度に対する作用を、種々のカリウム濃度条件下で検討した。標本としては、約 1 cm の長いイヌプルキンエ線維を心室中隔近くから摘出し、一端を細い双極電極で刺激し、約 4 ~ 5 mm 離れたところに単極電極、さらにもう一つ他端近くに単極電極をプルキンエ線維表面に圧着させ、両電極間の電位差を AC 増幅器で記録し、両電極間の伝導時間を測定した。その電極間の 5 ケ所をガラス微小電極を用いて刺入し、細胞内活動電位を記録し、平均値を求めて活動電位パラメーターとした。タイロード液の K 濃度を 4 → 1 → 2 → 4 → 6 → 8 → 10 → 4 mM と変化させ、伝導速度と活動電位を記録したのち、ジギタリスとしてアセチルストロファンチジンを 300 msec 刺激間隔の場合は 5×10^{-8} g/ml, 1,000 msec 間隔の場合

合は 10^{-7}g/ml の濃度で表面灌流1時間行い、そのうちアセチルストロファンチジンを含む種々のK濃度のタイロード液にかえ、伝導速度と活動電流を記録した。

正常タイロード液では、伝導速度はK 6 mMで約 2 m/sec と最高値を示しKの低下および上昇で伝導速度は減少した。 V'_{max} は4 mM Kで最高値を示したので、 V'_{max} と伝導速度は高Kの $V'_{\text{max}} 300\text{ V/sec}$ 以下でしか比例関係を示さなかった。この関係は300 msecと1,000 msecの刺激間隔でも同じであった。ジギタリスタイロード液では、標本は4 mM K以下で脱分極し、自動能低下を示し、2 mM K以下では刺激されなくなった。伝導速度は4 mM Kでは低下したが6 mM K以上では有意な減少を示さず、高Kがジギタリス自動能は抑制するが、伝導を遅くする作用も消失させたことになる。ジギタリスにより静止電位が -80 mV より深くないので、伝導速度と V'_{max} は比例関係を示した。この実験で、ジギタリスには正常K濃度では伝導速度を減少させるが、それが不整脈発生、特にリエントリー不整脈を誘発する程の減少は示さないこと、高Kにより伝導抑制作用は消失するが、高K単独で著明な伝導抑制が起こることが示された。

Ordered reentry の特徴について

沢登 徹（東京医歯大・難研）

Ordered reentryすなわち解剖学的に規定された巡回経路を利用したreentryのモデルに蛙心房の静脈洞開口部を中心としたリング状標本を作成し、これを用いreentryの特徴を検討した。多数ヶ所同時記録が可能な光学的膜電位測定法を用い、8ヶ所からの同時記録と期外刺激法とによって巡回性頻拍の出現は既に報告した (Am, J, Physiol, 16; H185-H194, 1984)。同様の標本にて微小電極及び表面電極を用いて、頻拍の特徴を再検討した。無Ca溶液下に0.5 Hz, 10分間刺激し、その後活動電位を記録した。持続時間は $461 \pm 157\text{ msec}$ ($n=114$)で場所による持続時間のばらつきは少なく、興奮波の巡回時間は $175 \pm 37\text{ msec}$ ($n=10$)であり、この時間関係からは一方向性ブロックが出現しても巡回は困難であり、また実際頻拍を誘発し得なかった。不応期を短縮させるため $\text{Ach } 10^{-8}\text{ g/ml}$ を用いた。活動電位持続時間は $125 \pm 59\text{ msec}$ ($n=40$)となり、場所による持続時間のばらつきは増強し、巡回時間は10%短縮した。この条件では頻拍の発生は可能であり、実際に標本の58%に頻拍がみられた。この頻拍はリングの上順次微小電極により活動電位を記録した結果、興奮波の進行は一方向で、リング上を巡回した。この際頻拍の巡回時間は頻拍のrateと正相関 ($r=0.86$)を示し、巡回路はほぼ固定していた。reentryでは期外刺激の連結期と不整脈の回復周期の間は逆相関を示すといわれている。標本23例中16例で逆相関を示し、7例で2相性ないし正相関を示した。逆相関を示さなかった例は記録部位によって異なる関係を示し、刺激後の巡回径路が刺激毎に異なる可能性が示唆された。頻拍Rateの変化は①頻拍発生当初より順次巡回周期が延長する。②巡回周期が初期に著しく動揺し、約50~100 beat後に安定する。③発

生初期は順次周期は延長し、途中動揺を示す。いずれも頻拍発生後周期の延長が観察された。これらの中で②の例に逆相関を示さない例が多かった。頻拍は自然ないし単発の期外刺激で停止した。周期の短縮、延長後また突然停止がみられたが、周期の変化後停止することが多かった。期外刺激による場合、刺激直後また1周後に停止するのがみられたが有効刺激範囲は先行周期の48～75%であった。標本の中にブロックを示しながら興奮旋回に関与していない場合がみられた。以上より蛙心房標本でみられた頻拍はordered reentryの条件の多くを満たすが、不均一な伝導要素を含むことも明らかになった。

虚血類似条件下における心筋活動電位変化と細胞内イオン活性

中谷晴昭（北海道大学・医）

心筋梗塞急性期における心室性不整脈はしばしば心室細動に移行する事が多いが、その発生機序として、虚血心筋部興奮伝導遅延によるリエントリー回路の成立が大きな役割を果たすとされている。虚血心筋部における電気生理学的異常の原因として細胞内外イオン分布の異常化が重要と考えられるが、未だその詳細は不明な点が多い。そこで、虚血類似条件下における心筋活動電位変化とその時の細胞内 K^+ および Na^+ 活性についてイオン選択性微小電極を用いて検討した。

イヌ右室より得た心内膜側および心外膜側心室筋標本を2Hzで電氣的に駆動しながら、低酸素 ($pO_2: 23 \pm 1 \text{ mmHg}$)、呼吸性アシドーシス ($pH: 6.60 \pm 0.01$)、無グルコースといういわゆる虚血様灌流液で30分間表面灌流すると、静止膜電位の減少と共に、活動電位幅の短縮、活動電位高および最大立上り速度の減少が観察され、その程度は心外膜側心室筋標本でより高度であった心外膜側心室筋標本を上記虚血様灌流液で30分間表面灌流すると、静止膜電位は $-85.5 \pm 0.6 \text{ mV}$ から $-69.5 \pm 1.0 \text{ mV}$ へと脱分極した。それと共に細胞内 K^+ 活性は、 $101.0 \pm 5.6 \text{ mM}$ から $79.5 \pm 5.8 \text{ mM}$ ($n = 8$) へと有意に減少し、心筋細胞第一層下の細胞間隙における細胞外 K^+ 活性も10分後で $0.7 \pm 0.3 \text{ mM}$ 、30分後で $0.5 \pm 0.3 \text{ mM}$ だけ増加した。しかしながら細胞内 Na^+ 活性は対照時 $12.6 \pm 2.4 \text{ mM}$ から虚血類似条件下30分で $13.3 \pm 2.1 \text{ mM}$ ($n = 7$) と有意の変化は来たさなかった。また低酸素単独条件下では静止膜電位の減少は $9.5 \pm 0.5 \text{ mV}$ であり、細胞内 K^+ 活性減少も $12.2 \pm 2.6 \text{ mM}$ であった。アシドーシス単独では、静止膜電位減少 ($4.7 \pm 1.3 \text{ mV}$) および活動電位変化はさらに軽微なものとなり、細胞内 K^+ 活動減少も有意ではなかった。また無グルコース単独ではこれらはほとんど変化せず、これら三条件の中では低酸素状態が最も大きな因子であると考えられる。

この様に、イヌ心外膜側心室筋を低酸素、アシドーシス、無グルコースの状態におくと、細胞内から細胞外へ K^+ が流出し、これによる K 平衡電位の減少が静止膜電位の減少に大きく寄与していると考えられるが、その流出に見合うだけの細胞内 Na^+ 活性の増加は観察されず、 K^+ の流出

には Na-K ATPase 活性の低下以外の因子が関与するものと思われる。

心臓形成初期相における興奮伝播パターンと細胞間連絡

神野耕太郎（東京医歯大・医）

光学的方法による活動電位の多部位同時測定によって、鶏初期胚の心臓形成初期相ではペースメーカー領域に発生した興奮は一定速度（0.8～1.3mm/sec）で放射状に心臓全域に伝播することが明らかにされた。さらに、伝播速度は細胞内 Ca^{2+} の増加により減速することから、興奮の伝播は gap-junction を介していることが示唆された。

Hirota, A., Kamino, K., Komuro, H., Sakai, T. and Yada, T. J. Gen. Physiol. 85(1985). in press.

心筋 GAP JUNCTION の形態学的特徴

柴田洋三郎（九州大・医）

心筋細胞間の興奮伝達を行なう GAP 結合の膜粒子は、単位蛋白 Connexon 6 個が同心円状に集合して隣接する細胞質間を内径約 2 nm の親水性通路で連絡している。下等脊椎動物心筋には典型的な斑状の GAP 結合粒子のほかに、線状や円周状、不整形などの粒子配列もみられ、斑状のもも非常に小さく単独の膜粒子が GAP 結合として機能しているとも考えられる。発達途中の哺乳類心筋にも同様の不規則な粒子配列が出現する。また心筋 GAP 結合は、肝細胞や上皮細胞などと比べて、細胞質内 Ca 濃度による粒子配置の変化や、細胞質側膜表面の性状、Connexon 蛋白の分子量、抗原性などが異なることから、心筋など活発な電氣的興奮伝達に関与するものと、代謝連関などにかかわる一般のものとは、GAP 結合を構成している Connexon 蛋白が相違するものと推測される。

WPW 症候群における副伝導路逆伝導様式の検討

加藤貴雄，小林義典，斉藤寛和，井野 威，新 博次，早川弘一（日本医科大）

目的： WPW 症候群において興奮が副伝導路を逆行する際、ここに伝導遅延を生じ得るか否

か、その頻度・特徴はどうか、などについては未だ不明の点が少なくない。本研究の目的は、WPW 症候群の臨床例においてこれらの点を電気生理学的に調べることにある。

対象および方法：電気生理学的検査を行った overt WPW 症候群のうち、右室電気刺激の際の心房電位の興奮順序の分析から、興奮が副伝導路を逆行していることが証明された15例（A型10例、B型5例）を対象とし、右室ペースングおよび右室期外刺激時の興奮伝導様式を検討した。心内電位記録は、右室心尖部、ヒス束、冠静脈洞近位・遠位、右房高位・中位・低位の各部にて行い、食堂誘導ならびに体表心電図を同時記録し、各部位間の伝導時間を計測した。

結果：右室期外刺激法により室房伝導曲線を作成するに、A型10例中3例、B型5例中3例、計6例に伝導遅延の所見を認めた。この際副伝導路を含む室房伝導様式をみるため、 A_1 A_2 時間はA型では冠静脈洞遠位、B型では右房低位の心房波を計測に用いた。次にこの6例につき伝導遅延部位を検索するため、A型は右室心尖部の心室波（Vapex）、冠静脈洞遠位部の心室波（VcSD）およびその心房波（AcSD）の3点、B型はVapexのほか、右房低位の心室波（VLRA）心房波（ALRA）をそれぞれ計測した。その結果、主たる伝導遅延部位はA型3例中1例でVapex-VcSD、2例はVcSD-AcSDにあり、B型では3例中2例がVapex-VLRA、1例がVLRA-ALRAに存在することが判明した。すなわち、A型のVcSD-AcSD、B型のVLRA-ALRA時間はそれぞれ副伝導路の逆伝導時間に最も近い値を示すと考えられることから、ここに延長を示すA型2、B型1例では、副伝導路内に伝導遅延が起っている可能性が強いと判断された。なおこの3例における室房有効不応期は 237 ± 15 msecで、伝導遅延のない群の 326 ± 51 msecに比して有意に短縮していた。副伝導路の順行伝導に関しては、房室伝導曲線上伝導遅延を示したものはなく、かつ有効不応期も300msec前後と一定であった。また上室性頻拍の電気的誘発率は、伝導遅延例では83%に達し、非遅延例の50%に比して高かった。

総括：WPW 症候群における副伝導路逆伝導の際、ここに伝導遅延を示す例が存在し、これらの例の室房有効不応期が有意に短いこと、および上室性頻拍の電気的誘発率が高いことが示され、上室性頻拍の機序と副伝導路内伝導遅延の関連性が示唆された。

β-受容体を介するNaチャンネルブロック

久留一郎, 有田 真 (大分医科大)

細胞外液 K^+ 濃度を増加し (8.1~14.9mM)、モルモット心室乳頭筋の静止電位 (E_m) を脱分極させると、活動電位立ち上がり相が抑制され、その最大立ち上がり速度 (V_{max}) は residual fast channel の活動による $V_{max, fast}$ と slow channel の活動による $V_{max, slow}$ の二つの成分に分離して記録される。これらに対して catecholamine (isoproterenol 及び noradrenaline) を作用させると $V_{max, slow}$ は増加するが、同時に $V_{max, fast}$ が抑制される。今回はこの catecholamine によ

る $V_{\max, \text{fast}}$ の抑制機序を明らかにした。

方法：モルモット心室乳頭筋を異なった K^+ 濃度の酸素加 Tyrode 液で灌流し、膜を脱分極させた。電気刺激は標本基部にあてた輪状電極により、0.2Hz の頻度で行った。活動電位は微小電極により記録し、その一次微分波形を求めた。また $V_{\max}-E_m$ 曲線は Beeler & Reuter の式 ($V_{\max}=V_s / \{1+E_{\text{exp}}[(E_m-E_i)/S]\}^2$) により computer を用いて実験値に最も良く合致する曲線として求めた。

結果：isoproterenol(ISP) $10^{-7}M$ は深い膜電位では $V_{\max}$ を変化させず、浅い膜電位 ($\geq -74mV$) における $V_{\max}$ を抑制した。また $V_{\max}-E_m$ 曲線は 2.2mV 有意に過分極方向に偏移した。同様の偏移は、 Ca^{++} 拮抗剤、l-verapamil (1ug/ml) 存在下でも生じたが、 β 遮断剤、pindolol (1ug/ml) または atenolol (15ug/me) 存在下では全くみられなかった。次に K^+ 濃度を $13.5mMK^+$ に固定し、l-verapamil, pindolol 存在下、非存在下で ISP による $V_{\max, \text{fast}}$ 抑制の濃度依存性 ($10^{-8} \sim 10^{-6}M$) を検討した。no treatment では ISP は $V_{\max, \text{fast}}$ を濃度依存性に抑制した。一方 l-verapamil 存在下ではこの抑制はさらに顕著となったが、pindolol が存在すると ISP 最大濃度 ($10^{-6}M$) でも抑制は認められなかった。 α 遮断剤、phentolamine $10^{-5}M$ または α 刺激剤、phenylephrine $10^{-5}M$ が存在しても ISP による $V_{\max, \text{fast}}$ の抑制には変わりなかった。ISP のかわりに theophylline 4mM 作用させたとところ ISP のときと同様に $V_{\max, \text{fast}}$ は抑制され $V_{\max}-E_m$ 曲線は過分極方向に偏移した。

総括：脱分極により抑制された $V_{\max, \text{fast}}$ の catecholamine による抑制は、 $V_{\max}-E_m$ 曲線の過分極側への偏移で説明できる。この偏移は slow inward current ($V_{\max, \text{slow}}$) の増加を介する二次的効果 ($[Ca]_i$ 増加による膜内側の negative charge の減少など) ではなく、 β 受容体を介して c-AMP が増加したことによる直接的効果であり、この効果発現には α 受容体は関与していないことが判明した。この β 受容体を介する Na^+ channel 抑制作用は遅い伝導を担当する ion channel の切替え (residual fast channel から slow channel へ) に重要な役割りを果たすと考えられる。

心臓の発生進化と細胞間結合

平光厲司 (埼玉医大)

進化というのは、種 species が過去 (地質学的年代) にたどった歴史であり、発生とは現代の暦時間上で経過する個体の歴史である。通常、前者を系統発生 phylogeny、後者を ontogeny という。心臓のような器官は、当然のことながら、化石として残らないから本来の系統発生を知るわけにはいかない。ただ、現在生きている動物の成体や胚を比較することによってそれを類推することができるのみである。

まず、脊椎動物の個体発生をながめてみると、心臓形成は、体腔形成の部分現象であることがわかる。すなわち側板中胚葉が、形態形成運動によって、背側から腹方へ移動してきて前腸腹側で癒合し、ここに生じた体腔を囲む被覆臓側葉から心臓の壁ができる。この段階の心臓は、ほぼ単層の上皮から成る槌状の構造物であって、この上皮細胞のなかに収縮要素（筋細線維）が出現し、拍動を開始する。この状態は、いくらか変異はあるが、すべての脊椎動物に共通している。このことから「心臓はもともと血管壁の一部がふくらんで特殊化した」というようなものではないことがわかるであろう。

そこで次に、系統発生を類推するために、脊椎動物に近縁で、さらに原始的であるとみなされている原索動物に眼を転じてみると、ここでは“血液”循環の原動力となっている（心臓に相当する）構造物は、成体の状態でまさに体腔被覆の臓側葉そのものであることがわかった。尾索類に属するホヤでは、“心臓”が単層上皮から成る管であってこの細胞には横紋をもった筋細線維がふくまれている。これに対し、頭索類のナメクジウオには、脊椎動物の心臓に匹敵するような血管も心臓もない。しかし、“血液”を循環させる装置はある。それは少なくとも、内柱、腸、“肝”を覆う体腔上皮の一部がその役割をになっていることは確かである。すなわち、これが最も原始的な体液循環の姿なのであろう。これがやがて前腸腹側部に局限したものが脊椎動物の心臓と考えられる。

上にのべた原始“心臓”はすべて上皮からできている。これまで調べられた限り、ここには上皮特有の頂上部閉鎖結合と、筋細糸を付着する接着部とデスモゾーム、それに小面積ながら凍結・切断レプリカで nexus 様の膜内粒子配列を示すところがかならず認められた（ナメクジウオはまだ凍結切断レプリカで観察されていないが）。これらのことから、原始的な心臓においても、細胞間結合要素はすべて備わっていることがわかる。

Entrainment について

松尾博司（東京大・医）

ここで述べる entrainment は、頻拍を停止させる目的で行う高頻度心臓刺激、いわゆる overdrive pacing 時に、頻拍のレートが pacing のレートに一致して速くなるが、pacing をやめると再び元の頻拍が本来のレートで再開する現象を言う。Entrainment のメカニズムは十分には明らかではないが、entrainment が頻拍の発生機序を明らかにする可能性がある。以下、自験例について検討した。

(1) 心房粗動：臨床例 5 例全例に entrainment を認めた。Pacing 部位と電位記録部位の位置的関係により、pacing 中止直後の心房局所周期に差を認めたため、イヌに実験的心房粗動を作成して検討した。Entrainment 中の興奮伝播経路は頻拍中と同じで、各 pacing 刺激は興奮旋回路に入

り込み, orthodromic および antidromic に進行するが, 後者は先行興奮と途中で衝突して消滅し, 前者は先行興奮のあとを追って同じ経路を巡回した。Pacing 中止直後の周期を記録部位ごとにみると, 刺激部位からみて, 興奮巡回路の上流に相当する部位の周期は pacing 周期から直ちに元の頻拍周期に戻るのに対し, 下流に相当する部位では元の 1 周期に戻る前に周期だけ延長した。

(2) WPW 症候群の circus movement tachycardia: 6 例全例で, 心房 pacing に伴い entrainment を認めた。Pacing 中止直後の周期をみると, pacing に反応して頻拍時と異なるタイミングで興奮する部位 (高位右房や His 束心電図上の心房波, 時に左房) は, 元の頻拍周期に戻る前に 1 周期だけ延長を示したが, 1 つ前の pacing 刺激に反応する His 束や心室は pacing 周期から直ちに頻拍周期へ移行した。

(3) 心室頻拍: 心室早期刺激で誘発された心室頻拍 2 例で, 心室 pacing による entrainment を認めた。Pacing 周期の短縮とともに QRS 波形は変化した。しかし pacing 中止直後の周期は pacing 周期の短縮とともに延長した。次にイヌ心室局所にアコニチンを注入して作成した心室頻拍 4 例に心室 pacing を行った。心室の興奮伝播過程は, 頻拍時アコニチン投与部位より, pacing 時刺激部位より, それぞれ放射状に広がり, pacing 時の QRS 波形は周期の変化によらず常に一定であった。Pacing 中止直後の周期は臨床例と同様延長したが, アコニチン投与局所の周期は直ちに元の頻拍周期に戻っていた。

Entrainment はリエントリー型でも自動能亢進型頻拍でも認められるが, pacing レートの増加とともに心電図波形が変化し, pacing 中止直後の波形は直ちに元の頻拍時に戻るが周期は pacing 時と同じであれば, この頻拍はリエントリー型であると考えられた。

抗不整脈剤その他による時間依存性活動電位立ち上り速度抑制について

伴 隆志 (山口大・医)

心筋組織における活動電位立ち上り速度 (V_{max}) の抑制作用は抗不整脈剤の重要な作用機構の一つである。この抑制作用は多くの抗不整脈剤について高頻度側で増強する特性があり臨床的にも意味のある作用と云われている。Hille ら, Hondeghem and Katzung らの modulated receptor model によれば各抗不整脈剤は Na channel の open (活性化 parameter $1 \gg m > 0$, 不活性化 parameter $1 \gg h > 0$) 乃至 inactivated ($h = 0$) の状態で Na channel に強い親和性を示し closed の状態 ($m = 0, h = 1$) で affinity は減弱すると考えられている。従って活動電位の立ち上り期及び活動電位持続期に形成が促進された Na channel 内受容器—薬物複合体 (D-R complex) は刺激間期に次第に減少し最終的には抑制作用は消失乃至頻度非依存性の最小限の抑制を残すのみとなる。刺激間期における抑制消失過程を検討するには先行する刺激の影響を受けぬよう出来るだけ低頻度の反復刺激 (本報では 0.027 Hz) を行い, この間に種々の時間間隔を

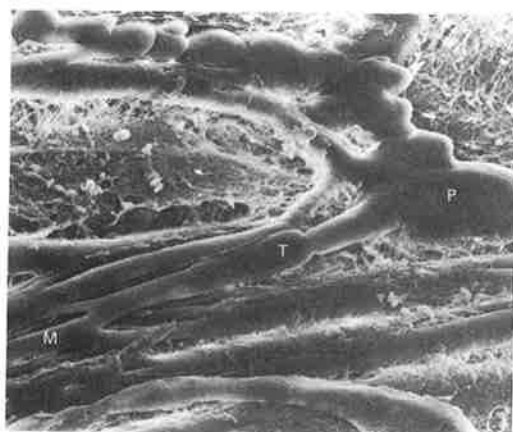
もって早期刺激を挿入しその $V_{\max}$ と正規刺激（条件刺激）による $V_{\max}((V_{\max})_{\text{cond}})$ の比を時間に対して plot する。薬物非存在下には150msec 以内に完全に回復する早い成分が顕著であるが、薬物存在下には通常それ以後にもう一つの成分が明瞭となる。この時定数 τ は用量により多少異なるがほぼ薬物個有の値を示す。他方この成分を活動電位再分極の終期に外挿した $V_{\max}$ の相対値 $(V_{\max})_t=0/(V_{\max})_{\text{cond}}$ は活動電位 1 個あたり形成された D-R complex の量にほぼ対応すると考えられる。 τ より短い刺激頻度の反復刺激は D-R complex 量の蓄積を来し、これが頻度依存的 $V_{\max}$ の抑制を来す原因となると考えられている。ある刺激頻度で定常状態にあるとき $V_{\max}$ の抑制は活動電位 1 個あたりの D-R complex 形成量を一定とすれば $(V_{\max})_t=0/(V_{\max})_{\text{cond}}/(1/\tau - 1)$ で表わされる筈である。但し DI は活動電位終期より次の活動電位発生までの時間である。演者は $V_{\max}$ 抑制の分子機構を明らかにする目的で一連の構造類似の β 遮断薬について同作用を検討しているが、これら化合物に関して 4 Hz における $V_{\max}$ 抑制度と上記計算結果との間に非常によい相関のあることを見出した。計算値はすべて実測値よりも大きいがこれはこれら化合物が活動電位発生中すなわち Na channel の open 乃至 inactivated の状態で生ずる D-R complex 形成が 4 Hz において 0.027Hz よりも減少することを示唆するが同時にその減少様式が一連の構造類似体に関しては同一であることを示唆するものとして興味深い。

プルキンエ，心室筋接合部の形態

島田達生（大分医大）

ヤギの心室に於けるプルキンエ細胞と通常の作業心筋（心室筋）間の移行（P-M region）が形態的に調べられた。光顕と透過電顕に於いては内皮に対して水平断の切片で P-M region が見出された。走査電顕に於いては内皮と内皮下の結合組織が化学的に除去された。プルキンエ細胞は心室筋の細胞と比べて 3～4 倍大きく、その細胞質は辺縁に集中した筋原線維と大量のグリコーゲンの存在によって特徴づけられた。又 T-tubules はない。P-M region は大まかに二種類の形態が識別された。I 型は大型で卵円型のプルキンエ細胞が序々に小さくなるとともに形も帯状の心室筋へと移る。II 型は大型のプルキンエ細胞が急に径を減じ、帯状の心室筋に変化する。I 型に於ける特徴はプルキンエ細胞と心室筋の中間の径をもつ細胞が存在することで、この細胞は比較的筋原線維に富んでおり心室筋と近似であった。しかしながら筋原線維の配列が部分的に乱れており、ミトコンドリアの配列も規則性はなかった。又 T-tubules を欠いていることから心室筋と区別できた。この細胞はいわゆる移行型のものと考えられる。I 型に於いて一つのプルキンエ細胞は一つの心室筋細胞とではなくて 3～4 個の細胞と連結していた。プルキンエ細胞—移行型細胞—心室筋細胞及びプルキンエ細胞—心室筋細胞間の結合はいずれもデスモゾームや gap

junction によって互に結ばれていた。

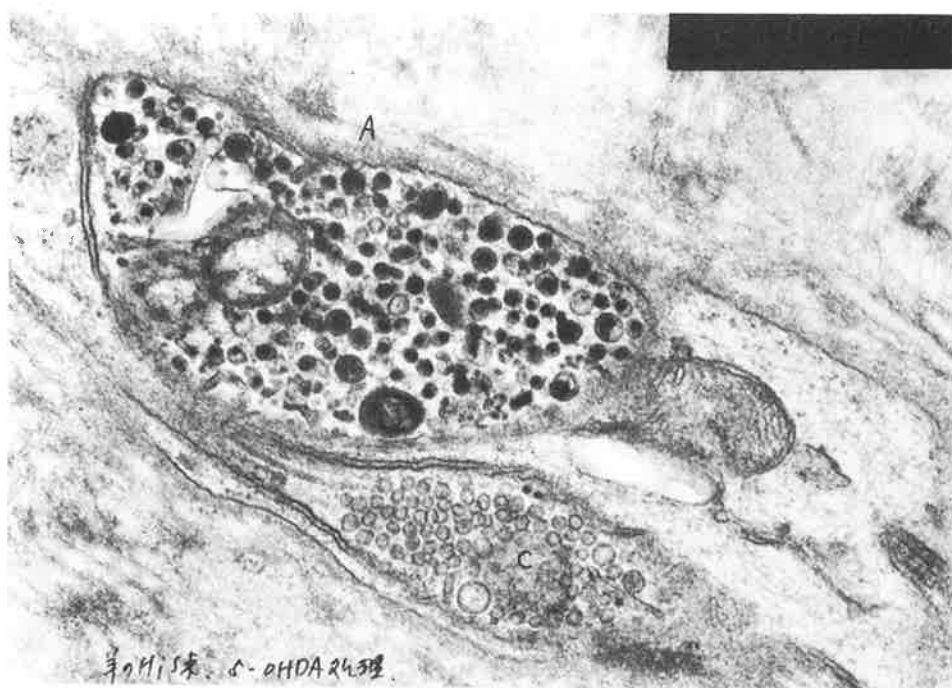


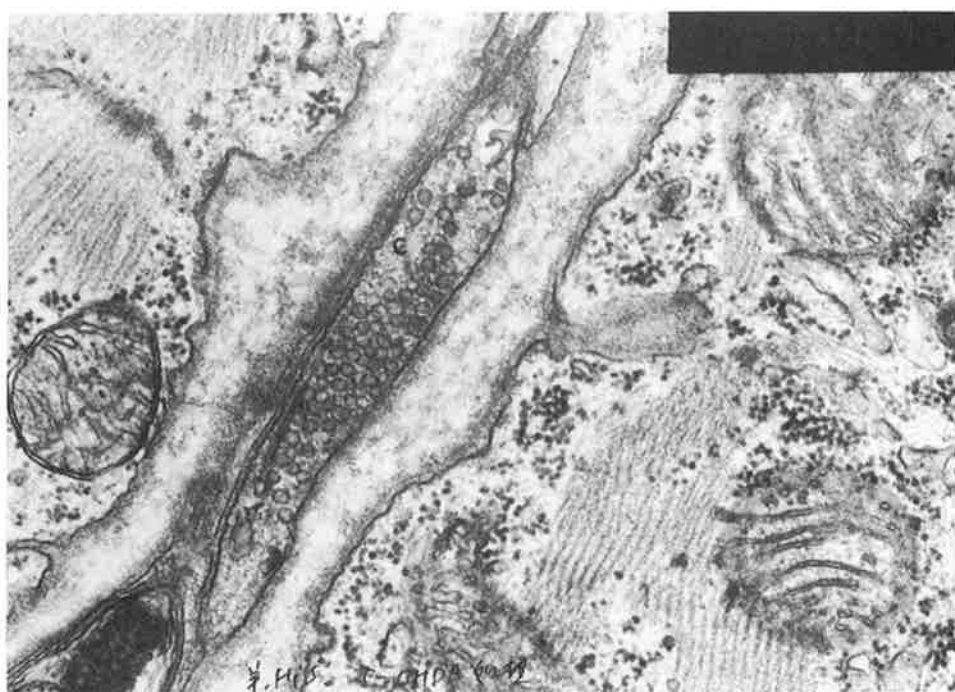
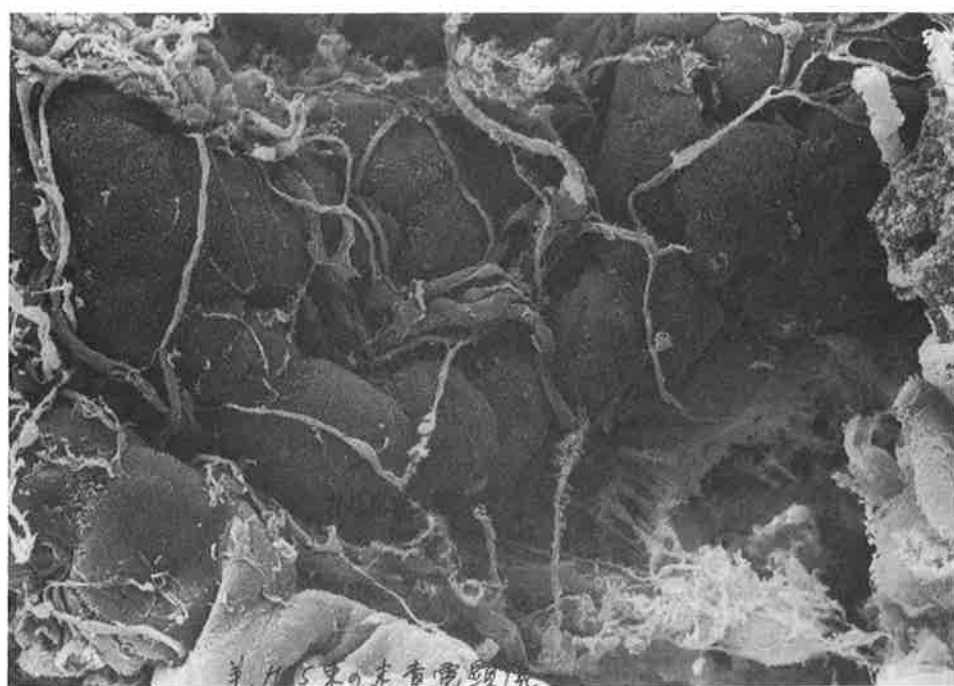
I 型

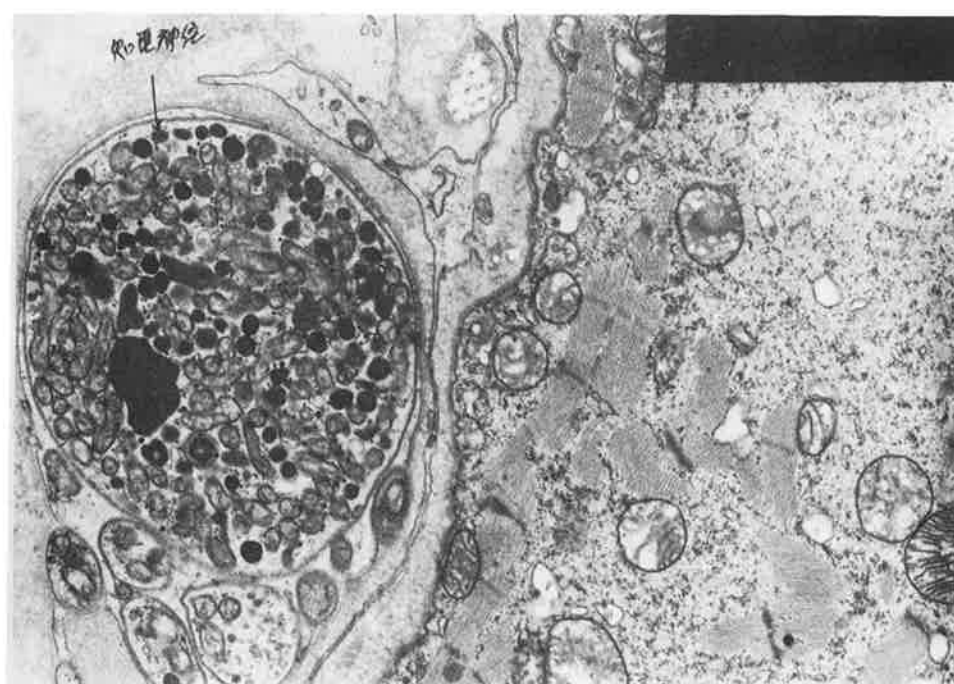
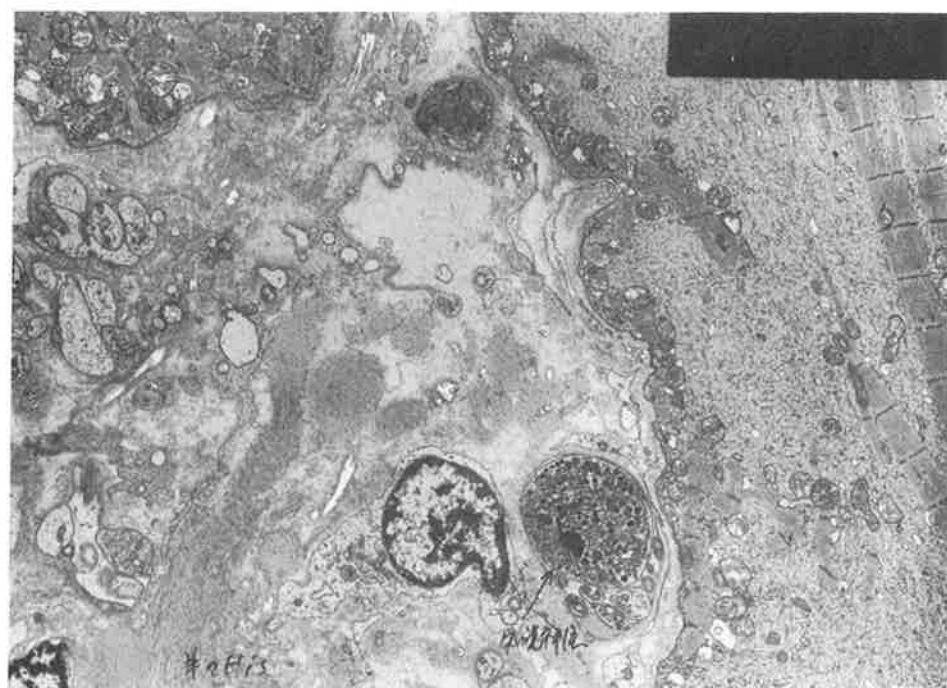


II 型

P：プルキンエ細胞, T：移行細胞, M：心室筋







『睡眠促進物質研究会』

昭和59年10月25～26日

- 〔代表者〕 井上昌次郎（東京医科歯科大学）
内菌耕二（生理学研究所）
山岸俊一（生理学研究所）
尾崎 毅（生理学研究所）
菰田泰夫（東京医科歯科大学）
本多和樹（東京医科歯科大学）
岡野泰久（東京医科歯科大学）
長崎紘明（山梨医科大学）
井之口昭（九州大学）
高橋康郎（東京都神経科学総合研究所）
鳥居鎮夫（東邦大学）
A.A. Borbély（チューリッヒ大学）
I. Tobler（チューリッヒ大学）
M.V. Graf（バーゼル大学）
A.M.A. van Dijk（バーゼル大学）
J. Adrien (INSERM)
J.A. Horne（ラフバラ大学）
J.M. Krueger（ノースシカゴ大学）
L.M. Mukhametov（ソ連科学アカデミー）
Liu Shiyi（マックスプランク研究所）

会の概要

睡眠促進物質研究会は、昭和58年度までは睡眠促進物質（SPS）を研究するわが国の研究者グループ、すなわち生理学研究所、東京医科歯科大学医用器材研究所、山梨医科大学に所属する小人数の4つのグループが、それぞれの研究成果を持ち寄り、なかば非公開形式で徹底的な討論をするのを常としてきた。この理由は、SPSが化学的に未同定であり、中間の研究成果が他研究機関に先取りされないよう秘密にする必要があったためである。そのおかげで、それまでの10年余りの努力が実り、昭和59年初頭にウリジンがSPSの有効成分4種のうち1つであることをつきと

め、公表することができた。

この間に睡眠物質の研究は着実に進展し、国内外で多くの候補物質が報告されるようになった。そこで、今年度はSPSに限らず、睡眠に関連のある物質の研究を進めている第一線の専門家を一堂に招いて、この分野の最先端の研究成果を検討しあい、未知要素の多い睡眠機構と睡眠物質の作用の解明をめざすことにした。これは、SPS研究の成果が国際的にも評価され、SPSに対する内外の研究者の関心がきわめて高くなってきたことと、世界各国の一流の睡眠物質の専門家が谷口シンポジウム出席のためまとまって訪日中であったこととを勘案したタイムリーな企画といえよう。

このようなわけで、本会は公開のパネル・ディスカッション方式で開催された。睡眠修飾作用のある活性物質の化学的特性・抽出法・合成法・生理効果・脳内機構・個体発生・遺伝・系統発生・存在意義などさまざまな問題について Horne, 菰田, 長崎, Mukhametov, Adrien, Borbély, 井上らの話題提供をもとに、全員が活発に議論に参加した。また、海外からの参加者にとっては岡崎の優れた研究環境に接することが特に意味があると考えられたので、内菌, 山岸, 尾崎らによって生理学研究所の概要が紹介され、さらに所内の主要研究設備を見学するプログラムも組み込まれ、ともにたいへん好評であった。

『各種臓器におけるブドウ糖分子受容識別機構と生理機能発現に関する研究』

昭和59年12月1日

グルコースによるインスリン分泌におけるCキナーゼの役割

仁木 厚（愛知学院大・歯）

アロキサンによるラット肝・膵グルコキナーゼの阻害

三輪一智，原 弘，奥田 潤，（名城大・薬）

自立神経活動よりみた脳幹に存在するグルコースセンサーとその役割

新島 旭（新潟大・医）

グルコース受容ニューロンの膜特性

大村 裕（九州大・医）

各種甘味物質に対するマウス味覚神経応答の重金属塩による抑制

佐藤昌康，岩崎一生（東京都神経研）

甘味受容の分子機構

栗原堅三（北大・薬）

骨格筋におけるNa依存性グルコース輸送系の3-O-Methylglucoseに対する親和性

北里 宏，丸中良典（滋賀医大）

小腸の糖質消化吸収機能における部位差の検討

竹内竜男（鳥取大・医），笠木 健（鳥取大・医療短）

味覚における甘味抑制物質のグルコース腸管吸収におよぼす効果

吉岡伸一，井元敏明，山田博子，日地康武（鳥取大・医）

糖吸収担体（糖・Na⁺共輸送体）の研究の今後の問題点

星 猛（東大・医）

消化管内分泌細胞の化学受容

藤田恒夫（新潟大・医）

大腸菌の糖に対する化学感覚

林 博司（名大・理）

代表者 仁木 厚

ブドウ糖に対して特有の生理反応をもって応ずる中枢神経，味の味細胞，吸収と内分泌にたづさわる腸管，骨格筋および膵B細胞，さらに走化現象を示す大腸菌を研究対象としている研究者24

名が、昭和59年12月1日、午前9時より生理学研究所145号室に集まり、別紙のプログラムに従って報告と討議を行った。

今回は、特に上記諸細胞の間の共通性と相違点に重きをおいた討論がなされ、実りの多い成果が得られた。さらに諸細胞のブドウ糖受容から生理反応までの各段階に、なお不明な点の多いことが確認され、来年度も同様のテーマで研究会をもつことか決められ、午後5時に会を終った。

グルコース受容ニューロンの膜特性と視床下部および延髄のグルコース応答性

大村 裕（九州大・医）

生体の重要な営みである摂食行動を調節するために、エネルギー源として重要なグルコースのレベルをモニターする機構が存在するとはきわめて妥当である。事実中枢神経系では、視床下部及び脳幹において、グルコースセンサーの存在が明らかになって来ている。まずグルコースの全身投与により、摂食中枢である視床下部外側野（LHA）、および満腹中枢である腹内側核（VMH）のニューロン活動が変化することが報告された。続いて、電気浸透圧的にグルコースを投与できる、多連微小電極法を用いた単一ニューロン記録において、LHAにはグルコース投与でその活動が抑制されるグルコース感受性（GS）ニューロンが、一方VMHにはグルコース投与でその活動が亢進するグルコース受容（GR）ニューロンがそれぞれ約25%存在することが明らかになった。

今回我々は、モルモット視床下部薄切切片を用い、細胞内記録を行い、VMHブドウ糖ニューロンのブドウ糖に対する電気生理学的な特性を検討した。灌流液として、高濃度グルコース液（20～30mM）と、ショ糖で浸透圧をそれぞれ補正した標準液（グルコース10mM）及び低濃度グルコース液（0～3mM）を用いた。また、静止電位50mV以上、活動電位50mV以上、30分以上安定した記録のえられた細胞についてのみ検討を加えた。灌流液を低濃度から高濃度液に変化すると、14個中3個（21%）のニューロンで、8—13mVの脱分極と約1.5倍の入力抵抗の増大がみられた。反応のあったものでは、標準液と高濃度液の膜電位等の差は余り認められなかった。正常の血等値（5.5mM）より、標準液のグルコース濃度が10mMと高値であり、すでに反応の飽和へ近づいているためであろう。また、グルコース高濃度時と低濃度時の電流—電圧曲線をえがいてみると、その逆転電位は平均—89.5mVであった。以上の結果より、グルコース受容（GR）ニューロンにおけるブドウ糖による脱分極は、Kのコンダクタンスを減少させることによると想定できる。

さらに、同時に併行して検討した58個のVMHニューロンを、電気生理学特性と形態学的特徴により、A、B、C、の3種類のタイプに分類したが、上記のグルコース受容（GR）ニューロンは、Cタイプと一致した。このニューロンの特徴は、他2種のタイプと異なり、活動電位の後に

大きな過分極をとめない、発火頻度が規則的でゆっくりしており、また VMH の核内外側端の刺激に対して、EPSP-IPSP の反応を示した。形態学的には、他のタイプより大きな細胞体（直径約 12μ ）と細胞体から出る 4 本以上の豊富な樹状突起と分枝を有していた。これらの特徴は、これまで報告されたグルコース受容（GR）ニューロンの特徴とほぼ一致している。一方グルコースに無反応のニューロンの形態の特徴（A 型、B 型）は細胞体が直径 10μ で、紡錘型であり、主樹状突起が 2 本しかない。

脳幹でのグルコースセンサーの存在の可能性は、グルコース類似物質の第 4 脳室投与や延髄弧束核（NTS）への局所投与により、摂食誘発や胃酸分泌亢進の起こることから示唆されていた。ラット延髄薄切切片を用いた研究により、NTS ニューロンの約 20% が GS ニューロンであり、約 7% が GR ニューロンであることが判明した。GS ニューロンはグルコース投与で膜抵抗の変化しない膜電位変化を起こし、解糖系阻害剤で細胞間 ATP 枯渇を引起こす 2-deoxy-D-glucose で興奮することから、LHA の GS ニューロンと同様に Na-K ポンプの活性化に基づく反応と考えられた。一方、NTS の GR ニューロンは VMH のそれと同様に入力抵抗の増大と伴う脱分極応答を示し、K コンダクタンスの減少による反応と考えられた。また、同様の GR ニューロンの存在は迷走神経背側運動核にも発見された。NTS の GS ニューロンはブドウ糖非感受性ニューロンに比し、細胞体が大きく多くの樹状突起を有することが HRP 法の併用により確認された。VMH の GR ニューロンと同様に NTS ニューロンも機能的にも形態的にも特異的な性質を有すると考えられる。また、NTS GS ニューロンは第 4 脳室および脳血液関門を欠く最後野に隣接した尾側部に多く存在し、血中・髄液中の代謝産物をモニターする位置にある。一方、NTS の吻側部は味覚情報を受け、尾側部は内臓臓器からの入力情報を受け、迷走神経出力系である迷走神経背側運動核・疑核ならびに交感神経出力系の脊髄側角とも連絡を有している。事実、肝門脈に存在する GS ユニットからの情報は NTS GS ニューロンへの収束することが *in vivo* の実験から立証されている。さらに、NTS を起始核とする腹側ノルアドレナリン束を經由して LHA GS ニューロンへ末梢情報が入力することも確認されている。

このように、末梢の肝門脈や小腸壁内に存在するブドウ糖受容装置からの情報は延髄 NTS への収束し、NTS から迷走神経あるいは交感神経を介した反射性の代謝調節が営まれる。一方、NTS を介する情報はさらに LHA や VMH のブドウ糖応答ニューロンへ送られ、この両中枢を中心としたマクロ神経回路網を介して高度で複雑な摂食調節機能を形成するという一連の階層性構造が存在すると考えられる。

各種甘味物質に対するマウス味覚神経応答の重金属塩による抑制

佐藤昌康（東京都神経研）

I. 重金属塩の甘味抑制作用

4種類の味刺激、特に甘味刺激に対するマウス鼓索神経応答が、各種重金属塩によってどのように抑制されるかを調べ、甘味物質と受容体との反応機序について考察した。

- 1) 0.01~0.1mM CuCl_2 , ZnCl_2 によってショ糖、サッカリンに対する神経応答は20~70%抑制されるが、他の味刺激に対する応答は、ほとんど抑制されない。
- 2) ショ糖濃度と応答の大きさの逆数プロットによって、ショ糖と味覚受容膜との反応に対するCu, Znイオンの作用はショ糖分子との競合的抑制であることがわかった。
- 3) ショ糖、マルトース、果糖、ブドウ糖の応答は、その大きさが0.1mM CuCl_2 によって約75%, 0.1mM ZnCl_2 によって約50%抑制され、糖の種類によって抑制効果には差がみられなかった。このことから、各種の糖と結合する受容体のサイトは、共通であることがわかる。
- 4) MnCl_2 , CoCl_2 , FeSO_4 は、1mMの濃度で、ショ糖、サッカリン、キニーネ、食塩に対する応答をわずかに抑制した。 CdCl_2 はすべての味刺激に対する応答をある程度抑制するが、甘味応答の抑制効果は、Cu, Zn塩に比べて弱い。
- 5) 各種重金属塩による糖応答の抑制効果は、 $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Cd} > \text{Co} \approx \text{Fe} \approx \text{Mn} > \text{Ni}$ であった。

II. 甘味受容蛋白質の検出

ショ糖の約10倍の甘味度をもつ蛋白質、タウマリン（分子量、約2万）を、光アフィニティーラベル法を用いてカンクイザル有郭乳頭と結合させ、組織を可溶化した後、SDS-PAGEによってラベルされた蛋白質の存在を調べた。その結果、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液で抽出される分画に、70Kの位置に一致して特異的な放射活性が検出された。この放射活性のピークは、味蕾を含まない糸状乳頭に由来する分画には存在しない。したがって0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液で抽出された、有郭乳頭由来の分画中の70Kのピークは、甘味受容体とタウマリンとの複合体である可能性が強い。

糖吸収担体（糖・ Na^+ 共輸送体）の研究の今後の問題点

星 猛（東京大・医）

小腸、近位尿細管における糖の能動的な吸収に本質的な役割を果たしている糖、 Na^+ 共輸送体の研究は、現在その分子的構築の解析と、担体分子内での Na^+ と糖の流れの連結の問題に焦点が

当てられているように思われる。分子構築に関しては、我々(Kano-Kameyama & Hoshi, 1983)も小腸刷子縁膜より抽出した蛋白を分画してリポゾームに埋め込み、輸送系を再構成して Na^+ 依存性 overshoot uptakeを機能的指標として担体蛋白を同定することを行った。その結果、ゲル濾過法では共輸送機能をもつ蛋白は分子量300K~350KDaの分画に見られ、更にその分画をchromatofocussing法で分けると、pH 5.0~5.5で溶出される160KDaの糖蛋白として確認された。ごく最近のLin et al (1984)の改良された電子ビームによる照射不活性化実験によると共輸送機能をもつ分子は 345 ± 24 KDaである事が示されている。Malathi & Preiser (1983)も再構成法で160K~165KDaと報告しているが、恐らく膜では160K~165KDaのmonomer 2つよりなるdimer構築をとっているものと想定される。一方従来から刷子縁膜のD-glucose或はphlorizin結合蛋白として、thiol基又はamino基修飾、photoaffinity labeling法、親和性クロマト法などで同定されているものは30K, 50K~60K, 70K~72KDaのより小型の分子である。我々(Katayama & Hoshi 投稿中)もthiol基, amino基修飾及びphlo-rizin-polymerを用いた親和性クロマト法により、刷子縁膜よりの抽出蛋白中のD-glu-cose, phlorizin結合蛋白の同定を試みた結果、30~40K, 45K, 70~90K, 100~150KDaの4つの分子が3つの異なった方法によって共通に確認された。このことは、糖・ Na^+ 共輸送担体monomerは更に複数の糖(又はphlorizin)結合部を有するsubunitよりなる複雑な構造のものであることを示唆している。

担体分子内の Na^+ 、糖分子の流れの連結の問題については、当初Craneの提唱した三者複合体の膜内拡散モデルが長く支持されてきたが、前述の如き担体分子の構築や性質から可動担体の考えは信じ難い。のみならず、 Na^+ ・糖のstoichiometryも最近の研究では必ずしも1:1ではなく、条件により連結比は1~3の間の値をとり、variableであることが示されている。一方担体を通る Na^+ の流れは、糖が外側より担体に結合すると開門(コンダクタンスの上昇)するチャネル様の透過路を通るものとして説明でき、その際の Na^+ 電流は膜内外の Na^+ の駆動力($E_m - E_{\text{Na}}$)によって規定される。従って開門と共に流れる Na^+ と担体分子内のチャネル(又は細孔部)で何等かの機序で等分子と相互作用し、糖の担体内透過を促進するものと思われる(Hoshi, 1984)。今後はこの単一担体内を流れる Na^+ 流れを更に最新の電気生理学的手法を用いて明確にすると共に、糖分子との相互作用を微視的にかつ定量的に研究する方法論の開発によって解明することが望まれる。

グルコースによるインスリン分泌におけるCキナーゼの役割

仁木 厚, 仁木初美, 玉川達雄(愛知学院大・歯)

膵B細胞内の情報伝達機構としては、従来より細胞内外の Ca^{2+} の移動と、cAMPの増減が注目されてきた。最近、西塚らによって見出されたCキナーゼは、種々の細胞における情報伝達に重

要な役割をはたしていることが知られているが、グルコースによるインスリン分泌にどのような関与をしているかはまだ明らかでない。私共は正常ウイスターラット膵よりコラゲナーゼ法で分離した膵島を用い、この点につき検討を加えた。

Cキナーゼ活性は、細胞膜においてホスファチジルイノシトールより産生されるジアシルグリセロール (DG) により調節されるか、ホルボルエステルの1つである TPA は、この DG の作用を代行することが知られている。TPA は16.2nM で有意に、162nM では著明に孵置膵島よりのインスリン分泌を刺激した。このインスリン分泌は、日高らによって合成されたCキナーゼ阻害剤である H-7 により阻害され、膵島インスリン分泌にもCキナーゼが関与しうることが示唆された。また膵島周辺灌流においては、TPA はインスリン分泌を1相性に刺激し、同時にわずかではあるが膵島よりの Ca^{2+} efflux を増加させた。H-7 はこの両者を抑制した。

一方、H-7 (50, 100 μM) は、10mM グルコースによるインスリン分泌に対しては、抑制効果を全く示さなかった。この結果はグルコースによるインスリン分泌機構には、Cキナーゼ系は大きな役割をはたしていないことを示唆する。しかしH-7 は、10mM グルコース存在下においては TPA を添加して増幅されたインスリン分泌に対しても、抑制作用を示さなかった。すなわち、高濃度グルコースは、H-7 のCキナーゼ阻害作用が発現しにくい状況を作り出すものと考えられる。日高らによれば、H-7 は他のCキナーゼ阻害剤とは異なり、酸素蛋白に直接作用するとされ、その作用部位は同酸素のATP結合部位であろうと考えられている。したがって高濃度グルコースによって膵B細胞内のATP量が増加した状況下では、H-7 の阻害作用は発現しにくいとも考えられ、今回の実験結果の解釈にはなお検討の必要がある。

次に、グルコースによるインスリン生合成におけるCキナーゼの役割を検討するため、比較的低濃度 (3mM, 5.5mM) グルコース存在下におけるインスリン生合成に対するTPAの影響をみたところ、TPAはなんらの作用も示さなかった。またこの際生成されるプロインスリンとインスリンの比にも影響がなく、プロセッシングの過程においてもCキナーゼが大きな役割をはたしているとは考えられない結果がえられた。

自律神経活動よりみた脳幹に存在するグルコースセンサーとその役割

新島 旭 (新潟大・医), 足立 明 (岡山大・歯)

大村、足立らの最近の研究により脳幹の孤束核、迷走神経運動核、最後野などには主としてグルコース感受性ニューロンと少数のグルコース受容性ニューロンが存在することが多連微少電極使用により明らかにされた。

われわれは、除脳ラットを使用して、これらのグルコースに感受性をもつニューロンの出力が迷走神経および交感神経の各分枝の遠心性神経活動にどのような影響を与えるかを観察した。

1) 副腎神経：副腎神経は副腎髄質からのカテコールアミン分泌を調節することにより血糖に影響を与えることが知られている。迷走神経を横隔膜下で切断して内臓からのグルコース神経情報を遮断した除脳ラットでグルコース200mg/kgを静注すると副腎神経の遠心性活動の抑制がみられる。グルコース代謝を阻害する2-デオキシグルコース(2 DG, 200mg/kg)を静注すると、遠心性活動はグルコースとは反対に増加を示す。橋で脳幹を切断したラットでも反応は同様であるが、延髄下端で切断、あるいは胸髄切断ラットでは、グルコース、2 DGの投与は無効となった。また、迷走神経切断、除脳ラットでも、グルコース投与、2 DG投与は副腎神経活動を変化させるが、さらに最後野を破壊すると、これらの物質の投与効果はみられなくなる。

以上の実験から除脳動物でも最後野が正常に機能している場合は血中に投与されたグルコースや2 DGは速かに最後野・孤束核のグルコースに反応するニューロンに作用し副腎神経活動を修飾すると思われる。また、グルコースと2 DGの反応からこのニューロンはグルコース代謝を通してコーディングを行なうグルコース感受性ニューロンであろう。

2) 次に迷走神経および内臓神経各枝に対するグルコースと2 DGの効果を除脳ラットで観察すると、グルコースの静脈内投与により迷走神経腹腔枝と肝臓枝では促進、迷走神経胃枝と内臓神経肝臓枝ならびに脾臓枝では抑制がみられた。2 DGでは効果は逆であり、迷走神経胃枝と内臓神経肝臓枝、脾臓枝で促進、迷走神経腹腔枝と肝臓枝では抑制がみられた。すなわち、グルコース投与は脳幹、主として孤束核のグルコース感受性ニューロン活動を抑制するが、その神経出力により、インスリン分泌の増加、肝グリコーゲン合成の促進、胃運動と酸分泌の抑制をおこすことが上記神経観察によっても裏づけられる。

迷走神経でも、胃枝と腹腔枝、肝臓枝ではグルコース・2 DGの効果か正反対であることは興味深い。以上の実験から回路につき1つの仮説を試みた。

消化管内分泌細胞の化学受容

藤田恒夫(新潟大・医)

1. 形態学的知見

ヒト、イスおよび種々の哺乳類の消化管粘膜を用いて、光顕(鍍銀法など)、電顕、ペプチドおよびアミンの免疫組織化学によって内分泌細胞の形態を詳細に検討し、次の結論を得た。内分泌細胞は、例外的な領域(ヒトでは胃体)を除いて、すべて基底膜から腸管内腔に伸びる双極性細胞で、上端は微絨毛の冠をつけて内腔内に突出している。

一方、Grossman(1961)その他によって想定されていた、腸管内腔に達する神経終末、これと内分泌細胞を連絡する神経要素ないしシナプスは認めることができない。

2. 薬理学的実験

イヌを用いて、neuroleptoanalgesia 麻酔下に開腹し、十二指腸ループをつくってトリプトファンとフェニルアラニン溶液を灌流し、腓液の総蛋白量排出増加を指標にして、パンクレオザイミンの放出をしらべた。アミノ酸灌流前にアトロピン、テトロドトキシンの静注を行なっても、パンクレオザイミンの放出反応は阻害されなかった。この実験で、上記の Grossman が描いたような神経の受容と伝達の機構は存在しないと考えられる。

3. パンクレオザイミン分泌細胞の受容器

ラットにトリプシン阻害剤（大豆）を経口投与すると、パンクレオザイミンが放出される。Green と Lyman (1972) は腸内トリプシンの欠除によるフィードバックによるものと考えたが、腸内容を洗い流すと反応が消失し、腓液を注入すると恢復することから、私たちは、腸内トリプシンが阻害剤と結合することが、この反応をひきおこすものと考えた。ところが、あらかじめトリプシンと阻害剤と結合させたものを注腸しても、パンクレオザイミンが放出されることから、次の仮説が成り立つ。腸内のトリプシンが阻害剤と結合して、アロステリックな変化をしたものに対するレセプターがパンクレオザイミン分泌細胞の微絨毛冠に分布している。この仮説を支持する事実として、私たちは、ラットがアルギニンおよびリジンの注腸に対してパンクレオザイミンを放出することを見いだした。この2つのアミノ酸はトリプシンの活性部を刺激することが知られている。一方、イヌやヒトではトリプトファンとフェニルアラニンがパンクレオザイミン放出に有効であり、このことは、キモトリプシンがパンクレオザイミン分泌細胞の受容機序に与かっていることを示唆している。

骨格筋における Na 依存性グルコース輸送系の

3—0—Methylglucose に対する親和性

北里 宏，丸中良典（滋賀医大）

骨格筋の glucose 輸送の約20%は Na^+ 依存性であり，この Na^+ 依存性 glucose 輸送は saturable であり，また allosteric 蛋白としての性質を持っていることが明らかとなった。

実験方法：ウシガエルの縫工筋を用いた。3—0—methylglucose (3—0—MG) の取込みの大きさは，筋30分間 3—0—MG を含む Ringer 液に浸し，この間に取込まれた 3—0—MG の量を筋細胞内 water space と incubation time である30分で割ったもので表わすこととした。

実験結果：2 mM の 3—0—MG Na^+ Ringer に glucose を加えて行くと，glucose 濃度が 2 mM までは 3—0—MG の取り込みは約20%増大するが，glucose 濃度を更に高くして行くと，3—0—MG 取込みは次第に小さくなり，glucose 濃度が20mM 以上では 3—0—MG 取り込みは一定の値となる。このときの 3—0—MG 取込みのレベルは細胞外に Na^+ が存在しないときのレベルより僅かに低い。Na-free Ringer 中での 3—0—MG 取り込みは細胞外に glucose を加えても抑

制されない。このことは Na 依存性の 3-O-MG 取込みのみが saturable であり, glucose がこれを競合的に抑制することを示す。

細胞外に glucose が存在しない場合には 3-O-MG 取込みの濃度依存性は sigmoidal であるのに対して, 5 mM glucose が存在するときの濃度依存性は Michaelis-Menten 型に近くなる。細胞外 3-O-MG 濃度が 5 mM 以上では, 5 mM glucose 存在するときの 3-O-MG 取込みの大きさは glucose が存在しない場合より小さくなる。このような実験結果は glucose 輸送担体に複数の結合部位があり, 結合部位の 1 つに glucose が結合すれば, 他の部位の親和性も増大することを示唆している, 担体に glucose に対して高い親和性を持つ状態と低い親和性を持つ状態の 2 つの状態があり, また 1 つの担体上の結合部位の数は 2 つであるとのモデルから得られた Monod-Wyman-Changeux 型の式に $L=14$, $K_1=0.5\text{mM}$, $K_2=2.0\text{mM}$ の値を代入することによって最もよく fit する曲線が得られた (Fig.1.)。L は親和性の低い状態の高い状態に対する存在比であり, K_1 は高親和性状態にある担体の結合部位と glucose との結合の解離定数, K_2 は結合部位と 3-O-MG との結合の解離定数である。

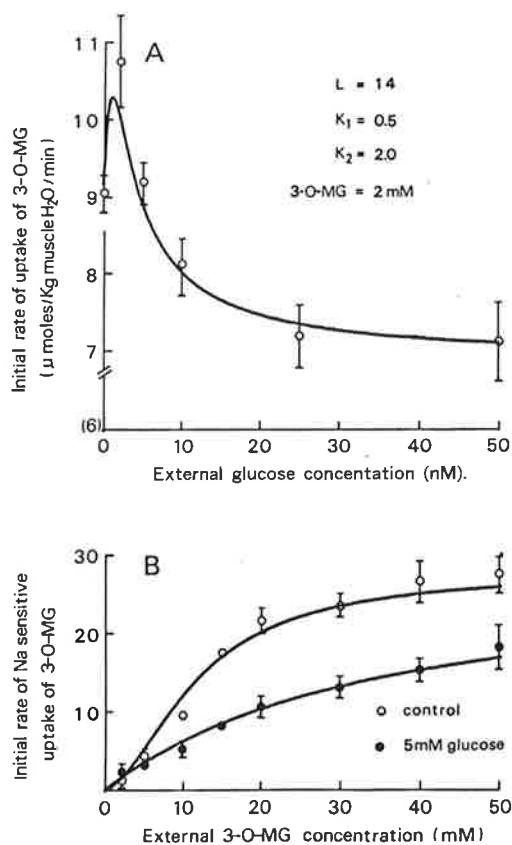


Fig.1 Effect of glucose 3-O-MG uptake.

以上の解析の結果、高親和性状態にある結合部位の 3-0-MG に対する親和性は glucose に対する親和性より低く、約 1/4 であると推測された。

糖に対する大腸菌の化学感覚

林 博司（名古屋大・理）

大腸菌は化学感覚機構を持ち、誘引物質には集まり、忌避物質からは逃げる。大腸菌の誘引物質となる糖は多数知られているが、リボース、ガラクトース、マルトース等の糖についてはよく研究され、それぞれの糖に対する化学受容体が明らかにされている。グルコースの化学受容については、前三者ほど明確な理解には到達していないが、ホスホトランスフェラーゼ系（輸送系）が重要な役割を果たすことが示唆されている。ここでは、大腸菌の化学感覚機構の仕組みをまとめ、マルトースの化学受容の機構に重点を置いて現在までの知識を紹介したい。

大腸菌の走化性の発現には、MCP と呼ばれる膜貫通性のタンパク質の存在が必須であり、このタンパク質は走化性の情報変換機構の中心的役割を担っている。即ち、このタンパク質は、走化性の真の化学受容体であると同時に情報変換分子であり、環境の化学物質の濃度の時間変化を検出することが可能であり、順応も又この分子の性質によるものである。こうした能力はこのタンパク質が可逆的なメチル化を受けることによって達成されている。メチル化反応は、受容体とリガンドの解離結合反応より遅い反応であるため、メチル化の変化は環境の変化にある時間の遅れを持って追従してゆく。メチル化の度合は、受容体の信号特性を変化させるため、大腸菌は一瞬前の時間と現在とを比較し、応答を示し、順応を示すのである。

マルトースの化学受容にはペリプラズム中のマルトース結合タンパクは必要である。この分子は輸送系の最初の段階に位置する。マルトース結合タンパクはマルトースと結合すると、MCP と相互作用をする。即ちマルトース結合タンパクを介して、マルトースは MCP に情報を与える。マルトースの情報とアスパラギン酸の情報は同じ MCP (tar MCP) によって処理されているが、濃度変化に対する応答の大きさ（適応までの時間）はマルトースとアスパラギン酸とは異なっている。即ちアスパラギン酸に対しては、幅広い濃度領域で濃度変化に応答するのに対して（負の協同性）マルトースに対しては、マルトース結合タンパク質の K_d 値から予想されるミカエリス-メンテン型の応答をするため、限られた中の濃度変化しか検出できない。

リボース、ガラクトースもそれぞれ輸送系の結合タンパクを介して MCP (trg MCP) と相互作用し、走化性の情報を生み出すことが知られている。

アロキサンによるラット肝・膵グルコキナーゼの阻害

三輪一智, 原 弘, 奥田 潤 (名城大・薬)

膵臓ランゲルハンス氏島 (ラ氏島) からのインスリン分泌機構はまだ明らかではないが, グルコキナーゼ (GK) がインスリン分泌の調節の関与することが示唆されている。もし, それが正しいければ, アロキサンによるインスリン分泌の阻害およびラ氏島B細胞の破壊は, アロキサンによる GK の阻害によって説明されうると考えられる。この考えの妥当性を調べるため以下の実験を行なった。

ラ氏島に比べて肝細胞は大量の単離が容易であり, しかも双方の GK の性質はよく類似することから, アロキサンにより GK が阻害されるか否かを, まずラット肝遊離細胞を用いて調べた。3mM アロキサンと30℃, 5分間処理することにより肝細胞中の GK 活性は約70%阻害されたが, ホスホフルクトキナーゼは約30%阻害されたのみであり, ピルベートキナーゼおよびグルコース-6-リン酸脱水素酵素は全く阻害されなかった。また, アロキサンによるインスリン分泌阻害あるいは糖尿病惹起はグルコース, 3-O-メチルグルコース, マンノースの共存により抑制されることがわかっているが, これらの糖 (15mM) により GK の阻害も防御された。

アロキサンによる肝細胞中 GK の明らかな阻害が見られたので次にラ氏島を 1 mM アロキサンと37℃, 5分間処理したところ, GK 活性は約60%阻害され, その阻害はグルコース, 3-O-メチルグルコース, マンノースの共存により防御された。

また, ラット肝より精製した GK を0.5mM アロキサンを含む液の中で, 37℃, 5分間インキュベートすると, 約70%の阻害が見られ, α -あるいは β -グルコースを共存させた時には, α アノマー共存下でのみ明らかな GK 阻害の抑制が見られた。これは β より α アノマーの方がアロキサンによるインスリン分泌阻害, 糖尿病惹起をよく防御する事実を説明しうる結果である。

なお, アロキサンはグルタチオンと共有結合性反応物を生成すること, およびアロキサンによる精製 GK の阻害に際し, 反応液中にはアロキサンの還元剤となりうる化合物 (ジチオスレイトール) が25 μ Mしか含まれないこと, グルタチオン (5 mM) の共存により阻害が著しく抑制されること, スーパーオキシドディスムターゼ, カタラーゼの共存による阻害の抑制はわずかであることなどから, アロキサンによる GK の阻害は $O_2^{\cdot-}\cdot OH$ などによるものよりも, むしろアロキサンが GK の SH 基と直接反応することによると考えられる。

味覚における甘味抑制物質のグルコース腸管吸収におよぼす効果

吉岡伸一, 井元敏明, 山田博子, 日地康武 (鳥取大・医)

ヒトの味覚において選択的に甘味のみを抑制する2種の物質について, それらの甘味抑制効果とグルコースの腸管吸収におよぼす効果を比較検討した。グルコースの腸管吸収は, ラット小腸を用い, in vivoにおけるグルコースの Na^+ 依存性能動輸送電位(ΔPD)の測定と小腸内循環灌流法により調べた。

1) ギムネマ酸のグルコース腸管吸収抑制効果

ギムネマ酸の甘味抑制効果はヒト以外にハムスターなどの味覚で示されているが, ラットでは認められていない。ところでギムネマ酸の腸管でのグルコース吸収におよぼす効果を調べたところ, 以下の結果が得られた。0.1mg/mlのギムネマ酸単独では腸管壁内外の電位差に変化を生じないが, 5mMグルコースに添加するとグルコースによる ΔPD を軽度抑制した。0.25mg/mlのギムネマ酸単独では腸管壁内外電位差を大きく変化させ, また, 電位変化が続いている時の5mMグルコースによる ΔPD は明らかに抑制された。次に, 0.25mg/mlのギムネマ酸を5mMグルコースに添加して小腸内循環灌流をおこなうと, 60分値で約50%グルコース吸収が抑制され, その抑制効果は1時間近く持続した。

2) Zizyphus jujuba (ナツメ) の葉抽出物の甘味抑制効果

ナツメの葉からヒトの味覚に対する甘味抑制物質が抽出されることが, Halpernらにより報告されている。われわれは, Halpernらとは異なる方法で抽出して得られたナツメの葉抽出物(混合物)の味覚に対する効果を, ラットおよびハムスターの鼓索神経積分応答を記録して調べた。ラットおよびハムスターの両者ともに, ナツメの葉抽出物による舌処理にて, スクロース, サッカリンに対する神経応答は抑制されたが, 食塩, キニーネ, 塩酸の応答には影響がみられなかった。また, ヒトの味覚に対するナツメの葉抽出物による甘味抑制効果を味刺激に対する認知閾値を示標として調べ, 確かめた。

3) ナツメの葉抽出物のグルコース腸管吸収抑制効果

ナツメの葉抽出物, 1.0mg/mlを5mMグルコースに添加して小腸内循環灌流するとグルコース吸収が抑制され, さらにその抑制効果はギムネマ酸にみられたと同様に1時間近く持続した。また, ナツメの葉抽出物1.0mg/mlを5mMグルコースに添加した場合, グルコースによる ΔPD は抑制されたが, それ単独で腸管壁内外電位差の変化を生じさせることはなかった。

ギムネマ酸とナツメの葉抽出物とは, 味覚における甘味抑制効果の種類特異性に差が認められたが, 腸管からのグルコース吸収を両者とともに抑制し, 能動輸送にも影響をおよぼしていることが示唆された。

小腸の糖質消化吸收機能における部位差の検討

竹内龍男, 笠木 健 (鳥取大・医, 鳥取大・医療短)

小腸における糖吸収機能の部位差を, 正常ラットと実験的糖尿病ラットを用いた *in vivo* での Na^+ 依存性糖輸送電位測定法, 及び小腸内循環灌流法で検討した。

実験的糖尿病の作製はストレプトゾトシン $45\text{mg}/\text{ml}$ の腹腔内投与により行った。また, 高血糖自身の影響を調べるため, 正常ラットに 40% グルコースを静脈内投与した急性高血糖ラットも作製した。以下の実験は, 正常群, 一週間経過した糖尿病群, 1ヶ月经過した糖尿病群, 急性高血糖群の4つのグループに分けて比較検討した。

まず, 5mM , 10mM , 20mM , 50mM の各濃度のグルコースによる糖輸送電位 (ΔPD) を測定した。空腸では, 一週間経過した糖尿病群でグルコースによる糖輸送電位 (ΔPD) を測定した。 ΔPD が大きくなる傾向を示したが, 1ヶ月经過した糖尿病群, 急性高血糖群は正常群との差を認めなかった。回腸では, 糖尿病群は正常群より実験を行なったすべての濃度で ΔPD が大きくなる傾向を示し, 1ヶ月经過群で一層著明であった。しかし, 急性高血糖群では空腸の場合と同様に正常群との差を認めなかった。

また, グルコース濃度と ΔPD の大きさは Michaelis-Menten 型の応答を示し, 回腸では4群ともみかけの K_m が空腸より低くなる傾向で, 特に正常群では有意な低値となった。正常群と糖尿病群を比較すると, 糖尿病群で PD_{max} , みかけの K_m ともに大きくなる傾向がみられたが, 急性高血糖群では, PD_{max} , みかけの K_m とも正常群との差を認めなかった。

次に 50mM スクロースによる ΔPD を測定してみたが, 正常群では回腸での ΔPD は空腸より有意に低値となった。糖尿病群では一様に正常群より高い傾向を示し, 特に回腸では有意に高値となった。一方, 急性高血糖ラットの回腸でも正常群に比べてスクロースによる ΔPD が大きくなる傾向を示した。

さらに, 正常群と1週間経過した糖尿病群について, 1時間の糖吸収量を小腸内循環灌流法で測定した。 2mM , 5mM , 10mM , 20mM の各濃度のグルコースを用いたが, 正常群, 糖尿病群とも, 実際の糖吸収量は空腸が大きな値となった。また, グルコース濃度が高くなるにつれて, 回腸で糖尿病群の吸収が大きくなる傾向がみられた。

以上の結果から, 正常のラットでは, 糖吸収能は空腸が大きいものの, 回腸は低濃度の糖をより効率的に吸収する能力を持ち, また実験的糖尿病の発症では, 一時的に吸収能が上昇するが, 時間経過とともに空腸では, 正常群に復帰するような傾向が見られた。しかし, 高血糖自身の影響ではないことから, 血糖値のみの影響ではなく, 糖尿病により形質的な変化を生じていることが示唆された。

『蛋白質の性質，生体膜および細胞の機能』

昭和59年12月21日～12月22日

心筋の paired cell における観察

今永一成（福大・生理），入沢 宏（生理研）

赤血球カルシウム濃度と流体力学挙動の関係

前田信治，昆 和典，志賀 健（愛媛大・生理）

神経成長因子ならびに類似の蛋白分子と培養神経細胞

福田 潤（東京大・生理）

平面膜法による筋小胞単一チャネルの研究—カオチンチャネルのゲート機構—

曾我部正博（大阪大・人間科学）

血漿アルブミン分子の構造転移— Molten-Globule State

恵良聖一，桑田一夫，長岡俊治，曾我美勝（岐阜大・生理）

亘 弘（生理研）

細胞内 Ca イオンの周期的変化

宮崎俊一（自治医大・生理）

心筋の化学受容器依存性カリウムチャネル

野間昭典（生理研）

培養海馬神経細胞のL-グルタミン酸感受性イオンチャネル

小沢静司（群馬大・生理）

筋小胞体のイオンチャネルとイオン透過

布垣一哉，葛西道生（大阪大・基礎工）

生体膜の磷脂質の機能と考察

竹中敏文（横浜市大・生理）

ホヤ胚分離球における興奮性膜の自律性分化

高橋國太郎（東京大・脳研・神経生物）

細胞内 Ca および多価カオチンと細胞膜の機能

山岸俊一（生理研）

電氣的細胞融合：蛋白分解酵素及び Ca^{2+} による促進

岡田泰平，少作隆子，老木成稔（京都大・生理）

ヒヨコ内耳より単離した有毛細胞のトランスダクション電流

大森治紀（東京大・脳研）

外分泌機転の NMR による研究

村上政隆，今井雄介（大阪医大），瀬尾芳樹（京都府立医大）

亘 弘（生理研）

マクロファージの食作用と Ca^{2+}

宮本 宏（新技術開発事業団・創造科学）

アフリカツメガエル胚外胚葉分化マーカーの単一クローン抗体による研究

岡本治正（東京大・脳研・神経生物）

発癌高感受性 Balb/3T3 subclone の細胞の細胞間連絡とフィブロネクチン合成パターンの特徴

榎本 平（広島大・歯・生理），山崎 洋（国際癌研，フランス）

角永武夫（大阪大・微研），菅野義信（広島大・歯・生理）

カエル骨格筋における Na, K-ATPase 活性と細胞内蛋白輸送

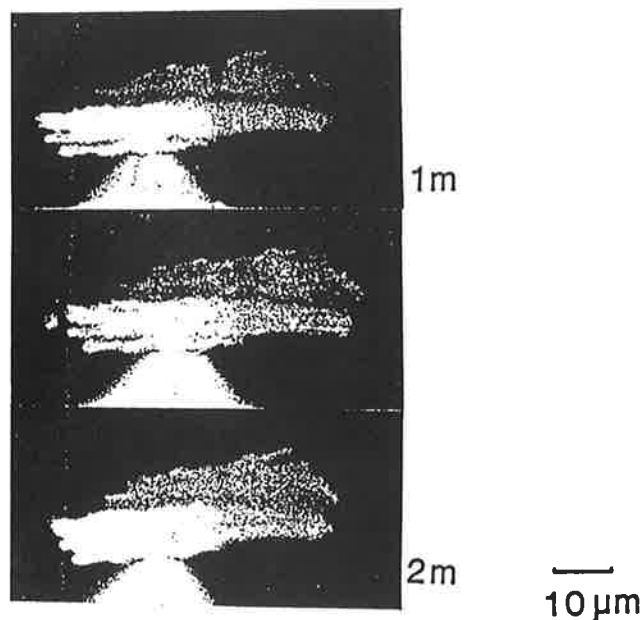
北里 宏（滋賀医大・生理）

心筋の paired cell における観察

今永一成（福岡大・医）

入沢 宏（生理研）

パッチ電極を細胞に吸着させパッチ電極尖橋の細胞膜を破ると，静止電位が発生する。電極内に蛍光色素を入れておくと色素が細胞内に拡散する様子を観察できる。第1図はRhodamine B—

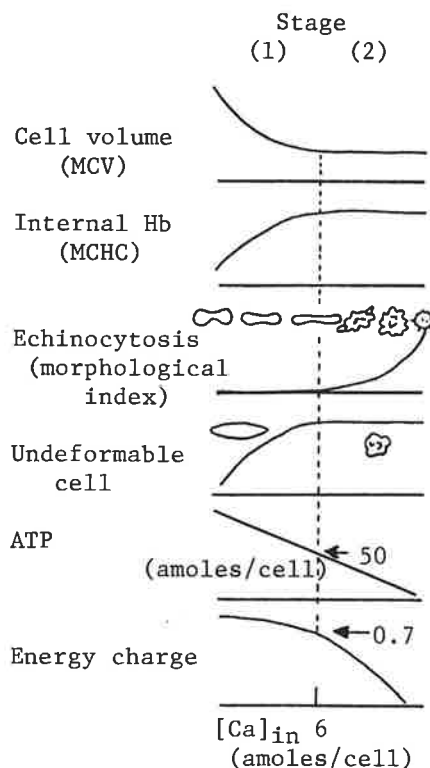


200を電極内に入れ30秒間隔に色素が拡散する像を示したものである。TV画面においた光電池により色素の濃度を測定すると、単純な拡散方程式によって示される曲線と大差なかった。もちろん理論的に拡散の式を応用できるのは膜を破ってから初めの10秒ぐらいまでのことで、それ以後は細胞の大きさが有限なため制限を受け反響し色素の蓄積は複雑な様式で示すはずである。この実験によって Rhodamine B—200, Lucifer yellow CH, 6 Carboxy Fluorescein, Na Fluorescein, Na 等の拡散因子 (diffussion coefficient) を測定することができた。

赤血球カルシウム濃度と流体力学挙動の関係

前田信治, 昆 和典, 志賀 健 (愛媛大・医)

カルシウムは種々の生理機能の調節に重要な役割を果たす。本研究ではヒト赤血球内 Ca の増加によっておこるレオロジー機能, 特に変形能, の変化について調べ, 形態および代謝機能の変化をあわせて Ca による赤血球レオロジー障害について検討した。



〔方法〕 赤血球への Ca 負荷は A23187 ($1.5\mu\text{M}$) と CaCl_2 ($2\sim 20\mu\text{M}$) により 50mM HEPES 緩衝化等張液中でおこなった (37°C , 40min)。赤血球内総 Ca 量はフレイムレス原子吸光法で定量し、赤血球の変形能は Rheoscope 法によって測定した。赤血球の比重差による分画分離は Percoll を用いた密度勾配遠心法によりおこなった。

〔結果と考察〕 (1)赤血球内 Ca と変形能の変化：正常ヒト赤血球 (Ca, $\sim 1.5\text{amole}/\text{cell}$) に Ca を負担すると、高ずり応力 ($140\text{ dyn}/\text{cm}^2$) によっても変形不能な赤血球が出現した (約 $6\text{ amole}/\text{cell}$ で 100%)。 (2)赤血球内 Ca と形態、容積変化：赤血球内 Ca 量が増すと、赤血球は円板状を維持しながら扁平化し、著名な容積減少をおこす。約 $6\text{ amole}/\text{cell}$ 以上の Ca 負荷では容積変化はほとんど起らず、形態は有棘—金米糖化した。変形不能な赤血球の出現率は血球容積の減少と平行し、 K^+ と水の脱失による赤血球内ヘモグロビンの濃縮、すなわち内部粘膜の上昇、が変形能障害の主因と考えられた。脂質膜流動性の低下が脂肪酸スピラベル法で観察され、Ca による変形能障害には形態や膜の粘弾性の変化も関与している。 (3)Ca 負担赤血球の分画と性状：密度に勾配遠心法で分画された比重の軽い赤血球 (13%) は容易に変形し、G6PDH 活性、ATP 濃度も高いが、重い分画 (24%) は G6PDH 活性、ATP 濃度共に低かった。Ca 負荷による酵素活性の変化はみられないので、変形能障害が老化赤血球に優先的に起っていることを示唆している。 (4)老若赤血球の Ca 負荷による変形能障害：密度勾配遠心法で分画した若い血球は老化血球 (15%) に比べて Ca 量は低く、G6PDH 活性、ATP 量は共に高く、変形能も良かった。Ca 負荷により若い血球の形態はほとんど変わらず、変形能障害も軽度であったが、老化血球では、形態は扁平化、容積は減少し、変形不能な血球が多数出現した。以上のことは、赤血球に Ca 負荷されたときの変形能障害が代謝活性の低い老化血球に優先的に起こることを示している。

〔文献〕 Shiga, T., Sekiya, M., Maeda, N., Kon, K. and Okazaki, M.: Cell age-dependent changes in deformability and calcium accumulation of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta (in press)*.

神経成長因子ならびに類似の蛋白分子と無血清培養下の神経細胞

福田 潤 (東京大・医学)

神経細胞の初代培養を行う際には、ほとんどの場合、動物血清や胎児抽出液などを倍地に加える必要があり、それがないと細胞は育たない。時として、「条件培地」と名づけられる培地、すなわち培養下ですでに育った細胞の生産物を含んだ培地を加える必要がある。しかしながら血清中や条件培地などには未知の物質が多く含まれているにちがいない、それらの物質が様々な「いたずら」をしていると考えられる証拠がある。このような欠点を除く方法として未知の物質を含まない、いわゆる無血清培地が開発されひろく用いられるようになったが、神経細胞に応用した

例は少なく、それも胎生動物の末梢神経細胞に用いられるのがほとんどである。

そこで今回我々は、従来用いられてきたこの神経細胞培養用の無血清培地に若干の工夫をほどこすとともに、培養血にも必要な処理を行って、種々の神経細胞の培養を試みた。その結果、末梢の神経細胞、すなわち脊髄緩根神経筋細胞、頸部ならびに腹部交感神経筋細胞、三叉神経筋細胞などが、胎生動物のそれのみならず、成熟動物から老化動物の場合に至るまで培養可能であることが明らかになった。また、末梢神経細胞のみならず、中枢の神経細胞でも無血清培養が可能であり、小脳の神経細胞、海馬の神経細胞、嗅・脳の神経細胞、そして網膜の神経細胞でも育つものがあることがわかった。これらの無血清培養法を用いて、末梢神経細胞、とりわけ交感神経節細胞と脊髄後根神経節細胞について神経成長因子の効果を調べた。その結果、再生した軸索の長さを指標にした場合、新生動物、幼若動物、成熟動物と老化動物の間に明らかに差があり、神経成長因子依存性が、動物の成熟と老化とともに変化していくことが判明した。

脂質平面法による筋小胞体単一チャネルの研究

—カチオンチャネルのゲート機構—

曾我部正博（大阪大・人間科学部）

ウサギ骨格筋（白筋）から抽出した筋小胞体（SR）ベシクルを脂質平面膜に膜の一方（シス側）から融合させて、SRに含まれる電位依存性 K^+ チャネルに対するDIDS（アミノ基修飾剤の一種）の効果を調べた。多数の K^+ チャネルを含む膜は強い内向き整流特性を示すが、膜のトランス側（SRを添加していない側で、ベシクルの内面側に相当し、膜電位はこの側を基準に定義した）にDIDS（ $\sim 100 \mu M$ ）を添加すると、膜コンダクタンスの上昇と伴に整流性が消失してオーミックな特性となる。単一チャネルの実験により、DIDSは膜電位に関係なくチャネルを開状態にロックすることがわかった。（図1）。このときチャネルコンダクタンスは変化しないので、DIDSは

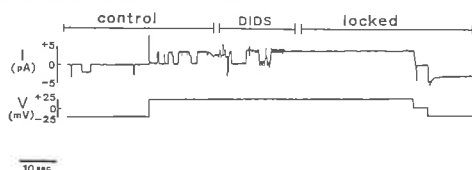


図 1

DIDS-effect on single channel behavior. The current increases upwards in the +25 mV trace and downwards in the -25 mV trace. In the absence of DIDS, the channel fluctuates between the open and closed states depending on the membrane voltage (left side trace). Upon addition of DIDS, the channel seems to be locked to the open state, even if the membrane potential is changed to negative (-25 mV) at which the channel favors to close (right side trace). Single channel conductances are fairly constant during this experiment indicating that DIDS selectively modifies the voltage dependent gate of SR K^+ channel without affecting ion conducting pathway for K^+ .

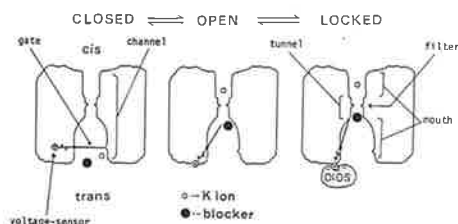


図 2

Possible configurations of the voltage dependent gate in three different states, closed, open, and newly proposed locked states. In the closed state, both small (o) and bulky cations (e) cannot approach the conducting pathway. In the open state, small cations like K^+ readily approach and permeate through the channel, but bulky cations like aminoglycosides do not readily draw near the binding site of the channel. In the locked state, the binding site becomes easy of access for both small and bulky cations.

In this model, voltage sensor (B) containing amino residues which are responsible for the DIDS action is assumed to connect tightly with the gate, and to expose part of it when channel is in the open states. Cartoon of the SR- K^+ channel is drawn after Miller (1982), to which the channel consists of relatively large mouth on cis and trans entrance, and narrow tunnel equipped with ion selective filter.

チャネルの K^+ 透過部位には影響せず、電位依存性ゲート機構を選択的に修飾することが示唆される。DIDSはチャネルが開状態のときのみトランス側から作用するので、チャネルが開いたときにゲート分子の一部（これは他の実験より、電圧センサーの一部を構成するリジンもしくはアルギニン残基であるらしい）がトランス側に露出するようである。ロック状態では K^+ の透過性に変化はないが、bulkyなブロッカーイオンのトランス側からの accessibility が上昇するので、このときゲートは通常の開状態よりも更に開いた状態になっていることが示唆される。また同じブロッカーのシス側からの accessibility に変化はないので、ゲートはチャネルのトランス側に位置しているものと思われる。以上の推論をまとめた模式図を図2に示す。

血漿アルブミン分子の構造転移 — Molten-Globule State

恵良聖一，長岡俊治，桑田一夫，曾我美勝（岐阜大・医）

亘 弘（生理研）

牛血漿アルブミン（BPA）は0.10M KCl中で、 $N \rightarrow F$ 転移（pH 4.40～3.75）， $N \rightarrow B$ 転移（pH 7～9）と呼ばれる構造転移を示す。

(1) $N \rightarrow F$ 転移

BPA と SDS との複合体（ AD_m ; m は SDS と BPA のモル比， $0 \leq m \leq 12$ ）の $N \rightarrow F$ 転移について調べた。を加えないBPA単独の場合（ AD_0 ）， $N \rightarrow F$ 転移において二次構造変化（ $N \rightarrow F$ ； $\Delta f_{\alpha} = -0.10$ ， $\Delta f_{\beta} = 0.07$ ）は観察されるが固有粘度の変化は僅少である。と電位を補正した酸滴定データではN型で約半数の $-COO^-$ は正電荷をもつ側鎖とイオン結合を作るが $N \rightarrow F$ 転移で開裂し，F型で荷電側鎖の可動性は増加する。またF型の¹H-NMRスペクトルは一般にシャープになり，特に低磁場側の aromatic region は変形状態のスペクトルに似た変化が認められる。スピン拡散法により交叉緩和時間（ T_{IS} ）を求めるとF型で増加した（表1）。従って AD_0 のF型は側鎖の可動性が増加した状態で，二次構造変化を除き， α -lactalbumin や cytochromin にみられるような Molten-Globule State に類似した状態である。また AD_{10} や AD_{12} では二次構造，固有粘度の変化は殆ど観察されない。と電位を補正した酸滴定データでは AD_0 のF型同様， AD_{12} のF型でも荷電側鎖の可動性は増加する。スピン拡散法により求めた AD_{10} の T_{IS} も AD_0 同様， $N \rightarrow F$ 転移で増加する（表1）。従って AD_{10} や AD_{12} のF型は Molten-Globule State である。

（表1）

T_{IS} (cross-relaxation time) values of side chains of the N- and F-form of bovine mercaptalbumin (AD_0) and dodecyl sulfate-bovine mercaptalbumin (AD_{10} , where 10 is molar ratio of added dodecyl sulfate to bovine mercaptalbumin) (4.84%, 0.10M Cl^-)

PD	FORM	$f_2(\text{ppm})$	$\partial H_2/2\pi(\text{Hz})$	T _{IS} (SEC)			
				CH ₃	LYS	AROM	HIS
5.32	N(AD ₀)	7.13	69	0.79		0.75	—
4.03	F(AD ₀)	7.13	69	1.12		1.59	—
5.42	N(AD ₁₀)	7.13	69	0.78		0.90	—
3.91	F(AD ₁₀)	7.13	69	1.45		1.54	—

(2) N→B 転移

N→B転移に対応して $[\alpha]_{313}$, $[\alpha]_{300}$ 及び $[\alpha]_{233}$ が変化する。S—S結合の局所環境変化を反映する $[\theta]_{268}$, $[\theta]_{262}$ も同様に変化する。一方Moffitt-Yang式の b_0 , $[\theta]_{222}$, $[\theta]_{208}$ 及びCDスペクトルより求めた二次構造含量(f_α , f_β , f_R)は殆ど変化しない。スピン拡散法により得たT_{IS}より、N型、B型の分子のカタさの差はみられない。蛍光エネルギー移動法によるとTrp—241とTyr—411の距離はN→B転移で増加する(N型, 18Å²; B型, 24Å²)。以上よりN→B転移は二次構造に殆ど変化なく、17個のS—S結合の二面角などに若干の変化をきたし、ドメイン、サブドメイン間の距離も増加し同時に広範囲にわたる揺らぎの増加する構造転移で、B型はsubdomain-fluctuating stateと考えられる。

細胞内Ca イオンの周期的変化

宮崎俊一 (自治医大)

我々はゴールデンハムスター卵の受精時に、周期的な過分極反応が発生することを見出した¹⁾。この過分極反応は、Ca-activated K conductanceに基づく²⁾ことから、細胞内Caイオンが周期的に増加することが示唆される。そこで我々は、Ca感受性微小電極を用いて、直接経時的に細胞内Caイオン濃度を測定する試みを行った。ガラス微小電極の先端を研磨して1~1.5μmとし、ジメチルジクロロシランでcoatingした後、Ca ionophore ETH1001を先端から200~300μmに充てんした。Ca標準液で較正曲線を得てから、未受精卵に刺入し、媒精した。別に3M KCl電極を刺入し、膜電位を差し引いた。しかしCa電極は非常に高抵抗であるため、膜電位変化を完全に消去しきれないことがわかり、三本目のKCl電極を刺入して膜電位固定を行ない、膜電位が変化しない状態でCa濃度増加による電位変化のみを記録した。静止時の細胞内Ca濃度は $1 \sim 3 \times 10^{-7} \text{M}$ と結論された。媒精により、各々の過分極反応(実際には外向きK電流)に対応して、細胞内Caイオン濃度が1~2μMまで増加することが実証された。周期的なCa増加は、卵の表層でも、20~30μm深いところでもおこった。また、CaCl₂を充てんした電極から電気泳動的に未受精

卵内に Ca イオンを注入すると、ある注入電流で、all-or-none に近い Ca 濃度増加を記録した。我々は既に、Ca-activated K conductance を指標として、この系での Ca イオンの動員は、細胞外からの Ca の流入と、細胞内 store からの Ca 放出の linkage によるというモデルを提唱しているが、細胞内 Ca 濃度を直接記録した結果はこのモデルの妥当性を支持する。

- 1) Miyazaki, S. and Igusa, Y., (1981) *Nature*, **290**: 702-704.
- 2) Miyazaki, S. and Igusa, Y., (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 931-935.
- 3) Igusa, Y. and Miyazaki, S., (1983) *J. Physiol.*, **340**: 611-632.

心筋の化学受容器依存性カリウムチャンネル

野間昭典（生理研）

心筋細胞にパッチクランプ法を適用したところ、現在までに4種類のカリウムチャンネルが同定されている。静止電位附近での膜カリウムコンダクタンスを発生している内向き整流カリウムチャンネル、ムスカリン性受容器を介してアセチルコリンによって活性化されるカリウムチャンネル、細胞内のATPが減少した時に開くカリウムチャンネル、それに、細胞内のナトリウム濃度が30mM以上に上昇すると活性化されるカリウムチャンネルである。これ等のチャンネルは平均開時間の違いや、単一チャンネルの電導度の違いによって容易に識別できる。チャンネルの電導度は外液の K^+ 濃度によって変化するが、外液に150mMの K^+ が存在すると、内向き整流Kチャンネルは約45pS、AChチャンネルは60pS、ATPチャンネルは80pS、Naチャンネルは200pSである。内向き整流Kチャンネルは膜電位に依存してその開確率が変化するが、後三者はそれぞれ異なる化学物質の濃度によって活性化の程度が変化する。即ち、AChチャンネルはムスカリン様受容器にACh分子が結合すると開確率が上昇し、アトロピンやスコポラミンのような拮抗薬が結合すると、低頻度で開いていたチャンネルの活動が逆に抑制される。また、チャンネルの活性化に細胞内の機序は関与していないところから、受容器分子が膜レベルでチャンネルの開閉を制御していると考えられる。ATPチャンネルは、AMPPNPによってもATPと同様に抑制される。またGTP、UTPによっても抑制される、ADPはATPの約1/10の効果を持つがAMPやアデニンでは抑制されない。ATP濃度とチャンネルの開確率の関係は通常の濃度応答曲線によってよく説明できるが、ヒル定数は3~4の値を示す。このチャンネルは細胞膜内側にATPに対するレセプターを持ち、これにATPが結合すると、開確率が減少すると考えられる。細胞から遊離したパッチ膜で、細胞膜内面の Na^+ 濃度を上げると開くチャンネルが見つかる。

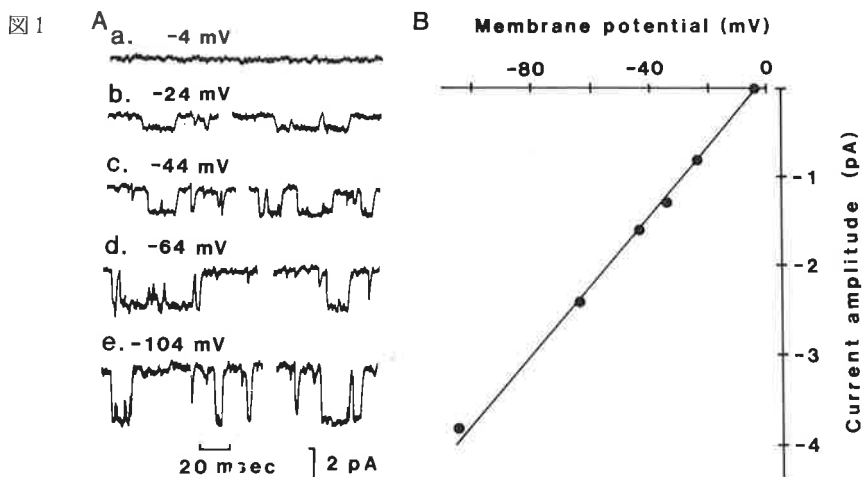
化学受容器によって制御されているKチャンネルが発生する膜電流は細胞全体の膜電位固定実験でも記録されている。それぞれの電流は膜電位変化に対して殆んど時間依存性の変化を示さないか、あるいは小さな変化を示す(ACh Kチャンネル)。これ等の電流は従来、背景電流として一

括され、膜興奮発生におけるそれ等の役割には注意が向けられていなかったが、細胞内の ATP や Na^+ 濃度を感知し、自動的に膜の興奮性を変化させる重要な機能を持つことがわかった。

培養海馬神経細胞のL-グルタミン酸感受性イオンチャンネル

小澤壽司（群馬大・医）

胎生17～19日目のラット海馬の初代培養によって得られた錐体細胞¹⁾のL-グルタミン酸感受性イオンチャンネルの性質をパッチクランプ法（whole-cell voltage-clamp 法, outside-out patch 記録法²⁾）によって調べて次の結果を得た。1. 培養細胞は培養後5日目まではグルタミン酸に対する感受性をほとんどもたなかったが、7日目から14日目の間で急速にグルタミン酸に対して反応するようになった。2. 細胞内の陽イオンの組成を変えて、グルタミン酸感受性電流の反転電位を測定し、グルタミン酸感受性チャンネルのアルカリ金属イオンに対する透過性比を求めた所、 $0.9 (\text{Li}^+) : 1.0 (\text{Na}^+) : 1.2 (\text{K}^+) : 1.3 (\text{Rb}^+) : 1.3 (\text{Cs}^+)$ であった。 Cl^- をプロピオン酸で置換しても反転電位に変化が生じないので、グルタミン酸電流の発生に Cl^- の関与はほとんどないと考えられる。3. グルタミン酸感受性電流の膜電位依存性について調べた。電流-電圧曲線の slope conductance は -60mV より過分極側で減少した。この減少は Mg^{2+} を細胞外液から除去するとほとんど消失した。従って Mg^{2+} はグルタミン酸電流に対して膜電位依存性抑制作用をもつことが結論される。4. Mg^{2+} 除去溶液中で outside-out patch 記録法により、グルタミン酸感受性単一チャンネル電流を記録した。単一チャンネル電流は 40pS （図1）。平均開時間は 3.1msec であった。



A. outside-out patch 記録法によるグルタミン酸感受性単一イオンチャンネル電流とその膜電位依存性。
B. A の記録の測定によって得られた電流-電圧関係。

〔文献〕

- 1) Ozawa, S. and Yuzaki, M., (1984) Patch-clamp studies of chloride channels activated by gamma-aminobutyric acid in cultured hippocampal neurones of the rat., *Neurosci. Res.*, 1: 275-293.
- 2) Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sacmann, B. and Sigworth, F. J., (1981) Improved Patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches, *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 391: 85-100.

筋小胞体のイオンチャネルとイオン透過

布垣一幾, 葛西道生 (大阪大学・基礎工)

単離筋小胞体膜は小さなカチオン・アニオンに対して高い透過性を示すことが膜ベシクル系を用いた研究から知られていたが、従来の方法では時間分解能が低く、イオン透過の全過程は直接観測されていない。一方、筋小胞体膜ベシクルを人工脂質平面膜に融合させ電氣的に測定する方法から、100~200pSの単位コンダクタンスを持つカチオン及びアニオンチャネルの存在が示された^{2, 3)}。これらのチャネルが直径0.1 μ mのベシクルに一個含まれているとすると、イオン透過時間として数ミリ秒が期待される。我々は、ベシクルけん濁液系において測定の時間分解能を上げ、電氣的に測定されたチャネルとの対応を吟味するために、イオンによるけい光の消光を用いる方法⁴⁾を応用した。

水溶性色素 (Pyrenetetrasulfonate) を内側にとりこませたベシクルけん濁液を、ストップ・フロー装置で消光イオン (Ti^+ 又は I^-) 溶液と急速に混合し、約0.5ミリ秒以後のけい光減少を測定した。それは単一過程ではなかったため、試料は透過性の異なる数種のベシクルから成るとして、多成分に分けて解析したところ、全てのけい光変化は数個の成分で説明できた。最も速い成分は、 Ti^+ の場合時定数約3ミリ秒、全ベシクル中の割合約40%、 I^- の場合、それぞれ15ミリ秒、45%であった (図参照)。これより速い過程の存在は認められなかった。人工膜の実験から求まっ

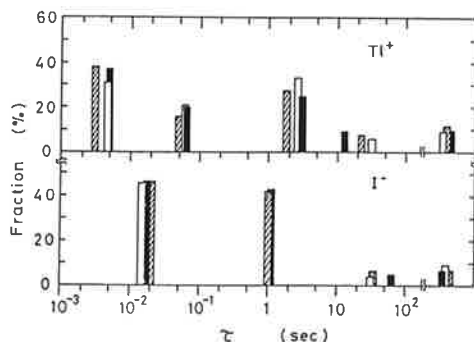


図. イオン透過の各成分の時定数と含有率。

た単位チャネル ($\text{TI}^+0.1\text{M}$ に対し 80pS , $\text{I}^-0.1\text{M}$ に対し最大 180pS) がベシクル当り一個含まれているとすると, TI^+ 透過に対する時定数は約 2.4 ミリ秒, I^- のそれは約 1.1 ミリ秒となる。アニオンチャネルは数分の一のコンダクタンスを持つサブステートが数個存在することを考慮すると, カチオン・アニオンの場合ともほぼ対応がつく。薬物の効果や膜電位の影響等のさらに詳しい対応については現在検討中である。

〔文献〕

- 1) G. Meissner (1983) Mol. Cell. Biochem. 55, 65-82.
- 2) R. Latorre and C. Miller (1983) J. Membr. Biol, 71: 11-30.
- 3) M. Kasai, K. Nunogaki, K. Nagasaki, M. Tanifuji and M. Sokabe: In "Sarcoplasmic Reticulum: Structure and Function", Y. Tonomura and S. Fleischer eds., Academic Press, New York. (*in press*)
- 4) H. -P. H. Moore and M. A. Raftery (1980) Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 77:

生体膜のリン脂質の機能と考察— 脂肪酸を中心として

竹中敏文 (横浜市大・医)

脂肪酸の興奮膜に対する作用を, 膜電位固定法をもちいて調べ Na チャネルに対するその効果を解析した。炭素鎖 9 ケ以下の脂肪酸は, 膜の興奮性に対して全く作用を及ぼさないが, 炭素鎖 9 ケ以上の脂肪酸は, Na チャネルを抑制する。しかし, この際脂肪酸の作用は, Na チャネルだけであって, K チャネルにはなんの作用も及ぼさない。この抑制作用は, このように炭素数に関係するが, その他に化学物質の型も関係する。たとえば, 炭素鎖 10 ケの脂肪酸で比較した場合, 炭素鎖の両端に $-\text{COOH}$ についている sebacic acid は, 抑制効果をあらわさないし, また炭素鎖の両端に $-\text{COOH}$ と $-\text{OH}$ のついた 10-hydroxydecanoic acid も抑制効果をあらわさない。この抑制効果は Na -チャネルのどこに作用するのであろうか。 Na -電流のピーク値をとった $\text{I}-\text{V}$ 曲線のピークは, 脂肪酸により正電位の方にシフトする。このとき膜のコンダクタンスは, 全く変化していない。テトロドトキシンや局所麻酔薬では, このピークのシフトはみられず, しかも膜コンダクタンスが変化するので, 脂肪酸の作用とは全く異ったものと考えられる。また脂肪酸の作用は, Hodgkin のいう h 不活性化には作用せず, 活性化の m にだけ作用する。ことに Zm に作用し, 1 mM の 2-decenoic acid ではこれを $1/2$ にする。

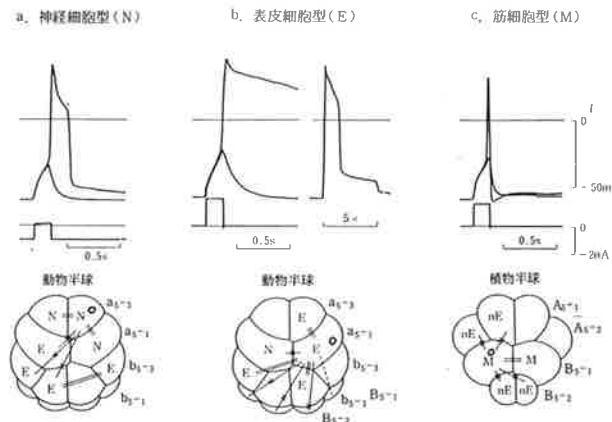
膜の脂質は $1\ \mu^2$ に 5×10^6 もある。一番多く見られる磷脂質は $\text{PC} > \text{PE} > \text{PS} > \text{Sph} > \text{PI}$ の順である。これについている脂肪酸は, Palmitic acid と stearic acid が多く, 次に多いのが Oleic acid と Linoleic acid である。後者の 2 つ oleic acid と linoleic acid は不飽和結合を 9 番目の位置に

もっている。このことから膜を構成している脂質は極性部から9番目の炭素のところまでは、比較的かたいstiff region そっくり、そのあとは比較的自由度のたかいelastic region をつくっている。9ヶ以上の炭素鎖をもった脂肪酸が、抑制作用をあらわすのは、鎖がelastic region に入って、そこのrandom-nessを増した時に作用が出現するということになる。つまり、この部位にm-gateがあって、この開きにelastic region の脂肪酸が関与することになる。

ホヤ胚分離割球における興奮性膜の自律性分化

高橋國太郎（東京大・脳研）

ホヤ胚の初期で細胞分裂を抑制すると、割球の巨視的形態変化がみられないのに膜の機能分化が起る。分化のマーカーとして電圧固定法による膜電流の解析にくわえ、蛍光ラベルしたレクチンであるWGAあるいはRCAによる細胞内膜系の染色、NBD-ファラシジンによるF-アクチンの染色、Karnovsky法によるアセチルコリンエステラーゼの染色の結果を用い、機能分化の表現型として神経細胞型、表皮細胞型、筋細胞型、非興奮性細胞型の4型を固定した。この表現型と分裂抑制胚の各割球について古典的に記載されている発生予定運命との関連を調べて次のような結論を得た。分裂抑制胚の1つの割球についてその発生予定運命が単一でないときには分化の表現は各種細胞型のモザイクとならず、複数の予定運命のうちの1つを確率的に選択して表現していることがわかった。また分裂停止胚の各割球を単離し、割球の自律性分化を利用して、この分化型選択の時間経過を調べた。このとき割球は単離してあるので、通常の胚細胞間にみられる電気的結合を除去して実験できるので、固定した割球において各イオンチャンネルの発生に伴う変化を正確に定量できた。



分裂抑制16細胞胚の各割球にみられるる型の活動電位。それぞれの電位記録の下図は一つの胚の中で活動電位の記録部位を(○)で示したものを。また二重線(=)で連続されている割球は互に電気的に連絡し、同一の活動電位が見られた割球群である。

細胞内Ca および多価カチオンと細胞膜の機能

山岸俊一（生理研）

興奮性細胞の内膜面から興奮のイオンチャンネルに作用するCaイオンその他の多価カチオンは外側からチャンネルに作用する場合と全く異なる効果を及ぼしている。イカ巨大神経では0.1mM以上のCaイオンを細胞内K⁺溶液に加えると静止膜電位に大きい変化は見られないが活動電位の大きさは次第に減少する。ところが同時に興奮閾値の急激な低下が10~20秒のうちに起り、一触即発で興奮する状態となる。標本によっては電気刺激なしでCa添加による膜興奮が発生する。これを膜電位固定による膜電流解析を行うとNaチャンネル電流(I_{Na})、Kチャンネル電流(I_K)ともに同程度に抑制されるが、一時に8~10mV低電位側への電流曲線シフトし、外液Ca効果とは反対方向へのcharge effectが認められ、これが閾値低下の原因となっていると了解される。Ca以外の2価イオンでもI_{Na}、I_Kに対する基本作用の傾向は同じだが、濃度条件はイオン種で異り、且つ、I_{Na}ピーク値の抑制、I_{Na}不活性化の抑制、I_Kの抑制にそれぞれ独立に効いていると判断される。Poly-Llysine, protamine等多価カチオンもI_{Na}、I_K抑制を示すが、これらはholding potentialを40mV以上マイナス側に下げることにより回復する。即ち、2価イオンより大きい分子の多価カチオンは電位依存性の不活性化機構により強く作用していると思なされる。

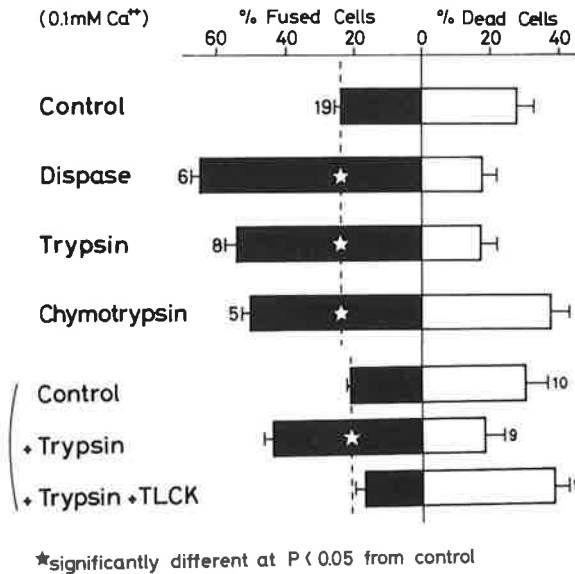
電氣的細胞融合：蛋白分解酵素及びCa²⁺による促進

岡田泰伸，少作隆子，老木成稔（京大・医）

誘電泳動法によって多数個細胞を一行に接着させた上で高電圧パルスを加えることにより電氣的膜離断孔を介して細胞融合を実現させるという方法が近年開発された^{1, 2)}。パルス加電時にプロナーゼなどの蛋白分解酵素を加えることにより、この電氣融合は著しく促進されることが知られている^{1, 2)}。しかし、極めて高濃度を必要とし、蛋白分解酵素阻害剤PMSFによりあまり影響を受けないことなどから、分解酵素活性そのものには困らず、パルスを受けた細胞に対する非特異的な安定化作用などに帰せられてきた²⁾。ところが、私達はCa²⁺選択性微小電極を用いることによりプロナーゼ標品にはCa²⁺が相当量混在していることを見出し、高濃度プロナーゼ効果の一部はCa²⁺効果によること、適量のCa²⁺存在下ではプロナーゼは低濃度で奏効することを明らかにした³⁾。そこで、この効果は分解酵素活性そのものによるか？、二価陽イオンが実際に電氣融合に関与するか？、の二点が明らかにされなければならない。

蛋白分解酵素はプロナーゼ以外の種々の標品が有効であり（図参照）、これで細胞を前処理す

[図]



るだけでもパルス時存在と同様に有効であり、熱処理により失効し、TLCK (図参照) やアプロチニンなどの分解酵素阻害剤で抑制される。以上の事実から、分解酵素活性そのものにその効果が帰せられることは明白である。細胞表面からの蛋白質の部分的分解・除去が電気融合に適した条件を生み出すものと推定される。³⁾

細胞外の Ca^{2+} , Mg^{2+} 濃度を種々に変化させたり、細胞を Mg^{2+} -free 液中で長時間ロードしたりして電気融合への効果を観察した結果、融合には細胞外に μM オーダーの Ca^{2+} (Mg^{2+} は無効) の存在が不可欠であり、加えて、細胞内又は外液中に mM オーダーの Mg^{2+} (又は Ca^{2+}) の存在が必要であることが明らかになった。⁴⁾⁵⁾

Ca^{2+} , Mg^{2+} 蛋白分解酵素濃度などの条件を整えることにより、高収率 (70~90%) に融合細胞を再現性よく得ることができる。この方法は、異種細胞間融合にも適用することができ、今後細胞工学、遺伝子工学などの分野への応用も期待できる。⁶⁾

[文献]

- 1) Zimmermann (1982) Biochim. Biophys. Acta 694: 227.
- 2) 岡田小作 (1984) 生体の科学 35: 378.
- 3) Ohno-Shosaku & Okada (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun. 120: 138.
- 4) Okada et. al. (1984) Biomed. Res. 5 (in press)
- 5) Chno-Shosaku & Okada (submitted)
- 6) Ohno-Shosaku et al. (1984) Cell Struct. Funct. 9: 193.

ヒヨコ内耳より単離した有毛細胞のトランスダクション電流

大森治紀（東京大・医・脳研）

内耳の感覚受容細胞である有毛細胞は、感覚毛に加わる機械刺激を電気信号に変換するトランスデューサー細胞である。100本程度の stereocilia と 1 本の kinocilium とから構成される感覚毛を、kinocilium の方向に向って変位させる機械刺激によって、脱分極性のトランスダクション電位が生じる。膜電位固定下では、感覚毛に直線的な変位を生ずる機械刺激によって、トランスダクション電流はステップ状の値をとって流れた。このステップ値より、50pSの伝導度を持つ単位トランスダクションチャンネルの存在が示唆された。

一価及び二価陽イオンによってトランスダクション電流は運ばれた。細胞内イオンとして用いたCsイオンに対する相対透過係数は、反転電位からGoldman-Hodgkin-Katzの方程式を用いて推定した。選択性の系列は以下のようであった（表1参照）。

$\text{Li} > \text{Na} \geq \text{K} \geq \text{Rb} > \text{Cs} > \text{choline} > \text{TMA} > \text{TEA}$

$\text{Ca} > \text{Sr} > \text{Ba} > \text{Mn} > \text{Mg}$

トランスダクション電流の発生には外液のCaイオンが必須であった。内リンパのCaイオン濃度に相当する20 μM がトランスダクション電流を安定して記録できた最低濃度であった。SrイオンのみがCaイオン作用を代行し、等張のSr溶液中でトランスダクション電流は安定して記録できた。

表 1

イオン種 (mM)	$E_{\text{rev}}(\text{mV})^{\circ}$	$P_{\text{x}}/P_{\text{cs}}^{+}$		E_{rev}	$P_{\text{x}}/P_{\text{cs}}$
160Li	10.7 ± 1.3	1.39	100Ca	28.2 ± 4.0	4.65
155Na	7.0 ± 1.6	1.22	100Sr	20.6 ± 1.4	2.82
155K	6.8 ± 1.0	1.17	99Ba	20.2 ± 3.4	2.73
157Rb	5.9 ± 1.6	1.12	98Mn	19.0 ± 1.4	2.50
160Cs+2.5Ca	4.3 ± 0.5	0.96*	98Mg	18.0 ± 3.5	2.41
160Cs+20 μM Ca	0.3 ± 0.6	0.99*			
160Choline	-17.0 ± 1.5	0.33			
160TMA	-23.5 ± 7.0	0.20			
160TEA	-25.3 ± 0.4	0.17			

* $P_{\text{ca}}/P_{\text{cs}}$ (4.65) を用いて計算した時の細胞内外Csイオンの相対透過係数。

◎ 反転電位は細胞内160mM Cs溶液に対する。

+ 相対透過係数は細胞外液に加わる1~2.5mM[Ca]を考慮して計算。

マクロファージの食作用と Ca^{2+}

宮本 宏 (新技術開発事業団・創造科学)

はじめに マクロファージは食作用能の活発な単核の細胞で病原微生物や腫瘍細胞に対する生体防御において重要な役割を果たしている。また清掃細胞として免疫複合体、自己の壊れた細胞、異物等も食作用を通して除去する。この食作用の第一段階は細胞膜表面における異物との接触と認識であるが、それを契機とした食作用運動に到る細胞内情報伝達が何によって行なわれているか良く解明されてはいない。しかし Ca 濃度依存にアクチンフィラメントを切断するゲルゾリンがマクロファージより抽出されていること。食作用時に Ca^{2+} の細胞内への流入、細胞からの流出が共に増大することが R 1 のトレーサーを使った実験で示されていることから、細胞内 Ca^{2+} が何らかの関与をしていると考えられる。

方法 細胞は Balb/C マウスリンパ芽球由来の株化マクロファージ様細胞である J 774.2 をモデル系として用いた。培地はダルベッコ変法 MEM に 10% ウシ胎児血清を加え、5% CO_2 95% 空気雰囲気下 37℃ で継代培養を行なった。細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定には Ca^{2+} キレート性蛍光プローブである Quin 2 を細胞内にとりこませ、分光蛍光光度計及び落射蛍光顕微鏡を用いた。

結果 10^6 コ/ml のマクロファージに Zymosan 粒子 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ を与えると細胞内にあらかじめ取込ませておいた Quin 2 の蛍光が小さいながらも減少する。この時試料を光学顕微鏡で観察すると Zymosan を付着、あるいは内部に取込んでいる細胞が多く見られた。外液 Ca^{2+} 濃度を $1 \mu\text{M}$ 以下にして Zymosan 粒子を与えると Quin 2 の蛍光の変化はほとんど見られなかった。また食作用

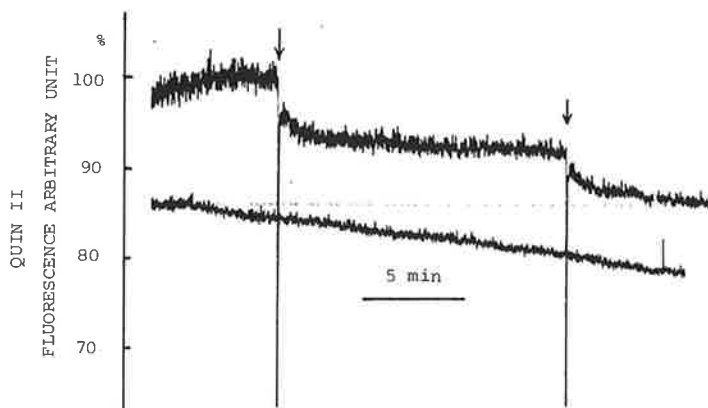


Fig. Zymosan によるマクロファージ内 Quin 2 蛍光の変化。

マクロファージに $5 \mu\text{M}$ Quin2 acetoxymethyl を与えて 20 分間インキュベートした後、外液を洗って蛍光強度を測定した。(Ex. 337nm Em. 490nm) 試料はマグネチックスターラでゆっくりと攪拌しながら矢印の所で Zymosan を $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ となる様に加えた。

が起こるかもしれない。もしくは非常に抑制される低温下（13℃）で Zymosan 粒子を与えると Ca^{2+} が存在しても蛍光の変化は見られなかった。Quin 2 のみに Zymosan を与えても蛍光は変化しない。従って Zymosan を細胞に与えた時に起る蛍光強度の減少は食作用に関係した細胞内 Ca^{2+} の変化を反映していると推測される。

アフリカツメガエル胚外胚葉分化マーカーの単一クローン抗体による研究

岡本治正（東京大・医・脳研）

両棲類囊胚期に形成される三胚葉（外，中，内胚葉）のうち，外胚葉は神経又は表皮系組織のどちらか一方に，又中胚葉は筋肉，脊索，間葉系組織などに分化する事が知られている。しかしこれら神経，筋組織等の初期分化過程，特にその分化運命決定の機構は不明であり，その解析の困難な理由の一つとして，定量的解析の可能な初期分化マーカーの少い事があげられる。そこで単一クローン抗体法により，アフリカツメガエル胚における初期分化マーカーを検索した所，二種の外胚葉初期分化マーカーを得た。又その胚組織特異性，胚発生中の発現経過について解析を試みた。

抗原としては，アフリカツメガエル神経胚を低イオン強度溶液中で破碎した後，不連続ショ糖密度勾配遠心法により粗膜分画を調製して mouse に投与した。なお単一クローン抗体は常法に従い作成し，抗体のスクリーニング，及び発生各段階の胚凍結切片の染色には，間接蛍光抗体法を用いた。

現在までの所，外胚葉初期分化に関係する単一クローン抗体として，EM-1，E-1 の 2 つが得られている。初期神経管期胚で調べてみた所，EM-1 は，表皮，神経管といった外胚葉性組織，及び脊索，筋節など中胚葉性組織一般に強い親和性を示す一方，始原生殖細胞を除く内胚葉細胞には弱い親和性しか示さなかった。一方 E-1 は表皮細胞に特異的に結合する事が明らかになった。

次に抗体結合部位（以下簡単に EM-1 抗原，E-1 抗原と記す）の発現経過を胚発生各段階で検討して，以下の結果を得た。①EM-1 抗原はすでに未受精卵中に，主として動物極側に片寄って存在し，発生に伴い外，中胚葉系の細胞質に分離している。又同抗原は未受精卵植物極近傍にも少量パッチ状に存在し，この部分は発生に伴い，始原生殖細胞質に分離して，次世代未受精卵中の EM-1 抗原の起源となるものと思われる。②E-1 抗原は，三胚葉構造の確率した後，外胚葉が予定神経域，又は表皮域どちらか一方に決定された直後に，予定表皮域にのみ出現する。

従って，神経系の初期分化について考えてみると，EM-1 抗体により，未受精卵中の動物極対植物極という極性にまでさかのぼる事ができる一方，外胚葉からの神経板（予定神経域）の誘導過程は E-1 抗体を用いて予定神経細胞を予定表皮細胞から区別する事により解析可能なものと思われる。

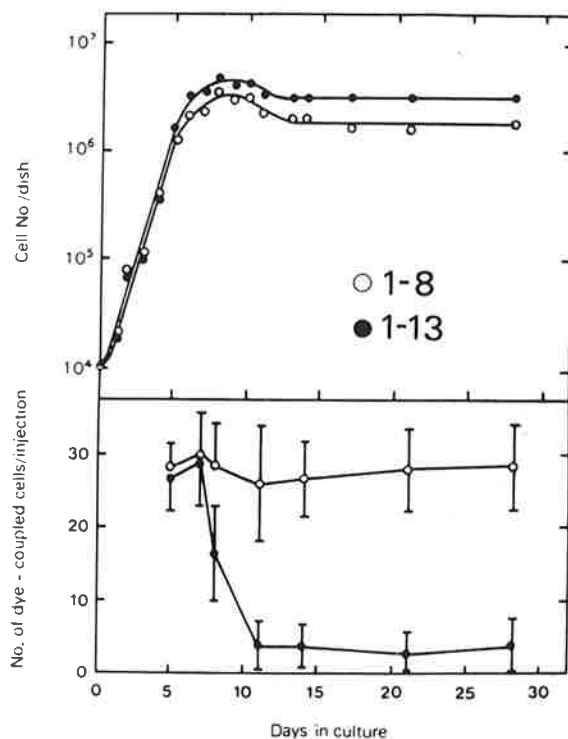
発癌高感受性 Balb/c 3T3 subclone の細胞の細胞間連絡と フィブロネクチン合成パターンの特徴¹

榎本 平, 菅野義信 (広島大・歯), 角永武夫 (大阪大・微研)

山崎 洋 (国際癌研, フランス)

最近, 発癌プロモーターがギャップ結合細胞間連絡を抑制することが解り, 発癌促進過程における細胞間連絡阻害の重要性が示唆されている。本研究では, 試験管内発癌過程における細胞間連絡の役割を調べることを目的として, 角永らが分離した高発癌感受性 Balb/c 3T3 subclone 1-31 と低感受性 1-8 細胞の細胞間連絡能と phorbol ester TPA に対する反応を比較検討した。細胞間連絡は 1 個の細胞にインジェクトスコープを使って注入した Lucifer Yellow 蛍光色素の周囲の細胞への流入移動 (dye transfer) により測定した。

強力な発癌プロモーターである TPA は両 clone 細胞の電氣的細胞間連絡も dye transfer のいずれも強く抑制した。又, TPA の細胞膜 receptor の数も両 clone 間で差はなかった。これは外来性の発癌プロモーター TPA に対しては両 clone 細胞は同じ性質をもっていることを示している。試



験内発癌実験では、悪性形質転換した細胞は発癌物質で処理後4—5週間培養の後に出現してくる。この過程で細胞は増殖期と接触による増殖停止期の2つの増殖状態を経過する。そこで全培養期間中の細胞間連絡能の変化を調べるため、両細胞を発癌実験と同じ条件下で4週間に至り培養し、経時的にdye transfer能を測定した(図)。培養7日目まで、両clone細胞は同じ様な増殖を続けるが、8日目には接触による増殖停止が起こり、これは4週間安定であった。細胞増殖期では、両clone細胞とも高いdye transfer能を示した。低感受性1—8細胞は増殖停止期に入っても高いdye transfer能を示し、これは4週間に至って維持されていた。一方、高感受性1—13細胞では増殖停止が起こる8日目に急激なdye transfer能が減少が起こり、これは4週間後にも回復しなかった。フィブロネクチン合成能を比較したところ、1—13細胞でのみ増殖停止後も盛んな合成が観察された。これらの結果は増殖停止後の細胞間連絡能の減少が試験管内発癌促進に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。又増殖停止後の細胞間連絡の減少はフィブロネクチンのような細胞外マトリックスの過剰な蓄積によるものかもしれない。

〔文献〕

- 1) H. Yamasaki, T. Enomoto, Y. Shiba, Y. Kanno and T. Kakunaga (1984) Cancer Res. (in press)
- 2) T. Kakunaga and J. D. Crow (1980) Science, 209: 505-507.

カエル骨格筋における Na·K-ATPase 活性と細胞内蛋白輸送

北里 宏, 丸中良典, 神戸万里子 (滋賀医大)

カエル骨格筋の細胞外液に insulin (100mu/ml) を与えると Nalk-pump の活性化が認められる。正常の筋に ouabain を与えると Na efflux は抑制され、その後 ouabain を取り去っても Na efflux の回復は認められない。これは ouabain が Na/k 輸送蛋白に不可逆的に結合することを示す。ouabain が存在しているときに insulin を与えても Na efflux の増大は起らないが、ouabain を与え Na efflux を抑制した後 ouabain を取り去り、Na efflux がまだ抑制された状態であるときに insulin を与えると、Na efflux の増大が認められる。このことは、insulin 投与によって新しい Na/k 輸送蛋白が形質膜に埋めこまれたのか、あるいは既に形質膜にある輸送蛋白のうち不活性化状態にあるため ouabain と結合していなかった輸送蛋白が活性化されたのか、その何れかであることを示唆している。この実験は以上の可能性の何れであることを明らかにすることを目的として行われた。

カエル骨格筋を破碎 homogenize し得られた microsome を蔗糖密度勾配にのせ遠沈し、5'-nucleotidase 活性および N-acetylglucosamine-galactosyl transferase 活性を指標として形質膜

に富む分画および Golgi 膜に富む分画を同定した。形質膜分画には Na·K-ATPase 活性が認められた。膜断片は vesicle 状になっていることが電顕によって確かめられた。この vesicle 浮遊液に insulin を加えても Na·K-ATPase 活性の促進は認められず、また vesicle に insulin を封入しても Na·K-ATPase 活性の上昇は認められなかった。これに対して、insulin-pretreated muscle から調製した形質膜 vesicle の Na·K-ATPase 活性は control muscle から調製したものの活性の約 2 倍であった。このことは insulin による Na/k 輸送促進は形質膜にある輸送蛋白に及ぼす直接的な作用ではなく細胞内の変化を伴うものであることを示す。

Actinomycin D は細胞内での蛋白合成を阻害することよく知られている。正常筋を Actinomycin D (1×10^{-6} M) で pretreat としても、これから得られた形質膜分画の Na·K-ATPase 活性には変化は認められなかった。また Actinomycin D と共に insulin で pretreat した筋の形質膜分画の Na·K-ATPase 活性は Actinomycin D がいない場合と同様に上昇した。ところで、Monensin (1×10^{-6} M) fibroblast の fibronectin および procollagen 分泌を抑制することが知られている。これを細胞外液に加えると、insulin による Na·K-ATPase 活性促進の効果は完全に抑制された。

以上のことから、insulin による Na/k 輸送促進は、細胞内における Na/k 輸送蛋白の合成の促進によるのでもなければ、また形質膜に既に存在する不活性な輸送蛋白の活性化によるのでもなく、細胞内に於て合成され貯えられている輸送蛋白が形質膜に輸送され埋めこまれる過程が促進されることによる、と考えられる。

外分泌機転の NMR による研究

村上政隆、今井雄介（大阪医大）、亘 弘（生理研）、瀬尾芳輝（京都府医大）

外分泌腺は、その分泌過程において酸素消費速度が著しく上昇し、熱産生も増加して、エネルギー代謝が活発になることが知られている。ここで消費されるエネルギー（酸素、ブドウ糖など）はそのエネルギー形態を様々な形に変え、物質輸送に供給されると予想される。さらに、分泌速度の関係を調べてみると、このエネルギーのうち分泌仕事として外界にするしごととはごくわずかで、 Na^+ など電解質の輸送に供されるエネルギー流がかなりあると予想される。ことに輸送機構とエネルギー供給機構の接点には、ATP の加水分解により駆動される Na/K ATPase が存在しており、種々の分泌条件下で Na/K ATPase と腺の高エネルギー磷酸化合物（ATP、クレアチン磷酸）の動きを知ることが重要となる。

外分泌腺のモデル臓器としてイヌ顎下腺 Krebs Henseleit Ringer で血管灌流し、これに磷核磁気共鳴法を適用し、アセチルコリン刺激時の分泌量と高エネルギー磷酸化合物（ATP、クレアチ

ン磷酸)の組織レベルを経時的に測定した。灌流液に 5×10^{-6} Mのアセチルコリン (ACh) を加えると、腺から著明な唾液分泌が観察できる。このような分泌状態にある腺ではATPクレアチン磷酸の減少と pH の低下, ADP, Pi の増加が観察された。灌流液から ACh を除去すると、唾液分泌は停止し、各燐化合物のレベルは元にもどる。このように ACh による分泌刺激は ATP CP の消費と ADP Pi の生産を促進し、エネルギー代謝が昂進するものであることが示された。

灌流液の Na^+ を完全に Li^+ で置換すると、ACh 刺激をしても少量の唾液が一過性に分泌するのみで、腺組織の ATP CP は変化しない。ATP CP レベルが減少しないことは細胞外に Na^+ のない条件下では ACh による刺激もエネルギー代謝を昂進しないことを示すもので興味深い。 Na^+ を含む灌流液に戻すと刺激がないにもかかわらず、わずかな分泌と ATP CP レベルの減少が見られた。

これらの結果は、NaCl および水の輸送を主たる機能とする唾液腺上皮膜組織における燐代謝には Na^+ は必須のイオンであり、 Na^+ を完全に Li^+ で置換すると ATP CP の消費は抑制されることを示し、分泌機構の解明に役立つ情報となる。今後、灌流ラット唾液腺にも NMR 法を適用し、飽和移動法による ATP-CP 間のフラックス測定に応用する予定である。

『感覚・知覚の神経機構』

昭和60年2月8日～2月9日

1. 視床腹側基底核群の侵害受容ニューロン

横田敏勝（滋賀医大）

ウレタンクロラローゼ麻酔ネコを用い、視床体性感覚中継核（VPM, VPL）の侵害受容ニューロンの分布を調べたところ、VPM, VPLともに核の外殻（shell）に一致して存在し、侵害刺激にのみ応じるもの、非侵害刺激にも応じるもの、内臓刺激にも応じるものが見出された。

2. 結合腕、視床味覚中枢ニューロンと視床味覚核ニューロンの性質

小川 尚（熊本大・医）

ラットの味覚脳幹中継核であるparabrachial nucleusのニューロンを味覚刺激で同定し、視床への投射様式を逆行性刺激で調べたところ、両側性が多かった。Amugdalaへ投射するニューロンもあった。また視床中継核VPM_{pc}のニューロンを記録しその受容特性を調べたが、一般に受容野が大きく、温度差に応じると思われるものもあった。

3. ネコ大脳皮質における咬筋駆動ニューロンの局在、反応およびその機能について

角野隆二（日本大・歯）

ネコ体性感覚野顔面領域で、咬筋、歯根膜皮膚、顎関節を電気刺激して得られる誘発電位を記録し、その分布を比較した。皮質の微小電気刺激を用い、対側顔面にて、瞬目反射、ヒゲ、舌、顎の動きなどを誘発する部位が2か所（6 a β と43野）あることを見出した。

4. 嗅覚中枢のニオイ情報処理

小野田法彦（群馬大・医）

嗅球と梨状皮質ニューロンのニオイ刺激に対する反応を比較した。嗅球の浅層では、基本ニオイ物質のどれかひとつに応答するニューロンが主であり、尿などの自然のニオイに応答するものはなかった。梨状葉では基本ニオイの組合せに応じるもの、自然のニオイに応じるものが見出された。次に、梨状葉の機能区分を免疫組織化学的に行う試みについて述べた。

5. 聴覚中枢における識別ニューロンの意義

丸山直滋（新潟大・脳研）

純音、帯域雑音、合成ホルマント、合成母音等の刺激音を用い、ネコ大脳聴覚野AIユニットの反応を調べ、純音ユニット、帯域雑音ユニット、子音識別ニューロン、ホルマント識別ニューロン、母音感受性ニューロン、母音識別ニューロン等が認められることを既に報告した。今回は主として母音感受性ニューロンと母音識別ニューロンの性質の比較に基づき、音声弁別上の意義を考察した。ヒトで、母国語の母音は、それぞれ独立の感覚単位となっている。母音識別ニューロン

は、特定の合成母音にのみ反応するので、このような弁別を司ると思われる。中学で初めて英語を習う日本人は、æの音をaとeの中間の音として習い、aとeとの距離を感じつつ判断している。母音感受性ニューロンは、個々のホルマントにも反応し、特定の合成母音に特に大きな反応を示すので、このように判断するような弁別を司ると思われる。

6. 網膜水平細胞から視細胞へのフィードバック回路

金子章道（生理研）

単離網膜視細胞標本に GABA を電気泳動的に与える実験で、① GABA 感受性が赤および緑錐体だけにあり、他の錐体および杆体にはないこと、② GABA 感受性が cone pedicle のみに限局されることなどが示された。これらの実験結果は赤および緑錐体が GABAergic シナプスを持つことを示すもので、Stell-Baylor の水平細胞から錐体への free-back により color opponency を説明するモデルとそのシナプス（H1 水平細胞）が GABAergic であるとする説を支持するものであるという考えが示された。これに対し、実験結果と双極細胞の color opponency との関連が議論された。

7. コイおよびカワヤツメ網膜における水平細胞軸索の配列方位 根岸晃六（金沢大・医）

pH あるいは c-AMP 誘導体などにより水平細胞の dye coupling を抑制して、蛍光色素を細胞内に注入し、軸索の走行を調べると、ヤツメウナギでは大部分の軸索は左右の optic disc を結ぶ線に平行に（水平方向）走るのに対し、コイでは軸索は大部分が optic disc を中心にして、放射線方向に、あるいはこれと直角な接線方向に延びることが示された。これらの実験結果と網膜の生後発達の関連が議論された。

8. 遺伝性小眼球症ラットの外側膝状体細胞の形成不全

大谷克己（千葉大・医）

遺伝性小眼球症ラットの視覚系を調べ、視覚系全体に神経核の大きさ、細胞の数、細胞体の大きさ、樹状突起の数、spine の数について、正常ラットに比して 70～30% の減少があること、これらの発達不全は特に副視束路系で最も強く、他の非外側膝状体系がこれに続き、外側膝状体系が最も軽いことなどが示された。これらの実験結果と眼球摘除実験の効果との関連が議論された。

9. 新生仔期片眼摘出ネコにおける外側膝状体中継細胞の視神経支配様式

福田 淳（大阪大・医）

層（A, A₁, C）の同側支配の A₁ 層に対側からの投射が起こり、(Guillery, 1972) それが対側支配の A 層と、C 層からの側芽形成（sprouting）によることが知られている (Robson et al, 1978)。しかし個々のニューロンの性質がどう変わるかは調べられていない。そこで本研究では、出生直後のネコで片側の眼を剔除し、数か月後に外側膝状体の中継細胞の光刺激に対する反応を調べた。まず、X, Y, Z の三つの型について見ると、剔除後もこの三つの型にきれいにわかれ、on 中心型と off 中心型の 2 つのタイプに別れる。しかし中心部の受容野が正常に較べて 2—3 倍の大き

さに拡大しているのが特徴である。また、A₁層の中心部には光刺激に全く反応しない細胞があり、その多くが群発性発射活動を示す。このような細胞は正常な細胞と違って中脳網様体刺激で発射が抑制された。

10. 外側膝状核ニューロン活動に対するコリン作動性制御 小川哲郎（秋田大・医）

上行性網様体賦活系がコリン作動性かアドレナリン作動性かについては古くから議論があるが、ラットの中脳網様体ではCAT (Choline-acetyl-transferase) 陽性の細胞群がある。CAT陽性細胞の分布する部位を電気刺激すると、外側膝状体の中継細胞 (P-cell) に促通が起こる。この部位はLDTN(Latero-dorsal tegmental nucleus) と一致する。この促通効果はムスカリン様作用の遮断剤であるスコポラミンの局所投与によって消失する。一方、アドレナリンの α ブロッカーのフェントラミンではほとんど変化がない。P-cellに対するLDT刺激の促通効果は、on反応またはoff反応の増大である場合もあるが、その他に持続性の発射活動の増大が見られることもあり、視覚野でAchによって起る識別性の増加と同じ効果があるかどうかはまだはっきりしない。一方、外側膝状体のI-cellにはLDT刺激は抑制効果を持ち、視床網様核ニューロン (P-cellに抑制的) はLDT刺激で持続性の発射を起こす。

11. 大脳皮質視覚領における興奮性伝達物質の役割 津本忠治（大阪大・医）

視覚野のニューロン結合はかなりよく分かっているが、抑制性の伝達物質がGABAであることが分かっているだけで、興奮性伝達物質はまだ分っていない。しかし、グルタミン酸とアスパラギン酸が伝達物質の候補に挙げられており、キスカル酸、カイニン酸等がアゴニストと考えられている。本研究ではこれらのアゴニストの作用を中心に調べた。5連の微小電極にグルタミン酸、アスパラギン酸、キヌレン酸等を詰め、ionophoreticに注入した。キヌレン酸はグルタメートとアスパルテートの興奮作用をブロックする。また単純細胞では光刺激に対する応答がキヌレン酸でブロックされる。しかしspecial complex cellの反応はキヌレン酸ではブロックされない。通常の複雑細胞にはキヌレン酸が有効である。層別に見るとIVa, IVb, IVc層とVI層上部のニューロンがキヌレン酸でブロックされる。結論的にいえば外側膝状体から直接結合しているシナプスにはキヌレン酸が有効であるが、皮質内結合のシナプスには無効である。従って、外側膝状体からのシナプスがグルタミン酸（またはアスパラギン酸）作動性である可能性が高い。

12. 視覚前野における運動情報の処理 深田芳郎（NHK放送技研）

サル視覚前野のMT野とそれより前の領域 (MST野またはDSR-zone) のニューロンの視覚的運動刺激に対する反応を笑気麻酔のサルで調べた。MT野では受容野の周囲のドットパターンを同方向に動かしたときに抑制されるものとされないものの2種類があった。DSR-zoneではスリット反応するがドットパターンに反応しないobject型と、ドットパターンに反応するがスリットには反応しないField型、および両方に反応する非選択型の三つのタイプがあった。また像の大

きさの変化に反応するニューロンも多く、その場合も円板または正方形の拡大に反応するものと、ドットパターン全体の拡大に反応するものがあった。また回転運動に選択的に反応する細胞もあった。刺激にはランダムパターンとスリットおよび一対のスポットの三種類を使ったが、大部分はランダムパターンだけに反応し、スリットやスポットに反応するものは少なかった。最後に実物の顔や手など三次元的な物の動きにのみ反応し、平面的な図形の動きには反応しないものもいくつか見つかった。

『生理学における数学的方法』

昭和60年 2月22日～2月23日

イヌ体液系の輸液負荷時の動特性

伊藤俊之（京都府立医大）

生体回路モデル合成法の熱力学的基礎

今井雄介，村上政隆，吉田秀世（大阪医大）

組織インピーダンスの測定について

吉田秀世（大阪医大）

神経細胞の自発性活動の拡散モデル

佐藤俊輔（大阪大・基礎工）

膜内濃度をあらわに考慮した非電解質の膜透過式

品川嘉也（日本医大）

Replicon replication model にもとづく cell cycle の simulation

高橋 学（山口大・医）

ある細胞集団での熱力学的挙動

寺本 英（京都大・理）

ブラウン粒子を駆動するノイズ

久保 泉（広島大・総合科学部）

電子スピン共鳴スペクトルの解析

亘 弘（生理研）

Ligand binding polynomial について

磯本昭夫（大阪大・医）

パーソナルコンピュータによる連続シュミレータ

臼井支朗，村瀬一之（豊橋技科大）

神経束速度分布関数のキャラクタリゼーション

磯貝芳徳（京都府立医大）

ヤング図形の上の確立分布の値をとる確率過程

清水昭信（名工大）

混合ポアソン過程の超汎関数について

伊藤嘉房（名大・医療短大）

自己組織神経場における微細構造の形成について

甘利俊一（東大・工），丸山 稔（菱電機・中研）

形態と機能とを橋わたすステレオロジー

石坂昭三, 古牟田裕 (筑波大・生物科学系)

テキスチャ様刺激と網膜水平細胞の空間加算効果

安井湘三 (基生研), 大塚輝彌 (生理研)

脊椎動物網膜内情報処理

中 研一 (基生研), 桜永昌徳 (日本医大)

頻回閃光刺激による視覚誘発電位の非線形性応答

渡辺 悟 (名大・環境研), 四方義啓 (名大・理), 芝垣正光 (愛知県身傷者コロニー)

眼底写真の画像解析の試み

橋本正史, 磯本昭夫, 福田全克 (大阪大・医)

概要

細胞生物学からブラウン運動まで, 広い範囲にわたって, 生理学における数学的モデルの足式化と解析がおこなわれた。イヌ体液分布のコンパートメント分析や視覚誘発電位の非線形応答のようなまるごとの生理学に近い研究, ダイナミックシステムの解析に適したパソコンソフトウェアの開発, 微小形態の新しい光学的研究法, 二, 三の確立過程についての新しい展開など, 方法論的な反省をよびおこすテーマもあり, 活発に討論された。数学・物理・生理・生物学など広範囲からの参加者が, それぞれ多様な刺激をうけたと思われる。

イヌ体液系の輸液負荷時の動特性

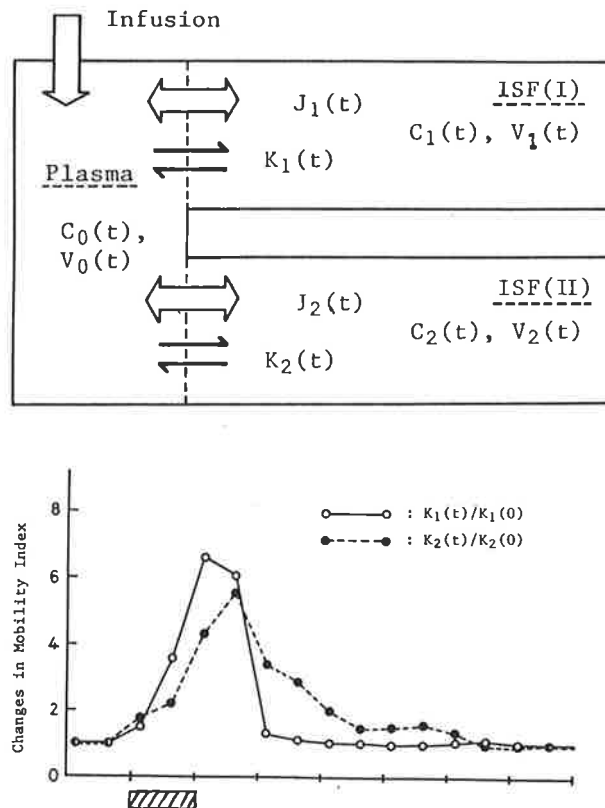
伊藤俊之, 三木健寿*, 森本武利 (京府医大*産業医大)

生体内の細胞はすべて細胞外液 (ECF) に浸って生命活動を営んでおり, 生体の恒常性を維持するうえで ECF の果たしている役割は極めて大きい。しかし ECF は, 測定に用いる tracer ごとに分布体積が異なるなどの測定上の問題があり, その動態についてはほとんど解明されていない。

我々は先に, 近年 ECF 測定 tracer のひとつとして広汎に用いられはじめた ^{51}Cr -EDTA の生体内分布特性を解析し, 報告した (*). すなわち, 循環血液中 γ 線連続測定法を用いて, ^{51}Cr -EDTA を one-shot で注入したあとの血中 RI 活性を連続的に計測し, その希釈曲線の分析から, イヌ細胞外液 (^{51}Cr -EDTA space) が三分画に区分されるべきことを見出して, 二種類の compartment model を構成したものである。

今回はこのうちの「並列モデル」, すなわち plasma に対して, tracer の access の速い間質液

(I) と access の遅い間質液 (II) とが並列に接するという schema が、輸液という負荷に対してどう応答するかについて解析を加えた。脾・腎臓を摘出したイヌに ^{51}Cr -EDTA を注入しておき、平衡状態で $10\text{ml/kg}\cdot 10\text{min}$ の乳酸加 Ringer 液を輸液し、この時の血中 ^{51}Cr 活性, Hct 値の変化を連続的に測定した。これと同時に、イヌに埋め込んだ多孔カプセルにより、皮下間質の静水圧をやはり連続測定した。Hct 値から plasma の体積変化が、間質静水圧から間質液 (II) の体積変化が求まるので、結局 ECF 構成三分画の夫々について体積変化の連続 Profile が得られる。我々の基本的方法は、この体液移動を惹起する力学因子を決定するのではなく、かかる体液再分布のもとでの tracer の移動を数理的に記述し、実測データとの fitting から、並列モデルの “mobility index K_j ” の経時変化を求めるものである。結果を右下図に示す。mobility index は定数ではなく、輸液と共に過渡的に増加するが、これは交換血管領域における拡散流・体積流の増加、compartment 中での増加にするもので、全身実験から微小循環動態を推定する際の現象論的指標となるものと考えられる。



(*) Jpn. J. Physiol. 34 (4) : 641-654 (1984)

生体回路モデル合成法の熱力学的基礎

今井雄介, 村上政隆, 吉田秀世 (大阪医大)

熱力学はあらゆるシステムの背後にある原理となる。先年度にシステムの全自由エネルギーの変化速度が全散逸と釣り合うとして、これから回路モデルが合成できることを報告した。すなわち、全自由エネルギー変化は、システム内の各パワー種の自由エネルギー変化素子で起こり、その変化速度はそこでのパワーの総和で表現される。また全散逸は各散逸素子でのパワーの総和で表現される。

パワー種の各々については、自由エネルギー変化速度とパワー散逸、その他にパワー変換伝達を考えることで釣り合うものとなる。このことからシステム内でのパワー変換伝達の総和が零であり、保存的な変換体で表現できる。

具体的に膜輸送系は一般化容量体、一般化抵抗体およびパワー変換体をもって回路モデルとすることができる。この回路モデルをもちいたシュミレーションは実際の系挙動をよく再現するものであり、いくつかの予測も可能となることを報告した。

今回は、古典熱力学に遡って前述のパワー釣り合いが成立する条件を検討したので報告する。普通の記号を用いて熱力学の2つの法則をパワーの単位で表現する。まず閉鎖系について考える。

$$\frac{du}{dt} = \frac{dQ}{dt} - P \frac{dv}{dt} \quad (1)$$

$$T \frac{ds}{dt} = T \frac{deS}{dt} + T \frac{diS}{dt} \quad (2)$$

(2) 式の内容は閉鎖系に対して次である。

$$T \frac{deS}{dt} = \frac{dQ}{dt}, \quad T \frac{diS}{dt} = \Phi = \frac{dQ'}{dt} \quad (3)$$

Φ は散逸関数で常に正の値を持つ。

今、等温等圧下でのシステムの自由エネルギーの変化速度を考える。これに(1)~(3)式を代入する。閉鎖系では次になる。

$$\left(\frac{dG}{dt} \right)_{T,P} = -\Phi \quad (4)$$

すなわち回路モデルで用いたパワー釣り合い関係は、等温等圧の閉鎖条件において成立する。つぎに等温等圧の物質交換を許す解放条件について考察する。物質交換に伴い系に入るパワーを dW'/dt として(1)式に加える。また物質交換に伴うエントロピー変化を dxs で表現すると(3)式の内容は次になる。

$$T \frac{deS}{dt} = \frac{dQ}{dt} + T \frac{dxS}{dt} \quad (5)$$

したがって開放系でのパワー釣り合いは次で示される。

$$\left(\frac{dG}{dt} \right) = \frac{dw'}{dt} - T \frac{dxS}{dt} - \Phi \quad (6)$$

(6) 式を用いることにより開放系の回路モデル合成が可能となることも報告する。

組織インピーダンスの測定について

吉田秀世（大阪医大），中張隆司（大阪医大）

誘電測定では，分析実験などとは異なり，調べる対象を任意の状態および条件に保ちつつ，その系を乱すことなく測定ができるので，生物細胞や組織にも古くから応用されてきた。しかしその物理的解釈となると，適当な理論がみあたらない。Pauchy Schwan（1959）らの被膜球懸濁系の理論は，細胞のように，イオンを透過しにくい薄い膜で覆われた系には適したものと思われる。この懸濁系の理論を発展させて，細胞を単位として複雑な構造をもつ組織に応用していくために，組織に何らかの変化を起こさせて，そのインピーダンス変化を捉えて手懸かりを得ようと試みた。犬顎下腺は刺激により，大量の水を動脈側から腺腔側へ輸送し，唾液として分泌することが知られている。この時のコンダクタンスを測定してみると，図2に示す如く，刺激時にはコンダクタンスが大きくなる。誘電率の変化については，白金電極の分極の寄与が大きいため明確ではない。また抵抗とリアクタンスの複素平面上で表わしたのが図3で，円弧が二つ重なった形をしている。この形に注目して，データの定量化のために，図1の様な等価回路を用いて，各パラメータを最小自乗法により求めた。現在，どこ迄が電極の寄与なのか，他の組織（筋肉，肝臓，赤血球）の測定と比較しながら検討している。

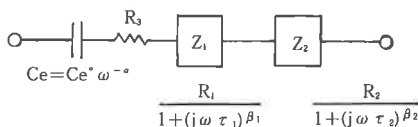


図1

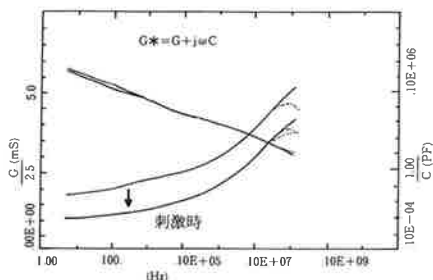


図2

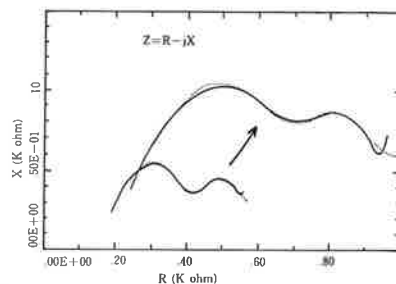


図3

神経細胞の自発性活動の拡散モデル

佐藤俊輔（大阪大・基礎工）

横紋筋の筋線維の束に並行して存在する筋紡錘は、筋の張力受容器として知られている。筋紡錘は筋が伸張すればそれにつれて伸張する。筋が伸張すれば筋紡錘は放電し求心性神経線維を通じてインパルス系列を送る。筋の張力が一定ならば筋紡錘から発射されるインパルス列の間隔は一定であると期待される。しかしKatz (1950)の実験によれば伸張したカエルの筋の中にある筋紡錘からの神経インパルスの間隔は一定ではなくランダムにゆらぐ。Katzはインパルスがランダムに発射される原因として筋紡錘の伸張の機械的受容物質における分子の擾乱、または終末におけるイオンの雑音をあげている。

Buller, Nicholls and Strom (1953)はカエルの筋紡錘からのインパルス発射についてさらに詳しい実験をした。筋肉を自然の長さにしておくと線維は10インパルス/秒以下の頻度で不規則に発火する。そしてこの長さより筋を短くすればほとんどの筋紡錘は放電しなくなる。筋が自然の長さをこえてひきのばされると放電の割合は増加し発火時間間隔に規則性が増す。実験によると平均発火時間間隔 (μ) が6—160msec では、発火時間間隔の分布が平均値のまわりにほぼ対称になり、分布の標準偏差 (s.d.) とのあいだに $s.d. \propto \mu^2$ という関係が得られている。また $\mu > 160$ msec ではこの分布は非対称になり $s.d. \propto \mu$ の関係がなりたつことを報告している。

Biscoe and Taylor (1963) はネコの化学受容器でも同様な関係がみられることを示した。

Purkinje 細胞のように複雑な神経回路に属する神経細胞は外からの刺激がなくても回路内の他のニューロンからの影響によってランダムに発火している。このような自発性の興奮に伴うインパルス発射はおおむね不規則であり従って統計的な性質が実験的にしらべられてきた (Stein, 1972; Knight, 1972)。

一方この不規則なスパイク列は確率点過程によってモデル化され不規則性の統計が研究されてきた (Superposition model : Bishop, Levick and Williams, 1964 ; Deletion model : Ten Hoopen and Reuver, 1965; Srinivasan and Rajamannar, 1970 ; Rade, 1972 ; Random walk model : Gerstein and Mandelbrot, 1964 ; Diffusion model : Roy and Smith, 1969 ; Capocelli and Ricciardi, 1973 ; Sato, 1978 ; Ricciardi, Sacerdote and Sato, 1983)

ニューロンのスパイク発生が膜電位が閾値に達したときになされると仮定すれば膜電位の変動の統計的性質がスパイク系列の統計を支配することになる。ニューロンの拡散モデルは膜電位 $X(t)$ が次式に従って変化するというモデルである。

$$X(t)/dt = -X(t)/\theta + Z(t)$$

ここで θ は細胞膜電位の減衰の時定数。 $Z(t)$ はこのニューロンにたいする他のニューロンやその他のものからの影響はすべてひっくるめたもので、 $X(t)$ にくらべて十分に早い白色雑音的変動をする

とかんがえてよい。この仮定のもとでニューロンの自発的火系列の統計的性質をしらべる問題はある値から出発した膜電位 $X(t)$ が閾値 $S(t)$ に達するまでの時間（初通過時間）のそれをしらべる問題に帰着される。

$S(t)=S$ （一定値）のときには

$$\mu \propto \sigma^2$$

となり，Buller et al や Biscoe et al が実験的に得た関係は導かれぬ。

ニューロンはスパイクを発生した直後は刺激にたいして応答を示さないといういわゆる不応期をもちこれは閾値がスパイク発生直後に非常に高いということとおきかえてもよい。従って閾値は一定ではなく時間とともに変化するとかんがえるべきだろう。この場合に初通過時間分布は Durbin (1971) の方法で数値計算が可能であり現在それを計算中である。

2 個以上のニューロンが相互作用をしたり類似した雑音入力を周囲から受ける場合にはそれぞれが生成するスパイク系列もまた互いに従属する。その関係は多次元のベクトル拡散過程の初通過時間分布からしらべられる。実験的に得られた系列コレログラムやその拡張（Snowflake plots : Perkel et al, 1976）とベクトル拡散過程の関係をしらべてみることも有意義であろう。

膜内濃度をあらわに考慮した非電解質の膜透過式

品川嘉也（日本医科大）

担体流の膜方程式としては Kedem-Katchalsky の式を担体にあてはめた

$$\frac{dv}{dt} = L \left(\Delta P - C_a + \frac{X}{V} + \frac{\sigma S}{V} - \sigma C_e \right) \quad (1)$$

$$\frac{ds}{dt} = w \left(\frac{C_e}{K_a + C_e} - \frac{S/V}{K_a + S/V} \right) + \bar{C}_s (1 - \sigma) \frac{dv}{dt} \quad (2)$$

$$\bar{C}_s = \frac{E_0}{2} \left(\frac{C_e}{K_a + C_e} + \frac{S/V}{K_a + S/V} \right) \quad (3)$$

が用いられる。この式で Overshoot uptake を再現できること，bimit cycle 解を持つことは以前に報告した。Limit cycle 解の存在の証明は，久保泉先生によって，コンピュータを補助に使う数学的に厳密に証明する方法でなされた。

上の式は膜内での溶質濃度 $\bar{C}_s$ に平衡が仮定されている。平衡仮定が正しいかどうかを検討する目的で(2)，(3)式を次のように改め，濃内溶質濃度 C_s をあらわに計算した。

$$\frac{ds}{dt} = w_1 \left(\frac{C_e}{K_a + C_e} - \frac{S/V}{K_a + S/V} \right) + C_s (1 - \sigma) \frac{dv}{dt} \quad (4)$$

$$\frac{dC_s}{dt} = w_2 \left(C_e \left(\frac{E_0}{2} - C_s \right) - K_a C_s \right) \quad (5)$$

平衡点では $C_s^\infty = \frac{E_0 C_e}{K_a + C_e}$, $S^\infty / V^\infty = C_e$ となるので定数係数を別として(2), (3)式に一致する。

計算の結果, C_s は速に平衡値に接近するが, S - V 平面では周期的に振動する解があり bimit cycle に似ている。このとき S - V 平面では軌道が交叉するように見え C_s 方向には極めて薄い空間内にアトラクターが存在するように見える。解の性質について更に検討を続ける。

生理学的意味としては, E_0 (担体濃度) したがって C_s が大きいところで膜振動を生じることは (2), (3)式と(4), (5)式に共通して居り, Overshoot が $C_s \geq C_e$ の条件で起こることも共通して示された。膜内での平衡を仮定することは, そう悪い近似ではない。

Replicon Replication Model によるCell Cycle のSimulation

高橋 学 (山口大・医)

はじめに

昨年度の研究会においては, replicon 複製過程の Monte Carlo simulation model を提出し, それに基づいて算出した replicon の center-to-center distance の分布などから, モデルの妥当性を検討し, 併せて DNA 合成速度の S 期内分布の simulation を行った。今回は, bromodeoxyuridine (BrdUrd = thymidine analog) により pulse label された細胞が cell cycle を進行する状況を Monte Carlo 法で simulate し, また数学的な定式化を試みた。

実験データ

実験データは, HeLa 細胞を10分間 BrdUrd で標識し, その直後 ($t = 0$) に固定し, 抗 BrdUrd 抗体と FITC 標識抗ガンマグロブリン抗体を作用させ, 同時に DNA を propidium iodide (PI) で染め, flow cytometer で測定したもので, BrdUrd の取込み量と DNA 量にそれぞれ比例した黄緑色蛍光と赤色蛍光を, 縦軸と横軸にとった細胞の二次元分布 (BrdUrd-DNA 相関図) (図1), および BrdUrd 標識後色々の時間 (t) BrdUrd の存在しない培地で培養した細胞の BrdUrd-DNA 相関図である。

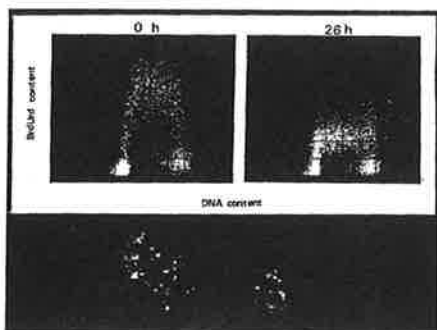


図1

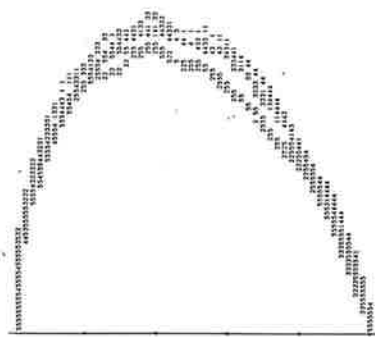


図2

DNA 合成速度はS期の中程で高く、 $t = 0$ で相関図は逆U字型。 t が増すと、頂点が右に押し倒されて、右に傾いた逆V字型となる。図1右上は、 $t = 26$ 時間 (cycle time) のもの。全体の形は、 $t = 0$ のそれとほぼ同じ (細胞分裂のため高さが半分)。これは、全細胞の cycle time がほぼ同じであることを示している。このパターンの推移から、cell cycleの各期の持続が時間を求めるのが、当面の問題である。

モデル

昨年度に報告したのと減速的に同じ (生理学研究所年報第5巻, p. 335—338, 1984)。但し, Monte Carlo simulationの速度を著しく向上させ, 1 ミクロンの DNA segments 10万個の集まりからなる DNA (計10cm) 上での複製を扱った。

シミュレーションの方法

DNA segments に対応する配列 (配列要素は10万個) を用意し, 複製の時間 (単位は分) を記入していく。DNA の領域を m 個の clusters に分けてから, 次の操作に移る。

(1) 時間を1とする。平均値の n の一様乱数を発生させ, arrivalの個数 (n_1) を決める。次に, n_1 個の一様乱数 (cluster 1 の上に一様に分布するものとする) を発生させ, arrival sites ($s_1, s_2, \dots, s_{n_1}$) を決める。そこが最初の initiation sites となる。だから, 対応する配列要素に, 時間1を記入する。

(2) 時間を2とし, 以後は同じことを行う。しかし, 乱数により指定された配列要素に, 既に時間が記入されていれば, arrivalは不発に終わるものとする。また, 時間1が記入されている配列要素の両隣りに, 時間2を記入する。以下同様。

こうして, 全配列要素に時間を記入する。これを複製テーブルと呼ぶ。これから色々のことが判る。時間 i における DNA 合成速度は, 時間 i が記入されている配列要素の個数に等しいし, 時間 i までに複製された DNA の量は, i 以下の時間が記入されている配列要素の数に等しく, DNA 合成速度とDNA量との関係が得られる。

BrdUrd-DNA 相関図の経時的変化のシミュレーション

$t = 0$ に或る DNA 量を持っていた細胞が, 時間 t には DNA 量が幾らの細胞になっているかを問題にする。DNA 量を指定すると, BrdUrd 取込み量が決まる。その細胞はそれだけの BrdUrd を持ったまま, DNA 量だけを増加させ, 相関図上で点は右に平行移動する。どれほど移動するかは, 次のようにして判る。S期時間とDNA量の関係 (前途) が判っているから, $t = 0$ における DNA 量から細胞のS期時間 (s 分) が判り, 更に t 分経過したときの DNA 量 (S期時間が $s+t$ 分の細胞の DNA 量) が判る。

結果

次の仮定のもとで計算した。DNA は長さ10cm。5つの clusters に分かれ, trigger region は各 cluster の末端部10%を占め, arrivalの頻度は平均5回/分。その結果, S期は約7時間 (427.2分), 変動係数 CV は約5.6%。図2は, $t = 0$ における BrdUrd-DNA 相関図。図3は, $t = 2$ 時間, $t = 4$ 時間経過後のものである。

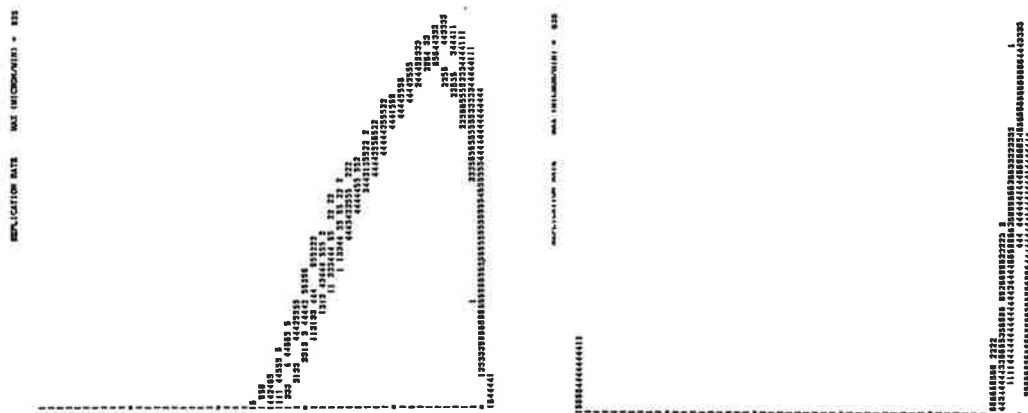


図 3

図 3 から判ることは、 $t = 2$ 時間の時点において既に、標識細胞群の最左端の細胞 (early S cell) も含め全標識細胞が、S 期のほぼ中央にまで移動していることである。これら細胞が、このままの速度で移動すると仮定すれば、S 期は 4 時間で終わらなければならない。従って、S 中期通過時間に準拠し、比例関係で S 期の長さを求めるなら、S 期は過少評価される。

(2) Cluster 別に見た BrdUrd-DNA 相関図

上記の同様の DNA clusters の複製を、cluster 別に表示したのが図 4 である。この結果から、第 4 第 5 の cluster の複製開始は、他に比して遅れているが、各 cluster の複製完了はほぼ同時に起こることが判る。

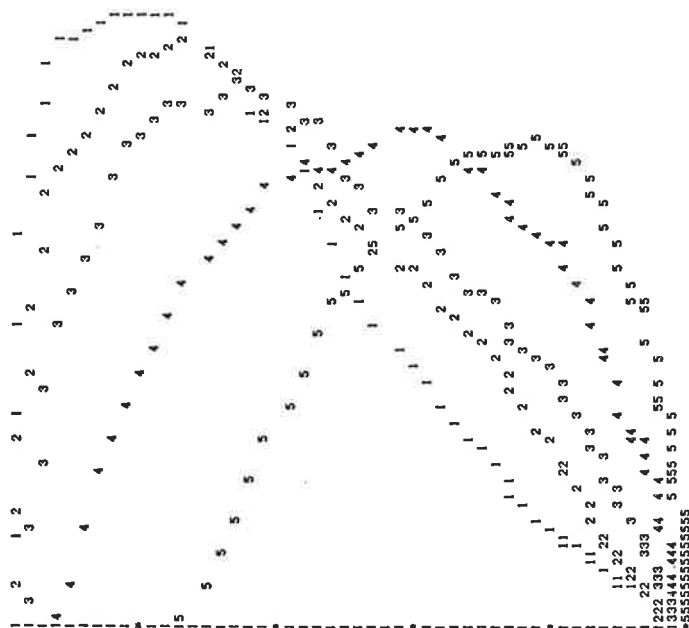


図 4

解析的方法の試み

DNA 合成速度の経時的变化

一つの cluster からなる DNA が複製する過程において, fork 衝突の確率が fork の数に比例すると仮定し (この点で前途のモデルとは異なる), 決定論的なモデルを考え, S 期の時間 t における DNA 合成速度 $f(t)$ を計算する。 $f(t)$ は, fork の数に比例する。また, DNA の長さを 1 とする。

$$df(t)/dt = \alpha(1-r(t)) - \beta f(t) \quad (1)$$

第一項は, 新しい fork 形成確率である。 $r(t)$ は, 時間 t において既に複製されている DNA 量。 $1-r(t)$ は, initiation 可能な区域の広さ, 即ち initiation の成功確率に比例している。第二項は, fork 消滅確率であるが, それは fork の衝突確率にひとしい。二つの fork が衝突する度に fork が一つ減少するからである。また, $r(t)$ は DNA 合成速度の積分に等しい。 $r(t) = \int f(t)dt$ (2)

故に, 上記の方程式(1)は微分積分方程式となり, その Laplace 変換は

$$sF(s) = \alpha(1/s - F(s)/s) - \beta F(s) \quad (3)$$

$$\text{となる。これを整理すると, } F(s) = \alpha/(s^2 + \beta s + \alpha) \quad (4)$$

但し, $f(0) = 0$ としてある。

結局, 原関数 $f(t)$ は

$$f(t) = (\alpha/\gamma) \exp(-\beta t/2) \sin \gamma t \quad \gamma = \sqrt{\alpha - (\beta/2)^2} \quad (5)$$

となる。

(2) BrdUrd-DNA 相関図

DNA 合成速度の経時的变化を表す式(5)から, BrdUrd-DNA 相関図 ($y = F(x)$) を作るには,

$$x = \int_0^t f(\tau) d\tau \quad (6)$$

$$y = f(t) \quad (7)$$

とすればよい。なお,

$$\int_0^t f(t) = 1 - \exp(-\beta t/2) [\cos \gamma t + (\beta/2\gamma) \sin \gamma t] \quad (8)$$

これは, 核の成長曲線 (S 字状の成長曲線) である。

Fork 衝突確率を現実的なものにするには, β を $r(t)$ の関数とすることが必要で, その形は

$$\beta = 1/(1 - r(t)) \quad (9)$$

である。しかし, その β では方程式(1)は解析的には解けない。

おわりに

核の DNA 合成過程は, 興味深い確率過程であるが, 未だ克服すべき問題を多数含んでいる。

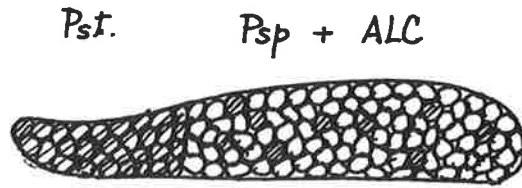
細胞粘菌の細胞選別に関する凝熱力学的モデル

寺本 英 (京都大・理)

細胞性粘菌のライフサイクルの各段階でみられる現象は, 細胞の分化・選別・形態形式など生

物システムの基本的現象を示す比較的簡単な例として理論的考察の対象になってきた。1) 走化性によるアメーバの集合, 2) 調節された細胞分化, 3) 細胞の選別と運動などについていろいろ理論的な研究がなされてきた。とくに, 分化と選別に関しては, 再生の現象などにも関係して, 位置情報と関連づけた考え方がとられてきていたが, Tasaka & Takeuchi (1981) の研究によって, 細胞分化とその調節には位置情報は直接には関係していない可能性があることが示され, 一般に認められるようになってきた。したがって, ここでも分化と選別とは別個の現象として選別に関するモデルを考えることにする。ここではとくに最近Kakutani & Takeuchiによる巧妙な実験結果を記述するためのモデルを紹介しよう。問題はSternfeld & David (1981) が第3番目の細胞と主張した anterior like cell (ALC) の挙動を確かめることである。

Kakutani & Takeuchiの実験によれば, 移動体の後部に存在しているALCは移動体内でランダムな移動運動としていて, 前部を占めている予定柄細胞(Pst)との間に入りがあることが確かめられている。しかし, ALCの割合は一定に保たれている。この系を熱力学的モデルによって考えてみる。



X: 予定柄細胞数 Y: 予定柄細胞数 n: Anterior LiKeCell 数
Pst Psp ALC

ここで, $X+Y+n=N$, $Y/(x+n)=R$ は与えられているとする。

— ε_1 : Pst-Pst, Pst-ALC, ALC-ALC の相互作用エネルギー

— ε_2 : Psp-Psp の相互作用エネルギー

— ε_{12} : Psp-Pst, Psp-ALC の相互作用エネルギー

Z: 最近接細胞数

とすれば, この系のエネルギーは

$$E = -Z \varepsilon_1 X - Z \left(\frac{Y}{Y+n} \varepsilon_2 + \frac{n}{Y+n} \varepsilon_{12} \right) Y - Z \left(\frac{Y}{Y+n} \varepsilon_{12} + \frac{n}{Y+n} \varepsilon_{12} \right) n$$

エントロピーは

$$S = K \log \frac{(Y+n)!}{Y! n!} = K [(Y+n) \ell_n(Y+n) - Y \ell_n Y - n \ell_n n]$$

自由エネルギー $F(n, \theta) = E(n) - \theta S(n)$ を考えるが, K , θ は細胞集団レベルでの特性定数と特性温度と考える。自由エネルギー最小の条件は,

$$(1+x_0)^2 \ell_n \left(\frac{1+x_0}{x_0} \right) = \frac{2Z \varepsilon}{K \theta} \equiv \lambda$$

ただし,

$$x_0 = n_0 / Y, \quad \varepsilon = \frac{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}{2} - \varepsilon_{12}$$

を与える。この式から実験値 x を用いて λ の値を推定できる。

つぎに, Pst と ALC を赤く生体染色した粘菌と青く染めた粘菌を前部・後部に切断して交換して移植した菌を用いた実験を考える。青い Pst と赤い ALC が時間が経つと交り合って全体として紫色に変化する動的過程は,

ξ : blue ALC の数

$$\xi + \eta = \eta_0$$

η : red " "

とすれば, ξ の変化は

$$\frac{d\xi}{dt} = \kappa_0 \frac{x_0 - \xi}{x_0} \rho S - \kappa' \frac{\xi}{Y + n_0}$$

で与えられ, $\kappa' = \tau / t, \kappa = \kappa_0 / \kappa' = \exp\left[-\lambda \left(\frac{Y}{Y + n_0}\right)^2\right]$

$$\xi = \frac{X_0 n_0}{X_0 + n_0} \left[1 - \exp\left(-\frac{X_0 + n_0}{X_0(Y + n_0)} t\right) \right]$$

となり, すべて平衡状態の量で記述することができる。

実験データとの大体の一致は得られるが, こうした考え方の是非さらに他の実験との比較が必要であり, 理論的には, 分化と選別を組み合わせた理論モデルを作ることがこれからの問題といえる。

ブラウン粒子を駆動するノイズ

久保 泉 (広島大・総合科学部)

1827年ブラウンは顕微鏡下で花粉を砕いた粒子が不規則な運動をすることを発見し, 他の有機物の破片, 化石や木炭の粉末, はてはスフィングスの欠片, 岩石・ガラスの粉末に対しても同様の現象が起ることを確認したことは有名である。1905年アインシュタインはこの不規則運動が溶液の分子の巨視的な粒子に衝突することによって起る揺動であることに気付く, 巨視的に測定出来る量と微視的な量を結びつける揺動散逸定理を導き, アボガドロ数を決定出来ることを指摘した。スモルコフスキーやペランの精力的な実験を得てアインシュタインの理論の正しさが示されると共に, ケルヴィン卿やマッハ等の総攻撃を受けていたマックスウェル・ボルツマンの統計力学の正当性も実証されたことになった。

アインシュタインの描いたブラウン粒子は, その速度が各時点で独立に変化するものであったから, 正規型ガラスの白色雑音の積分としてのレヴィー・ウィナーのブラウン運動と考えてよ

い。その後、ブラウン粒子は粘性流体の中でランダムな力を受けて運動する粒子と考えるべきであるという主張から、ストークスの定理を適用して、速度 v が、

$$m\dot{v} = -6\pi PR\eta v + W(t)$$

なるランジュヴァン方程式を充すものと考えられるようになった。この速度の確率過程が、オルNSTEIN・ウーレンバックのブラウン運動と呼ばれ、このブラウン粒子の動きはその積分で与えられる。

近年、ゆっくりとした定速度で運動する粒子に対して得られたストークスの定理の適用の批判から、速度の変化する粒子に対する抗力を与えるブシネの定理を使った

$$m^* \dot{v} = -6\pi \rho R \eta v - 6\pi \rho R^2 \sqrt{\frac{\nu}{\pi}} \int_{-\infty}^t \frac{\dot{v}(\tau)}{\sqrt{t-\tau}} d\tau + W(t)$$

$$m^* = m + \frac{2}{3} \pi \rho R^3$$

に従うべきであるとの議論がなされている。この二つの描像は、前者は相関関数が指数オーダーの減少であるのに対し、後者は幅オーダーであるという決定的差異をもっている。実験的には後者であることが大林等によって検証されているが、ここでランダム力 $W(t)$ が何であるかは問題のあることで久保亮五の線形応答理論によれば、そのスペクトルは

$$\{12\pi \rho \nu a + 3\sqrt{2} \pi a^2 \rho \nu^{\frac{1}{2}} |\omega|^{\frac{1}{2}}\} / m^*$$

となる。しかし、 $W(t)$ をガウス型白色雑音とも考えられるが、そのとき $v(t)$ の相関関数の差異は実験的に調べられるほど大きくない。

電子スピン共鳴スペクトルの解析

亘 弘 (生理研)

電子スピン共鳴の測定は、他のスペクトロスコーピーとは異なり、磁場変調をおこなっている。ある静磁場にて得られるマイクロ波の信号はダイオードにて検波され、前置増幅機にて増幅される。この出力信号を磁場変調周波数にて位相検波して得られる信号を得る。静磁場を掃引する事により、1次高調波スペクトルを求められる訳である。また変調周波数の2倍のものをを用いると2次高調波スペクトルが得られる。弱いマイクロ波を使用した場合には静磁場の掃引にともなう位相はまったく変化しないが、強いマイクロ波を使用した測定（飽和移動電子スピン共鳴）の場合には位相の変化が観測される。したがってベクトル（つまり振幅と位相）を磁場の関数とするベクトルのスペクトルとして考慮する必要がある。このような観点にたって、電子スピン共鳴スペクトルの解析を行なった。

通常、電子スピン共鳴1次高調波であると1回の積分値は零で、3回目の積分値がスピン濃度を示す。しかし強いマイクロ波を使用した飽和移動電子スピン共鳴の場合には、1次及び2次高

調波スペクトル共、1回の積分によって有限の値を持つため、スピン濃度（飽和している状態での観測されるスピンの数）の見積が不可能となってくる。この様なベクトル・スペクトルをベクトルの的に積分して、ベクトル積分値（振幅および位相）を得る。この位相に 90° を加えた角度においては、積分値は零となることは容易に理解される。従ってこの角度を持つ平面にベクトル・スペクトルを投影すれば、積分値零のスペクトルが得られることになる。

この様な方法を1次高調波スペクトルでは1回、2次高調波スペクトルでは2回用いることにより、それぞれ1回および2回の積分値が零となり、次の積分値を得ることができた。マイクロ波によって飽和されているので真のスピン濃度ではないが、スピン濃度の見積を求めることが可能となった。

パーソナルコンピュータによる 連続系シミュレータ

白井支朗，宮地寿人（豊橋技科・情報工学）

【はじめに】

従来、生体システムに関する研究は、主に記述的に行われてきた。しかし、生体はあくまでも生きた存在であり、動的システムとしての構造や機能を理論的に解明することも重要であり、工学においても大変興味深いテーマとなっている。

一方、生体の優れた機能はその特異な存在に起因するものが多く、それが理論的扱いを困難にしている。それでも実験データを解析して得られる知見と対象に関する知識をもとに、深い洞察力と創造力により数理モデルを構築し、それに対しシミュレーションを繰り返し行うことにより、動的システムとしての構造やパラメータ・挙動を実システムのそれに適合していくという方法は非常に有効な手段であると考えられ、生体に限らず、非線形を含む動的システムの解析に、連続系シミュレータが有効な道具と考えられる。

こうした背景の下に、開発を行ってきたパーソナルコンピュータによる会話形連続系シミュレータ：PC-SIGMAについて述べる。

【SIGMAの歴史】

1978年、会話形連続系シミュレータ：SIGMA (Simulator with Interactive Graphics for Multi-purpose Analysis) の原形となる NUSS II が名古屋大学にて FACOM 230-48（主記憶384KB，ディスク容量200MB）上で開発された。1980年、これを基本構想として本学の MELCOM, COSMO 700 II（主記憶15MB，ディスク容量600MB）上で TYTCSS を開発し、1981年、これをミニコン版 TYTCSS として MELCOM 70/30（主記憶128KB，ディスク容量（可動部5MB，固定部5MB））へ移植、この上で各種の機能を追加、拡張し、82年にミニコン版

SIGMAとして発表し、また、1984年には、著しい普及をとげ、安価で高性能な16ビットパーソナルコンピュータへ移植しPC-SIGMAとして発表した。

【SIGMAの特徴】

SIGMAは連続系の動的な解析を行うための汎用プログラムであり、(1)非線形を含む常微分方程式で記述される数理モデルの数値演算が行え、(2)モデルに対してその機能を表示するブロック図形をグラフィックディスプレイ(GD)との対話によって接続線で結合しながら視覚的に提示していくため、(3)FORTRANなどプログラミングの知識をまったく必要とせずシミュレーションが行え、(4)系全体の構造も視覚的に把握し易い。また、(5)モデルのパラメータや構造の変更が会話的に行えるので、試行錯誤の使用に適しており、(6)結果のグラフ表示も用意であり、ファイルへの保存も可能なため他のモデルとの比較も容易に出来る。全体の構成は、(1)GD画面上にカーソルを用いてシミュレーションモデルのブロック図を記述し、システム情報を自動的に生成するDIAGRAM PHASE、(2)システム情報に基づきシミュレーション演算を行うANALYSIS PHASE、(3)演算結果をグラフにして出力するGRAPH PHASEから成っている。演算エレメントは31種類あり、最大エレメント数は120個、最大接続線数は360本である。

【動作環境】

PC-SIGMAはPC-9801/E/Fの標準ハードウェアに256KBのメモリ増設で動作する。OSにはMS-DOS Ver. 2.11、コンパイラにMS-FORTRAN Ver. 3.13を用いているので、他のMS-DOS機への移植はグラフィックルーチンの一部を変更することにより容易に行え、現在、IBM 5550上でも動作している。また、全く別の機種に対してもJIS7000レベルのFORTRANで記述されているため移植性は良く、機種に依存し、互換性がないI/Oのドライバールーチン等は最小限にとどめ、パッケージ化してあるので、比較的短時間で移植が行える。

【むすび】

PC-SIGMAの開発により、会話形という特徴を最限に生かした“Desk Top Simulator”が誕生した。高度なグラフィック機能を生かした高速のカラー表示が行え、計算速度においても十分実用に耐えうるものであり、安価なシステムで連続系のシミュレーションが手軽に行え、様々な分野に広く応用できるものと思われる。

参考文献

- 1) 白井他、名大大型計算機センターニュース
Vol. 9, No. 3, (1978).
- 2) 白井他、情報処理 Vol. 19, No. 11, (1978).
- 3) 白井他、電関学東海支部連大 (1980).
- 4) 松田他、信学技研 MBE 81—57, 75—82, (1981).
- 5) 宮地他、電関学東海支部連大 (1984).

神経束伝達速度分布関数のキャラクタリゼーション

磯貝芳徳, 伊藤俊之 (京府医大)

神経束内を伝搬する活動電位は伝搬に伴い peak 電位の減少, 波形の放散等の変形を受ける。これは神経束を構成する各神経線維上の活動電位 (SFAP, Single Fiber Action Potential) は変形を受けなくとも, 各線維の伝達速度に差があるため, その合成として観測される神経束上の活動電位 (CAP, Compound Action Potential) は変形するものとして理解されている。逆に云えば, CAP の変形は神経束内の伝達速度分布 (CVD, Con-duction Velocity Dextribution) に関する情報を含んでいることになる。一方, 種々の身体疾患 (例えば糖尿病) が CVD に影響することが知られており, 臨床医学の立場からは CVD を測定する手法の確立が期待されている。

本研究では CAP から CVD を求める非常に簡便な方法を提案し, 計算機実験から得たデータを本方法で解析した結果について報告する。本方法の骨子は複数箇所から得た CAP を基に, CVD の任意次数の moment を求める点にある。また数値計算が非常に容易であり, 応用への可能性が高いものと考えられる。

神経束上の刺激点より観測点までの距離を x , 刺激後の時刻を t とすると, CAP ($c(x, t)$) は SFAP ($s(t)$) 及び CVD ($w(v)$) を用いて, (1) の様に表わすことができる。ここで $M_n(x)$ を, (2) の様に定義し, (1) を代入して x の幅で整理すると $M_n(x)$ は, (3) で与えられる。ここで $A_i^{(n)}$ は $S(t)$ 及び $W(v)$ の i 次の moment を含む係数である。 $x \gg 1$ として x^{-1} の高次の項を侵略すると, $M_n(x)$ は, (4) のように x^{-1} の一次式として表わすことができる。 $S(t)$ 及び $W(v)$ の i 次の moment を夫々 a_i, b_i とすると $A_0^{(n)}$ は $a_0 b_n$ として与えられる。

$$C(t, x) = \int_0^\infty dv \, s\left(t - \frac{x}{v}\right) w(v) \quad (1)$$

$$M_n(x) \equiv x^n \int_{-\infty}^\infty dt \, t^{-n} c(t, x) \quad (2)$$

$$= \sum_{i=0}^\infty A_i^{(n)} x^{-i} \quad (3)$$

$$M_n(x) \simeq A_0^{(n)} + A_1^{(n)} x^{-1} \quad (4)$$

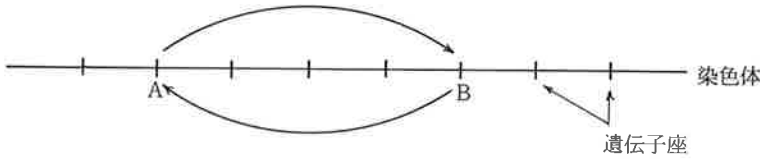
上の計算は次の事を教えている。 $x \gg 1$ なる領域で複数箇の CAP を測定し, 定義式 (2) に従って $M_n(x)$ を求め, x^{-1} を横軸にとって plot する。すると各次数の plot は直線上に乗り, 縦軸切片が $A_0^{(n)}$ (すなわち $a_0 b_n$) を与える。 $n = 0$ より順次この切片を求めてゆけば, 逐次的に $w(v)$ の任意次数の moment が定まることになる。

適当な $S(t)$ 及び $W(v)$ を設定して計算機上で, $C(x, t)$ を作成し, この $C(x, t)$ から逆に上記の方法で $W(v)$ の moments を求めたところ, 数%以内の精度で moments を再現できる事を確かめた。

ヤング図形の上の確率分布の値をとる確率過程

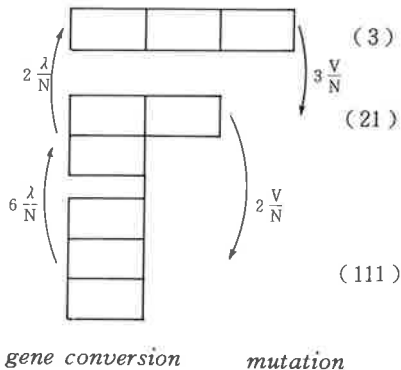
清水昭信（名古屋工大）

集団遺伝学における多重遺伝子族の進化の研究に関連する課題である。1 個の染色体上に n 個の遺伝子座があり、各遺伝子座にある遺伝子は独立に突然変異を起し、突然変異が起ると常に新しい遺伝子が生まれるとする（K : mura-Crow の無限アリルモデル）。遺伝子座間にある種の相互作用がある。A は B を自分と同じ A に変えようとし、逆に B は A を B に変化させようとする（g-



ene conversion)。更に、各世代において Population size N 個分の染色体を random sampling する (random mating)。このようなモデルは、T. Ohta によって議論されている。定常状態（時刻を $+\infty$ にした極限状態）において、染色体を一個 random にとり出し、染色体上の遺伝子座 2 ヶ所勝手に指定したとき、そこに同じ遺伝子のある確率を $\hat{C}_1$ とする。T. Ohta は、この $\hat{C}_1$ の値が $\hat{C}_1 = \frac{\lambda}{\lambda + \nu}$ であるとしている。V は突然変異の rate であり、各遺伝子は、毎世代 V/N の比率で、頻度をすりへらす。λ は gene conversion の rate であり、毎世代上図の B が A に変化する rate が λ/N である。T. Ohta は他に 2 個の量を計算しているがこの C_1 のみを議論することを目的とすれば、比較的簡単なモデルを作ることが出来る。 $n = 3$ の場合を考えよう。この場合、3 個の遺伝子座にすべて同一の遺伝子がある状態は（その遺伝子の種類を問わず）identify 出来る。同様に 2 個同一のものがあ他に 1 個異なる遺伝子のある状態、すべて異なる遺伝子のある状態の 3 種類の状態に分類できる。これを図示すると次のようになる。突然変異， gene conversion， random mating できる 3-states の markov chain を拡散近似する。

極限の diffusion の generator は



$$\begin{aligned}
 L = & (-3\nu p_{(3)} + 2\lambda p_{(21)}) \frac{\partial}{\partial p_{(3)}} \\
 & + (3\nu p_{(3)} - 2(\nu + \lambda)p_{(21)} + 6\lambda p_{(111)}) \frac{\partial}{\partial p_{(21)}} \\
 & + (2\nu p_{(21)} - 6\lambda p_{(111)}) \frac{\partial}{\partial p_{(111)}} \\
 & + \frac{1}{2} \sum_{\alpha\beta} p_{\alpha} (\delta_{\alpha\beta} - p_{\beta}) \frac{\partial^2}{\partial p_{\alpha} \partial p_{\beta}}
 \end{aligned}$$

となる。この diffusion の定常分布をしらべる。

混合ポアソン過程の超汎関数とその応用

伊藤嘉房 (名大・医療短大)

非線形システムがガウス白雑音またはポアソン白雑音を受け入れ、出力が入力の L^2 - 汎関数となる場合、出力は多重ウィナー積分の級数に展開される。このことは非線形システムの同定に応用される。出力が点過程のような超汎関数となる場合、この方法は使えないので出力の領域を拡張する必要があるが、これは最初飛田によって行なわれ、その後、飛田やその共同研究者によって、内容が豊富となり、飛田カルオユラスと呼ばれている。ポアソン白雑音についても、飛田カルキュラスが可能であることは、この研究会などで今までに報告してきた通りである。さらに両白雑音を一般化したレヴィ白雑音についても飛田カルキュラスの手掛りが得られ、興奮性と抑制性の混合入力を持ったニューロンを材料にして、結果の一部をこの会合で報告した。

その後、レヴィ白雑音のサブクラスがある混合ポアソン白雑音については、ほぼ、単純ポアソン白雑音について得られている結果に相当する結果を得たので、生理学への応用を意識しつつ概略について報告する。

$P_1(t), \dots, P_K(t)$ をお互いに独立で、各々の頻度が $m_k, k = 1, \dots, K$, であるような独立なポアソン白雑音とし、その線形結合: $P(t) = a_1 P_1(t) + \dots + a_K P_K(t)$ の汎関数を考える。 $a_1, \dots, a_K$ は正または負の常数で振幅に担当する。

$$g_n(x; \eta_1, \dots, \eta_n) = \frac{\partial^n}{\partial w_1 \dots \partial w_n} e^{\sum_{k=1}^K \langle x_k, \log(1 + a_k \sum_{j=1}^n w_j \eta_j) \rangle} - \sum_{k=1}^K a_k m_k \langle w_j \eta_j \rangle \Big|_{w_1 = \dots = w_n = 0}$$

一般化されたシャリエ多項式汎関数と呼ぶ。 n 次の一般化されたシャリエ多項式汎関数が張る空間を $\mathcal{G}_n$ と書くことにすると、直和分解

$$(L^2) = \sum_{n=0}^{\infty} \oplus \mathcal{G}_n \quad ((L^2) = L^2(S_{-1}^1 \mu))$$

が得られる。これは L^2 - 汎関数のウィナー展開に相当する。ここに μ は P を定義する測度である。 $\phi \in (L^2)$ の $\mathcal{U}$ -変換は

$$(\mathcal{U}\phi)(\xi) = C(\xi)^{-1} (T\phi)(\xi) = C(\xi)^{-1} \int_S e^{i\langle x, \xi \rangle} d\mu(x)$$

によって定義される。 $C(\xi)$ は μ の特性汎関数である。 ϕ の renormalization: ϕ は

$$:\phi(\dot{P}): = \mathcal{U}^{-1} \phi\left(\sum_{k=1}^K a_k m_k e^{a_k i \xi}\right)(\dot{P})$$

によって定義される。 $\langle P_1 \eta_j \rangle, j = 1, 2, \dots$, の 3 次の単項式は renormalize されると 3 次の

一般化されたシャリエ多項式となる。 $\langle P_i \eta_j \rangle$ の 2 次以上の単項式は各 η_j が δ -関数に近づく
と発散して取り扱うのが極めて困難となるが、renormalize されているとその極限は (L^2) を拡張
して得られる超汎関数の空間 $(L^2)^+$ は (L^2) の元が適当な位相のもとで収束した極限值からなる
空間である。 (L^2) は点過程も含む。

$P(t)$ による微分は、その成分 $P_k(t)$ による偏微分の形をとる。

$$\partial_{k,t} \varphi(\dot{P}) = U^{-1} \frac{\delta}{\delta a_k m_k e^{a_k i \xi(t)}} U \varphi(\dot{P}) = \frac{1}{a_k} \{ \varphi(\dot{P} + a_k \delta_t) - \varphi(\dot{P}) \}$$

その共役作用素 $\partial_{k,t}^*$ を使うと積作用素は次のように表わされる。

$$\dot{P}(t) = \sum_{k=1}^K a_k m_k (a_k \partial_{k,t}^* + 1) (a_k \partial_{k,t} + 1)$$

先に述べた混合入力を持つニューロンが最も典型的な例と云えるが、生体系には混合ポアソン
過程によって近似される入力は随所にみられる。ここに述べた超汎関数の理論の生理学への応用
が期待される。

自己組織神経場における微細構造の形成について

甘利俊一（東京大・工学部）

丸山 稔（三菱電機・中研）

自己組織能力を有する神経場のモデルを作り、このモデルに外部から信号を繰り返し与える
と、各信号を表現する細胞が神経場の中に形成されることが知られている。特に、信号がもう一
つの神経場の位置情報を表わすような場合には、これにより二つの場の間のトポロジーを保った
結合が形成できる。また一般に外界において近い関係にある二つの信号は、神経場においても近
い場所に表現細胞ができることが知られている。こうした、外界の信号空間を神経場の中に表現
するメカニズム、とくに外界の信号空間のトポロジー構造が 2 次元の神経場の中にどう表現され
るか、こういった信号表現の問題が注目されている。神経場の対応のモデルを用いて、竹内と甘
利はある場合に二つの神経場の対応が離散ブロックに分かれた微細構造を持つようになることを
指摘した。これは現実の神経場におけるコラム構造を示唆するものとして興味あるばかりでな
く、多次元の外界の信号空間を 2 次元の神経場の中に表現する際の一つの手段を与える点でも興
味がある。また、神経情報のアドレス機構を論ずる際の一つの手懸りともなりうる。

本研究では、簡単なモデルを用いて信号表現細胞の配置の問題とくに、離散微細構造の形成の
問題を論ずる。神経場 F は 1 次元一様構造側抑制形とし、外部信号空間 $X = \{x\}$ からの信号を受
容して自己組織を進めるものとする。外部信号空間は実質的には 1 次元であって、 θ をパラメー
タとして $x(\theta) = (\cos \theta, \sin \theta, -x_0)$ という形で 3 次元空間の一部をなしている (x_0 は定

数)。神経場の座標を ξ に表現細胞を持つかで、 $\theta \rightarrow$ その表現が定まる。神経場の興奮力学の方程式と、シナプス結合の自己組織の方程式を連立させれば、容易にわかるように、 $\xi = c \theta$ という一様な連続状態で信号空間 X を場 F の中に表現する解が得られる。この平衡解のまわりで変分方程式をたてると、変分方程式が安定もしくは不安定になるための条件が求まる。不安定な場合には、 X と F とを共に離散の微小ブロックに刻み、ブロックどうしの対応をつける解が得られることが予想される。とくに、場 F において、異った分解能を持つ神経細胞が層になって並んでいれば、離散構造の中にさらに連続的な構造を埋め込んだ解が得られるであろう。

本研究では、理論的解析とともに、計算機シミュレーションによって、こうした信号表現細胞形成の様子を具体的に示すことを目標にしている。

- 1) A. Takeuchi & S. Amari (1979) Biol. Cybernetics, 35 : 63-72.
- 2) S. Amari (1980) Bull. Math. Biol., 42 : 339-364.

テキスチャ様刺激と網膜水平細胞の空間加算効果

安井 湘三 (基生研)

大塚 輝彌 (生理研)

はじめに

視覚研究における基本データの一つに光強度—応答曲線がある。図1の●印はカメ網膜のL型水平細胞から細胞内記録で得た例である。網膜全体を一樣に照射するフラッシュ光の相対強度 I をNDフィルタで変えて、その応答の最大値を測っている。水平細胞は視覚系二次ニューロンで、このように I と共に sigmoidal 状に増加する緩電位性の過分極応答を示す。この他の関係する周知の事実として、水平細胞は低電気抵抗のギャップ結合でつながれて網膜内に一つの層を作り、このため広い受容野をもつ。つまり、大きく離れた網膜上の一部を小光点で刺激しても、信号は仲間の水平細胞を次々と介してやって来て応答がとれる。また光点を記録部位の真上に合わせれば、応答は刺激の直径と共に増大する。これを水平細胞の面積効果という。以上から、一つの水平細胞の挙動は多数の視細胞応答を反映すると考えられ、水平細胞の空間加算効果と呼ばれる。こうして、まわりの平均的な光の量を知って、個々の注視物のコントラストを高めるというのが一つの解釈である。

ここで工夫した実験で分かったことは、水平細胞の空間加算効果は光パターンの微視的構成内容によっても左右されるということである。すなわち、光強度がテキスチャ状に凹凸に分布すると、それを平らにならしたときに比べて水平細胞の応答は小さくなる。

この報告では、この現象の説明に重点を置く。

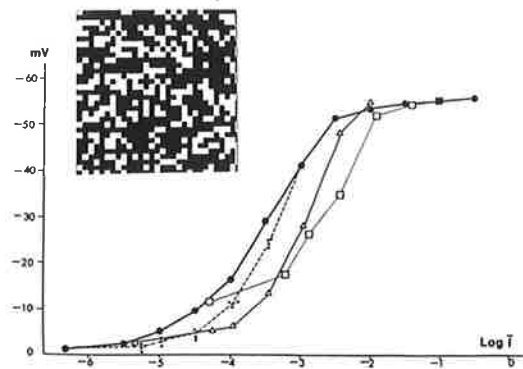


図 1

実験と結果

ND フィルタで光強度を変えるのではなく、一様にばらまかれた小光点の密度を変えることによって水平細胞の受容野全体にあたる光の量を調節した。フラッシュ光は 100×100 個の画素からなるスライドを通して与えられ、 $50 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ の各画素は確率 P で「ドット」となり、そうでない場合より $3.3 \log \text{unit}$ 光透過率が高くなる。図 1 に、このようなパターンの例を添えて実験結果を示す。一様光の場合 (●印) と同様に、400ms の白色光フラッシュを用い、惹起された最大応答値をプロットした。例えば、□印は相対背景光強度 I を ND フィルターで $-1 \log \text{unit}$ に固定し、 P を 1 から順次下げた結果である。△印も同様だが、 $\log I = -2$ に保持した。 $\bar{I}$ を単位面積 (又は一視細胞) 当りへの平均相対光強度とすれば、 $\log \bar{I} = \log I + \log P$ である。通常の一様強度変調 ($P = 1$, I 可変) に比べて、ドット密度変調 (I 一定, P 可変) は平均光度 $\bar{I}$ を等しくとっても応答を著しく減少させることがわかる。 $I = -3 \log \text{unit}$ の場合には、それぞれの P の値について 4 枚の独立なランダムドット・スライドをテストしたが、図 1 に示すように結果に大差なく、等電位性が空間加算によっておおむね成立していることが伺える。

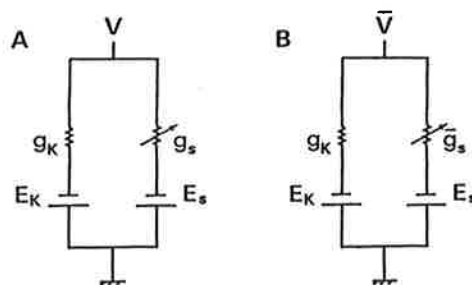


図 2

考察

なぜ密度変調にすると応答が小さくなるのか。まず、コントロールである強度変調の場合をしばらく考える。光は一様であるから水平細胞層の電位はどこも等しく、樹状突起のシナプス部に

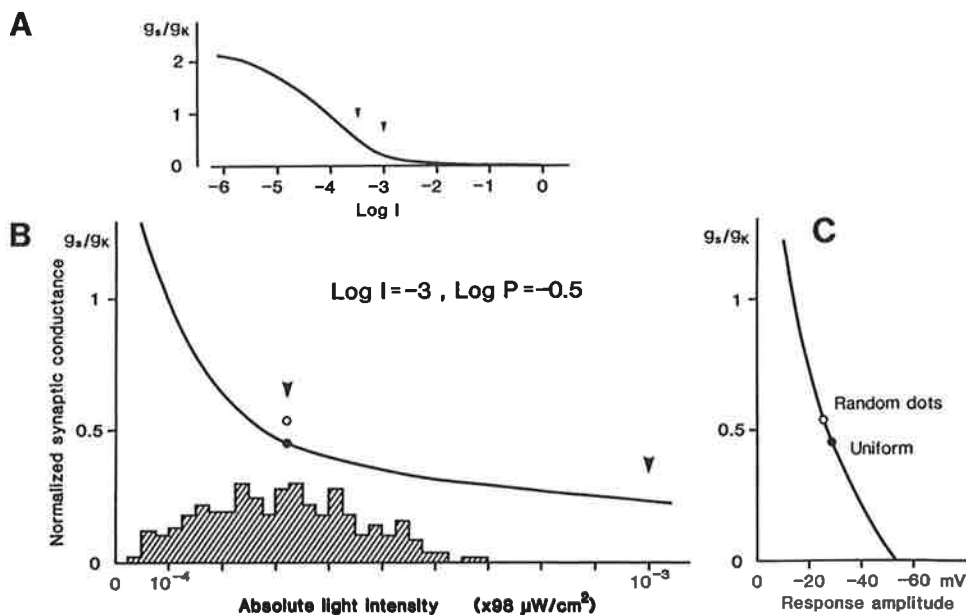


図 3

発現する光で変調される電流はギャップ結合を通して層方向に拡散することはない。すなわち、回路は一つの水平細胞内で閉じ (図 2 A), 膜電位として $V = [E_K + (g_s/g_K)E_s] / (1 + g_s/g_K)$ を得る。E と g はそれぞれ膜の平衡電位とコンダクタンスを表わし、添字の s と K はそれぞれシナプス部と非シナプス部を指す。生理的条件下では、 E_K と g_K には主として K イオンが関与することをふまえて、 $E_K = -80\text{mV}$ に、また g_K は V に依存しないと近似する。さて前出の式を変形すると $g_s/g_K = (E_K - V) / (V - E_s)$ となる。もし E_s が分かれば、 g_s/g_K は光強度 I の関数として知ることが出来る。これは図 1 の ● 点から I に対応して V を読みそして上式を使って可能となる。 $E_s = 0\text{mV}$ とすれば、上の結果は図 3 A のようになる。 $E_s = 0\text{mV}$ とした根拠は、視細胞から水平細胞への神経伝達物質として有力候補であるグルタミン酸が 0 mV 付近に反転電位をもつことが生理研の立花らの研究で示されるからである。

以上のような関係が強度変調の場合にはどの細胞でも大体同じようにあてはめられようが、本題の密度変調での g_s は個々のドットとの微視的位置関係に依存して大きくばらつくであろう。しかし図 1 で見たように V に関しては等電位とみなせる。だが一応、V の平均値として $\bar{V}$ を使うと、附録に導いたように、

$$\bar{V} = \frac{E_K + \bar{g}_s / g_K E_s}{1 + \bar{g}_s / g_K} \quad (1)$$

を得る。これを等価的に図 2 B に示す。 $\bar{g}_s$ はランダムに分布する g_s の平均である。従って、 $\bar{V}$ を予測するには $\bar{g}_s/g_K$ を、そしてこの $\bar{g}_s/g_K$ を求めるには光強度の分布を知ればよい。 $\bar{g}_s/g_K$ は図 3 A の g_s/g_K と光強度の関係に分布の重みづけをして計算可能となる。(図 3 A の関係は光が一樣な強度変調の場合から得たものであるから、水平細胞層に直角方向の「純粋な」視細胞→水

平細胞の信号伝達を反映するもので場所毎にローカルに適用可能である。) さて光の分布であるが、スライド上では正方形の一つのドットは、光刺激装置や網膜内部での光の散乱のために、視細胞の段階で「なまる」。それぞれの decay 定数を測光や文献情報より $20\mu\text{m}$ と $25\mu\text{m}$ とし、各密度 (P) 値について計算機シミュレーションを行った。これによると例えば $\log I = -3$ のときの $\log P = -0.5$ のスライドは図 3 B の斜線で示したような光強度分布を視細胞レベルに与える。この場合の平均相対強度 $\bar{I}$ は 10^{-35} であり、もし g_s/g_K が光強度に対して線型に変われば、 g_s/g_K は強度変調で I を 10^{-35} としたときの値 (●印) と等しく、そして応答の大きさにも差異はないはずである。しかし実際には、問題の関係が凹状に非線型のため、 g_s/g_K の大きい値がより強調される。この結果、密度変調の g_s/g_K が○印で示したように若干大きくなり、従って応答も増す (1 式または図 3 C)。他の場合でも説明は定性的には同様である。定量的な面も図 4 に示すように悪くないと思う。

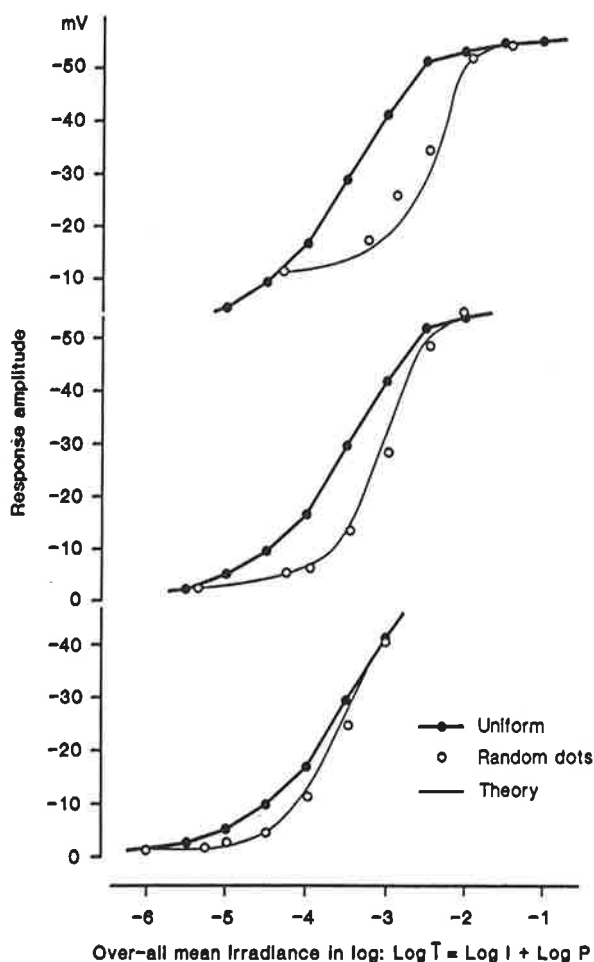


図 4

結び

網膜の機能上で重要とされる水平細胞の空間加算効果には本実験で明らかにされた側面がある：広い水平細胞の受容野から見れば微細は次元においても、光パターンがどう構成されているのかが空間加算の結果を左右する因子となり得る。ここで試みた説明の理論的骨子は「非線型変換後の平均はその前の平均に等しくない」ということに集約されよう。そしてこの非線型信号変換とは、光から水平細胞シナプス後膜への課程を指す。もとより、この間には視細胞応答や伝達物質の放出およびその受容のステップがあり、どれも非線型性に富むものかも知れない。これらを別々に取り上げて検討することはここでは出来ない。しかし、本説明で用いた図3A（またはB）によれば水平細胞シナプス膜のコンダクタンスは、非シナプス膜のそれに比して、暗闇では約2倍大きいのが量と共に非線型的に急速に減少し $0.01 \mu \text{w}/\text{cm}^2$ 付近の一樣白色光（10～20mVの応答に相当）でこの大小関係は逆転する。

（付録）

1式（または図1Bの等価回路）を正当化することが目的である。図1Aの回路をギャップ結合で二次元的に連結した格子をまず想定する。任意の光分布を考えて、シナプス膜コンダクタンス g_s は座標 x, y の関数となり、従って膜電位 V についても同様となる。この水平細胞層の離散モデルにオームとキルヒホッフの両法則を適用すれば差分方程式を得るが、極限をとって連続系に変換すれば次の偏微分方程式に問題なく到達する。

$$\nabla^2 V - V/\lambda^2 = h \quad (2)$$

ここで、 ∇^2 はラプラシアンで、また

$$\lambda^2(x, y) \equiv gG/[gK + g_s(x, y)] \quad (3)$$

$$h(x, y) \equiv -[gKEK + g_s(x, y)E_s]/gG \quad (4)$$

上で gG はギャップ結合のコンダクタンスを表わし近似的に一定として扱う。それでもなお2式を解析的に解くことは出来ない。係数に変数である $\lambda^2(x, y)$ が絡むからだ。ここで次のように定義される λ^2 の平均値 $\bar{\lambda}^2$ を導入する。

$$\bar{\lambda}^2 \equiv gG/(gK + g_s) \quad (5)$$

そして2式の λ^2 をこの $\bar{\lambda}^2$ で置き換える近似を施す。本実験で用いたランダム・ドット図形のように、光パターンが巨視的には一樣であるが微視的にはそうでない場合には、上の近似は許されるであろう。従って2式より

$$\nabla^2 V - V/\bar{\lambda}^2 = h$$

を得る。この解は

$$V(x, y) = \iint w(\xi, \eta) h(x - \xi, y - \eta) d\xi d\eta \quad (6)$$

である。積分は刺激を受ける全域にわたる

$w(x, y)$ は次式を満足する。

$$\nabla^2 w - w/\bar{\lambda}^2 = \delta(x, y) \quad (7)$$

$\delta(\cdot, \cdot)$ は二次元ディラック関数である。さて4式を使うと、6式は

$$V(x, y) = -\frac{E_s}{gG} \iint w(\xi, \eta) g_s(x - \xi, y - \eta) d\xi d\eta + C \quad (8)$$

となり、ここでCは定数で

$$C = -\frac{g_k E_k}{g_G} \iint w(x, y) dx dy$$

と与えられる。ここで7式を用いると上の面積積分は

$$\begin{aligned} \iint w(x, y) dx dy &= \bar{\lambda}^2 \iint [-\partial(x, y) + \nabla^2 w] dw dy = \\ &= -\bar{\lambda}^2 + \bar{\lambda}^2 \iint \nabla^2 w dx dy \end{aligned} \quad (9)$$

と書ける。しかしグリーンンの定理より

$$\iint \nabla^2 w(x, y) dx dy = \oint \frac{\partial w}{\partial n} ds \approx 0 \quad (10)$$

が成立する。wは原点から指数関数的に減少するので刺激域の境界線の法線方向の勾配 $\partial w / \partial n$ も微小となり、右辺の周回積分は0と見積ってよい。こうして $C = \bar{\lambda}^2 g_k E_k / g_G = g_k E_k / (g_k + g_s)$ を得、8式に代入して平均をとると

$$\bar{V} = -\frac{g_k}{g_k + g_s} E_k - \frac{g_s}{g_G} E_s \iint w(\xi, \eta) d\xi d\eta$$

ところが、9と10式より上の面積積分は $-\bar{\lambda}^2$ に等しい。一方、5式の関係があるので、 $\bar{V}$ は直ちに本文中の1式（または等価的に図1B）で表わすことが出来る。

頻回閃光刺激による視覚誘発電位の非線形性応答

渡辺 悟（名古屋大・環），共垣正光（愛知県コロニー）

四方義啓（名古屋大・理）

大脳皮質の電気現象のうち、リズム形成にあずかる成分の解析は従来、 α 波、睡眠紡錘波、誘発電位の後電位など、また病的なてんかん脳波について主として行われて来た。吾々は脳皮質において秩序だった律動的な電気現象が発生する機構を仮定して、その性質を調べる1手段として、外部からの刺激を強制的に加えることを試みた。この報告では脳への入力系を比較的単純化する目的で、上位離断脳標本を作成し、醒眠時脳活動を検討することとした。

実験方法：実験動物には猫を用い、上位離断脳標本（睡眠脳波を示す *cerveau isole* 標本）にて頻回閃光刺激を加えて視覚誘発電位を大脳皮質視覚野表面より記録した。閃光刺激は1 Hz から30 Hz まで（刺激時間は1 Hz については70秒間、2 Hz は40秒間、以後3 Hz から30 Hz までは30秒間とし、それぞれの刺激の間には10秒間の休止期を入れる）を段階状に上げ、更に30 Hz から1 Hz まで段階状に下げた。刺激強度の変化はニュートラル・フィルターを用いて10° (F0), 10⁻¹ (F1), 10⁻² (F2), 10⁻³ (F3), 10⁻⁴ (F4), 10⁻⁵ (F5) までを変化させた。視覚野の誘発電位は64回の加算平均波形を用いた。

結果と考慮：1. 刺激周波数に対する振幅の変化

刺激強度F0による場合をみると、P₁-N₁は成分は5 Hz を頂点に振幅に増大がみられ、この傾

向は刺激強度を減じても観察出来る。一方、この頂点の近傍では、刺激の増加過程と減少過程は同じ道筋をたどらないで、反時計方向の履歴環を画く。これらの現象は、引き込み現象と履歴環から、一種の非線形共振現象としてとらえることができる。刺激強度を減少して行くと、F 3, F 4 では高い周波数帯で、すなわち13—14Hzに再び P_1N_1 振幅の変化に1つの山があらわれる。基本調波と二次高調波成分について調べると、いずれもF 2, F 3, F 4において低い周波数帯(5—6Hz)と高い周波数帯(17—18Hz)に頂点をもつ2つの山があらわれる。しかも高い周波数帯の山は刺激強度がF 3の場合に一番大きく現われ、刺激強度に依存する形の共振系も存在することが考えられる。

2. 刺激周波数に対する潜時の変化

比較的強い光刺激であるF 0, F 1では、 P_1, N_1 の潜時は刺激頻度の増加および減少に際して殆んど変化しない。しかし、強さが更に感じられる(F₃, F₄), N_1 の潜時は17—18Hzの間で急激なjump現象を示して短縮する。これは振幅の変化の場合とよく一致し、この周波数帯で、状態の変化が起ることが推察される。従って、1つは低い周波数帯での安定と、更には高い周波数帯での安定と2つの安定状態が観測されたと考えてよい。以上、周期的な外乱(1—30Hz)を加えて脳活動を共振現象としてとらえるとき、少くとも2つの共振点をもつことが推察出来た。

眼底写真の画像解析の試み

橋本正史, 磯本昭夫, 福田全克(阪大・医)

はじめに

一般的にパターン認識は、(1)パターンの観測、(2)パターンの特徴の抽出、(3)パターンの識別、といった過程から成る。今回、眼底写真の画像解析を行うにあたり、主として眼底の認識・病変の色調のパターン化を試みた。この際、(1)については、眼底写真を三管式カラービデオカメラを用いて写し、その赤(R)、緑(G)、青(B)、の各成分の輝度を256階調のデジタル情報に変換した。(2)については、専門家(眼科医)にある部位がどの認識対象(組織・病変)に属するかを判断してもらい、(3)については、以下に述べるアルゴリズムを用いてパターンの識別を行った。

パターン識別アルゴリズム

画像解析の際、与えられる情報は、 $x=(x_1, \dots, x_k)$ といった形の k 次元空間(パターン空間)の点で表現されるが、 $x_1, \dots, x_k$ をパターンの特性値と呼ぶ。この特性値がパターン識別のため役に立つためには、「類似したパターンはパターン空間で近いところにくる」という前提を必要とするが、この条件に適合する眼底写真の色調のパターンの特性値は各輝度の比 $G/R(x_1)$ と $B/G(x_2)$ であることが判明した。この2つの特性値について、各認識対象(組織・病変)ごとに平均、分散(V_{11}, V_{22}), 共分散(V_{12}), 相関(γ)を求めた。

これを用いて、(1)特性値の間に何らかの相関があるとその相関をもたらす共通要素について重複して解析することになるから、主成分分析を行ない、(2)、(1)の際、その分析がそこで用いた測定単位に支配されないため、平均0、分散1になるように基準化された特性値 u_1, u_2 を導入した ($u_1 = (x_1 - \bar{x}_1) / \sqrt{V_{11}}, u_2 = (x_2 - \bar{x}_2) / \sqrt{V_{22}}$)。

識別関数として、ある点 (x_1, x_2) 又は (u_1, u_2) の分散を考慮をいれた認識対象 ($W_1, \dots, W_n$) の重心までの距離 (マハラノビスの距離) ($d_1, \dots, d_n$) を求めた。

$$\left(\alpha_i^2 = \frac{u_1^2 + u_2^2 - 2ru_1u_2}{1-r^2} \right) \text{ ここで } \min(d_i) \text{ のとき } x(x_1, x_2) \in W_i \text{ とした。}$$

まとめ

マハラノビスの距離をパターン識別に応用したが、この識別は定性的で、さらに定量的な識別も検討を進めている。又、特性値を加え、識別の精度を上げることも検討している。

『筋収縮の基本的機構』

昭和60年3月9日～3月10日

1. 筋小胞体の機能

General Introduction

骨格筋細胞内 Ca 濃度と収縮

筋小胞体における生理的 Ca 遊離と他イオンの動き

筋小胞体の Ca とりこみ機構と筋弛緩

2. 分子機構 I 溶液内反応から Intact な系へ

General Introduction

アクトミオシン ATPase と張力発生

細胞運動モデルシステムの開発と
分子運動の直接的観察

ミオシン頭部とアクチンの結合

グリセリン筋の収縮にたいする pPDM の
効果からみたミオシンの二つの頭部の機能

3. エナージェティクス

General Introduction

隣 NMR 法：化学分析法との比較

維持熱産生の筋節長依存性

カエル骨格筋収縮におけるエネルギー
収支の短縮速度依存性

筋タンパクのカロリメトリー

4. 高速 X 線回折法

General Introduction

収縮中のカエル骨格筋アクチンフィラメント
の構造変化

伸張による骨格筋収縮張力増強の分子的機構

5. 分子機構 II 構造の面から

General Introduction

急速凍結法による分析

Ca 制御と構造

6. Concluding Remarks

座長 大槻 磐男

遠藤 実 (東大・医)

栗原 敏 (慈恵医大・医)

北沢 俊雄 (順天堂大・医)

小川 靖男 (順天堂大・医)

座長 児玉 孝雄

太和田勝久 (九大・理)

荒田 敏昭 (阪大・理)

柳田 敏雄 (阪大・理)

盛田 フミ (北大・理)

杉 晴夫 (帝京大・医)

座長 小川 靖男

山田 和広 (大分医大・医)

田之倉 優 (大分医大・医)

米谷快男兄 (大分医大・医)

山田武範 (帝京大・医)

児玉 孝雄 (岡山大・歯)

座長 遠藤 実

松原 一郎 (東北大・医)

若林 克三 (阪大・理)

杉 晴夫 (帝京大・医)

座長 杉 晴夫

若林健之 (東大・理)

月田承一郎 (東大・医)

大槻 磐男 (九大・医)

座長 丸山 工作

江橋 節郎 (生理研)

筋収縮は、生体運動及びエネルギー変換の二つの面から、生理活性を代表する機能であり、さまざまな方法を駆使した研究が行われてきた。筋収縮の研究は、生理学研究を代表するものとして、重要な役割を果たしてきたといえることができる。筋研究が進み、その成果が他の多くの分野へと広がって行った現在（非筋組織の運動および細胞機能のカルシウムによる制御など）、本来の筋収縮にたいする興味が失われつつあるように思われる。しかし、筋収縮の機構は解明し尽くされたのでは無く、収縮の基本的機構は、依然として謎に包まれている。

以上のような理由から、生理学の分野のみならず他の多くの研究分野からの参加を要請し、収縮の基本的機構に関するディスカッションを主とする研究会が計画された。以下のプログラムにおける各セッションについて、約半分の時間をディスカッションのために用いた。プログラムに記されている参加者の他、下記の研究者の参加を得た。

（慈恵医科大学）馬詰良樹、（東海大学）吉岡利忠、（順天堂大学）山本啓一、（東京大学）飯野正光、田仲広明、（名古屋市立大学）堀田健、大羽利治、越田信、保住哲、（大阪大学）井上明男、（川崎医科大学）松村幹郎、越智和典、（大分医科大学）北野敬明

—— プログラム（別紙） ——

筋小胞体のセッションでは、遠藤教授による現状分析、エクオリンシグナルの性質、カルシウムと置換されるべき陽イオンの同定、カルシウムとりこみ速度と弛緩の速度との対応が議論された。溶液内ATPase反応のキネティクスと構造を保った系における分子機構との関連についてのセッションでは、アクトミオシンATPaseの性質、力の発生機構が主としてアクチンフィラメント側に存在する可能性、ミオシン頭部におけるアクチン結合部位の詳細が議論された。エネルギージェティクスのセッションでは、エネルギー収支不足の発生と、高速³¹P NMR測定結果との関連が議論された。

高速X線回折法のセッションでは、松原助教授による現状分析の他、高エネルギー研究所における強力な線源を用いて得られた結果がのべられた。高速X線回折法は優れた生理学的方法として用いられ、収縮中のミオシン分子の配向、収縮に先行するアクチンフィラメントの構造変化が議論された。微細構造のセッションでは、若林助教授による、三次元像にもとづく微細構造の面からの現状分析、急速凍結法による収縮の任意の時点における微細構造の静止像、カルシウム制御における微細構造変化が議論された。

本研究会の主題は、出席者各自に共通したものであったため、全会期に亘ってなされた白熱した議論は、本研究会計画中における予想をはるかに凌ぐものであり、この分野における研究意欲の力強い底流を示すものであった。

The 10th Seiriken Conference
on
ADVANCES IN NERVE, SYNAPSE, AND MUSCLE PHYSIOLOGY

March 7 - 9, 1985

National Institute for Physiological Sciences
Okazaki, 444 Japan

(March 7, Thursday)

Chairman: Yamagishi, S.

Director Uchizono: Welcome address.

Hagiwara, S. (UCLA)

Ca channels in lymphocytes.

Miyazaki, S. (Jichi Med. Col.)

Ca-related hyperpolarizing excitation at fertilization of golden hamster eggs.

Takahashi, K. (Univ. Tokyo)

Development and differentiation of excitable membranes in the embryo of a mosaic egg.

Chairman: Terakawa, S.

Akaike, N. (Kyushu Univ.)

Neural regulation of the active sodium-potassium transport in hypokalemic rat skeletal muscle.

Ozawa, S. (Gunma Univ.)

Glutamate-activated channels in cultured hippocampal neurones of the rat.

Tachibana, M. & Kaneko, A. (SEIRIKEN)

Sensitivity to γ -aminobutyric acid in solitary photo-receptors dissociated from turtle retina.

Furukawa, T. (Tokyo Med. Dent. Univ.)

On transmitter release at hair cell-afferent fiber synapse.

(March 8, Friday)

Chairman: Watanabe, A.

Tasaki, I. (NIH)

Mechanical and thermal responses of neurons and sensory cells.

Kanno, T. (Hokkaido Univ.)

Cytochrome reduction coincides with electrical activity induced by afferent electrical stimulation or by brain-gut peptides in perfused bullfrog brain.

Haga, K. and Haga, T. (Hamamatsu Univ. Sch. Med.)

Purification and characterization of the muscarinic acetylcholine receptor.

Sugiyama, H., Hirono, C. & Yamagishi, S. (SEIRIKEN)

Induction of ionic channels in *Xenopus* oocytes by exogenous mRNA.

Kuno, M. (SEIRIKEN & Kyoto Univ.)

Electrophysiological characterization of ACh receptor expressed in oocytes from cloned cDNAs.

Angelides, K. J. (Univ. Florida)

Molecular and cellular dynamics of the voltage-dependent Na⁺ channel.

Chairman: Uchizono, K.

Katz, B. (Univ. Col. London)

Looking back at the neuromuscular junction.

Obata, K., Fujita, S. C., Shirao, T., Inoue, H., Nishie, H. & Uchizono, K. (Gunma Univ. and SEIRIKEN)

Monoclonal antibodies against synaptic vesicles.

Otsuka, M. (Tokyo Med. Dent. Univ.)

Substance P as a transmitter for slow excitatory postsynaptic potential.

Chairman: Kaneko, A.

Takeuchi, A., Onodera, K. & Kawagoe, R. (Juntendo Univ.)

Amino acid transmitter.

Kawai, N. (Tokyo Metropol. Inst. for Neurosci.)

Block of glutamate synapses by a spider toxin (JSTX).

Obara, S. (Teikyo Univ.)

Amino acid-induced responses in the afferent synapses of *Plotosus* electroreceptors.

Tsou, K. (Shanghai Inst. Materia Medica)

Electrical stimulation and dopamine induced protein phosphorylation in neurohypophysis.

Edwards, C. (NIH)

The possible role of the vesicular acetylcholine transport system in non-quantal release at the neuromuscular junction.

(March 9, Saturday)

Chairman: Ebashi, S.

Feng, T. P. (Shanghai Inst. Physiol.)

The neural determination of skeletal muscle fiber type.

Noma, A., Tsuboi, N. & Irisawa, H. (SEIRIKEN)

Electrical resistance of cardiac gap junctions regulated by Ca_i and pH_i .

Ito, F. & Fujitsuka, N. (Nagoya Univ.)

Sensory terminal responses in decapsulated muscle spindle of the frog.

Endo, M. (Univ. Tokyo)

Significance of the Ca -induced Ca release mechanism.

Matsubara, I. (Tohoku Univ.)

Movements of cross-bridges in active frog skeletal muscle.

Sugi, H. (Teikyo Univ.)

Current problems of the cross-bridge hypothesis.

Ebashi, S. : Concluding remarks.

〔セミナー報告〕

Biophysics of ribonucleotide reductase: A radical enzyme

昭和59年 4 月 5 日

EHRENBERG, Anders (ストックホルム大)

Picosecond spectroscopy of nucleic acids

昭和59年 4 月 5 日

RIGLER, Rudolf (ストックホルム大)

Choroid の通液路一特に細胞間通路の観点から

昭和59年 4 月 6 日

KELLY, Douglas E. (Univ. of Southern California)

How the brain gives us the voluntary movement

昭和59年 4 月 6 日

ECCLES, John (ニューヨーク州立大 名誉教授)

記憶障害について

昭和59年 4 月 19 日

白木博次 (神経病理学研究所長)

NMR と生理学

昭和59年 4 月 19 日

田崎京二 (東北大学・教授)

Coding of pain from normal and inflamed knee joints

昭和59年 4 月 19 日

SCHMIDT, R. F. (Wurzburg 大・教授)

Optical recording of neuron activity in the central nervous system

昭和59年 5月15日

COHEN, L. (Yale 大)

膜電位に感受性を持つ蛍光色素を用い、神経節または中枢神経を染色して、多くの神経細胞の活動の同時記録を行った。10—20分の染色を行うと、活動電位の発生により、背景光の千分の一程度のシグナルをうることができた。15mm平方の中に、100個程の光検出器を配列して、神経節の中の個々の細胞の活動状態をしらべた。しかし、検出器の配列は規則的であり、神経細胞の配列は不規則であるため、2つの光検出器に同時に発火が記録された時には、シグナルが二重に記録されたのか、2つの細胞が同時に発火したかの区別が必要であった。ヒル、フジツボ、アメフラシなどの神経節について実験を行い、ことにアメフラシの口球神経節では、周期性興奮を多くの神経細胞から同時描記でき、性質の異なる細胞を区別できた。ラットの体性知覚領野における実験では、ヒゲの運動を刺激として光学的シグナルを観察した。シグナルは約1.3mmの範囲から観測されたが、実際に発火した範囲を知るためには、光検出器の大きさ、光散乱の程度などを考慮する必要がある。

Incorporation of voltage-dependent calcium channels from Paramecium into planar lipid bilayers

昭和59年 5月15日

COHEN, Barbara E. (Albert Einstein College of Medicine)

ゾウリムシの線毛の膜から Ca チャネルを取り出し、これを平面脂質二層膜に入れてその電気生理学的な性質を調べた。目的は、膜の機能の分子的な基礎を知ることにある。蛋白質分子はとり出すことができるが、その機能は、膜の中ではじめて発揮される。チャネルは多くのイオンを一時に通過させるので、電気生理学的にしらべやすい。方法については詳細は省略するが、ゾウリムシの Ca チャネルの性質は生理学的にも生化学的にもよく知られているという利点がある。たとえば Ca チャネルは線毛に局在し、線毛を除くと Ca チャネルの活動はなくなる。外液の Ca, Sr, Ba により内向き電流を生ずるが Ba では不活性化が起らない。Pon という変異は Ca 電流がなく、行動的には反転のないことが知られ、また蛋白の注射で治療できる。蛋白の独出法は人に聞くのが一番よい。脂質膜は小胞を用いると膜電位が制御できず小胞内の濃度がすぐ平衡に達するなど不都合な点が多い。平面膜を60 μ の穴に張り、Ca チャネルは、純粹にすることなく、小胞の状態、脂質の片側の溶液に加えた。電圧固定を行い、はじめ EDTA を流しておき、Ca または Mg の溶液に片側を交換した。三分の一の例では結果は出なかったが、出た例では二種のチャネ

ルを区別できた。一つは、Mg と Ca ととほとんど同じ程度に通過させ、他の一つは Mg に比し Ca を選択的に通過させた。前者を Large divalent channel、後者を Small divalent channel と呼ぶ。どちらのチャネルも、K や Cl に対する透過性は低かったが、Large channel のほうは二価陽イオンに対する選択性が低く、Small channel の方は Mg の透過性は Ca, Ba に比し非常に低かった。膜電位依存性は、Large channel にもわずかに存在したが、Small channel では非常にはっきりと認められた。Large channel はあるいは機械受容器であるかもしれない。これらの電流は、単一チャネル電流として記録された。

細胞骨格の三次元構成

昭和59年 7 月20日

広川信隆（東京大・医）

Two independent respiratory rhythms after splitting the brainstem by midline section

昭和59年 7 月23日

JANCZEWSKI, Victor （ポーランド科学アカデミー）

心と量子状態

昭和59年 8 月 8 日

大木幸介（江南女子短大）

Functional and morphological development of nicotinic acetylcholine receptors

昭和59年 8 月24日

NAKAJIMA, Shigehiro (Purdue Univ.)

Noradrenergic Neurons of the locus coeruleus and cholinergic neurons of the basal forebrain in dissociated cell culture

昭和59年 8 月24日

NAKAJIMA, Yasuko (Purdue Univ.)

Synaptic Receptors in the CNS; Localization and Regulation

昭和59年 8 月24日

ROBERTIS, Eduard De (Univ. of Buenos Aires)

On components and interpretation of the modulation transfer function of the human eye

昭和59年 8 月29日

劉 育民 (上海生理研究所)

Cellular fine structure in three dimensions

昭和59年 8 月31日

PORTER, Keith R. (Univ. of Colorado)

Fine Structural Correlates of Synaptic Transmission

昭和59年 9 月 4 日

PAPPAS, G. D. (Univ. of Illinois)

Isolation and Sequencing of a Full Length cDNA Clone to Myosin LC₂ with the Expression Vector λ_{gt11}

昭和59年 9 月 6 日

FISCHMAN, D. A. (Cornell Univ.)

Studies of peptide neurosecretion utilizing a crab model

昭和59年 9 月12日

COOKE, Ian (Univ. of Hawaii)

Ian M. Cooke 博士 (Békésy Laboratory of Neurobiology, University of Hawaii) は Ninth International Symposium on Neurosecretion に参加のため来日され, 生理学研究所を訪問して “Studies of peptide neurosecretion utilizing a crab model” について講演された。講演を要約すると以下のようなものである。

甲殻類のペプチド性神経分泌器官, X-organ sinus gland system (XOSG) は, 空気生理学的, 生化学的, あるいは組織学的方法が時に同時に適用可能な実験材料で脊椎動物の単純なモデルとしての有用性を持っている。すなわち, sinus gland は分泌終末の均一な系として, 電顕的には分泌顆粒の 5, 6 種の型が区別され, 電気生理学的にも微小電極を用いて記録が可能であり, Na, Ca 両イオンに依存性の活動電位が観察されている。また X-organ は細胞体が存し, 電気生理学的な実験に加えて, 生化学的にペプチドの生合成が行われていることが確かめられている。現在, カニの XOSG を用いて, 2, 3 種のペプチドホルモンが細胞体で prohormone という形で合成され, 分泌終末へ輸送され, そこで, ペプチドホルモンとして Ca 依存性に分泌されていることが観察されている。

単一チャネルの薬理学

昭和59年11月 9 日

梶橋敏夫 (ノースウエスタン大)

Autonomic nervous system, retrospect and prospect

昭和59年11月21日

BROOKS, McC. (State Univ. of New York)

Professor Uchizono, Professors Katsuki, Fessard, Ebashi, Irisawa, Associates and Friends. It is good to be with those of you I have known for many years. Life's experiences have united us with a bond peculiarly ours.

It is also an honor to have been invited to visit this Institute and National Center dedicated to the advancement of physiological thought and achievement.

I should like to discuss with you "The Autonomic Nervous System in Retrospect and Prospect" — the evolution of our concepts of its function and problems of the future.

I — Preface and Introduction

The autonomic nervous system controls function, the study of function is physiology. Physiology began at that moment when man started to think about the nature of life and death, the nature of disease and its effects on living beings. Life is a flow of integrated processes directed, by a hierarchy of control mechanisms, toward attainment of essential goals. Physiology is the study of the essence of life.

Galen said that Physiology is the foundation of medicine, physiological thought is the nature of thought essential to medicine. Galen also was the first to discover, to identify the

system of nerves we now call the autonomic nervous system. He said these nerves carried the sympathies and thus the name sympathetic system originated as did the first concept of its function from Galen.

By way of introduction I wish to say that those who have studied the autonomic nervous system have indeed made major contributions to basic medical science. Furthermore, attainment of the ultimate goals of medicine and of physiology and the goals of those studying the bases of man's behavior will require further investigation of this division of the nervous system. It is obvious now that conditioning retained by centers regulating the autonomic system is highly determinative of behavior reactions.

Finally, (the autonomic system is an integrating system) integrative activity that organizes living protoplasm into functioning units and into organ systems, then directs their behavior appropriately to impinging requirements is the essence of the function which is life. Understanding of this as well as the role of molecular units is the required direction toward comprehension of life and man.

I shall begin a discussion of the present and future with a Retrospective Look since the new comes from the old.

II —Retrospective Thought

A. The Past: Those who first studied the composition of the autonomic nervous system also devised the nomenclatures that define its functional nature.

Galen (131–201 A. B.) said the system is responsible for the sympathies: We have given this a modern elaboration.

Sir Thomas Willis (1621–1675) and Jakob Benignus Winslow (1669–1761) called it the involuntary nervous system: By modern interpretation we can consider it independent of and even determinative of volition.

Marie Francois Xavier Bichat (1771–1802) called it the vegetative nervous system: A thought used today to imply a control over the very essence of the life process — energy usages.

John Newton Langley (1852–1925) also contributed. The name he used was autonomic nervous system with its sympathetic and parasympathetic divisions: This for us today implies automatic participation in all functions in a controlling role.

It can be said, however, that for the first 1500 years after Galen, concern was with anatomy of the system. I think that even today most "physiologists" are still anatomists in that they think structure identifies and determines function. The physiologist recognizes structure as providing potentiality for but not defining function. Many think an ion channel is

determinative rather than a potential, controlled entity. However, gradually as the system, its components and connections were identified, thought of function began to dominate. Anatomical discoveries of course still continue.

The listing of major discoveries of the past identifies many of the present themes of research. For example, the new HRP, fluorescent and immunological reactions permit reconsideration and extension of anatomic study to great benefit. We are still studying the depressor (barostatic) reflexes discovered by Cyon and Ludwig in 1866.

Many have contributed to our knowledge of the autonomic system but I believe two men have been chiefly responsible for the traditional channels of thought of our time: Walter B. Cannon and Ivan P. Pavlov.

Cannon's concepts can be summarized much as follows:

- 1 . The autonomic system plays a major role in emotions and emotional expression.
- 2 . The hypothalamus is the major site for organization of autonomic system function, emotional expression, etc.
- 3 . The system has an emergency function (sympatho-adrenal division) and a protective function (parasympathetic division).
- 4 . Has the ability to fire as a whole and organize defensive reactions.
- 5 . Plays a major role in adaptive change and maintenance of homeostasis.
- 6 . The humoral transmission of autonomic nerve impulse.
- 7 . Denervation sensitization.
- 8 . He revealed the nature and extent of deficiencies created by sympathectomies.

Pavlov's studies were not centered on the autonomic system as were Cannon's but he used autonomic system reactions in his experiments and in reaching his concepts of physiological functions. His contributions to our understanding of autonomic system directed behavioral reactions are these:

- 1 . Identification of action of various nerves on the heart (chronotropic, inotropic, etc.).
- 2 . Oscillatory characteristics of arterial pressure — neurogenically imposed.
- 3 . Neural control of the digestive system's secretory action: gastric, pancreatic, etc.
- 4 . Neurogenic inhibition: general and local.
- 5 . Psychic secretions: anticipatory (conditioned) autonomic reaction.
- 6 . Conditioned (conditional) as well as unconditioned reactions.
- 7 . Phenomenon of transfer — one signal for another producing responses.
- 8 . Significance of the stimulus to production of conditioning.

These ideas and discoveries constituted the essence of our knowledge and thought by the middle of this century.

B. The Present

The past blends into the present imperceptibly but I shall say the present began at mid century. Most of us here were living in 1950. It can be said that our present newer ideas closely relate to and are derivatives of those formulated in the first half of this century.

Examples of present thought can be listed and much support for all these somewhat new concepts could be presented. In brief summary they are as follows:

- 1) The autonomic system innervates and affects all tissues and functions: sensors, effectors and integrative processes. This needs no elaboration.
- 2) Since the autonomic nerves are not essential to but do affect function their action is modulatory. The pancreas will secrete insulin and glucagon even if denervated but when nerves are present a more sophisticated performance is possible — preparatory, anticipatory secretions are possible.

The autonomic system plays a role in the remarkable and complex metabolic system of glucosensitive, glucoreceptive reactions so much studied in Japan.

- 3) Supportive reactions are also clearly demonstrable. The autonomic and somatic system are not separate independent entities. Autonomic action follows somatic reaction like a shadow supporting functions of tissues involved — producing humoral support, energy supply, shunting of blood, appropriate heart pumping action, secretions, etc.
 - 4) Turning to Pavlov's heritage it can be said that the involvement of the autonomic system becomes more interesting and suggests new thought when we consider that autonomic action is readily and rather enduringly conditionable. The autonomic system's memory is good — this is related to the fact that the autonomic system comes into strong and total action when circumstance and stimuli are significant — significant to survival, etc. Nothing is learned without attachment of significance — when a signal is significant the autonomic system is involved.
 - 5) Autonomic system's reactions are also anticipatory and preparatory for somatic action — the alerting, the startle, the defense reactions, so much talked of, have major autonomic components.
- Psychic secretions — Pavlov — are anticipatory.
- 6) If this latter is true then the autonomic system certainly has a predicative, determinative role to play. By this I mean that the conditioned, retained, early autonomic reactions that precede the execution of behavior can to a degree determine what the behavior will be.
 - 7) If this determinative action is not considered proved or acceptable it cannot be

denied that the autonomic system determines the color, the quality, the intensity and effectiveness of behavioral reactions.

This is where I think we are at present in our concepts of autonomic system function.

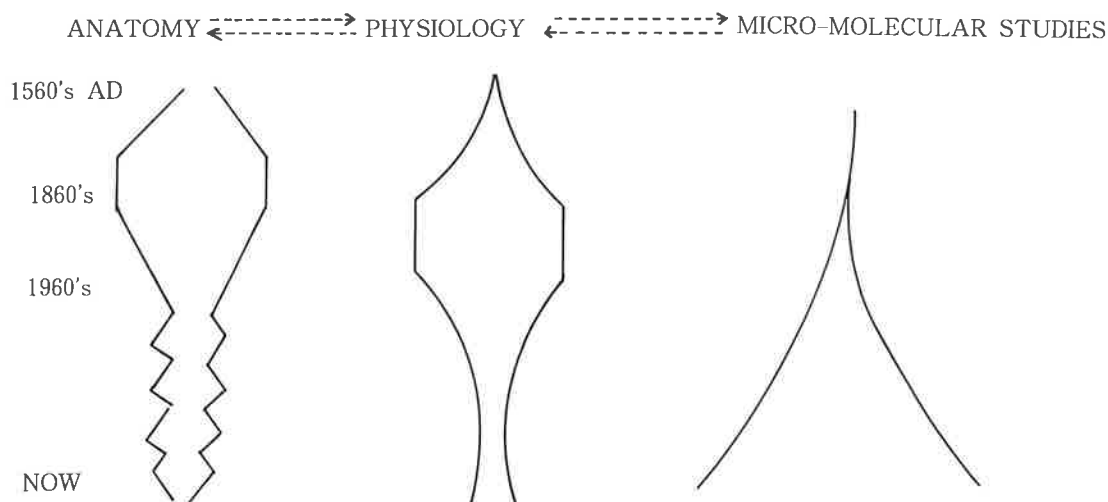
The birth of new ideas is a certainty but what they will be is hard to visualize. One can identify realms and nature but prediction is never safe although it is a necessity that man must engage in. Preparation for the future requires anticipated concepts of the future — what new developments are occurring.

III —Prospect

A. The New

To me much that is new is what I have just seen in laboratories in Fukuoka, Kitakyushu, Sendai and here. I admit that what is new to me may be relatively old to others. The new grows out of the old and to a degree determines the immediate future.

- 1) I see the new as chiefly the product or results of reductionist action and concern for minutia. We are well along in an age of molecular physiology or concern with the molecular. I would diagrammy view of developments as follows:



- 2) This diagram is based on what I see in my own country. It (physiology) is diminishing but there may be some hope for a modest new blooming of physiological thought as more attention turns toward study of behavior. Much previous work in behavior has been concerned with emperical conclusion drawn merely from observation and there has been much meddling with and confusion of our language. Now it seems there is more integrative thought and much meticulous experimental

work is being done. The potentialities of Pavlov's transferences and conditioning are being developed. The inherent and the acquired are being sorted out and there is of necessity more concern with control and the autonomic system, with the complex viscerο-emotional reactions, than with the simplistic somatic system most neuroscientists probe so industriously.

I see in the new, a hope for the reunification of the reductionist and integrative concern in the study of man and animals in their totality, their socio-environmental concern and search for security and the good life. However at times I feel a greater, an unbridgeable crevice is opening between the reductionist and integrative approach.

The new is a transient — the new is the threshold of the future.

B. The Future and Its Objectives

The attainments of the future cannot be identified. One can only predict interests and accomplishment and dangers.

1. Dangers: Science is not free from dangers.

Anyone not alert to present dangers to our concerns and anyone looking to the future who does not anticipate things to avoid has imperfect central and peripheral vision.

The dangers of today are dangers of tomorrow: I shall mention a few:

- a) Exclusive concern with minutia without consideration of their relationship to totalities. The reductionist probe extends beyond or past the essence of life — this essence is integration — how the minutia fit into the totality is the important question.
- b) Lack of realization that what can happen does not necessarily happen and that what does happen may not necessarily be significant. I sense a lack of skepticism in all the physiological sciences.
- c) The subdivision of interest and the breakdown of communication due to "jargon" and ill chosen specialized vocabularies are rampant. We cannot understand what others say.
- d) Techniques and technological attainment is valued over new and synthesizing-integrating thought. To know much about a little is worth more than to know much about many things—Little is Big.
- e) Interest in "security," power, wealth, comfort, privilege is too prevalent in academia—the labor union mentality dominates in the west.

2. Direction of Progress — Objectives of Progress

In discussing objectives and progress I should like to look in two directions and mention four objectives as examples.

First: the concern for Humoral Processes and the Humor Control Systems.

At the turn of the century humoral transmission was actively studied. We had acetylcholine, adrenaline and noradrenaline — several candidates such as histamine had been eliminated, both as hormones and as transmitters.

Most are back again plus legions of other compounds. Some are found, such as pancreas compound-P which at least 12 or so months ago had no known function. That may have changed now. Peptides do everything — they are everywhere.

The point I make is that all this is going to be extremely hard to put together — it is exciting but is it controllable?

I wonder to what degree the composition and production of these transmitters is fixed? Can or cannot a cell produce more than one transmitter?

When in a cell's development is power to produce a transmitter fixed, if ever? What powers produce or release fixations?

Are all these compounds listed as acting really functionally important—?

Second: Responsiveness of tissues to humors—The Receptor Concept

Humoral control and receptor function are hardly separable.

The receptor presents many possibilities and mysteries to me. It (the receptor idea) is not a new idea and has been presented in various forms.

- 1) Paul Ehrlich (1885) presented quite elaborate pictures and ideas. One unique feature was that a receptor "reached out" and captured materials which it then binds.
- 2) Langley's 1907 concept of a receptor was that this entity conferred special sensitivity and responsiveness permitting one compound to have diverse effects on cells. This is the present concept.
- 3) Cannon and Rosenblueth's ideas of the late 1930's and early 40's implied combination of a transmitter and receptor (ME or MI) which then circulated to affect distant cells.

The evolution of ideas about the endplate and receptors in skeletal muscle has resulted in diverse concepts.

There is still inconsistency and confusion in concepts of the nature of receptors. During the last two years I have heard that insulin acts through no receptors and contrarily I have heard that some forms of diabetes mellitus are in effect "receptor diseases"

Newer concepts of receptors include statements that receptors may contain several receptor points with diverse acceptabilities.

Others speak of sensitizing and/or facilitating receptor action.

Others speak of blocking and of desensitizing receptors.

If receptors are the key determinants in reactions possibly they can be conditioned. There are statements about long term facilitating and suppressing of receptors.

Are receptors the locus of memory?

Receptors act through "messengers." What are they — entities or actions triggered (if actions they are not messengers)?

Certainly the neurosecretory — transmitter — receptor story has to be sorted out. I think it will but not for some time if the present unskeptical, permissive conclusions continue to be drawn and if constricted vision continue to prevail.

Change of an adaptive nature is ever present in function — this adaptation is to produce not only change but also constancies — what adaptive changes occur in humoral control and receptor function?

They must occur.

Third: Concern for the Totality is the ultimate goal. Integration creates the totality.

Studies of integrative processes will of necessity, if progress is to occur, develop.

For those interested in the minutia the integrative processes that organize, maintain the cell and enable it to create the membrane and sustain its properties should be of interest.

There has been considerable attention paid to the mechanisms that correlate or unify cell population actions to attain effective mass — tight junctions, field effects, humoral emissions (local and from nerves) have been considered to be unifiers.

If integrative action is a "brain" function then I suggest it will have to be studied at several levels:

- (a) Higher intellectual brain levels
- (b) The vegetative brain and cord levels
- (c) The peripheral brain-integration in ganglia,
the plexuses.

With the receptor complex.

My fourth and final suggested objective is this — what is sympathy and where does it reside?

IV—Fourth: The final objective I see and my conclusion in this: The Study of Sympathy

In closing I should like to return to Galen's idea. The autonomic system is somehow tied

to the emotion of sympathy. Man is a social animal, we attain our highest achievement together. Sympathy is the matrix of society. If anything will preserve the future of man it will be sympathy.

It would not be unbecoming of scientists to know more of this human capability. What is its basis and how can it be cultivated?

We here present feel it toward each other but what do we know of its physiology?

There is somewhere inherent within man, or early learned by man, a concern for others. It can be developed or it can be destroyed. Somewhere within those bins that preserve experience, that direct the minds and emotions of men there is a storage of the behavioral component called sympathy that is expressed through autonomically controlled processes, processes that enables our "heart to leap with joy" and our eyes to "weep in sorrow." Is its study and cultivation an appropriate theme for future scientific thought? Perhaps it is a necessity.

New information about the central representation of the pairful message

昭和59年11月21日

FESSARD, Mme (パリ大)

心臓神経の新知見

昭和59年11月21日

KOIZUMI, K. (ニューヨーク州立大)

視床損傷後における大脳皮質の機能・構造の再編成

昭和59年11月29日

浅沼 広 (ロックフェラー大)

The functions of acetylcholine in the retina

昭和60年 1 月12日

MASLAND, R. (Massachusetts General Hospital)

生体試料に電子線を照射すると、試料中に含まれる元素固有の特性X線及び広範囲な波長分布を示す連続X線が発生する。この連続X線は、照射された試料の質量に比例し、又特性X線は、各固有元素の量に比例している。これらを測定する事により、試料中に含まれる元素の種類やその量を定量できる。電子線を小さな領域に絞り込み、試料のイオン分布を損わないよう工夫できれば、生体試料中の元素分布やその変化を知る事ができる。電子顕微鏡及びX線の半導体検出器の発達によりこれらが可能となった。試料の厚さが厚い時には、電子線を小さく絞り込む事はできない。これは、試料に入射した電子が、主に弾性散乱で方向変化を受け拡散状態を作り出すからである。しかし、瞬間凍結試料を超薄切片に切る事ができるようになり、100Åφ程度に絞り込む事は、困難ではなくなった。しかし、定量分析の際には、特性X線が近接する場合には困難が伴う。特に生体試料では、高カリウム濃度下で、微量のカルシウムを定量する必要がある事が多いがカリウムのKβ線とカルシウムのKα線が近接し、わずかのピークのずれや分解能の変化で大きく左右され定量が難しい。一般に特性X線のエネルギー分布は、ピーク値を中心にガウス分布となって測定されるが、スペクトルを、この2次微分まで使ってベストフィットする事により、微量なカルシウムの定量も可能になった。この方法を使ってカエル骨格筋のスキンドファイバーのCa²⁺、Mg²⁺の結合量を測定した。その結果F-actinに強く結合しているイオンはMg²⁺である事が証明された。更に、thin filamentへのCa²⁺の結合がtroponin Cの量から予想されるよりも少く、これが緩衝液のTRISの作用である事が確かめられた。また筋肉が弛緩状態の時、1 troponin 当り1 Ca²⁺が結合している事などが示された。このように、この方法は、極めて有力だが、幾つかの課題も残されている。一つは、電子顕微鏡の真空中に残っている水蒸気圧が、瞬間凍結してコールドステージ上にある試料の氷の水蒸気圧より高いと氷が析出し、照射損失を受けやすくなる。その為、高い真空度と水蒸気圧を下げる工夫が必要な事である。またもう一つは、X線の半導体検出器への照射損失（電子線のはねかえりや、高エネルギーX線）である。電子線のはねかえりに対しては、検出器の位置（距離を変えると測定立体角が損をするので、試料に対する角度が工夫の対象となる）を工夫する。しかし、現在の電子顕微鏡は、そのような工夫ができるよう設計されていないのが残念である。又、検出器表面保護の為、Beの窓が設けられているが、感度を得る為にはやはり余り厚くはできない。又このBeの為²³Na以下の測定が出来なくなっている。本研究の電子顕微鏡室に、JEM-200CX、JEM1200EXがあるが、上記試料作製の支援体制がなく、データ処理用コンピュータもなく、必要な低残留水蒸気圧も得られないので、上記の定量分析には、現在のところ不向きである。

ISFET (Ion Sensitive Field Effective Transistor) とそのバイオセンサーとしての応用

昭和60年 1 月22日

松尾正之 (東北大・工)

ISFET は、トランジスターの一種である絶縁ゲート形電界効果トランジスター (IGFET : (註) 絶縁体として SiO_2 等の酸化膜を用いたものは MOSFET として知られているもの) のゲートにイオン感應膜を形成し、イオン濃度に応じてできる界面電位で FET の電流制御を行うものである。このイオンセンサーは、次のような特徴を有している。(1) 絶縁物を介して電位を検出する為、入力抵抗の極めて高い理想的なポテンショメトリックな検出器である。(2) センサーの応答時間が速い。イオン感應膜の界面電位が FET のゲート電位に直結しているので増幅器も集積化でき、フィードバック回路を工夫すれば、容易に 10^{-3} 秒以下にできる。従って応答時間は、感應膜のみの熱平衡条件で決まる。この熱平衡は、感應部が薄くなればなる程に、理想的速さに近づく。(3) センサーの出力抵抗は、数 $k\Omega$ 程度にでき、ノイズに強い。(4) IC の高集積技術で超小型化・多重センサー化・信号処理回路の一体化が可能である。実際、(a) イオン感應膜として水和しない無機絶縁膜 (Si_3N_4 or Al_2O_3 or Ta_2O_5) ですぐれた pH センサーを作り、(b) NAS ガラスを用いて Na^+ 又は K^+ イオンセンサーを更に、(c) 高分子膜 (PVC 等) に K^+ イオノフォアや Ca^{2+} イオノフォアを分散させて、これらのイオンセンサーを作成した。超小型化・高集積化は、 $30 \times 30 \mu\text{m}^2 \times 5\text{mm}$ の pH, pNa, pK センサーを試作し、実用に耐える事を示した。 $10 \mu\text{m}$ 程度迄のものは出来るが、それ以下は強度及び集積法に今後の工夫が必要である。ただし、これらのイオンセンサーは、電解液電位を固定する為に、比較電極が別に必要である。絶縁膜として、イオンや H^+ に応答しない $1000\text{\AA}$ 厚のパリレンやテフロンを用いると、界面電位の変化がほとんどなく比較電極として用いる事ができる (但し液電位は、Pt 電極等で固定する)。実際、pH センサーと比較電極を両方集積した ISFET を作り動作を確認した。現在、耐水性に富むパッケージ法、絶縁膜の安定性等の改善がまだ必要であるが、使い捨て方式の短時間使用には十分な特性が得られている。ゲート膜への工夫や高集積化・超小型化は、今後の生命科学への大きなインパクトを約束している。

Early processing of colour and motion in a mosaic visual system

昭和60年 1 月26日

FRANCESCHINI, N. (Centre Nationale de la Recherche Scientifique)

Arterial Chemoreceptor and Baroreceptor

昭和60年 1 月 28 日

TRAZEBSKI, A. (Medical Academy of Warsaw)

Structural Kinetic and Cellular Mapping of the Na⁺ Channel

昭和60年 2 月 12 日

ANGELIDES, Kimon J. (Univ. of Florida)

精製したNaチャンネルに、直線加速機を使って電子線を照射し、その神経毒の結合活性に対する影響をしらべた。活性喪失の時間定数から計算されたNaチャンネル分子の大きさは、テトロドトキシン (TTX) 結合に必要なものとして270KD, β サソリ毒 (β -ScTX) 結合に必要なものとして200KD, α -ScTX 結合に必要なものとして41KDであった。これらの神経毒の蛍光誘導体を各種作製し、そのうちの2種類を同時にチャンネル分子に結合させ、蛍光色素間のエネルギー転スファの程度から各結合サイト間の距離を調べた。TTX サイトと TTX サイト間の距離は約50Åとなり、Naチャンネルは幾つかが集合した状態にあることが示唆される。 α -ScTX サイトと TTX サイト間の距離は約35Å, β -ScTX と TTX サイト間の距離は33Å, α - β ScTX サイト間は22Åとなっている。サソリ毒サイトは細胞膜表面にやや近くに在るようである。バトロコトキシンサイトはサソリ毒サイトから37Åのところであり、分子の中央付近と考えられる。蛍光化したサソリ毒はマウスの座骨神経のランヴィエ絞輪を選択的に染色し、また、コロイド金をラベルしたサソリ毒は、神経膜分画標本において膜構造にかなり選択的に結合する事が、それぞれ蛍光顕微鏡的に、また、電子顕微鏡的に示される。培養した神経細胞に蛍光標識化したTTXまたはScTXを結合させ、Naチャンネルの膜上での lateral mobility をレーザー退色法で調べると、細胞の分化に従って変化するのが分かる。軸索起始部では細胞体の部分より mobility が一段と低くなる。また、筋細胞においては、シナプス形成に際して mobility が低下する事が分かった。精製したNaチャンネルの円偏光二色性スペクトルも調べたが、可溶化した状態では分子内のランダムコイルは29%, β -回転24%, α -ヘリックス32%, 脂質膜に再構成した状態では、それぞれ、12%, 8%, 64%となっていることが分かった。膜に取り込まれることによってチャンネル分子は規則的な構造をとるようになることが示された。

The effects of dopamine on fish horizontal cells

昭和60年 3 月 15 日

DOWLING, John (Hervard Univ.)

The formation of neuronal connections in the cerebellar cortex. Role of
the cellular milieu in synaptic specificity.

昭和60年 3 月22日

SOTELO, C. (INSERM)

生理研昼食セミナー

(昭和59年度・世話人：小坂俊夫)

1984年

- 4月16日 藤田 一郎 (高次液性調節)
「魚類嗅覚神経路の機能分化」
- 5月7日 前田 純 (高次神経機構)
「計算機画像処理による神経細胞の形態計測」
- 5月28日 川口 泰雄 (液性情報)
「前庭動眼反射と小脳片葉」
- 6月25日 谷村 禎一 (基生研：行動制御)
「ショウジョウバエの神経遺伝学」
- 7月23日 Janczewski, Victor
「Two independent respiratory rhythms after splitting the
brainstem by midline section.」
- 9月17日 黒岩 常祥 (基生研：細胞機構)
「オスを操るメスの遺伝子」
- 10月22日 江橋 節郎 (神経化学)
「カルシウムイオンによる筋収縮制御」
- 11月20日 田内 雅規 (神経情報)
「網膜 ACh 作働性アマクリン細胞の形態と配列」
- 12月17日 久野 宗 (情報記憶)
「損傷神経膜の修復機序」

1985年

- 2月12日 Angelides, Kimon J.
「Structural kinetic and cellular mapping of the Na⁺
channel.」

- 2月25日 大森 治紀 (生体システム)
「神経系のモデルとしての有毛細胞」
- 3月25日 塚原 仲晃 (高次神経機構)
「大脳赤核シナプスの可塑性と運動学習」

【 超高压電子顕微鏡
共同利用実験報告 】

超高压電子顕微鏡共同利用実験報告

〔目 次〕

脾外分泌細胞のゴルジ装置と肝 Kupffer 細胞の貪食胞の立体観察ならびに ギャップ結合の高分解能観察 (小川和朗他)	357
ゴルジ装置トランス側の超微構造 (横田貞記他)	358
血小板立体微細構造に対する薬理学的研究 (西尾廣昭他)	359
上皮膜細胞の超高压電子顕微鏡観察 (佐々木貞雄他)	361
単純ヘルペスウイルス感染細胞における細胞膜とウイルス粒子との 相互関係 (新居志郎他)	362
培養細胞全載標本細胞小器官の立体的観察 (永田哲士他)	363
イソアワモチの感杆型光受容細胞の立体観察, 特にレンズ細胞と dermal photoreceptor 細胞の軸索について (片桐展子他)	365
生体膜に関する細胞化学的研究 (平野 寛他)	366
未固定無染色生物試料の高分解能観察 (高屋憲一他)	367
細胞内小器官の立体構造並びにその動態の解析 (齊藤多久馬他)	368
視細胞シナプス部の立体構造と特徴的構造物の解析 (塚本吉彦他)	370
カメ網膜の視細胞軸索終末の立体構造 (神山暢夫他)	371
アメリカナマズ網膜の外網状層における神経回路網 (中 研一他)	373
超高压電顕によるパーオキシゾームの観察—クロフィブレートによる誘導— (中村允之他)	374
フタホシコオロギ精子核内の DNA 高次構造 (鈴木 理他)	375
ラット星状膠細胞の微細構造 (浜 清他)	376
ラット心室心筋細胞横細管の生後発達に関する 定量的研究 (中村栄男他)	377
透過電子顕微鏡によるステレオ写真からの三次元情報解析について (浜 清他)	377

膵外分泌細胞のゴルジ装置と肝 Kupffer 細胞の貪食胞の立体観察 ならびにギャップ結合の高分解能観察

小川和朗, 藤本 和, 野田 亨, 山本厚太, 小川和重 (京都大・医)

1. マウス膵臓外分泌細胞におけるゴルジ装置の立体構造：我々は昨年度においてマウス膵外分泌細胞におけるゴルジ装置の電顕的観察に Zinc-Iodide-Osmium 法が有用であること、また超高圧電顕下で試料の厚切り切片を観察し、立体像を得ることによって、超薄切片像からは想像し難いゴルジ装置の立体構造に関する新たな知見を報告した。本年度においては1ケの膵外分泌細胞全体におけるゴルジ装置のより高次な立体構造、及びゴルジ装置の細胞内分布と細胞極性との関係を明らかにするために、昨年度と同様の試料を約1 μm 厚の連続切片、あるいは約5 μm 厚の厚切り切片として超高圧電顕下 (H-1250M) で観察し、検討を行った。マウス膵外分泌細胞においては、1ケの細胞全体は15~20枚の連続切片によって包括しえたが、ゴルジ装置の分布が確認できたのはそのうちの10数枚前後の連続切片においてであった。各切片におけるゴルジ装置の立体構造の変化が著しいにもかかわらずゴルジ装置の連続性は各切片間と立体視を行うことによって確認できた。したがって、マウス膵外分泌細胞においてはゴルジ装置は1つの連続した構造と考えられた。また、約5 μm 厚の厚切り切片像及び連続切片像を重ねあわせたものから判断すると、ゴルジ装置の全体像は10数 μm あるいはそれ以上の径をもつ球状あるいは楕円体状の空間に拡がった網様構造体と考えられ、さらに網様構造はtrans, cis側をもつリボン様ゴルジ層板からなることが明らかとなった。多くの場合、全体の構造の外側はcis側、内側はtrans側となっている。このように1つに連続したゴルジ装置の細胞内分布に関しては、細胞内におけるゴルジ装置の拡がりの方向と細胞間細管と走向とがよく一致すること、また細胞頂上膜直下に発達したゴルジ装置がしばしば観察されることから、その分布は膵外分泌細胞全体の極性と密接な関係をもつものと考えられた。

2. ギャップ結合の高分解能観察法の検討：ギャップ結合 (gap junction, GJ) の超微細形態観察法として、凍結割断レプリカ法やネガティブ染色法が広く用いられている。しかし、これらの方法には、GJの分離過程を含めて種々の煩雑な前処理や電子線損傷により、GJに構造変化をきたす可能性がある。本研究において、我々は、より構造変化の少ないGJ観察法を検討するために、急速凍結固定試料を用いて、超高圧電顕下で観察することを試みた。即ち、ラット心を細切し、液体ヘリウムないし窒素にて急速凍結固定した試料を、凍結ミクロトームにて50~100 nm 厚に薄切した。作成した切片を支持膜を張ったメッシュに圧着、伸展させ、凍結乾燥後、ウラン染色ないし無染色にて、超高圧電顕下で観察した。ギャップ結合は、全膜厚17~18 nm、細胞間隙2~3 nmの構造として観察された。また矢状断ではconnexonに対応すると考えられる粒子の集合が観察された。

ゴルジ装置トランス側の超微構造

横田貞記（山梨医大），有井達夫（生理研）

ゴルジ装置は形態学的に次の三部分に分けることができる。i) 小胞体で合成された蛋白質を含む輸送粒子とシス側層板，ii) 中央部をしめる数層の層板，iii) 分泌顆粒を含むトランス側の層板および微細網目構造である。これらは画然と分離しているわけではなく，境界はむしろない。通常の透過電顕により連続切片を観察すると，トランス側は極めて複雑な分枝吻合する管状構造よりなることがわかる。先に筆者はアルブミンの免疫電顕の局在を調べ，この蛋白質が分泌蛋白質の細胞内輸送器官の全てに存在することを明らかにした。さらに連続切片の観察により，ゴルジ装置トランス側の管状構造が小胞体とは直接に連続していないことを示唆した。しかし，決定的な確証を得るには到らなかった。そこで今回は，ゴルジ装置トランス側の構造——とくに小胞体と管状構造との関係を明らかにするために，アルブミンを免疫染色した標本の厚切り切片を超高圧電顕で観察した。

材料と方法：動物は雄ウィスタ・ラット（約200 g）を用い，方法は基本的に既報によった（PNAS 78, 4971, 1981）。肝臓を5分間門脈より灌流固定した。固定液には4%ホルマリン，0.02%グルタリアルデヒド，4%ポリヴィニルピロリドン，0.01%塩化カルシウム，0.15Mカコジル酸緩衝液（pH 7.4）の混合液を用いた。50 μ m 厚のヴィブラトーム切片を得て，これを西洋ワサビペルオキシダーゼ標識家兎抗ラット IgG（Fab 画分）で4時間浸漬し，洗浄後，DAB-H₂O₂ 液に10分浸漬して発色させた。オスミウム固定後，脱水，エポンに包埋した。厚さ1～2 μ m のエポン切片を50メッシュ銅グリッドにマウントして，無染色のまま光顕で反応を確かめると同時に超高圧電顕で観察した。

結果：アルブミンの局在を示すDAB反応産物は核膜周囲腔，小胞体，およびゴルジ装置に認められた。しかしながら，細胞内膜系のコントラストが低く，超微構造の詳細を検索するには困難があった。とくにゴルジ装置トランス側では反応産物の微妙な拡散があってさらに構造を不明瞭にしていた（図A・a, b）。高倍では像はさらに不鮮明であった。

考察：今回の観察により，免疫細胞化学に用いるDAB染色は超高圧電顕での観察には適していないことが明らかとなった。通常の電顕では殆んど問題とならない反応産物の微量な拡散も超高圧電顕では大きな障害となる。さらにウランによる電子染色がDAB反応産物を漂白するので，これを用いることができないのもまた像の不鮮明さの大きな要因である。アルブミンのような肝細胞の合成物の局在から，ゴルジ装置トランス側の構造を検討するには，さらに新たな方法が検討されねばならない。

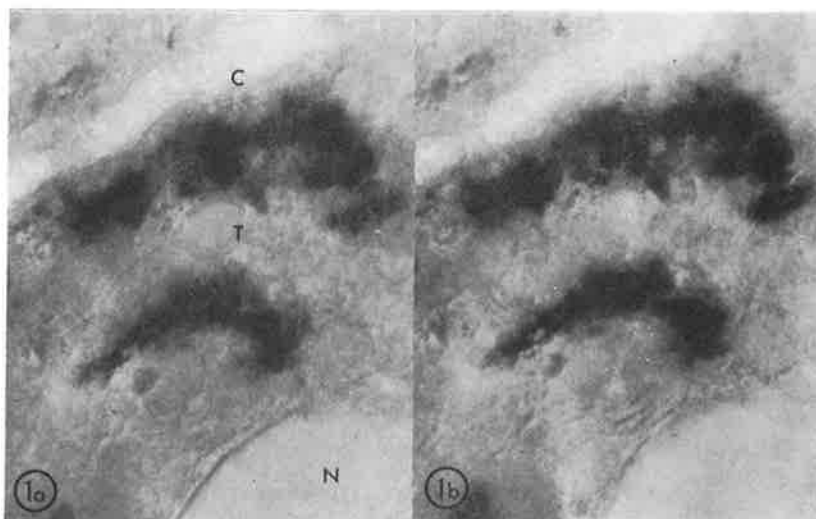


図1. ステレオ写真。ラット肝細胞。アルブミンの局在を示す高電子密度の反応産物がゴルジ装置全体に見られる。C：シス側，T：トランス側，N：核，9,500倍。

血小板立体微細構造に対する薬理学的研究

西尾廣昭，瀬川富朗（広島大・医）

ウサギ血小板の立体微細構造，特に解放小管系あるいは小胞系とセロトニン貯蔵部位である dense body との機能的，形態的関連性について，超高圧電子顕微鏡（HVEM）により観察し薬理学的考察する目的で，まず第一段階として HVEM 観察用の血小板試料作成法について検討した。また血小板はその形態が厚さ約 $0.2\mu\text{m}$ 直径 $2\sim 5\mu\text{m}$ の円盤状である事，細胞内構造に核を欠くがその他の構造は良く発達している事などから，HVEM を用いた超薄切片法によらない細胞立体構造の高分解能観察法を確立するための実験系として有用である。現在，血小板微細構造の HVEM を用いた本格的な研究報告は数少なく，わずかに LOFTUS, J. C. らの文献 [J. Cell Biol., 98, 2019—2025. (1984)] が認められるにすぎない。しかし彼等の報告は主に血小板細胞骨格系の観察とその細胞凝集過程での変化について研究を行っており，我々とその目を異にしている。[実験方法] 試料の固定，染色，脱水乾燥法としては，我々が従来より超薄切片法および走査型 EM に用いた方法および前述の LOFTUS らの方法の各種 modification を行った。すなわち，0.1% ポリ—L—リジン処理した支持膜にグルタルアルデヒド（GA）固定した血小板試料を固着させた後，以下の操作を行った。後固定剤としてはオスミウム酸（OS）を，染色剤としては酢酸ウラニル（UA）を，脱色剤としてはエタノール系列を用い，臨界点乾燥を行った。なお一部の

実験では、細胞内構造の固定、染色性を高めるためサポニン（SP）＋タンニン酸（TA）処理を、また細胞膜、小管系の density を高めるためルテニウムレッド（RR）処理を行った。[実験結果および考察] HVEM を用いて血小板のような遊離細胞の立体像を観察するためには、次のような点が解決されなければならない。1) 細胞内構造が細胞表面と同様に良く固定、染色されるようにする。2) 細胞全体が適当な電子密度を持って固定、染色され全体像が観察されるようにする。3) さらに特定の細胞構造を特異的に染色する方法を観察する。1) に関しては 0.05% SP + 0.2% TA + 1% GA による前固定、0.2% OS による後固定が有効であった。GA 固定を省略したり、パラホルムアルデヒドに変えたり、また OS 固定を省略した場合には、正常と思われる電顕像は得られなかった。2) に関しては 1% UA が有効であった。Fig. 1 は、このような固定染色法および臨界点乾燥した正常血小板の HVEM 像である。細胞内構造物としては、セロトニン貯蔵 granule, alpha-granule, 解放小管系, microtubules などが認められたが、mitochondria は同定できず、さらに観察、検討する必要がある。このような微細構造の観察のためには臨界点乾燥は必須であった。3) に関しては 0.5 mg/ml RR を固定剤と共に用いる事により小管系をより特異的に観察しうる事が明らかになった。

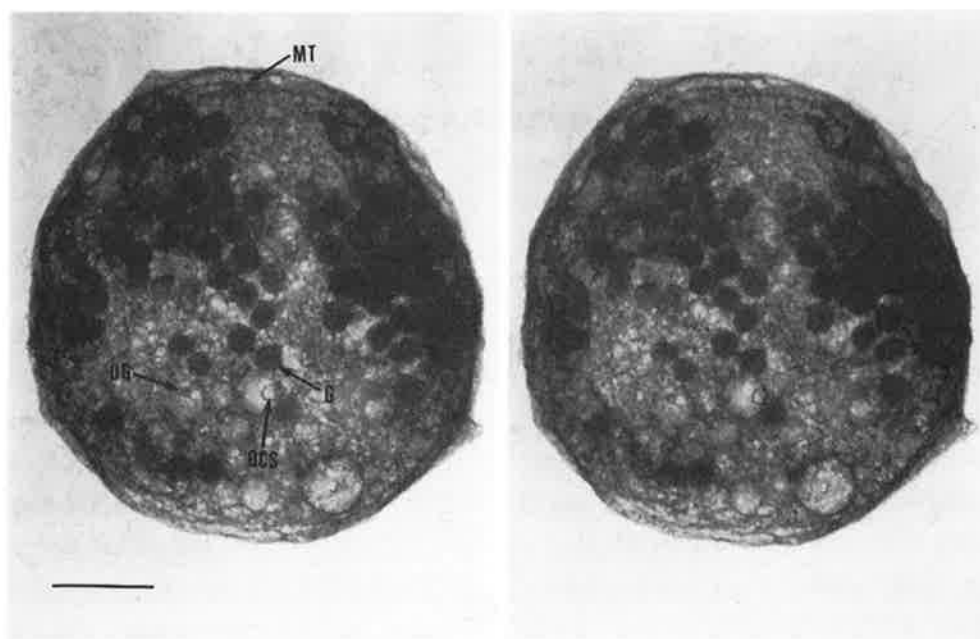


Fig 1. HVEM stereo pair whole mount. Representative intact rabbit blood platelet. Platelet possesses characteristic discoid shape and lacks pseudopodia. Note the circumferential microtubules (MT), alpha-granules (G), serotonin storage dense granule (DG), and open canalicular system (OCS). Bar, 1.0 μ m. $\times$ 13,000.

上皮膜細胞の超高圧電子顕微鏡観察

佐々木貞雄，中垣育子，今井雄介（大阪医大）
藤本 守（大阪医大），田代 裕（関西医大），有井達夫（生理研）

外分泌腺腺房細胞や腎尿細管細胞のような上皮膜細胞には，蛋白，イオン，水などの細胞内輸送システムが発達していると考えられる。従来家蚕絹糸腺細胞内の分泌果粒輸送系である細胞骨格（マイクロチューブル・マイクロフィラメント系）や唾液腺腺房細胞内の細胞間分泌細管膜上のイオンポンプの分布などを，本研究所の超高圧電子顕微鏡で立体的に観察して来た。

今回は，外分泌腺（ブタ腭腺房細胞，後部絹糸腺細胞）では，細胞の腺腔側に分泌果粒の開口放出の結果どのような変化が生ずるか，また腺腔の細胞内小器官にどのような細胞化学的な活性が存在するかに焦点を合わせて超高圧電子顕微鏡法を試みた。また蛙の腎近位尿細管細胞では，管腔より血液側への小胞輸送の全体像を把握するため超高圧電顕法による立体観察を試みた。

ブタ腭，家蚕後部絹糸腺および蛙腎尿細管の各試料小片をグルタルアルデヒド溶液（0.1 M Na-cacodylate buffer, pH 7.3 with 0.25 M sucrose）で前固定し，腭はそのまま，絹糸腺にはATPaseの，また尿細管にはAcid phosphataseの細胞化学的処置を施した後，酢酸ウラニールのブロック染色を施し，脱水の後エポキシ包埋した。電子顕微鏡用超ミクロトームで厚さ3 μ mの切片を作製し，電子染色を施し，超高圧電子顕微鏡（生理研：Hitachi H-1250 M）に挿入し， $\pm 8^\circ$ の傾斜角度を切片に与えて1,000 kV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，またはテレビカメラで撮りコンピューターと特製ガラスを用いて観察し，外分泌細胞および尿細管細胞を立体的に観察した。

ブタ腭腺房細胞では腺腔に豊富な微絨毛を観察し，それらが分泌果粒の激しい開口放出の結果形成されたと考えられる所見を得た。後部絹糸腺細胞では，開口放出によって分泌果粒の膜より出来たと考えられる腺腔の微絨毛上にATPaseの反応産物が厚い切片中に蓄積して観察され，これらの腺腔微絨毛膜上にKポンプあるいはチャネルの存在も議論された。

図1の立体電顕写真で示すように，蛙近位尿細管細胞ではAcid phosphatase陽性のライソゾームを初め，輸送小胞が立体的に観察され蛋白，アミノ酸，糖，イオン，水の細胞内小胞輸送の役割が種々議論された。

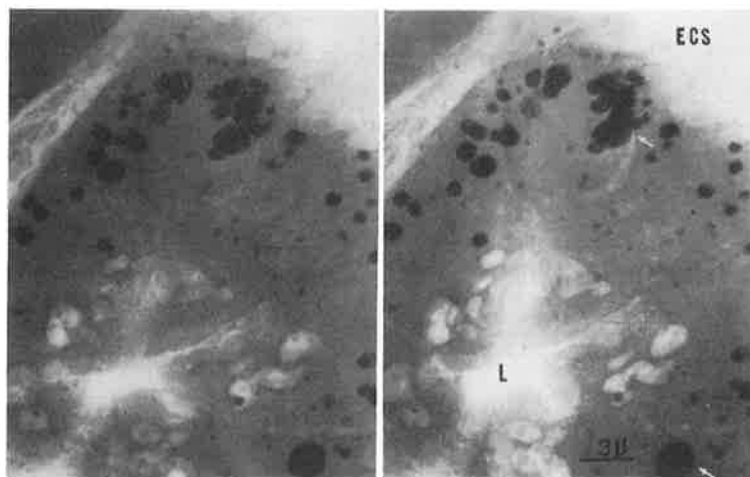


図1. カエル腎近位尿管細胞のステレオ写真。厚さ約 $3\mu\text{m}$ の切片を $\pm 8^\circ$ 傾斜した。試料には酸フォスファターゼの細胞化学的染色が施してある。ライソゾームは染色陽性である(矢印)。L: 管腔, ECS: 細胞外液腔。倍率 $\times 2,300$ 。

単純ヘルペスウイルス感染細胞における細胞膜とウイルス粒子との相互関係

新居志郎, 宇野文夫, 吉田まり子(岡山大・医)

目 的

単純ヘルペスウイルス感染細胞表面膜上および感染細胞内におけるウイルス粒子の分布, 存在様式ならびに放出過程を明らかにする目的で, 感染細胞の全載標本作製し, 超高圧電顕(HVEM)および走査電顕(SEM)による観察を行った。また比較検討のために, ワクチニアウイルス感染細胞についても同様の観察を行った。

材料と方法

培養細胞として, 上皮系FL, CV-1, ならびに線維芽細胞株HELを用い, それぞれフォルムバル膜上に培養調製した。単純ヘルペスウイルス1型(HSV-1)の深山+GC(LPV)株をMOI約10で接種ののち, 経時的に固定し, 常法に従って感染細胞の全載標本作製した。ワクチニアウイルスの感染にはIHD-W株を用い, FL細胞にMOI約5で接種し, 同様の標本作製した。超高圧電顕(H-1250M)で観察後, 金属コーティングを施し, 同一部位を走査電顕(HFS-2)で観察した。

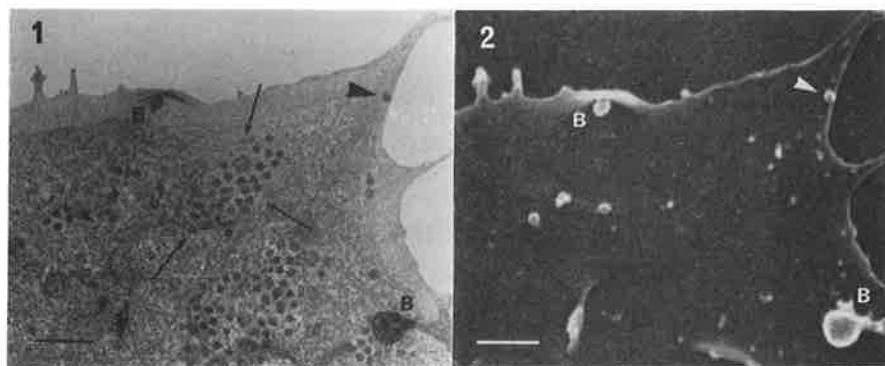
結 果

① HVEMによる, 傾斜角度を異にした撮影写真の立体視観察により, HSV-1ならびにワ

クチニアウイルス感染細胞のそれぞれの細胞質内ならびに表面膜上に多数のウイルス粒子を明瞭に観察することができた。+ GC (LPV) 株感染細胞の細胞質内には、個々単独の、あるいは多数のウイルス粒子を内包する空胞の存在が確認された。ワクチニアウイルス感染細胞では、細胞質空胞内および表面膜上の大多数の粒子が一層の膜に包まれた状態で観察された。② HVEM と SEM による同一部位の対比観察の結果、表面膜上の粒子のウイルス粒子としての同定がなされたのみならず、表面膜上粒子と細胞質内粒子を明確に区別することが可能であった。

考 察

HVEM と SEM を併用してウイルス感染細胞の同一部位を対比観察することにより、細胞表面膜上ならびに細胞質内におけるウイルス粒子の存在様式が明瞭となり、従来の超薄切片法では得られなかった新たな知見を提供しつつある。



HSV-1 感染 FL 細胞感染後、9 時間の HVEM 像 (図 1) および同一部位の SEM 像 (図 2) を示す。細胞表面にブレップ (B) および、ウイルス粒子 (►) を認め HVEM 像では、細胞質内に多数のウイルス粒子 (→) が観察された。(Bar: いずれも 1 μ m)

培養細胞全載標本細胞小器官の立体的観察

永田哲士, 臼井信光 (信州大・医)

浜 清 (生理研)

〔研究目的〕 培養細胞の細胞小器官を超高圧電顕により立体的に観察して、細胞小器官相互の位置の関係を明らかにするため、培養細胞全載標本に組織化学的染色を行い、立体観察を試みて^{1) 2)}いる。今回は培養細胞に HRP (horse radish peroxidase) を投与し、形成された飲小胞 (pinocytotic vesicles) を観察した。

〔材料及び方法〕 白金メッシュにフオルムバール支持膜を張り、組織培養用シャーレの底に並べ、小牛血清加 Ham F12 培養液により樹立線維芽細胞 CHO-K1 細胞を炭酸ガスふ卵器で 2, 3

日間培養した。次いで培養液中に HRP を 1 mg/ml の濃度に投入し、2 時間培養を継続した後、 0.1 M リン酸緩衝 1% グルタルアルデヒドで 1 時間固定し、 0.1% ジアミノベンジジン四塩酸塩 (DAB) と 0.02% の H_2O_2 を 0.05 M Tris-HCL 緩衝液で pH 7.2 になるように調整した反応液中で 30 分間反応させた。反応終了後、 0.5% 四酸化オスミウム液で 15 分間固定し、一部は無染色のまま、一部は染色して、臨界点乾燥を行い、日立 H-700 型電顕 (加速電圧 200 kV) で観察し、さらに日立 H-1250M 型超高压電顕 (生理研, 加速電圧 $1,000\text{ kV}$) で観察し、同一視野を $\pm 10^\circ$ の傾斜で撮影し、ステレオペアを作製した。

〔結 果〕 超高压電顕で培養細胞を観察すると、核の周囲部の細胞質の厚い部分から、細胞体辺縁部まで、浜の PN, ED, PE, CC の各 domain に反応産物が明瞭に観察された (図 1)。HRP による反応産物は、糸粒体、脂質小滴と同程度の電子密度を有する楕円形の顆粒状を呈し、一見脂質小滴に類似するが、脂質小滴より電子密度が高く、一様でないことにより区別でき、飲小胞と同定される。細胞体辺縁部では飲小胞が一行に並ぶ像が時々観察されたが、大部分のものは不規則な配列を示し、平均直径は約 $0.2\mu\text{m}$ であった。

傾斜をかけて同一視野から撮影したステレオペアにより、飲小胞と他の細胞小器官との位置関係が立体的に観察された。

一方、 200 kV 電顕による観察では、細胞質の厚い核周囲部 (PN) の観察は不可能であった (図 2)、また飲小胞と糸粒体の電子密度はほぼ同じで区別が困難であった (図 3)。

〔結 論〕 培養細胞に HRP を飲作用によって取り込ませ、DAB 反応を行った飲小胞を観察すると、 $1,000\text{ kV}$ の超高压電顕は電子密度の差により他の細胞小器官と区別でき、有用であった。また細胞小器官相互の位置関係を立体的に観察するためには、この方法は不可欠である。

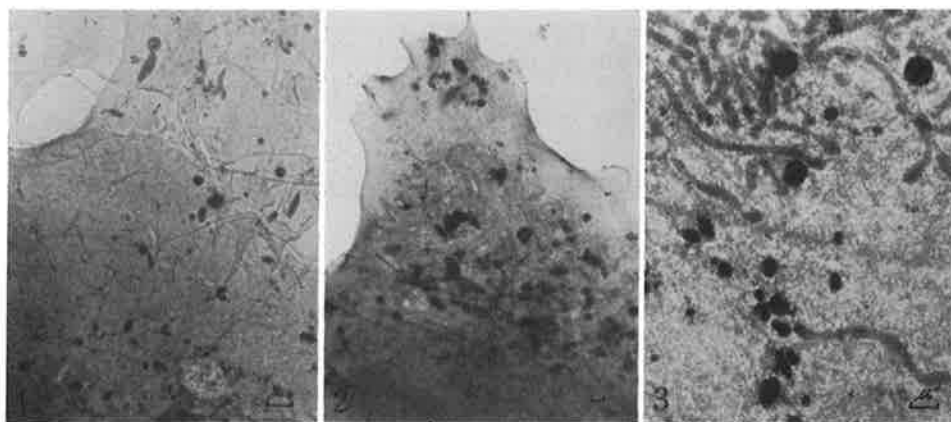


図 1. 培養 CHO-K1 細胞, HRP 投与後 1 時間, DAB 反応。 $1,000\text{ kV}$ で観察すると、核周囲部から細胞体辺縁部まで飲小胞が明瞭に観察される。

図 2. 同上試料の 200 kV 観察。辺縁部のみ明瞭に観察される。核周囲部不明瞭。

図 3. 同上試料の 200 kV 観察。辺縁部の強拡大像。

〔引用文献〕

- 1) 永田哲士：培養細胞全載標本の高圧電顕観察，組織培養10：411—413，1984。
- 2) 臼田信光，永田哲士：培養細胞全載標本への組織化学の応用。組織培養10：428—433，1984。
- 3) 浜 清：培養細胞全載標本の超高圧電顕観察。組織培養10：414—417，1984。

イソアワモチの感杆型光受容細胞の立体観察 特にレンズ細胞と dermal photoreceptor 細胞の軸索について

片桐展子，片桐康雄（東京女医大）

浜 清（生理研）

イソアワモチ（軟体動物・腹足類）には多種類の光受容系（柄眼・背眼，皮膚光覚・神経光覚）が存在するが，そのうちレンズ（L）細胞と皮膚光覚（DP）細胞は特異な光受容細胞である。L細胞は背眼の中央部に位置しレンズとしても機能する。DP細胞は外套の皮下組織中に1～数個集まって散在する。75 kV 電顕の観察によって両細胞は互いに似た微細形態を有すること（Katagiri, N. 1984）と細胞内記録によって光刺激に対し脱分極性応答を示すこと（Katagiri, T. et al. 1979）から感杆型光受容細胞であることが明らかにされている。L細胞はレンズ内における細胞の形，数，相互の位置関係など個々の背眼で異なる。また，DP細胞は色素を含まないのでその所在を外表から識別できない上，皮下組織内における分布や数，相互の位置関係も一定しない。更に，両細胞は大形（径200 μ mに達するものがある）であり，通常の薄切切片では立体再構築が難しく，軸索の有無や神経との関係はまだ解明されていない。両細胞の興奮伝達機構を明らかにするため超高圧電顕によって厚切りの連続切片の観察を試みた。

59年度は超高圧電顕でL細胞とDP細胞を確実に観察するための試料作成法を検討し，下記のようにした。(1) DP細胞は長時間・加温オスミウム染色し，L細胞はHRDを細胞内に注入してエポン包埋する。(2) シャーレに薄いトルイジン青液を入れ，ビニールシート（パンチで孔をあけ番号をつける）を浮かせる。厚さ1.0～2.0 μ mの切片を切った順番に1～2枚ずつ各孔に移す。シャーレごとポットプレート上で加温し切片を適宜染色する。(3) 実体鏡下で目的の細胞を確認しグリッドに1～2枚の切片を下からすくって載せ，穴あき金属板上に置いてグリッドの枠から水が盛りあがるようにする。グリッドの枠に細胞がかからないように切片を動かし位置を定める。(4) ろ紙で水分をとり，ホルムバース支持膜を貼る。(5) シリコンゴムチューブに10～15枚のグリッドを挟み（北，1984），電子染色をする。(6) 切片の光顕写真を撮り対照しながら超高圧電顕で観察する。

観察した全ての試料でDP細胞群の直下および外側に神経束が存在した。DP細胞が互いにやや

離れて分布する場合，DP細胞の側面に部位は一定しないが1～2 μm 径の軸索様突起構造が1細胞に1本認められた。しかし，多数（7個と11個）密集している場合は突起様構造と細胞の関係を明らかにできなかった。これは総切片数が多くなる上，1枚の切片上で観察する細胞数が多くなり，短期間には観察しきれなかったため，今後も観察を継続し更に例数を多くする予定である。

また，L細胞へのHRP注入は超高压電顕で観察可能な電子密度が得られなかった。更に実験を試みつつある。

生体膜に関する細胞化学的研究

平野 寛，高田邦昭，川上速人（杏林大・医）

山岸俊一（生理研）

1. マクロファージ全載標本及び厚切り切片を用いた実験結果（昭和59年度報告書参照）を原著論文（3篇）として刊行した。

論文：

- 1) Takata, K., Arii, T., Yamagishi, S. and Hirano, H.: Concanavalin A (ConA) receptors in mouse macrophages demonstrated in thick sections with a 1,000 KV transmission electron microscope. Proc. Jpn. Acad., 60 (Ser. B): 273-276, 1984.
- 2) Takata, K. and Hirano, H.: Whole-cell-mount cytochemistry by the colloidal gold labeling method. Combined transmission and scanning electron microscopic study of ConA binding sites in mouse macrophages. Histochemistry 81: 435-439, 1984.
- 3) Takata, K., Arii, T., Yamagishi, S. and Hirano, H.: Use of colloidal gold and ruthenium red in stereo high-voltage electron microscopic study of ConA-binding sites in mouse macrophages. Histochemistry 81: 441-444, 1984.

2. ヒト血小板開放小管系と細胞内配列の全体像を掌握するために，厚切り連続切片法による三次元的再構築を試みた。

ヒト静脈血より得た血小板画分を，0.05%ルテニウム赤を含むグルタルアルデヒド固定液にて処理した後，エポキシに包埋し，厚切り連続切片（厚さ0.8 μm ）を作製した。H-1250M型超高压電子顕微鏡（加速電圧1,000 kV）により， $\pm 8^\circ$ の傾斜にて撮影した写真をステレオ観察した（図1）。血小板は小型の細胞であるため，約5枚の連続切片より，開放小管系の全体像を再構築することができた。15～20箇所の開口部より細胞質内に侵入した管系は，複雑に分岐しつつ深部まで到達し，全体としてひとつながりの管状構造をなしていることか明らかとなった（図2）。このような管系が，リガンドの取り込み過程等において，どのように変化していくかさらに検索中

である。

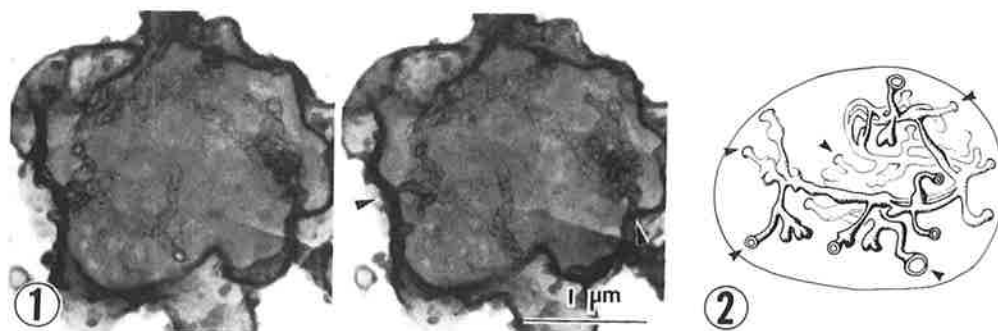


図1：ルテニウム赤にて染色したヒト血小板厚切り切片（厚さ $0.8\mu\text{m}$ ）の超高压電顕像。ステレオ写真（傾斜角 $\pm 8^\circ$ ）。開放小管系が細胞質内に複雑に分布している様子が、立体視することにより、三次元的に観察できる。矢尻は開口部を示す。

図2：厚切り連続切片より再構築した開放小管系と細胞内分布を示す立体模式図。矢尻は開口部を示す。

〔学会発表〕

- 1) 川上速人, 平野 寛：ヒト血小板開放小管系の立体観察。日本解剖学会第89回総会, 仙台, 1984年4月3～5日。
- 2) 川上速人, 平野 寛：ヒト血小板開放小管系の三次元的再構築 —— 厚切り連続切片を用いた超高压電顕による観察。（教育セミナー）日本臨床電子顕微鏡学会第16回総会, 大阪, 1984年9月20～22日。
- 3) 川上速人, 平野 寛：電顕細胞化学的にみた血小板の膜系。第3回新潟シンポジウム「血小板放出反応をめぐって」新潟, 1984年10月6～7日。

未固定無染色生物試料の高分解能観察

高屋憲一（富山医科薬科大）、吉井亮一（富山医科薬科大・実験実習機器センター）

有井達夫（生理研）

〔実験目的〕動物組織の未固定無染色標本を用いて200 kV透過型電子顕微鏡により種々の高密度果粒やシナプスボタン、シナプス小胞、メラニン果粒等を観察することができるが、しばしばこ

これらの構造と周りの細胞質との間に裂け目が生じる等のアーティファクトが生じる。1,000 kV電顕観察によりできるだけこれらのビーム損傷なしに高分解能で観察する。エネルギー分散型X線マイクロアナライザーにより分析を行ないそれらの微細構造における電解質・金属元素の成分と電子密度とを比較する。また電子回折法により結晶性を調べる。今回は主に有尾兩棲類赤腹イモリのいくつかの臓器で黒色素胞果粒について研究をおこなった。

〔実験方法〕赤腹イモリ成体の背側皮膚（黒色）、腹側皮膚（赤色）、眼球、肝臓等の細切片端と引き抜いた人毛包の乳頭端をコロジオン膜を張った銅及びアルミニウム製グリッドに軽く接触させてプリント標本を作製した。またイモリの臓器の新鮮凍結乾燥超薄切片（150 nm—2 μ m）を作製した。200 kV電顕（JEM-200 CX）による像観察後、分析電子顕微鏡（X-650）のSTEM像で黒色素胞および果粒の確認とEDSによる定性・定量的分析及びピークの重なる元素（K, Ca, Ti, Ba, Zn）についてはWDSにより結晶（RAP, PET, LiF）を用いて確認を行なった。また伸展標本と新鮮凍結乾燥超薄切片を無蒸着で超高圧電子顕微鏡（1,000 kV）により観察し、人の毛包、黒色マウス眼球、赤腹イモリ背部皮膚、眼球のメラニン果粒と色素上皮細胞果粒の、微細構造と電子密度を比較した。また一部の果粒は電子回折法で調べた。

〔結果と討論〕伸展標本と新鮮凍結乾燥超薄切片の200 kV, 1,000 kV電顕観察で赤腹イモリの皮膚（背部）、眼球脈絡膜、虹彩とメラニン果粒は短楕円体形または球形で明瞭な輪郭を示し、網膜色素上皮細胞果粒は長楕円体形であり、カエルのもとのほぼ同じであった。またマウスや人のものに比べより高密度であった。X線微小部分析で赤腹イモリ皮膚や眼球のメラニン果粒は高濃度の種々の金属元素を含み特にMg, K, Ca, Ba, Fe, Zn等有るがそれらの濃度は果粒により異なっている。対照として調べたマウスのメラニン果粒ではMg, K, Feが人ではMgとKが高濃度であった。電子回折法では人やマウスのメラニン果粒には結晶性を示すパターンは認められなかった。

細胞内小器官の立体構造並びにその動態の解析

齊藤多久馬（自治医科大）、浜 清（生理研）

細胞内小器官にはそれぞれ、代謝機能に従った酵素を保有しているので、その特異的指標酵素を検出することにより各細胞内小器官を染め出すことが可能である。超高圧電子顕微鏡はその立体構造を研究する上で有効な手段を提出している。

1) 視細胞における5'-nucleotidase 活性の立体構築

我々は、アデノシンリン酸をアデノシンとリン酸に分解する酵素である5'-nucleotidase活性をWachstein and Meisel法（1957）により検出観察を行なった。反応最終産物は電子密度大なりン酸鉛として認められる。4 μ エボン切片のステレオ写真はこの活性が視細胞の周囲を取り巻き

て蜂巢状に位置していることに明示しており、視細胞には、その生理機能上アデノシンリン酸を急速に分解することが必要な代謝が含まれていることを示して興味深い。(図1)

2) クライオ切片における acid phosphatase の立体像

クライオ切片法は急速凍結後、超薄切片を作成する技術である。この凍結超薄切片においても酵素活性を検出することが可能である。今回小腸上皮の4 μ クライオ切片において acid phosphatase 活性を検出し超高圧電子顕微鏡による立体観察を試みた。

Acid phosphatase 活性は小腸上皮微絨毛、ライゾゾーム、ゴルジ装置の他に側原形質にも陽性となった。この他細胞質中には acid phosphatase 陽性の細い管状構造を認める。原型質膜における陽性所見が真の活性であるかどうかは、従来の組織化学的結果と、対比しつつ目下検討中である。クライオ切片の酵素組織化学が可能であることから、エボン切片以上の厚い切片の立体観察の可能性が開けたことになるものと思われる。(図2)

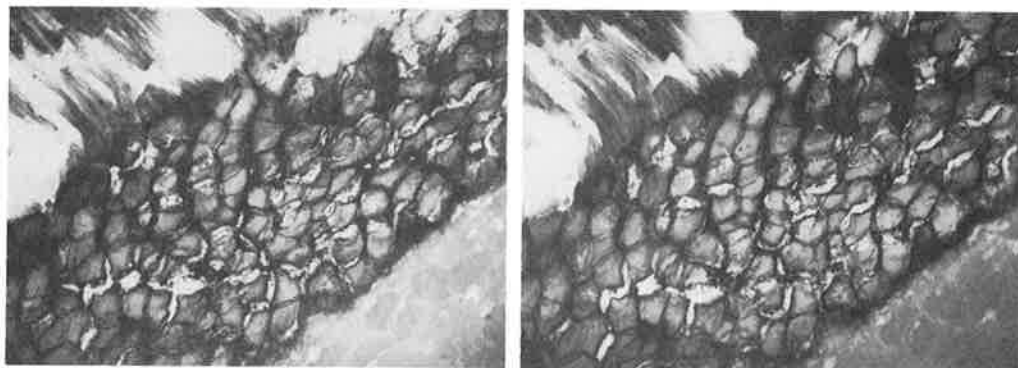


図1 網膜視細胞における 5'-Nucleotidase 活性 $\times 1300$ 。

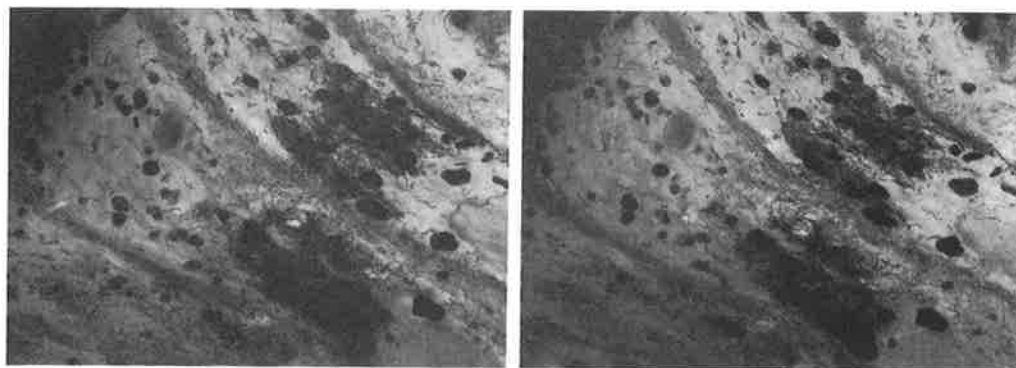


図2 小腸上皮のクライオ切片における acid phosphatase 活性 $\times 490$ 。

視細胞シナプス部の立体構造と特徴的構造物の解析

塚本吉彦（兵庫医大），金子章道（生理研）

暗順応したウシガエル網膜の視細胞終末のシナプス間隙に電子密度の高い物質が貯留することが見いだされた。赤杆体シナプス間隙におけるこの物質の出現頻度は暗順応3時間以上でシナプスリボン1個あたり0.6個の飽和値を示す。その形は球状または多角体状で、暗順応の経過とともに大きくなり直径約150 nmに至る。この物質は明順応状態で高頻度に観察される有芯小胞の内容物が開口分泌されたものと考えられる。以上の知見が通常型電顕を用いた超薄切片のランダムサンプリングにより得られた（Tsukamoto, 1983, Cell Tiss. Res. Vol. 234）。しかし、この高電子密度物質の三次元的配置に関しては未解明のままである。超高圧電顕を用いれば厚い試料の観察が可能なので少ない枚数の連続切片で目的物がカバーできるうえ、傾斜角をかけることにより切片内部における奥行き情報が得られる。これらの利点の実現性を試験することが本年度の課題の一つである。

図1, 2に例示するように、傾斜角をかけることにより切片内部の構造物の立体的な位置関係がわかる。奥行きの相対的な定量的データも計算できるが、切片表面からの絶対的な値は不明である。切片表面に何らかの指標を付ければ連続切片法と組み合わせることにより三次元的再構築が原理的には可能である。効率的に信頼性をもって行なうにはまだ多くの工夫が必要であろう。

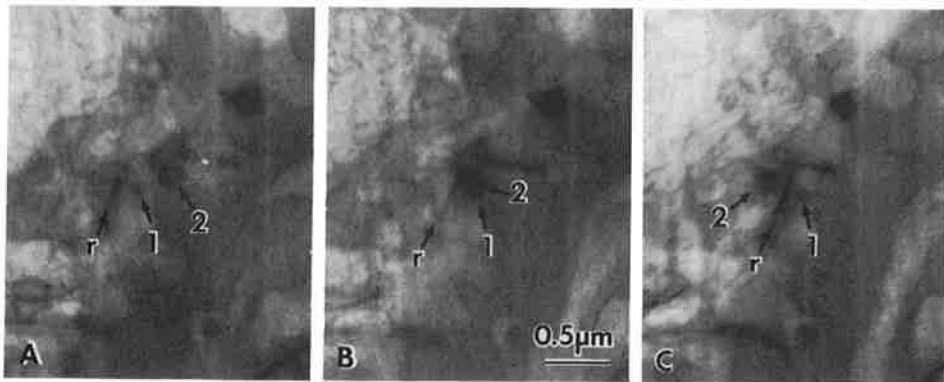


図1. ウシガエル赤杆体シナプス部におけるシナプスリボン（r）と高電子密度物質（1, 2）。傾斜角はA： -20° ，B： 0° ，C： $+20^{\circ}$ 。Aでは左から右へリボン，物質1，物質2の順に並ぶが，Cでは物質2，リボン，物質1の順に並ぶ。Bでは物質1と2が重なる。1 μm 切片のHVEM像，縮尺は0.5 μm 。

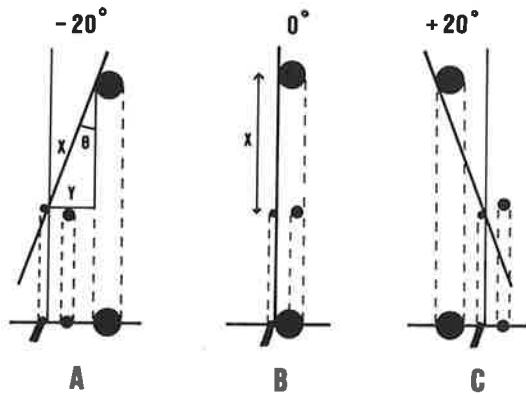


図2. 図1の所見の説明図。リボンと物質1がほぼ同一平面にあり、それらから距離をおいて物質2があるため、傾斜角を変えた時に観察像が異なる。像上のリボンと物質2の距離($y=0.22\mu\text{m}$)、傾斜角($\theta=20^\circ$)より、リボンと物質2の距離(x)が約 $0.65\mu\text{m}$ であることが次式により推定できる。

$$x = \frac{y}{\sin \theta} = \frac{0.22}{\sin 20^\circ} = 0.65 (\mu\text{m})$$

カメ網膜の視細胞軸索終末の立体構造

神山暢夫, 渡辺宏助 (東女医大), 大塚輝彌 (生理研)

脊椎動物網膜の視細胞間結合には、視細胞軸索終末のtelodendronによる結合と、視細胞内節の鬚状の突起(radial fin)による結合がある。杆体間のradial fin結合は杆体が多数を占めるカエルの網膜で報告されている。しかし、錐体については所見がないので、錐体为主であるカメ網膜の錐体及び杆体のradial finの立体構造を解析した。

甲羅長約20cmのクサガメの剝離網膜を、パラホルムとグルタルアルデヒドの混合液で固定し、網膜の背側部を切り出して錐体内節の油滴をカラー写真に記録した後、オスミウム固定し、酢酸ウラニウムでブロック染色後、通常のとおり脱水、包埋した。標本は視細胞の外節から外境界膜まで、連続の水平断切片(厚さ $2\mu\text{m}$)を作成し、染色せずに観察した。杆体(1例)、複合錐体(2例)、及び緑色感受性の単一錐体(1例)についてradial finの位置する内節の部分のステレオ写真を撮影し解析した。視細胞の種類、並びに錐体の色光感受性是有色油滴の有無と色から形態学的に同定した(生理研年報第6巻, p. 46)。

radial finは視細胞の内節から放射状にひろがる厚さ約 $0.08\mu\text{m}$ の鬚状構造で、視細胞の長軸方

向に長さ約 $8\ \mu\text{m}$ 、幅約 $3\ \mu\text{m}$ である。数は各視細胞によって異なり、杆体で約40枚、錐体で約20枚であった。各 fin は、外境界膜から視細胞内節の近位約 $1/3$ にわたって存在する。radial fin による結合は、杆体に顕著に見られた。カエルの杆体は fin の先端部同士が接触して、small gap junction を形成している。一方、カメの杆体の radial fin は隣接した単一錐体の radial fin と結合していた。杆体と錐体の fin が互いにその全幅に渡って密着し、先端部は、相手の視細胞の内節に直接接触していた (図1)。また、この結合は fin の全長にわたっていた。観察した杆体は、一つの赤錐体とは3重の、また他の赤錐体とは、4重の結合を持っていた。しかし、緑錐体とは、一つの fin が、その幅の中間でおわる結合しか持っていなかった。また、複合錐体の fin との結合は見られなかった。複合錐体を、構成する主錐体と副錐体の fin の間に結合がみられたが、他の錐体と杆体の fin との結合は見られなかった。単一錐体も近傍と杆体としか結合を持たなかった。カメ網膜では、杆体間の距離が fin の拡がりよりはるかに大きいため、杆体間の radial fin による結合は不可能と思われる。従って、カメ網膜において radial fin による結合が存在したのは、杆体—単一錐体間のみであった。今回の解析では、杆体—錐体間の radial fin 結合に small gap junction が存在する事を確認する事は出来なかった。杆体 ($\lambda_{\text{max}} = 520\ \text{nm}$) と赤色錐体 ($\lambda_{\text{max}} = 620\ \text{nm}$) は、色光応答性や動作する光強度の範囲が異なるため、この radial fin 結合が両者の光応答にどのように影響するかという問題は今後検討したい。

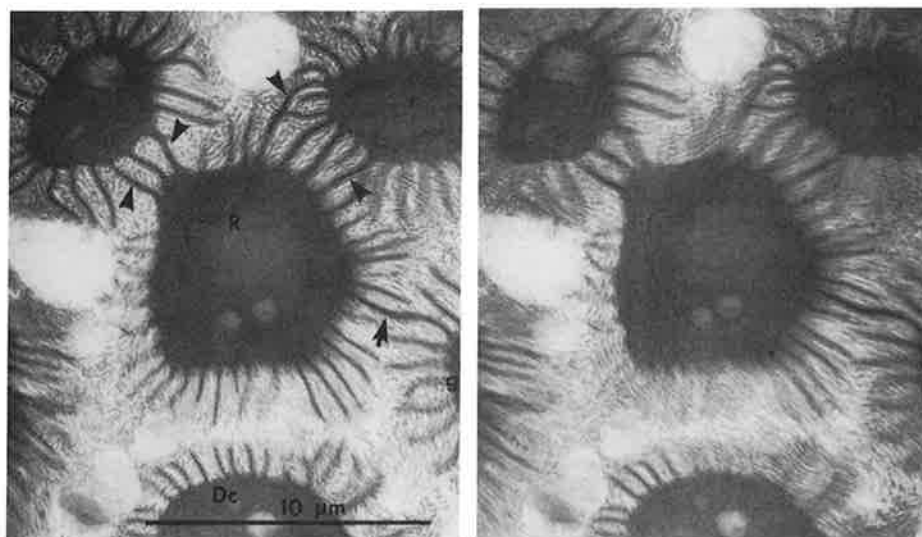


図1. カメ網膜視細胞内節部の水平断像。杆体 (R) の radial fin が赤錐体 (r) の radial fin と、矢頭にはさまれた部分で結合している。また、矢印の部分で緑錐体 (g) と結合しているが、複合錐体 (D) との結合は見られない。スケールは $10\ \mu\text{m}$ 。傾斜角 $\pm 8^\circ$ 。

アメリカナマズ網膜の外網状層における神経回路網

中 研一, 日高 聡 (基生研)

Golgi 法により鍍銀した双極細胞の樹状突起の形態については昭和58年度に報告した。昭和59年度にアメリカナマズ網膜の錐体水平細胞及び杆体水平細胞, そして錐体の3次元立体の形態について超高压電顕で解析した。

アメリカナマズ網膜のすべての錐体水平細胞は, 唯一の感光色素から信号を受けており, その最大吸収は620 nm である。(Naka, 1969)。即ち唯一の錐体のタイプから入力を受けている (Lasater, 1982)。Golgi 法により鍍銀された錐体水平細胞は細胞体を内顆粒層の最上部に位置し, 杆体水平細胞は錐体水平細胞の細胞体とその軸索に挿まれて位置する。錐体水平細胞は大きな細胞体を持ち, そこから分枝の少ない, 細くて短い樹状突起が出ているが, 杆体水平細胞は小さな細胞体を持ち, そこから分枝した太くて長い樹状突起が出ている。錐体水平細胞は錐体末端に multiple invagination を形成し, リボンシナプスの triad の lateral processes を形成する。またこの lateral process から spinules の構造が, 3~5 μ m の厚さの切片で立体的に詳細に観察できた。杆体水平細胞は杆体のみと contact し, 杆体末端の唯一のシナプスリボンの両側の lateral processes を, 1つの杆体水平細胞からの processes が形成し, 錐体水平細胞のそれよりは深くて, 大きい spinules を形成している。

唯一の type の錐体は, 末端に telodendria を持ち, 時々隣りの錐体に invaginate している。

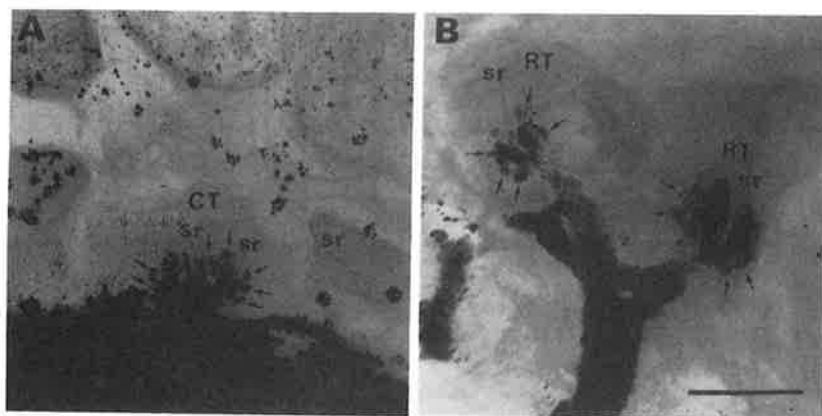


図1.AとBはそれぞれ Golgi 法により鍍銀されたアメリカナマズ網膜の錐体水平細胞及び杆体水平細胞の樹状突起が, 錐体及び杆体にそれぞれ invaginate している超高压電顕像。CT は錐体末端, RT は杆体末端。sr はシナプスリボン。矢印は水平細胞の spinules を示す。scale は 2 μ m。

〔文 献〕

1. Naka, K. -1. (1969) Computer assisted analysis of S-potentials. *Biophys. J.* 9 : 855-859.
2. Lasater, E. M. (1982) A white noise analysis of responses and receptive fields of catfish cones. *J. Neurophysiol.* 46 : 1057-1068.

**超高压電顕によるパーオキシゾームの観察
—クロフィブレートによる誘導—**

中村允之, 湊川洋介, 城戸 亮 (和歌山医大)

Peroxisomes の超薄切片による形態学的報告や, 酵素学的報告が多くなされている。これらによると, Peroxisomes は各種薬物で誘導され, 球形を呈するのが一般によく観察されるが, 時にはオタマジャクシ様の尾を持っていたり, やゝ大型の Peroxisome に太い尾が一本あるいは二本在るものも見受けられる。これらの尾もまっすぐなものから, ジグザグに曲ったもの, ジアミノベンチジン (DAB) によるカタラーゼ染色によく染まるものから, ほとんど染まらないものといくつかの変化がある。これらの形態変化が投与する薬物の種類によってもたらされるのか, 或は投与量, 投与期間, 栄養状態等の条件によってもたらされるのかは現在明らかではない。またこれらの形態学的変化が生理的にいかなる意味を持っているのかも明らかにされていない。少なくとも現在までの Peroxisomes の形態学的研究は超薄切片を用いて行われたものがほとんどであり, 1~2 μ m の大きさを持つ Peroxisome の観察には厚切り切片による超高压電顕が Peroxisome 研究に一分野を拓くことは云うを待たない。¹⁾ 今年度は Peroxisome 誘導薬剤としてよく知られているクロフィブレートによる Peroxisome 誘導を経時的に観察する目的で研究を行った。クロフィブレート投与3日目, 5日目—10日目の超高压電顕像から, Peroxisomes が次第に誘導されること, 3日目と5日目では球形の Peroxisomes がほとんどであるが, 10日目では尾を持ったものや, 異常な Peroxisomes が多く出現していることなどが観察された。現在, クロフィブレート投与後のもっと早い時期 (12時間~24時間) のものについて検討を行つている。

1) 中村, 湊川, 城戸 (1984) 生理学研究所年報 5: 436-438.

フタホシコオロギ精子核内の DNA 高次構造

鈴木 理, 有井達夫, 江橋節郎 (生理研)

筆者らか東京大学理学部において行った実験により長さ 20μ , 直径 1μ のフタホシコオロギ (*G. bimaculatus*) 頭部内で

1. DNA は精子核長軸方向に配向している。
2. 核両端では DNA の配向度は減少しており, これは DNA が曲がっている事を反映しているものと思われる。
3. 染色体には 20μ の周期構造があり, これは DNA のおれまがり位置を示していると思われる。
4. 精子形成と共に DNA 配向度は上昇する。

事が示された。しかし, これらはいずれも DNA 結合色素を用いた実験によるものであるため, 色素が非等方的に結合しているとする批判をまぬがれなかった。

今回, 生理研の超高压電顕を用いて, 成熟精子頭部の電子線回折像を得る事に成功した。これはカーボン・コロジオンメッシュ上の 1 枚の精子頭部の 1 部分のみに照射した電子線によるもので (図 1)

1. シグナルは $3.1\sim 3.5\text{\AA}$ 近辺にアーク状にあり, 角度は約 45° , 幅は $\pm 0.2\text{\AA}$ 程度である。
2. デフォーカス像より示される精子頭部方向とシグナルの方向が一致する。

このシグナルは DNA 塩基対間隔に対応するものと考えられるので, この事から以下が結論される。

1. 精子頭部内で DNA は長軸方向にたかだか $20\sim 25^\circ$ の角度内に配向している。この角度は試料を乾燥したために生じた可能性もある。
2. DNA 塩基対間隔は $\pm 0.2\text{\AA}$ と分布が少なく, これは分子レベルの構造がよく保たれている事を示している。
3. $3\text{\AA}$ 以上の塩基対間隔は, 乾燥真空下でも DNA が B 型を保持している事を示しており, DNA 結合蛋白質等の寄与が予想される。

また $4.3\text{\AA}$ 近辺にみられるリングはメッシュからの寄与とも考えられるが, 配向試料の X 線回折 (高エネルギー研究所雨宮博士との共同研究) でもこの近辺にリングが見られる事からシグナルである可能性もあるものと考えられる。

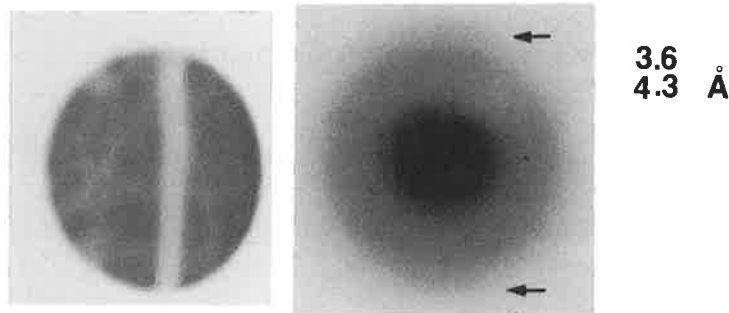


図1.

左：デフォーカス像（ネガティブ）中央の白帯が精子頭部の一部

右：回折像

ラット星状膠細胞の微細構造

浜 清，小坂俊夫（生理研）

星状グリア細胞はニューロンと共存し，その形態形成，形態維持および生理機能に密接に関与することが知られているが，その構造の詳細，特に終末分枝の三次元構造の詳細は充分に知られていない。我々は星状グリア細胞の光顕像および電顕像の総合的理解を深め，特に終末枝微細構造の三次元構造を明らかにするためラットの星状グリア細胞についてGFAP免疫染色法，ゴルジ染色法を施した後，光顕，超薄切片 TEM および $5\mu\text{m}$ 切片を用いての HVEM 立体観察を行った。特に Golgi 標本については金置換を行った後光顕で同定した細胞についての連続切片観察を行い，反応金粒子の細胞質内局在とグリア細繊維の存在を確認した。

GFAP免疫染色を行ったラット中枢星状グリア細胞の光顕像はグリア細繊維を染めるカハール法グリア染色における星状グリア細胞の像とほぼ同様の形態を示す。超薄切片 TEM では，反応産物は主としてグリア細繊維上に見られるが一部は周辺の細胞質内および細胞膜下まで拡散している。ゴルジ染色を行った星状グリア細胞は脳表面，灰白質内，白質内など，その存在する部位により異った形態を示すが HVEM による立体観察を行うとこれらの星状グリア細胞の終末細枝は基本的に共通の形態を持っていることが分った。即ち，終末枝は扁平繊細な木の葉状となって神経性要素の間隔を埋め，一部は扁平板状となって血管周辺に終っている。神経細胞が密集する部ではしばしば扁平な小片となり神経細胞を取り囲み蜂巣状の隔壁を形成するのが見られた。異った脳層に亘って枝を出す，いわゆる放射グリア細胞の場合にはその終末枝の形態はそれぞれの脳層に特有な形態を示す。ゴルジ標本の光学顕微鏡観察で細胞質性あるいは繊維性星状グリア細胞と同定された細胞は連続超薄切片の TEM 観察によりグリア細繊維をもつことが確認された。また前記の板状あるいは繊細な木の葉状の終末突起はグリア細繊維を含まないが細繊維を含む大

型突起との連続性が認められた。ゴルジ染色後、金置換された金粒子は細胞体および大型突起では細胞質内および細胞膜下に集合し、扁平な終末枝では三層構造を示す細胞膜に囲まれた $0.1\mu\text{m}$ 以下の狭い細胞質内に局在しており、ゴルジ染色が神経細胞の場合と同様にグリア細胞の場合にも細胞質を染める染色であることを示している。

以上の所見から GFAP 免疫染色およびカハールのグリア染色はグリア細胞繊維染色によって表現された星状グリア細胞像を示し、ゴルジ染色は細胞質染色によって表現された星状グリア細胞像を示すことが分った。また星状グリア細胞の形態は存在する部位の神経性要素の形態により異った像を示すが終末細枝は基本的に共通の形態をもっている。このような星状グリア細胞の終末枝の三次元的な構成の解明は普通の超薄切片からの立体再構築法では不可能であり、厚切りにしたゴルジ染色標本の HVEM 立体観察法が極めて有効であった。

ラット心室心筋細胞横細管の生後発達に関する定量的研究

中村栄男（名古屋大・医），浜 清（生理研）

ラット心室心筋細胞横細管の生後発達を超高圧電顕（H1250—M）を用いて立体的に観察した。生後2日から23週のラット心臓を4%グルタルで室温固定後、Franzini-Armstrong と Peachy による Golgi black 反応法で横細管を選択的に染色した。エポン、アララルダイト包埋後、 $1\sim 3\mu\text{m}$ 厚の切片を作製し、立体観察のために超高圧電顕下（1,000 kV）で $\pm 8^\circ$ の傾斜を与えてステレオ写真の撮影を行った。Golgi black 反応法は心筋細胞横細管の構造の詳細をよく示し、ラットの発育に伴う心筋細胞横細管の形態学的変化、特に横細管網の密度、長軸方向要素の頻度、扁平槽状に拡大した部分の形態等の変化を明瞭に観察できた。また $\pm 0^\circ$ の2方向に傾斜させた2枚の透過電顕像間の視差を利用して立体的情報を抽出するプログラムを開発し、日本レギュレーター Luzex 5000 を主体とした画像解析装置を用いて、心筋細胞横細管の長さ、体積、表面積の定量化を試みた。

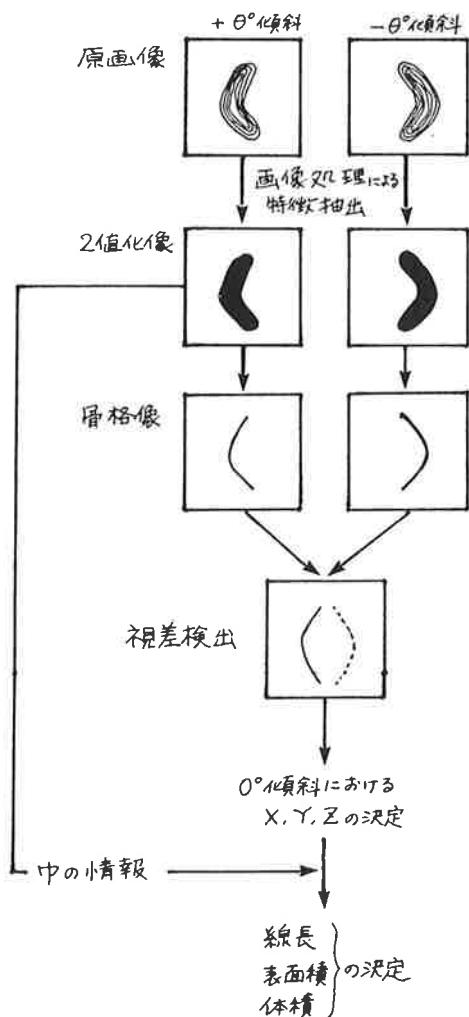
透過電子顕微鏡によるステレオ写真からの三次元情報解析について

浜 清，有井達夫，中村栄男（生理研）

超高圧電子顕微鏡の特徴の一つに厚い試料のステレオ観察があることは、これまでに良く知られている。この種の像の観察には、ステレオスコープや偏光スクリーンを用いた方法による両眼視の方法が用いられている。近年、コンピューターの普及と共に、これらの画像の立体的情報

を、コンピューターを用いて解析する手法が、走査電顕像等に対して試みられている。^{1, 2)}

今回、我々は、日本レギュレーターの Luzex 5000 を、主体とした画像解析装置を用いて、 $\pm \theta^\circ$ の 2 方向に傾斜させた透過電顕像より、立体的情報を抽出するプログラムを開発した。



この解析手順を左の図に示す。 $\pm \theta^\circ$ の 2 方向に傾斜させて撮影した 2 枚の透過電顕写真を、撮像管を用いて 2 面のイメージフレームメモリーに取り込み、画像処理を行って特徴抽出を行い、2 枚の 2 値化像を作る。この像を骨格化することにより、点又は線として識別した後、この像をモニターテレビ上に重ねて表示する。2 枚の骨格化像において対応点を決めることが出来れば、その点の視差を検出することにより、いろいろの対応点相互の深さ方向に関する相対的位置の情報を決めることが出来る。さらに、一定近似のもとに、撮影された物体の、長さ、表面積および体積を決めることが出来る。

昨年の電顕学会において報告したようにサイドエントリー傾斜ステージの傾斜角度の指示精度は、単結晶薄膜から得られる電子回折像の中の菊池模様の解析から、 $\pm 0.1^\circ$ 以内に決定することも可能であるので、ステレオ写真上の 3 次元的情報を、より定量的に決定していくことが可能となった。現在のところ、この方法は選択染色された管状の構造や、顆粒の空間的分布等の解析に有用であると考えられる。

1) 小堀哲雄 et al (1979) 第35回日本電顕学会予講集: 118.

2) S. G. Roberts and T. F. Page (1981) J. Microscopy 124: 77-88.

3) 浜 清, 中村栄男, 有井達夫 (1983) 第39回日本電顕学会予講集: 258.

索引

〔 Key Words 〕

索

引

【A】

Acetylcholine (heart circus movement)	249
Acid phosphatase (intestine, HVEM)	368
Acid phosphatase (renal tubule, HVEM)	361
Acidosis (respiratory, heart)	250
Action potential (compound)	316
Aganglionosis (rat, Hirschsprung's disease)	86, 212
Albumin (plasma, N-F transition)	280
Allosteric effect (glucose transport)	269
Alloxan (glucokinase, liver, Langerhans)	272
Amacrine cell (retina, rabbit)	50
Amino-acid sequence of helodermin	10
Amphibian active peptides	173
Amygdala (GH secretion)	206
Amygdala (neuron activity, feeding)	81
Angiotensin II (sinoatrial node)	202
Anomer of glucose (alloxan, glucokinase)	272
Antiarrhythmic drugs (heart)	255
Area postrema (glucose sensitivity)	267
Arrhythmia (heart single cell)	203
Arrhythmia (WPW syndrome)	251
Aspartic acid (chemotaxis, Escherichia)	271
Astrocyte (rat glial cell, HVEM)	376
ATP (heart muscle, K-channel)	282
ATP (living frog muscle, ³¹ P-NMR)	4
ATP-regulated K-channel	72
ATPase (Na·K-, lipid bilayer)	188
ATPase (Na·K-, affinity chromatography)	38
ATPase (Na·K-, hyperosmolarity-tolerant)	187
ATPase (Na·K-, immunohistochemistry)	37
ATPase (Na·K-, insulin, frog muscle)	293
ATPase (Na·K-, phosphorylated intermediate)	189
Atropin (effects on pancreozymin secretion)	268
Autonomic nervous activity (glucose)	267

【B】

Bipolar cell (gut endocrine secretion)	268
Bipolar cell (turtle retina, synapse)	192
Blastomere (ascidian, excitable membrane)	286
Brain stem (glucose sensitivity)	267
Brownian movement (Langevin equation)	312

【C】

C-kinase (insulin secretion)	266
Ca-current (heart, intracellular Ca)	73
Calcium (erythrocyte, deformability)	277
Calcium (intracellular, heart)	203
Calcium (intracellular, heart Ca-current)	73
Calcium (intracellular, squid axon)	287
Calcium (macrophage, phagocytosis)	290
Calcium (MLCK, calmodulin)	155
Calcium (periodic hyperpolarization)	281
Calcium (proteases)	287
Calcium channel (Paramecium)	334
Calmodulin (MLCK, calcium)	155
Carrier (structure, Na/sugar transport)	266
Carrier transport (Kedem-Katchalsky eq)	306
Catecholamine (amygdala neuron, feeding)	81
Catecholamine (heart, Na-channel)	252
Catecholamine (hypothalamus neuron)	76
Catecholamine (single Na channel, heart)	202
Cationized ferritin (neuroblastoma cell)	176
Cell death (sensory neuron)	62
Cerebral ischemia (³¹ P-NMR)	168
Chemotaxis (Escherichia coli, maltose)	271
Chlofibrate	374
Chloride channel (Dorsal root ggl, GABA)	208
Chloride channel (ray electric organ)	181
Cholecystokinin (stomach movement)	174
Cholinergic cell in retina	50
Circuit modelling (membrane transport)	303
Circular dichroism (Na-channel protein)	348
Circus movement (frog heart)	249
Co-transporter (sugar/Na)	265

Cochlea (inner ear, conductance change)	181
Colon (aganglionosis rat, morphometry)	212
Columnar organization of neuron (model)	319
Compound action potential (cond velocity)	316
Computer simulation (biological system)	314
Concanavalin A (neuroblastoma cell)	176
Conductance (salivary gland, Cole plot)	304
Conduction (chicken embryonic heart)	251
Conduction velocity (heart Purkinje)	248
Conduction velocity distribution	316
Cone (retina, spectral sensitivity)	46
Cone (turtle retina, GABA sensitivity)	40
Cone (turtle retina, synapse)	192
Connexon (gap junction of heart)	251
Contact lens (soft, ¹ H-NMR)	167
Contraction (muscle, mechanism of)	329
Contraction (smooth muscle, Ca)	1
Corti (organ of, movement by current)	184
⁵¹ Cr-space (extracellular fluid)	318
Creatine phoshate (muscle, ³¹ P-NMR)	4
Cultured nerve cell (serum free medium)	278

【D】

Deformability of erythrocyte (Ca)	277
Dendrites (three-dimensional network)	195
Dense core vesicle (autoradiography)	85
Diabetic rat (glucose absorption)	274
Differentiation (Xenopus embryo)	291
Differentiation of function	286
Divalent cations (Na-channel)	16
DNA (orientation of molecules in sperm)	2
DNA replication model (HeLa cell)	286
Dorsal root ganglion (Cl-channel, GABA)	208

【E】

Egg (Ca, periodic hyperpolarization)	281
Egg (differentiation of function)	286
Egg (Xenopus, Na-channel, mRNA)	21
Electric organ (ray, chloride channel)	181
Electrofusio (proteases, calcium)	287

Electron diffraction (DNA, cricket sperm)	375
Electron spin resonance (membrane)	313
Electron-probe microanalysis (calcium)	203
Electroreceptor (transmitter)	190
Energy transfer (Na-channel, TTX sites)	348
Enkephalin (inhibition of peristalsis)	211
Entrainment (heart, tachycardia)	254
Erythrocyte (deformability, Ca)	277
Escherichia coli (chemotaxis, MCP)	271
Evoked potential (vision, flash)	325
Evolution (stochastic process)	317
Excitation (fatty acid effect)	285
Excitation (optical activity, squid)	26
Extracellular fluid (compartments)	318
Eyeground (pattern recognition)	326

【F】

Fatty acid (excitable membrane)	285
Feeding (amygdala)	81
Feeding (lateral hypothalamus, monkey)	79
Feeding (Locus coeruleus activity)	78
Feeding (Locus coeruleus, monkey)	78
Feeding (prefrontal cortex)	204
Feeding behavior (LHA, catecholamine)	76
Fibronectin (neoplastic transformation)	292
Flavoprotein (resonance Raman)	5
Flow coupling of sodium and sugar	265
Fluctuation of membrane potential	305
Fluidity of biomembrane (fatty acid)	285
Fluorescence quenching (SR)	284
Freeze-fracture (heart, gap junction)	253

【G】

GABA (Cl-channel, dorsal root ganglion)	208
GABA (visual cell of turtle retina)	40
Gap junction (heart, HVEM, rat)	357
Gap junction (heart, prochordates)	253
Gap junction (heart, Purkinje)	256
Gap junction (structure, heart)	251
Generalized functional (mathematics)	301

Glucokinase (Langerhans islet, liver)	272
Glucoreceptor neuron (feeding)	263
Glucose (alloxan, glucokinase, liver)	272
Glucose (insulin secretion, Langerhans)	266
Glucose absorption (intestine, diabetes)	274
Glucose absorption (taste modifiers)	273
Glucose deficiency (heart)	250
Glucose transport (skeletal muscle)	269
Glucose-sensitive neuron (brain stem)	267
Glucosensitive neuron	263
Glutamate-sensitive channel	283
Glutathion (alloxan, glucokinase, liver)	272
Golgi apparatus (horizontal cell, HVEM)	373
Golgi apparatus (stereo, HVEM)	357
Golgi apparatus (ultrastructure, rat liver)	358
Golgi blacking method (muscle, T-tubule)	377
Golgi staining (astrocyte, HVEM)	376
Growth hormone (amygdala stimulation)	206
Gut endocrine cell (pancreozymin)	268
Gymnemic acid (tast modifier)	273

【H】

Hair cell (permeability sequence)	289
Heart (antiarrhythmic drugs)	255
Heart (chicken embryo, conduction)	251
Heart (circus movement, entrainment)	254
Heart (circus movement, frog)	249
Heart (conduction, Purkinje)	248
Heart (ECG, WPW syndrome)	251
Heart (gap junction, structure)	251
Heart (isolation of pacemaker cell)	73
Heart (K-channel, ATP)	282
Heart (membrane potential, hypoxia)	250
Heart (phylogeny, prochordates)	253
Heart (Purkinje, structure of junction)	256
Heart (symposium)	248
Heart muscle (diffusion coefficient)	276
Heart (catecholamine, Na-channel)	252
Heavy metals (sweet receptor)	265
Helodermin (active peptide from lizard)	12

Herpes virus (cultured cell)	362
High resolution imaging (HVEM)	83
High voltage electron microscopy	83
Hippocampal neuron (patch clamp)	283
Hippocampus (immunohistochemistry)	54
Hippocampus (zinc, rat, mouse)	178
Hirschsprug's disease (rat)	86
Horizontal cell (carp retina)	193
Horizontal cell (spatial addition)	320
Horseradish peroxidase (carp retina)	193
Horseradish peroxidase (neurosecretion)	186
Hyperosmolarity-tolerant cell (kidney)	187
Hypothalamus (feeding, catecholamine)	76
Hypothalamus (GH secretion)	206
Hypoxia (heart action potential)	250

【I】

Ileum (glucose absorption, rat)	274
Immunocytochemistry (Golgi, HVEM)	358
Immunohistochemistry (hippocampus)	54
Impedance (salivary gland, Cole plot)	304
Inhibitory synapse (hippocampus)	54
Inner ear (oto-acoustic emission)	182
Insulin (Na·K-ATPase, muscle, ouabain)	293
Insulin secretion (C-kinase, glucose)	266
Intercellular communication	292
Intracellular dialysis (heart muscle)	71
Intracellular injection (HRP)	186
Intracellular injection (Lucifer)	46
Intracellular pH (heart, ³¹ P-NMR)	165
Ion permeation (SR)	284
Ionic channel (heart)	71
Ionic current (heart ventricle, drugs)	203

【J】

Jejunum (glucose absorption, rat)	274

【K】

K-channel (ATP-regulated, heart)	72
K-channel (heart muscle, ATP)	282

K-channel (intracellular K)	70
K-channel (squid, K accumulation)	20
K-channel (SR, lipid bilayer)	279

【L】

Langerhans islet (C-kinase, insulin)	266
Lateral hypothalamic area (feeding)	79
Learning (catecholamine, amygdala)	81
Lipid bilayer (SR, K-channel, DIDS) _i	279
Locus coeruleus (feeding, monkey)	78
Lohmann reaction (TMR, muscle)	4

【M】

Maltose (Escherichia coli, chemotaxis)	271
Mathematical model (biological system)	314
Maximum rate of rise (catecholamine)	252
Maximum rate of rise (heart)	255
Mechano-electrical transduction	289
Membrane protein (Na-channel, Raman)	30
Messenger RNA (ACh receptor egg)	24
Messenger RNA (Na-channel, egg)	21
Methyl-accepting chemotaxis proteins	271
Micro-sleep (mouse) _i	6
Microphonic current (cochlea)	181
Monensin (insulin, Na·K-ATPase)	293
Monoclonal antibody (Na·K-ATPase)	37
Monoclonal antibody (synaptic vesicle)	87
Monoclonal antibody (Xenopus embryo)	291
Motivation (prefrontal cortex)	204
Motivation (preoptic area)	209
Motoneurons (rat and cat)	197
Multigene family (evolution)	317
Multiple membrane (spinal cord, ³¹ P-NMR)	167
Muscarinic acetylcholine receptor (mRNA)	24
Muscle (heart, diffusion coefficient)	276
Muscle (heart, ³¹ P-NMR, ATP)	165
Muscle (skeletal, Na, glucose transport)	269
Muscle (smooth, contraction, Ca-regulation)	1
Muscle (smooth, two-dimensional ³¹ P-NMR)	156
Muscle afferent (injury, NGF)	62, 197

Muscle spindle (denervation)	197
Myenteric plexus (aganglionosis rat)	86
Myenteric plexus (enkephalin) _i	211
Myosin light chain kinase (isolation)	155

【N】

Na-channel (electroplax)	33
Na-channel (molecular biology)	348
Na-channel (patch clamp of heart)	202
Na-channel (purified, Raman, brain)	30
Na-channel (Raman spectrum)	30
Na-channel (residual, heart)	252
Na-Channel (squid axon, drugs)	185
Na-Channel (squid, divalent cations)	16
Na-channel (squid, poly-cation)	18
Na-channel (Xenopus egg, mRNA)	21
Na-K pump (single unit current)	71
Neoplastic transformation	292
Nerve growth factor (cell death)	62, 197
Nerve growth factor (cultured neuron)	278
Nerve growth factor (nerve injury)	62
Nerve injury (effect of NGF)	62
Neural release of VIP and PHI	14
Neuroblastoma cell (ferritin, con A)	176
Neuroblastoma-glioma hybrid cell	85
Neuron activity (Locus coeruleus)	78
Neuron culture (serum-free medium)	278
Neuron model (dendritic network)	195
Neuron network (cable properties)	195
Neuron organization (model analysis)	319
Neuron specific proteins in SCG	179
Neurosecretion in crustacea	186
NMR (¹ H, contact lens, serum albumin)	167
NMR (³¹ P, experimental tumor, brain)	168
NMR (³¹ P, heart muscle, ATP)	165
NMR (³¹ P, multiple membrane)	167
NMR (³¹ P, salivary gland, ATP)	158, 303
NMR (³¹ P, topical magnetic resonance)	4
NMR (two-dimensional, smooth muscle)	156
Non-linear resonance	325

Nucleotidase (HVEM, visual cell)	368
Nucleus tractus solitarii (glucose)	263

【O】

Occluded enzyme (Na·K-ATPase)	189
Oil droplets in turtle cone	46
Onchidium (dorsal eye, mollusc)	365
Operant conditioning (feeding, amygdala)	81
Optical activity (squid axon, excitation)	26
Optical method (heart, chicken embryo)	251
Optical recording of neuron activity	334
Orbitofrontal cortex (feeding)	79
Oto-acoustic emission (stimulated, ear)	182
Ouabain (conduction, heart Purkinje)	248
Ouabain affinity chromatography (ATPase)	38

【P】

Pacemaker current (heart, single cell)	73
Pacemaker mechanism (angiotensin II)	202
Pacemaker mechanism (heart, conductance)	72
Pancreatic acinar cell (HVEM)	361
Pancreozymin (secretory cell)	268
Paramecium (cilia, calcium channel)	334
Patch clamp (hippocampal neuron)	283
Patch clamp (K-channel, heart muscle)	70
Pattern recognition	326
Pentobarbital (Cl-channel, GABA)	208
Peptides (amphibian, active)	173
Periodic flash stimulation	325
Peristalsis (intestine, enkephalin)	211
Permeability sequence (hair cell)	289
Peroxisome (ultrastructure, HVEM)	374
Phagocytosis (macrophage, Ca)	290
PHI (peptide histidine isoleucine)	14
PHM (a VIP-associated peptide)	8
Phosphatidylcholine phosphatase (squid)	175
Phosphatidylinositol phosphatase (squid)	175
Phosphorylated intermediate (ATPase)	189
Photoreceptor (dermal, mollusc)	365
Photoreceptor (frog, synapse, HVEM)	370

Photoreceptor (turtle retina, HVEM)	371
Photoreceptors (turtle retina)	46
Plasma albumin (N-F transition)	280
Platelet (ultrastructure, HVEM, human)	366
Platelet (ultrastructure, HVEM, rabbit)	359
Poisson process, mixed (mathematics)	318
Polyvalent cations (squid giant axon)	287
Postsynaptic potentials (motoneurons)	197
Prefrontal cortex (feeding)	204
Preoptic area (thermoregulation)	209
Purkinje fiber (heart, digitalis)	248
Purkinje fiber (heart, structure)	256

【Q】

Quin 2 (Ca-probe, macrophage)	290

【R】

Radial fin (turtle retina, HVEM)	371
Raman spectrum (flavoprotein)	5
Raman spectrum (purified Na-channel)	30
Reconstructed membrane (Na·K-ATPase)	188
Red nucleus (dendritic architecture)	195
Reentry (heart, tachycardia)	254
Renal tubule (HVEM)	361
Replicon (Monte Carlo simulation, DNA)	307
Retina (carp horizontal cell)	193
Retina (catfish, horizontal cell, HVEM)	373
Retina (cholinergic amacrine cell)	50
Retina (dot pattern stimulation)	320
Retina (turtle, synapse)	192
Retina (visual cell, GABA sensitivity)	40

【S】

S-100 protein (superior cervical ggl.)	179
Salivary gland (³¹ P-NMR, ATP)	294
Salivary gland (impedance)	304
Sarcoplasmic reticulum (K-channel)	279
Sarcoplasmic reticulum (permeability)	284
Scala media (cochlea, voltage clamp)	181
Scorpion toxin (electroplax, Na-channel)	33

Secretin	12
Serotonin (neuroblastoma-glioma hybrid)	85
Single Cl-channel current	208
Single Ca-channel current (Paramecium)	334
Single channel current (Na·K-ATPase)	188
Single glutamate-sensitive channel	283
Single K-channel current (SR)	279
Sino-atrial node (cell isolation)	73
Sino-atrial node (pacemaker mechanism)	72
Sino-auricular node (angiotensin II)	202
Skeletal muscle (glucose transport)	269
Sleep substance	260
Slime mold (thermodynamics)	310
Smooth muscle (³¹ P two dimensional NMR)	156
Smooth muscle (Ca-regulation)	1
Sodium pump (Na·K-ATPase)	189
Somatostatin (GH, amygdala, HRP)	206
Spectral sensitivity of visual cell	46
Sperm (cricket, DNA orientation)	375
Spider toxin (JSTX on electroreceptor)	190
Spontaneous discharge (diffusion model)	305
Squid giant axon (divalent cations)	16
Squid giant axon (K-channel, water flow)	20
Squid giant axon (optical activity)	26
Squid giant axon (phospholipase C)	174
Squid giant axon (poly-cation)	18
Squid giant axon (polyvalent cations)	287
Squid giant axon (Tb ion, fluorescence)	183
Stereoscopic imaging (HVEM)	83
Stomach (effect of cholecystokinin)	174
Superior cervical ganglion (proteins)	179
SVS-40 protein (synaptic vesicle)	87
Sweet receptor (taste bud, SDS-PAGE)	265
Synapse (frog photoreceptor, HVEM)	370
Synaptic vesicle (monoclonal antibody)	87
【T】	
Taste modifier (glucose absorption)	273
Tb ion (squid axon, fluorescence)	183
Tetrodotoxin (pancreozymin secretion)	268

Thaumatococcus (sweet-tasting protein)	265
Thermodynamics (membrane transport)	303
Thermodynamics (slime mold)	310
Thermoregulation (preoptic area)	209
Three-dimensional structure analysis	377
Topical magnetic resonance (muscle)	4
Transmitter (fish electroreceptor)	190
Transport (Kedem-Katchalsky equation)	306
Transport (skeletal muscle, Na, glucose)	369
Transport (small intestine, Na/sugar)	265
Transport (thermodynamics, membrane)	303
Transverse tubule (HVEM)	377
Trypsin inhibitor (pancreozymin secretion)	268
Tumor (experimental, ³¹ P-NMR)	168

【V】

Ventral root afferents	197
Ventricular cardiac muscle (HVEM)	377
Ventricular cell (Ca-current)	73
Ventricular cell (heart, K-current)	72
Ventricular single cell (drugs)	203
VIP (vasoactive intestinal polypeptide)	8, 12, 14
Vision (uniform and dot stimulation)	320
VMH (hypothalamus, feeding)	266

【W】

Water flow through membrane (squid)	20
WPW syndrome (heart, ECG)	251

【X】

Xenopus (monoclonal antibody)	291
Xenopus (oocyte, Na-channel, mRNA)	21

【Z】

Zinc (behavior, hippocampus)	178
Zizyphus jujuba leaf extract (taste modifier)	273

生理学研究所年報 第6卷

印 刷 昭和59年 8 月 20 日

発 行 昭和59年 8 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

