岡崎国立共同研究機構

生理学研究所年報

第 11 巻

1990

はじめに

昨年は総合研究大学院の発足，今年は統合生理研究施設の新設と，生理研も年毎に装いを変えてゆきますが，それを支えるものは個々の研究者の地道な努力以外にはありません。ここにお届けする年報を御覧戴きまして，もし生理研がその本来の責務を怠っているとお考えになりましたら，厳しい御叱正を賜りたいと思います。

平成２年10月

生理学研究所長
江　橋　節　郎

主な職員（1989年度）

所　　長　江　橋　節　郎

分子生理研究系

神経化学研究部門

教　　授	小　幡　邦　彦
助 教 授	赤　川　公　朗
助　　手	三　川　　隆
〃	鈴　木　　理
〃	白　尾　智　明
〃	児　島　伸　彦

細胞内代謝研究部門

助　　手	桑　原　厚　和

超微小形態生理研究部門

教　　授	亘　　弘
助 教 授	村　上　政　隆
助　　手	東　　晃　史
〃	瀬　尾　芳　輝
〃	平　石　泰　三（～1989. 9.30）

細胞器官研究系

生体膜研究部門

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

能動輸送研究部門

客員教授	藤　田　道　也
客員助教授	山　田　一　夫
助　　手	花　井　洋　行

機能協関研究部門

教　　授	渡　辺　　昭
助 教 授	寺　川　　進
助　　手	中　山　　孝
〃	木　村　能　章
〃	筒　井　泉　雄（1989. 8. 1～）

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	鈴　木　参郎助（～1990. 1.31）
〃	金　田　　誠

高次神経機構研究部門

客員教授	外　山　敬　介
客員助教授	福　田　　淳（～1989.12.31）
助　　手	谷　藤　　学

液性情報研究部門

教　　授	月　田　承一郎（1990. 1. 1～）
助 教 授	小　坂　俊　夫（～1989. 7. 1）
助　　手	川　口　泰　雄（～1989. 5.15）

情報記憶研究部門

客員教授	久　野　　宗
助　　手	樫　原　康　博

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門

教　授	彦坂興秀
助　手	亀山正樹
〃	加藤　誠
〃	宮下暢夫
〃	松村　賢（1989.10.16～）

生体システム研究部門

教　授	大森治紀
助　手	山口和彦
〃	山下勝幸

高次液性調節研究部門

客員教授	丹治　順（1989.12.1～）
助　手	粟生修司（～1989.7.1）
〃	藤田一郎（～1989.5.31）

生理機能研究施設

超高圧電子顕微鏡室

助教授	有井達夫

生体機能検査室

助　手	成瀬　達

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	技　官	山口　登
班　長	南　定雄	〃	佐治俊幸
係　長	大庭明生	〃	鈴木賢一
〃	小川良斎	〃	森　将浩
〃	加藤勝巳	〃	深井勝彦
技　官	市川　修	〃	磯谷健治
〃	池田明聡	〃	南口知津江
〃	山本幸子	〃	大石久美子
〃	前橋　寛	〃	吉友美樹
〃	細野　道	〃	永田理恵子
〃	小原正裕	〃	三輪晃子
〃	永田　治	〃	大河原　浩
〃	伊藤昭光	〃	小木曽　昇
〃	桜井律子	〃	鍋田弥生
〃	伊藤嘉邦	〃	山本　武
〃	水谷文保	〃	中西美津紀（1989.6.16～）

非常勤講師	河又邦彦
	山中篤
	碓井貞成 (1989. 8. 1～)
	Koriadriana ALICIA (1989. 1.16～)
日本学術振興会特別研究員	小坂克子　筒井泉雄 (～1989. 7.31)
特別協力研究員	亀山亜砂子
	成瀬博昭 (～1989. 4.31)
	樊津紅 (～1989. 8.31)
	Robert. W. Rodieck (1989. 4.18～ 7.14)
	Jonathan. F. Ashmore (1989. 4.15～ 5.22, 1989.12. 3～12. 8)
	Volodya Ayrapetyan (1989. 7.22～10.19)
	A. A. Yass (1989. 8.10～ 9.26)
	Frederick Sachs (1989.12. 3～12.10)
	Adriana A. Kori (1989.12. 4～)
	陳明 (1990. 2.19～)
	朱培閎 (1990. 2.19～)
	Philippe J. Anglade (1990. 2.10～)
文部省外国人研究員	Martin C. Steward (～1989. 6. 8)
	J. E. G. Downing (～1989.10.15)
	杜煥基 (1989. 9. 4～)
	George. S. Ayoub (1989. 9.12～12.11)
	Thomas W. Gardiner (1990. 3. 1～)
日本学術振興会招へい外国人研究者	Philippe Anglade (～1990. 2. 9)
	German. A. Roth (1989. 4.12～10.11)
	Shigeru. Tsuji (1989.10. 3～11. 2)
	Jhon Abott (1990. 3.13～)
大学院受託学生	矢沢和人　井上孝　加藤亮
	橋本隆紀　坂口雅彦　石川純嗣
	井上明宏　岩瀬範和　高木厚司
	岡田英一郎　寺田庄一　夏苅直己
	倉橋隆　安井健二　重本尚
	神山斉己　Shanthi Manivannan
中国政府派遣研究員	李金鳴 (～1989.10. 4)

1989年度　生理学研究所年報

目　　次

はじめに

主な職員（1989年度）

研究活動報告

分子生理研究系 …… 9
細胞器官研究系 …… 22
生体情報研究系 …… 47
生体調節研究系 …… 67
生理機能研究施設 …… 84
動物実験施設 …… 91
技術課 …… 95

研究発表

発表論文 …… 115
学会発表 …… 144

共同研究報告 …… 173

磁気共鳴装置共同利用実験報告 …… 255

超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告 …… 269

研究会報告 …… 297

コンファレンス報告 …… 433

セミナー報告

生理研セミナー …… 439
お別れセミナー …… 449
脳の細胞生理学 …… 453
昼食セミナー …… 457

【研究活動報告】

研究活動報告

〔目　　次〕

分子生理研究系

神経化学研究部門 …… 9

概　要

脳の発生に関連する蛋白質ドレブリンの遺伝子構造及びその発現機構
（白尾智明，児島伸彦，他）

キンドリングによって特異的に発現量の増加する分子の cDNA クローニング
（児島伸彦，橋本隆紀，他）

ラット網膜の再凝集培養内に見られる網膜様組織について（赤川公明）

アマクリン細胞特異蛋白 －HPC－1－ の解析（井上明宏，赤川公明）

実験的アレルギー性脳脊髄炎ラットの免疫化学的研究
（German A. Roth, 小幡邦彦）

超微小形態生理研究部門 …… 15

概　要

Na^+/ K ATPase, Na^+/ K^+ $2Cl^-$symport による唾液腺 K^+輸送
（村上政隆，宮本信一他）

ラットの唾液腺における Rb イオンの膜透過
（Martin C. Steward, 瀬尾芳輝他）

Na－MRI による腎臓の尿濃縮能の評価に関する基礎的検討
（前田宗宏，瀬尾芳輝他）

二量子フィルターを用いた細胞内 K の測定（瀬尾芳輝，村上政隆他）

ラットにおける ATP の compartmentation : ^{31}P NMR による縦緩和時間の研究
（鈴木英司，瀬尾芳輝他）

生体分子の相関時間と磁気共鳴における変調周波数との関係
（亘　　弘，村上政隆）

^{31}P NMR によりみた stunned myocardium に対する高 K 酵素化再潅流の検討
（平石泰三，亘　　弘）

細胞内代謝研究部門 …… 20

概　要

ガラニンの構造－活性相関（桑原厚和）

細胞器官研究系

生体膜研究部門 …… 22

概　要

神経細胞内 Ca^{2+} および Mg^{2+} レベルによる興奮の制御

（山岸俊一，古家喜四夫）

ラット海馬シナプス伝達の長期増強に対するホスホリパーゼ阻害剤の効果

（岡田大助，杉山博之）

ラット海馬におけるグルタミン酸受容体サブタイプの分析

（山本幸子，杉山博之）

軸索外表面の K イオン蓄積に対する K イオンの影響（久木田文夫）

培養乳線上皮細胞における細胞内カルシウム振動と反応

（古家喜四夫，榎本浩一，他）

機能協関研究部門 …… 31

概　要

神経の施光性シグナルの伝導方向による逆転（渡辺　昭）

クロマフィン細胞の顆粒運動と開口放出（寺川　進，樊　津紅，他）

神経分泌終末のエキソサイトーシスの可視化

（寺川　進，シャンティ・マニバナン）

脳下垂体後葉の光散乱変化に対応する微細構造変化

（シャンティ・マニバナン，寺川　進）

脳下垂体前葉の TSH 細胞におけるエキソサイトーシスの可視化

（岩瀬範和，寺川　進，他）

大腸クリプト細胞の Ca 信号（寺川　進，朱　培閎，他）

細胞外マトリックスによる海馬神経軸索の成長促進

（中山　孝，杉山博之，他）

イカ巨大軸索 C1－ チャネル（筒井泉雄，山岸俊一）

能動輸送研究部門 …… 43

概　要

ドーパミン作動性およびβアドレナリン作動性シグナル伝達系における

カルモデュリンの関与（藤田道也，夏苅直己，他）

ラット小腸の単離上皮細胞における Ca channel の同定と検討

（花井洋行，亀山正樹，他）

高齢ラットにおける，カルシウム吸収低下の機序

（花井洋行，山田正美，他）

モルモット小腸刷子縁膜小胞のアミノ酸輸送系（山田一夫）

生体情報研究系

神経情報研究部門 …… 47
概　要
抗 protein kainase C 抗体に対する反応性を指標としたキンギョ網膜双極細胞の分類（鈴木参郎助，細野　道，他）
視物質のモノクローン抗体を用いた錐体視細胞の研究（大塚輝彌，河又邦彦）
単離ネコ網膜神経節細胞の電位依存性ナトリウム電流のスパイク発射頻度に与える影響（金子章道，金田　誠）
液性情報研究部門 …… 57
概　要
高次神経機構研究部門 …… 58
概　要
大脳皮質視覚野における電位感受性色素による光学的応答と細胞内電位との比較（山中　篤，谷藤　学，他）
冷却型 CCD カメラによる視覚野神経活動の時空間パターンの解析（谷藤　学，中山　篤，他）
坐骨神経移植による哺乳動物視神経の再生過程（福田　淳）
情報記憶研究部門 …… 64
概　要
筋神経終末端からのカルシトニン遺伝子関連ペプチドの放出（久野　宗，樫原康博，他）

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門 …… 67
概　要
サル脳の MRI－ 行動実験への適用（宮下暢夫，加藤　誠，他）
眼球運動発現における大脳基底核ドーパミン系の役割（碓井貞成，アドリアナ・コリ，他）
生体システム研究部門 …… 74
概　要
モルモットの蝸牛外有毛細胞における ATP による Ca 応答（大森治紀，J. F. Ashmore ）
ATP は ACh と同様に有毛細胞において細胞内 Ca 濃度を増加させ，電気的応答を引き起こす（重本　尚，大森治紀）

蝸牛神経節細胞における化学感受性イオンチャネル（山口和彦）
高次液性調節研究部門 …… 79
概　要
大脳皮質補足運動野細胞活動の可塑性（丹治　順，相沢　寛）
雌ザル中脳電気刺激で誘発される性行動（栗生修司，高木厚司，他）
摂食行動に及ぼす視床下部刺激の効果（高木厚司，岡田英一郎，他）

生理機能研究施設
生体機能検査室 …… 84
概　要
空腹期の胃の周期運動に伴うガストリン感受性の変化（成瀬　達）
組織培養標本室 …… 86
概　要
毛細血管内皮細胞の有窓構造形成に関する in vitro モデル（古家園子）
超高圧電子顕微鏡室 …… 88
概　要
厚い試料の超高圧電顕像に対する平行投影近似の適用限界と像を歪める収差（有井達夫）
動物実験施設 …… 91
概　要
Colokalization of acetylcholinesterase activity and some neur opeptides in the guinea－pig myenteric plxus.（アングラード・フィリップ，尾崎　毅）
技術課 …… 95
生理機能研究施設
生体機能検査室
組織培養標本室
超高圧電子顕微鏡室
電子計算機室
磁気共鳴装置室
動物実験施設
共通施設
電子顕微鏡室
機器研究試作室
低温冷凍実験室

分 子 生 理 研 究 系

神経化学研究部門

概要

当部門では脳の長期的機能変化における物質的基盤を明らかにすることを目的に，１）神経発生関連蛋白ドレブリンの分子遺伝学的解析，２）脳可塑性モデルであるキンドリング・ラット海馬からの特異分子の検索を行った。

脳の発生にしたがって分子型と分布を変える３型(E1, E2, A)のドレブリンにつき，既にニワトリ胚cDNAライブラリーよりクローニングして，E1及びE2の構造を決定したが，今年度はヒヨコ大脳よりcDNAライブラリーを作り，これからA型ドレブリンのcDNAクローニングを完成した。さらに，ドレブリン遺伝子のクローニングの大半を終了し，その結果，１種の遺伝子から，alternative splicingより３種のmRNA, 蛋白質が作られていくことが明らかになった。この発現調節機構を明らかにすることが，今後の課題である。

キンドリングは扁桃体や海馬に連日，少数の弱い電気刺激を加えることにより，永続的なけいれん誘発可能状態を起こすことで，てんかんモデル，可塑性モデルとして多くの研究がされているが，断片的で統一的見解が得られていない。そこで海馬への重要な入力である内側中隔を慢性刺激することによりキンドリングを作成し，海馬で特異的に変化する蛋白質，mRNAの分析を行なった。

アルゼンチン国立コルドバ大学助教授G. A. Roth博士は日本学術振興会外国人招へい研究者として６ケ月間滞在し，実験的アレルギー性脳脊髄炎の研究に本部門の免疫組織学的，免疫化学的技術を導入して，新たな知見を得た。

脳の発生に関連する蛋白質ドレブリンの遺伝子構造及びその発現機構

白尾智明，児島伸彦，寺田庄一，小幡邦彦

ニワトリ脳の発生段階に応じて特徴的な発現，消失パターンを持つ酸性蛋白質ドレブリンは，２種類の幼若型(E1及びE2)と１種類の成熟型(A)に分類される。我々は，既に幼若型２種類のcDNAをクローニングすることによって，それらの構造を決定した。今回我々はふ化後１日のニワトリ大脳よりラムダgt10ベクターを用いてcDNAライブラリーを作製し，それよりドレブリンAのcDNAをクローニングすることに成功した。そこでその塩基配列を決定し，各ドレブリンの蛋白構造を推定したところドレブリンE1, E2, Aは非常によく似た構造を持っていること

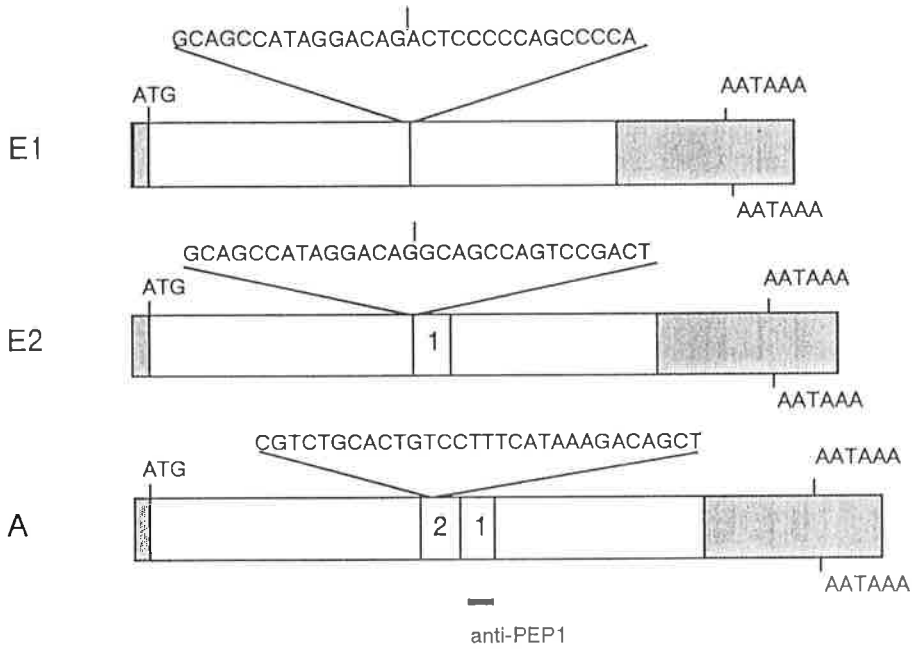


Fig. 1. Schematic representation of drebrin E1, E2 and A mRNAs. Each mRNA structure was predicted from drebrin cDNA clones. open rectangle : coding region. shaded rectangle : non－coding region. 1 : ins 1 sequence. 2 : ins 2 sequence. Oligonucleotide sequences are isoform specific probes used in situ hybridization. The sequences which encode the epitopes of MAb M2F6 and anti－pep1 antiserum are underlined.

が判った。すなわちドレブリン E2 には E1 のほぼ中央に129アミノ酸の挿入配列があり，A にはその直前にまたさらに別の挿入配列があった。その他の部分配列は完全に一致していた (Fig. 1)。次にニワトリの遺伝子をサザンブロットにより解析したところ，ドレブリンの遺伝子は 1 種類であることが判った。そこでドレブリン遺伝子のクローニングを行った。単離した数種のクローンを制限酵素切断して制限酵素地図を作成すると単離したクローンはすべて同種のもので，しかもニワトリ遺伝子のサザンブロットの結果と一致した。次にこの遺伝子の塩基配列を部分決定し，前述の挿入配列に対応する塩基配列は各々独立したエクソンとなっていることが判った (Fig. 2)。以上の結果よりドレブリンの 3 型は 1 つの遺伝子より alternative RNA splicing の機構により生じることが判った。

我々は以上の結果を用いてドレブリン E2 および A とは反応するがドレブリン E1 とは反応しない抗体 (anit－PEP1) を作製することに成功した。また同時に各ドレブリンアイソフォームの mRNA と特異的に結合するオリゴヌクレオチドを合成した。これらのプローブをもちいて immunohistochemistry および in situ hybridization を行い，以下のことを明らかにした。ドレブリン E1, E2, A は分裂期の細胞には発現されない。最終分裂を終えた神経細胞にはドレブリン E1 および

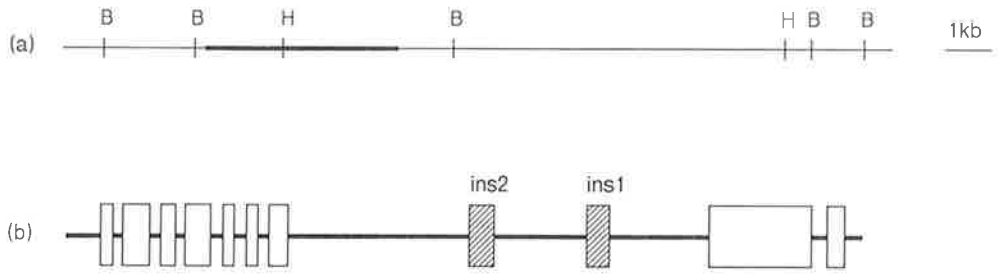


Fig. 2. Partial restriction map and partial structural organization or the drebrin gene. (a) Genomic clones for a drebrin gene ware obtained by screening a lambda EMBL3 chicken genomic DNA library with cDNA clone gDcw17. The relative position of restriction endonuclease sites of BamHI ald HindIII were consistent with the result of genomic southern blot analysis shown in Fig2. (b) Restriction fragment (thick line in (a)) of a genomic clone whichi covered the region of drebrin insertion sequences, insl and ins2, were sequenced. Exons are indicated by rectangles. Shaded rectangle shows the exons for ins I and ins2.

E2 が発現されているが，細胞内に蛋白として存在しているものの多くはドレブリン E1 である。ドレブリン E1 は細胞移動を終了した神経細胞ではもはや作られなくなる。このとき細胞内のドレブリンは E2 がその主なものとなるが，それと同時に神経細胞内でのドレブリンの局在も変化し，細胞体でのドレブリン蛋白は消失し突起に集積するようになる。成熟神経細胞ではドレブリン A が樹状突起シナプス後部に特徴的に認められるようになる。

我々は現在，上述のようなドレブリン蛋白の性質が鳥類に特異的なものなのかそれとも哺乳類にも当てはまるのかを明らかにするために，ラットにおけるドレブリンの分析を進めている。

キンドリンによって特異的に発現量の増加する分子の cDNA クローニング

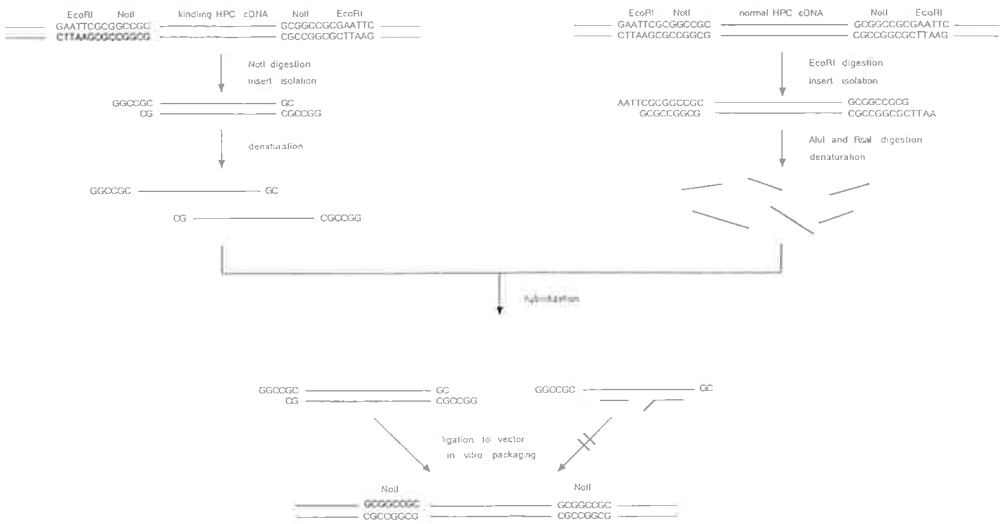
児島伸彦，橋本隆紀，小幡邦彦

神経回路網の可塑的変化が記憶，学習といった脳の高次機能の発現を可能にしていると考えられるようになって久しいが，その物質的基盤についての知見は乏しい。そこで我々はキンドリング現象を可塑性のモデルとして，それと並行して長期持続的に増加する分子の検索を試みた。

6 から 7 週の Wister ラットの内側中隔に慢性電極を埋め込み，60Hz の刺激を afterdischarge を引き起こすいき値の強度 (300 から 500 μA) で 1 秒間与えた。このキンドリング刺激を連日与えることによって，ラットは平均20日でキンドリング状態となった。キンドリングを形成したラットは最終刺激日から一週間から一ヶ月後に以下の実験に供した。

初めに，キンドリングを形成したラットの海馬及び大脳皮質の構成タンパク質を 2 次元電気泳

動法により分離して無刺激のそれと比較したが，両者に顕著な差異は認められなかった。次に，キンドリングラットの海馬で増加する mRNA に対応する cDNA クローンを取るために，キンドリングとコントロールのラット海馬全 cDNA をプローブとした differential hybridization により，キンドリングを形成したラット海馬の cDNA ライブラリーをスクリーニングしたが，そのようなクローンは得られなかった。以上の結果はキンドリングを形成した脳内で著明なタンパク構成上の変化がないことを示しているが，これらの方法の検出感度は限られたものであり，微量分子の変化を見逃している可能性もあるので，より効率よくそのようなクローンをとる方法として，図のような方法で cDNA のサブトラクションを試みた。その結果，作製したキンドリング特異的 cDNA クローンを多く含むライブラリーから，キンドリングの海馬 cDNA と反応し，無刺激のラット海馬 cDNA とは反応しない cDNA クローンが 5 種類得られた。



キンドリング特異的 cDNA ライブラリーの作成方法

キンドリングを形成したラット及び正常ラットの海馬 cDNA ライブラリーから異なる制限酵素，NotI と EcoRI により，それぞれの全 cDNA をベクターから切り出した。正常ラットの cDNA をさらに RsaI と AluI により断片化し，両者を 1 ：50の比で混ぜ，変性後再びハイブリッド形成させた。正常ラットの cDNA と共通配列を持つキンドリングラット cDNA は右のようなハイブリッド分子を形成し，一方共通配列を持たないキンドリングラット cDNA は再びその相補鎖どうしで左のようなハイブリッド分子を形成する。これを NotI で切断したベクターと連結した。キンドリング cDNA どうしでハイブリッド形成した分子の末端は NotI 切断端となっているのでベクターと連結するが，正常ラットの cDNA とハイブリッド形成したものは連結されない。したがってこの段階で，正常ラットの cDNA と共通配列を持つキンドリングラットの cDNA がサブトラクトされる。

現在これらのcDNAの構造とその発現様式について解析中であるが，これらのcDNAをプローブとしたラットの脳切片のin situ hybridizationによって，そのうちの少なくとも一つは確かにキンドリングの脳，特に海馬CA3の錐体細胞で増加していることが確認された。これまで決定したこれらのcDNAの部分配列をDNAのデータベースによりホモロジー検索したが，既知の分子との一致はみられなかった。

ラット網膜の再凝集培養内に見られる網膜様組織について

赤川公朗

新生児ラット網膜をdissociateした後，ラット血清を含むMEM培養液の中で旋回培養を行なうと，直径約300－500uの球形の再凝集塊を得ることが出来る。これを1週間以上培養すると，細胞塊の中には特徴的な層構造が認められる。この再構築された構造を細胞種特異的モノクローン抗体で免疫組織化学的に調べてみると，各細胞種が規則的に配列されていて，生体の網膜に類似していることを既に報告している。この再凝集培養にみられる網膜様組織構築に於いては，生体の網膜と同様に光応答をする細胞があるのではないかと予想されていた。そこで再凝集培養細胞塊の最外側の細胞群—大部分はアマクリン細胞と思われる—にパッチクランプ法を適用して電気的活動を記録した。およそ1/4の細胞は自発性活動電位を発射していた。この内，１％位の細胞では再凝集塊に光照射をするとその頻度が上昇するものがあった。このことは最内側にある光受容細胞と外側のアマクリン細胞との間に機能的な神経連絡が出来ていること示唆した。また，この結果はsingle cell suspensionにまで分離された網膜の細胞群が，自発的に機能的な神経連絡を形成することを示しており，神経回路形成のモデルとして有用と思われる。

アマクリン細胞特異蛋白 ーHPC－1ー の解析

井上明宏，赤川公朗

網膜のアマクリン細胞及び海馬に多量に存在する蛋白質抗原としてHPC－1がある。この抗原の性状を明らかにする目的で以下の実験を行なった。海馬より調整したmRNAよりcDNAを合成しλ gtllライブラリーを作製した。このライブラリーをHPC－1に対するモノクローン抗体を用いて検索し，５種の独立した陽性クローンを得た。これらは全て同一の制限酵素地図を示し，互にハイブリダイズした。現在その内，最も長いcDNAインサートの配列を解析し，HPC－1抗原の同定とその全構造の解析を行なっている。

実験的アレルギー性脳脊髄炎ラットの免疫化学的研究

German A. Roth, 小幡邦彦

ラットの2系統すなわちウイスター(W)とルイス(L)にモルモット・ミエリン，ウシ・ミエリン，ウサギ・ミエリン塩基性蛋白質を投与した。Lラットではほぼ全例が発症（後肢麻痺，尿失禁，体重増加停止）したが，Wラットでは抗原性の高い高濃度のモルモット・ミエリンでのみ発症した。血中にはミエリン塩基性蛋白質(14及び18.5kD)とミエリン関連糖蛋白質に対する抗体が出現するが，Lラットでは軽度であり，Wラットでは高度（Lラットの10倍前後）であった。一方，脳組織の変化はL・ラットで著明であった。すなわちLラットではミエリンのマーカーであるCNPase活性が低下し，細胞浸潤等の病理的変化がみられた。

本研究では感受性の異なるラット2系統を比較解析することにより，実験的アレルギー性脳脊髄炎の発症における血液脳関門の役割が示唆された。

超微小形態生理研究部門

概要

超微小形態生理研究部門は，生体における特徴的な秩序構造とそれに伴う特異的な機能を分子・原子・電子レベルで検討し生体分子の超微小構造がいかにマクロな細胞レベルの生理機能に反映するかを検討することを目的としている。この為に，臓器灌流法と核磁気共鳴法により，物質輸送，エネルギー代謝，及び細胞内の分子，イオンの運動の3テーマの研究をすすめている。

物質輸送グループは摘出灌流臓器のイオン出納の経時的定量法をより正確な手法とし，ラット唾液線における $Na^+/K^+/2Cl^-$ 共輸送系，Na^+/K^+/ATPase によるイオン流を定量し，分泌における両者の寄与を明らかにした。さらに Rb イオンを加えたリンゲル液を用いて，アセチルコリンによる一方向の流れに対する影響を Rb－NMR により観測した。また，^{23}Na MRI 法を用い，腎における尿 Na 濃縮能解析の基礎実験をすすめた。分子運動グループは二量子フィルター NMR 法を用いて，細胞内 Na 及び K を NMR で測定することに成功し，細胞内 K の磁気緩和速度を明らかにした。ラット摘出灌流臓器での細胞内燐化合物の縦緩和時間を短時間に測定できる手法を確立したが，とくにランゲンドルフ灌流心での ATP における β 位の燐原子の縦緩和時間が2つあることを見出だした。エネルギー代謝グループは，ラット摘出灌流心臓標本の NMR 測定を行い，虚血後の高濃度 K イオンの灌流がクレアチン燐酸や ATP 動態に及ぼす影響を検討した。

マンチェスター大学の Dr. Martin C. Steward が平成元年3月より6月まで文部省外国人研究員として滞在した。村上政隆は第28回日本放射線医学会生物部会（神戸）において『In vivo multinuclear MRS』について特別講演を行なった。亘　弘は第17回国際生理学大会と第8回国際磁気共鳴医学会に，瀬尾芳輝は第8回国際磁気共鳴医学会に出席した。平成元年3月に九鬼覚助手が大阪労災病院に，また前田宗宏助手が奈良県立医大に転出した。大阪大学医学部研究生の平石泰三は平成元年3月より10月まで助手として在籍した。

Na^+/K^+ ATPase, Na^+/K^+ $2Cl^-$ symport による唾液腺 K^+ 輸送

村上政隆，亘　　弘（生理研・分子生理）
宮本信一*，今井雄介*（阪医大・生理*）

唾液腺は acetylcholine 刺激により大量の水分泌を起こす。水分分泌は電解質の輸送に伴う浸透流と考えられており，分泌中この電解質輸送を維持するために，Na^+/K^+ ATPase が ATP を消費し，Na^+，K^+，Cl^- の駆動力をまかなっていると想像される。我々は Na^+/K^+ ATPase

の輸送効率を報告したが，今年度は Na^+/K^+ ATPase の stoichiometry について詳細に検討し，さらに持続分泌中のK輸送量と Na^+/K^+ ATPase の K 取り込み量から $Na^+/K^+/2Cl^-$ symport による K^+ 取り込み量を求めた。

Wistar 系雄性ラットの顎下腺を modified Krebs solution で血管灌流した (2ml/min, 25°C)。静脈側，唾液側への正味のK輸送量は流出液，唾液のイオン分析（炎光光度法，イオン電極法），酸素消費は動静脈においた Clark 型電極にて測定した。

acetylcholine 1 μM 刺激で唾液分泌が誘発され，静脈側に一過性のK放出があった。分泌中は血管側より取り込まれ，同量が唾液中に分泌された。酸素消費は静止時12.9±1.2から分泌時 62.4 ± 4.2 μl/g・min へ増加した。ouabain を overload することにより分泌は用量依存性に減少し，静脈側へ一過性の K 放出が観測された。ouabain と acetylcholine を洗い流すと，正味 K 取り込みと酸素消費増加が同時に起こった。ouabain の用量依存性を示した。

酸素消費 1mol につき ATP 6mol 消費されるとして，回復期間中のK取り込み速度と酸素消費速度を比較すると，回復後期に直線上（傾き1.8）にのった。この stoichiometry から分泌中 20 μmol/g・min で K が Na^+/K^+ ATPase により取り込まれると推定された。

一方 ouabain overload 時の一過性K放出過程を，double exponential で解析した結果，分泌時の K^+ 輸送量は 30 μmol/g・min で取り込みと放出がバランスしていることが明らかになった。酸素消費から推定した。Na^+/K^+ ATPase による 20 μmol/g・min の取り込みの外に 10 μmol/g・min の K^+ 取り込み過程の存在が示された。これは Na/K/2Cl symport による K^+ 取り込みと推定できる。さらに duct の寄与，Na^+/H^+ antiport の存在を仮定すると，分泌時 acinus での Na 取り込みは Na/K/Cl 系で 8－10 μmol/g・min, Na/H 系で 14－17.5 μmol/g・min の寄与で行われることも示唆された。

ラット唾液腺におけるＲｂイオンの膜透過

Martin C. Steward（マンチェスター大学・生理）
瀬尾　芳輝，村上　政隆，亘　　弘（生理研・分子生理）

Rb イオンは生体中にはほとんど存在しないが，K イオンの代替として外部より加え，一方向のK イオンのフラックスを解析するために用いられてきた。K イオンを Rb イオンで置換したリンゲル液によって灌流したラット摘出灌流唾液腺の ^{87}Rb－NMR スペクトルを観測すると，狭い吸収巾（約 140Hz ）の共鳴線と広い吸収巾（約 650Hz ）の共鳴線よりなる事が見出だされた。これらのスペクトルは，それぞれ細胞外と細胞内の Rb イオンによる信号に対応している。灌流液を通常のリンゲル液から Rb イオンで置換したリンゲル液に置換えると，信号強度は二段階で増加する。細胞外の Rb イオンによる信号は約 $0.3min^{-1}$ の速度定数で平衡に近付くが，細胞内

のイオンによる信号は，もっとゆるやかに増加する。この経過は，アセチルコリンの投与によって促進される。灌流液をRbイオンで置換したリンゲル液を通常のリンゲル液に戻すと，細胞外のRbイオンは急速に消えていく。後にのこった細胞内のRbイオンによる広い吸収幅の信号は指数関数に従って減少し，0.02min^{-1}の速度定数であった。アセチルコリンの投与による刺激によって速度定数は0.034min^{-1}にまで増加する。Rbイオンの流出は，K－チャネルの阻害剤であるBaイオン(5mM)やキニジン(1mM)によって抑制される事も認められた。K－チャネルのコンダクタンスがアセチルコリンによる分泌刺激により制御されていることが明らかになった。

Na－MRIによる腎臓の尿濃縮能の評価に関する基礎的検討

前田　宗宏，瀬尾　芳輝，村上　政隆，亘　　宏（生理研・分子生理）

^{23}Na MRIでの腎臓の濃縮能を評価する可能性を検討するため，モルモット(Hartley, ♀，300－600g)を用いて，脱水と水負荷の状態で腎臓のNa－MRIと尿中Na濃度の測定を行ない，腎臓のNa－MRIと尿中のNa濃度を比較した。脱水状態にするために24－48時間絶食させ，また水を負荷するには体重の3％量のグルコース溶液を経口的に投与した。使用MR装置は日立製(2.11T)，観測周波数は23.81MHzである。100mm径のプローブ内にモルモットを固定し，信号強度のリファレンスとして100mMのNaCl溶液をいれた容器を置いて撮像した。撮像条件は，繰り返し時間150msec，エコー時間9msecのグレディエント・エコー法で，スライス厚5mm，フィールド・サイズ150mm，測定マトリックス64×64，加算回数256である。尿は尿道カテーテルにより集め，尿中Na濃度の測定には炎光光度法を用いた。

脱水時の腎髄質は，皮質に比べて著名な高輝度を呈した。水負荷により髄質の信号強度は低下し，皮質と等じ信号強度となった。また，尿中のNa濃度は，脱水時に高く，水負荷状態では低かった。腎髄質のNa信号強度と尿中Na濃度の間には正の相関関係が認められた。このように髄質の信号強度と尿濃縮の指標となる尿中Na濃度との間に相関がみられ，Na MRIを用いた腎臓の濃縮の診断の可能性が示唆された。

二量子フィルターを用いた細胞内Kの測定

瀬尾　芳輝，村上　政隆，亘　　弘（生理研・分子生理）
永山　国昭（日本電子・生体計測）

Kイオンは細胞内液中に最も高濃度に存在する陽イオンであり，細胞の興奮・運動・吸収・分

泌などの基本機能にとり重要な役目を果たす。我々は，^{39}K－NMR 法により細胞内Kイオンの緩和時間は短く，四重極緩和機構が効率よく働いている事を報告してきた。今年度は，二量子フィルターを用い細胞内 ^{39}K の緩和速度を求めたので報告する。

ウィスター系ラット (180～350g) をペントバルビタール麻酔下に手術し，顎下腺（約 0.2g ）を摘出し，定流灌流した。^{39}K－NMR はブルカー WM－360 分光器 (8.45T) と ^{39}K 専用プローブ (16.8MHz) を用い，スピン・エコー二量子フィルター (D－90°－ τ /2－180°－ τ /2－90°－ δ －90° acquire) にて測定した。

On resonance の条件で得られる時間領域の信号強度M（ τ ， δ ， t）は

$$M(\tau, \delta, t)=0.75(e^{-s2\tau}-e^{-s1\tau})\cdot e^{-sdq\sigma}\cdot(e^{-s2t}-e^{-s1t})$$

で表わされる（ t は最後の 90° パルス後の時間)。S_1, S_2 は各々，｜3/2＞＜1/2｜，｜－1/2＞＜3/2｜コヒーレンス，及び｜1/2＞＜－1/2｜コヒーレンスの横緩和速度であり，$\omega\tau_c \geqq 1$ の領域の核のみ二量子フィルターを通過することができる。（ω は観測周波数，τ_c は分子相関時間)。

灌流唾液腺の二量子 ^{39}K－NMR スペクトルでは S/N が低いために，｜1/2＞＜－1/2｜コヒーレンスの信号のみが明らかである。この腺を低酸素灌流 (20%O_2/80%N_2) し，細胞内 K 濃度を低下させると信号はほとんど検出できなくなる。

灌流唾液腺の細胞内Kの S_1, S_2 緩和速度は各々 $S_1=2800\text{sec}^{-1}$, $S_2=400\text{sec}^{-1}$(n＝3) であった。細胞内 K, Na イオンの NMR スペクトルとして，パウダーパターンスペクトルが示唆されてきたが，本実験の結果，細胞内 K のスペクトルは２つのローレンツ曲線の重畳したもの (homogeneous biexponential spectra) であることが明らかになった。このスペクトルは $\omega_Q^{-1} > \tau_c \geqq \omega^{-1}$ の条件下で得られることが知られている，（ω_Q：時間平均四極子結合定数)。細胞内のKが均一な状態にあるとして，τ_C， ω_Q を S_1, S_2 より求めると各々 $2.5\cdot10^{-8}\text{sec}^{-1}$ と 1.4MHz となった。ω_Q の値は，$KClO_3$ の 1.06MHz, バリノマイシン等のイオノフォアと結合したKの 1.1～2.6MHz と同程度の大きさである。$\omega\tau_C \geqq 1$ の核と $\omega\tau_C \geqq 1$ の核との速い交換が行われているモデル (rapid－exchange model) の場合には，真の ω_Q は１桁大きい値を持つことになる。しかし今回の実験結果からは積極的に rapid－exchange model を否定することはできず，さらに，細胞内Kの緩和定数の温度依存性・測定周波数依存性の解析が必要である。

ラット心における ATP の compartmentation : ^{31}P NMR による縦緩和時間の研究

鈴木英司（岐阜大医，三内）
瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘（生理研・分子生理）

ラット・ランゲンドルフ灌流心で細胞内燐化合物の縦緩和時間を DESPOT(Driven equilibrium single pulse obsevations of T_1 relaxation) 法により，測定した。クレアチン燐酸では緩和は一成

分（２秒）であったが，ATPの三つの燐酸とも二つの緩和成分を示し，β位の燐原子の縦緩和時間は0.4と14secで，後者の成分は約30％であることを見出だした。一方ラット赤血球中のATPの三つの燐酸は単一の緩和時間（β位のATPのT_1＝1秒）を示した。この結果，心筋中では少なくとも２つのATPプールがあることが明らかになった。恐らくミトコンドリアと細胞質に存在するATPを分離して検出できたのではないかと考えている

生体分子の相関時間と磁気共鳴における変調周波数との関係

亘　　弘，村上政隆，瀬尾芳輝（生理研・分子生理）

CW－方式の磁気共鳴の測定では磁場変調を行なって検出感度の向上を行なっている。磁場変調を加えたブロッホの方程式を解いて，分子の緩和時間と変調周波数との関係を求めた。この結果は，磁場変調周波数を変化させ測定すると，分子の緩和時間を算出することが可能となる事を示している。

^{31}P NMRによりみたstunned myocardiumに対する高K酸素化再灌流の検討

平石泰三，亘　　弘（生理研・分子生理）

ラット灌流心を用いてstunned myocardiumを想定した20分のanoxiaに引き続く再酸素化において，高K^+及び2,3－butanedione monoxime (BDM)による心停止下再酸素化を加え，心機能への影響とその間の心筋高エネルギーリン酸化合物の変動を検討した。高K^+及びBDMによる心停止下再酸素化群ではコントロール群に比し，心拍数と血圧との積からみた心機能は良好な回復を示した。また，クレアチン燐酸のover shoot現象の早期消退を認めた。これらの結果より考えられるのは，心停止再酸素化による心筋保護効果は筋小胞体からのCa放出の除去よりも，機械的ストレスの抑制が関与しているものと考えられた。

細胞内代謝研究部門

概要

各種神経・内分泌調節ペプチドおよびその関連ペプチド，並びに機能性タンパク質の各種部分ペプチドの化学合成をおこない，合成ペプチドを免疫抗原として特異抗血清を作製し，これら合成ペプチド及び特異抗血清を用いて，神経・内分泌調節ペプチドの組織内分布・局剤・生合成過程・生物活性ならびに機能性タンパク質の構造と機能について生理学的，生化学的および免疫化学的アプローチにより研究している。中枢神経および末梢神経に広く存在する神経ペプチド，ガラニンについて，その誘導体およびフラグメントを合成し，腸管運動に及ぼす影響を検討した。

ガラニンの構造－活性相関

桑原厚和

ガラニンはブタ上部小腸から単離された29個のアミノ酸残基からなるペプチドである。免疫組織化学により，ガラニンは腸管の壁内神経叢に存在する神経ペプチドであることが明かにされた。しかしながら，ガラニンは化学的検索法により単離・精製されたペプチドであるため，その生理作用については不明な点が多い。昨年度は，ガラニンの消化管運動に及ぼす影響についてモルモット摘出腸管を用いて検討した。その結果，ガラニンは壁内神経叢で非コリン－作動性神経の活動を抑制性に調節して，輪走筋の収縮を制御していることを明らかにした。

本年度は，さらにガラニンの輪走筋への抑制機序を分子レベルで明らかにするための一段階として，各種のガラニン誘導体を合成し，その構造－活性相関についてモルモット回腸を用いて検討した。

モルモットを放血屠殺後，回腸を摘出し，Ｌ型の筋条片を作製し縦走筋および輪走筋の収縮活動を等張性に同時記録した。経壁電気刺激により，縦走筋および輪走筋からは律動性収縮が発生した。神経刺激により誘発された輪走筋収縮に対して，galanin (1－29), galanin (2－29) および galanin (1－15) は用量依存性にその収縮を抑制した (Table I)。一方，galanin (3－29), galanin (10－29), galanin (21－29), [Phe2]galanin および [Tyr2] galanin は神経刺激により誘発される輪走筋収縮を抑制しなかった (Table II)。また，上述の galanin およびその誘導体は神経刺激により誘発される縦走筋収縮に対して，何等影響を与えなかった。以上の結果は，(1) galanin 分子にとってＮ端の２個のアミノ酸が神経刺激により誘発される輪走筋収縮の抑制に必須であること，および (2) galanin の抑制効果を完全に発現させるためにはＣ端部の構造も必要であることが明かとなった。

TABLE I

ED_{50} of galanin and galanin fragments on the guinea—pig ileal circular muscle

Values are mean ± SEM of 7 animals.

Responses were compared to galanin (1—29) response.

* $p<0.05$

TABLE I

ED_{50} of galanin and galanin fragments on the guinea-pig ileal circular muscle

	1-29	1-15	2-29
% inhibition induced by 5×10^{-7}M	14.0±5.1	48.5±9.3	27.3±8.9
$ED_{50}\times10^{-8}$M	3.1±0.2	65±5*	32±3*

Values are mean ± SEM of 7 animals. Responses were compared to galanin (1-29) response.

* $p< 0.05$.

TABLE II

Summary of the effect of various galanin fragments and analogues on neurally—evoked circular muscle contractions in the guinea—pig ileum

Galanin fragments		Analogues	
1-29	+	(D-Trp^2) Galanin	—
2-29	+		
3-29	—	(Tyr^2) Galanin	—
1-15	+		
10-29	—		
21-29	—	(Phe^2) Galanin	—

細胞器官研究系

生体膜研究部門

概要

生体膜研究部門では各種の細胞の細胞膜におけるイオンチャネルおよびリセプターの発現とその探索，および細胞内外の諸条件による機能発現の機序を明らかにすることを目標に研究を進めてきた。

イカ巨大神経を用いる研究では1989年12月～1990年４月の期間に，山岸，久木田，古家，筒井，そして，共同研究グループでは美宅（東京農工大），平野（杏林大医）が伊根実験室でイオンチャネルおよびシナプスを対象に機能解析および形態学的研究を進めた。

ラット海馬のシナプス伝達の諸問題について，杉山，岡田，山本らが研究を進めた。

マウスの培養乳腺上皮細胞については，古家，榎本（島根医大）が，自発性ないし機械刺激で起る細胞内 Ca 振動について解析を進めた。

以上に加え，森元（尚絅短大），東田（金沢大），橋本（東京医歯大），永田（保健衛生大）の各氏との共同研究を進めた。

神経細胞内 Ca^{2+} および Mg^{2+} レベルによる興奮の制御

山岸俊一，古家喜四夫

神経細胞をはじめ殆どの細胞内には微量の Ca^{2+}，Mg^{2+} が含まれており，細胞自身の生存と活動にとって，これら２価イオンの存在は不可欠である。　この Ca^{2+} と Mg^{2+} の神経膜興奮に関わる作用はいくつかの点で質的に異っている。　例えば細胞外 Ca^{2+} の存在により，はじめて膜興奮が維持できるが，Mg^{2+} では興奮を維持することはできない。　また細胞内 Ca^{2+} 濃度は 10^{-8}～10^{-7}M であるが Mg^{2+} 濃度は $2～4\times10^{-3}$M である。

本報告では，ヤリイカ *Doryteutis* 巨大神経標本について細胞膜興奮を制御する Ca^{2+} および Mg^{2+} の各濃度条件における生理作用の比較検討を行った。標準溶液として外液に人工海水 (ASW : NaCl 500, KCl 5, $Cacl_2$ 50, Tris－HEPES PH8.0), 細胞内に 100mMK Cl または K－glutamate 溶液を用い，必要に応じて，外液に TTX, 内液に TEA および２価イオンを加えた。

実験結果として，次のようなことが明らかとなった。

(1)　Na 電流 (I_{Na}) に対する効果

細胞内液を 100mM K－glut＋10mM TEA. cl としてコントロールの I_{Na} を計測し，これに 0.01

表　細胞内 Ca イオンおよび Mg イオン添加時の I_{Na} 抑制，I_K 抑制の時間経過と K_D 値の比較

Out: ASW In: 100mM K-glut	I_{Na} suppression		I_K suppression	
	τ (min)	K_D (mM)	τ (min)	K_D (mM)
Ca addition	2.0	2.3	0.5	5.8
Mg addition	1.8	7.0	0.5	10.2

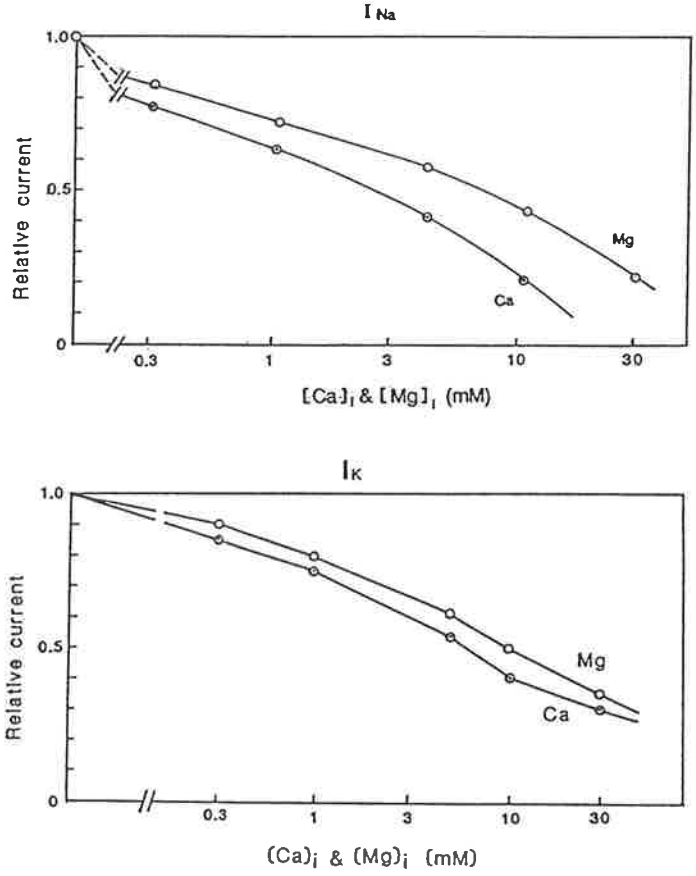


図　細胞内 Ca および Mg イオン添加による I_{Na} と I_K 抑制の濃度依存性。

～30mM の Ca^{2+} または Mg^{2+} を加えて I_{Na} に対する効果をしらべた。両イオンで共に濃度に応じて，I_{Na} の抑制がおこり，2価イオンを流し去れば，I_{Na} 値は回復した。完全に可逆的回復ではない。Ⅰ－Ⅴ曲線の低電位側（過分極側）への移動，I_{Na} ピーク値までの時間，ピーク値からの立下り時間曲線，いずれも低電位側への移動が見られた。移動の最大値は Ca^{2+}，Mg^{2+} ともに 4mM 投与時に最大で各々 7mV と 11.5mV であった。Ⅰ－Ⅴ曲線の移動は Na チャネル内側近傍のネガティブチャージ中和効果と見なされる。I_{Na} カイネティクスは変化しておらず，単純抑制の形である。

(2) K電流（I_K）に対する効果

細胞外液は ASW＋1 μMTTX, 細胞内液は 100mMK－glut の条件でコントロールの I_K 計測を行い，これに細胞内液中に 0.01～30mM の範囲で Ca^{2+} または Mg^{2+} を加えたときの効果は，やはり濃度増加に応じた I_K の抑制，I_K 立上り時間。低電位側へのシフトであった。I_K カイネティクスは変化して居らず，Ca^{2+} と Mg^{2+} の効果の違いは Ca^{2+} が Mg^{2+} の約2倍の抑制効果を持つことであった。I_K 抑制効果を I_{Na} 抑制効果と比較すると，Ca^{2+}，Mg^{2+} ともに，I_K に対する抑制時間の時定数は0.5分で I_{Na} 抑制の約1/4の時間（表　参照）であるが，抑制高そのものは I_{Na} 抑制よりも少く，約2/3であった。

(3) Ca^{2+} 効果と Mg^{2+} 効果の比較

イカ神経膜の殆どの膜電流を形勢している I_{Na}, I_K に対する細胞内 Ca^{2+} および Mg^{2+} の電流抑制効果の特性およびⅠ－Ⅴ曲線の低電位側へのシフトという基本的作用は殆ど同じであった。両者の違いは表　，と図　に示すように，I_{Na}, I_K 抑制に対する濃度効果の違いであり，Ca^{2+} と Mg^{2+} の濃度効果の比は I_{Na} に対する抑制 (KD) が3倍，I_K に対する抑制が約1.8倍である。

この効果の比は細胞質の Mg^{2+} 濃度が 2～4mM で Ca^{2+} の25倍高い値であることを考えると3倍程度の効果比ではまだ小さいと思われる。見方を変えれば，現実に細胞内で I_{Na}, I_K の大きさを制御しているのは細胞内 Mg^{2+} である可能性が考えられる。

ラット海馬シナプス伝達の長期増強に対するホスホリパーゼ阻害剤の効果

岡田大助*，杉山博之
（*現所属　理化学研究所，国際フロンティア，思考ネットワーク）

シナプス伝達の長期増強 (Long－term Potentiation : LTP) は記憶，学習との関連で注目され，特に海馬の LTP は最近精力的に研究が勧められている。海馬の3つの主要なシナプスのうち，苔状線維と CA3 錐体細胞の間のシナプス（CA3 シナプスと略す）の LTP については関与する伝達物質受容体を含め細胞内機構はよくわかっていないが，Schaffer 側枝及び交連線維と CA1 錐体細胞の間のシナプス（CA1 シナプスと略す）の LTP は，NMDA 型グルタミン酸受容体か

らのシナプス後細胞への Ca^{2+} の流入に始まり，シナプス前後両細胞が関与するとされる。これを説明するための細胞間メッセンジャーの存在が提唱され，アラキドン酸カスケードの中間体がその候補と考えられている。これはCA1シナプスのLTPがアラキドン酸カスケード中のホスホリパーゼ A_2 の阻害剤 (NDGS : nordihydroguaiaretic acid) で抑制されるからである。一方，我々はCA3シナプスのLTPのメカニズムを追求しているが，先にこのLTPが百日咳毒素感受性Gタンパク質を介して起こっていることを示した。このGタンパク質のエフェクター分子は不明であるが，ホスホリパーゼC（イノシトールりん脂質代謝）やホスホリパーゼ A_2（アラキドン酸カスケード）等はその候補である。特に後者はCA1シナプスのLTPに関与する可能性があるため，CA3シナプスのLTPの研究にとっても興味深い。そこでCA3シナプスのLTPに対するホスホリパーゼ A_2 の阻害剤の効果をNDGAとBPB (bromophenacyl bromide) を用いて調べた。

ラット海馬の400 μm厚のスライスを作成し，Schaffer側枝及び交連線維 (CA1) または顆粒細胞層 (CA3) を刺激し，各々CA1またはCA3の錐体細胞のdendrite域から集合興奮性シナプス後電位 (pEPSP) を記録した。LTPは頻回刺激 (100Hz, 1 s) によって起こし，頻回刺激前と30分後のpEPSPの大きさと初期勾配の増加で定量化した。NDGA (100 μM) またはBPB (10－25 μM) 存在下で (bath application, 10－20min) 頻回刺激がLTPを起こすかどうかを調べた。その結果，両阻害剤ともにCA1シナプスのLTPを抑制したが，CA3シナプスのLTPには効果がなかった。BPBはPI－PLC (phosphatidylinositol specific－phospholipase C) も阻害するという報告があるが，CA1シナプスのLTPに対するBPBの効果はPI－PLC活性を介したものではないことをスライスのホモジネート中のこの酵素の活性を測定して確かめた。これらのことから，CA1シナプスとCA3シナプスとではLTPの機構が異なりCA1シナプスではホスホリパーゼ A_2 が関与しているらしいが，CA3シナプスでは関与していないらしいことが示唆された。

発表 : Neurosci. Lett., 100 (1989) 141－146.

ラット海馬におけるグルタミン酸受容体サブタイプの分布
——単離細胞による分析——

山本幸子，杉山博之

グルタミン酸受容体にはイオンチャネル型とGタンパク質共役型の二つの大きなカテゴリーのものが知られており，さらにイオンチャネル型のものには少なくとも三つのサブタイプの受容体が知られている。これら各種サブタイプ受容体は高等動物中枢神経系のいろいろなシンプスにおいて，重要な働きをしている。例えば海馬においては，NMDA型の受容体がCA1領域の長期増強に決定的な役割を果たしていることがよく知られている。これら受容体サブタイプの海馬における分布は，スライスを用いた電気生理学的測定や，放射標識リガンド結合のオートラジオグラ

フィー等によって調べられている。ただ，スライスそのものを用いた測定ではシナプス伝達を介した二次的，三次的影響を考慮しなければならないし，オートラジオグラフィーの結果については放射標識リガンドの結合部位が受容体だけを表しているかどうか，あいまいさが残る。これらの難点を補う一つの方法として，海馬の各領域から神経細胞を単離し，その受容体応答を測定することを試みた。

細胞試料は次のようにして調製した。ラット海馬の新鮮スライスを作成し，これからCA1, CA3, および歯状回領域を切り出す。これらを酵素 (protease または trypsin) 処理した後，ピペットでていねいにほぐす。あらかじめ Con A でコートしたカバーグラスに細胞上澄をのせ室温に静置し，神経細胞を接着させる。受容体応答は fura－2 蛍光法によって細胞内カルシウム応答をモニターすることで測定した。

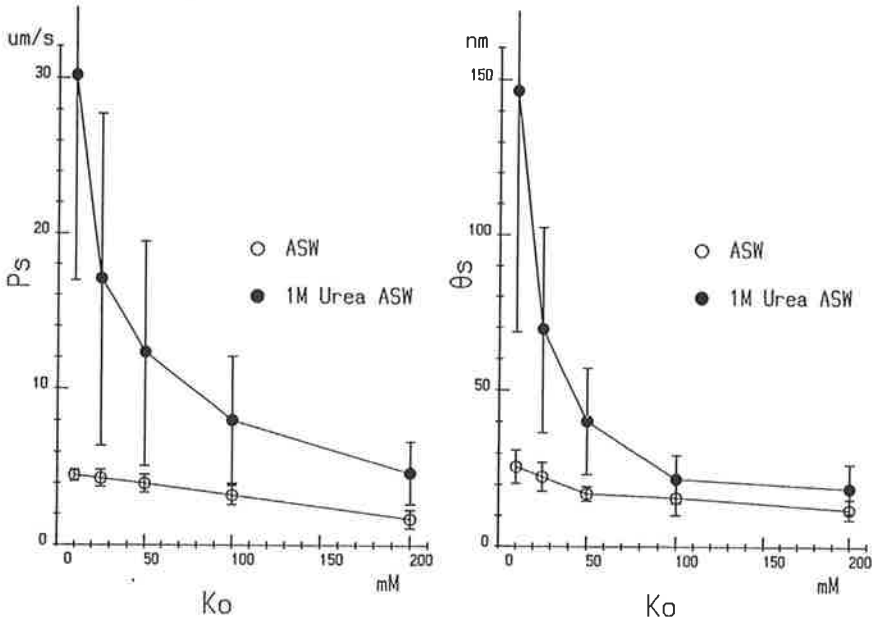
まず，グルタミン酸受容体応答の発生過程を検討するために出生後５日から26日を経たラットの海馬全体から細胞試料を調製した。試料調製直後から数時間以内で受容体応答を検討した場合，出生後５日齢のラットではグルタミン酸応答は検出できにくかったが，生後１週間頃からはっきりとした応答が検出できるようになり，以後大きな変化は見られなかった。また，調製後１日経過した細胞でもはっきりと応答が検出できた。次に，生後10日前後のラットを用い，海馬の上記３領域より調製した細胞試料における NMDA, キスカル酸，カイニン酸に対する応答を検討した。いずれの領域においても，キスカル酸応答は常に検出され，かつ検出頻度は他のアゴニストの応答よりも高かった。NMDA 応答は CA1 領域および歯状回において，カイニン酸応答は CA3 領域及び歯状回において検出されたが，他の領域ではそれぞれ検出されにくかった。これらの結果は，海馬の主要な３つのシナプスのいずれにおいてもキスカル酸タイプのグルタミン酸受容体がシナプス伝達に重要な役割を果たしていること，NMDA 受容体は CA1 領域および歯状回では重要であるが，CA3 領域では必ずしも重要ではないこと，等を示唆している。

軸索外表面のＫイオン蓄積に対するＫイオンの影響

久木田文夫

シュワン細胞は軸索を取り囲み，軸索外表面のＫイオン濃度（K_S）の調節機能を持つと推測される。しかし，軸索外表面のK_Sを人為的に変化させる確実な方法は神経線維－シュワン細胞標本に浸透圧勾配を与える方法のみである（Ｋイオン蓄積は外向きの浸透圧勾配で減少，内向きの浸透圧勾配で増加する）。Ｋイオンの蓄積はK_SがＫ電流により運ばれたＫイオン量（Ct：これを平均のＫ電流で割ると時間を表す）に対して増加する現象のことを言う。Ct が零のときのK_Sは膜電位依存性のＫチャネルが完全に閉じている状態（－100mV に１秒間過分極した状態）での軸索外表面Ｋイオン濃度 (Kr) を表す。本研究では細胞外（シュワン細胞の外側）のＫイオ

$$K_S = \frac{1}{\Theta_S}\left(\frac{1-u}{F}\int I_K dt - P_S\int (K_S - K_r)dt\right) + K_r$$



3隔室モデルによると軸索外表面のKイオン濃度K_SはF−H間隙の厚さΘ_Sとシュワン細胞層を通して細胞外へ流失する透過度P_Sにより図上のように表される。P_SとΘ_Sは細胞外液のKイオン濃度K_Oが増大するにつれて減少する。細胞外液が高張液の場合（○）は等張液の場合（●）よりKイオンの影響が大きい。

ンがKイオン蓄積に与える影響を調べた。その結果，細胞外液のKイオンがKイオン蓄積に影響を与えることが分かった。Krは細胞外液のKイオン濃度（K_O）が増大するにつれて，それに比例して増加する。軸索－シュワン細胞間隙（F−H間隙）にKイオンを十分負荷した場合（50mVの脱分極を最長14ミリ秒間与えた）のK_SもK_Oが増大すると増大するが，其の増加の程度$\triangle K_s$はKoが増加するにつれて顕著になる。つまり，細胞外液のKイオン濃度が増加するとKイオン蓄積は増加するように見える。従来，細胞外のKイオン濃度を高くするとKイオンの蓄積の影響が減少すると考えられており膜電位依存性のKチャネルの解析に頻繁に用いられてきた。しかし，このことがKイオンの蓄積の減少を意味するのではないことは一定量のKイオンが蓄積した場合のE_Kの変化が(Kr＋△Ks)/Krの対数に比例するからであり，Krが大きくなると△Kが同じでも$\triangle E_K$が小さくなるからである。精密な測定をすると細胞外液のKイオン濃度が増大するとKrのみならず△Kも増大することが明らかになった。この変化は浸透圧により予めKイオン蓄積を十分除去した場合には更に顕著に現れる。このデータをF−H間隙にKイオンが軸索膜の外向きK電流により負荷され，シュワン細胞層をとして細胞外へKイオンが流失するという

3隔室モデルで解析した。このモデルを用いると軸索外表面のKイオン濃度K_sはF－H間隙の容量Θ_S（Ctが小さい場合の傾斜に逆比例する）シュワン細胞の能動的および受動的とに関わらずKイオンを細胞外へくみ出す能力P_S（Ctが十分大きい場合のK_Sに逆比例する）により図上に示すような関係式で表される。図に示すように細胞外のKイオンが増大するとP_SとΘ_Sが減少する。これはシュワン細胞の体積が増大してF－H間隙が狭まったことに対応している。生理的条件下でのKイオン濃度の変化は高々20mM程度と考えられるのでKイオン濃度の変化に対するシュワン細胞の反応は小さいと思われるがKイオンが蓄積し始めると加速度的に蓄積が増大する機構が存在することを示唆している。

最近イカ神経線維のシュワン細胞は複雑な管状構造をもち，この構造がKイオンの軸索外表面からの汲みだし機構に関係しているらしいという仮説が提唱されている。上記のモデルは極めて単純化されたモデルであるので，Kイオンによるシュワン細胞内の細かな構造の変化も考慮にいれる必要がある。

培養乳腺上皮細胞における細胞内カルシウム振動と反応

古家喜四夫，山岸俊一
榎本浩一（島根医大）

乳腺分泌細胞はホルモンによってその増殖，分化がコントロールされ，自発性に乳汁等の分泌を行う。我々は授乳期のマウスの初代培養した乳腺上皮細胞（上皮性増殖因子処理）を用い，この細胞に新しいタイプのCa依存性Kチャネルが高密度で存在し，その活性が自発的に振動していることを明らかにした。またこの細胞は機械的刺激に応答し，その反応はコロニー内の他の細胞に広がるが，この時やはりこのチャネルの活性化が見られる。これらのことはこの細胞において自発性の細胞内カルシウム振動や反応が起こっていることを示唆している。それを確かめ，細胞内カルシウム変動の様子を空間的，時間的に明らかにするため，fura－2蛍光顕微測光法及び画像法による研究を行った。またパッチクランプ法も同時に適用し，Ca依存性Kチャネルの活性化との相関をみた。

細胞内カルシウム変化の二次元像は倒立蛍光顕微測光システム(Olympus OSP－3)に暗視型テレビカメラ(Panasonic WV－1900)をつけ，画像処理装置(Avioics Image Σ －III)を通してfura－2蛍光像の差分を実時間でとることにより観察した。また画像ボードとD/Aボードを装備したパソコンを用い，蛍光変化と単一イオン電流が同時に記録できるシステムをつくった。

自発性細胞内カルシウム振動

培養条件，日数等に依存していると考えられるが，時として一つのコロニー内で数個から7－8個の細胞で周期数十秒の自発性の振動が見られた（図1）。それぞれの細胞でのカルシウム変

化は全く同期せず，また一つの細胞でのカルシウム上昇は周りの細胞には伝わらなかった。パッチクランプ法と fura－2 蛍光変化の同時測定により，Ca 依存性 K チャネルの活性化と細胞内カルシウムの変化が完全に同期していることが示された（図２）。Ca－free 溶液中ではこの振動は消失したが，時として溶液置換後一ないし数回の振動が見られることもあった。

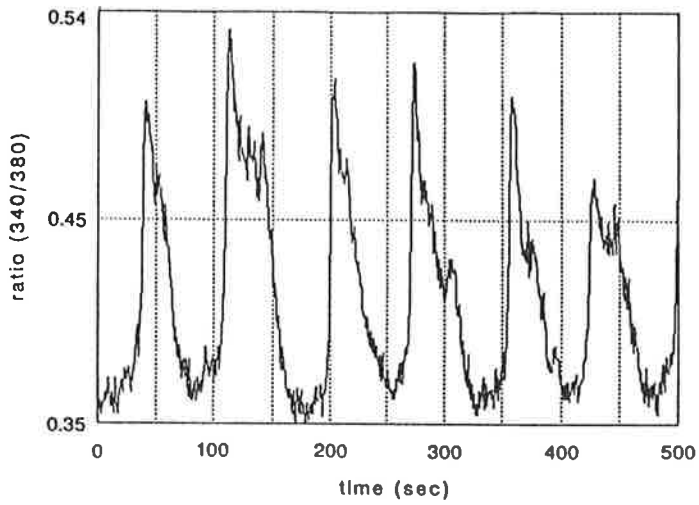


図１　自発性の細胞内カルシウム振動。励起光 340nm と 380nm による fura－2 蛍光強度の比を示す。

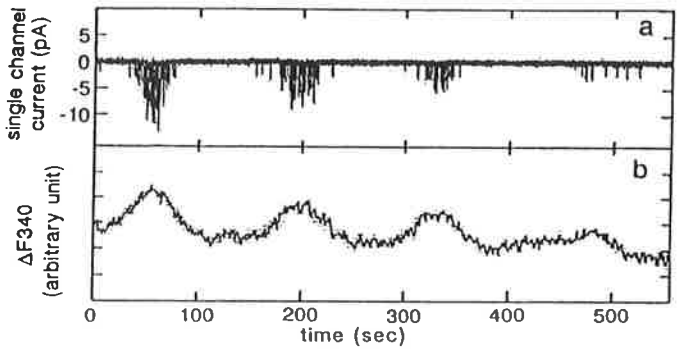


図２　自発性に振動している Ca 依存性 K チャネルの活性と fura－2 蛍光強度変化の同じ細胞での同時測定。上段は high－K 電極を用い cell－attached で測定した単一チャネル電流。最大４個のチャネルが開いている。下段は 340nm 励起の fura－2 蛍光の強度変化。連続的に画像ボードで像を取り込み，目的の細胞の蛍光強度を計算し，D/A 変換して出力した。

機械的刺激による細胞内カルシウム上昇とその伝播

先をなましたガラス電極で細胞を軽くさわると同じコロニー内の別の細胞で過分極反応やCa依存性Kチャネルの活性化が見られるが，fura－2蛍光画像法によりその伝播の様子が明らかになった。さわられた細胞でまずカルシウム上昇が見られ，そのシグナルは波のように同じコロニー内の周りの細胞に伝わっていった。反応は十数秒で100－200 μm広がり40秒ほで持続して消えた（図3）。この反応は別の細胞をさわればほぼ何回でも繰り返し起こすことが可能であったが，Ca－free溶液中では一度しか反応しなかった。

ATP, FCS等による細胞内カルシウム反応

この細胞はATP, ADP($>$ 3 μM)(not AMP) やFCS, LPSR ($>$ 1%) に反応して細胞内カルシウムの一過性の増大，時としてその振動を引き起こした。この反応もCa－free溶液中で，繰り返しは出来ないが，起きることが明らかにされた。

以上乳腺細胞におけるカルシウム変動の様子を明らかにした。これらのカルシウム増加は細胞内カルシウムトアーからの遊離によっていると考えられる。更に，Ca－free (EGTA) 中に長時間（約10分以上）置くとすべてのカルシウム反応が消失することや，20mMの二価イオン (Ca, Mn, Ba) 中でそれらのイオンが膜を透過して細胞内に入ってくることなどから，このストアー内のカルシウムは細胞外のカルシウムイオンとかなり頻繁に交換していると思われる。現在，このストアーは何か，またカルシウム変動，カルシウムシグナル伝播の機構及び役割について研究を進めている。

Key Words : intracellular calcium, mammary epithelial cell, fura－2

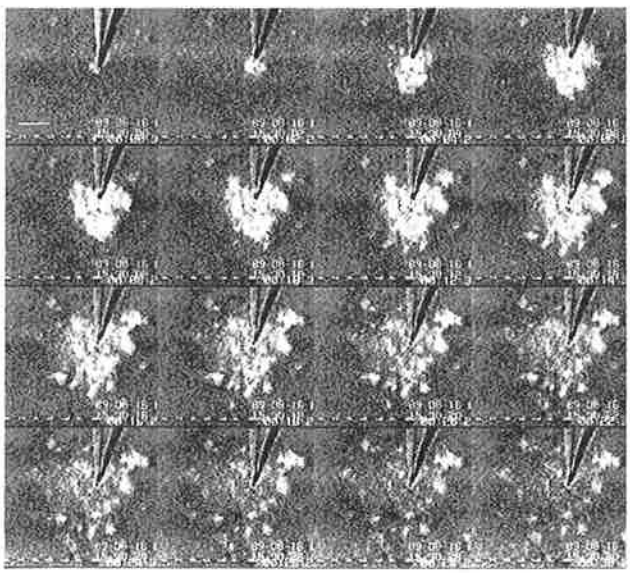


図3　ガラス微小ピペットを用いた機械的刺激による細胞内カルシウムの増大とそのシグナルのコロニー内での伝播。刺激後2秒毎の像を左から右，上から下の順番に16枚並べた。これらは340nmでのfura－2蛍光像の差分像で，白くなったところはカルシウムが増大したことを示す。Barは100 μm。

機能協関研究部門

概要

本研究部門では，種々の電気的，化学的刺激により誘発される細胞活動の様式を，電気生理学的手法と光学的手法を併用して解析し，細胞活動の基礎を，細胞下レベル，または，分子レベルにおいて解明しようとしている。渡辺は，神経の興奮に伴う旋光性シグナルについての研究を進め，入射光に対して神経を傾けた際のシグナルの変化から，旋光性シグナルが，膜電位勾配によって傾斜した膜高分子の興奮による旋光性変化を表現していることを結論することが出来た。寺川は，大学院学生マニバナン，受託大学院生の岩瀬らと，微分干渉顕微鏡で得られる光学像をビデオカメラで捉え画像処理によって分解能を上げる手法で，内外及び神経分泌細胞をリアルタイムに観察し，分泌顆粒のエキソサイトーシスの動的な側面を解析した。クロマフィン細胞内の分泌顆粒のエキソサイトーシス直前の運動を定量的に測定し，脳下垂体前葉のTSH細胞と後葉の神経終末のエキソサイトーシスを捉えることに成功した。これらの観察によって，エキソサイトーシスと分泌顆粒の運動性との関係が従来想像されていたものと異なることが明らかになった。中山は単離した神経細胞を用いて，細胞外マトリックスと神経軸索の成長の関連を調べ，筒井はイカの巨大軸索に見られるClチャンネルがCa依存性であることを明かにし，その電位応答の動態を調べた。寺川は本年度に行われる上海生理研究所との共同研究の準備を進め，訪中してビデオ観察の実験条件を整え，来日した朱培閲助教授と消化管分泌細胞のCa蛍光信号の測定を行った。

神経の旋光性シグナルの伝導方向による逆転

渡辺　昭

神経に電気刺激を与えて興奮を起こさせると神経の旋光性は一時的に変化し，これを旋光性シグナルとして記録することができる (Watanabe, 1987)。エビの歩脚神経を材料として得られる旋光性シグナルは，振巾が最大2×10^{-4}度位の短い変化であるが，シグナルの大きな特徴の一つは，インパルスの伝導方向によりその形を変え，多くの標本では，その方向まで逆転することである。図1にその一例を示す。逆転の程度は，標本によって異り，ほぼ完全な逆転を示すものから，図1に見られるように，インパルスの方向によって振巾に差のあるもの，更に，逆転の全く見られないものなど，変異が大きい。しかし，インパルスの伝導方向によって，シグナルが形を大きく生えるという点は，すべての標本に共通している。他の光学的シグナルでは，シグナルの形がこのように大きく変わることはない。図1の吸収シグナルや複屈折性シグナルと比較すると，

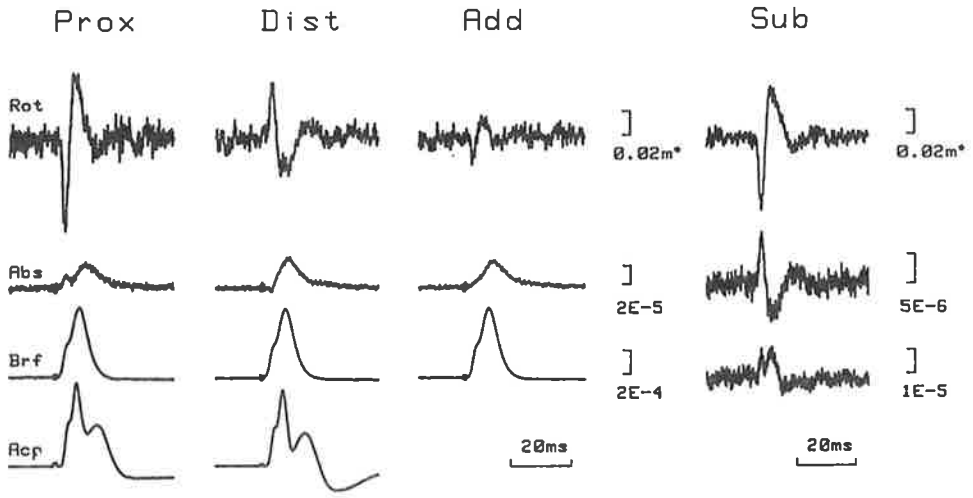


図１．　エビ歩脚神経の旋光性・吸収・複屈折性各シグナルと，細胞外誘導による活動電位。Rot, 旋光性シグナル。(上向きのフレは右旋性の増加)。Abs, 吸収シグナル（より正確には 0° での光散乱シグナル)。上向きのフレは光の減少。較正は背景光との比。Brf, 複屈折性シグナル．上向きは複屈折性の減少。較正は背景光との比。静止時複屈折は 64° 。Acp, 細胞外活動電位。Prox, 中枢端刺激。Dist, 末梢端刺激。Add, 中枢端及び末梢端刺激によるシグナルの和の半分。Sub, 中枢端及び末梢端刺激によるシグナルの差の半分。10℃

この点はよくわかる。図１の右端は，中枢端刺激によるシグナルと末梢端刺激によるシグナルとの差を示したが，旋光性シグナルの場合には，差シグナルは和シグナルと同じ程度の大きさとなって現われる。

吸収シグナルや複屈折性シグナルにおいても，差シグナルは出現する。吸収シグナルの差シグナルはことに大きく，この例では和シグナルの30％に達している。複屈折性シグナルの差シグナルは小さく，この例では２％ていどである。しかし，これらのシグナルの存在は，神経の興奮伝導にさいして，伝導方向が異なる時，膜の状態が完全には同じでないことを示している。この差は，旋光性シグナルの記録によって，最も顕著に現れるにすぎない。

この現象を説明するために假説として最も考え易いのは，伝導性インパルスによって，膜電位に空間的勾配が生ずる時，膜分子の軸が静止状態に対し傾斜すると考えることである。傾斜の原因として，第一に考えられるのは，軸索内を縦方向に流れる活動電流であるが，この効果は，エネルギー的に見て非常に小さく，これを原因として考えることは除外しなければならない。より考え易い原因としては，膜電位の変化によって生ずる膜の機会的な変形である。このような変形が存在することは，すでに Tasak & Iwasa (1982) および Terakawa (1985) により実験的に見出されているからである。変形の具体的な内容については，まだ情報が充分といえないが，この変化は膜電位依存性であり，おそらく膜の厚さの増加を伴っているものと思われる。このような変化に対応して膜分子の傾斜が起ることは容易に考えられることである。

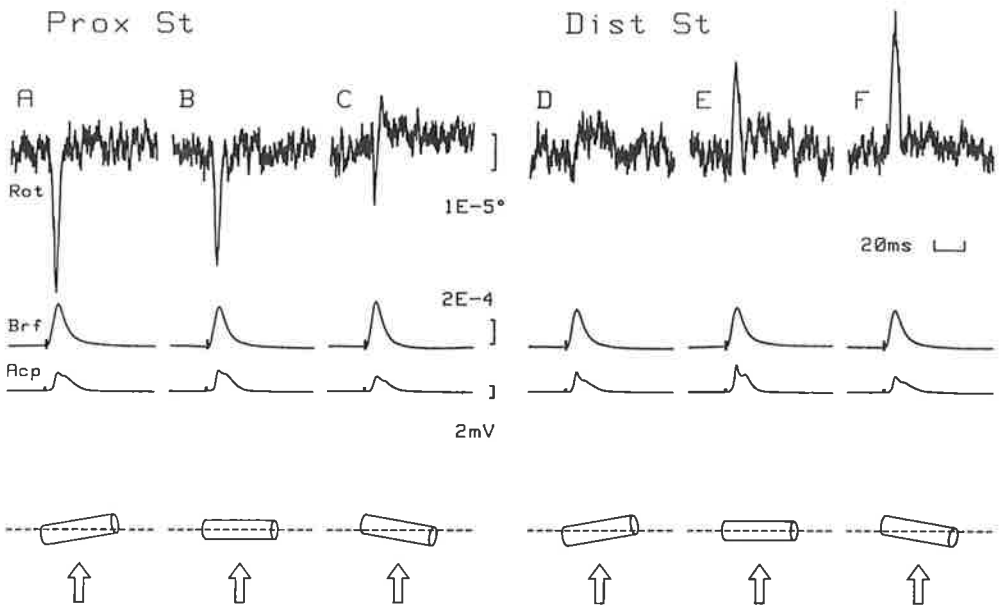


図２．　旋光性シグナルに対する神経と入射光との角度変化の影響。記号は図１と同じ。下の模式図は，神経と入射光との角度の関係を示す。円筒は神経，矢印は入射光を示し，傾きの角度は±10°。12℃

しかるに，分子の旋光性は，一般に，入射光の方向と分子の光学軸の方向とによって定まる。例えば，合成ポリペプチドである poly－γ－benzyl－L－glutamate の溶液に電場をかけて分子を配向させ，その旋光性を測定すると，ヘリックス軸に平行な入射光に対し右旋性，ヘリックス軸に垂直な入射光に対し左旋性を示す (Tinoco, 1957 ; Hammond and Jennings, 1980). 同様な現象は，結晶では早くから認められていて，例えば，水晶は，光軸に平行な光線に対する旋光性は，光軸に垂直な光線に対する旋光性と逆符号である (Sziessy & Münster, 1934 ; Kobayashi et al, 1988), また，双軸結晶の一つである庶糖の二つの光軸に沿って測定した旋光性は一方で左旋性，他方で右旋性である (Longchambon, 1921)。膜は，規則正しく配列した分子群であるから，その光学的性質は結晶と同様に考えるべきであり，膜分子が秩序を持って傾斜する時，これに伴って旋光性変化が発生するものと考えられる。

それでは，神経に見られる旋光性シグナルは，膜電位の空間的勾配により発生する膜分子の傾きのみによって説明できるか。この疑問に答えるため，神経を光路に対し傾斜させる実験を試みた。図２にその例を示す。神経を光路に対し 10° 傾斜させると，旋光性シグナルは振巾を大きくかえる。時にはその方向をかえることもある。この実験は，旋光性シグナルが，分子の軸の傾きによってのみ起るとすると，全く解釈がつかない。何故なら，神経全体を傾けても，インパルスによる傾きの変化分には変わりがないはずであり，従って傾けるという操作は，シグナルの大

きさや方向には無関係であるべきだからである。この実験結果は，神経を傾けることにより，静止時の旋光性が変化し，興奮によって，静止時の旋光性の消失または強い減少が起ると考える時，はじめて理解できる。興奮時の膜高分子の旋光性は，静止時にくらべて絶対値の上で小さく，しかも膜と入射光との間の角度を変化させても，あまり変化しないものを考えられる。第一近似としては，旋光性の消失と考えればよい。

以上をまとめると，次のような結論が得られる。

(1) 神経線維の膜高分子は，ある秩序を持って配列している。その光学的モデルとしては，高分子溶液より結晶のほうが適切である。

(2) 神経線維の旋光性ジグナルは，膜高分子が，膜電位の空間的勾配により傾きを受けて，その静止時の旋光性を変化させたのち，興奮状態での旋光性のレベルに遷移した結果発生する。

文献

Hammond, P. and Jennings, B. R. (1980) The optical activity of poly－γ－benzyl－L－glutamate helices, Molec. Phys. 39, 1035－1038

Kobayashi, J., Asahi, T., Takahashi, S and Glazer, A. M. (1988). Evaluation of the systematic errors of polarimetric meesurements of the gyration tensors of α －quartz by the HAUP. J. Appl. Cryst. 21, 479－484.

Longchambon, L. (1921). Sur la mesure du pouvoir rotatoire dans les cristaux biaxes, Comptes Rendus, 172, 1187－1189.

Szivessy, G. und Münster, C. (1934). Über die Prüfung der Gitteroptik bei aktiven kristallen. Ann Phys. 5. Folge, 20, 703－736

Tasaki, I. and Iwasa, K. (1982).Rapid pressure changes and surface displacements in the squid giant axon associated with production of action potentials. Jpn. J. Physiol. 32, 69－81.

Terakawa, S. (1985) Potential－dependent variations of the intracellular pressure in the intracellularly perfused squid giant axons. J. Physiol. 369, 229－248.

Tinoco, I. Jr. (1957). The change of optical activity of poly－γ－benzyl－L－glutamate in an electric field. J. Am. Chem. Soc. 79, 4248－4249.

Watanabe, A. (1978). Change in optical activity of a lobster nerve associated with excitation J. Physiol. 289, 223－253.

クロマフィン細胞の顆粒運動と開口放出

寺川　進，樊　津紅，熊倉鴻之助*，今泉美佳*（*上智大・生命科学研）

牛副腎髄質よりコラゲナーゼ処理によって得たクロマフィン細胞を培養し画像処理によって強化したノマルスキー顕微鏡下に細胞内活動を観察した。この細胞においてAChや高濃度K溶液の刺激によって分泌顆粒の開口放出が観察できることは前年度報告に記したが，今年度は顆粒の膜融合と開口の細かい時間的な解析と，顆粒の運動と開口放出の間の関連性の有無を調べた。

開口放出の活動を示す細胞は，大部分，ゆっくりとした顆粒全体のブラウン運動を示すタイプのものであった。中には実時間では顆粒の運動性が明らかでない細胞で開口放出を示すものもあったが，その数は少なかった。一個の顆粒の膜融合と開口に際する画像変化を時間分解能4ミリ秒で記録し，開口にともなってその顆粒がこの様に運動したかをビデオ記録から解析した。開口と顆粒内容の放出は約10ミリ秒の間に完了する速度をもち，開口放出の結果形成されるΩ形は数秒から1分ほど維持された。開口直後約1秒くらいに渡って直径の膨大化を示す顆粒も見られた。これは顆粒内容がもともと溶液状態にはなく，沈澱した様になっており，開口がきっかけとなっておそらく酵素の助けを借りて溶解し始め，浸透圧の上昇が起こって顆粒が膨れたものと解釈できる。このことは，しばしば電子顕微鏡で観察される分泌顆粒の開口像において，顆粒の開口にも関わらずΩ形の内容が球状に固まったようになっているのと対応する現象と考えられる。

顆粒の融合開口に伴う光強度変化をプロットしてみると，開口直前に顆粒は殆ど動いていないことが明瞭である。顕微鏡の対物レンズを動かすことによって観察される顆粒の明るさの変化をキャリブレーションとして推定すると，20nm以上の動きは光軸の方向にも焦点面の方向にも認められない。細胞のあちこちで開口反応が起こっているときにも顆粒全体のブラウン運動の程度は変化しなかった。このことはやはり画像処理によって定量的に示すことができた。330ミリ秒の間隔で2枚の画像を画像処理装置に取り込み，その画像間の引算をし，一定値を足してマイナスの値が無いようにしたところで，画素の明るさの分布ヒストグラムを作る。このヒストグラムは顆粒の運動の方向や速度がいろいろであるので，ほぼ正規分布となり，そのピーク値と分散は運動の速さと直接関係したものになる。この方法によって，刺激前のヒストグラムと，刺激をして開口放出が見られる瞬間のヒストグラムとを比較すると，全く差が無いか，むしろ，刺激中の方が分散が小さくなる傾向がある。そして，刺激の無いときの色々の細胞で分散を比較すると，同じように開口放出の能力をもつ細胞でも，大きな違いを見せた。細胞の側面で開口が起こるとΩ形の形成がはっきりと分かるが，このときにも顆粒が細胞膜の方向に特に移動することは無かった。培養によって分化したクロマフィン細胞は軸索のような長い突起を作るが，その突起の終末部においても微小な顆粒の開口が見られた。この場合にも顆粒がの移動は全く観察されず，初めから膜に接触した顆粒が開口反応を起こしていると考えられる。

これらの観察から，顆粒の運動と開口放出との間には因果関係は無いことが結論される。顆粒

はブラウン運動によって常に細胞膜との不定期的な接触を持ち，刺激があれば顆粒と細胞膜の間に分子的な結合ができて，この接触が非可逆的になり膜融合に導かれるものと考えられる。従来，レーザードプラー法による測定から，神経終末などの興奮時にはシナプス顆粒が膜の方向に駆動されそれが膜融合のトリガーになるとする仮説が提出されているが，そのようなことはないだろうと思われる。Kイオン濃度の高い溶液を細胞にかけると確かに，顆粒のブラウン運動が速くなる様な細胞が時に見られる。これはドナン平衡を回復するために細胞がKの取り込みをして，それに伴って水が細胞内に入り込むからである。このような細胞は開口反応を示さず，次第に球状になっていく。レーザーによって観察されたのはこの反応であり，生理的な分泌反応に伴うものではない可能性が高い。クロマフィン細胞で見られた顆粒のブラウン運動が単なる水中にある微小顆粒の熱的運動なのか，ランダムな方向に走るアクチンや微小管によって駆動されるものなのかについては目下研究中である。

神経分泌終末のエキソサイトーシスの可視化

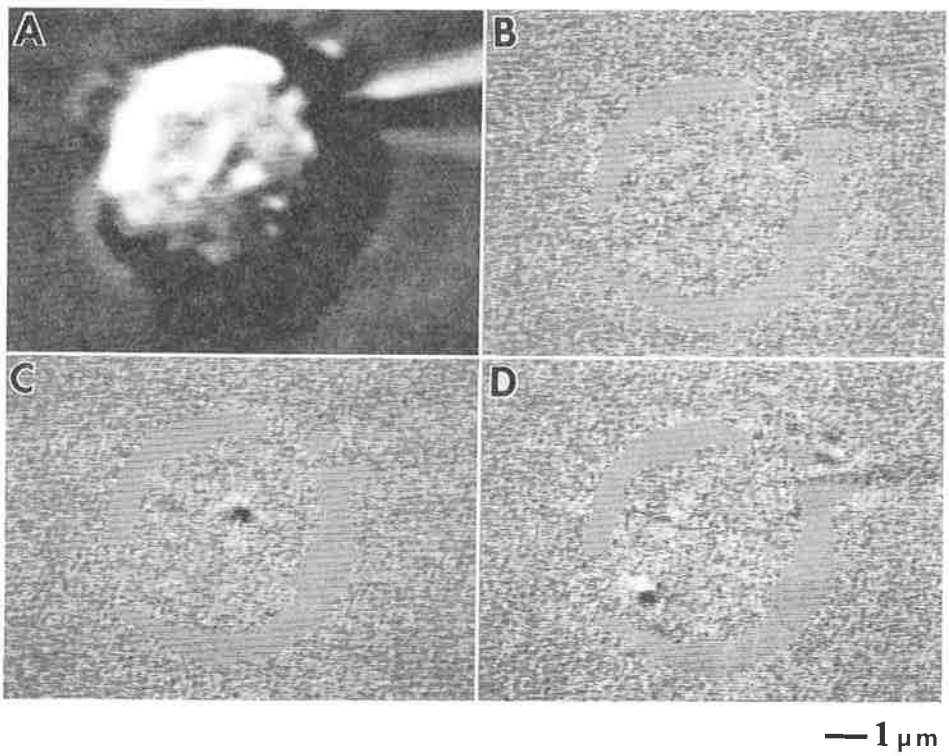
寺川　進，シャンティ・マニバナン

ラットの脳下垂体から後葉部分を分離し，コラゲナーゼ処理によって神経終末を単離し，リジンをコートしたカバーガラス上に接着させノマルスキー顕微鏡下にビデオカメラと画像処理装置を通して観察した。終末は１－５ミクロンの球状の形をしており中に分泌顆粒を蓄えていた。時に，軸索をつけたものもあった。終末によって中の顆粒が殆ど動かないものと，ゆっくりとブラウン運動するものとがあった。

ピペット電極を終末に当てて電流刺激を与えると，いくつかの顆粒の明るさが突然変化し，小さな陥没となりすぐに消失した。このような変化はクロマフィン細胞やTSH細胞において見られたエキソサイトーシス（開口分泌）の反応と全く同じのもで，神経終末におけるホルモン分泌の単位過程を反映するものと考えられる。顆粒の開口反応は電気刺激後100ミリ秒から１秒ぐらいの間に起こり，一つの終末当り２，３個から10数個起こった。１個の顆粒の明るさの変化は33ミリ秒かそれ以下の急速な立ち上がりの後，次第に元に戻るものと，さらにゆっくりと大きくなってからもとに戻ていくものとがあった。微分干渉像の明るさとして数パーセントの大きさであった。反応した顆粒の直径は0.2から0.5ミクロンぐらいで，その顆粒の位置の分布には特別なパターンは認めれれなかった。５ミクロン程の直径の終末で10数個の顆粒の融合反応が起こっても，終末全体が膨張することはなかった。反応はCaイオンを取り除いた溶液中では起こらなかった。また，開口反応を引き起こすのに必要な電気刺激の大きさにはある閾値があった。したがって，電気刺激により膜の興奮が起こり，それによるCaイオンの流入がエキソサイトーシスを引き起こしていることが分かる。

ゆっくりとしたブラウン運動をしている終末では，電気刺激によって，その運動の停止が起こり，内部に大きな液胞状の構造が形成された。この構造の詳細は不明であるが，顆粒の開口頻度との相関は無く，全く開口が起こらなかった場合にも出現し，外液中のCaイオンを必要としなかった。10－20分かかってゆっくりとブラウン運動は回復し，液胞も消失した。2回目の電気刺激によっても同じことが繰り返された。この反応は，その時間経過の遅いことから，下垂体後葉を組織全体として電気刺激したときにみられる，遅い光透過性変化の信号に対応するものである可能性がある。

下垂体後葉の神経終末はホルモン分泌を主として行っているものではあるが，神経終末にエキソサイトーシスの反応が起こることをリアルタイムに確認できたことは，シナプスのような神経終末にも同じことが起こりうることを強く示唆するものである。



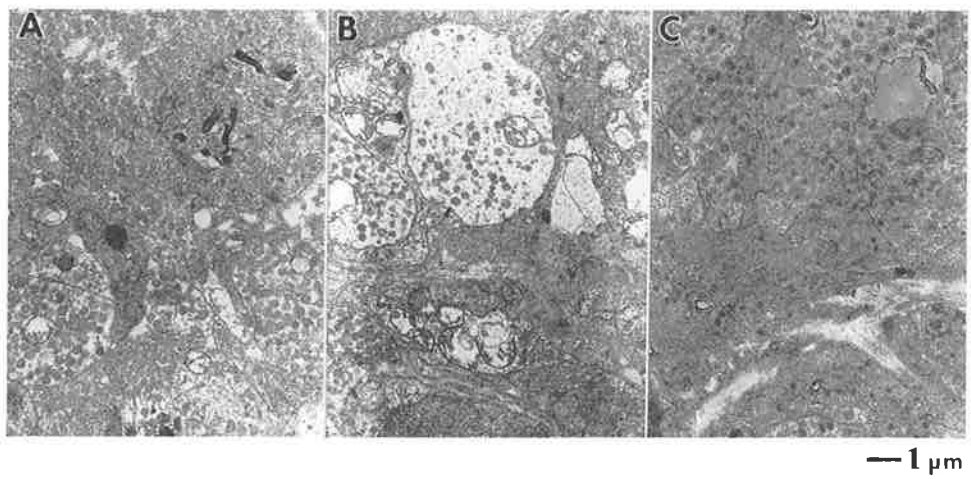
［図1］ラット脳下垂体後葉から単離した神経終末のエキソサイトーシス。A；終末の微分干渉像。ガラス微小電極（白矢印）から電流刺激（1ミリ秒のパルス）を与えた。B－D；2駒の連続した画像間の差分をとり平均値が灰色になるように明るさをかさ上げすることによって得られた時間微分画像。33ミリ秒以内の早い時間変化の起こった部分にのみ黒または白のパターンが現れる。B；終末内に特別の変化の起こっていないもの。C；電気刺激後130ミリ秒に現れた分泌顆粒の急激な明るさの変化（矢印）。D；刺激後270ミリ秒に現れた分泌顆粒のあかるさの変化（矢印）。

脳下垂体後葉の光散乱変化に対応する微細構造変化

シャンティ・マニバナン，寺川　進

ラット脳下垂体を切り出し前葉と中葉を取り除いた標本を，プラスチックチェンバーに入れて明視野顕微鏡下に置き，連続灌流しながら光透過度の変化を測定した。50Hz 5秒間の繰り返し電気刺激を与えると，2つのピークをもつ光透過度増大が起こることはすでに報告した通りである。初めのピークは電気刺激終了直後に生じ，エキソシトーシスによって分泌顆粒が消失することとによる成分と，神経終末内の細胞質の何等かの早い変化とを含んでいる。第2のピークは刺激終了3－5分後に生ずるもので，今回この成分がどのようなものであるかを電子顕微鏡による微細構造の観察から調べた。

第2の光透過度の増大がピークに達したところで組織2.5%のグルタールアルデヒドによって灌流し固定した。オスミウム酸固定，アルコール脱水，スパー樹脂による包埋をしてから超薄切片を作り，ウラニル酸と酢酸鉛で染色し，日本電子C200で観察した。刺激後固定した標本では，分泌顆粒の密度が少なくなっており，エキソサイトーシスによって顆粒が消失したということと矛盾しなかった。さらに顕著な変化は，直径50nmくらいの，内部が染色されないタイプの微小顆粒の密度が増大していたことである。終末によっては分泌顆粒がほとんどなく，大部分の領域を殆ど隙間なく微小顆粒が埋めていた。このような微小顆粒は，刺激を加えていない対照標本にも見いだすことが出来たが，その終末内に占める面積と密度にはおおきな違いがあった。



［図1］ラット脳下垂体後葉の分泌反応に伴う微細構造変化。A；電気刺激なし。分泌顆粒の密度は一様に高く，微小顆粒の密度とその占める面積は小さい。B, C；50Hzの頻度で5秒間の繰り返し電気刺激を与え，4分後に光透過性の上昇変化が最大に近くなったとこれで固定したもの。分泌顆粒の密度が低下し，微小顆粒の数と密度が著しく増加している。

微小顆粒形成の意味についてはいくつかの仮説がある。一つは，分泌顆粒が終末細胞膜と膜融合することによって余剰になった細胞膜を，エンドサイトーシスによって再取り込みした結果であるとするもの。二つは，終末の興奮に伴って細胞内に入ってきたCaイオンを吸収するためにERから形成されたものだとするもの。微小顆粒は大変小さいが無構造の原形質に比べれば光を散乱する能力は高いと考えられる。従って，光の透過度の増大はこの微小顆粒が減少したことに対応する可能性がある。そうであれば，この微小顆粒も，エキソサイトーシスの形式で中に貯めたCaイオンを細胞外に排出するという可能性も考えられる。今後，細かい時間間隔で固定した標本の観察を続ける予定である。

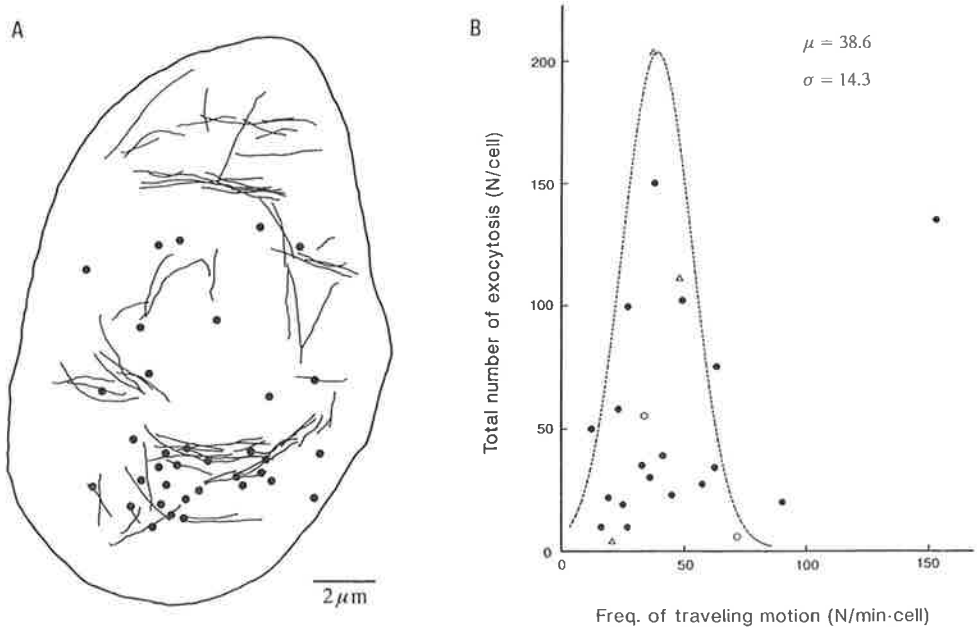
脳下垂体前葉のTSH細胞におけるエキソサイトーシスの可視化

岩瀬範和*，寺川　進，柳沢　忠*（*宇都宮大・農・農芸化学）

コイ脳下垂体より前葉端部を切り出し，コラゲナーゼ処理とEDTA処理によって細胞を単離して，数日間培養した。これをノマルスキー顕微鏡下にビデオカメラと画像処理装置を通して観察した。細胞内には沢山の分泌顆粒が見え，昨年の報告に記したようなブラウン運動とトラベリング運動とを示した。

100nMのTRHまたはその誘導体である[1－Me－His] TRHを含む溶液，あるいは65mMのKを含む溶液を，細胞の側に置いた微小ガラス管から細胞に与えた刺激すると，分泌顆粒が突然そのあかるさを変え，弾けるような反応を示してから消失してしまうということが次々に起こった。刺激物を含まない溶液ではこのようなことは引き起こせなかった。このような顆粒の変化は刺激直後に激しく起こり，数分間持続して次第にその頻度を減少させ，脱感作してその後は起きなくなった。一個の顆粒の反応は，その明るさの変化から解析すると，速いものは33ミリ秒，遅いものは0.5秒ぐらいの時間で完了することが分かった。このような特徴から，顆粒の示す急激な明るさの変化はエキソサイトーシス（開口分泌）を反映するものであると結論される。

この細胞では頻繁に顆粒のトラベリング運動がみられたので，その運動の起こる領域と，開口分泌の起こる領域を比べてみると細胞によって，一致するものと一致しないものとまちまちであった。しかし，一個のトラベリング運動を示す顆粒がそのまま開口放出に至ということは認められなかった。さらに，前記のクロマフィン細胞におけるのと同じ解析によっても，顆粒の運動は開口とは直接結び付いていないことがわかった。コルヒチンを用いてトラベリング運動は抑制することができるが，コルヒチン処理した細胞では開口放出を示す確率も明らかに減少した。多くの細胞において，開口分泌をした数を，トラベリング運動をした顆粒のすうにたいしてプロットしてみると，ほぼ正規分布の関係があることがわかった。最適なトラベリングの頻度は一分間当り33回であった。分散は17回に相当した。従って，運動性は間接的に開口放出の能力と関連して



［図１］コイ脳下垂体前葉の TSH 細胞における分泌顆粒の運動性と開口分泌の関係。A；トラベリング運動の軌跡と開口分泌の生じた部位の分布。顆粒の運動は最も開口分泌の盛んなときの１分間に追跡可能であった軌跡を記録したもので，個々の軌跡は数秒間の連続した運動を示す。●はK溶液刺激によってこの細胞に見られた全ての開口分泌の発生部位を示す。B；個々の細胞における顆粒運動の頻度と開口分泌の総数との関係。横軸は，一個の細胞の一分間当りに観察された顆粒の直進運動の回数。縦軸は，その細胞を刺激した時に観察されたエキソサイトーシス反応の総数。点線は平均値38.6（回／分・一個の細胞当り），標準偏差14.3の正規分布を表す。●は 65mMK 溶液，○は１μMTRH，△はμM [1－Me－His] TRH によって刺激した細胞を表す。

いることが示唆される。

開口分布を示した細胞の種類を同定するため，ノマルスキー顕微鏡下に反応性を確かめた後，フォルマリン固定をし，PAP 法を用いていくつかの抗体の反応性を調べた。サケの抗プロラクチン抗体，および，抗成長ホルモン抗体の染色は陰性であり，ヒトの抗 TSH 抗体に対しては陽性の反応が得られた。このことからコイにおいてはＴＲＨとその誘導体である [1－Me－His] TRH が TSH 細胞に作用して TSH の放出を促すことがほぼまちがいない。コイの脳に TRH よりも多量に存在する [1－Me－His] TRH の作用の一つが明らかになったものと考えられる。

大腸クリプト細胞の Ca 信号

寺川　進，朱　培閎，古家喜四夫，山岸俊一

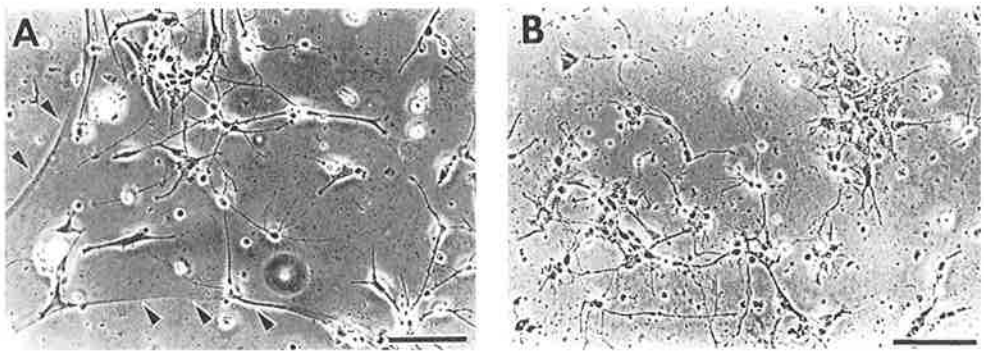
ラットの大腸から筋層を剝離し，得られた粘膜を細片としてから，fura－2－AM によって染色し，340 と 380nm の 2 波長交互励起によってクリプトの細胞からハッスル蛍光強度を経時的に測定した。カルバコール 100 μM によって刺激すると，数分に渡る細胞内フリー Ca 濃度の上昇を示す蛍光信号が認められた。1.5mM ヒスタミンによっても同様の反応が起こった。カルバコール存在下でヒスタミンを与えると，ヒスタミンによる Ca 濃度上昇は生じなかった。外液の Ca イオンを取り除いた状態でカルバコール刺激をすると，Ca 信号の時間幅は短くなりその大きさもやや小さくなった。膜透過性 cAMP アナログの単独投与では大きな信号は得られなかった。しかし，カルバコール存在下では cAMP によってはっきりした信号が生じた。蛋白の脱燐酸化酵素を選択的に阻害するといわれるオカダ酸によって組織を前処置しておくと，Ca 信号は短いものとなった。以上の観察結果は，クリプトの杯細胞における粘液分泌反応の性質とほぼ平行しており，クリプトの他の細胞における CI イオン分泌の反応との一致性が低い。したがって，観察された Ca 信号は主として杯細胞の寄与によるところが大きいものと考えられる。粘液分泌反応の速い成分が細胞内 Ca ストアーからの Ca 放出によって起こること，遅い持続性の成分が細胞外からの Ca イオンの流入によって維持されることなど，粘液分泌の直接観察によって示された結論が支持される。10mM カフェインは単独投与によっても，カルバコールとの同時投与によっても効果が認められなかった。骨格筋細胞に対しては 2mM のカフェインが有効であったので，クルプトの細胞内における Ca ストアーの性質は筋肉の SR のそれとは異なっていることが結論される。

細胞外マトリックスによる海馬神経軸索成長促進

中山　孝，杉山博之，古家園子

中枢神経細胞の成長・分化と細胞外接着の関係を調べるため，コラーゲンやラミニンなどの細胞外マトリックスから成る基底膜を培養基質として，ラットから調製した海馬神経細胞を初代培養しその突起成長の様子を観察した。もちいた基底膜は孵卵 8 日目の鶏胚の眼からとり出し，プラスチック・ディシュの上にコートした。培養後統計処理をした結果から，コラーゲンやポリ・リジンさらにラミニンを培養基質にもちいた時に比べて，基底膜上での海馬神経細胞の突起は培養後素早く開始され，またその成長速度は 2 倍以上促進されることを見い出した。この成長速度は海馬神経の軸索の成長速度と一致している。また基底膜をもちいると，神経と培養基質との接

着が強いため海馬神経細胞同士が接着し集合を形成することが抑制された。以上のことから，基底膜にふくまれているコラーゲン，ラミニンまたその他の細胞外マトリックス成分およびその複合体が，初代培養した海馬神経細胞の細胞極性の決定そして軸索成長を強く促進すると結論づけられた。



A．基底膜を培養基質とした海馬神経細胞の初代培養。
B．コラーゲン，ラミニン上での培養。培養開始2日後，スケール　100 μm。

イカ巨大軸索 Cl^- チャネル

筒井泉雄，山岸俊一

神経の興奮現象に伴うイオンの出入の課程においては，カチオンと同様にアニオンも何らかの意義を持つものと考えられてる。イカ巨大軸索においては Na^+ チャネルと K^+ チャネルが主として興奮伝達過程を担っているが，それと対応するレベルの“リーク電流”と呼ばれている成分が存在している。この成分を明らかにすることによって，神経興奮の伝達とそれにともなう軸索周囲の環境のホメオスタシスと神経におけるその意義と役割についての知見が得られるものである。本実験はヤリイカの巨大軸索を用い細胞内灌流を行いアニオンだけが通過できる条件にして Cl^-（アニオン）チャネルの測定を行った。その結果として，イカ巨大軸索には K^+ 電流と比べて約1/100程度の電流を運ぶことが可能な Cl^-（アニオン）チャネルが存在し，そのイオン透過性は Cl^-, glutamate$^-$ > PO_4^{3-}, F^- の順で，特に Cl^-, glutamate$^-$ にたいしては大きな透過性をしめしたが，逆に PO_4^{3-}, 特に F^- によって著しいコンダクタンスの現象が見られた。又，これらの結果と巨大軸索の生存時間等の比較より，この Cl^- チャネルの活性と生存時間との間にある種の相関があることが判明した。このことは興奮に関与しているチャネル以外の部分において，神経の生存にひつような条件が維持されている可能性を示している。

能動輸送研究部門

概要

本研究部門では，生体膜輸送およびその調節の分子機構について多角的に研究を行うことを本来の研究目的としている。すでに，Naイオン輸送タンパクであるNa, K－ATPaseについてその分子反応機構を詳細に研究し，解析してきた。最近では，グルコースの輸送タンパク（グルコーストランスポーター）についてそのサブタイプおよび細胞内局在を吸収上皮細胞を用いて研究している。また，輸送担体細胞内で大きい表面積を持つ細胞内小胞体膜の浸透感受性およびアミノ酸透過能などについて検索を行ってきた。さらに，ヒト胎盤微繊毛膜を用いてそのアミノ酸輸送機構を解析している。Na, K－ATPaseの細胞内局在と膜内配向を検討するために精製タンパクおよびその合成部分ペプチドに対する蛍光抗体を作製し，尿細管上皮細胞および小腸吸収上皮細胞を免疫組織学的に検索した。糖の分解・吸収に関与する膜結合酵素トレハラーゼについてその膜結合様式および内在性分子修飾機構について解析を行った。単離した小腸吸収上皮細胞についてその側底部形質膜のイオン透過性をパッチクランプ法で研究する試みを行った。また，同細胞を用いてCaの取り込みを蛍光発光法により測定し，老化および高血圧との関連において検索した。最近，脳アデニル酸サイクラーゼのカルモジュリンによる制御機構について研究を始めた。

ドーパミン作動性およびβアドレナリン作動性シグナル伝達系におけるカルモデュリンの関与

藤田道也，夏苅直己，花井洋行

ラット大脳皮質，同線条体から調製したEGTA処理シナプトソーム膜(ESM)のアデニル酸サイクラーゼ(AC)を指標として，カルモデュリン(CaM)，GTP，ドーパミン(DA)・βアドレナリン（βA）作動性アゴニストの作用を調べた。AC活性のCa依存性からACが最大活性を示すpCa6.2ないし5.7においてCaMとGTPの共存効果は加算的ではなく協調的(synergistic)であることが分かった。この効果はCaM依存性ホスホジエステラーゼによるcAMPレベルの変化によるのではない（外来性CaMは本酵素活性に影響しない）。DAとCaM，βAとCaMの効果もGTP存在下に協調的である。最も著明なのは線条体ESMにおけるSKF38393（DAアゴニスト）とCaM，皮質ESMにおけるイソプロテレノールとCaMのGTP存在下の協調的活性化である。ホルスコリンとCaMの間にも協調性が見られた。これらの知見はCaMが受容体－Gタンパク系の奏効体としてのACに作用していることを示唆している。これは，ACのDA・CAMに対する感受性がハロペリドールの慢性投与によって増加し，そのさい膜結合型CaMの増加を伴

っているというGnegyら（1986）の報告に照らして興味のある知見だと思われる。

ラット小腸の単離上皮細胞における Ca channel の同定と検討

花井洋行，亀山正樹，三輪晃子，金子栄蔵，藤田道也

Caイオンは，細胞内外で10^4倍の濃度勾配が存在するため形質膜から受動的に取り込まれ，エネルギー依存性に排出されるとされている。小腸上皮細胞は，極性を有し，刷子縁膜よりsaturableに受動的に取り込まれることが認められているがそれが担体によるものかチャネルによるものか詳細は不明である。また，側底膜からはCa pumpとNa^+/Ca^{2+}交換輸送によって，activeに排出されると考えられている。

〈目的〉　小腸上皮細胞のCa influxの解析を^{45}Caを用いたトレーサー実験と蛍光色素fura－2を用いた細胞内遊離Caイオンのモニターにより行う。

〈方法〉　酵素処理を行わず調整した単離上皮細胞を使用。Ca antagonist (Bay K 8644), Ca antagonist (Nifedipine, Verapamil, Diltiazem) Ni^{2+}，Mn^{2+}等のCa influxに対する効果を観察。

〈結果，考察〉　小腸全域にBay K 8644感受性のCa inflexを認め，それは3μMから10μMまでdose dependentな反応を示した。また回腸を例にとると，そのinfluxはNifedipine (10μM)で23.5%，Verapamil (10μM)で32.4%，Ni^{2+} (300μM), Mn^{2+} (10μM)では，それぞれ92.6%，100%の抑制をした。また，basal infuluxは上記の量のCa antagonistでは抑制されなかったが，50μMのVerapamilで部分的抑制を，Ni^{2+} (800μM), Mn^{2+} (50μM)でそれぞれ97.4%，94.7%の抑制効果を認めた。valinomycinを用い$[K]_0$を変化させてもBay K 8644感受性Ca influxには変化は認めなかった。

以上のことよりbasal influxと，Bay K 8644感受性Ca influxの少なくとも2種のCa influx pathwayを認めたがBay K 8644感受性influxはNifedipine, Verapamilで一部抑制されるもののそれは膜電位非依存性で新しいタイプのCa channelであることが示唆された。

高齢ラットにおける，カルシウム吸収低下の機序

花井洋行，山田正美，夏苅直己
亀山正樹，三輪晃子，金子栄蔵，藤田道也

ヒトでは，高齢化と共に小腸のカルシウム吸収が低下することが知られている。その機序として活性化ビタミンDの低下が指摘されている。ラットでも高齢ラット（24ヶ月）は若齢ラット

（６ヶ月）に比して十二指腸でのカルシウム吸収量の低下が知られているが，腎臓でのビタミンDの活性化酵素のactivityの低下が関与していることが指摘されている。十二指腸吸収上皮細胞自身の変化として刷子縁膜ベジクルを用いた実験で，Ca uptakeの低下が高齢ラットで生じていることが報告されている。

〈目的〉　高齢ラットにおけるCa吸収低下の機序として，十二指腸吸収上皮細胞そのもののCa輸送機構，特に底側膜に存在するCa排出機構としてのCa pump, Na^+/Ca^{2+}交換輸送に変化はないかを検討。

〈方法〉　十二指腸吸収上皮細胞を用いfura2を負荷した後，細胞外に0.50, 140mMのナトリウムを含んだmediumを加えEGTA添加後の細胞内遊離カルシウムの変化よりCa pump能とNa依存性のCa efflux（Na^+/Ca^{2+}交換輸送）の量を６ヶ月と24ヶ月ラットで比較。

〈結果，考察〉　basal levelの細胞内遊離Ca濃度は，６ヶ月と24ヶ月ラットで有意な差は認めない。細胞外Na濃度0mMの時（Ca pump能），EGTA添加後５秒間のCa排出は，それぞれ15.9%，10.3%と24ヶ月ラットで有意な低下を認めている（$P < 0.01$）。$[Na]_0$を50mM, 140mMと同時にNa依存性Ca efflexを測定した場合，EGTA添加後５秒間のCa排出は，６ヶ月と24ヶ月ラットでそれぞれ20.8%，16.3% ($[Na]_0$ 50mM), 22.3%，18.7% ($[Na]_0$ 140mM) といずれも24ヶ月ラットで有意な低下を認めている（$P < 0.05$）。また全Ca排出におけるNa依存性Ca effluxの占める率は24ヶ月ラットで高い値を示した。なお，細胞内ATP含有量は，両者で差を認めず，calmodulin依存性のCa−Mg ATPaseは，24ヶ月ラット群で有意な低値を示していた。

以上のことより高齢ラットでは，十二指腸吸収上皮細胞でのCa pump活性が低下しておりそれは，細胞内ATP含量の差によるものではないことが示唆された。現在，Ca結合蛋白，特にcalmodulinとCa pump activityについて検討中である。

モルモット小腸刷子縁膜小胞のアミノ酸輸送系

山田一夫（生理研，広島大・医・生化）

栄養素の消化吸収は，小腸上部までの種々の消化過程と，消化により低分子化した栄養素が小腸吸収上皮細胞の刷子縁膜より細胞内へ，ついで側基底膜より血管へ移行する膜輸送過程に大別される。膜輸送過程の知見は，初め反転腸管を用いて研究され，その後小腸の遊離上皮細胞の分離，さらに刷子縁膜小胞および側基底膜小胞の調製が可能となり，これらの標品を用いて輸送機構が検討されている。

われわれはモルモット小腸刷子縁膜小胞（BBMV）におけるアミノ酸輸送系を系統的に検討した。Pro, MeAIB, Cys, G1y, Ala, Leu, Met, Phe,Glu, Lysを標識基質として選び，輸送初速度を測定，それぞれについて，Na^+依存生，Na^+非依存性，および単純拡散による輸送部分を求めた。Pro,

MeAIB, Gly は，95％以上が Na^+依存性で輸送され，Cys, Ala, Leu, Met, Phe, Glu は，70－80％が Na^+依存性で，Lys, Asp は，ほぼ100％ Na^+非依存性で輸送された。次いで，Na^+勾配存在下，非存在下における交差阻害実験により，Na^+非依存性のアミノ酸輸送系の解析を行った。その結果，Na^+依存性輸送では Pro, MeAIB に共通な輸送系，Gly の輸送系，Cya, Ala, Leu, Met, Phe に共通な輸送系の少なくとも３つの輸送系の存在が認められた。一方，Na^+非依存性輸送系では Lys の輸送系，Asp の輸送系，Cys, Leu, Phe に共通な輸送系の少なくとも３つの輸送系の存在が認められた (Table 1)。

TABLE I

Amino-acid transport pathways in brush-border membrane of guinea-pig intestine

1. Simple diffusion

2. Na^+-dependent pathways

Primary substrates	Inhibitors		
	total	partial	minimal
Imino (Pro, MeAIB)	Pro, MeAIB	Cys, Ala, Leu Met, Phe, Gly	none
Gly	Gly	Cys, Ala, Leu	none
Neutral (Cys, Ala, Leu, Met, Phe)	Cys, Ala, Leu Met, Phe	Pro, MeAIB, Gly	none

3. Na^+-independent pathways

Primary substrates	Inhibitors		
	total	partial	minimal
Neutral (Cys, Phe, Leu)	Cys, Phe, Leu	Lys	none
Acidic (Asp)	Asp	none	none
Cationic (Lys)	Lys	Cys, Phe, Leu	none

生体情報研究系

神経情報研究部門

概要

神経情報研究部門は視覚神経系における情報抽出の神経機構の解明を目指して，脊椎動物網膜の研究を行っている。これまで主に冷血動物の網膜を研究材料にしてきたが，近年，哺乳類の網膜の知見があいついで報告され，同じ機能を有する網膜神経細胞でも用いる神経伝達物質や伝達物質のレセプターが動物種によって異なることが明らかになってきた。そこで，これまで当部門に蓄積された冷血動物網膜の生理学，薬理学，形態学の総合的な知見をもとに，哺乳類網膜の研究を開始した。

金子と鈴木は網膜双極細胞が特異的に抗プロテインキナーゼC抗体に対する免疫反応性を有することが示唆されてきたが，この免疫反応性を利用して双極細胞のサブタイプを同定することを行ない，ON型双極細胞が免疫反応陽性であること，反応するプロテインキナーゼはα型のものであることを見いだした。

金田，金子及び外国人研究員J. E. G. Downingはネコ網膜から単離した神経節細胞の膜電位依存性チャネル及び伝達物質によって制御されるチャネルの性質を解析し，①W, X, Y型神経節細胞は性質の異なるナトリウムチャネルを持っていること，②アセチルコリンとグルタミン酸は共に興奮性伝達物質であるが，アセチルコリンは閾値濃度に近いような低濃度でも時間経過の早い脱感作を示し，一方グルタミン酸は高濃度でも脱感作を示さないことなどを明らかにした。

外国人研究員G. S. Ayoubは金子と共同してキンギョ網膜双極細胞から伝達物質として放出されるグルタミン酸の定量を行なう実験を行なった。時間的な制約のため，充分な結論を得るには至らなかったが，予備実験で実現の可能性を示唆する結果を得た。

大塚と非常勤の講師河又はカメ視細胞浮遊液を抗原として得たモノクローン抗体を用いて各種脊椎動物網膜錐体視細胞のサブタイプの同定を行ない，下等動物の緑錐体には杆体と相同のアミノ酸配列があることを明らかにした。

受託大学院生の倉橋は嗅覚受容細胞の匂い受容機構の研究を行ない，匂い刺激は嗅細胞の受容分子に捕らえられるアデニールシクラーゼを活性化し，細胞内のcAMP濃度を上昇させ，それが形質膜の陽イオン透過性を上昇させて脱分極性応答が発生することを明らかにした。また，神山はcAMPにより制御される水平細胞のギャップ結合の性質を調べ，網膜水平細胞の光応答の修飾機構を解明する研究を行なっている。外国人研究員の杜煥基は網膜双極細胞の応答に対する神経ペプチドの作用を解析している。

抗 protein kinase C 抗体に対する反応性を指標としたキンギョ網膜双極細胞の分類

鈴木参郎助，細野　道，金子章道

1．はじめに

網膜の第2次ニューロンである双極細胞は光刺激によって脱分極するON型と，過分極するOFF型とに分類されている。また，別の分類法として，杆体視細胞から入力を受けるタイプと，錐体視細胞から入力を受けるタイプとに分類することもできる。ON型双極細胞とOFF型双極細胞とは形態が異なり，前者の軸索終末は内網状層の内側（b層）に位置し，後者の軸索終末は内網状層の外側（a層）に位置するので，網膜切片標本において両者を形態学的に同定することが出来る。われわれは最近キンギョやマウスの網膜から単離した双極細胞を標本として用い，双極細胞の応答発生機序を明らかにする目的で膜イオン電流や化学伝達物質に対す応答を検討しているが，単離した双極細胞では上に述べた形態学的な特徴が失われてON型とOFF型，あるいは杆体入力型と錐体入力型を同定することが不可能であった。最近，Negishiら（1988）は抗プロテインキナーゼC (PKC) 単クローン抗体がドパミン作動性の網状層間細胞と杆体入力型の双極細胞と特異的に反応することを報告した。彼らは抗PKC単クローン抗体がコイやキンギョなどではおそらくON型双極細胞と，ラットでは杆体入力型の双極細胞と反応すると報告している。そこで今回，免疫反応性を精査し，免疫反応性がON型／OFF型に関連して現われるのか，杆体入力型／錐体入力型に関連して現われるのかを明らかにすることを目的とした。抗PKC単クローン抗体に対する反応性が明らかになれば，同定の手がかりに乏しい単離双極細胞の同定が可能になると考えられる。

2．方法

キンギョの剝離した全網膜をZamboni固定液で固定し，抗PKC単クローン抗体と反応させた後，Epon樹脂に包埋・薄切して観察する方法 (Pre－emmbedding) と固定後凍結切片を作製し抗PKC単クローン抗体と反応させ観察する方法（凍結切片法）とを用いた。また，パパインを用いて単離した双極細胞に，抗PKC単クローン抗体を用いてPAP法，ABC法，およびFITC蛍光抗体法により反応させ観察した。用いた抗体はいずれも市販のもので，Amersham社製 (MB5)，および医学生物学研究所 (MBL) 製 (MC－al, MC－a2, MC－a3) のものを使用した。

3．結果および考察

キンギョ網膜凍結切片で抗PKC単クローン抗体に対する免疫反応生を観察すると，形態が異なる二つのタイプの双極細胞に免疫反応性が見られた（図1）。第1のタイプは内顆粒層の視細胞側寄りに大きな細胞体を持ち，内膜状層のb層に大きな軸索終末を持つ双極細胞で，最も強い免疫反応陽性像を呈した。第2のタイプは内顆粒層内側比較的小さな細胞体を持ち，樹状突起が長く，軸索は内網状層のb層に小さな終末として終わる細胞であるが，その免疫反応性は大

型の細胞よりも弱かった。内網状層のａ層には免疫反応性は全く認められなかった。

免疫反応陽性細胞をこれまで報告されているキンギョ網膜双極細胞の形態学的な特徴に照らし合わせると，免疫反応強陽性の大型細胞は杆体から主な入力を受けているON型細胞，免疫反応弱陽性の比較的小型細胞は錐体から主な入力を受けているON型細胞であることが判明した。ON型細胞であると同定した根拠はいずれも軸索終末が内網状層のｂ層に終わっていたことによる。また，内網状層のａ層には免疫反応性が全く見られなかったことからOFF型双極細胞はPKC免疫反応性がないと考えられる。

キンギョの剥離した全網膜の伸展標本で免疫反応陽性細胞の数を数えたところ，免疫反応強陽性双極細胞は431 ± 45/mm^2，弱陽性細胞は1750 ± 471個/mm^{2}であった（図２）。したがって，杆体入力ON型双極細胞と錐体入力ON型双極細胞の比率は１：４である。

われわれは単離したキンギョ双極細胞を便宜的に，形態学特徴から次の４つのグループに分類した。グループⅠはフラスコ型の大きな細胞体，短く太い樹状突起，大きな軸索終末をもつ双極細胞，グループⅡは大きな細胞体を持つが大きな軸索終末の無い細胞，グループⅢは比較的細長い細胞体，長くて細い樹状突起，小さい軸索終末をもつ双極細胞，グループⅣは小さい細胞体，

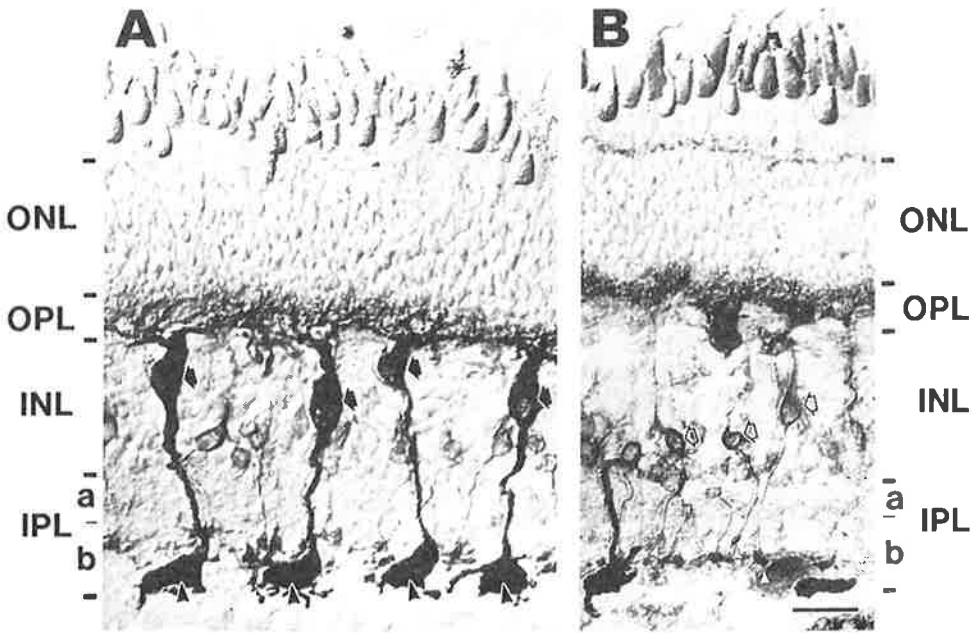


図１　キンギョ網膜凍結切片の抗PKC抗体に対する免疫反応性。微分干渉顕微鏡写真。PKC抗体MC5を250倍に希釈して用いた。２種類の双極細胞に免疫反応性がみられる。
Ａ．免疫反応強陽性の大型双極細胞。この細胞は大きな細胞体（矢印）と大きな軸索終末（矢印）を持っている。Ｂ．免疫反応弱陽性の小型双極細胞（白矢印）。いずれの双極細胞も軸索終末が内網状層のｂ層にある。スケールは20 μm. ONL, 外顆粒層。OPL, 外網状層。INL, 内顆粒層。IPL, 内網状層。

細長い樹状突起，細長い軸索終末をもつ双極細胞である。グループⅠとⅡはPKC免疫反応強陽性であった。グループⅢの45％はPKC免疫反応弱陽性で残りの55％は陰性であった。グループⅣはすべてPKC免疫反応陰性であった（図３）。全体では単離した双極細胞の61％が免疫反応陽性であった。PKC免疫反応陽性の双極細胞は核を除く細胞全体に均一に反応性が認められた。

３種類のアイソザイムをそれぞれ認識するMBL社のモノクローナル抗体MC－1a（サブタイプα），MC－2a（サブタイプβ），MC－3a（サブタイプγ）を用いてPKC免疫反応性がとのサブタイプによるものかを検討した。先の実験でグループⅠの双極細胞がすべて免疫反応陽性であったことを利用して，この細胞に上記３種の抗体を作用させたところ，サブタイプαを認識する抗体に対してだけ反応性が見られた。

抗PKC単クローン抗体による免疫反応性からON型キンギョ網膜双極細胞を同定する手がかりを得ることが出来，今後の生理学的研究に応用して細胞を同定する道が開けた。

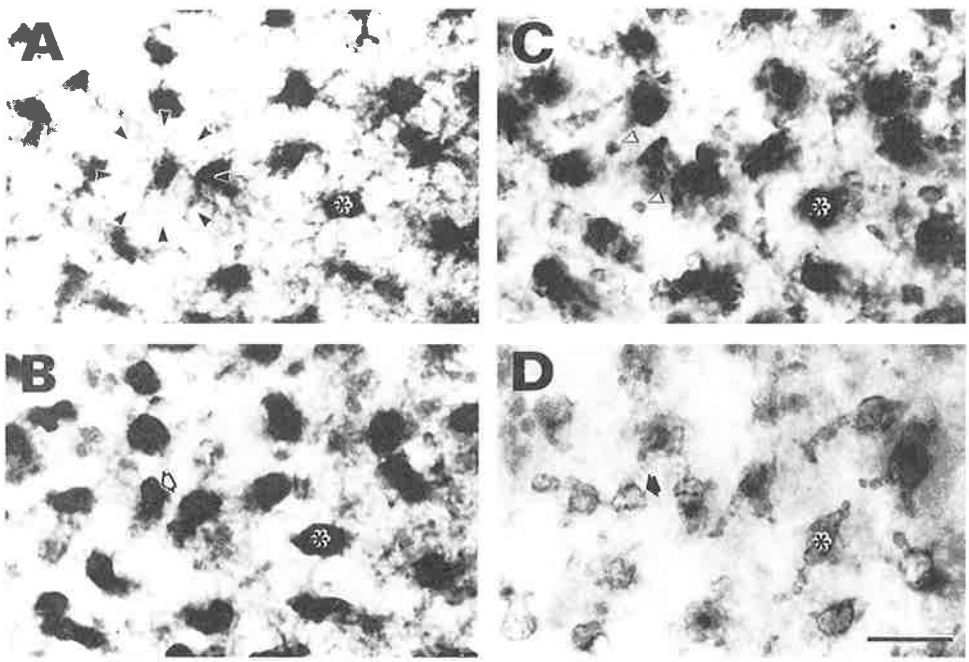


図２。キンギョ網膜伸展標本の抗PKC抗体に対する免疫反応性。微分干渉顕微鏡写真。PKC抗体MC5を250倍に希釈して用いた。A．外網状層に焦点を合わせた写真。免疫反応陽性の樹状突起（矢印）がみられる。B．内顆粒層の外側に焦点を合わせた写真。免疫反応強陽性の大きな細胞体（白矢印）が認められる。C．内顆粒層の中央部に焦点を合わせた写真。免疫反応弱陽性の小型細胞（白小矢印）が認められる。D．内網状層近位側に焦点を合わせた写真。免疫反応強陽性の大きな軸索終末（矢印）が認められる。星印は同一の双極細胞を各レベルで追跡したもの。スケールは50μm。

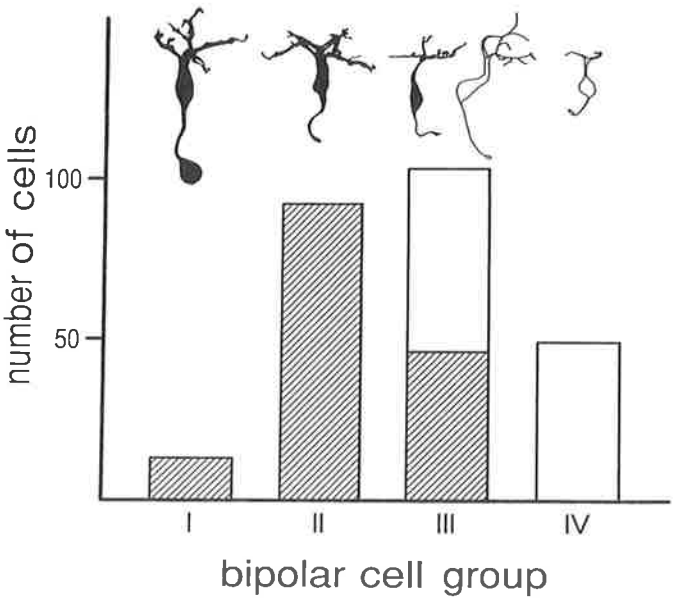


図3。キンギョ網膜から単離した双極細胞の分類と抗 PKC 抗体に対する免疫反応性。Group Ⅰは大型の細胞体，太い樹状突起幹，大きな軸索終末を持つ双極細胞。Group Ⅱは大型の細胞体を持つが軸索終末の無い細胞。Group Ⅲは細胞体が小さくて軸索終末も小型の双極細胞。Group Ⅳは Ⅲと類似しており，さらに小型の双極細胞。Group ⅠとⅡはそのすべてが PKC 陽性であった。Group Ⅲは約半数が PKC 陽性，残りの半数が陰性であった。Group Ⅳは全ての細胞が陰性であった。

視物質のモノクローン抗体を用いた錐体視細胞の研究

大塚輝彌，河又邦彦

網膜の光受容細胞である視細胞には，暗所で働く杆体と明所で働く錐体の2種類がある。錐体の外節には吸収スペクトルの異なる視物質が存在し，外界の光を赤・緑・青の3原色に分解する。網膜における色信号変換の神経機構を解明する研究では，これら3種の錐体の識別が重要な手がかりとなるため，これまで数多くの方法が考えられてきた。大別すると，①顕微分光学的に錐体外節の吸収スペクタルを測る，②錐体視細胞から色光応答の細胞内記録を行い色光感度を求める，③蛍光色素の選択的な取り込みや酵素化学反応（NBT など）を利用する，さらに④油滴などの形態学的な特徴を用いる方法などが報告されている。本研究は形態学的な特徴を有しない魚類や哺乳類などの錐体を識別する新しい手段として，視物質の抗体を用いて3種類の錐体を識別する研究方法を検討した。

ヒトの杆体と3種の錐体視物質の1次構造は，Nathans と Hogness らによって既に全解読されている。錐体視物質は約350個のアミノ酸からなり，赤と緑錐体の視物質のアミノ酸配列はほぼ相同であるが，赤と青の錐体視物質の相同性は約半分であることなどが明らかになっている。そこで，これらの錐体視物質のアミノ酸配列の違いを認識する抗体を用いれば，3種類の錐体を識別することが可能となる。本研究では，Gauer ら (Vision Res., 1988) がカメ網膜を単離した細胞浮遊液を抗原として得たモノクローン抗体 (MAb15－18) を用いた。この抗体はウシ・ロドプシンの190－197番目のアミノ酸配列を認識することが明らかになっている。

実験には，魚類・爬虫類・鳥類・霊長類などの網膜を用いた。剝離網膜から，全載標本と縦断切片（氷結切片及びエポン包埋切片）を作製し，MAb15－18 に対する免疫反応性を調べた。これらの動物の剝離網膜は Zamboni 液で固定し，MAb15－18（10－3,000倍希釈）に2日，抗マウス IgG（100倍希釈）に3時間，さらに avidin－biotin 複合体 (Vector Lab.) を用い，標識物質 (HRP) を DAB で可視化した。

まず最初に，クサガメ網膜の視細胞の免疫反応性を調べた。カメの視細胞は油滴の有無と色から，杆体と3種類の錐体を形態学的に容易に識別出来る。MAb15－18 は杆体と緑錐体の外節に強い陽性反応を示した。さらに，1,000倍以下の低倍希釈では，青及び一部の赤錐体の外節にも弱い陽性反応が見られた。アメリカ産のアカミミガメでも同様の結果が得られた。これらの結果は表1にまとめた。

次に魚類・鳥類・霊長類の剝離網膜の反応性を調べた。魚類と鳥類はカメと同様に杆体と緑錐体に陽性反応を得た。さらに鳥類では低倍希釈の MAb15－18 に対して，一部の赤錐体外節にも弱い陽性反応が見られた。一方，サルでは杆体外節にのみ陽性像がみられ，錐体外節は低倍希釈

表1　MAb15－18 のカメ網膜視細胞に対する免疫反応性

視細胞の種類		油滴の種類		抗体の希釈倍率			
		クサガメ	アカミミガメ	3,000	1,000	500	10
杆体		ナシ	ナシ	++	++	++	++
赤錐体	単	赤色	赤色	−	−	−	−
	単	薄緑色	薄緑色	−	+	+	+
	複（主）	黄色	橙色	−	−	−	−
	複（副）	ナシ	ナシ	−	−	−	−
緑錐体	単	橙色	黄色	++	++	++	++
青錐体	単	無色	無色	−	+	+	+

カメ網膜の視細胞は杆体と赤・緑・青の3種の錐体から成る。錐体には単一錐体（単）及び複合錐体（複）の主錐体（主）と副錐体（副）がある。これらのサブタイプは，視細胞内節にある油滴の有無と色から形態学的に識別出来る。

に対しても何等反応しなかった。ヒトの網膜もサルと同様に錐体外節には反応が見られなかった。

これらの所見から，①魚類から鳥類までの緑錐体視物質には，杆体と相同のアミノ酸配列がある，②哺乳類は杆体と緑錐体視物質に相同の配列が無いことが明らかになった。これまで視物質の抗体を用いた脊椎動物網膜の免疫組織化学の研究が数多く報告されているが，得られた結果に整合性が無く，混乱を極めている。杆体視物質であるロドプシンのアミノ酸配列は，ハエからヒトまで相同性が良く保存されている。一方，色覚に関係する錐体視細胞は進化の過程で大きな変遷を経ているため，鳥類を境にして錐体視物質の構造はかなり大きく異なっていると推定される。本研究の結果は，錐体視物質の構造に系統学的な種特異性があることを初めて示した報告であり，今後の視物質のモノクローン抗体を用いた研究に重要な手がかりを与える所見である。

単離ネコ網膜神経節細胞の電位依存性ナトリウム電流のスパイク発射頻度に与える影響

金子章道，金田　誠

緒言：　網膜の出力信号を高次中枢へ伝える神経節細胞は，それまで緩電位応答によって処理されてきた網膜内の光刺激に対する信号をスパイク列に変換する役割を負っている。ネコ神経節細胞は光刺激に対する応答の性質からあX, Y, W の３つのタイプに分類されている。X型とY型細胞は高頻度のスパイク発射を示すが，W型細胞のスパイク発射頻度は低い。こうした応答様式の違いは，シナプス入力の違いにも起因するであろうが，形質膜の興奮性の違いによってもたらされる可能性も考えられる。しかし，その機構についてはほとんど知られていない。

本研究では視細胞，水平細胞，双極細胞のイオン電流の解析に大きな成果を収めたパッチクランプ法を用いて，ネコ網膜神経節細胞のイオン電流を解析し，これらのイオン電流の性質と神経節細胞の応答様式との関係を考察した。

方法，結果，考察：　多くの網膜細胞は単離しても特徴的な形態を保っているので，顕微鏡下で同定することは容易である。しかし，神経節細胞の軸索は単離時に失われてしまうので，神経節細胞とアマクリン細胞とを形態だけから同定することは困難であった。そこで，われわれは蛍光色素 (DiI) を神経節細胞の軸索投射部位である上丘および外側膝状体へ注入し，逆行性に神経節細胞を標識したのちに，網膜から神経節細胞の単離を行う方法を開発した。この方法によって蛍光顕微鏡下で蛍光像の陽性な細胞を神経節細胞として識別することが可能になった。すでにこれまでの形態学的研究からX, Y, W 型神経節細胞は大きさが異なること，投射先が異なることが知られている。逆行性に標識された単離神経節細胞の大きさの分布を調べると，形態学的に予想される分布とよく一致した。すなわち，上丘に色素を注入した例では比較的小型のW細胞が主に標識され，一方，色素を外側膝状体に注入した場合には比較的大型のX細胞と小型のW細胞が標識

された。大型のY細胞は絶対数が少ないため，明瞭な集団を形成しなかった。

current clamp の条件下に神経節細胞を通電によって脱分極させると，スパイク発火が認められたが，スパイク頻度は細胞によって異なっていた。7例中2例は単発のスパイク発火を示したが，残りの5例は繰り返し発火を示し，繰り返し発火の数は2－13発とかなりの変動が存在した。（カリウムおよびカルシウム電流を抑制した条件下で）voltage clamp を行い，神経節細胞を －95 mV の保持電位から －5mV へ脱分極すると一過性の内向きの電流が認められた。この内向き電流は脱分極刺激後 2－3msec でピークに達し，10msec 以内に完全に不活性化された。またテトロドトキシン投与により可逆性に抑制され，外液ナトリウムをコリンで置換しても内向き電流が消失した。以上の結果から，この一過性の内向き電流は電位依存性ナトリウム電流であると同定した。ナトリウム電流は －55mV より脱分極側で活性化され，－25mV 付近で最大となり，＋60mV 付近に逆転電位を持っていた。逆転電位は外液ナトリウム濃度を変化させると Nernst の式に従って変化した。

次に，ナトリウム電流のキネティクスを調べた。activation curve および steady－state inactivation curve には細胞による違いは認められなかったが，脱分極によって不活性化したナトリウ

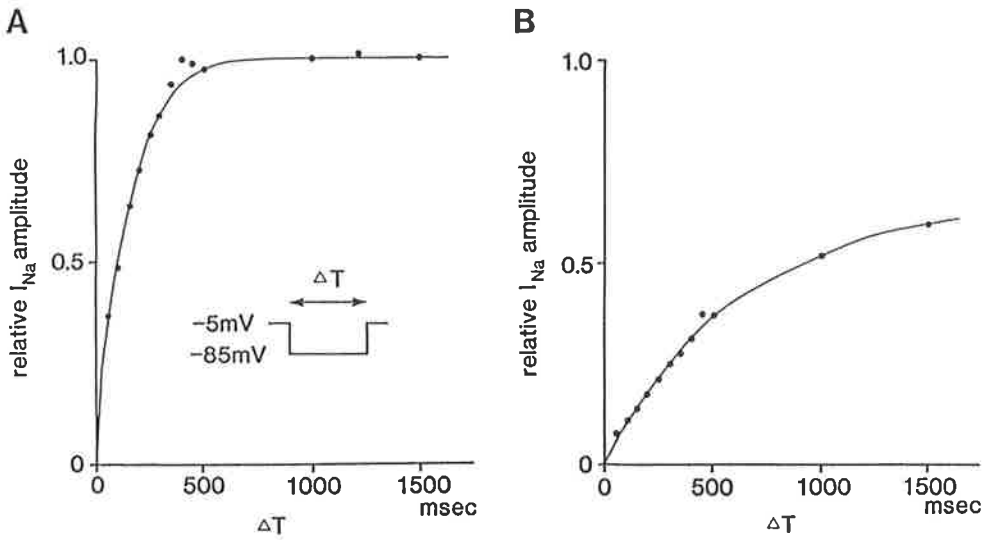


図1　ナトリウム電流の回復曲線

－5mV に細胞を7秒間膜電位固定しナトリウム電流を不活性化したのち，－85mV への過分極刺激を与えるとナトリウム電流が再活性化してくる。ここで再び －5mV への脱分極刺激を与えると，再活性化されたナトリウム電流を観察できる。図ではこの再活性化されたナトリウム電流を，－85mV から －5mV へ脱分極させたときのナトリウム電流の大きさを1として縦軸にとり，過分極の時間を横軸にとって示してある。過分極時間が長くなるにしたがってナトリウム電流は再活性化してくるが，その回復速度は細胞毎に著しい違いが認められる。図には二つの異なる細胞からえられたナトリウム電流の回復曲線を示してある。

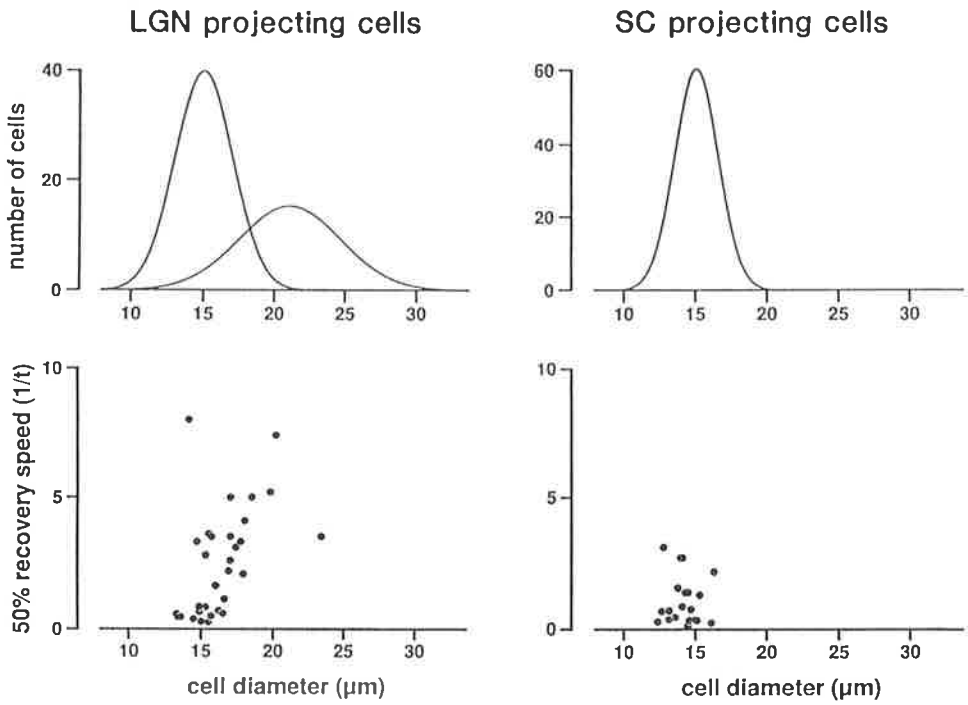


図２　ナトリウム電流の回復スピードと細胞直径の関係
上段　標識された細胞の直径の分布より推定したＸ細胞，Ｗ細胞の分布曲線。15μm付近のピークはＷ細胞，20μm付近のピークはＸ細胞を示す。細胞直径は細胞体の長軸と短軸の平均値。
下段　回復スピードと細胞直径の関係
　　縦軸：回復スピード
　　横軸：細胞直径
左：外側膝状体(LGN)注入例
右：上丘(SC)注入例

ムコンダクタンスが過分極パルスによって再活性化される過程には細胞によって大きな違いが認められた（図１）。そこで再活性化過程の比較を行なうため，ナトリウム電流が50％回復するのに要する時間を求め，その時間の逆数を回復のスピードと定義して細胞毎のナトリウム電流の回復速度の比較を行った（図２）。色素を上丘に注入して標識した例では比較的小型で回復スピードの遅い細胞が集団を構成した。一方，色素を外側膝状体に注入して標識された例では，回復スピードの遅い小型の細胞集団（上丘注入例で見られた細胞と同じグループだと考えられる）の他に，回復スピードの速い比較的大型の細胞が認められた。大きさの分布と回復速度の分布が一致したことから，われわれは回復スピードが速いのは比較的大型のＸ細胞，回復スピードが遅いものはＷ細胞であると結論した。

上でも述べたように，Ｘ, Ｙ, Ｗ型神経節細胞は光刺激にたいするスパイク発射頻度が異なることが知られている。すなわちＸ, Ｙ細胞は "brisk spike" と呼ばれる高頻度スパイク応答を示し，

W細胞は “sluggish response” と呼ばれる緩慢なスパイク応答を示す。今回の実験で得られたナトリウム電流の回復スピードの違いが，このX細胞，W細胞を特徴ずけているスパイク発射頻度の違いを生む一因子であると考えられる。すなわち，ナトリウム電流の回復スピードの速いX細胞では高頻度スパイク発射が可能であり，一方，回復スピードの遅いW細胞では低頻度のスパイク発射しか出来ないものと考えられる。今後さらに他のイオン電流がこのスパイク発射頻度にどのような影響を与えるかを検討するための実験が必要であると考えている。

液性情報研究部門

概要

液性情報研究部門は，平成元年８月に助教授の小坂俊夫が九州大学解剖学教室に教授として転出した。新たに平成２年１月より月田承一郎が教授に着任し，これまでの本部門の研究と異なった新しい領域での研究を開始した。したがって，ここで報告すべき本研究部門の平成元年度の研究活動はほとんどない。以下，平成２年度の報告につなげる意味で，月田の前任地（東京都臨床医学総合研究所）における研究方針と平成元年度の研究活動の概要を記す。

細胞骨格と総称される細胞内線維構造の構造と機能はきわめて多彩である。これらの構造は細胞になんらかの構造的基盤を与えるだけでなく，細胞内の情報伝達機構にも重要な役割を果たしていると考えられているがその実体は明らかではない。

多細胞動物の分化発生の機構を考えるとき，細胞が他の細胞を認識し，正しく接着するメカニズムが問題となる。また正しく接着したという情報が如何にして細胞質の奥深くにある核に伝わり，細胞の状態を変えていくかということも癌研究をはじめ現代の医学生物学研究の大きな問題点である。我々は，この接着という情報が核へ伝えられていく過程で細胞骨格が果たしている役割を明らかにすべく研究を進めている。一昨年，アクチンフィラメントが裏打ち構造を介して結合している Adherens Junction を高純度で単離することに初めて成功し，昨年度はこの単離 AJ を用いてその細胞膜裏打ちタンパク質の分子構築を解析した。その結果，ラディキシンと命名した分子量 82kd のアクチン調節タンパク質をはじめとする，一群の興味深いタンパク質を同定することに初めて成功した。そこで，平成元年度は細胞接着の制御や情報伝達にかかわると考えられるこれらのタンパク質の構造と機能の解析をさらに進め，多くの新しい知見を得た。また，単離 AJ を用いたチロシン燐酸化反応の解析など接着装置における情報伝達機構を直接解析する方法を確立することを目標として研究を進め，ある種のプロト癌遺伝子産物が AJ の裏打ち構造に局在するという興味深い結果を得た。

その他，急速凍結法を用いて細胞内現象の動的側面をコマ取り写真として解析するシステムの開発にも取り組み，Caged 化合物を用いたユニークな凍結システムを開発した。

高次神経機構研究部門

概要

当部門においては，１）視覚野神経回路の興奮の時空間パターンの光学的計測，２）神経移植による視覚伝導系の再生現象の研究などのテーマで，感覚情報処理の神経機構の解明を試みている。平成元年においては，項目１の研究として，ラットの視覚野の脳切片標本を電位感受性色素(RH155)で染色し白質を刺激したときに生じる光学的反応を128素子の光ダイオードアレイと冷却型CCDカメラにより記録し，その光学的反応を微小電極により記録される視覚野細胞の細胞内反応と比較することにより光学的記録法の信頼性を検討した。光学的応答と細胞内応答の間には視覚野の全層でよい一致がみられ，光学的応答が細胞内応答を忠実に反映することが確かめられた。また，白質刺激の後一定感覚でストロボ光照明を与え，光学的応答をvideo cameraで撮影することにより，白質刺激後興奮が視覚野の神経回路を伝播する様子をイメージとして捉えることができた。この手法は視覚野の神経回路の時空間特性を研究するための有力な手段であることが示された。

第２の項目については，神経移植による視覚伝導路の神経再生過程の研究を行なった。網膜から四丘体上丘聴に至る視覚伝導系を切断したのち，座骨神経移植により切断部を継ぎ，数カ月後に電気刺激により調べると網膜から四丘体上丘に至る神経路が再生されていることが確認され，さらに，この神経再生にラミニンが関与していることが可能性が示唆された。

大脳皮質視覚野における電位感受性色素による光学的応答と細胞内電位との比較

山中篤，谷藤学，外山敬介

大脳皮質視覚野では，神経結合が層構造をもつため，神経活動にともなって流れる電場電流は層構造に垂直な方向に流れることが知られている。我々は昨年，フォトダイオードアレイを用いて，電位感受性色素(RH155)で染色した視覚野脳切片の神経活動を光学的応答として計測し，その光学的応答が細胞内電位の総和を表わしていると仮定することによって，その空間的な一次微分として細胞内の電流の総和を，また，細胞外電場電位の一次微分として細胞外の電流を求め，両者の空間分布及び時間経過が良く一致することを明らかにした（89年年報)。このことから，光学的応答は神経細胞の細胞内電位応答を忠実に表わしていると考えられる。本年度は，各層において細胞内記録を行ない，光学的応答と比較することによりこの結論をさらに確かめることを試みた。

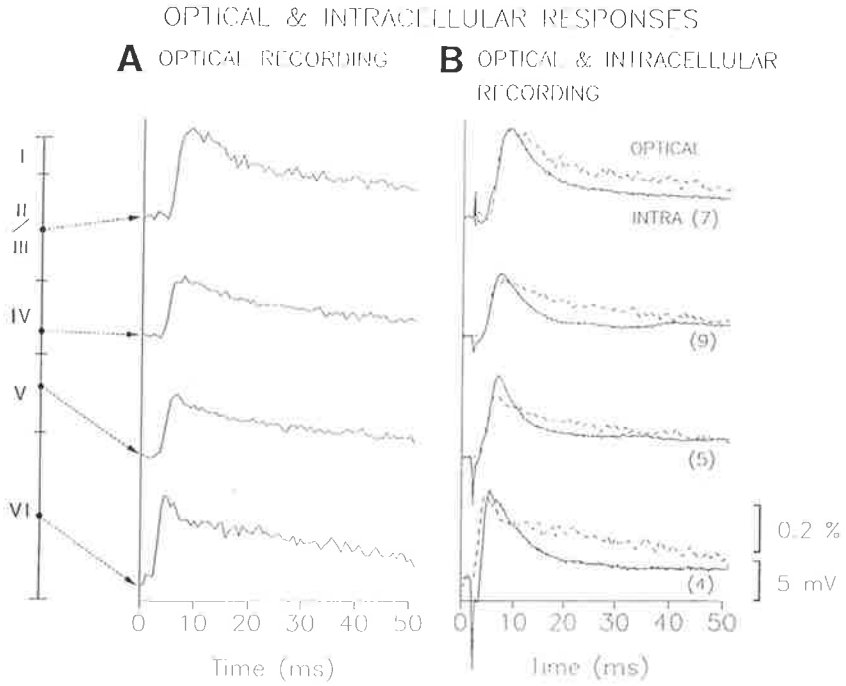


図1　白質刺激による光学的応答と細胞内応答との比較。A：フォトダイオードアレイにより得られた各層での光学的応答。B：各層における細胞内応答を加算平均したトレース（実線）。括弧内の数値は
加算平均に用いた細胞の数を示している。点線のトレースはAに示した光学的応答。

生後4週から8週のラット大脳皮質視覚野の前額断脳切片より，微小電極により細胞内記録を行なった。静止電位が－46mV以下の神経細胞について，光学的測定を行なうときと同一の条件で白質刺激を行い，そのとき得られる細胞内応答を記録した。電位感受性色素の応答は，応答を検出する部位に含まれる神経細胞の細胞内電位の総和に比例すると考えられるので，各層でサンプルされた細胞内応答の加算平均を行ない，フォトダイオードアレイによって得られた各層での光学的応答と比較した。フォトダイオードアレイによる光学的応答の記録は昨年と同様の方法により行なった（89年年報）。

図1Aは，白質刺激に対する光学的応答の典型的なパターンを示している。光学的応答の潜時は深層から浅層に近づくにつれ大きくなり，それぞれの応答の波形は早い増大とゆっくりとした減少の過程より成っている。この観測は，新鋭興奮の伝播の遅れにより潜時が浅層では大きく，また，それぞれの光学的な応答が興奮性シナプス電位を反映していると考えられる。光学的応答は，通常の細胞内記録でみられるような抑制性のシナプス電位に対応する成分を欠いている。これは，細胞内応答そのものが，過分極性の応答を含んでいないためであるのか，あるいは，グリア細胞のような神経細胞以外の細胞内電位変化，電位変化とは直接の関係を持たない光学的応答

等が重畳されているためであるのかが明確ではない。この点を明らかにするため，細胞内記録を行なった。十分に深い静止膜電位を持つ細胞においては抑制性シナプス電位はほとんど認められなかった。さらに，光学的応答との対応関係を検討するために，細胞内電位の各層における加算平均と図1Aの光学的応答を重ねて示したのが図1Bである。実線で示す細胞内応答の潜時と立ち上がりの波形は点線で示す光学的応答ときわめてよく一致しており，また，光学応答の減少の過程もその傾向は細胞内電位の変化と類似している。これらの事から，大脳皮質視覚野において，光学的応答が，神経細胞の細胞内電位の総和を反映していると考えられる。しかし，光学的応答の持続時間が細胞内応答より全体に長くなっていることは，グリア細胞等の応答がある程度重畳されている可能性を示唆している。

冷却型CCDカメラによる視覚野神経活動の時空間パターンの解析

谷藤　学，山中　篤，外山敬介

88年年報において，我々は，テレビカメラとシャッターを組み合わせることによって，大脳視覚野脳切片において電位感受性色素による光学的応答の空間パターンが得られることを示し，白質を刺激したときの空間パターンが層構造に垂直な方向に広がっているばかりでなく，水平方向に伝播している可能性を示唆した。白質を刺激したときの大脳視覚野のシナプス電流は，単シナプス性と多シナプス性の成分が層依存的に局在することが電流源密度解析により示されている。これらの成分の2次元的局在を明らかにするため，冷却型のビデオカメラによる光学的応答のイメージ化を試みた。

ラット脳切片の作成，電位感受性色素による染色の方法等は，前報告と同様である。光学的応答の空間パターンは，低雑音，高輝度分解能の冷却型CCDカメラを用いて，次のようにして得た。①まず，カメラの受光面の走査を一時的に停止する事によって，テレビカメラを受光面に対する映像信号の蓄積が可能な状態（フレームブランキング状態）におく。②次に，試料を刺激後，一定の時間をおいて，ストロボスコープにより試料を短時間(50 μs)露光する。③このときテレビカメラの受光面に蓄積された試料の映像を，フレームブランキング状態を解除することによって読みだす。この一連の操作を刺激のある場合とない場合を交互に20回繰り返し，その差分加算画像を画像処理装置により得た。この方法では露光されている時間の間の応答のみを切り出して記録することができるため，刺激と露光時間との感覚を順次変えることによって，刺激に対する応答パターンの時間経過を得ることができる。我々は露光の手段としてこれまでメカニカルシャッターを用いてきたが，本研究においては，ストロボスコープを用いることにより，最大50 μsまで時間分解能をあげることができた。このようにして，大脳視覚野のスライス標本を白質刺激したときの光学的応答の空間パターンを，1msおきに記録し，同一スライスで細胞外電場

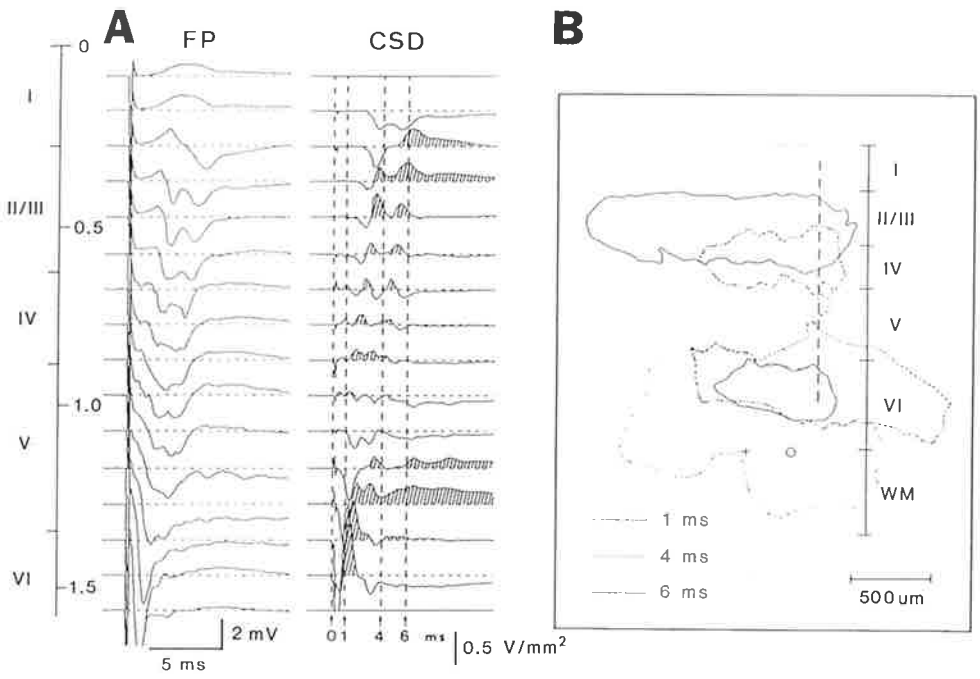


図1　白質刺激に対する神経反応の電流源密度解析及び光学的応答の空間パターン。A：細胞外電場電位 (FP) の記録より求めた電流源密度解析 (CSD)。正の電流源密度は細胞内応答を引きおこすシナプス電流をあらわしている。B：光学的応答の空間パターンより得られた0.075％以上の応答を示す領域。外枠はカメラの受光面を示している。刺激と光学的応答との時間間隔は 1ms（‥‥），4ms（----），6ms（——）である。層構造を横切る点線は細胞外電場電位の記録を行なったトラックを示している。刺激電極は○（陰極），＋（陽極）で示している。

電位をⅥ層からⅠ層にわたって記録し，電流源密度解析を行なって得られる単シナプス性及び多シナプス性の電流源と光学的応答との比較検討を行なった。

図 1A に，電流源密度解析の結果を示す。単シナプス性と考えられる電流応答がⅣ層・Ⅱ／Ⅲ層下部及びⅥ層に見られ，それぞれ潜時は 2－3ms と 1－2ms であった。多シナプス性の電流応答はⅤ層下部及びⅣ層上部からⅡ／Ⅲ層にかけて見られ，それぞれ潜時は 3ms と 4－5ms であった。図 1B は，このスライスについて得られた光学的応答の空間パターンから 1ms, 4ms, 6ms の潜時で得られた光学的応答の空間パターンを選び，0.075％より大きな応答を示す領域を重ねて表示したものである。潜時 1ms に刺激電極の周辺に見られる光学的応答は，4ms には，Ⅳ層とⅡ／Ⅲ層下部の限局された領域と，Ⅵ層とⅤ層下部の層に沿った広い領域に応答が伝播し，さらに，6ms には，Ⅳ層上部・Ⅱ／Ⅲ層の層構造に沿った広い領域に光学的応答が見られた。ここで示した光学的応答がシナプス電流の潜時より，1－2ms 遅れていると仮定すると，細胞外電場電位の記録を行なったトラック上での光学的応答は電流源密度解析の結果とよく合致する。す

なわち，Ⅳ層とⅡ／Ⅲ層下部で見られた単シナプス性の応答，Ⅵ層でみられる単シナプス性の応答及びⅤ層下部の多シナプス性応答は，4msの潜時におけるⅣ層とⅡ／Ⅲ層下部の光学的応答とⅥ層からⅤ層下部にかけての光学的応答に対応し，Ⅳ層上部・Ⅱ／Ⅲ層の多シナプス性の応答は6msにおける光学的応答に対応すると考えることができる。このような応答の遅れは，シナプス電流の潜時が細胞内応答の立ち上がりに同期していると考えられれのに対し，図2Bでは，光学的応答の立ち上がりではなく，比較的大きな光学的応答を示す領域を表示しているためであろう。また，1msの潜時における光学的な応答は，その潜時から順行性あるいは逆行性のスパイクをおもに反映していると思われる。以上の結果から，大脳視覚野における神経活動の伝播は層状構造を横切る方向だけでなく，Ⅳ層からⅡ／Ⅲ層への多シナプス性の結合，Ⅴ層下部及びⅥ層の応答は，層構造に沿って空間的に大きく広がっていることが示唆された。しかし，我々の解析では，軸索伝導速度の違い，遠位部と近位部への信号伝播の時間的な差は考慮されておらず，また，光学的応答の立ち上がりを検出しているわけでなく，単シナプス性の応答と多シナプス性の応答の分離には曖昧な点が多い。さらに検討が必要であると考えられる。

坐骨神経移植による哺乳動物視神経の再生過程

福田　淳

本研究では，成熟ハムスターの視神経を切断し坐骨神経移植による軸索再生の形態学的研究を行った。まず，その起始細胞である網膜神経節細胞の細胞体の大きさと樹状突起の形態について調べ，次に移植神経の断面を光学顕微鏡，電子顕微鏡を用いて調べ，どの構成成分に沿って軸索再生が起こっているかを明らかにした。さらに，最近培養系において，神経突起伸展効果があるとされている細胞外マトリックス分子の一つであるラミニンの存在を免疫組織化学的に検索し，正常坐骨神経，視神経，移植坐骨神経の間で比較した。

1）軸索再生した網膜神経節細胞の形態：

成熟ハムスターの視神経切断端に同一個体の坐骨神経を移植吻合し7－8週後に坐骨神経を露出し移植部分から1㎝以遠で切開を加えた後，逆行性標識のための蛍光色素（ローダミンデキストラン）を注入した。3－5日後に動物を4％パラフォルムアルデヒドでかん流固定し，網膜全伸展標本を作成して蛍光顕微鏡下で観察した。標識された細胞の分布はマイクロスキャナーを用いて調べた。その結果，軸索再生した神経節細胞は網膜全体に分布しており，その細胞体の大きさは正常動物での分布をカバーすると同時に，全体として，より大きい傾向があった。また，樹状突起まで良く標識された細胞では正常の形態を示すもののほかに，非常に細い樹状突起を持つものや突起の数の極めて少ないものなど異常な所見を示すものがあった。これらは恐らく，一度変性した樹状突起から新たに再生したものと思われる。また，軸索突起についても，明らかに樹

状突起の分枝から出ているもの，極端なループをなして長い距離を経て視神経乳頭に向かうものなどが見られた。これらも，おそらく視神経軸索再生の結果であろう。

2）移植片断面の光学顕微鏡，電子顕微鏡的観察：

移植を施した動物を4％パラフォルムアルデヒドでかん流固定し，摘出した移植片をさらに，0.2％ピクリン酸，4％パラフォルムアルデヒド，0.5％グルタールアルデヒド液に2時間浸透させる。さらに，2％4酸化オスミウムで2時間固定した後，アルコールで脱水し，エポキシレジンに包埋した。厚切り切片はトルイジンブルーで染色し，光学顕微鏡で観察した。超薄切片は酢酸ウランとクエン酸鉛で染色し電子顕微鏡で観察した。移植片の厚切断面の光学顕微鏡での観察により，多数の変性した神経線維とシュワン細胞にまじって明らかに再生線維と思われる像があちこちに見られた。電子顕微鏡的観察の結果，再生線維はシュワン細胞の細胞質に囲まれて正常と同様の厚い髄鞘を被ったものも見られたが，多くは中，小型の軸索径であるにもかかわらず，大きな直径の厚い髄鞘をかぶりしかもその一部が変性過程にあり，あたかも軸索直径にあわせて髄鞘を再編成しているとおもわれる像も観察された。一般に，無髄の再生軸索は群集することが多いが，それらのいずれもが必ずシュワン細胞の細胞質突起か基底膜に取り囲まれていた。

3）間接免疫抗体法によるラミニンの同定：

移植手術後8－12週のハムスターを4％パラフォルムアルデヒドで灌流固定し，移植片を摘出し緩衝生食液で洗浄した後，4％グリシンにつけ非特異的反応を防いだ。クライスタットで切片を作成し，空気乾燥させ緩衝生食液で再び湿らせた後，ウサギ抗ラミニン抗体で1時間処理した。さらにその後FITC標識抗ウサギ1gGに反応させた。反応の終わった切片を緩衝生食液で洗浄して，カバーグラスを載せて検鏡した。健常動物も同様に灌流固定し，コントロールとしての視神経及び坐骨神経切片も同様の免疫組織化学的検索を行った。正常坐骨神経での抗ラミニン抗体免疫反応陽性構造は，規則正しい正円が楕円の環状を呈していたが，移植片では大小不整で不規則な配列を示した。いずれも，おそらくラミニンを含んだ基底膜が染色されているものと考えられる。コントロールとして同様に反応させた視神経では，血管壁と神経外皮以外にはまったくラミニン陽性構造はみられなかった。

2），3）の結果は，再生軸索はシュワン細胞質とその基底膜に沿って再生することを確認するとともに，もと底膜成分のひとつであるラミニンが*in vivo*の軸索再生過程においても突起の接着及び伸展促進効果を持つ可能性を示唆している。

情報記憶研究部門

概要

部門の研究は神経系の可塑的変化と栄養因子による神経機能の維持機構の解析を主眼としてきた。神経細胞には古典的伝達物質の他に多種のペプチドが存在する。これらのペプチドは伝達物質かあるいはシナプス伝達の修飾因子を一般に仮定されている。1982年に見いだされた神経ペプチド，カルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene－related peptide ; CGRP) は多種の神経細胞に存在する。CGRP は末梢神経では感覚神経にも運動神経にも存在し，神経筋伝達は CGRP の投与によって影響を受けない。したがって，この神経ペプチドは伝達物質あるいは伝達修飾因子ではなく，一種の神経栄養因子であろうと示唆された。事実，培養筋細胞に CGRP を投与するとアセチルコリン受容体の合成が促進されることが報告された。我々も，1988年に CGRP が運動神経終末端の発芽形成を抑制することを報告した。昨年，我々は高感度酵素免疫測定法による CGRP の定量法を開発し，この手法により CGRP が運動神経においても感覚神経においても細胞体から末梢へ１時間に約１㎜の速度で軸索輸送されていることを発表した。これらの結果は CGRP が神経栄養因子である可能性を支持する。本年度は，細胞体から輸送された CGRP が，事実，感覚神経あるいは運動神経の終末端から放出するかを検討し（部門研究報告参照），さらに細胞体におけるこのペプチドの合成がどのような機構によって調節されるかを解析した（共同研究報告参照）。

筋神経終末端からのカルシトニン遺伝子関連ペプチドの放出

久野　宗，樫原　康博，坂口　雅彦

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は末梢の感覚神経及び運動神経の細胞体で合成されその神経終末端へ軸索輸送により運搬される。このペプチドは神経の古典的伝達物質と共存し，その伝達物質と同様に Ca 依存性に末梢神経終末端から放出されると仮定されているが実験的には証明されていない。本研究では，ラットの筋神経を用い CGRP が事実，感覚神経，運動神経の終末端から放出されるか，その放出の Ca 依存性は古典的伝達物質の放出の Ca 依存性と定量的に同一であるかを検討した。

(1) 方法：

ラットの下肢から摘出し“ひらめ” (soleus) 筋を，Krebs 液を満たした容積約 7ml のプラスチック皿に固定して95％ O_2 － 5 ％ CO_2 ガスの飽和によって維持した。この標本にテトロドトキシン存在下で高濃度の K イオンを投与するか，あるいはクラーレの存在下で神経を刺激し，その

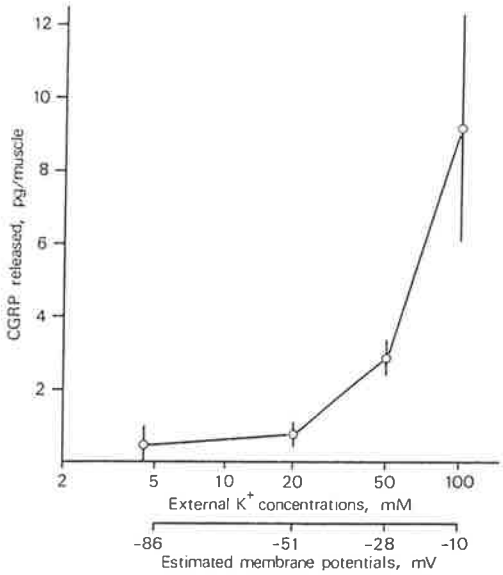


図1　CGRP の放出量と添加した外液K濃度の関係

際に溶液中に放出された CGRP を酵素免疫測定法により定量した。

(2) 高濃度Kイオンによる CGRP の放出：

外液のK濃度を正常 (4·5mM) から 100mM まで変化させ，これらの溶液を 7 分間投与した。溶液の NaCl の濃度は 35mM に固定し，KCl 濃度に伴う浸透圧の変化は choline chloride により調節した。CGRP の放出量は投与した溶液のK濃度に比例して増加した。図 1 はこの結果を示す。20mM のKでは CGRP 放出に有意の上昇は見られないが，K濃度を 50mM あるいは 100mM に増加させると CGRP の放出は急激に上昇した。これらの結果から，このペプチドは神経の脱分極により放出すると結論される。筋を含まない末梢神経のみあるいは慢性的に除神経したひらめ筋に高濃度のKを作用させても CGRP の放出は観察されなかった。したがって，脱分極によって放出される CGRLP は筋の神経終末端に由来すると結論される。

(3) CGRP 放出の Ca 依存性：

100mM のK濃度の投与による CGRP の放出に対して外液の Ca 濃度を変化させその放出の Ca 依存性を検討した。Ca 濃度，0.1～2mM の範囲で，CGRP の放出量は近似的に外液 Ca 濃度の 1 乗に比例した。神経筋接合部におけるアセチルコリンの放出量は Ca 濃度の 4 乗に比例することが知られている。これらの結果は CGRP の放出が古典的伝達物質の放出とは異なった機構に依存することを示唆する。

(4) 感覚神経と運動神経に由来する CGRP の放出：

筋神経には運動神経線維も感覚神経線維も含まれているので，上記の CGRP の放出がいずれの神経終末端に由来しているかは不明である。坐骨神経を 2Hz の頻度で 6 分間刺激した場合，

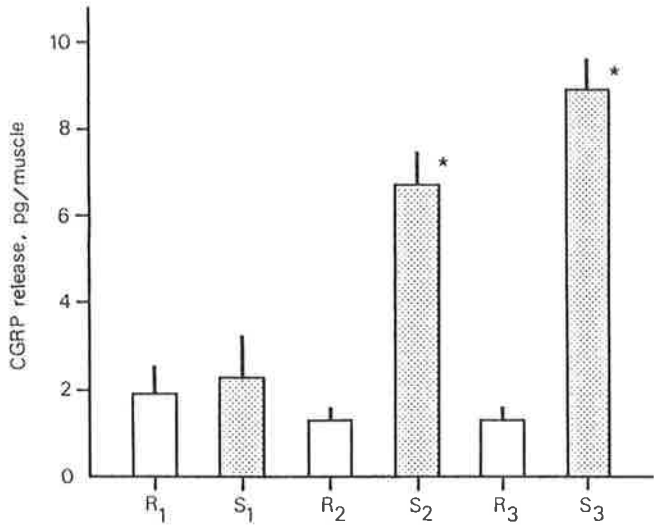


図2　腰髄後根の逆行性刺激によるひらめ筋からのCGRPの放出。R，刺激なし。S1, 域値の3倍の強度 2Hz 刺激。S2, 域値の50～100倍の強度 2Hz 刺激。S3, 域値の50～100倍強度 10Hz 刺激。

筋収縮を誘発する域値の3倍の刺激強度（Aα線維の刺激強度）ではCGRPの放出が見られず，50～100倍の強度（Aα及びC線維の刺激強度）で刺激すると，平均，8pgのCGRPの放出が観察された。図2は腰髄の後根の逆向性刺激によるひらめ筋からのCGRPの放出を示す。後根も最も興奮性の高い感覚神経線維の域値の3倍の強度で2Hzの頻度で刺激するとCGRPの有意の放出は見られなかったが(S1), その50～100倍の刺激強度ではCGRPは有意に放出した(S2, 2Hz ; S3, 10Hz)。この結果はひらめ筋からのCGRPの放出の大部分は高域値感覚神経線維（AδとC線維）に由来していることを示唆する。運動神経線維由来のCGRPの放出を検討する目的で腰髄の前根を切断して，運動神経の変性後（術後4日）ひらめ筋に100mMのKを作用させ，その際のCGRPの放出量を正常側と比較した。運動神経の変性側のCGRPの放出量は正常側の約70％であった。したがって，CGRPは運動神経終末端からも放出されるが，その量は感覚神経からの放出の半分以下であると推定される。

生 体 調 節 研 究 系

高次神経性調節部門

概要

彦坂，加藤，宮下，松村，碓井， Kori, Gardiner は，随意運動の中枢神経機構，とくに大脳基底核とそれに関連する脳領域の役割を，おもに眼球運動を指標として研究している。サルを訓練してさまざまな行動課題をおこなわせ，その行動の基礎となる神経機構を研究している。実験室の整備，コンピューターシステムの開発，動物の訓練をおこなった。今年度は研究の体制づくりがほぼ完成して実験がスタートした。おもな研究課題は，大脳基底核におけるドーパミン作動性神経系の機能を調べることである。実験的ヘミパーキンソン病モデルのサルにおける随意的眼球運動の変化を調べた。これは，ドーパミン性ニューロンを非可逆的に変性させる作用をもつ薬物を，尾状核に局所的に微量注入することによってえられる。注入とは反対側にむかう眼球運動が選択的に障害されることがわかった。そのメカニズムをあきらかにするために，現在，大脳基底核のさまざまな領域の単一ニューロン活動を記録している。

心筋グループ（亀山，木村ら）は，昨年にひきつづいて，単一心筋細胞を酵素処理によって遊離し，パッチクランプ法によって単一イオンチャンネルのメカニズムを研究した。

サル脳の MRI
―行動実験への適用―

宮下暢夫，加藤誠，彦坂興秀（生理研，生体調節）

MRI of monkey brain ―a tool for behavioral experiment―

Nobuo Miyashita, Makoto Kato, Okihide Hikosaka
(Dept. of Biol. Cont., Natl. Institute for Physiol. Sci.)

われわれは個々のサルの脳内構造を把握し，電極刺入や薬物投与などの脳内操作を正確におこない，またその結果を生体中で確認するために MRI を利用している。しかし MRI は座標系を持たないためにそのままでは位置の同定ができない。この問題を解決するために，サルの頭部にマーカーを設置する方法を試みた。今回はこの方法で尾状核の位置を同定し，ここにパーキンソン病惹起毒物である MPTP (1－mehysdl－4－phenyl－1, 2, 3, 6tetrahydropyidinc) を慢性的に持続注入した際の MRI について報告する。

【方法】

《マーカーの設置》ニホンザル（オス，体重8kg）の頭部を定位脳固定装置に固定し，その頭頂部に4本のポリエチレンチューブを定位的に垂直に立てた。MRI撮影時にこの内腔を流動パラフィンでみたし，MRIで確認できるようにした。《薬物の投与》このMRI上のマーカーをもとに尾状核の目的の位置を算出し，再び定位脳固定装置に固定しカニューレ先端をその位置に刺入し固定した。右尾状核内にはMPTP4mg/200 μlを，左尾状核内には生理食塩水200 μlを浸透圧ミニポンプでそれぞれ7日間かけて慢性的に投与した。《頭部の固定》ネンブタール麻酔下でサルの頭部を直径30cmのプローブのほぼ中央に冠状面，矢状面，水平面ともに垂直及び水平になるように固定した。《撮影条件》日立製2.14テスラ超伝導MRI装置を使用。IR法（2000/500/25～33, 加算10回），SE法（3000/80，加算4回），スライス厚2mm，スライス間隔5mmでMPTP投与前，投与後14日，36日，66日，生食投与後15日にそれぞれ冠状断，矢状断で撮影した。《組織学的検索》MPTP注入開始後86日目に灌流し，Nissl染色で注入部位を確認した。

【結果】

（1）マーカーから尾状核の目的の位置を正確に算出することができ，脳室造影などを行うことなくMPTP及び生食を容易に投与できた。（2）MPTP投与後14日目のMRIではSE法で尾状核内に直径約5.5mmのhigh intensity lesionを認めた。IR法ではlesionの中心にhigh intensityを，その周囲にlow intensityを認めた。これらのlesionは時間経過とともに縮小した。（3）生食投与後15日目のMRIではSE法，IR法ともにあきらかなlesionは認めなかった。（4）Nissl染色では右尾状核内に直径約4mmの範囲で神経細胞の脱落を認めた。一方左尾状核ではカニューレの軌跡と思われるgliosisを認めたのみであった。

【まとめ】

（1）このマーカー法によってMRIをもとに定位的に脳内操作をすることが可能となった。（2）SE法でされたMPTP投与後のhigh intensity lesionは神経細胞脱落の範囲とほぼ一致していた。

眼球運動発現における大脳基底核ドーパミン系の役割

碓井貞成，アドリアナ・コリ，加藤誠
宮下暢夫，松村賢，彦坂興秀

＜研究目的＞

眼球運動の発現と抑制における大脳基底核の役割とそのニューロン機構をあきらかにすることを目的とした。大脳基底核は脱抑制の機構をもちいて随意的な眼球運動の発現を促進することを，生理学的な研究によってあきらかにしてきた。とくに，記憶にもとづいて予測的に眼球運動をお

こすための情報を伝える。これは，中枢神経に内在するとされる運動のプランあるいは運動のプログラムのある側面を反映すると考えられる。

このような内的・自律的な神経情報はどのような神経回路によって形成され，保持され，出力されるのだろうか。それは，きわめて複雑に結合しあうニューロンの集合体によっておこなわれるのであろう。大脳基底核のなかでもさまざまなニューロン系が存在する。それらは固有の物質を伝達物質とする系をなしている。GABA, ドーパミン，サブスタンスP，エンケファリン，ソマトタチンなどである。それらがお互いに作用しあっていることは解剖学的な所見から推定されている。しかし，その内容はあきらかでない。

ここでとくに注目したいのは，GABA系とドーパミン系の関係である。これまでの研究で，大脳基底核（とくに尾状核－黒質網様部系）はGABA作動性の直列的な抑制性結合からなっており，大脳皮質からの入力によってこの抑制を強め，あるいは抑制をとりのぞくことによって運動の調節と発現に関与していることがわかっている。この実験では，いくつかの行動課題をもちいてサルを訓練し，とくに眼球運動において，大脳基底核がどのような役割になっているかを調べた。具体的には，1－methyl－4－phenyl－1, 2, 3, 6－tetrahydropyridine (MPTP) とその誘導物質を一側の尾状核に局所的に長期にわたって注入し，眼球運動がどのように障害されるかを調べた。

MPTPは，黒質緻密部のドーパミン作動性細胞を選択的に変性・破壊し，パーキンソン症候群をつくりだすことが知られている。

＜方法＞

(1) ドーパミン性ニューロンの選択的破壊： MPTPあるいはその誘導物質(MPP+)を投与した。前回の研究では，一側の総頸動脈から全身麻酔下でMPTPを注入する実験をおこなった。これは，注入と同側のドーパミン性ニューロンを選択的に破壊することを目的とした。ドーパミン性ニューロンは，線条体（尾状核と被殻）のほかに側坐核や前頭連合野にも投射しているので，MPTPの総頸動脈注入によってこれらの広範な領域の機能を変化させると考えられる。これまでの研究で，眼球運動に関係する細胞は，尾状核の比較的狭い部位に限局して存在することがわかっている。これを考慮して今回は，二頭のサルで，浸透圧ミニポンプをもちいて尾状核のサッケード関連領域に注入した。これは，体組織とポンプ内の浸透圧の差を利用して長期的に（1－2週間）MPTPを注入する方法である。

(2) 眼球運動測定条件： MPTPの注入によって，眼球運動，とくにサッケードがどのように変化するかを調べた。今回とくに詳しく解析したのは自発性眼球運動 spontaneous eye movement である。これは，行動課題をおこなっているときの眼球運動とは異なり，随意性・目的性の低い眼球運動である。4つの異なる条件下で記録した。①明るい条件 ②薄暗い条件 ③暗黒の条件 ④サル自身が写っている鏡を見る条件，である。サルは遮音したシールドルームのなかでモンキーチェアーにすわっている。最初の3条件では，サルの眼前60cmの位置に縦80cm，横100cmのスクリーンが置かれている。いずれの条件でも3分間の眼球運動の記録をおこなった。

(3) 眼球運動の測定法： 眼球運動はサーチコイル法をもちいて測定した。外部磁界によって眼球コイルに生じる誘導電圧を測定する方法である。直径90cmのコイルによって外部磁界を発生させる。サルの頭部を中心として，これが上下に一対，左右に一対，立方体状のわくに収められている。これらのコイルの約 30KHz の高周波電流を流すことによって交代性の磁界を発生させる。この磁界にたいする眼球コイルの方向によって誘導される電流が決定される。これを交代性磁界の適当な位相に一致させて測定することによって，縦と横の２方向の眼球回転角が正確に測定できる。ただし，眼球のねじれの方向は測定することができない。精度は0.1度以下である。

(4) ドーパミン機能の薬理的修飾： ドーパミンの agonist である apomorphine やドーパミンの前駆物質である 1－DOPA を与えたときに眼球運動がどのように変化するかを調べた。MPTP によってドーパミン作動性細胞が消失するために，尾状核におけるドーパミン受容体が supersensitive になり，ドーパミンにたいする過剰な反応がおこると考えられる。

(5) 解剖学的解析： MPTP によってドーパミン細胞が変性したことを確かめるために免疫組織化学的方法をもちいた。ドーパミンの主要な合成酵素である tyrosine hydroxylase にたいする抗体をもちいた。この抗体を大脳基底核を含む脳切片に反応させ，さらに二次抗体をもちいて発色させた。

＜結果＞

(1) 行動の変化

一側の尾状核に MPTP を注入した今回の実験では，ケージ内での行動に変化，とくにパーキンソン病様の症状は見られなかった。動作の緩慢，上下肢の強直，屈曲姿勢，ふるえなどまったくなかった。これは，一側の総頸動脈から MPTP を注入したサルとはまったく異なる点である。

(2) 自発性眼球運動の変化

つぎのような変化がいずれのサルでもみられた。

① 眼球の運動範囲が狭くなった。
② 平均眼球位置が MPTP 注入と反対側に偏位した。
③ サッケードの頻度が減少した。
④ サッケードの振幅・最大速度が減少した。
⑤ サッケードの duration が増加した。
⑥ ③から⑤の変化は MPTP とは反対側にむかうサッケードで顕著にみられた。

以下にその詳細を記す。

(3) MPTP 注入後の眼球運動の変化の時間経過

注入開始後第１日目には反対側にむかうサッケードが増加する傾向があったが，すぐにその傾向は逆転し，サル１では１週間後には平均の眼位が同側10－20度に固定し，反対側に移動することはすくなかった。サル2では眼球運動量はかなり保たれていたが，平均の眼位はやはり同側10－15度にあった。サル１では１カ月，サル２では1.5カ月後から注入前の状態に戻る傾向が現れた。反対側にむかうサッケードは同側にむかうサッケードよりもその数が少なかった。

(4) サッケード間隔の増大

サッケードの時間間隔は視覚的条件でおおきく変化する。明るい条件では約 300msec, 薄暗い条件では約 500msec, 暗黒の条件では 500－1000msec であった。これは MPTP 注入前の値である。注入後はいづれの条件でも平均的に間隔が増大した。とくに，暗黒条件下では，1000－2500msec になった。より明るい条件下では短い間隔のあいだに長いものが混在するようになった。

(5) サッケードの duration の増加

注入前は両側ともに最頻値は 50－60msec であった。注入後は同側が 60－70msec, 反対側が 80－90msec にまで延長した（薄暗い条件)。反対側にたいする効果が大きいことがわかる。反対側は duration がさらに長いサッケードの一群が現れた。その最頻値は 150－160msec であった。

(6) サッケードの duration と振幅の関係

MPTP 注入前はこれらのあいだに直線に近い関係がみられた。5 度のサッケードは約 25msec, 30度のサッケードは約 60msec の duration であった。注入後はこの関係がはるかに弱くなった。とくに反対側にむかうサッケードについては，単調増加の関係がほとんどみられなくなり，10度でも 200msec 近い duration をもつものが多くなった。

(7) サッケードの最大速度と振幅の関係

注入前はこれらのあいだに単調増加の曲線的関係がみられた。振幅が小さい範囲では最大速度がかなり直線的に増加し，振幅20度で速度が 600－700deg/sec であった。振幅がさらに大きくなっても速度の増加は鈍く，1000deg/sec 程度で頭打ちになった。MPTP 注入後は振幅にともなう速度の最初の増加が鈍く，とくに反対側では20度で 400deg/sec 程度だった。

(8) ドーパミン agonist にたいする反応

尾状核への MPTP の局所的注入によってドーパミン性ニューロンの軸索終末が選択的に破壊されていることが予想されていることが予想され，つぎに述べるように解剖学的にもそれが実証された。そのような状態が長く続くと尾状核ニューロンの細胞膜上にあるドーパミン受容体の感度が増強することがこれまでの薬理学的研究によって知られている。この場合にも同様の現象がおこっているとすると，ドーパミン agonist にたいして左右の尾状核が非対称的に反応し，眼球運動にも非対称的な効果が現れることが期待される。そこでドーパミンの agonist であるアポモルフィンの筋注をおこなってその効果を調べた。

アポモルフィン注射後，数分で強い効果が現れた。サッケードの頻度が増加し，振幅が増大し，眼球位置が MPTP 注入とは反対側に強く（40－50度）偏位した。これは，MPTP 注入による効果とはほぼ逆の効果である。反対側にむかうサッケードは短い duration を回復し，最大速度と振幅の関係は正常に近くなった。

(9) Tyrosine hydroxylase (TH) の免疫組織化学

MPTP 注入開始後 2 カ月の時点でサル 1 の脳の組織学的検索をおこなった。MPTP 注入の近

傍ではTHの活性がつよく減少していた。現象の範囲は被殻の背側を含んでいた。尾状核のもっとも頭部の前方は正常に近かった。側座核の減少はあきらかでなかった。反対側の大脳基底核の変化はみられなかった。ドーパミン性線維の起始部と考えられる黒質にも変化がみられた。同側黒質の背外部のTH活性が選択的に減少していた。

＜考察＞

大脳基底核は眼球運動にたいして抑制的なコントロールをおこなっている。これは，基底核の出力部である黒質網様部から中脳にある上丘にたいする強い持続的な抑制によっておこなわれる。黒質のニューロンは自発活動がきわめて高く，抑制性の作用をもつGABAを伝達物質とするからである。このため，これを受ける上丘中間層のニューロンはふだんはほとんどスパイク活動を示さない。それが活動するときはバースト状であり，その情報が脳幹の眼球運動発生機構に送られて反対側にむかうサッケードがおこる。

黒質に持続的に抑制されているはずの上丘ニューロンになぜそのような激しい活動がおこるのだろうか。その少なくともひとつの原因は，黒質からの抑制が一時的にとだえることによる。黒質のニューロンがサッケードに先行してその活動を減少あるいは停止するのである。これはしかし随意的なサッケードに限られる。とくに記憶性のサッケードに選択的に活動を減少させるものが多い。

では，黒質ニューロンの活動の減少は何に起因するのだろうか。黒質網様部は大脳基底核の入力部である線条体，とくに尾状核からつよい入力を受けることが知られている。しかもそのおおくはやはりGABA伝達物質とし，抑制性である。実際，尾状核の頭部から体部にかけての領域には随意的な反対側にむかうサッケードに先行して活動するニューロンがかたまって存在する。

抑制と脱抑制によって大脳基底核が眼球運動をコントロールしているということがこのような実験からわかる。持続的抑制によってむだな眼球運動がおさえられるだろう。脱抑制によって適切なサッケードが誘発されるだろう。この脱抑制によって選ばれるのは，記憶性サッケードに代表されるように内的な情報が主である。それにたいして直接に上丘を駆動する興奮性情報は外界からの感覚入力に由来するものがおおい。したがって，大脳基底核は，あらかじめ蓄積され，予測された内的な情報にもとづいて行動への出力をコントロールするゲート機構と考えることもできる。

大脳基底核全体の機能を大きく左右するもうひとつの系がドーパミン性ニューロンである。そのおおくは黒質の緻密部に細胞体をもち，おもに線条体（尾状核と被殻）に線維を投射する。この黒質緻密部の細胞が変性・消失するとパーキンソン病がおこることはよく知られている。重症になるとまったく動くことができない。しかし，ドーパミンがいかにして運動のコントロールに関与しているのかはまったくわからないといっていい。線条体のニューロンになんらかの作用をすることが重要であることはまちがいないだろう。しかし，ドーパミンが伝達物質として標的の細胞にどのような作用をするのかという基本的なことさえわかっていないのである。

MPTPはドーパミンの機能を調べるためにきわめて重要な薬物である。ドーパミン性ニュー

ロンを変性させ，パーキンソン様症状をひきおこす。それによっておこる行動の変化を詳しく解析し，それにともなう，あるいはそれをひきおこすニューロン活動の変化を調べることによってドーパミン系の機能，さらに大脳基底核全体の機能を総合的にあきらかにすることができるであろう。眼球運動はその意味で重要な行動の指標になりうる。あまりにも自由度のおおい四肢の運動とちがって，定量的なあつかいが容易である。眼球運動のメカニズムに関するおおくの知見がある。

この研究の結果，一側尾状核のドーパミン機能の局所的低下によって自発性眼球運動に選択的な障害があらわれることがわかった。反対側にむかうサッケードが抑制される。頻度が減少し，振幅，速度が減少し，durationが延長する。おそらくその結果，同側に眼位が偏位するのであろう。

そのメカニズムはなんだろうか。ドーパミンの作用点は少なくともふたつ考えられる。尾状核と黒質である。まず，作用点が尾状核であるとしてこの実験の結果を解釈してみたい。ドーパミン性ニューロンは尾状核の出力細胞に結合していることは疑いない。この作用はおそらく促進的であろう。MPTPによってその促進的作用を失った尾状核ニューロンは発火しにくくなり，黒質網様部を抑制しにくくなるだろう。そして，上丘にたいする脱抑制がおきにくくなるだろう。その結果が，反対側にむかうサッケードの抑制として現れていると考えられる。

第二に，ドーパミンの作用点が黒質であるとしたらどうか。黒質内で，樹状突起を介して緻密部（ドーパミン性）から網様部（GABA性）に結合があるといわれる。ドーパミンはこの場合，抑制的な作用をもつだろう。MPTPによってその抑制作用を失った黒質網様部ニューロンは自発活動を強め，上丘ニューロンをさらに抑制するだろう。そして，反対側にむかうサッケードが抑制される。

この実験から以上のふたつの可能性を評価することはできない。しかし，このような基礎的事実を背景にした細胞レベルにおける研究によってドーパミン系の役割をあきらかにしていきたい。

生体システム研究部門

概要

本研究部門は内耳における聴・平衡感覚の神経機構の解明を研究目的としている。感覚情報である機械的振動は有毛細胞により電気信号に変換され，シナプスを経た後，一次求心性線維のインパルス列として中枢へ送られる。一方，これらの過程は中枢側から遠心性神経線維による調節を受けている。本部門ではこれらの過程を以下の四つの方向から研究している。

1）単離した有毛細胞を用い，機械的信号が電気的信号に変換される過程を解析刷る（大森，重本)。

2）有毛細胞に対する遠心性神経調節の仕組みを明らかにする（重本，大森)。

3）内耳の切り出し標本を用いて，有毛細胞と一次求心性線維間のシナプス伝達の過程を調べる（山下)。

4）培養した蝸牛神経節細胞の膜に存在する神経伝達物質受容体，および電位感受性イオンチャネルの性質を解析する（山口)。

これらの研究課題について，電気生理学的および光学的測定法，また形態学的手法などを組みあわせることにより，内耳神経情報処理の各過程での基礎的メカニズムを解析しながら，それらの結果を総合することによって，内耳というシステム全体の機能を総合的に理解することを目指している。

モルモットの蝸牛外有毛細胞における ATP による Ca 応答

大森治紀，J. F. Ashmore（Bristol 大）

蝸牛の外有毛細胞には多数の遠心性神経がシナプスし，聴覚中枢から末梢の聴器官に到るフィードバックループを構成する重要な要素となっている。しかしながら，求心性神経の大多数は内有毛細胞に発する事から，通常の意味での神経系のフィードバックループは構成されていない。従って，何らかの相互作用が内・外の有毛細胞間に想定される事になる。内外の有毛細胞間で切れているループを構成する上での，最も可能性の高い機能的結合は，外有毛細胞の細胞長が電気刺激に伴って変化するという事実であろう。外有毛細胞は，部位によって 50 μm から 100 μm 程度の長さを持つ。この細胞長が膜内外の電位差によってわずかに変化する事で，基底膜全体の振動特性に変化が生じて，内有毛細胞感覚毛により大きな機械振動を加える，あるいは，基底膜振動振幅の局所的な変動を強化することになり，シャープな周波数同調特性を生ずるのであろうとする主張が行われている。この時，外有毛細胞膜内の電位差を変える要因の一つは，感覚毛の

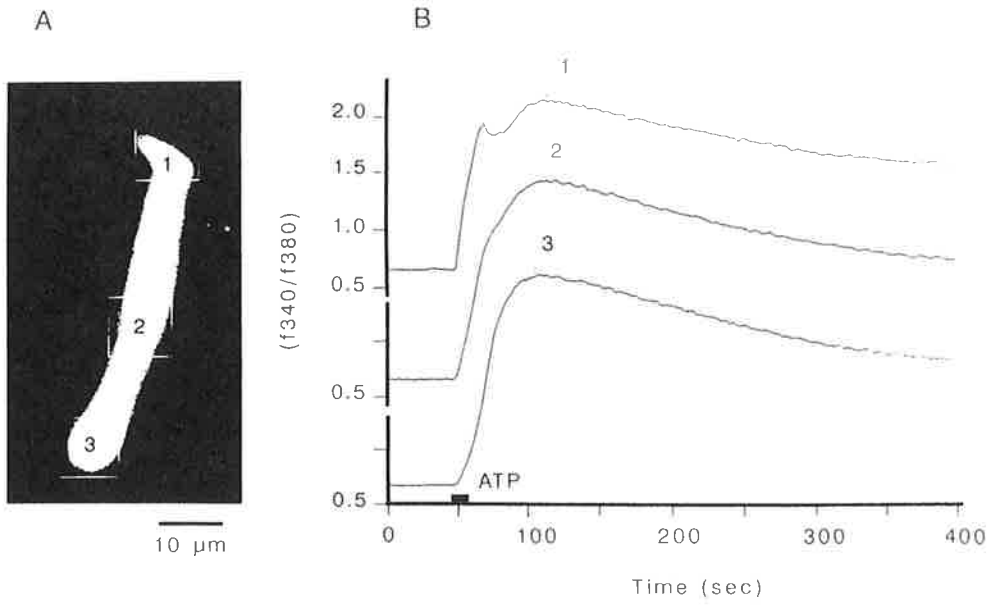
機械振動によって生ずる，いわゆる変換電流であり，もう一つは，遠心性神経刺激によって主として外有毛細胞に生ずる過分極性の応答である。

遠心性神経の伝達物質は，いくつかの理由から Ach （アヤチルコリン）がもっとも有力な候補として考えられている。ヒヨコの有毛細胞では， Ach が細胞内 Ca 応答を生じ， Ca activated K チャネルを活性化し，膜過分極を生ずることから，確かに遠心性伝達物質である可能性が高いと考えられる。しかしながら，モルモットの外有毛細胞では， Ach による Ca 応答，電位応答は，極端に高い濃度を除いて観察されず，むしろ ATP による Ca 応答，及び脱分極性の電位応答が観察された。

図 1 は， Fura－2 を負荷したモルモット蝸牛外有毛細胞の蛍光像と (1A), この細胞の頂部 (1B－1), 中間部 (1B－2), そして底部 (1B－3), で記録した ATP による Ca 応答である。 25 μM ATP の投与（時間軸上マーク）によって時間経過の異なる Ca 応答がそれぞれ観察された。頂部では，速い立ち上がりを示す Ca 応答に続いて，ゆっくりとした Ca 応答が発生し，また，底部ではゆっくりとした Ca 応答のみが観察され，中間部では Ca 応答も頂部と底部の中間の時間経過を示す現象として観察された。一方， Ach は， Ca 応答を示さないばかりか， ATP による Ca 応答を拮抗的に抑制した。

Ca－free 溶液中でもゆっくりとした Ca 応答は ATP によって発生し，更に Caffeine によってもゆっくりとした Ca 応答は生じた。この Caffeine 応答は頂部よりも底部付近で大きくかつ速かった。従って，細胞内からの放出機構によって遅い時間経過を示す Ca 応答は発生すると思われた。この Ca 放出機構は外有毛細胞の底部付近に主として存在すると思われる。

膜電位固定下に ATP を投与すると内向き電流が流れ， Ca 応答も発生する。 ATP によって何



らかのイオンチャネルが活性化され，Ca 流入が生ずることが速い Ca 応答の原因であると考えられる。ATP で活性化されるイオンチャネルは細胞の頂部付近に局在すると思われる。

ATP はいくつかのシナプスで Ach との共存が示され，同時に放出されるとの報告もある。一方，有毛細胞への遠心性神経終末からの伝達物質が Ach であるとの証拠もいくつか挙げられている。モルモットの外有毛細胞では Ach が ATP 作用に拮抗することで結果的に過分局応答を生ずることは起こり得ると思われる。一方では，ヒヨコとモルモットとで Ach 作用が異なる事は，動物種によって遠心性神経の伝達物質が異なる可能性を示唆するものかもしれない。ある程度の比較生理学的アプローチが更に必要と考えられる。

ATP は ACh と同様に有毛細胞において細胞内 Ca 濃度を増加させ，電気的応答を引き起こす

重本　尚，大森治紀（生体システム）

（緒言） 有毛細胞は抑制性の遠心性神経支配を受けており，ヒヨコではアセルコリン（以下 ACh ）が神経伝達物質であることが推測されている。我々はすでに fura－2 を用いた細胞内 Ca 濃度測定により，1, ACh がムスカリン性受容体を活性化し細胞内器官からの放出により細胞内 Ca 濃度の増加を引き起こす。2，電気的には ACh は過分極応答を引き起こすことを明かにした。ACh による過分極応答は細胞内 Ca 濃度の増加によって Ca－activated K channel が活性化したためであろうと推測された。そこでさらに ACh の他に伝達物質の可能性のある物質について細胞内 Ca 濃度変化を検討したところ，外液中の ATP が細胞内 Ca 濃度を増加させることが明らかになった。本研究の目的は ATP による Ca 応答の機序を明かにすることと，相当する電気的応答を捉えることである。

（方法と結果） ヒヨコ内耳の蝸牛器官から機械的操作のみによって有毛細胞を単離した。これはタンパク分解酵素の前処理により受容体が不活性化される可能性を避けるためである。細胞内 Ca 濃度変化は fura－2 を負荷した有毛細胞の示す蛍光強度比を以って推定した。ATP は一定濃度を puff により与えた。ATP は muscarine と同様に Ca 応答をおこすが adenosine は C a 応答を起こさなかった。2.5mM Ca を含むリンガー溶液中では ATP による Ca 応答は立ち上がりの速い phase と引き続く遅い phase が観測された（図１，45秒）。Ca－free 溶液中では遅い phase のみが観察され（図１，220秒），さらに 2.5Ca を含んだ ATP を puff で与えると速い立ち上がりの Ca 応答のみが観察された（図１，350秒）。この結果から ATP による Ca 応答には２つの component があり，速い立ち上がりは Ca の流入によるものであり，遅い応答は細胞内貯蔵部位からの Ca 放出であると考えられる。電気的には whole cell voltage clamp 下で 500 μM ATP を投与すると即座の内向き電流と引き続く外向き電流が観察された。ATP による速い Ca 応答は内向き電

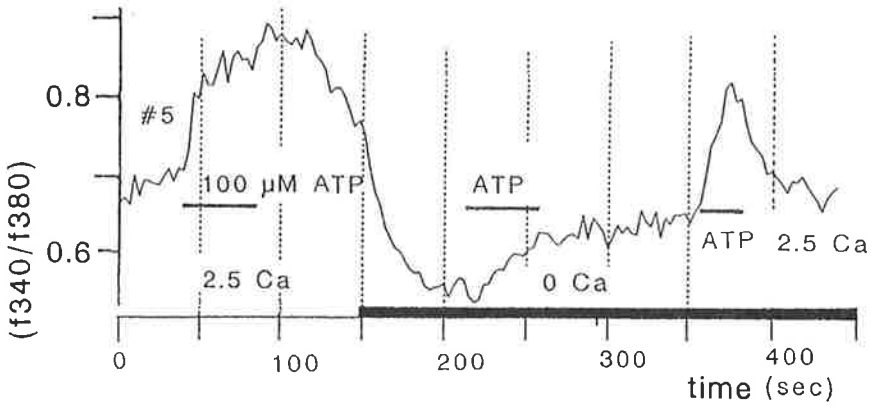


図1．ATP投与によるヒヨコ有毛細胞内Ca濃度変化。2.5mM Caを含む外液中では二相性のCa濃度の増加が観察された。Ca−free溶液中では緩やかな増加のみが観察され，2.5mM Caを含んだATPをpuffで与えると，速いCa応答のみが観察された。

流によってもたらされ，引き続く外向き電流はCa−activated K channelによると推定された。

（結論及び考察） AChは有毛細胞においてムスカリン性受容体を活性化し，Ca応答と過分極応答を引き起こす。従って，AChが遠心性線維の伝達物質であり抑制性に作用していることが強く推定される。ATPは有毛細胞においてCaの流入と放出，脱分極と過分極を引き起こす。カメの有毛細胞では遠心性線維の刺激により脱分極と引き続く過分極がおこることが報告されているが，ATPが遠心性線維の神経終末に存在するならこのような脱分極と過分極を説明することが可能である。またATPはcholinergic神経終末のシナプス小胞においてAChと共存し，同時に放出されAChの作用を就職することが知られており，有毛細胞においてもこのような可能性が考えられ，今後の研究課題の一つである。

蝸牛神経節細胞における化学感受性イオンチャネル

山口和彦

聴覚情報は蝸牛有毛細胞において電気的信号に変化された後，化学シナプスを介して1次感覚神経である蝸牛神経節細胞に送られる。この聴覚神経系における最初のシナプスである有毛細胞−蝸牛神経節細胞間シナプスの化学伝達物質については，グタミン酸であるという仮説が提出されているが反論もある。我々は「グルタミン酸仮説」に検討を加えるため，培養した蝸牛神経節細胞の薬理的性質を調べてきた。その結果，この神経節細胞はグルタミン酸に対する感受性が高く，特にNMDA型受容体を多く持っていることを見いだした。これは「グルタミン酸仮説」に

有利な状況証拠の一つであろう。このNMDA型受容体に共役しているイオンチャネルの性質について，本年度は単一チャネル記録法により検討を加えた。

実験には鶏胚（孵卵17－19日）より摘出，酵素（コラゲナーゼ，パパイン）処理によって単離し，血清（５％）を含む培地中で４－14日間培養した蝸牛神経節細胞を用い，化学感受性電流をパッチ電極を用いた電位固定法により調べた。ピペット内にEGTA (5mM) を含むCsCl溶液をつめてoutside/out excised patch membraneを作製し，これにグルタミン酸あるいはNMDAを投与すると，開口確率の増加する単一チャネル活動が見られ，その電流電圧関係はMg^{2+} －freeの生理塩類溶液中で直線関係を示し（反転電位はOmV付近），スロープコンダクタンスは46pSであった。この値は哺乳類中枢神経系で報告されているNMDA受容体イオンチャネルのものとほぼ等しかった。

このチャネルのイオン選択性を調べたところ，１価，及び２価の陽イオンに対し比較的広い選択性を持つことが示された。Cs^+, Rb^+, K^+は外向きにこのチャネルを透過し，その透過係数はNa^+に対するものとほぼ等しかった。しかし高濃度の細胞外K^+ (156lmM) はNMDA受容体イオンチャネルの開口確率を低下させた。またK^+ (156mM), TEA (10mM) 共存下で内向き単位電流の大きさは役60％低下した。

細胞外Ca^{2+}濃度を通常の10倍 (2.5 から 25mM) に上昇（ Na^+濃度を低下）させたところ，単一チャネル電流の反転電位は脱分極側にシフトし，チャネル内定電場を仮定しGoldman－Hodgkin－Katzの式に従って相対透過率を計算するとCa^{2+}はNa^+に対し約３倍透過し易いことになった。しかし，内向き電流のスロープコンダクタンスは細胞外Ca^{2+}濃度の上昇 (2.5 から 25mM) に伴い，46から18pSに減少し，細胞外Ca^{2+}濃度が高いほど内向き電流が流れにくいことを示した。一方，Ca^{2+}濃度を0.05mMに下げるとスロープコダクタンスは66pSに増加し（反転電位は過分極側にシフト），同様の傾向が見られた。この一見相反するような電流電圧関係の変化は，チャネル内にCa^{2+}に強い親和性を持つ結合部位が存在し，Ca^{2+}の通過速度は１価陽イオンのそれより遅いこと等を仮定することで説明され得ると思われる。

高次液性調節研究部門

概要

本研究部門は，中枢神経系がどのように摂食行動や性行動を制御しているか，また種々の生理活性物質がこれらの行動の発現にどの様な役割を果たしているか研究してきた。

これらのプロジェクトは数多くの成果を挙げ，1989年をもって取りまとめを済ませ，一応終結させることにした。

新たに研究対象とした分野は，随意運動の高次調節機構である。大脳皮質の運動関連諸領野を中心とし，神経細胞活動の特性を解析し，脳の各部位がどのような局面でどのような運動発現・調節に関与するかを調べる。次にその活動の背景となっている物質の関与も調べる。次の段階では，生理学的に特性を明らかにし諸部位について，組織学的・組織化学的手法を用い，微細構築を調べ，次いで入・出力投射の様式を精細に調べる。

大脳皮質補足運動野細胞活動の可塑性

丹治　順（生理研），相沢　寛（東北大・医）

霊長類の大脳補足運動野は二次運動野を構成し，その細胞活動は四肢の運動に先行して変化することが知られている。私どもはこれまで，18頭の日本ザルについて，それぞれ種々の上肢動作を行なわせ，それに伴う細胞活動変化を調べ，報告してきた。今回は従来とは異なり，ごく単純な動作（キー押し運動）を長期間，毎日連続的に行わせた。12ヶ月後に無菌的手術を行い，記録用シリンダーを装着させた。術後回復を待って，同一の動作遂行中に補足運動野細胞の活動を記録したところ，運動直前に明確な活動変化を示す細胞は見られなかった。

それに引続いて，同一のサルの一次運動野手指支配領域を，局部的に破壊した。その破壊のためには，微小電極を用いて，一次運動野のマップを作成し，次いでDC通電を微小電極尖端に行い，その操作を反復することによった。2週間で手指支配領域の破壊を完成し，その後2週間の再トレーニング期間をおいた。その後に補足運動野の細胞活動を調べたところ，今度はキー押し運動に先行する活動が明らかにみられた。

以上の実験成績により，①補足運動野の細胞活動は固定的なものではなく，長期間反復により学習が高度に進行すると，その運動に伴う活動は消失すること。②しかし一次運動野の破壊という負荷が加わると，活動に参加することがわかった。これらは，補足運動野の細胞活動の機能的可塑性を示すものと考えられる。

雌ザル中脳電気刺激で誘発される性行動

粟生修司，高木厚司，岡田英一郎，大村　裕

性行動は種族保存のための本能行動であるが，ヒトや一部の高等動物では個体間の関係を保つための社会行動としても機能している。その発現には高等動物になるほど性ホルモンの影響は弱まり，それ以外の社会的要因，学習や経験，あるいは個体間の「相性」などが重要な因子となる。雌の性行動の中枢性調節機構はラットのロルドーシス反射で詳しく研究されているが，この行動は受身的な行動であり，雄や実験者が雌ラットの腰や臀部を触ることで初めて起きる反射行動である。雌ザルではラットのロルドーシスにあたる雄に尻を差し出す行動はプレゼンティングといわれているが，雄の腰部の接触に対して受身的にプレゼンティングを行う receptive presenting と，雌自ら雄に尻を向ける proceptive presenting があることが知られている。

これまでに，我々は（1）雌ザルの視床下部腹内側核を電気的に刺激すると，雄による接触刺激を必要としない能動的な presenting, すなわち proceptive presenting を誘発すること，（2）この部位のニューロンの多くが実際の性行動中に著明な興奮を示すことを明らかにしているが，その視床下部からの出力を受ける中脳の性行動調節機構について検討した。

雌アカゲザル2頭を用い，モンキーチェア上で頭部を固定した状態で実験を行った。雄のパートナーを前にして中脳領域を1㎜おきに刺激し，誘発される行動をタイムレコーダーのついたビ

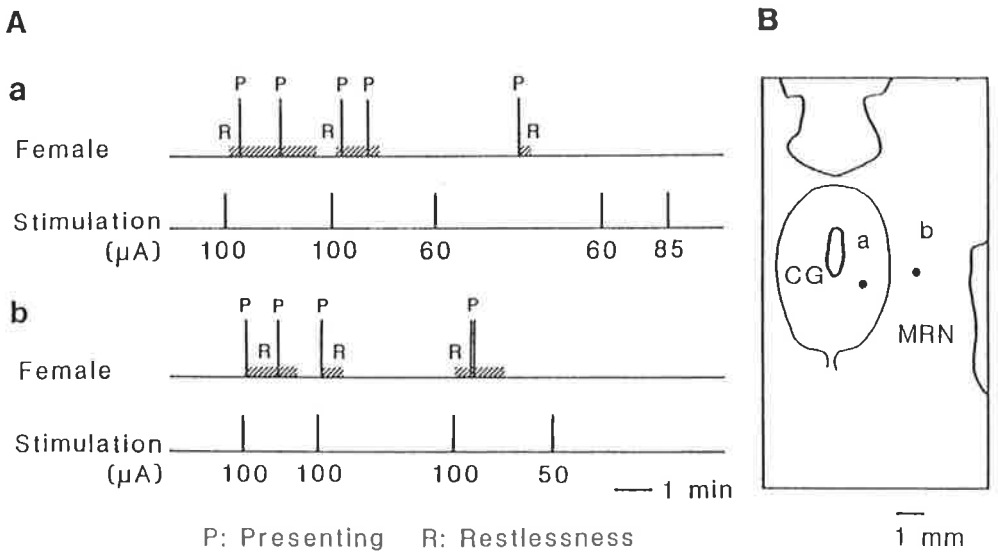


図1　中脳電気刺激で誘発された雌ザル性行動
CG, 中心灰白質；MRN, 中脳網様核。
刺激部位をBに示している。

デオレコーダーに記録した。刺激にはエルジロイ電極を用い，刺激条件は 50Hz, 2.5秒，125パルスであった。

その結果，上丘のある領域の中心灰白質やその外側および腹外側の被蓋野で前後数㎜にわたって presenting を誘発する刺激有効部位があった。中心灰白質を刺激すると10秒以上の潜時で腰や体を揺さぶるといった反応 (restlessness) が起こり，その後 presenting が１回以上誘発された（図 1Aa)。被蓋野を刺激すると中心灰白質と同様の反応が誘発される場合と10秒以内の潜時でプレゼンティングが１回だけ誘発される場合があった（図 1Ab)。中心灰白質に隣接する被蓋野領域では中心灰白質やその腹外側の被蓋野に比べ後者のタイプの短潜時の反応が多かった。

視床下部の刺激では10秒以内の潜時で presenting が通常１回誘発されるが，中脳では視床下部と異なる長い時間経過で作動する性行動賦活系が速い時間経過の調節系とともに存在することが明らかになった。このことは中脳には視床下部と異なる presenting 調節機構があり，単に視床下部からの情報を中継しているだけではないことを示唆する。

摂食行動に及ぼす視床下部刺激の効果

高木厚司，岡田英一郎，粟生修司，大村　裕

緒言：　これまでに我々は摂食課題を訓練したサルを用いて視床下部内に空腹時の電気および化学刺激によって摂食課題遂行が抑制される部位があることを示した。本報では，空腹時刺激効果のまとめと，同じサルで実施した満腹時刺激効果をあわせ報告する。

方法：　10ないし20回のレバー押しにより報酬として餌がもらえるレバー押し摂食課題をあらかじめ訓練した４頭の雄アカゲザルを用いた。頭部固定下で１分またはそれ以上の試行間隔をおいて餌を呈示して摂食課題遂行を観察した。電気刺激はエルジロイ電極を用い，10－500 μA の陰性矩形波トレインパルスを加えた。化学刺激は，まず先端を切断したエナメル被覆ステンレススチール線を中に通したステンレスのガイド管（外径0.6㎜）を，電気刺激効果を観察しながら刺入した。次に摂食課題遂行の抑制効果の認められた部位で電極を外径0.3㎜のステンレス管に替えてマイクロシリンジによりグルタミン酸ナトリウム溶液 (5mM－500mM) を 0.2－0.5 μl/分の速度で３－５分間注入した。空腹時の刺激実験は前夜から12時間以上の絶食状態で開始し，満腹時の刺激実験は実験開始前に充分量（１日分以上）の餌を与え，餌を呈示してもレバー押しを開始しない状態で観察した。

結果と考察：　図１に空腹時の電気および化学刺激効果の４頭のまとめを示した。腹内側部から背内側部そして一部外側野の腹側部にかけて遷延型の抑制反応部位を認めた。また化学刺激では４頭中３頭のサルで内側部領域で抑制反応を認めたが，外側野刺激では４頭いずれも無反応であった。一般に視床下部腹内側核は満腹中枢と言われ，今回の実験でも内側部の電気刺激で遷延型

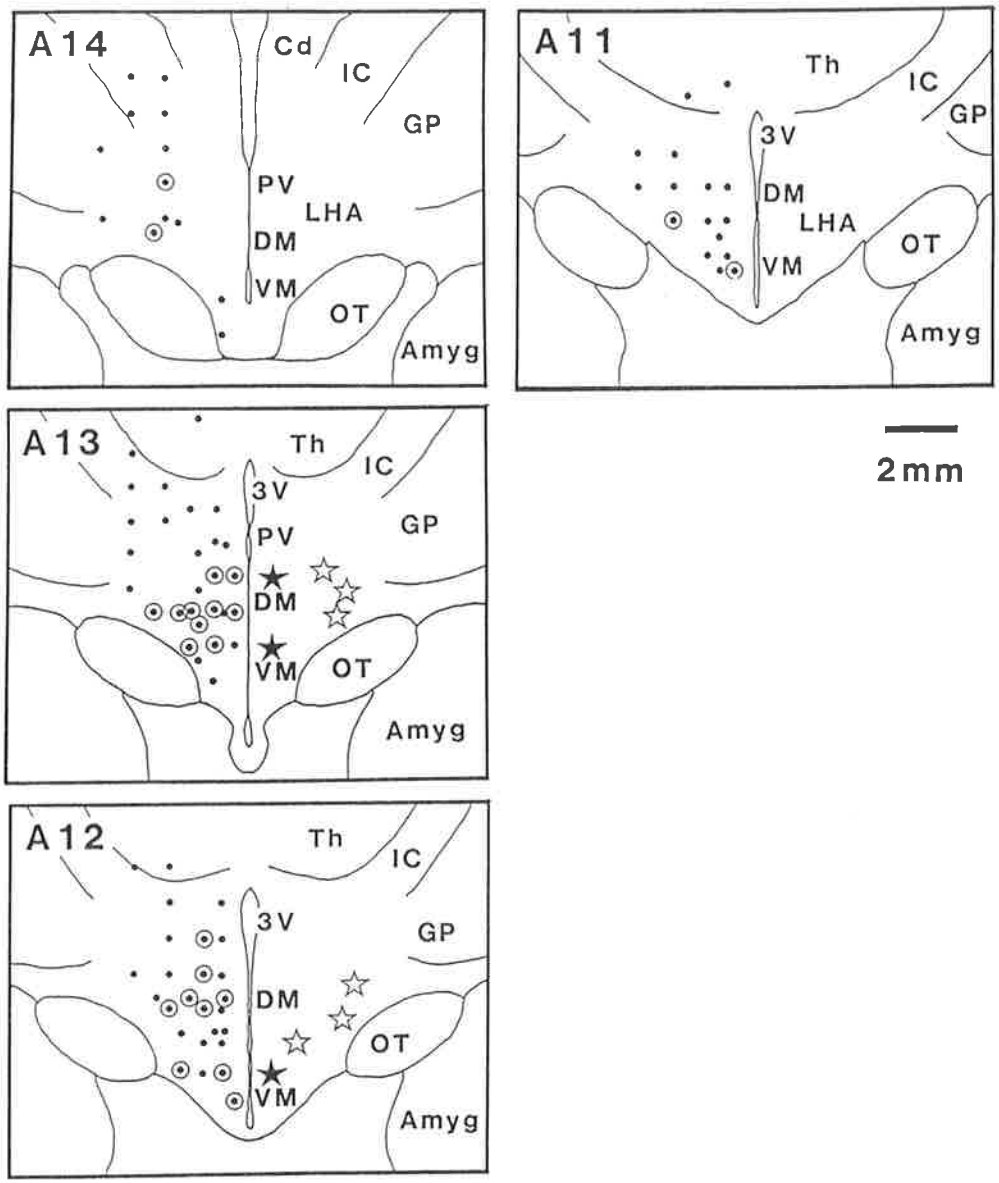


図１．空腹時の電気及び化学刺激による摂食課題遂行の抑制効果。
左肩の数字は両耳間線からの距離。図の左半分は 100 μA 以下の電気刺激で抑制効果があった部位を示す。◎は電気刺激による摂食課題遂行抑制効果が連続 3 回以上の課題遂行に及んだ遷延型の抑制反応部位を示す。●は非遷延型の抑制反応部位を示す。右半分は電気刺激で抑制効果を示した部位の化学刺激効果を示す。★は化学刺激でも抑制効果が見られた部位，☆は化学刺激では抑制効果が見られなかった部位を示す。略語： Amyg, 扁桃体 ; Cd, 尾状核 ; DM, 視床下部背内側核 ; GP, 淡蒼球 ; IC, 内包 ; LHA, 視床下部外側野 ; OT, 視索 ; PV, 室傍核 ; Th, 視床 ; VM, 視床下部腹内側核 ; 3V, 第 3 脳室。

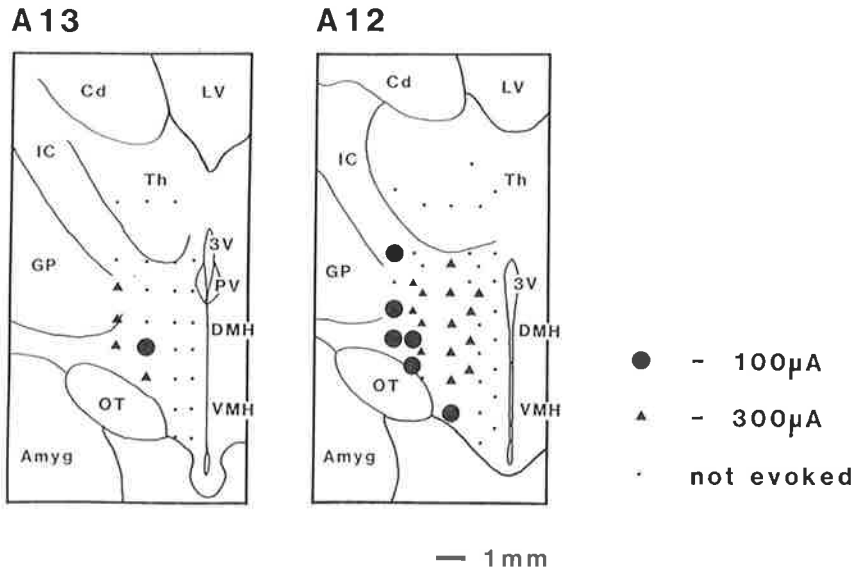


図２．満腹時の電気刺激による摂食課題遂行の促進効果。
各印は摂食課題の遂行を発現させた電気刺激の閾値を示す。

の抑制効果が観察された。細胞体を選択的に興奮させると言われているグルタミン酸の注入によっても同様の効果が得られることからこの抑制反応が内側細胞群の興奮により引き起こされることが推測された。一方，摂食促進系と言われている外側野の腹側部電気刺激でも内側部刺激とよく似た遷延型の抑制反応を認めた。視床下部内の腹内側核と外側野の間の傍矢状切断により過食と肥満が発現することがラットやアカゲザルで報告されており，外側野の腹側部刺激で観察されたこの遷延型抑制効果は，内側部から外側に向けて出力する摂食抑制性の遠心性の線維束を優位に賦活した可能性が考えられた。また外側野の背側部を中心に非遷延型の抑制反応も認められたが，この反応は電気刺激終了直後からレバー押しを再開することからレバー押し行動そのものに対する直接の抑制効果と考えられた。図２では同じサルの満腹時の電気刺激効果を示した。餌を呈示してもレバー押しが発現しない状態での外側野刺激でレバー押し摂食課題が発現し，特に極外側に低閾値領域が存在した。さらに外側野の腹側部において空腹時の電気刺激で遷延型の抑制効果が認められた部位を満腹状態で電気刺激したところレバー押しが発現し，空腹満腹状態によっても同部位の刺激効果が異なることが確認された。

結語： サルのレバー押し摂食課題に及ぼす空腹時・満腹時の電気刺激効果，及び空腹時のグルタミン酸注入効果を検討した。その結果，①視床下部内側部に摂食抑制系を制御している神経細胞群が存在すること，②視床下部外側部では摂食促進系だけでなく通過線維束と考えられる抑制系の双方が存在し，空腹・満腹レベルにより刺激で賦活される行動調節系が異なることが推測された。

生理機能研究施設

生体機能検査室

概要

生体機能検査室は人体および高等動物の個体としての生理機能を研究するための設備および装置の開発研究を目的としている。主に音響実験室と人工気候室が共同研究等に利用されている。1989年度は，血中酵素等32項目に関して200テスト／時の処理能力を持つ自動化学分析装置を導入した。各種計測機器のファイルはコンピューターに入力されており，利用者の便を計っている。本年度の音響実験室の利用は延べ9件，人工気候室は16件，計測機器等の短期利用は157件であった。

研究活動：イヌを用いて，非麻酔下に個体の生理機能の測定を試みている。本年度は(1)腹部内臓循環に関する研究，(2)膵外分泌と消化管運動の関係，(3)大分子型心房ペプチドの腎における作用，(4)全身運動の消化器能に及ぼす影響等の共同研究を行った。

空腹時の胃の周期運動に伴うガストリン感受性の変化

成瀬　達（生理研）

イヌでは空腹時の胃酸分泌は通常低値を示すが，ペプシン分泌は胃運動の周期的亢進 (Migrating Myoelectric Complex : MMC) に同期して増加する[(1)]。経静脈的にメサコリンを投与すると，投与開始後分泌のピークに至るまでの時間は一定ではなく，投与開始時刻と胃の周期活動のサイクルの間隔に依存している[(2)]。この事は胃の各種刺激剤に対する反応性は胃の収縮期には高まっていることを示唆している。本研究ではガストリンに対する酸分泌反応と胃運動の関係を無麻酔犬を用いて検討した。

方法：胃瘻，Heidenhain pouch (HP), および十二指腸瘻を造設したイヌ5頭を用いた。18時間の絶食後，瘻口よりカテーテル型圧トランスデューサーを挿入し，胃および十二指腸の運動を記録した。HPの運動は圧トランスデューサーと直接接続し測定した。胃液は10分間隔で採取し，酸およびペプシン分泌量を測定した。生理食塩水のみを静脈内投与し，運動と分泌を6時間観察し，コントロールとした。MMCを一サイクル観察後，ペンタガストリン (62.5,125, 250, 500, 1000ng/kg/h) を6時間にわたり静脈内に持続投与した。さらにアトロピン (25 μg/kg/h) またはヘキサメソニウム (C6, 2mg/kg/h) と共にペンタガストリンを投与した。食物400gを経口摂取させ，HPの酸分泌をペンタガストリンのそれと比較した。

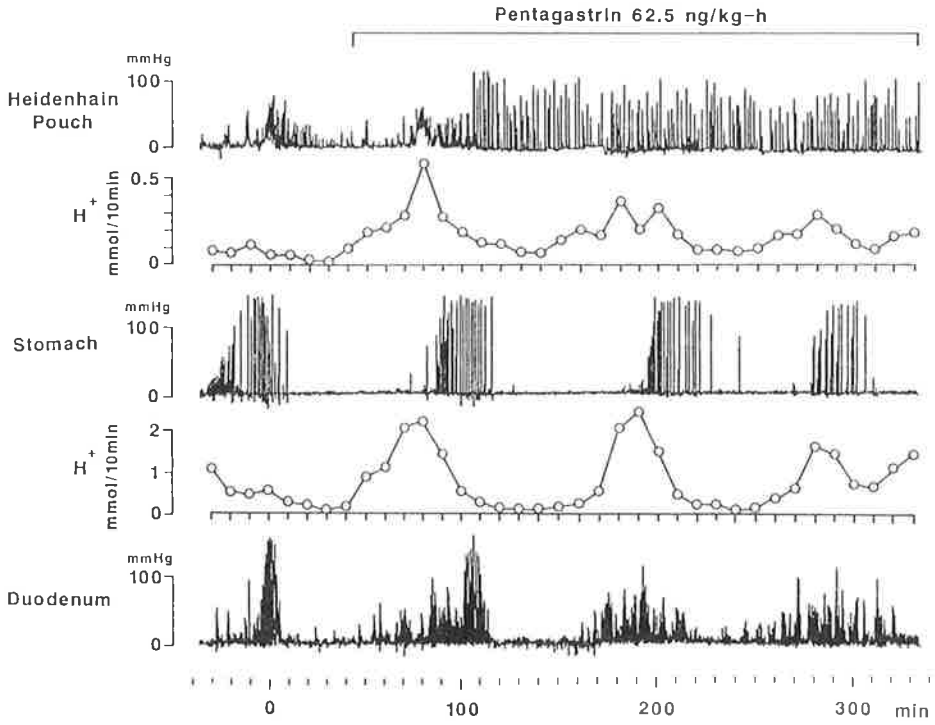


図　胃・十二指腸運動と酸分泌

成績：胃・十二指腸周期運動の周期：ペンタガストリン 62.5, 125, 250ng/kg/h により胃・十二指腸の MMC は抑制されなかったが，一周期の間隔はコントロールの95±5分からそれぞれ130±13，136±12および170±24分に延長した。投与量 500 および 1000ng/kg/h では，2頭のイヌでは周期運動は消失したが，3頭ではそれぞれ平均177分と247分に延長した。

胃液分泌：ペンタガストリン 62.5, 125, 250ng/kg/h による酸分泌は一定ではなく，胃運動の亢進期に高値を，静止期に低値を示した（図)。酸分泌のピークは十二指腸運動のピークより20−30分先行していた。投与量が 500ng/kg/h 以上では周期変動は不明瞭となった。ペプシン分泌は酸分泌と同様の変動を示した。アトロピンおよび C6 は運動の周期変動のみならず，ペンタガストリン刺激による酸およびペプシン分泌の周期的亢進も抑制した。摂食後の HP の酸分泌はペンタガストリン 125ng/kg/h による反応とほぼ同じであった。

結論：運動の周期的亢進時には，胃分泌腺のガストリンに対する感受性が高まっている。この分泌促進作用にコリン作動性神経が関与していると推定される。

文献

(1)Magee, D. F. & S. Naruse. J. Physiol. 344 : 153−160, 1983.

(2)Magee, D. F., S. Naruse & A. Pap. Br. J. Pharmacol. 84 : 347−355, 1985.

組織培養標本室

概要

組織培養標本室は組織培養室及び組織標本室から成る。251号室と254号室は初代培養，継代培養，モノクローナル抗体作製等が行えるよう，整備されている。263号室には培養細胞の長時間ビデオ録画のために，超高感度テレビカメラ，リアルタイム画像改善装置，タイムラプスビデオ，ビデオプリンター一式が設置されているが，使用頻度が高く，システム一式の増加が必要である。261号室は光顕標本作製の為の装置一式が設置されており，主にパラフィン切片作製に利用されている。

平成元年度の組織培養標本室利用者は，所内９部門２施設の25名（教官９名，技官９名，大学院生等７名），所外５名の計30名であった。

毛細血管内皮細胞の有窓構造形成に関する in vitro モデル

古家園子

毛細血管内皮細胞は組織によって異なった形態を示すが，物質透過の盛んな内分泌器官や腎臓では内皮細胞の一部が非常に薄くなって多数の均一な，隔膜を持った丸い窓（有窓構造；diaphragmed fenes-trae）が見られる。昨年は牛副腎髄質より毛細血管内皮細胞を分離し，in vitro にて有窓構造を形成するクローンについて述べたが，本年度はこのクローンを用いて in vitro における有窓構造形成の機構を調べ，モデルを提出した。

結果：内皮細胞では何らかのシグナルによって基底側に plasmalemmal vesicle（開口部に薄い隔膜をもった vesicle で，開口部の直径：50～60nm, vesicle の直径：65～95nm）が規則正しく細密充填し（２つの vesicle の中心間距離：122 ± 17nm, vesicle 数：56 ± 18/um^2），vesicle の開口部と開口部の間は電子密度の高い物質でつながれていた。何らかのシグナルにより細胞質の一部が非常に薄くなると，基底側に配列している plasmalemmal vesicle と頭頂側の形質膜が融合し，裂ける。膜は plasmalemmal vesicle 間でシールする。この結果，元来 plasmalemmal vesicle の隔膜を持った開口部がむき出しとなり，窓 (diaphragmed fenestra) として取り残される (fenestra の直径：58 ± 5nm, ２つの fenestrae の中心間距離：130 ± 26nm, fenestrae 数：50 ± 13)。既に形成された fenestrae 部分と細胞質の境を厚切切片にしてステレオ観察すると，潮がひくように細胞質部分が後退していき，fenestrae 部分が拡がっていく様に見え，何らかの motive force の存在を示唆した。

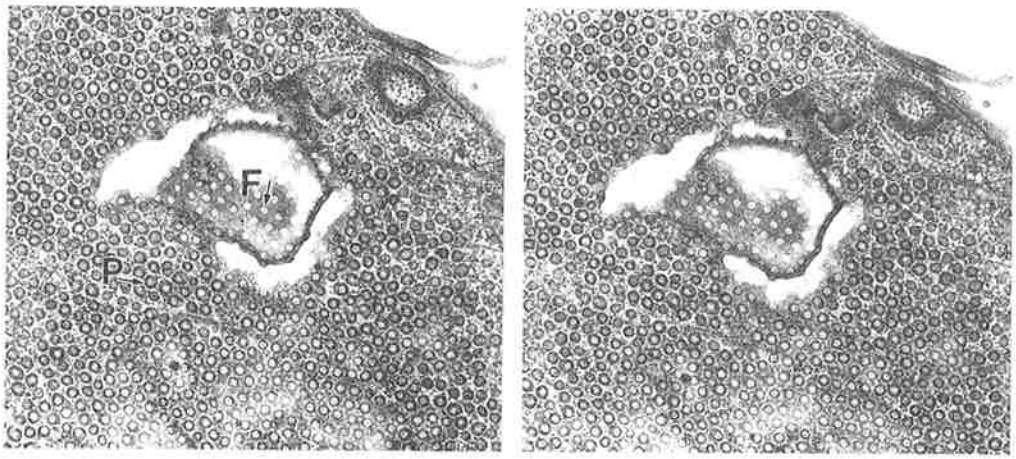


図1　培養面に水平な超薄切片のステレオ像　左：−15°, 右：+15°
多数の fenestrae (F) のまわりの細胞質に plasmalemmal vesicles (P) が規則正しく充填している。

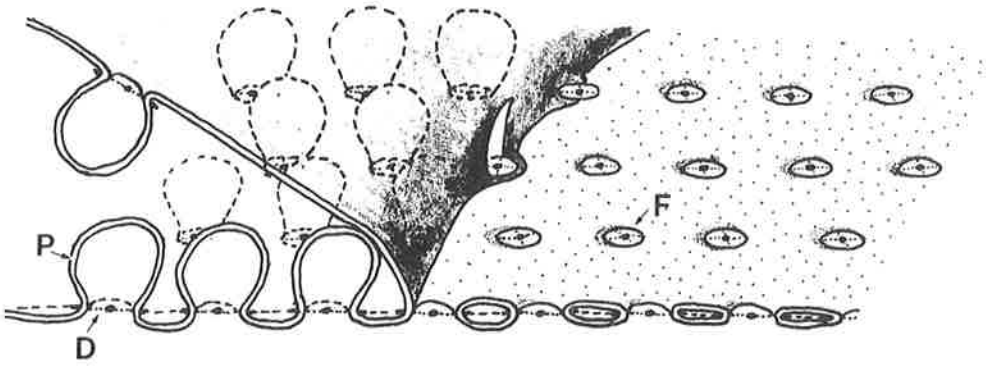


図2　in vitro における有窓構造形成のモデル
P : plasmalemmal vesicle, F : fenestra, D : diaphragm

超高圧電子顕微鏡室

概要

医学生物学用超高圧電子顕微鏡（H－1250M 型）が昭和57年３月に導入されて，同年11月よりこれを用いての共同利用実験が開始された。平成元年度は共同利用実験計画が８年目に入ったことになる。本研究所の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，平成元年度は最終的に22課題が採択され，このうち20課題が実施された。これらは，主に①厚い生物試料の立体観察と解析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できる。これらのうち共同利用実験の成果は，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。

本年度の超高圧電顕の利用状況の内訳は，共同利用実験等141日，修理調整等83日である（技術課超高圧電顕室報告参照）。電顕フィルム使用枚数は8,457枚，フィラメント点灯時間は522.5時間であった。

超高圧電顕室では，上記の共同利用実験計画を援助するとともに，これらの課題を支える各種装置の維持管理及び開発に当たってきた。また超高圧電子顕微鏡に関連する各種基礎データの集積および電子顕微鏡画像処理解析法の開発，雰囲気試料室の基礎実験等を，重要な課題として積極的に取り組んでいる。

なお生理研超高圧電顕室紹介のパンフレットを前半期に作製した。後半期初めに，高圧タンク内のフレオンガスを六弗化硫黄ガスに変更するにともない，ガス回収装置の導入および改修を行った。さらに，雰囲気試料室等の実験をより安全に行うために，照射系部分排気系の改造を行った。また 200kV 電顕 (H700H) においては，汚染対策と真空度の向上を計るため上部油拡散ポンプを磁気浮上式ターボモレキュラーポンプに交換した。

厚い試料の超高圧電顕像に対する平行投影近似の適用限界と像を歪める収差

有井達夫（生理研）

超高圧電顕 (1000kV) 立体写真を用いると，厚い試料からの三次元情報を求めることができる。立体写真を解析するときには，焦点の外れた像に対して平行投影近似を適用し，組写真上で対応点を決め，このときの視差から三次元座標を決めている。この意味において平行投影近似の適用限界をあきらかにすることは重要である。

これまでに強励磁対物レンズを用いたレンズ条件においては，無収差のレンズにおいても，照

射の条件と試料位置における磁束密度に応じて平行投影近似には有効厚さと分解能に応じた適用限界が光軸を中心とした領域に生じることをあきらかにし，このとき，試料に入射する電子線をより平行に近づけることと試料位置の磁場を弱めることにより，焦点の外れた像に対して平行投影近似を乱す量を，低減できることを示した（生理研年報９）。

この無収差対物レンズの条件を改善するために，レンズ電流を強励磁対物レンズのモードより約1/8減少させ，さらに対物レンズと第二対物レンズ電流を固定させて中間レンズで焦点をあわせる走査モード(Scan2：倍率 500X) を用いて，光軸を厳密に合わせて検討した。約± 400 μm の焦点外れの試料に対して像の倍率の変化はほとんどなく（△ M/M～1.5×10^{-3}），焦点外れ像の外れに依存する像回転も強励磁対物レンズの場合の約1/7と改善された。これは試料の全撮影視野において，電子線がほぼ光軸に平行に入射していて，試料位置において弱励磁であることを意味している。しかしこのモードでは収差（球面収差および色収差）の寄与が大きく，とくに色収差の寄与は厚い試料の鮮明な像を得ること.を困難にすると考えられる。

他に，焦点の合った像に対する歪像収差の寄与が考えられる。光軸に平行に入射した電子線がレンズの端を通ることによる寄与であり対物レンズで拡大された像を物点として扱う中間レンズ，投射レンズで問題となる。この寄与を低減するためには，歪の少ない選ばれた倍率で撮影するこ

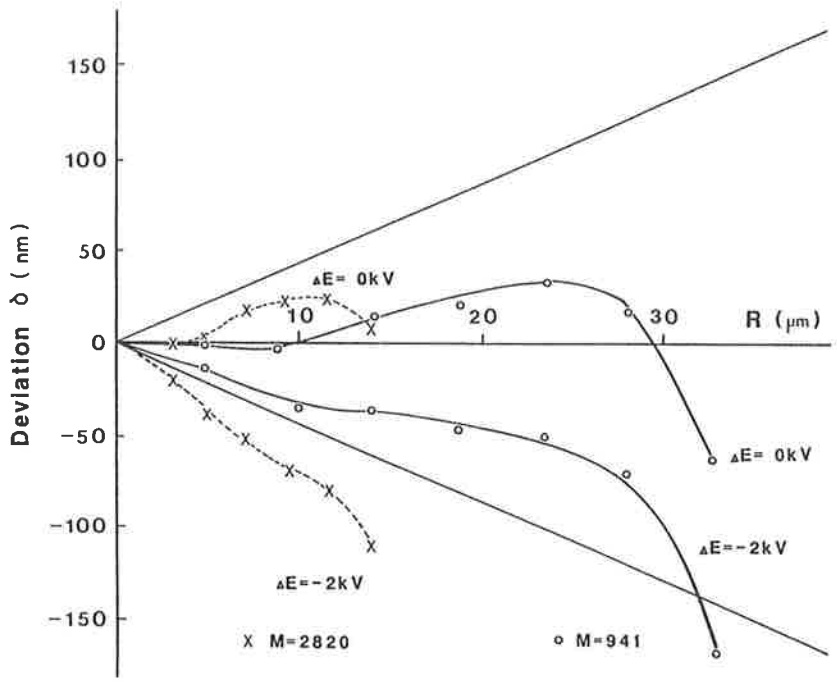


図１．エネルギー損失量△Ｅが，0.2kV のときの物面における電圧中心からの距離Ｒとガウス像点からのずれ

とも重要であることをあきらかにしている（生理研年報10)。

さらに，厚い試料においては，試料中でエネルギーを失った非弾性散乱電子がほとんどであるので，対物レンズの軸上色収差及び結像系レンズ全体としての，倍率色収差および回転色収差の寄与も考える必要がある。軸上色収差は像をぼかすのみであり像点の位置には影響を与えない。しかも超高圧電顕の大きな特徴としての低減効果がある。倍率色収差および回転色収差の寄与はレンズを適当に組み合わせることで低減できることが知られている。そこで，標準モードでこれらの寄与を実験的に検討した。1000倍の倍率において約 5 μm のエポン切片をグレイティングの上部におきエネルギー損失をした電子線による像点の移動をエポン切片のない部分と比較してみると，像点の移動はきわめて小さいことがあきらかになった。より定量的に検討するために加速電圧 1000kV で焦点を合わせておいて撮影しその後入射電子のエネルギーのみを変えて (−2kV, −5kV, −10kV) 撮影したフィルムから像点のずれを測定した。1 図には1000倍および3000倍における測定結果 ($\triangle$ E=0, 2kV) が示されている。

実際のエポン切片では，入射電子のエネルギー損失は 200kV における実験で対物絞りの開口角 α =3.4×10^{-3}rad のとき 220eV (3 μm) をピーク値として半値幅が ～350eV (3 μm) との値が得られており[1)]，この値から類推したエネルギー損失ピーク値 ～500eV (5 μm) 半値幅 ～600eV を用いると，標準モードにおいて選ばれた倍率で撮影すれば，エネルギー損失による像点のずれの寄与は入射条件と試料位置に依存する焦点外れの像点のずれよりも少なくできると考えられる。

文献

1) 会田嗟武朗 et al. (1981) 電子顕微鏡 16, 91－96.

動 物 実 験 施 設

尾崎　毅

概要

動物実験施設は，生理学研究所，基礎生物学研究所の共通施設として，昭和55年４月に設立され，両研究所の活発な研究活動を反映して施設利用も順調に拡大して来た。今日の生命科学の隆盛を物語るように，動物実験の内容もますます精密，多彩になり，用いられる動物も高等ほ乳類から無脊椎動物までその種類もきわめて広い範囲にわたっている。動物実験施設で行なわれる実験は，実験に用いる動物の繁殖や供給を目的とした維持飼育，動物に外科的あるいは免疫学的処置を行なってその反応や結果を研究材料として用いるための管理飼育など飼育を中心としたものと，動物になんらかの処置を加えて情報を抽出する狭義のいわゆる“動物実験”に大別される。研究人口の増加に伴って両者とも増え続けているが，近年の特徴の一つは，生体の機能の解明や，微量の生理活性物質の同定に免疫学的手法が広く用いられるようになり，これまで無縁と思われていた植物学の領域でも実験動物が利用されるようになった事である。また，単離した細胞や培養細胞を用いるものから，ミュータントや疾患モデル動物に胚操作を加えたり，MRI や NMR のような大型の機器を使用するなど実験の規模や内容がきわめて多彩になってきている。

動物実験をめぐる社会的環境の変化も著しく，欧米にならってわが国でも，動物実験の倫理的規範の策定や，使用する動物数を減らすための代替法の確立が求められるようになった。また，すべての動物実験の廃止を主張する動きも一部にみられ，世論の動向にも無関心ではいられなくなった。このような状況を背景として，昨年度策定された「岡崎国立共同研究機構動物実験指針」が，いよいよ今年度より施行に移され，11名の委員からなる「動物実験委員会」も発足した。動物実験施設では，策定された「動物実験指針」に照らして，改めて施設の飼育機器，設備，組織等について，整備に努力する事が求められるところとなり，人的，物的条件の改善を行なう一方，新技術の導入にともなう動物実験の場を確保するため，既設設備の改修や増築計画などを含め多角的に検討を行なっている。

Colocalization of acetylcholinesterase activity and some neuropeptides in the guinea-pig myenteric plxus.

アングラード・フィリップ（パリ大学）
尾崎　毅（生理研）

The localization of acetylcholine, a neurotransmitter playing a basic role in the transmission of nervous information, was still difficult to obtain owing to problems of high solubility or lack of immunogenicity of acetylcholine molecule. Therefore we wanted to study the specificity of the so-called ionic fixation method, devised few years before by Dr. S. Tsuji, which allowed observation of acetylcholine-like cations in the synaptic vesicles of the nerve endings at electron microscopic level. For this purpose, we first performed a simultaneous localization of acetylcholinesterase activity, the enzyme of degradation of acetylcholine, with acetylcholine-like cation in guinea-pig myenteric plexus at ultrrastractural level. In brief, we used, for the detection of acetylcholinesterase activity, a modification of the Tago's method immediately followed by the ionic fixation of acetylcholine-like cation in the synaptic vesicles of the nerve endings. Secondly, in a study led by S. Tsuji on the identification of cholinergic and non cholinergic nerve endings in the peripheral nervous system, we used the ionic fixation of acetylcholine-like cation in order to test in cytology the specificity of the method already checked by biochemical technics [(1)]. S. Tsuji made a communi-cation of these results in the "Neurons and paraneurons" symposium held at Niigata (Oct. 1988). This first part of our study was reported in two publications [(2,3)].

In a second step, we wanted to continue the study of the relation between acetylcholine and neuropeptides in the control of organ functions by the nervous system. An initial study consisting in a co-localization of acetylcholinesterase activity and neuropeptides immunoreactivity at light microscopic level had been already achieved [(4)]. Nevertheless, acetylcholinesterase activity, proved to be present in non cholinergic neurons, was not an ideal criterion to certify the presence of acetylcholine.

Therefore, in the absence of available immunocytochemistry of acetylcholine or choline-acetyltransferase, the enzyme of acetylcholine synthesis, to study the peripheral nervous system, we used, combined with neuropeptide immunocytochemistry, the ionic fixation of acetylcholine-like cation as marker of cholinergic nerve endings. Briefly, this methodology, devised S. Tsuji in rat myenteric plexus, consists in performing, after in aldehydic fixation, an immunoperoxidase procedure to detect neuropeptides, followed by ionic fixation of acetylcholine-like cation. This protocol permitted us to observe simultaneously the persence of neuropeptides immunoreactivity (like substance P or vasoactive intestinal polypeptide) and acetylcholine-like cations at electron microscopic level. This type

of experiment is helpful to determine the presence or the absence of defined neuropeptides in the cholinergic nerve endings and subsequently to bring suggestions about the physiological role of these neuropeptides in the modulation of acetylcholine evoked phenomenons.

This method was performed in rat myenteric plexus [5] and in rat endocrine pancreas (work under redaction). A preliminary study, performed in rat endocrine pancreas, using separately neuropeptide immunocytochemistry and ionic fixation of acetylcholine was reported in the congress of "European Pancreatic Club" held in Glasgow (Sept. 1989).

We would like to poursue this work by using some new available technics like the so called "in situ hybridation" method which provides insights not only on the nature of neurotransmitters present in neurons but also on the rate of their synthesis by one defined neuron at one given moment. It also seems to us that ultrastructural co-localization of choline-acetyltransferase (or acetylcho-line) and neuropeptide immunoreactivities on the peripheral as well as on the central nervous system might be a good model to deepen the understanding on the interaction between acetylcholine and neuropeptides.

As a complement, S. Tsuji, in collaboration with T. Ozaki and S. Yokoyama, made a physio-logical study on the intestinal peristaltism movement. They used as experimental model the quinea-pig ileum deprived of mucosa and submucosa. The peristaltism of ileum was recorded by means of electro-mechano transducer after removing the mucosa and submucosa layers. By this way the respective role of Meissner and Auerbach plexuses in the peristaltism movement could be investigated. In particular the amplitude and the frequency of the peristaltism was checked in intestine intact or deprived of Meissner plexus by means of video-camera image analysis. Histological controls were performed to ensure that the surface of the circular muscle layer was not damaged and that no part of Meissner plexus remained after removal of mucosa and submucosa layers [6]. Finally, this method could be useful to understand the overall role of drugs or neurotransmitters on the peristaltism movement of intestine.

REFERENCES

1. Ohoka T and Tsuji S : Specificity of ionic fixation with silicotungstic acid for cytochemical localization and identification of acetylcholine in synaptic vesicles. Biomed. Res9 : 335−341, 1988
2. Tsuji S,Andra J and Anglade P : Simultaneous ultrastructural localization of acetylcholinesterase activity and acetylcholine-like cation by means of "copper ferricyanide" and H_2O_2-diamiobenzidine" reaction followed by silicotungstic acid ionic fixatin. (accepted for publikation in Histochem J)
3. Tsuji S and Anglade P : Acetylcholine in neurons and paraneurons : a histochemical study. Arch Histol Cytol 52 : 75−83, 1989

4. Anglade P, Michel C, Ozaki T, Tsuji S, Vignon X and Yanaihara N : Simultaneous localization of acetylcholinesterase activity and met-enkephalin, vasoactive intestinal polypeptide and substance P immunreactivity in the rat myenteric plexus. Histochem J 20 : 464－467, 1988

5. Anglade P and Tsuji S : Simultaneous localization of neuropeptides (substance P and vasoactive intestinal polypeptide) with acetylcholine-like cation at electron microscopic level. (accepted for a publication in Acta Histochemica and Cytochemica).

6. Yokoyama S, Tsuji S, Anglade P and Ozaki T:Peristalsis evoked in the intestine tube devoid of mucosa and submucosa. In "Frontiers in Smooth Muscle Research", pp 493－497, 1990 Alan R. Liss, Inc. USA.

技　　術　　課

大平仁夫

技術課の技官は30名を越え研究支援体制もほぼととのい課の活動も比較的円滑に行われるようになってきた。その他，技術課独自の研究会，プロジェクト活動も技術の蓄積とあいまって活発におこなわれている。今後は，各技官が蓄積した技術力が充分生かされると共に，活力ある課を維持するための方向づけを明確にして行く必要があると考えている。

1989年度の技術課活動は，９月に所外研修として２班に別れ，１班は，名古屋商科大学及び愛知県農業総合試験場へ出張した。名商大ではコンピュータネットワークの教育への応用を研修したがこの技術は生理学研究所のネットワークを推進するうえで有益であった。農業試験場では組織培養による無病化，大量増殖，受精卵の移植技術など培養関係技術者には大いに参考になった。あと１班は，環境医学研究所ならびに愛知県工業技術センターにおいて，低圧環境下における生物試料の作成，計測技術ならびに工業自動化への計算機利用についての研修を行い，生理学実験におけるコンピュータの有用性を確認した。

11月末には，技術課内報告会を行い，出向先での業務内容ならびに各自の技術開発，工夫，改善，経験などを発表，技官相互の作業内容に理解を深めると共に，研究内容の動きも理解することにした。これも毎年行っている課活動の一つである。

生理学技術研究会（第12回）は，1990年２月に生理学研究所において開催し，国内の生理科学技術関係の従事者130名が参加した。16日は，専門別に４会場を設置し，専門技術交流の場として活発な意見の交換を行った。17日は共通の発表が行われ，当技術課からは，市川　修技官による西ドイツ Fraunhofer 研究所における磁気共鳴装置の研修報告がなされた。また，特別企画として「生理科学技術と技術者」と題して６講演が用意され，これからの技術者像を考える企画とした。この内容については生理学技術研究会報告12号に詳しく報告される。

さらに，３月９日に同専門部会（第３回）を実施したが，これは課の所内技術研修の場として位置づけ，５課題（細胞単離および器官培養技術，画像処理，生体磁気測定，生体分子のための顕微鏡技術，動物管理における消毒法）について，所内外の専門家による理論ならびに実習を行った。これは，課の所内での技術支援体制を整備して行くうえで，理論や技術面で弱い部分を補う意味で，きわめて重要な研修であると考えている。

上記とは別に，技術課では自主的に行う技術研修の一環としてプロジェクト活動を行っている。これは出向部門，専門技術とは無関係に，相互の技術の向上，技術的視野の拡大，関連技術の修得を目指したグループ活動である。本年度は，前年度より継続のものも含め，免疫化学，細胞技術，自動計測，NC 機器活用技術，写真技術，コンピュータネットワーク，画像処理ツールの開発の７課題を設定した。将来は技術開発的なもの１つを選定し，全員が参画できるようなものも

考えて行きたいと思っている。

第11回生理学技術研究会（1989年２月17，18日開催）及び1989年度の技術課活動については，それぞれ生理学技術研究会報告　第11号および生理学研究所技術課報告　第４号に詳しく報告されている。

第12回生理学技術研究会 (1990. 2. 16～17)

施　設　の　概　要

生理学研究所に所属する次の3施設には，技術課から技官が出向し，各施設で設備の運転，維持管理，利用者の技術支援，利用技術の開発を行っている。

1．生理機能研究施設　生理学研究所に直属した施設で，生体機能検査室，組織培養標本室，超高圧電子顕微鏡室，電子計算機室，磁気共鳴装置室からなっている。

2．動物実験施設　陸生動物室および水生動物室から成っており，それぞれ陸生，水生動物の受け入れ，飼育管理のほか各室設備の維持管理を行っている。生理学研究所と基礎生物学研究所の省令による共通施設として運営されている。

3．共通施設　生理学研究所および基礎生物研究所の共通施設として運営されている。これらは電子顕微鏡室，機器研究試作室，低温冷凍実験室である。

1．生理機能研究施設

(1)生体機能検査室

南　定雄

生体機能検査室は生体機能を研究するための音響実験室，人工気候室，シールド室を備えている。音響実験室は優れた遮音特性(−80dB)と可聴限界以下の暗騒音特性を持ち，隣接の計測室には音響発生器，周波数分析器，データ処理装置等が設置されている。平成元年度には，循環動態計測用ポリグラフおよび自動化学分析装置が導入され実験室が整備された。

(2)組織培養標本室

南　定雄

組織培養標本室は，組織培養室と組織標本室からなっている。培養室には，クリーンベンチ，炭酸ガスインキュベータなどの機器が完備されており，組織標本室には，光学顕微鏡および培養細胞観察のための16ミリ映画撮影装置やビデオ装置が整備されている。平成元年度には細胞の長期保存のために超低温フリーザー（−130℃）を設置した。

技官は出向部門の研究支援のため組織培養標本室を頻繁に活用している。

(3)超高圧電子顕微鏡室

伊藤昭光

今年度における共同利用実験は合計22課題が採択され，その内20課題が実行された。これらの共同実験の成果は，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。

超高圧電子顕微鏡の年間の利用状況を表にまとめたので以下にこれを示す。稼動率は，利用日数と使用可能日数より求めている。

１９８９年度 超高圧電顕月別稼働率

年　月	総日数	日祝祭日 休日	調整日	使用可能日数	所内利用	所外利用	計	稼動率%	備考
1989年 4月	30	6	8	16	6	4	10	63	
5月	31	7	5	19	11	4	15	79	
6月	30	4	7	19	7	1	8	42	
7月	31	6	8	17	1	8	9	53	修理 2日
8月	31	4	7	20	7	2	9	45	
9月	30	7	6	17	6	3	9	53	
10月	31	6	11	14	6	0	6	43	改造工事 5日
11月	30	5	8	17	7	4	11	65	改造作業 2日
12月	31	9	6	16	3	7	10	63	
1990年 1月	31	9	5	17	4	6	10	59	
2月	28	5	6	17	13	8	21	124	
3月	31	5	6	20	4	19	23	115	
計	365	73	83	209	75	66	141	67	

フィラメント点灯時間　522.5 時間
使用フィルム枚数　8,457 枚

⑷電子計算機室

池田明聡

今年度は，昨年度に導入された中央コンピュータシステム（HP9000/835SRX 他），所内 LAN，パソコン利用環境等の整備を進めてきた。

まず，中央コンピュータシステムに関しては，主に利用環境と所内 LAN のサーバーとしての整備を行った。具体的には，画像処理サブルーチンパッケージの登録，初心者用マニュアルの整備，LAN に関する各種情報の登録，NFS サーバーサービスの開始，等である。また，BITNET のノードマシンである基礎生物学研究所電子計算機室の VAX－11/780 及び学術情報ネットワークのサービスを行っている分子科学研究所電子計算機センターの HITAC M－680 と，デジタル電話を介して接続した。現在の利用登録者数は，８研究部門・施設で13名であり，データサーバー，画像処理，プログラム開発，ネットワーク利用等の目的で利用されている。

次に所内 LAN に関しては，利用を希望する研究部門周辺を中心に，マルチポートレピータ等を設置し接続ポートを整備した。現在８研究部門・施設の30台以上の計算機が接続され，ワークステーションやパソコンを使った実験データの収集解析等に利用されている。また，近い将来予想される広域ネットワーク利用に対処するために，機構内情報ネットワークの構築と利用について，各研究所及び管理局の担当者が集まり検討を始めた。この検討会での意見を参考に，今年度は機構内ネットワークの基幹ネットワークループとするための光ケーブルの敷設を行った。平成２年７月頃に所内 LAN と接続され運用が開始される予定である。

パソコン利用に関しては，生理研で有用と思われるワープロ，作図，ユーティリティソフト等の試用と検討を行い，利用相談者に情報を提供している。また，電子計算機室内にオープン利用のパソコンを用意し所内利用者，共同研究者の便宜を計っている。

現在，生理学研究所に於いて利用されているコンピュータは，ワークステーションが10台以上，パーソナルコンピュータが100台以上にのぼる。研究所職員の数から考えると，１人１台以上コンピュータが使われていることになる。これは，生理研に於けるコンピュータの利用形態の変化と，それに伴う新たな問題の発生を意味しており，電子計算機室としての新たな対応が望まれており，今後の検討課題である。

⑸磁気共鳴装置室

市川　修

活動概要

昭和62年度に導入設置された磁気共鳴装置を使用した共同利用実験が開始された。

１．共同利用実験開始にともない，施設の利用法について申し合わせを行い，これをもとに“磁気共鳴室利用について”のしおりを作成した。

２．生理動態画像解析装置の操作説明書を作成した。

3．磁気共鳴装置室のパンフレットを作成した。

4．パルスシーケンスの試作を簡便にするため，編集用ソフトウェアを作成した。

5．MR データ処理ソフトウェアの開発環境を整備した。

6．第１回磁気共鳴室ワークショップ（２・24～25），及び第２回ワークショップ（８・１）を開催した。

装置稼働状況

平成元年度　磁気共鳴装置月別稼動率

年　月	総日数	保守日	使用可能日数	所内利用	所外利用	計	稼動率	備考
1989. 4	30	3	27	0	3	3	11	
5	31	3	28	7	3	10	36	
6	30	3	27	10	0	10	37	
7	31	2	29	10	13	23	79	
8	31	5	26	9	16	25	96	修理　2
9	30	4	26	6	13	19	73	
10	31	6	25	3	8	11	44	調整　4
11	30	7	23	2	8	10	43	修理　4
12	31	7	24	2	18	20	83	
1990. 1	31	4	27	4	8	12	44	修理　1
2	28	3	25	5	3	8	32	
3	30	4	26	3	6	9	35	
計	365	51	314	61	99	160	51	

＊　保守日以外の日祝祭日は、使用可能日数に含めた。

2．動物実験施設

小川良斎，小木曽昇

施設利用

［陸生動物室］

陸生動物室の飼育室の利用は，生理学研究所17部門，基礎生物学研究所12部門の計29研究部門で昨年度に比べ，生理研で２研究部門が減少し，基生研では１研究部門が増加したが，これは昭和62年度から平成元年度にかけて生理学研究所における研究部門のスタッフの異動が相い次ぎ，今年度は発令までの空白期と重なったためであろう。月間利用件数も平均71件で４件の減少。また，搬入した動物は，13種，約3,900匹で昭和62年度の水準まで下がった。飼育室の利用の特徴としては，鳥類でのキメラの作成のための卵の採取，ミュータントマウスを用いてキメラマウスを作出するなどの新しい動物実験技術の導入と，ラット，マウス，ウサギ等での，免疫，抗体の作成や，育成，老化の実験等と慢性実験が増加し，飼育期間の長期化が見られる。長期利用が増加しているために一部の飼育室では収容能力が飽和状態に達し，飼育室の転用等で対処している。平成元年度より本機構においても「動物実験方針」が施行され，飼育管理から動物実験の終了に至るまで適正な取扱いが求められるところとなったが，飼育条件の改善のためにも飼育室の拡充は急務である。飼育中の動物については，ウサギ，モルモットで搬入後に死亡する例が散発したが，輸送時のストレスによるものか，他の原因によるものか不明である。

検疫は，イヌ２件，ネコ31件，サル２件について行ったが，イヌ，サルとも件数が少なくトラブルはなかった。ただ，ネコについては，搬入されたものの大部分が若令であったため十分な検疫が出来ず，検疫の方法について検討が必要である。

実験室の利用は，飼育室と同様に長期の利用が増え，手術室，手術実験室，標本室等では複数の研究部門による長期利用が行われている。他の実験室においても同様な傾向があり，実験室の拡充も期待されている。

設備関係の事故としては，空調用ヒートポンプの制御関係のトラブルのほか，設立10余年を経過して機器の老朽化に基づく不調が目立った。ボイラー用軟水器の交換，冷凍機の補修を行った他，ボイラー，貯湯槽，コンプレッサー等についても定期点検時に部品の交換や，オーバホールの必要が増えた。

［水生動物室］

水生動物室の利用状況は，生理学研究所，基礎生物学研究所各６研究部門，計12研究部門で昨年より４研究部門の増加となり，利用件数は月平均39件で約３件の減少である。搬入した動物は20種，（海水動物８種，淡水動物12種）約3,000匹であった。飼育動物は，キンギョ，アマゴ，ゼノパス等，淡水動物が増加し，また，長期的に飼育されるものが増加しているのに対して，ウニ，ヒトデ類等海水動物の短期飼育が今年の特徴である。淡水動物の使用水槽の増加に伴い，昨年度

から継続で今年も飼育環境の改良を行った。１トン水槽（２基）に独立沪過槽の増設，0.5トン（５基）の連続給排水工事である。

主なトラブルとして，加熱冷却ユニットの温度コントローラーの動作不良や，経年劣化による機器（ポンプ，加熱冷却ユニット）の故障の他，海水による飼育水槽，架台の腐触等が見られ，今後の対策を考える時期にきている。飼育動物の疾病の発生は，アマゴ，キンギョ等に多く，薬浴治療を施しているが，原因究明には到っていない。連続換水が行える水槽に移してからは，疾病の発生は減少傾向にある。

[伊根実験室]

実験室の利用は，３研究部門（生理学研究所２，基礎生物学研究所１）で利用の主なるものは，ヤリイカ，ウミウシ，海藻を材料とした実験である。年間を通して利用されているが，特に10月から３月にかけてはヤリイカの実験が集中している。

手術・実験室月別利用件数（平成元年度）

室名＼月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	計
手術室＊	2	3	3	3	8	3	4	6	4	4	3	3	46
生理実験室＊	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	18
生化学実験室＊	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
測定室＊	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	13
手術実験室＊	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
解剖室	1	1	2		2		2		4		3	2	17
レントゲン室	1	4	1			2						2	10
標本室＊	2	2	2	2	1	1	2	1	7	1	1	7	29
計	10	14	12	9	15	10	13	12	20	10	12	20	157

＊は長期使用

部門別・動物種別・搬入動物数（平成元年度）

部門名＼動物種	キンギョ	アメリカナマズ	アマゴ	ニジマス	イセエビ	クルマエビ	ヤリイカ	ゼノパス	ヒトデ類	ウニ類	イモリ	ウナギ	フナ	コイ	アメフラシ	ワタリガニ	ホタテガイ	ザリガニ	ウグイ	メダカ	合計
所長																	5				5
生体膜								12													12
機能協関					12	12								48	11	5					88
神経情報	15						23							40					10		88
情報記憶								20													20
動物実験施設																		424			424
生殖	280		171	24				136				110	100	48						500	1369
感覚情報		53																			53
形態形成											700										700
行動制御								10													10
細胞融合									100												10
細胞機構										120											120
計	295	53	171	24	12	12	23	178	100	120	700	110	100	136	11	5	5	424	10	500	2989

部門別・動物種別・搬入動物数（平成元年度）

部門＼動物種	ラット	マウス	ヌードマウス	ウサギ	モルモット	イヌ	ネコ	サル	ヤギ	ニワトリ	カメ	カエル	ハト	カモ	計
神経化学	391	122		4	21										538
超微小形態	245	226		21	3										495
細胞内代謝	6	5	20	17	100										148
生体膜	7	16			43										66
機能協関	119			13								21			153
能動輸送	319														319
神経情報		4		6			203			2	28	19	11	2	275
液性情報	4			3											7
高次神経機構	34						23								57
情報記憶	258	225													483
高次神経性調節					171		5	12							188
高次液性調節								3							3
生体システム					10					670					680
生体機能					13	2									15
組織培養標本室	13														13
技術課		5													5
動物実験施設					96										96
細胞機構		24													24
細胞内エネルギー				6											6
細胞増殖				3											3
生殖		30		8											38
細胞分化		57													57
形態形成		37								20					57
発生生物学		21													21
計時機構															
情報制御				5											5
行動制御	76	56													132
計	1472	828	20	86	457	2	231	15		692	28	40	11	2	3884

陸生動物月別・動物種別・搬入動物数（平成元年度）

動物種＼月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	計
ラット	163	111	74	124	220	127	133	63	130	78	50	199	1472
マウス	87	39	95	123	26	54	40	32	32	38	62	200	828
ヌードマウス	10	10											20
ウサギ	7	19	12	9	3	5	7	6	4	5	5	4	86
モルモット	58	62	38	45	41	28	30	42	20	44	30	19	457
イヌ											1	1	2
ネコ	25	44	21	22	10	21	25	18	15	12	10	8	231
サル			6		2							7	15
ヤギ													0
ニワトリ	36	47	58	10	5	28	94	63	97	45	48	161	692
ハト		6				5							11
カモ									2				2
カメ	20					8							28
カエル	5		10	4							21		40
計	411	338	314	337	307	276	329	224	300	222	227	599	3884

水生動物月別・動物種別・搬入数（平成元年度）

動物種＼月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	計
キンギョ				80			200	15					295
アメリカナマズ			53										53
アマゴ			122				49						171
ニジマス	2	1	1	2				2	6		10		24
イセエビ	2				1	2			2	5			12
クルマエビ								3			3	6	12
ヤリイカ												23	23
ゼノパス		12		26	5	22		56		20	17		158
ヒトデ類			100										100
ウニ数				120									120
イモリ												700	700
ウナギ	20	11	21							37		21	110
フナ		100											100
コイ	38			10		18	20		20	15		15	136
アメフラシ									11				11
ワタリガニ										5			5
アメリカザリガニ					20	14	390						424
ウグイ										10			10
メダカ										500			500
ホタテガイ											5		5
計	62	124	297	238	26	56	659	76	39	592	35	765	2969

3．共通施設

(1)電子顕微鏡室

大庭明生，前橋　寛

(a)電顕室の状況

平成元年度（1989年度）には，超薄切片の染色・水洗の工程が全て自動化され，多量の切片を同一条件下（染色温度と時間）で再現性よく電子染色できる超薄切片用自動染色装置を購入し，周辺機器の充実を計った。

室の将来計画として，昨年度は電子顕微鏡の更新と新型顕微鏡の導入をめざして，その仕様を検討したが，本年度はその計画の一環として(1)周辺機器の経年劣化による性能の低下に対処し，また研究課題の進展に対応できる周辺機器の導入をめざした周辺機器更新案と(2)電顕室の拡充をめざした増築計画案を作成した。

更新案では昭和52，53年度設置周辺機器（超ミクロトーム，包埋装置，イオンコーター，写真撮影装置）を中心に見直し，機器の単独導入方式ではなく，試料作製過程でつながりのある実験機器をシステム化した導入案とした。主なものは(1)超薄切片作製自動化システム　(2)凍結試料薄切システム　(3)生体構造凍結固定システム　(4) SEM 試料前処理システム　(5)プラズマ重合膜作製装置　(6)ビデオプリントシステムである。

増築計画案では，電子顕微鏡のみを備えた室から電子顕微鏡を含む様々な生物構造解析装置を設置できる室の間取り考えた。室の構成は，高電圧分析電子顕微鏡室，暗室，凍結切片作製室，生細胞観察室，情報解析室の５室である。

こうした電顕室独自の将来計画を立案する一方，両研究所で設置及び将来設置予定の実験機器のなかで，共用性の高い実験機器の受け入れを申し合わせた。受け入れの実験機器は，(1)共同利用機器として有用性の高い顕微鏡及びその附属装置　(2)現在設置してある装置と同等またはそれ以上の性能をもち，利用の要求度の高い機器　(3)試料作製等の利用範囲を広げる可能性のある機器である。今後，これらの受け入れを，電顕室の特色を生かしつつ，研究動向に対応できる施設作りの一環として活用していきたいと考えている。

今回，この申し合わせに基づき，生理学研究所生理機能研究施設より，顕微分光装置を受け入れ，微分干渉装置，蛍光装置，画像処理装置付光学顕微鏡に組み換へ設置した。

(b)研究内容一覧表

本年度に電顕室を利用してなされた研究の総件数は35件であった。機構内で19件あり，機構外では，国内で13件，国外は，イラク，インド，フランスの研究者による利用が３件あった。下記の表はその部門と施設および大学，研究所と研究内容の一覧表である。

三研究所

研究所	部門・施設	研究内容
生理学研究所	神経情報	網膜の細胞構築の微細構造解析
	機能協関	神経分泌細胞の超薄切片観察 脳下垂体後葉の散乱変化に対応する微細構造解析
	能動輸送	小腸単離上皮細胞の走査像観察
	組織培養標本室	培養血管内皮細胞の形態観察
	細胞内代謝	小腸単離平滑筋の走査像観察
	高次神経性調節	リポゾームのネガティブ染色観察
	技術課	薄切切片表面の走査像観察
基礎生物学研究所	形態形成	動物細胞の分化形態の観察 動物細胞の免疫電顕観察 培養細胞の超微形態観察
	細胞内エネルギー変換	微細藻類の微細構造観察
	感覚情報処理	脊椎動物網膜の機能的細胞構築と神経回路網の解析
	生殖	ウサギ精巣の微細構造観察
	スペクトログラフ室	冷却水フィルター付着金属粉のX線分析同定
	技術課	動物・植物細胞の超薄切片観察
分子科学研究所	機器センター	金属超微粒子の形態及び粒径分布の観察
	分子集団動力学	有機薄膜の構造観察 ストロンチウムフィルムの表面観察

所外（国内）

大学・研究所	研究代表者名	研究内容
愛知教育大学	渡辺貢次	Bacillus 属芽胞の表面構造変化の観察
鶴見大学	尾口仁志	骨・生体材料の境介面の観察
名古屋大学	加藤知	リン脂質膜の表面構造の観察
愛知県コロニー研究所	渡部眞三	網膜神経細胞の観察
産業医科大学	上田宏	硬骨魚下垂体の免疫電顕的観察
東京大学	雨宮昭南	ウニ胚 microvilli の観察
豊田工業大学	神谷芳弘	電顕像のコントラストの解析
岡山大学	河又邦彦	網膜視細胞の形態観察
大阪大学	村上富士夫	シナプスの可塑性の解析
	多田友香子	シナプスの可塑性の解析
	勝丸博信	中枢神経系の微細構造観察
兵庫県立成人病センター	垰本勝司	培養グリオーマ細胞の免疫染色切片の SEM 観察
早稲田大学	吉岡亨	Xenopus 卵母細胞の SEM 観察

所外（国外）

国名，大学・研究所	研究者名	研究内容
イラク バクダッド大学	ABDUL·RAZAK, Yass	サルモネラ症による仔牛小腸粘膜上皮の形態観察
フランス パリ大学	ANGLADE, Philippe	腸神経末端におけるアセチルコリンエステラーゼ活性の局在
インド マドラス医科大学	MANIVANNAN, Shanthi	脳下垂体後葉の散乱変化に対応する微細構造の変化の解析

(c)技術研修

前回，新導電化装置（日立イオンボンバーダ　VAIS 昭和63年度導入）の導電効果を桜（ソメイヨシノ）の花弁と花粉を用い，検討し報告した。(生理学研究所年報，1988年)

今回　この装置の特性であるエッチング効果を，エポン包埋樹脂試料の薄切切片への走査像観察に応用し，同一試料作製からの透過像と，走査像の相関の可能性を探った。

イオンボンバード法によるエッチング効果は，プラズマの出力と照射時間，距離が関係する。ここではプラズマの出力と照射時間に着目し，検討した。材料にはマウスの膵臓を用い，超薄切片作製法に従い，エポン包埋し，試料を0.5ミクロンに薄切し，スライドガラスに貼り，プラズマ出力を 1, 2, 3, 4, 5W と変化させ，照射時間は各々 5 分間とし，その後，プラチナを10 Å 蒸着し，走査像観察をした。その結果は下記の通りである。

(1) イオンイボードの最適なエッチング効果のプラズマ出力は，1～2W 付近にあり，3W 以上では過エッチング像がみられた。

(2) 装置のエッチング効果により，エポン樹脂の除去ができ，イオンスパッタ法では観察できなかった走査像が得られた。また従来のスパッタエッチング法において観察できる走査像より透過像と相関可能な走査像が観察できた。

この詳細は「生理学研究所技術課報告」第 5 号に報告した。

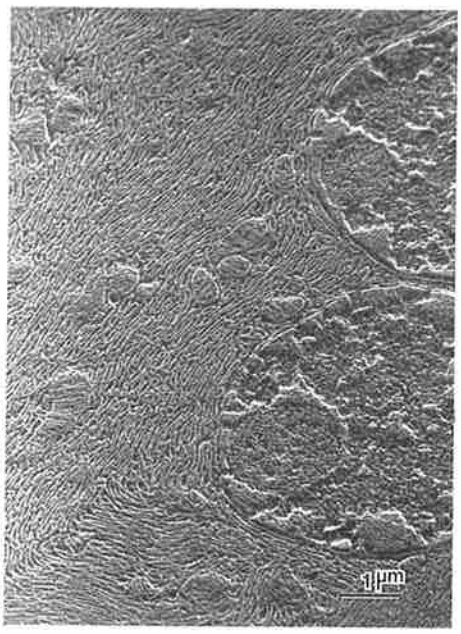


写真 1 .
イオンボンバード 2W, 5 分で観察された膵臓エポン切片

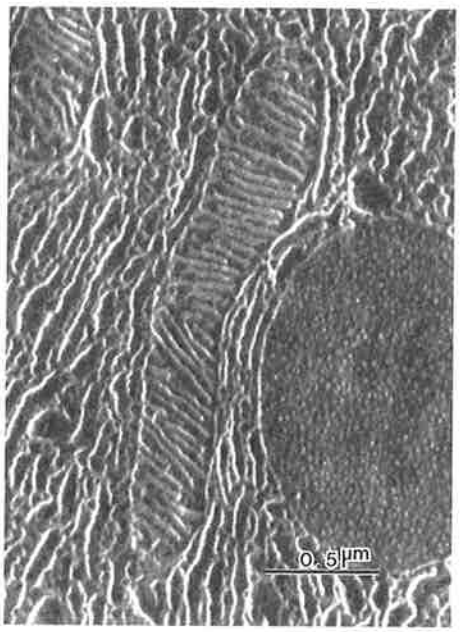


写真 2 .
イオンボンバード 1W, 5 分で観察された膵臓エポン切片のミトコンドリア

(2)機器研究試作室

加藤勝己，山口　登

機器研究試作室は，生理学研究所と基礎生物学研究所の共通施設として設立され，両研究所で行われている様々な実験に使用される特殊実験機器の開発，製作，改良を行っている。当施設は，機械工作，電気回路及びガラス・プラスチック・木材の工作の各分野からなっている。現在は，機械工作技官２名で担当している。しかし電気回路機器の依頼も多々あり，電気回路技官の充実が望まれている。

当施設で製作した実験機器・部品としては，イカ巨大神経用，脳切片用など各種チェンバー，粘膜電流記録用電極，二色性直線セルホルダ，C－CCD カメラ用アダプタなどがある。設備としては，一般工作室に設置されている旋盤，縦フライス盤が十年以上の使用で精度維持できなくなったため，生理学研究所にお願いして，更新を行った。機種は，旋盤（立谷川機械工業・TL－550S），フライス盤（井上工機・IV－600F）とも前回の機械とほぼ同じタイプである。しかし若干操作が異なるため使用者に対する講習会を今後行いたいと考えている。また，最近ガラス，セラミックスなどの切断，穴あけなどの需要も多々あるので，切断用としてダイヤモンドソー(LUXO・V－33)を設置した。穴あけ用としては既に超音波加工機が設置されている。

一方，故障した工作機械としては，放電加工機がある。この機械は，超硬，ステンレスをはじめとする難被作材の加工を行う工作機械である。現在，修理費などの関係で修理できない状態である。

委員長は，昨年度に引続き大森教授が担当され，機器研究試作室委員会は本年度は１回行われ，以下のようなことが話し合われた。

６月16日㈮

○委員長及び副委員長の選出

○昭和63年度の予算執行及び利用状況の報告

○平成元年度の運営計画

○機器更新について

○技官の補充について

○地震対策について

なお，機器研究試作室の平成元年度の利用状況は，以下の通りである。

機器研究試作室利用機器表（件数）

（平成元年度）

月	フライス	ボール盤	帯鋸盤	旋盤	横切盤	切断機	その他	合計
4	25	24	8	11	8	5	25	106
5	14	13	9	6	8	8	16	74
6	12	17	9	7	8	7	27	87
7	8	10	8	9	6	3	20	64
8	15	10	9	10	9	5	28	86
9	26	22	21	13	13	7	22	124
10	33	13	21	16	11	13	36	143
11	21	16	9	7	5	7	32	97
12	12	12	12	4	8	11	29	88
1	18	13	14	6	12	3	20	86
2	6	7	6	5	4	5	12	45
3	28	13	13	12	2	3	22	93
合計	218	170	139	106	94	77	289	1093

機器研究試作室利用人数表

（平成元年度）

月	生理研（人）	基生研（人）	その他（人）	合計（人）	延べ時間（h）
4	60	8	2	70	149
5	39	10	0	49	65
6	42	11	0	53	81
7	35	7	1	43	44
8	48	5	0	53	99
9	56	15	0	71	114
10	72	5	0	77	168
11	51	10	0	61	105
12	37	10	0	47	92
1	45	6	0	51	94
2	25	3	0	28	38
3	43	3	1	47	107
合計	553	93	4	650	1157

部門別利用状況

高次神経性調節	125	動物実験施設	56	神経情報	52
超微小形態生理	46	生体システム	46	高次神経機構	46
機能協関	40	生体膜	32	生体機能検査室	31
超高圧電顕室	22	高次液性調節	14	神経化学	12
情報記憶	9	細胞内代謝	7	液性情報	6
電子顕微鏡室	4	事務室	2	電子計算機室	1
技術課	1	能動輸送	1		
エネルギー変換	22	スペクトログラフ	13	情報制御	11
計時機構	11	分析室	10	洗浄室	8
細胞分化	5	ＲＩ実験施設	5	人工気象室	2
細胞器官培養室	2	形態形成	1	行動制御	1
発生生物学	1	細胞増殖	1		
分子研その他	4				

⑶低温冷凍実験室

低温環境を必要とするタンパク質等の生物活性の分離，精製等に使用するほか低温でないと変質する試料，試薬，細胞および実験機器の保管に使用されている。

【研　究　発　表】

a．発表論文

b．学会発表

a．発表論文

〔目　　次〕

神経化学研究部門 …… 117
超微小形態生理研究部門 …… 118
細胞内代謝研究部門 …… 119
生体膜研究部門 …… 122
機能協関研究部門 …… 124
能動輸送研究部門 …… 126
神経情報研究部門 …… 127
液性情報研究部門 …… 131
高次神経機構研究部門 …… 133
情報記憶研究部門 …… 135
高次神経性調節研究部門 …… 135
生体システム研究部門 …… 136
高次液性調節研究部門 …… 137
生体機能検査室 …… 140
組織培養標本室 …… 141
磁気共鳴装置室 …… 141
超高圧電子顕微鏡室 …… 142
動物実験施設 …… 142

発　表　論　文

《神経化学研究部門》

1. Tanaka, H., Agata, A. & Obata, K. (1989) A new membrane antigen revealed by monoclonal antibodies is associated with motoneuron axonal pathways. Dev. Biol. 132 ; 419－435.

2. Go, M. J., Tanaka, H., Obata, K & Fujita, S. C. (1989) Developmental changes in phosphorylation state of neurofilament proteins in the chick embryonic optic nerve. Dev. Biol. 134 ; 85－102.

3. Hirabayashi, Y., Hirota, M., Suzuki, Y., Matsumoto, M., Obata, K. & Ando, S. (1989) Developmentally expressed o－acetyl ganglioside GT3 in fetal rat cerebral cortex. Neurosci. Lett. 106 ; 193－198.

4. Shirao, T., Kojima, N., Nabeta, Y. & Obata, K. (1989) Two forms of drebrins, developmentally regulated brain proteins, in rat. Proc. Jpn. Acad. 65 ; 169－172.

5. Akagawa, K. & Uyemura, K., (1989) Inhibitory effect of peripheral myelin P2 protein on the proliferation of tumor cells. Biomed. Res. 10 ; 411－412.

6. 小幡邦彦 (1989) 神経系の初期発生とモノクロナール抗体，実験医学，7 (8) ; 57－62.

7. Akagawa, K. & Uyemura, K. (1989) Calcium and voltage dependent potassium channels in the rat retianl amacrine cell identified in vitro using a cell type－sepcific monoclonal antibody. Neurosci. Res. suppl. 9 S171.

8. Akagawa, K. & Uyemura, K. (1989) Layered structures in the reaggregate cultures from rat retinae ; possible presence of functional neural connections in vitro. Jpn. J. Physoil. 39 ; suppl. S155.

9. Murakami, Y., Akagawa, K. & Uyemura, K. (1989) A monoclonal antibody recognizing a protein specific for the zona pellucida of mice and rats. Jpn. J. Physiol. 39 ; suppl. S46.

10. 植村慶一，赤川公朗 (1989) 神経系と免疫系の共通性－蛋白質（後藤文男編） Annual Review

神経，中外医学社，p12－22.

《超微小形態生理研究部門》

1．Watari, H., Murakami, M., Seo, Y. & Shimoyama, Y. (1989) Vector electron paramagnetic resonance spectroscopy with first and second harmonic displays of ferrihemoglobin. Biochem. Biophys. Res. Commun. 162 (2) ; 681－685.

2．Murakami, M., Suzuki, E., Miyamoto, S., Seo, Y. & Watari, H. (1989) Direct measurement of K movement by ^{39}K NMR in perfused rat mandibular salivary gland stimulated with acetylcholine. Pflügers Arch. 414 ; 385－392.

3．Steward, M. C., Seo, Y. & Case, R. M. (1989) Intracellular pH during secretion in the perfused rabbit mandibular salivary gland measured by ^{31}P NMR spectroscopy. Pflügers Arch. 414 ; 200－207.

4．Era, S., Sogami, M., Kuwata, K., Fujii, H., Suzuki, E., Miura, K., Kato, K. & Watari, H. (1989) ^{1}H－n. m. r. studies on cross－relaxation phenomena in bovine mercaptalbumin (BMA) solution and partially hydrolyzed bovine plasma albumin (BPA ＊) gel. Int. J. Peptide Protein Res. 33 ; 214－222.

5．Watari, H., Murakami, M., Seo, Y., Suzuki, E., Kuki, S. & Maeda, M. (1989) NMR : A new method for the neurosciences. Neurosci. Res., Suppl. 9 ; S14.

6．Suzuki, E., Maeda, M., Kuki, S., Tsukamoto, K., Kawakami, T., Seo, Y., Murakami, M. & Watari, H. (1989) ^{31}P Spin－lattice relaxation time measurements in biological systems : heart, liver, kindey and erythrocytes of rat. 日磁医誌，9 (2) ; 115－120.

7．Shimoyama, Y., Sogami, M. & Watari, H. (1989) Vector electron paramagnetic resonance study of dynamic structure in bovine plasma albumin. Reports on Progress in Polymer Physics in Japan 32 ; 559－562.

8．Nakahari, T., Murakami, M. & Kataoka, T. (1989) Shrinkage of rat mandibular acinar cell with acetylcholine detected by video－enhanced contrast microscopy. Jpn. J. Physiol., 39 (4) ; 609

－615.

9．前田宗宏，鈴木賢一，市川　修，瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘，岩崎　聖，大石　元，打田日出夫 (1989) MRI による緩和速度測定の精度評価：同一マグネットを用いた MRS との比較。日磁医誌，8 (4)；263－267.

10. 前田宗宏，鈴木英司，吉矢和彦，伊藤伸一，松尾敏和，瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘，津島寿一，広橋伸治，尾辻秀章，岩崎　聖，大石　元，打田日出男 (1989) MRI における partial volume effet の実験的検討。日本医放会，49 (11)；1404－1410.

11. 村上政隆 (1989) ^{31}P NMR スペクトロスコピーの生物学・医学応用。医学のあゆみ，148 (5)；326－330.

12. 瀬尾芳輝 (1989) ^{23}Na MRI と ^{39}K MRS の生体応用。医学のあゆみ，148 (5)；331－334.

13. 村上政隆 (1989) In vivo multinuclear MRS について。日医放生物部会誌，2 (1)；22－31.

14. 亘　　弘，村上政隆，瀬尾芳輝 (1989) NMR より見た細胞内イオン。電気化学および工業物理化学，57 (7)；648－651.

15. 曽我美　勝，恵良聖一，加藤一夫，亘　　弘 (1989) 正常および腫瘍組織内水構造と ^{1}H－NMR 情報。電気化学および工業物理化学，57 (7)；642－647.

16. 村上政隆 (1989) 容積受容器。日本臨床，47；1424－1430.

《細胞内代謝研究部門》

1．Happola, O., Lakomy, M. & Yanaihara, N (1989) Met^{6}－enkephalin－and Met^{6} －enkepalin－Arg^{6}－Gly^{7}－Leu^{8} immunoreactive nerve fibers in the pig female reproductive system. Neurosci. Lett. 101；155－162.

2．Kuwagara, A., Cooke, H. J., Carey, H. V., Mekhjian, H., Ellison, E. C. & Mcgregor, B. (1989) Effects of enteric neural stimulation on chloride transport in human left colon in vitro. Digestive Disease & Sci. 34 (2)；206－213.

3. Kuwahara, A., Ozaki, T. & Yanaihara, N. (1989) Galanin suppresses the neurally－evoked contractions of circular muscle in the guinea－pig ileum. Eur. J. Pharmacol. 164 ; 175－178.

4. Ohgai, H., Kumakura, T., Komoto, S., Matsuo, Y., Ohshiden, K., Koide, T., Yanaihara, C. & Yanaihara, N. (1989) Production of rat epiermal growth factor by Escherichia coli cells containing a secretion plasmid. J. Biotechnology 10 ; 151－160.

5. Okamura, H., Murakami, S., Ynaihara, N. & Ibata, Y. (1989) Coexistence of catecholamine and methionine enkephalin－Arg^6－Gly^7－Leu^8 in neurons of the rat ventrolateral medulla oblongata. Histoachemistry 91 ; 31－34.

6. Takahashi, Y., Okamura, H., yanaihara, N., Hamada, S., Fujita, S. & Ibata, Y. (1989) Vasoactive intestinal peptide immunoreactive neurons in the rat suprachiasmatic nucleus demonstrate diurnal variation. Brain Res. 497 ; 374－377.

7. Ito, A., Ohbayashi, M., Hane, M., Takeda, H., Iimuro, F., Yonzawa, N., Okada, M., Ohno, H., Iguchi, K., Mochizuki, T. & Yanaihara, N. (1989) A sensitive immunoradiometric assay for human adrenocorticotropic hormone. Biomed. Res. 10 (6) : 491－497.

8. Kawai, S., Matsubara, A., Ohshiden, K., Matsuo, Y., Yasuda, S., Hong, Y. －M. & Yanaihara, N. (1989) Isolation and sequence analysis of EGF from rabbit urine. In : Peptide Chemistry 1988 (ed. M. Ueki),169－172.

9. Kuwahara, A., Sugiura, K. & Yanaihara, N. (1989) Structurefunction relationship of cholecystokinin (CCK) to gastroduodenal motility in dogs. Biomed. Res. 10 (2) : 123－130.

10. Takeda, Y., Hoshino, M., Yanaihara, N., Yanaihara, C., Isobe, J., Sugiura, N., Kashimoto, K., Takano, Y. & Kamiya, H. (1989) Comparison of CCK－8Receptors in the Pancreas and Brain of Rats Using CCK－8 Anaogues. Jpn. J. Pharmacol. 49 : 471－481.

11. Yanaihara, N., Yanaihara, C., Zhang, T. Hoshino, M., Iguchi K. & Mochizuki, T. (1989) Recent advances in brain－gut hormones. Arch. Histol. Cytol. 52 (Suppl.) : 49－54.

12. Zhang, T., Iguchi, K., Hoshino, M., Yanaihara C. & Yanaihara, N. (1989) Gonadotropin－releasing hormone－associated peptide in rat brain tissues. Biomed. Res. 10 (5) : 371－375.

13. Zgabg, T., Hoshino, H., Iguchi, K., Mochizuki, T., Yanaihara, C. & Yanaihara, N. (1989) Distribution and molecular forms of pro－LHRH－related peptide immunoreactivity in porcine brain. Biomed. Res. 10 (5) : 377－384.

14. Zhang, T., Mochizuki, T., Iguchi, K., Hoshino, M., Yanaihara, C. & Yanaihara, N. (1989) Rat gonadotropin－releasing hormone－associated peptied (GAP) : biochemical and immunochemical characterization. Biomed. Res. 10 (6) : 447－452.

15. 小出隆生，矢内原昇，矢内原千鶴子，王子田和秀，足立昇司 (1989) ラット EGF 特異 RIA の確立とラット尿および組織内 EGF 成分。消化管ホルモン（Ⅷ）（医学図書出版） 625－632.

16. 長島知明，望月徹，鈴木睦昭，矢内原昇，矢内原千鶴子 (1989) バロシン：特異 RIZ の確立，組織内分布および作用。消化管ホルモン（Ⅷ）（医学図書出版） 382－388.

17. 鈴木睦昭，石川純嗣，井上孝，井口和明，桑原厚和，望月徹，星野稔，矢内原千鶴子，矢内原昇，(1989) CLP－1 関連ペプチドの生物化学的性質。 Peptide Hormones in Pancreas 9 (Biomedical reseach Foundation) 128－134.

18. Kuwahara, A., Ozaki, T. & Yanaihara, N. (1989) Effect of galanin on smooth muscle contracions in the guinea－pig ileum. Neurosci. Res. (suppl. 9) S126 (＊＊＊)

19. Kuwahara, A., Ozaki, T. & Yanaihara, N. (1989) Role of galanin on non－cholinergic excitation in guinea pig ileum. Jpn.J.Physiol. (suppl.)39 :S90. (＊＊＊)

20. Yanaihara, N., Mochizuki, T., Naruse, S., Kuwahara, A., Inoue, T. & Yanaihara, C. (1989) Structure－function relationship of helodermin. Regulatory Peptides 26 : 186 (＊＊＊)

21. 桑原厚和，尾崎毅，矢内原昇 (1989) ガラニンによるモルモット回腸非コリン作働性収縮の制御。第13回神経科学学術集会予稿集　177, 新潟

22. 桑原厚和，尾崎毅，矢内原昇 (1989) モルモット回腸収縮活動に対するガラニン及びその誘導体の作用。脳腸ホルモン学会ニュース　4 (3) : 42.

23. Suzuki, M., Ishikawa J., Inoue, T., Mochizuki, T., Kuwahara, A., Yonezu, E., Hoshino, M., Yanaihara, C. & Yanaihara, N. (1989)Synthesis of GLP－L related peptides and production of

GLP−1 specific antisera. Peptide Chemistry 1988 pp73−78. M. Ueki (ed.) Protein Reesarach foundation Osaka.

《生 体 膜 研 究 部 門》

1. Oosawa, Y., & Yamagishi, S. (1989) Rat brain glutamate receptors activate chloride channels in *Xenopus* ooccytes coupled by inositol triphosphate and Ca^{2+}. J. Physiol. 408 : 223−232.

2. Okada, D., Yamagishi, S. & Sugiyama, H. (1989) Differential effects of phospholipase inhibitors in long−term potentiation in the rat hippocampal mossy fiber synapses and Schaffer/commissural synapses. Neurosci. Lett., 100 : 141−146.

3. Furuya, S., Ohmori, H., Shigemoto, T. & Sugiyama, H. (1989) Intracellular calcium mobilization triggered by a glutamate receptor in cultured rat hippocampal cells. J. Physiol. (Lond.), 414 : 539−548.

4. Sugiyama, H., Ito, I. & Watanabe, M. (1989) Glutamate receptor subtypes may be classified into two major categories: a study on Xenopus oocytes injected with rat brain mRNA.Neuron 3 : 129−132.

5. Nakayama, T., Sugiyama, H. & Furuya, S. (1989) Basal lamina enhances hippocampal neurite outgrowth in vitro. Develop. Brain Res. 49 : 145−149.

6. Sugiyama, H., Watanaabe, M., Taji, J., Yamamoto, Y. & Ito, I. (1989) Pharmacological properties of quisqualate− and preferring glutamate receptors induced in Xenopus oocytes by rat and chick brain mRNA. Neurosci. Res. 7 : 164−167.

7. Furuya, K., Enomoto, K., Furuya, S., Yamagishi, S., Edwards, C. and C. and Oka, T. (1989) Single calcium−activated potassium channel in cultured mammary epithelial cells. Pflügers Arch. 414 : 118−124.

8. Oosawa, Y. (1989) Ionic current of channels that are permeable to monovalent and divalent cations. Biophys. J. 56 : 1217−1223.

9．伊藤　功，杉山博之 (1989) G 蛋白と関連したグルタミン酸受容体。代謝，26, 535－542.

10. Yamagishi, S., Furuya, K. & Kukita, F. (1989) Increase in anion conductance by intracellular Ca addition in squid giant axions. Proc, IUPS. 17 : 159.

11. Enomoto, K., Furuya, K., Maeno, T. & Oka, T. (1989) Ion channels in normal and tumor states of mammary cells. Jpn. J. Physiol. 39 : S42.

12. Yamagishi, S., Furuya, K. & Kukita, F. (1988) Increase in Cl conductance by intracellularly added Ca ion or other perfusates in squid giant axons. Jpn. J. Physiol. 39 : S61.

13. 三宅成樹，久木田文夫 (1989) イカ巨大神経膜の有機溶媒による変性。生物物理 29 : S209.

14. 山岸俊一，古家喜四夫，久木田文夫，筒井泉雄 (1989) 細胞内 Ca イオン灌流による神経膜コンダクタンスの増大。生物物理 29 : S213.

15. 久木田文夫 (1989) 軸索外表面 K イオン蓄積に対する K イオンの影響。生物物理 29 : S214.

16. 山本幸子，杉山博之 (1989) ラット海馬におけるグルタミン酸受容体サブタイプの分布－単離細胞による分析－生物物理 29 : S271.

17. 岡田大助，杉山博之 (1989) ラット海馬シナプス伝達の長期増強に対するホスホリパーゼ阻害剤の効果。生物物理 29 :S272.

18. 榎本浩一，古家喜四夫，前野　巍，岡　孝己 (1989) 乳腺上皮細胞の細胞内 Ca と Ca 依存性 K チャネル。生物物理 29 : S294.

19. 榎本浩一，古家喜四夫，前野　巍 (1989. 11) 乳腺上皮細胞と乳癌細胞の情報伝達．日本生理学会誌 52, 123.

20. Sugiyama, H. (1989) Brain neurotransmitter receptors transplanted into Xenopus oocytes by microinjection of mRNA. Ed : M. Kasai, T. Yoshioka, & B. Suzuki. Biosignal Transduction Mechanisms. pp. 71－82. Japan Scientific Societies Press, Tokyo ; and Springer－Verlag, Berlin.

21. Nomura, Y., Tohda, M., Kaneko, S., Kato, K., Yamagishi, S. & Sugiyama, H. (1989) The transmem-

brane signalling mechanism of serotonin－eveoked inward current responses in *Xenopus* oocytes injected with rat brain mRNA. Ed : Segawa, T., Endo, M. Ui, M., Kurihara, K. Physiology and pharmacology of transmembrane signalling. pp. 125－133. Elsevier Science Publishers B. V.

22. Tsutsui, I., Yamagishi, S. & Ohkawa, T. (1989) Ca^{2+} regulated Cl^- channels in the *Chara corallina* plasm membrane. Ed : Dainty, J et al.Plant membrane transport. pp. 89－90. Elsevier Science Publishers B. V.

23. 杉山博之 (1989) グルタミン酸受容体をめぐる新知見。第３回「大学と科学」公開シンポジウム組織委員会　編．脳のメカニズム－機能分子と記憶（講演収録集） pp.42－52.

《機能協関研究部門》

1．Trakawa, S., Kimura, Y., Hsu, K. & Ji, Y. －H (1989) Lack of effect of a neurotoxin from the scorpion *Buthus martensi* Karsch on nerve fibers of this scorpion. Toxicon 27 : 569－578.

2．Nakayama, T. & Furuya, S (1989) Monensin induces distortion of optic nerve crossing at the chick embryo chiasm. Exp. Brain Res. 76 : 559－562.

3．Nakayama, T., Sugiyama, H. & Furuya, S. (1989) Basal lamina enhances hippocampal neurite outgrowth in vitro. Dev. Brain Res. 49 : 145－149.

4．Fan, J. －H. & Terakawa, S. (1989) Turbidity change of the mouse adrenal medulla evoked by acetylcholine stimulation. Jpn. J. Physiol. 39 : 183－189.

5．Terakawa, S (1989) Optical studies on the intracellular processes for secretion. In ; Cell Biology of Secretion. Gumma Symp. Endocrinol. 26 : 137－144.

6．Watanabe, A. (1989) Optical rotation signal of a lobster nerve recorded with a high－speed optical polarimeter. Neurosci. Res.Suppl. 9 : 21 (***)

7．Watanabe, A. (1989) Properties of optical rotation signals recorded from lobster nerve. Jpn. J. Physiol. 39 : Suppl. S61 (***)

8. Terakawa, S. & Suzuki, Y. (1989) Real－time video observation of exocytosis in the goblet cell. Jpn. J. Physiol. 39 : Suppl. S35.

9. Iwase, N. & Terakawa, S. (1989) Traveling movements of secretory granules in anterior pituitary cells of the carp. Jpn. J. Physiol. 39 : Suppl. S264.

10. Terakawa. S., Fan, J. －H. & Kumakura, K. (1989)Exocytosis and turbidity change in chromaffin cells. Jpn. J. Physiol. 39 : Suppl. S268.

11. Kameyama, M., Kameyama, A., Kaibara, M., Nakayama, T. & Irisawa, H. (1989) Intracellular mechanisms involved in "run－down" of calcium channels. *In* : Calcium Protein Signaling.Ed : H. Hidaka, E. Crofoli, A. R. Means and T. Tanaka, pp 111－117. Plenum Publishing Corp.

12. 渡辺　昭 (1989) 神経の旋光性シグナルの特性。生物物理。 29 : Supplement, S211.

13. 渡辺　昭 (1989) 神経線維の旋光性シグナルの２つの成分。生理学研究所年報。 10 : p.30.

14. 山岸俊一，古家喜四夫，久木田文夫，筒井泉雄 (1989) 細胞内 Cl イオン灌流による神経膜コンダクタンスの増大。第27回生物物理学会予稿集。 S212. 東京

15. 寺川　進，岩瀬範和，柳沢　忠 (1989) 脳下垂体前葉におけるエキソサイトーシスと分泌顆粒運動の可視化。日本内分泌学会雑誌 65 (9) : 858.

16. 寺川　進，樊　津　紅，熊倉鴻之助，今泉美佳 (1989) クロマフィン顆粒の細胞内運動と開口放出。生物物理 29 : S157.

17. 寺川　進，樊　津　紅，熊倉鴻之助，今泉美佳 (1989) クロマフィン顆粒の細胞におけるエキソサイトーシスの可視化。生物物理 29 : S108.

18. 小原正裕，寺川　進 (1989) コンピュータ制御のビデオデッキの画像処理への応用。日本生理学雑誌 51 (5) : 155.

19. 寺川　進，鈴木裕一 (1989) 杯細胞における開口分泌のリアルタイムビデオ観察。第66回日本生理学大会予稿集 138.

20. 岩瀬範和，寺川　進 (1989) 脳下垂体前葉における分泌顆粒のトラベリング運動。第66回日本生理学大会予稿集 156.

21. 寺川　進，樊　津　紅，熊倉鴻之助 (1989) クロマフィン細胞のエキソサイトーシスと濁度変化。第66回日本生理学大会予稿集 160.

22. 岩瀬範和，寺川　進，柳沢　忠 (1989) 脳下垂体前葉 TRH 感受性細胞における開口分泌のビデオ観察。日本生理学雑誌 52 (3) : 86.

23. 寺川　進，樊　津　紅，熊倉鴻之助，今泉美佳 (1989) 光学顕微鏡によるクロマフィン細胞のエキソサイトーシス観察。日本生理学雑誌 52 (3) : 87.

《能動輸送研究部門》

1. Natsukari, N., Ohta, H. & Fujita, M. (1989) Simple immunoassays for semiquantitative determination of calmodulin (CaM) and anti－CaM. Applications to affinity column chromatography of anti－CaM antibodies and estimation of CaM in synaptosomal membranes from rat cerebral cortex. J. Immunol. Methods 125 : 159－166.

2. 藤田道也 (1989) 界面活性剤（各論)。生体の科学 40 : 263－265.

3. 藤田道也 (1989) バッファー（総論)。生体の科学 40 : 266－268.

4. 藤田道也 (1989) バッファー（各論)。生体の科学 40 : 269－276.

5. 藤田道也 (1989) 核孔複合体。生体の科学 40 : 548－553.

6. Effect of Age on PTH－Stimulated Sodium Calcium Exchange Activity : Alteration at Cellular and Molecular Levels C. T. Liang, H. Hanai, L. Cheng, J. Barnes, and B. Sacktor (1989) In : Endocrine Function and Aging eds. H. J. Armbrecht, R. H. Coe, and N. Wongsuranat. Springer－Verlag

7. ドーパミン系伝達路におけるカルモジュリンの関与－脳シナプス膜とＣａＭとの相互作用の検討－夏苅直己，花井洋行，藤田道也，(1989), 神経科学 28 (1) p, 180－181.

8．自然発症高血圧ラットの単離十二指腸吸収上皮細胞におけるカルシウム輸送。山田正美，花井洋行，金子栄蔵，藤田道也，消化器病態生理研究会抄録 4：p, 5 1989

9．腎皮質尿細管細胞の Na/Ca 交換輸送と PTH 脱感作の機序。日本腎臓学会総会予稿集 32：p, 125. 花井洋行.

10. Kudou, Y., Urabe, T., Fujiwara, A., Yamada, K. and Kawasaki, T. (1989) Carrier－mediated transport system for cephalexin in human plasental brush－border membrane vesicles. Biochim. Biophys. Acta 978, 313－318.

11. Satoh, O., Kudo, Y., Shikata, H., Yamada, K. and Kawasaki, T. (1989) Characterization of amino－acid transport systems in guinea－pig intestinal brush－border membrane. Biochim. Biophys. Acta 985, 120－126.

12. 山田一夫，土肥雪彦，川崎　尚 (1989) 抗酸化剤による虚血細胞障害の保護。生化学 61：6, 527.

13. 佐藤　理，四方裕夫，山田一夫，川崎　尚 (1989) 糖尿病モルモットの小腸におけるアミノ酸輸送系の変化。生化学 61：9, 1167.

《神経情報研究部門》

1．Kaneo, A., Pinto, L. H. & Tachibana, M. (1989) Transient calcium current of retinal bipolar cells of the mouse. J. Physiol. 410：613－629.

2．Kaneko, A., Tachibana, M. & Pinto, L. H. (1989) Transient calcium current of retinal bipolar cells of the mouse. Neurosci. Res. Suppl. 10：S67－S76.

3．Ohtsuka, T., Kawamata, K. & Stell, W. K. (1989) Immunocytochemical studies of centrifugal fibers in the goldfish retina. Neurosci. Res. Suppl. 10：S141－S150.

4．Kaneda, M., Oyama, Y., Ikemoto, Y. & Akaike, N. (1989) Blockade of voltage－dependent sodium current in isolated rat hippocampal neurons by tetrodotoxin and lidocaine. Brain Res. 484：348－351.

5. Kaneda, M., Oyama, Y., Ikemoto, Y. & Akaike, N. (1989) Scorpion toxin prolongs an inactivation phase of the voltage −dependent sodium current in rat isolated single hippocampal neurons. Brain Res. 487 : 192−195.

6. Tokutomi, N., Kaneda, M. & Akaike, N. (1989)What confers specificity on glycine for its receptor site? Br. J. Pharmacol. 97 : 353−360.

7. Kaneda, M., Wakamori, M. & Akaike, N. (1989)GABA−induced chloride current in rat isolated Purkinje cells. Am. J. Physiol. 256 : C1153−C1159.

8. Takahashi, K., Tateishi, N., Kaneda, M. & Akaike, N. (1989) Comparison of low−threshold Ca^{2+} currents in the hippocampal CA1 neurons among the newborn, adult and aged rats. Neurosci. Lett. 103 : 29−33.

9. Wakamori, M., Kaneda, M., Oyama, Y. & Akaike, N. (1989) Effects of chlordiazepoxide, chlorpromazine, diazepam, diphenylhydantoin, flunitrazepam and haloperidol on the voltage−dependent sodium current of isolated mammalian brain neurons. Brain Res. 494 : 374−378.

10. Kaneda, M. & Akaike, N. (1989) The low−threshold Ca current in isolated amygdaloid neurons in the rat. Brain Res. 497 : 187−190.

11. Akaike, N. & Kaneda, M. (1989) The glycine−gated chloride current in acutely isolated rat hypothalamic neurons. J.Neurophysiol. 62 : 1400−1409.

12. Kurahashi, T. & Shibuya, T. (1989) Membrane responses and permeability changes to odorants in the solitary olfactory receptor cells of newt. Zool. Sci. 6 : 19−30.

13. Kurahashi, T. (1989) Activation by odorants of cation−selective conductance in the olfactory receptor cell isolated from the newt. J. Physiol. 419 : 177−192.

14. Kaneko, A. (1987) Conversion of trichromatic cone responses to color−opponent responses in the second−order neurons in the turtle retina. Die Farbe 34 : 81−87.

15. 金子章道 (1989) 網膜細胞の単離。医学のあゆみ, 150 (9) : 589.

16. 金子章道 (1989) 網膜の視覚情報処理機能。科学, 59 : 510－519.

17. 金子章道 (1989) 色覚に関する情報処理：三原色と反対色. 蛋白質核酸酵素, 34 (5) : 652－662.

18. 大塚輝彌 (1989) 油滴をもつ錐体視細胞の色光感度。蛋白質核酸酵素, 34 (5) : 605－613.

19. 大塚輝彌 (1989) 色情報抽出の網膜神経回路。動物生理, 6 (1) : 49－57.

20. 赤池紀扶, 金田　誠 (1989) 神経細胞の単離法。生体の科学, 40 : 56－59.

21. Kaneko, A., Pinto, L. H., Bowes, C. & Farber, D. (1989) Membrane currents of XENOPUS LAEVIS oocytes injected with RNA from retinas of carp and mouse. The Association for Research in Vision and Ophthalmology 30 (3) : 62.

22. Kaneko, A., Suzuki, S., Pinto, L. H. & Tachibana, M. (1989) Membrane currents and pharmacology of retinal bipolar cells differ between goldfish and mouse. Satellite to the 12th European Neuroscience Association Annual Meeting. Abstracts. p. 8.

23. Suzuki, S., Kaneko, A. & Tachibana, M. (1989) Glycine and GABA responses of solitary bipolar cells dissociated from the mouse. Jpn. J. Physiol. 39, Suppl. : S155.

24. Downing, J. E. G., Kaneda, M., Kaneko, A. & Suzuki, S. (1989) Transmitter sensitivities, receptor distribution and conductance mechanisms of mamalian retinal neurons. Society for Neuroscience, Abstracts 15. p. 922.

25. Pinto, L. H., Kaneko, A., Bowes, C. & Farber, D. (1989) Membrane currents of XENOPUS LAEVIS oocytes injected with RNA from retinas of carp and mouse. Society for Neuroscience, Abstracts 15. p. 1397.

26. 金子章道 (1989) 単離ニューロンと神経回路網。第28回日本 ME 学会大会論文集（医用電子と生体工学　27, 特別号), 大阪。 p. 16.

27. 金子章道, 鈴木参郎助 (1989) マウス網膜双極細胞のグリシンおよび GABA 受容体。第13回神経科学学術集会予稿集, 新潟。 p. 92.

28. 鈴木参郎助，金子章道，立花政夫 (1989) マウス網膜双極細胞の抑制性伝達物質に対する応答。第66回日本生理学会大会予稿集，岡山。 p. 243.

29. Kawamata, K., Ohtsuka, T. & Stell, W. K. (1989) Immunohistochemical study of centrifugal fibers in the goldfish retina. Jpn. J. Physiol. 39, Suppl : 158.

30. 大塚輝彌 (1989) 色情報抽出の網膜神経回路。第 7 回国際眼研究会議日本部会講演要旨集，大阪。 p. 48.

31. 大塚輝彌 (1989) サル網膜における色情報抽出の神経回路の解折。京都大学霊長類研究所年報 19 : 50.

32. 大塚輝彌 (1989) 色情報抽出の網膜神経機構の研究。加藤記念医学生理学研究成果報告書。 pp. 163－166.

33. 大塚輝彌 (1989) 網膜における遠心性神経の免疫組織化学的研究。持田記念財団研究成果報告集 5 : 269－270.

34. Kaneda, M., Wakamori, M. & Akaike, N. (1989) Low－threshold calcium current of rat cerebellar Purkinje cell bodies. XXXI International Congress of Physiological Sciences, Abstracts. p. 536.

35. Kaneda, M., Wakamori, M. & Akaike, N. (1989) Kinetic analysis of the GABA－induced current in cerebellar Purkinje cells. Acta Physiol. Scand. Suppl. 136 : 71.

36. 赤池紀扶，高橋和義，金田　誠，池本清海 (1989) 海馬単離 CA1 錐体細胞の Ca 電流。第66回日本生理学会大会予稿集，岡山。 p. 115.

37. Kurahashi, T. & Shibuya, T. (1989) Ca^{2+}－dependent desensitization of odorant－ and cyclic AMP－activated conductances in isolated olfactory receptor cells of newt. Jpn. J. Physiol. 39, Suppl. : S181.

38. 倉橋　隆，渋谷達明 (1989) イモリ単離嗅細胞の持続的匂刺激に対する応答の減衰と Ca イオン。第66回日本生理学会大会予稿集，岡山。 p. 126.

39. 倉橋　隆，金子道章 (1989) 脊椎動物嗅細胞膜の cAMP 活性化コンダクタンス。第13回神経

科学学術集会予稿集，新潟。p. 109.

40. 倉橋　隆，渋谷達明 (1989) 嗅細胞における匂い情報交換機構：匂い物質とサイクリックAMPによって活性化するコンダクタンスの電気生理学的性質の比較。第23回味と匂いのシンポジウム論文集。pp. 67－70.

41. Kaneko, A. & Tachibana, M. (1989) The role of GABA in the function of the neuronal circuit of the retina : studies on solitary neurons. Ed : T. Segawa, M. Endo, M. Ui & kurihara. Physiology and Pharmacology of Transmembrane signalling. Elsevier, 325－333.

42. Kaneko, A., Tachibana, M. & Pinto, L. H. (1989) Membrane currents of retinal bipolar cells : goldfish vs. mouse. Ed : R. Weiler & N. N. Osborne. Neurobiology of the Inner Retina. Berlin, Heidelberg : Springer－Verlag, 413－424. (NATO ASI Series Vol. H31).

43. 金子章道 (1989) 色覚（田崎京二・小川哲朗編）新生理科学大系。第9巻感覚の生理学。東京：医学書院，264－279.

44. 倉橋　隆，渋谷達明 (1989) 嗅細胞の匂い情報処理（高木貞敬・渋谷達明編）匂いの科学・第4章匂いの受容メカニズム－抹消レベル－。東京：朝倉書店，69－75.

《液性情報研究部門》

1. Hama, K., Arii, T. and Kosaka, T. (1989) Three－dimensional morphometrical study of dendritic spines of the granule cell in the rat dentate gyrus with HVEM stereo images. J. Electron Microscopy Technique. 12 : 80－87.

2. Koenig, J. H., Kosaka, T. and Ikeda, K. (1989) The Relationship between the number of synaptic vesicles and the amount of transmitter released. J.Neurosci. June 9 (6) : 1937－1942.

3. Kosaka, T., Heizmann, C. W. and Barnstable C. J. (1989) Monoclonal antibody VC1. 1 selectively stains a population of GABAergic neurons containing the calcium－binding protein parvalbumin in the rat cerebral cortex. Exp Brain Res. 78 : 43－50.

4. Kosaka, T. and Heizmann, C. W. (1989) Selective staining of a population of parvalbumin－

containing GABAergic neurons in the rat cerebral cortex by lectins with specific affinity for terminal N－acetylgalactosamene. Brain Res. 483, 158－163.

5. Tsukita, Sh,. and Tsukita, Sa. (1989) Isolation of cell-to-cell adherens junction from rat liver. J. Cell Biol. 108, 31－41.

6. Tsukita, Sa., Hieda, Y., and Tsukita, Sh. (1989) A new 82-KD barbed end-capping protein (radixin) localized in the cell-to-cell adherens junction : Purification and characterization. J. Cell Biol. 108, 2369－2382.

7. Hieda, Y., Tsukita, Sa., and Tsukita, Sh. (1989) A new high molecular mass protein showing unique localization in desmosomal plaque. J. Cell Biol. 109, 1511－1518.

8. Tsukita, Sh., Itoh, M., and Tsukita, Sa. (1989) A New 400kD-protein from isolated adherens junctions : Its localization at the undercoat of adherens junctions and at microfilament bundles such as stress fibers and circumferential bundles. J.Cell Biol. 109, 2905－2915.

9. Higuchi, M., Mitsuno, T., Sugimoto, M., Okamoto, A., Hirose, S., Tsukita, Sh., and Osawa, T. (1989) Tumoricidal activity of lymphotoxin (tumor necrosis factor β) in vivo : Its effects on marophages. J. Biological Response Modifiers 7, 619－630.

10. Matsumoto, G., Tsukita, Sh., and Arai, T. (1989) Organization of the axonal cytoskeleton : Differentiation of the microtubule and actin filament arrays. In Cell Movement. Alan R. Liss Inc. 335－356.

11. Tsukita, Sh. and Nagafuchi, A. (1990) The undercoat of adherens junctions : A key specialized structure in organogenesis and carcinogenesis. Cell Struct. Funct. 15, 7－12.

12. 月田早智子，月田承一郎 (1989) 細胞接着装置の分子構築。代謝 26, 眼で見るページ 300.

13. 月田早智子，月田承一郎 (1989) Adherens Junction の構造と機能。蛋白質核酸酵素，臨時増刊「細胞骨格の機能」。128－136.

14. 月田承一郎，月田早智子 (1989) 細胞接着装置の構造と機能。分子生物学の進歩　第7巻「細胞増殖細胞運動」。丸善。223－224.

15. 矢野雅文，月田承一郎 (1989) クロスブリッジの構造変化と収縮機構。蛋白質核酸酵素， 34, 1776－1783.

《高次神経機構研究部門》

1. Yamamoto, N., Kurotani, T. and Yoyama, K. (1989) Neural conections between the lateral geniculate nucleus and visual cortex in vitro. Science 245 ; 192－194.

2. Fukuda, Y., Sawai, H., Watanabe, M., Wakakuwa, K. and Morigiwa, K. (1989) Nasotemporal overlap of crossed and uncrossed retinal ganglion cell projections in the Japanese monkey (Macaca fuscata). J. Neurosci. July, 9 (7) : 2353－2373.

3. Keirstead, S. A., Rasminsky, M., Fukuda, Y., Carter, D. A., Aguayo, A. J. and Vidal－Sanz, M. (1989) Electrophysiologic responses in hamster supeior colliculus evoked by regenerating retinal axons. Science, 246 : 255－257.

4. 外山敬介 (1989) 大脳皮質視覚中枢の情報処理。蛋白質核酸酵素 34 : 674－682.

5. 外山敬介，小松由紀夫 (1989) 脳の可塑性と自己組織化。情報処理 30 : 137－146.

6. 外山敬介 (1989) 視覚情報処理。感覚統合研究第 6 集： 33－62.

7. 外山敬介 (1989) 両眼視の生理学。神経眼科 6 巻： 9－21.

8. 外山敬介 (1989) 大脳神経回路の自己組織化。 BME3 : 5－17.

9. 外山敬介，山本亘彦，黒谷　亨 (1989) 神経系の発達と学習。小児内科 1 : 18－28.

10. Tanifuji, M., Yamanaka, A. and Toyama, K. (1989) Spatial and temporal properties of optically measured membrane potencial of visual cortex in comparison with current source density analysis. Neurosci. Res. suppl. 9, S176.

11. Komatsu, Y. and Toyama, K. (1989) Long－term potentiation of synaptic transmissions mediated by non－NMDA and NMDA receptors in kitten visual cortex. Neurosci. Res. suppl. 9, S182.

12. Kurotani, T., Yamamoto, N. and Toyama, K. (1989) Developmental changes of neural cennections between a transplanted lateral geniculate nucleus and the host visual cortex in rats. Neurosci. Res. suppl. 9, S183.

13. Yamamoto, N., Kurotani, T. and Toyama, K. (1989) Neural connections in co−culture preparations of rat laterl geniculate nucleus and visual cortex. Neurosci. Res. suppl. 9, S184.

14. Morigiwa, K., Tauchi, M. and Fukuda, Y. (1989) Fractal analysis of ganglion cell dendritic branching patterns of the rat and cat retinae. Neurosci. Res. Suppl. 10 : S131−S140.

15. Toyama, K., Komatsu, Y., Yamamoto. N. and Kurotani, T. (1989) Prenatal control of visual cortical circuitry. Biomed. Res. 10, suppl. 2, 55−56.

16. Mizobe, K. and Toyama, K. (in press) Cortical and subcortical connectivity of area 21a of the cat. Biomed. Red. 10, suppl. 3.

17. Yamamoto, N., Kurotani, T., Yamada, K. and Toyama, K. (1989) Development of neural connectivity in lateral geniculate nucleus−visual cortex co−cultures of the rat. Biomed. Res. 10. suppl. 2, 73−76.

18. Komatsu, Y. and Toyama, K. (1989) Long−term potentiation of excitatory synaptic transmission in kitten visual cortex. Biomed. Res. 10. suppl. 2, 57−59.

19. Iwakiri, M. and Toyama, K. (1989) Selectibity of neuronal responses in clarebishop cortex to motion cue for three−dimentional motion. Jpn. J. Physiol. 39, suppl. 447.

20. Yamamoto, N., Kurotani, T., Yamada, K. and Toyama, K. (1989) Neural connectivity in coculture preparations of rat lateral geniculate nucleus and visual cortex. Jpn. J. Physiol. 39, suppl. 448.

21. Toyama, K., Komatsu, Y., Yamamoto, N. and Kurotani, T. (1989) Prenatal control of visual cortical development. Jpn. J. Physiol. 39, suppl. S1−6.

22. Fukuda, Y., Rasminsky, M., Keirstead. S. A., Carter, D. A., Aguayo, A. J. and Vidal−Sanz, M. (1989) Reinnervation of adult hamster superior colliculus by regenerating retinal ganglion cell axons. Biomed. Res. 10, Suppl. 2, 81−84.

《情 報 記 憶 研 究 部 門》

1. Kashihara, Y., Sakaguchi, M. & Kuno, M. (1989) Axonal transport and distribution of endogenous calcitonin gene－related peptide in rat peripheral nerve. J. Neurosci. 9 : 3796－3802.

2. Manabe, T., Kaneko, S. & Kuno, M. (1989) Disuse－induced enhancement of la synaptic transmission in spinal motoneurons of the rat. J. Neurosci. 9 : 2455－2461.

3. Kuno, M., Tsujimoto, T. & Umemiya, M. (1989) Disparity of terminal sprouting and functional plasticity induced by prolonged disuse at neuromuscular junctions. Biomed. Res. 10, Suppl. 2 : 155－157.

4. Kuno, M. & Tsujimoto, T. (1989) Terminal sprouting and functional plasticity at neuromuscular junctions. Ito, M., Nishizuka, Y. eds. Brain Signal Transduction and Memory.Tokyo, Academic Press, Inc., 259－268.

《高次神経性調節研究部門》

1. Hikosaka, O., Sakamoto, M. & Usui, S. (1989) Functional properties of monkey caudate neurons. I. Activities related to saccadic eye movements. J. Neurophsiol. **61** : 780－798.

2. Hikosaka, O., Sakamoto, M. & Usui, S. (1989) Functional properties of monkey daudate neurons. II. Visual and auditory responses. J.Neurophysiol. **61** : 799－813.

3. Hikosaka, O., Sakamoto, M. & Usui, S. (1989) Functional properties of monkey caudate neurons. III. Activities related to expectation of target and reward. J. Neurophysiol. **61** : 814－832.

4. Hikosaka, O. (1989) Role of basal ganglia in saccades. Rev. Neurol. (Paris) **145** : 580－586.

5. Ohye, C., Shibazaki, T., Hirai, T., Matsumura, M., Kawashima, Y., & Hirato, M. (1989) Microrecording for the study of thalamic organization fro tumor biopsy and removal. Stereot Func Neurosurg **52** : 136－144.

6. Hirai, T., Ohye, C., Nagaseki, Y., & Matsumura, M. (1989) Cytometric analysis of the thalamic

ventralis intermedius nucleus in man and a comparison with the monkey. J. Neurophysiol. **61** : 478－487.

7．Sakamoto, M. & Hikosaka, O. (1989) Eye movements induced by microinjection of GABA agonist in the rat substantia nigra pars reticulata. Neurosci. Res. **6** : 216－233.

8．Kameyama, M. & Kaibara, M. (1989) Mechanisms of regulation of caardiac calcium channels. Asian Med. J. **32** : 357－365.

9．亀山正樹，貝原宗重 (1989) 心筋 Ca チャネルの性質とその調節機構。心臓 **21** : 234－241.

10. 亀山正樹 (1989) 膜電位依存性 Ca チャネルの調節機構。実験医学 **7** : 218－223.（＊＊）

11. 亀山正樹 (1989) 心筋 Ca チャネルの細胞内調節機構。膜 **14** : 360－369.

12. 今井寿正，宮下暢夫 (1989) 大脳基底核疾患の動物モデル。Clinical Neuroscience **7** : 492－494.

13. 松村賢，斉藤由香里，大江千廣 (1989) フェニトイン中毒症における聴性脳幹反応の変化。群馬県医師会報 **499** : 12－16.

《生体システム研究部門》

1．Furuya, S., Ohmori, H., Shigemoto, T. & Sugiyama, H. (1989) Intracellular calcium mobilization triggered by a glutamate receptor in rat cultured hippocampal cells. J. Physiol. 414 : 539－548.

2．Ohmori, H. (1989) Inferences on the site of mechano－electrical transduction of the hair cell. In : Physiology and pharmacology of transmembrane signalling. Eds : Segawa, T., Endo, M., Ui, M. & Kurihara, K. pp 335－344. Elsevier.

3．大森治紀 (1989) 機械受容性イオンチャンネル。生体の科学 40 : 579－585.

4．山口和彦 (1989) 培養神経細胞における機能的シナプスの形成。Human cell 2 (2) : 132－136.

5. Ohmori, H. (1989) Mechano－electrical transduction in chick isolated hair cells. Proc. 31th International Congress of Physiological Sciences : S4040.

6. Ohmori, H. & Shigemoto, T. (1989) Frequency responses and membrane properties of chick hair cells. Jpn. J. Physiol. 39 (Suppl.) : S169.

7. Shigemoto, T. & Ohmori, H. (1989) Muscarinic agonists induce hyperpolarization and increase intracellular Ca^{2+} concentration in chick cochlear hair cells. Jpn. J. Physiol. 39 (Suppl.) : S169.

8. 大森治紀 (1989) ヒヨコ内耳有毛細胞の機械刺激受容機構。シンポジウム聴覚の原点－蝸牛有毛細胞のメカニズム－。第90回日本耳鼻咽喉学会総会 : 277.

9. 大森治紀 (1989) Mechano－electric transduction of the hair cell. 動物生理 6 : 228.

10. Yamaguchi, K. (1989) Ca－channels and glutamate receptor－channel of cultured chick cochlear ganglionic neuron. Neurosci. Res. Suppl. 9 : S24.

11. Yamaguchi, K. (1989) Single channel current through the NMDA type glutamate receptor channel of the cultured chick cochlear ganglion neuron. Jpn. J. Physiol. 39 (Suppl.) : S83.

12. Nakajima, S., Nakajima, Y., Stanfield, P. R. & Yamaguchi, K. (1989) Properties of the inwardly rectifying channels modulated by substance P. Soc. for Neurosci. Abstracts 15 : 176.

《高次液性調節研究部門》

1. Inase, M., Mushiake, H., Shima, K., Aya, K. & Tanji, J. (1989) Activity of digital area neurons of the primary somatosensory cortex in relation to sensorially triggered and self－initiated digital movements of monkeys. Neurosci. Res. 7 : 219－234.

2. Sato, K. C. & Tanji, J. (1989) Digit－muscle responses evoked from multiple intracortical foci in monkey precentral motor cortex. J. Neurophysiol. 62 : 959－970.

3. Kodama, T., Mushiake, H., Shima, K., Nakahama, H. & Yamamoto, M. (1989) Slow fluctuations of single unit activities of hippocampal and thalamic neurons in cats. I. Relation to natural sleep

and alert states. Brain Res. 487 : 26－34.

4．Kodama, T., Mushiake, H., Shima, K., Hayashi, T. & Yamamoto, M. (1989) Slow fluctuations of single unit activities of hippocampal and thalamic neurons in cats. II. Role of seotonin on the s tability of neuronal activities. Brain Res. 487 : 35－44.

5．Tanji, J. & Kurata, K. (1989) Changing concepts of motor areas of the cerebral cortex. Brain Dev 11 : 374－377.（＊）

6．丹治　順 (1989) 運動野と運動指令。人間工学，25（特別号）: 24－25.（＊＊）

7．丹治　順 (1989) 中枢神経系による運動の発現・調節機構。脳と発達，21（特別号）: 77－78.（＊＊）

8．丹治　順 (1989) 運動野の新しい機構地図。ブレインサイエンスⅡ，126－135 朝倉書店

9．蔵田　潔，丹治　順 (1989) 随意運動の発現と運動企画，感覚統合研究第 6 集，日本感覚統合障害研究編，91－107 協同医書

10. Karadi, Z., Oomura, Y., Nishino, H. & Aou, S. (1989) Olfactory coding in the monkey lateral hypothalamus : behavioral and neurochemical properties of odor-responding neurons. Physiol & Behav 45 : 1249－1257.

11. Lenard, L., Oomura, Y., Nakano, Y., Aou, S. & Nishino, H. (1989) Influence of acetyloholine on neuronal activity of monkey amygdala during bar press feeding behavior. Brain Res 500 : 359－368.

12. Aou, S., Woody, C. D. and Birt, D. (1989) Plasticity of the motor cortex during rapid conditioning of eyeblink reflexes in the awake cat. Biomed. Res. 10 (Suppl. 2) : 91－96.（＊＊）

13. 粟生修司，大村　裕，西野仁雄 (1989) 中枢性摂食調節機構。臨床栄養，74 : 253－260.（＊＊）

14. 大村　裕，粟生修司 (1989) 性行動を司る脳。こころの科学，25 : 50－56.（＊＊）

15. 粟生修司，西野仁雄，大村　裕 (1989) サル摂食行動の中枢調節機構。心身医学，29：310－318.（＊＊）

16. Karadi, Z., Oomura, Y., Nishino, H., Scott, T. R., Lenard, L. & Aou, S. (1989) Endogenous and exogenous chemosensitivity of lateral hyteral hypothalamic neurons in alert rhesus monkeys. Proceedings of 31st IUPS, p3472.（＊＊＊）

17. Aou, S., Oomura, Y., Takaki, A. & Okada, E. (1989) Sexual behavior elicited by electrical stimulation of the midbrin in female and male monkeys. Proceedings of 31st IUPS, p3493.（＊＊＊）

18. Matsumoto, I., Oomura, Y., Nishino, H., Nemoto, S., Aou, S., Aikawa, T. (1989) Effects of 2－buten－4－olide, a endogenous satiety substance, on plasma glucose, corticosterone and epinephrine. Proceedings of 31st IUPS, p5434.（＊＊＊）

19. Aou, S., Okada, E., Takaki, A. & Oomura, Y. (1989) Sexual behavior elicited by stimulation of the monkey midbrain. Soc. Neurosci. Abstr. 15：1099.（＊＊＊）

20. Okada, E., Takaki, A., Aou, S. & Oomura, Y. (1989) Electrical stimulation of the male monkey's midbrain elicits sexual behavior. Neurosci. Res. Suppl. 9：S31.（＊＊＊）

21. Niijima, A., Hori, T., Aou, S. & Oomura, Y. (1989) Interleukin 1－β on efferent activity of the splenic and adrenal branch of the splanchnic nerve. Neurosci. Res. Suppl. 9：S34.（＊＊＊）

22. Karadi, Z., Scott, T. R., Oomura, Y., Nishino, H., Lenard, L. & Aou, S. (1989) Amygdaloid neuronal responses to taste stimuli in rhesus monkey. Neurosci. Res. Suppl. 9：S40.（＊＊＊）

23. Aou. S., Oomura, Y., Takaki, E. & Koyama, Y. (1989) Short- and long-latency presenting elicited by electrical stimulation of female monkey midbrain. Neurosci. Res. Suppl. 9：S59.（＊＊＊）

24. Karadi, Z., Scott, T. R., Oomura, Y., Nishino, H., Lenard, L. & Aou, S. (1989) Catecholamines in taste information processing. Jpn. J. Physiol. 39 (Suppl) S121.（＊＊＊）

25. Takaki, A., Okada, E., Aou, S. & Oomura, Y. (1989) Effect of hypothalamic electrical stimulation on feeding task and task-related neuronal activity in the rhesus monkey. J. Physiol. 39 (Suppl)

S128.（＊＊＊）

26. Okada, E., Takaki, A., Aou, S. & Oomura, Y. (1989) Effects of electrical and chemical stimulation of the male monkey's midbrain on sexual behavior. Jpn. J. Physiol. 39 (Suppl) S153.（＊＊＊）

27. Aou, S., Oomura, Y., Takaki, A., Okada, E. & Koyama, Y. (1989) Comparison of effects of stimulation of the hypothalamus and midbrain on sexual behavior in female monkeys. Jpn. J. Physiol. 39 (Suppl) S266.（＊＊＊）

28. 高木厚司，粟生修司，大村　裕 (1989) サル視床下部制激による摂食課題遂行の抑制。第9回日本肥満学会記録 pp. 307－309.（＊＊＊）

29. 粟生修司，高木厚司，大村　裕 (1989) 摂食と生殖の相互調節系：雌ザル視床下部腹内側核の摂食抑制－生殖行動促進系。第9回日本肥満学会記録 pp. 310－311.（＊＊＊）

30. 粟生修司，高木厚司，岡田英一郎，西野仁雄，大村　裕 (1989) サル視床下部刺激による摂食課題遂行の抑制。厚生省特定疾患　神経性食思不振症調査研究班　昭和63年度研究報告書 pp. 231－235.

31. 大村　裕，粟生修司 (1989) 摂食行動（久保田，小野編）新生理科学大系11，行動の生理学 pp. 80－93. 医学書院，東京。

32. 大村　裕，粟生修司 (1989) 間脳と行動（久保田，小野編）新生理科学大系11，行動の生理学 pp. 314－325. 医学書院，東京。

《生 体 機 能 検 査 室》

1. Kondo, T., D. F. Magee, R. F. Murphy, S. Naruse, & A. Pap. (1989) Action of amino acids on stomach, pancreas, and gallbladder in dogs. Int. J. Pancreatology 4 : 41－49.

2. Magee, D. F., S. Naruse, & A. Pap. (1989) A comparative study of gastric secretory stimulants in conscious dogs. J. Auton. pharmacol. 8 : 311－318.

3. Kato, M., S. Naruse, T. Takagi, & Shionoya S. (1989) Postprandial gastric blood flow in conscious dogs. Am. J. Physiol. 257 : G111－117.

4. Takagi, T., M. Kato, S. Naruse, & S. Shionoya. (1989) Effects of nifedipine and verapamil on splanchnic and renal blood flow and function. Prog. appl. Microcirc. 14, p. 104－117.

《組 織 培 養 標 本 室》

1. Nakayama, T., Sugiyama H. & Furuya, S. (1989) Basal lamina enhances hippocampal neurite outgrowth in vitro. Developmental Brain Research 49 : 145－149.

2. Furuya, S., Ohmori, H., Shigemoto, T. & Sugiyama, H. (1989) Intracellular calcium mobilization triggered by a glutamate receptor in rat cultured hippocampal cells J. Physiol. 414 : 539－548.

3. Nakayama, T & Furuya, S. (1989) Monensin induces distortion of optic nerve crossing at the chick embryo chiasm. Exp. Brain Res. 76 : 559－562.

4. Furuya, K., Enomoto, K., Furuya, S., Yamagishi, S., Edwards, C. & Oka, T. (1989) Single calcium－activated potassium channel in cultured mammary epithelial cells. Pflügers Arch 414 : 118－124.

5. Furuya, S., Edwards, C. & Ornberg, R. L. (1989) Exocytosis of bovine chromaffin granules in ficoll captured by rapid freezing. J. Electron Microsc. 38 (2) : 146－147.

6. 古家園子 (1989) In vitro で形成される毛細血管様構造。医学のあゆみ, 148 : 43.

《磁 気 共 鳴 装 置 室》

1. Stward, M. C., Seo, Y. & Case, R. M. (1989) Intracellular pH during secretion in the perfused rabbit mandibular salivary gland measured by ^{31}P NMR spectroscopy. Pflügers Arch 414 ; 200－207.

2. Suzuki, E., Maeda, M., Kuki, S., Tsukamoto, K., Kawakami, T., Seo, Y., Murakami, M. & Watari,

H. (1989) ^{31}P Spin－lattice relaxation time measurements in biological systems : heart, liver, kindey and erythrocytes of rat. 日磁医誌, 9 (2) ; 115－120.

3．前田宗宏，鈴木賢一，市川　修，瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘，岩崎　聖，大石　元，打田日出夫 (1989) MRI による緩和速度測定の精度評価：同一マグネットを用いた MRS との比較。日磁医誌, 8 (4) ; 263－267.

4．前田宗宏，鈴木英司，吉矢和彦，伊藤伸一，松尾敏和，瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘，津島寿一，廣橋伸治，尾辻秀章，岩崎　聖，大石　元，打田日出夫 (1989) MRI における partial volume effect の実験的検討。日本医放会, 49 (11) ; 1404－1410.

5．村上政隆, (1989) ^{31}P NMR スペクトロスコピーの生物学・医学応用。医学のあゆみ, 148 (5) ; 326－330.

6．瀬尾芳輝 (1989) ^{23}Na MRI と ^{39}K MRS の生体応用。医学のあゆみ, 148 (5) ; 331－334.

《超高圧電子顕微鏡室》

1．Hama, K., Arii, T. and Kosaka, T. (1989) Three－dimensional morphometric study of the granule cell in the rat dentate gyrus with HVEM stereo images. J. Electron Microsc. Tech., 12:80－87.

2．有井達夫，浜　　清 (1989) 超高圧電顕による立体観察。細胞, 21 (5) : 37－42.

3．有井達夫，浜　　清 (1989) 超高圧電顕を用いた立体写真の三次元画像解析。細胞, 21 (7) : 26－32.

4．比留木武雄，有井達夫 (1989) Trypanosoma evansi に於ける新しい修飾構造。寄生虫学雑誌 38 : 69.

《動　物　実　験　施　設》

1．Anglade P., Michel C., Ozaki T., TsujiS., Vignon X. and Yanaihara N. (1989) Simultaneous localization of acetylcholinesterase activity and met-enkephalin, vasoactive intestinal polypeptide

and substance P immunoreactivity in the rat myenteric plexus. Histochem. J. 20 : 464−467.

2. Kuwahara A., Ozaki T. and Yanaihara N. (1989) Galanin suppresses neurally evoked contractions of circular muscle in the guinea-pig ileum. Eur. J. Pharm. 164 : 175−178.

3. Yokoyama S. and Ozaki T. (1990) Contraction of the longitudinal and circular muscle of the small intestine. In "Frontiers in Smooth muscle Research" pp. 493−497 Alan R. Liss Inc.

4. Yokoyama S., Tsuji S., Anglade P. and Ozaki T. (1990) Peristalsis evoked in the intestine tube devoid of mucosa and submucosa. (1990) In "frontiers in Smooth muscle Research" pp. 493−497 Alan R. Liss Inc.

b．学会発表

〔目　　次〕

神経化学研究部門 …… 145
超微小形態生理研究部門 …… 146
細胞内代謝研究部門 …… 154
生体膜研究部門 …… 155
機能協関研究部門 …… 156
能動輸送研究部門 …… 158
神経情報研究部門 …… 158
高次神経機構研究部門 …… 161
高次神経性調節研究部門 …… 162
生体システム研究部門 …… 164
高次液性調節研究部門 …… 165
生体機能検査室 …… 167
組織培養標本室 …… 167
磁気共鳴装置室 …… 167
動物実験施設 …… 169

学　会　発　表

《神経化学研究部門》

1．小幡邦彦 (1989. 3) 神経発生過程におけるガングリオシドの発現。第62回日本薬理学会総会（京都）

2．岡山吉道，黒沢元博，小幡邦彦 (1989. 3) ラット肥満細胞顆粒膜における HNK－1 エピトープの存在。第62回日本薬理学会総会（京都）

3．Igarashi, M., Waki, H., Hirabayashi, Y., Obata, K. & Ando,S. (1989. 4) Growth cone membrane (GCM) from rat fetal forebrain and brainstem : Comparison on lipid contents and composition. Presented at 12th International Society for Neurochemistry Meeting (Alganve, Portugal)

4．赤川公朗，植村慶一 (1989. 4) ラット網膜の再疑集培養内に見られる網膜様層構造について。第66回日本生理学会大会（岡山）

5．村上善紀，赤川公朗，植村慶一 (1989. 4) 卵子透明帯に対するモノクロナール抗体の受精に及ぼす影響。第66回日本生理学会大会（岡山）

6．Obata, K., Hirabayashi, Y. & Ando, S. (1989. 5) C－Series gangliosides : Distribution in the developing nervous tissue and neurite－promoting action. Presented at Symposium Franco－Japoneis on Developmental Biology (Okazaki)

7．甲賀英明，小幡邦彦 (1989. 6) Retinoic acid 誘発 chick 神経管閉鎖不全モデルのモノクローナル抗体による検討，第30回日本神経病理学会総会（東京）

8．甲賀英明，井上　洋，大江千廣，小幡邦彦 (1989) レチノイン酸誘発 chick 神経管閉鎖不全のモノクロナール抗体による検討。第48回日本脳神経外科学会総会（東京）

9．児島伸彦，白尾智明，寺田庄一，小幡邦彦 (1989. 9) 神経特異タンパク質 drebrin A の遺伝子構造とその発現。第32回日本神経化学会大会（札幌）

10．今村一之，森　憲作，岡　昌吾，渡辺恭良，白尾智明，小幡邦彦 (1989. 10) 幼若ネコ視覚野の発達に伴う分子的変化，第13回神経科学学術集会（新潟）

11. 甲賀英明，小幡邦彦，田中英明 (1989. 10) レチノイン酸誘発多重神経管による神経管形成機構の考察。第13回神経科学学術集会（新潟）

12. Roth, G. A. & Obata, K. (1989. 10) Encefalomielitis alergica experimental (EAE) : Comparcion entre una cepa de rata susceptibley una resistente. Presented at 4th Meeting of the Argentine Society for Neurochemistry (Cordoba, Argentina)

13. Shirao, T., Onel, K., Evinger, M. J. & Reis, D. J. (1989. 11) Region speific induction of c－fos mRNA by reserpin in the rat. 19th Neuroscience Meeting (Phoenix)

14. 小幡邦彦 (1989. 11) シナプス形成，可塑性と神経特異分子。第５回 WAKO ワークショップ（東京） 9 (S－2) 322.

《超微小形態生理研究部門》

1．亘　　弘，村上政隆，瀬尾芳輝，鈴木英司，九鬼　覚，前田宗宏 (1989. 2) In Vivo 多核種 NMR : 21T MRIS システムの現状。日磁医誌， 9 (S－1) ; 129. 第13回日本磁気共鳴医学会大会抄録（福岡）

2．前田宗宏，鈴木英司，九鬼　覚，瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘，岩崎　聖，打田日出夫 (1989. 2) 腎の ^{23}Na－MRI 。日磁医誌， 9 (S－1) ; 130. 第13回日本磁気共鳴医学会大会抄録（福岡）

3．桑田一夫，恵良聖一，曽我美　勝，藤井裕子，岩間　亨，山田　弘，加藤一夫，植木俊介，松波謙一，亘　　弘 (1989. 2) 蛋白質より水への交差緩和現象。日磁医誌， 9 (S－1) ; 270. 第13回日本磁気共鳴医学会大会抄録（福岡）

4．佐藤真司，木田公洋，松波隆信，桑田一夫，恵良聖一，曽我美　勝，藤井裕子，岩間　亨，山田　弘，加藤一夫，植木俊介，松波謙一，鈴木英司，亘　　弘 (1989. 2) ^{1}H－NMR による軟骨内水構造の研究。日磁医誌， 9 (S－1) ; 271. 第13回日本磁気共鳴医学会大会抄録（福岡）

5．Sogami, M., Era, S., Kuwata, K., Kato, K. & Watari, H. (1989. 4) ^{1}H－NMR studies of structural transition of bovine mercaptalbumin (BMA) by cross－relaxation measurement and spin－echo

spectra. Jpn. J. Physiol. 39 ; S17. 第66回日本生理学会大会抄録（岡山）

6. Fujii, H., Kuwata, K., Era, S., Soami, M., Kato, K. & Watari, H. (1989. 4) High－performance liquid chromatographic (HPLC) studies of conformation－dependent limited proteolysis of bovine plasma albumin (BPA) in acidic region. Jpn. J. Physiol., 39 ; S18. 第66回日本生理学会大会抄録（岡山）

7. Kawata, K., Era, S., Sogami, M. & Watari, H. (1989, 4) Kinetic and structural studies of molecular aging reaction (N－A isomerization) of bovine mercaptalbumin (BMA) in the alkaline region. Jpn. J. Physiol., 39 ; S18. 第66回日本生理学会大会抄録（岡山）

8. Watari, H., Murakami, M. & Seo, Y. (1989. 4) Analysis of rapid reaction in physiological phenomena with a birefrilngent polarized interferometer. Jpn. J. Physiol., 39 ; S18. 第66回日本生理学会大会抄録（岡山）

9. Era, S., Iwama, T., Kuwata, K., Sogami, M., Kato, K., Yamada, H. & Watari, H. (1989. 4) ^{1}H－NMR studies of water structure in modefied bovine plasma albumin (BPA ＊) gel and bovine mercaptalbumin (BMA) solution. Jpn. J. Physiol., 39 ; S21. 第66回日本生理学会大会抄録（岡山）

10. Era, S., Kuwata, K., Takahashi, K., Amano, H., Kawai, K., Iwama, T., Kato, K., Sogami, M., Kitazawa, Y., Yamada, H. & Watari, H. (1989. 4) Comparative ^{1}H－NMR studies of the water structure in soft contact lens (SCL) and mouse lens. Jpn. J. Physiol., 39 ; S21. 第66回日本生理学会大会抄録（岡山）

11. Era, S., Sato, S., Kida, K., Iwama, T., Kato, K., Sogami, M., Matsunaga, T., Yamada, H. & Watari, H. (1989. 4) ^{1}H－NMR studies of water structure in cartilage. Jpn. J. Physiol., 39 ; S21. 第66回日本生理学会大会抄録（岡山）

12. Era, S., Kuwata, K., Kida, K., Sogami, M. & Watari, H. (1989. 4) Circular dichroic (DC) and ^{1}H－NMR studies on the N－B transition of human serum albumin (HSA) and its complex with bilirubin (BR). Jpn. J. Physiol., 39 ; S23. 第66回日本生理学会大会抄録（岡山）

13. Ueki, S., Matsunami, Kuwata, K., K., Era, S., Sogami, M., Kato, K. & Watari, H. (1989. 4) ^{1}H－NMR studies of the water structure in rabbit vagus nerve. Jpn. J. Physiol., 39 ; S33. 第66回日

本生理学会大会抄録（岡山）

14. Nakahari, T., Murakami, M., Kataoka, T. & Imai, Y. (1989. 4) Changes in perfused submandibular cell volume during secretion. Jpn. J. Physiol., 39 ; S55. 第66回日本生理学会大会抄録（岡山）

15. Seo, Y., Steward, M. C. & Case, R. M. (1989. 4) Intracellular pH during secretlion by the perfused rabbit mandibular sallivary gland. Jpn. J. Physiol., 39 ; S56. 第66回日本生理学会大会抄録（岡山）

16. Maeda, M., Suzuki, E., Seo, Y., Murakami, M. & Watari, H. (1989. 4) Sodium－23 magnetic resonance imaging of the kidney. Jpn. J. Physiol., 39 ; S57. 第66回日本生理学会大会抄録（岡山）

17. Murakami, M., Seo, Y. & Watari, H. (1989. 4)Effects of transport blockers on intracellular pH of rat mandibular salivary gland during perfusion without bicarbonate. Jpn. J. Physiol., 39 ; S57. 第66回日本生理学会大会抄録（岡山）

18. 九鬼　覚，前田宗宏，瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘 (1989. 4) Ischemia, anoxia における心筋障害と Na/K pump 機能の関連について。第66回日本生理学会大会抄録（岡山）

19. 前田宗宏，津島寿一，廣橋伸治，尾辻秀章，岩崎　聖，岩田和朗，大石　元，打田日出男，平石泰三，瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘 (1989. 5) 腎の ^{23}Na－MRI の基礎的検討－皮髄コントラストに関して。第 9 回関西 MRI 研究会講演論文集，1113－1114.（大阪）

20. 東　晃史 (1989. 6) 覚醒・睡眠と情報・逆情報の平衡ポテンシャル。日本睡眠学会学術集会，14 ; 63.（東京）

21. 東　晃史 (1989.6) CPZ 投与マウスを用いた逆転診断のモデル解析。日本睡眠学会学術集会，14 ; 64.（東京）

22. Higashi, A. (1989) Functional combination of neuronal networks (Eccles type and crick type). Sleep research 18, 5. (Washington, D. C.)

23. Higashi, A. (1989) Can sleep and wakefulness phenomena be the operational system of the

brain? Sleep Research 18, 6. (Washington, D. C.)

24. Higashi, A. (1989) Types of rediagnosis using apparent conscious activity vector (AVC). Sleep Research 18, 7. (Washington, D. C.)

25. Higashi, A. (1989) Screening for psychotherapeutic drugs by analyzing conscious activity in the mouse. Sleep Research 18, 54. (Washington, D. C.)

26. Watari, H., Maeda, M., Seo, Y,. Murakami, M., Kuki, S. & Uchida, H. (1989. 7) Sodium－23 MRI of guinea pig kidney. XXXI Int. Cong. Physiol. Sci. Abstracts, 47. (Helsinki)

27. Ueki, S., Matsunami, K., Kuwata K., Era, S., Sogami, M., Kato K., Iwama, T., Yamada, H. & Watari, H. (1989. 7) ^{1}H－NMR studies on the water structure in rabbit vagus nerve. XXXI Int. Cong. Physiol. Sci. Abstracts, 148. (Helsinki)

28. Matsumoto, T., Kanno, T., Seo, Y., Murakami, M. & Watari, H. (1989. 7) Aerobic energy kinetsics in the pancreatic acinar cell during stimulus－secretion coupling. XXXI Int. Cong. Physiol. Sci. Abstracts, 152. (Helsinki)

29. Nakahari, T., Murakami, M., Sohma, Y., Miyamoto, M., Yoshida, H. & Imai, Y. (1989. 7) Decrease in acinar cell in perfused rat submandibular cell in perfused rat submandibular gland during secretion. XXXI Int. Cong. Physiol. Sci. Abstracts, 154. (Helsinki)

30. Suzuki, E., Maeda, M., Kuki. S., Steward, M., Takami, H., Seo. Y., Murakami, M. & Watari, H. (1989. 8) Adenosine triphosphate compartmentation in the rat heart : A P spin－lattice relaxation study. Society of Magnetic Resonance in Medicine, 1;115. (Amsterdam)

31. Seo, Y., Murakami, M., Nagayama, K. & Watari, H. (1989. 8) NMR characteristics of intracellular K in the rat salivary gland using ^{39}K double quantum NMR spectroscopy. Society of Magnetic Resonance in Medicine, 1 ; 257. (Amsterdam)

32. Hiraishi, T., Kuki, S., Maeda, M., Seo, Y., Murakami, M., Watari, H., Takami, H., Matsuda, H. & Kawashima, Y. (1989. 8) Assessment of high potassium reoxygenation in post－anoxic stunned myocardium using ^{31}P NMR spectroscopy. Society of Magnetic Resonance in Medicine, 2 ; 528. (Amsterdam)

33. Maeda, M., Suzuki, E., Kuki. S., Seo. Y., Murakami, M., Watari, H., Iwasaki, S, & Uchida, H. (1989. 8) Sodium－23 MR imaging of ischemic kidney in guinia pig. Society of Magnetic Resonance in Medicine, 2 ; 662. (Amsterdm)

34. Steward, M., Seo, Y. & Case, M. (1989. 8) Regulation of intracellular pH in rabbit mandibular salivary glands studied by ^{31}P NMR spectroscopy. Society of Magnetic Resonance in Medicine, 1106. (Amsterdam)

35. Steward, M., Seo, Y., Murakami, M. & Watari, H. (1989. 8) Effect of acetylcholine on unidirectional potassium fluxes across rat salivary gland membranes studied by ^{87}Rb NMR spectroscopy. Society of Magnetic Resonance in Medicine, 1107. (Amsterdam)

36. Seo, Y. (1989. 9) Chemical shift reagents and its application to biological systems. 日磁医誌, 9 (S－2) 99.第14回日本磁気共鳴医学会大会抄録（東京）

37. 平石泰三，九鬼　覚，瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘 (1989. 9) ^{31}P NMR よりみた stunned myocardium に対する高 K^+ 酸素化再灌流の検討。日磁医誌，9(S－2) 158. 第14回日本磁気共鳴医学会大会抄録（東京）

38. 前田宗宏，津島寿一，廣橋伸治，尾辻秀章，岩崎　聖，岩田和朗，大石　元，打田日出男，平石泰三，瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘 (1989. 9) Na－MRI による腎臓の尿濃縮能の評価に関する基礎的検討。日磁医誌，9 (S－2) 210. 第14回日本磁気共鳴医学会大会抄録（東京）

39. 桑田一夫，恵良聖一，曽我美　勝，天野　肇，河合憲司，北沢克明，岩間　亨，山田　弘，加藤一夫，亘　　弘 (1989. 9) 交差緩和時間（T_{1S}）測定による合成高分子ゲル，マウス・水晶体水構造の研究。日磁医誌，9 (S－2) 315. 第14回日本磁気共鳴医学会大会抄録（東京）

40. 岩間　亨，坂井　昇，山田　弘，恵良聖一，桑田一夫，曽我美　勝，加藤一夫，亘　　弘，木村征男，家森幸男，(1989. 9) 虚血脳細胞水構造の検討。日磁医誌，9 (S－2) 316. 第14回日本磁気共鳴医学会大会抄録（東京）

41. Seo, Y., Murakami, M., Watari, H. & Nagayama, K. (1989. 9) ^{39}K double quantum filer nuclear magnetic resonance study of intracellular K in the perfused rat salivary gland. 日磁医誌, 9 (S－2) 321. 第14回日本磁気共鳴医学会大会抄録（東京）

42. Murakami, M., Seo, Y. & Watari, H. (1989. 9) Effects of transport blockers on intracellular pH of rat mandibular salivary gland during perfusion without bicarbonate A : ^{31}P NMR study. 日磁医誌, 9 (S－2) 322. 第14回日本磁気共鳴医学会大会抄録（東京）

43. 恵良聖一，桑田一夫，曽我美　勝，岩間　亨，山田　弘，亘　　弘 (1989. 9) CD 及び ^{1}H－NMR によるヒト血清アルブミン構造移転の研究。日本生物物理学会（東京）

44. 桑田一夫，恵良聖一，曽我美　勝，亘　　弘 (1989. 9) ウシメルカプトアルブミン (BMA) N－A 異性化反応に対する脂肪酸等の影響。日本生物物理学会（東京）

45. 藤井裕子，桑田一夫，恵良聖一，曽我美　勝，亘　　弘 (1989. 9) ウシ血漿アルブミン (BPA) ゲル化の基礎的研究。日本生物物理学会（東京）

46. 加藤一夫，恵良聖一，桑田一夫，曽我美　勝，天野　肇，河合憲司，岩間　亨，山田　弘，森　秀樹，亘　　弘 (1989. 9) ^{1}H－NMR による蛋白質ゲル，合成高分子ゲル及び水晶体構造の比較。日本生物物理学会（東京）

47. 岩間　亨，岩井知彦，坂井　昇，山田　弘，加藤一夫，恵良聖一，桑田一夫，曽我美　勝，亘　　弘，木村柾夫，家森幸男 (1989. 9) 脳内水構造の研究（第２報）日本生物物理学会（東京）

48. 村上政隆，宮本信一，今井雄介，亘　　弘 (1989. 9) Na^{+}/ K^{+} ATPase, Na^{+}/ K^{+}/ $2Cl^{-}$ symport による唾液腺 K^{+}輸送。日本生物物理学会（東京）

49. 瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘 (1989. 9) ^{23}Na 二量子フィルター NMR 用いたラット唾液腺細胞内 Na の測定。日本生物物理学会（東京）

50. Case, R. M., Rawlings, J. M., Seo, Y. & Steward, M. C. (1989. 10) Water permeability of cell membranes in the isolated perfused rabbit mandibular salivary gland measured by proton NMR spectro scopy. J. Physiol., 417 ; 46P 英国生理学会抄録

51. Higashi, A. (1989. 10) Uncertainty in localizing consciousness and brain's calculating principle. The first internationa conference on higher nervous functions, 70. (大阪)

52. Higashi, A. (1989. 11) Brain's calculating principle. Alzheimer's and Parkinson's diseases,

2 ; 71.（京都）

53. Higashi, A. (1989. 11) Screening for psychothereapeutic chemicals by analyzing conscious activity in the mouse. Alzheimer's and Parkinson's diseases, 2 ; 71.（京都）

54. Case, R. M., Seo, Y. & Steward, M. C. (1989. 11) Regulation of intracellular pH in the isolated, perfused rabbit mandibular salivary gland studied by ^{31}P NMR spectroscopy. J. Physiol., 418 ; 127P. 英国生理学会抄録

55. Watari, H., Shimoyama, Y., Murakami, M. & Seo, Y. (1989. 11) Theoretical interpretation of vector EPR－A rigorous treatment of Bloch equation. 第28回 ESR 討論会， Abstracts ; 172 （京都）

56. Shimoyama, Y., Saji, K., Torii, M. & Watari, H. (1989. 11) Vector EPR study of melanin. 第28回 ESR 討論会， Abstracts ; 174 （京都）

57. 瀬尾芳輝，村上政隆，亘　弘，永山國昭，(1989. 11) 二量子フィルターを用いた細胞内Kの測定。第28回 NMR 討論会（東京）

58. 桑田一夫，恵良聖一，曽我美　勝，岩間　亨，山田　弘，加藤一夫，藤井裕子，天野　肇，河合憲司，北沢克明，亘　弘，赤坂一之 (1989. 11) 交差緩和時間（T_{IS}）測定による蛋白質ゲル，合成高分子ゲル内水構造の研究。第28回 NMR 討論会（東京）

59. 中張隆司，村上政隆，今井雄介 (1989) ラット灌流顎下腺の分泌刺激時の細胞容積の測定。第77回近畿生理学談話会日本生理誌抄録， 51 (3) : 110.

60. 桑田一夫，恵良聖一，曽我美勝，亘　弘 (1989) ウシメルカプトアルブミン (BMA) のN－A異性化反応とA型の構造。日本生理誌， 51 (1) : 23. 中部生理談話会抄録

61. 藤井裕子，桑田一夫，恵良聖一，曽我美　勝，亘　弘 (1989) ウシ血漿アルブミン (BPA) ゲル化の基礎的研究。日本生理誌， 51 (1) : 23. 中部生理談話会抄録

62. 岩間　亨，山田　弘，坂井　昇，桑田一夫，恵良聖一，曽我美　勝，加藤一夫，亘　弘 (1989) ^{1}H－NMR による脳内水構造の研究。日本生理誌， 51 (1) : 30. 中部生理談話会抄録

63. Sogami, M., Era, S., Kuwata, K., Yoshida, A., Iwama, T., Yamada, H. & Watari, H. (1989) ^{1}H−NMR studies on structural transition of bovine mercaptalbumin (BMA) by cross−relaxation measurement and spin−echo spectra.5th FAOB Congress Abstracts, 205.

64. Era, S., Kuwata, K., Takahashi, K., Sogami, M., Iwama, T., Yamada, H. & Watari, H. (1989) Circulat dichroic (CD) and ^{1}H−NMR studies on the N−B transition of human serum albumin (HSA). 5th FAOB Congress Abstracts, 206.

65. Sogami, M., Era, S., Kuwata, K., Fujii, H., Iwama, T., Yamada, H., Kato, K., Ueki, S., Matsunami, K. & Watari, H. (1989) ^{1}H−NMR studies on water structure in modified bovine plasma albumin (BPA ＊) gel and bovine mercaptalbumin (BMA) solution. 5th FAOB Congress Abstracts, 206.

66. Era, S., Kuwata, K., Sogami, M., Kato, K. & Watari, H. (1989) Circular dichroic (CD) and ^{1}H−NMR studies on the aged form of bovine mercaptalbumin (BMA). 5th FAOB Congress Abstracts, 207.

67. Kuwata, K., Era, S., Amano, H., Kawai, K., Takahashi, K., Iwama, T., Kato, K., Sogami, H., Kitazawa, Y., Yamada, H. & Watari, H. (1989) Comparative ^{1}H−NMR studies on the water structure in soft contact lens (SCL) and mouse lens. 5th FAOB Congress Abstracts, 210.

68. Ueki, S., Matsunami, K., Era, S., Sogami, M., Kato, K., Iwama, T., Yamada, H. & Watari, H. (1989) ^{1}H−NMR studies on the water structure in rabbit vaus nerve. 5th FAOB Congress Abstracts, 212.

69. Iwama, T., Ando, T., Sakai, N., Yamada, H., Era, S., Kuwata, K., Sogami, M. & Watari, H. (1989) ^{1}H−NMR studies on water structure in the rat brain tissues with cerebral tumor or ischemia. 5th Int. Conf. Neurol. Surg. Abstracts, 189.

70. Kuwata, K., Era, S., Ogura, S., Sogami, M., Kato, K. & Watari, H. (1989) Circular dichroic and ^{1}H−NMR studies on the aged form of bovine mercaptalbumin. Protein ENGINEERING '89 Abstracts, 156.

71. Sogami, M., Era, S., Kuwata, K., Kato, K., Iwama, T., Yamada, H. & Watari, H. (1989) ^{1}H−NMR andk circular dichroic studies on structural transitions of bovine mercaptalbumin. Protein

Engineering '89 Abstracts, 157.

72. Era, S., Kuwata, K., Sogami, M., Iwama, T., Yamada, H., Ueki, S., Matsunami, K. & Watari, H. (1989) ^{1}H－NMR studies on water structure in bovine mercaptalbumin sokution and partially hydrolyzed bovine plasma alblumin gel. Protein Engineering '89 Abstracts, 158.

73. 前田宗宏，鈴木賢一，市川　修，鈴木英司，九鬼　覚，瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　宏，打田日出夫 (1989) MRI による緩和速度測定の精度評価：同一マグネットを用いた MRS との比較。第 8 回関西 MRI 研究会（大阪）

《細胞内代謝研究部門》

1．井上孝，三宅秀，井口和明，望月徹，星野稔，矢内原千鶴子，矢内原昇 (1989. 4) 合成ヒト NPY および関連ペプチド用いるラジオイムノアッセイ系の確立とその応用。日本薬学会109年会（名古屋）

2．吉原重美，市村登寿，矢内原昇，(1989. 8) モルモット VIP 吸入のヒスタミンによる気道収縮の抑制効果。第11回消化管ホルモン研究会（静岡）

3．張濤，井口和明，望月徹，星野稔，矢内原昇 (1989. 4) ブタ脳組織中 LHRH 前駆体のプロセシングに関する研究。日本薬学会109年会（名古屋）

4．張濤，井口和明，望月徹，星野稔，矢内原千鶴子，矢内原昇 (1989. 6) pro－LHRH のプロセシングについて。第62回日本内分泌学会（東京）

5．張濤，井口和明，望月徹，星野稔，矢内原昇 (1989. 9) ブタ組織における pro－LHRH 関連ペプチド免疫活性の分布および存在様式。第 7 回脳腸ホルモン学会（静岡）

6．張濤，井口和明，望月徹，星野稔，矢内原昇，矢内原千鶴子 (1989. 11) LHRH 前駆体様分子の存在様式について。第62回日本生化学会大会（京都）

《生 体 膜 研 究 部 門》

1. Okada, D., Ito, I. & Sugiyama, H. (1989. 3) Some properties of long−term potentiation in the rat hippocampal mossy fiber synapses ; The International Workshop "Plasticity of Synaptic Transmission" (Kanazawa)

2. Yamagishi, S., Furuya, K. & Kukita, F. (1989. 7) Increase in anion conductance by intracellular Ca addition in squid giant axon. 31st Internat. Congress of Physiol. Sci. (Helsinki)

3. Sugiyama, H., Ito, I. & Okada, D. (1989. 8) Roles of metabotropic and ionotropic glutamate receptors in the long−term potentiation of hippocampal mossy fiber synapses ; European Neuroscience Association Satellite Symposium "Excitatory Amino Acids and Neuronal Plasticity". (Filerval, France)

4. Sugiyama, H. (1989. 12) Glutamate receptor subtypes involved in synaptiac transmission and long−term potentiation in the rat hippocampus ; The First International Symposium on "Synaptic Plasticity and Bio−computing". (Tsukuba)

5. 杉山博之 (1989. 1) グルタミン酸受容体をめぐる新知見。第３回「大学と科学」公開シンポジウム，脳のメカニズム——機能分子と記憶（東京）

6. 山岸俊一，古家喜四夫，久木田文夫 (1989. 4) 細胞内イオン条件による神経膜 Cl チャネルの発現。第66回日本生理学会大会（岡山）

7. 榎本浩一，古家喜四夫，前野　巍，岡　孝已 (1989. 4) 正常乳腺上皮細胞と乳癌細胞のイオンチャネル。第66回日本生理学会大会（岡山）

8. 森本克士，久木田文夫，山岸俊一 (1984. 4) 細胞内 Na イオンは Ca 依存性 K チャネルの開確立を増大させる。第66回日本生理学会大会（岡山）

9. 伊藤　功，渡辺雅一，杉山博之 (1989. 10) 脳グルタミン酸受容体サブタイプは２つの薬理学的カテゴリーに大別される。第13回神経科学学術集会（新潟）

10. 藤墳規明，吉村篤司，杉山博之，曽我部正博，伊藤文雄 (1989. 10) アフリカツメガエル卵母細胞膜の膜内粒子。第13回神経科学学術集会（新潟）

11. 山岸俊一，古家喜四夫，久木田文夫，筒井泉雄 (1989. 10) 細胞内 Ca イオン灌流による神経膜 Cl コンダクタンスの増大。第27回日本生物物理学会年会（東京）

12. 榎本浩一，古家喜四夫，前野　巍，岡　孝己 (1989. 10) 乳腺上皮細胞の細胞内 Ca と Ca 依存性Kチャネル。第27回日本生物物理学会年会（東京）

13. 美宅茂樹，久木田文夫 (1989. 10) イカ巨大神経膜の有機溶媒による変性。第27回日本生物物理学会年会（東京）

14. 久木田文夫 (1989. 10) 軸索外表面Kイオン蓄積に対するKイオンの影響。第27回日本生物物理学会年会（東京）

15. 山本幸子，杉山博之 (1989. 10) ラット海馬におけるグルタミン酸受容体サブタイプの分布——分離細胞による分析——。第27回日本生物物理学会年会（東京）

16. 岡田大助，杉山博之 (1989. 10) ラット海馬シナプス伝達の長期増強に対するホスホリパーゼ阻害剤の効果。第27回日本生物物理学会年会（東京）

17. 榎本浩一，古家喜四夫，前野　巍 (1989. 11) 乳腺上皮細胞と乳癌細胞の情報伝達。第40回西日本生理学会（山口）

18. 杉山博之 (1989. 11) シナプス長期増強の分子生理．第5回 WAKO ワークショップ「高次神経機構——細胞・分子より探る——」（東京）

《機能協関研究部門》

1．渡辺　昭，膜電位の勾配により発生する旋光性シグナル。第66回日本生理学会大会 1989. 4（岡山）

2．渡辺　昭，神経の旋光性シグナルの特性　第27回生物物理学会 1989. 10（東京）

3．Terakawa, S. & Kimura, V. (1989) Visualization of the synaptic transmission by photon counting imaging. The 2nd International Conference : Peace through Mind/Brain Science. 1989. 2 (Hmamatsu)

4．寺川　進，樊　津紅，熊倉鴻之助，クロマフィン細胞のエキソサイトーシスと濁度変化。第66回日本生理学会 1989. 4 （岡山）

5．寺川　進，鈴木裕一，杯細胞における開口分泌のリアルタイムギデオ観察。第66回日本生理学会 1989. 4 （岡山）

6．岩瀬範和，寺川　進，脳下垂体前葉における分泌顆粒のトラベリング運動。第66回日本生理学会 1989. 4 （岡山）

7．寺川　進，内分泌および外分泌細胞におけるエキソサイトーシスの光学顕微鏡観察公開シンポジウム「医学，生物学における光学顕微鏡の手技の最近における進歩」 1989. 4 （大阪）

8．寺川　進，樊　津紅，熊倉鴻之助，今泉美佳，クロマフィン細胞の分泌顆粒の運動性と開口放出。第27回生物物理学会年会 1989. 10 （東京）

9．寺川　進，樊　津紅，熊倉鴻之助，今泉美佳，クロマフィン細胞のエキソサイトーシスの可視化。第27回生物物理学会年会 1989. 10 （東京）

10. 寺川　進，樊　津紅，熊倉鴻之助，今泉美佳，光学顕微鏡によるクロマフィン細胞のエキソサイトーシス観察。第36回生理学中部談話会 1989. 10 （名古屋）

11. 岩瀬範和，寺川　進，柳沢　忠，脳下垂体前葉 TRH 感受性細胞における開口分泌のビデオ観察。第36回生理学中部談話会 1989. 10 （名古屋）

12. 寺川　進，岩瀬範和，柳沢　忠，脳下垂体前葉におけるエキソサイトーシスと分泌顆粒運動の可視化。第62回日本内分泌学会秋期学術大会。シンポジウム「視床下部ペプチドによる下垂体前葉機能の制御，最近の進歩」 1989. 10 （札幌）

13. 岩瀬範和，寺川　進，柳沢　忠，コイ脳下垂体の顆粒運動とエキソサイトーシス比較内分泌学会年会 1989. 11 （長崎）

14. 山岸俊一，古家喜四夫，久木田文夫，筒井泉雄，(1989) 細胞内 Ca イオン灌流による神経膜 Cl コンダクタンスの増大。第27回生物物理学会 1989. 10 （東京）

《能 動 輸 送 研 究 部 門》

1．Sato, E., Ohta, H., Fujita, M., Akahoshi, M. and Aashima, M. (1989. 8. 22) Notochord protrusion after cutting of Xenopus laevis and newt embryos. Presented at 11th International Congress of the Interna-tional Society of Developmental Biologists (Utrecht)

2．夏苅直己，花井洋行，藤田道也 (1989) ドーパミン系伝達路におけるカルモジュリンの関与。第32回日本神経化学会大会（札幌）

3．夏苅直己，上里忠良，藤田道也 (1989) 脳シナプス膜，小腸上皮細胞膜，赤血球膜の Calmodulin (CaM) 結合蛋白質の比較。第62回日本生化学会大会（京都）

4．山田正美，花井洋行，金子栄蔵，藤田道也 (1989) 自然発症高血圧ラットの単離十二指腸吸収上皮細胞におけるカルシウム輸送。第４回消化器病態生理研究会（東京）

5．ドーパミン系伝達路におけるカルモジュリンの関与－脳シナプス膜と CaM との相互作用の検討－夏苅直己，花井洋行，藤田道也。第32回日本神経科学会大会　札幌　９月27日－29日　1989

6．腎皮質尿細管細胞の Na/Ca 交換輸送と PTH 脱感作の機序。ワークショップ“新しい輸送機構”花井洋行。第32回日本腎臓学会総会　浜松　11月９日－11日 1989

7．自然発症高血圧ラットの単離十二指腸吸収上皮細胞におけるカルシウム輸送。山田正美，花井洋行，金子栄蔵，藤田道也。第４回消化器病態生理研究会　東京　11月25日 1989

8．山田一夫，土肥雪彦，川崎　尚 (1989. 4) 抗酸化剤による虚血細胞障害の保護。第30回生化学会中国・四国支部例会（広島）

9．佐藤　理，四方裕夫，山田一夫，川崎　尚 (1989. 11) 糖尿病モルモットの小腸におけるアミノ酸輸送系の変化。第61回生化学会大会（京都）

《神 経 情 報 研 究 部 門》

1．Pinto, L. H., Kaneko, A., Bowes, C. and Farber, D. (1989. 2) Membrane currents of Xenopus

laevis oocytes injected with RNA from retinas of carp and mouse. Annual Meeting of the Biophysical Society.

2．金子章道 (1989. 4) 網膜における色覚情報処理と側抑制のシナプス機構。第 5 回生物情報処理システム研究会講演会（札幌）

3．鈴木参郎助，金子章道，立花政夫 (1989. 4) マウス網膜双極細胞の抑制性伝達物質に対する応答。第66回日本生理学会大会（岡山）

4．Kaneko, A., Pinato, L. H., Bowes, C. and Farber, D. (1989. 5) Membrane currents of Xenopus laevis oocytes injected with RNA from retinas of carp and mouse. ARVO Annual Meeting (Sarasota, Florida)

5．金子章道 (1989. 5) 神経伝達物質の研究から明らかになった段階説の神経機構。第20回日本色彩学会全国大会（豊田）

6．金子章道 (1989. 5) 単離ニューロンと神経回路網。第28回日本 ME 学会大会（大阪）

7．Kaneko, A. (1989. 5) Conversion of tonic to phasic responses in the retina : signal preprocessing for motion detection. CNRS Jaques Monod Conference (Roscoff, France)

8．Kaneko, A., Suzuki, S., Pinto, L. H. and Tachibana, M. (1989. 8) Membrane currents and pharmacology of retinal bipolar cells differ between goldfish and mouse. The International Symposium on Fish Vision. The 12th Annual Meeting of European Neuroscience Society (Sardinia, Spain)

9．金子章道，鈴木参郎助 (1989. 10) マウス網膜双極細胞のグリシンおよび GABA 受容体。第13回日本神経科学協会学術集会（新潟）

10. Downing, J. E. G., Kaneda, M., Kaneko, A., and Suzuki, S. (1989. 10) Transmitter sensitivities, receptor distribution and conductance mechanisms of mammalian retinal neurons. Annual Meeting, Society for Neuroscience (Phoenix, Arizona)

11. Pinto, L. H., Kaneko, A., Bowes, C., and Farber, D. (1989. 10) Membrane currents of Xenopus laevis oocytes injected with RNA from retinas of carp and mouse. Annual Meeting, Society for Neuroscience (Phonix, Arizona)

12. Stell, W. K., Magnus, T., Kyle, A. L., Ohtsuka, T., and Kawamata, K. (1989. 8) Structure, function and chemistry of nervus terminalis retinal efferent fibres in goldfish.The International Symposium on Fish Vision. The 12th Annual Meeting of European Neuroscience Society (Sardinia, Spain)

13. 大塚輝彌 (1989. 11) 視覚情報処理の網膜神経回路。第 9 回生物情報処理システム研究会（札幌）

14. 大塚輝彌 (1989. 12) 色情報抽出の網膜神経回路。第 7 回国際眼研究会議日本部会（大阪）

15. 赤池紀扶，高橋和義，金田　誠，池本清海 (1989. 4) 海馬単離 CA1 錐体細胞の Ca 電流。第66回日本生理学会大会（岡山）

16. Kaneda, M. Wakamori, M. and Akaike, N. (1989. 7) Low－threshold calcium current of rat cerebellar Purkinje cell bodies. The XXXI International Congress of Physiological Sciences (Helsinki)

17. Kaneda, M. Wakamori, M. and Akaike, N. (1989. 7) Kinetic analysis of the GABA－induced current in cerebellar Purkinje cells. The XXXI International Congress of Physiological Sciences (Helsinki)

18. 倉橋　隆，渋谷達明 (1989. 4) イモリ単離嗅細胞の持続的匂刺激に対する応答の減衰と Ca イオン。第66回日本生理学会大会（岡山）

19. 倉橋　隆，金子章道 (1989. 10) 脊椎動物嗅細胞膜の cAMP 活性化コンダクタンス。第13回神経科学学術集会（新潟）

20. 倉橋　隆，渋谷達明 (1989. 11) 嗅細胞の情報変換機構：匂物質及びサイクリック AMP に活性化されるチャンネルの電気生理学的性質の比較。第23回味と匂いのシンポジウム（神奈川）

21. Kurahashi, T., Kaneko, A. and Shibuya, T. (1989. 11－12)Ionic Mechanisms of Olfactory Transduction Studied on Isolated Receptor Cells of the Newt. Taniguchi International Symposia on Visual Science. The 12th Symposium (Katata)

22. 倉橋　隆 (1989. 12) 嗅細胞における匂い情報変換の分子機構。生体分子集合体工学シンポ

ジウム（筑波）

《高次神経機構研究部門》

1．山中　篤，谷藤　学，外山敬介 (1989. 10) 視覚野切片標本の光学的応答。第13回神経科学学術集会（新潟）

2．外山敬介，小松由紀夫，山本亘彦 (1989. 4) 視覚野の神経回路の可塑性 (LTP) 局在の機能的意義：シナプス学習の誘導機構。第66回日本生理学会（岡山）

3．外山敬介 (1989. 5) 大脳視覚野の神経回路の自己組織化。日本 ME 学会（大阪）

4．外山敬介 (1989. 6) 脳の可塑性と自己組織化。計測自動制御学会「生体システムに学ぶ」（大阪）

5．外山敬介 (1989. 6) 立体視と斜視，弱視の生理学。日本斜視弱視学会（大阪）

6．外山敬介 (1989. 10) 視覚中枢，物の見え方の仕組み。眼科専門制度講習会（名古屋）

7．Toyama. K. (1989. 10) Physiology of cerebral cortex : cotical functions are learned under genetic control. Neurosurgery and neuroscience－the challenges (Singapore)

8．Toyama, K., Tanifuji, M., Yamanaka, A. and Yamamoto, N. (1989. 11) Optical imaging of excitation in visual cortical slices and lateral geniculate－visual cortex cocultures. Visual cortical plasticity : From molecular mechanisms to modelling (Nara)

9．Toyama, K. (1989. 12) In vitro study of self－organization in visual cortical circuitry. The lst international symposium on synaptic plasticity and biocomputing (Tsukuba)

10. Yamamoto, Y., Kurotani, T. and Toyama, K. (1989. 10) Neural connections in lateral geniculate nucleus－visual cortex cocultures. Soc. for Neurosci., USA. (Phoenix)

11. Komatsu, Y. and Toyama, K. (1989. 10) Long－term potentiation of early and late exitatory postsynaptic potentials in kitten visual corical cells. Soc. for Neurosci., USA. (Phoenix)

12. 田内稚規，田中一郎，福田　淳，森際克子，蘇国輝 (1989. 4) 抹消神経の移植による損傷網膜神経節細胞の再生。第66回日本生理学会（岡山）

13. 福田　淳，森際克子，蘇国輝，S. Kierstead, M. Raminsky, A. Aguayo (1989. 4) 座骨神経移植による網膜－上丘投射路の機能回復。第66回日本生理学会（岡山）

14. 井上　徹，安達栄治郎，森際克子，佐々木仁，福田　淳 (1989. 10) 座骨神経移植によって再生した視神経繊維の光顕的・電顕的観察。第13回神経科学学術集会（新潟）

15. 田内稚規，福田　淳，森際克子，蘇国輝 (1989. 10) 軸索切断した網膜神経節細胞の変性と抹消神経移植による再生。第13回神経科学学術集会（新潟）

16. Fukuda, Y., Sawai, H., Wakakuwa, K., Watanabe, M. and Morigiwa, K. (1989) Nasotemporal overlap of the monkey retina : morphological and physiological study. IV Tmin International Symposium ; Vision, Memory. and Temporal Lobe. (Tokyo)

《高次神経性調節研究部門》

1．Hikosaka, O., Sskamoto, M. & Usui, S. (1989) Role of monkey caudate neurons in saccadic eye movement. International Basal Ganglia Soc., Third Triennial Meeting. (Cagliari, Italy)

2．彦坂興秀 (1989) 眼球運動と GABA. シンポジウム「神経伝達物質からみた神経学」第30回日本神経学会総会（水戸）

3．Hikosaka, O. (1989) Role of forebrain in oculomotor control. Symposium : Role of the forebrain in senesation and abehavior. NASA/Ames Research Center. (Moffet Field, CA)

4．彦坂興秀 (1989) 眼球運動の中枢機構と睡眠。シンポジウム「睡眠の発達とその異常」第14回日本睡眠学会学術集会（東京）

5．彦坂興秀 (1989) 眼球運動の中枢機構。第19回新潟神経学夏期セミナール詳録集　（新潟）

6．Hikosaka, O. (1989) Basal ganglia control of saccadic eye movement. Symposium : Brainstem Control of Posture and Movements. (Asahikawa)

7．彦坂興秀 (1989) 眼球運動の中枢機構。シンポジウム「物の見え方の仕組み」第12回眼科専門制度講習会（名古屋）

8．Hikosaka, O. (1989) Role of basal ganglia in oculomotor function. Symposium : The Basal Ganglia : Structure and Function. Society for Neuroscience. 19th Anual Meeting. (Phoenix, Arizona)

9．矢沢和人，亀山正樹，亀山亜砂子 (1989) Ca チャネルの run－down を防ぐ物質の組織分布 第66回日本生理学会（岡山）

10. 亀山亜砂子，亀山正樹 (1989) Ca チャネルを活性化する細胞内物質の部分精製。第66回日本生理学会（岡山）

11. Yazawa, K., Kameyama, M. & Kameyama, A (1989) Tissue distribution of the c;ytoplasmic protein that lprotects L－type calcium channel from run－down. J. J. Physiol.（＊＊）

12. Kameyama, A. & Kameyama, M. (1989) Partial purification of the cytoplasmic protein that activates L－type calcium channel. J. J. Physiol.

13. 亀山亜砂子，関口和生， Shearman, M. S., 西塚泰美，亀山正樹 (1989) 心筋 Ca チャネルのリン酸化と Ca－flux の増大。第26回日本生化学会大会（京都）

14. 矢沢和人，亀山正樹，入沢宏 (1989) 心室筋 I_K に対するカテコールアミンの作用機序。

15. Kameyama, M., Kameyama, A., Kaibara, M. & Yazawa, K. (1989)Mechanisms of run－down of cardiac calcium channels. Japan－U. S. A. Symposium on Cardiovascular Drugs : Recent Advances in Ca channels and Ca－antagonists. (Hawaii)

16. 亀山正樹 (1989) 心筋 L 型 Ca チャンネルの細胞内調節機構。三菱化成生命研シンポジウム（町田）

17. Kameyama, M., Kameyama, A., Shearman, M. S. & Sekiguchi, K. (1989) Regulation of the cardiac calcium channel by protein kinases. 7th International Conference on Cyclic Nucleotides, Calcium and Protein Phosphorylation. (Kobe)

18. Imai, H., Nakamura, T., Miyashita, N., Nishi, K. & Narabayashi, H. (1989) Retrograde axonal

transport of MPTP after unilateral caudate nucleus infusion on the monkey. Internatinal Basal Ganglia Society, Third Triennial Meeting. (Cagliari, Italy)

19. Ohye, C., Shibazaki, T., Hirato, M., Kawashima, Y., Matsumura, M. & Shibasaki, T. (1989) Neural activity of the basal ganglia in Parkinson's disease studied by depth recording and PET scan. Third International Basal Ganglia Society Meeting. (Cagliari, Italy)

20. Ohye, C., Shibazaki, T., Hirai, T., Kawashima, Y., Hirato, M. & Matsumura, M. (1989) Tremor mediating thalamic zone studied in humans and in monkeys. 2nd Workshop on Microphysiological Recordings During Stereotactic Neurosurgery. (Nikko)

21. Ohye, C., Shibazaki, T., Kawashima, Y., Hirato, M. & Matsumura. M. (1989) Strategy of selective Vim－thalamotomy guided by microrecording. 10th Meeting of the World Society for Stereotactic and Functional Neurosurgery. (Maebashi)

《生体システム研究部門》

1．大森治紀，重本　尚 (1989. 4) 有毛細胞の周波数応答特性と膜特性。第66回日本生理学会大会（岡山）

2．大森治紀 (1989. 5) ヒヨコ内耳有毛細胞の機械刺激受容機構。第90回日本耳鼻咽喉科学会シンポジウム（Ⅱ）聴覚の原点－蝸牛有毛細胞のメカニズム－（大阪）

3．Ohmori, H. (1989. 7) Mechano－electrical transduction in chick isolated hair cells. Proc. 31th International Congress of Physiological Science. (Helsinki)

4．大森治紀 (1989. 12) Mechano－electric transduction of the hair cell. 動物生理学会（札幌）

5．重本　尚，大森治紀 (1989. 4) Ach によって生じた有毛細胞内 Ca 応答。第66回日本生理学会大会（岡山）

6．重本　尚，大森治紀 (1989. 11) Ach, ATP は有毛細胞において Ca 応答，電気的応答を引き起こす。第13回神経科学学術集会（新潟）

7．山口和彦 (1989. 4) 培養蝸牛神経節細胞のグルタミン酸受容体の単一チャネル電流。第66回日本生理学会大会（岡山）

《高次液性調節研究部門》

1．Inase, M., Mushiake, H., Shima, K., Aya, K. & Tanji, J. (1989) Neuronal activity in monkey primary sensory areas in relation to digit movements. Jpn. J. Physiol. suppl. 39 : S138.（＊＊＊）

2．Shima, K., Aya. K., Inase, M., Mushiake, H., Aizawa, H. & Tanji, J. (1989) Neuronal activities in the primate cingulate cortex during signal－triggered and selfpaced movement. Jpn. J. Physiol. suppl. 39 : S138.（＊＊＊）

3．Mushiake, H., Inase, M. & Tanji, J. (1989) Movement－related actiavity in supplementary motor and premotor areas during visually－ and internally－guided sequential movements. Jpn. J. Physiol. suppl. 39 : S139.（＊＊＊）

4．稲瀬正彦，虫明　元，嶋　啓節，綾　皓二郎，丹治　順 (1989) 大脳体性感覚野ニューロン活動は，筋活動に先行するか？日本生理学雑誌，51 (3) : 106.（＊＊＊）

5．嶋　啓節，綾　皓二郎，稲瀬正彦，虫明　元，相沢　寛，丹治　順 (1989) 上肢運動に伴う大脳帯状回ニューロンの活動。日本生理学雑誌，51 (3) : 107.（＊＊＊）

6．Aou, S., Woody, C. D. and Brit, D. (1989. 1) Plasticity of the motor cortex during rapid conditioning of eyeblink reflexes in the awake cat. 14th SEIRIKEN Conference on The Neural Basis of Cortical Plasticity. (Okazaki)

7．粟生修司，大村　裕，高木厚司，岡田英一郎，小山純正 (1989. 4) 雌ザル視床下部および中脳の性行動促進系の比較。第66回日本生理学会大会（岡山）

8．Karadi, Z., Scott, T. R., Oomura, Y., Nishino, H., Lenard, L. & Aou, S. (1989. 4) Catecholamines in the taste information processing. 第66回日本生理学会大会（岡山）

9．岡田英一郎，高木厚司，粟生修司，大村　裕 (1989. 4) 中脳刺激による雄ザルの性行動について。第66回日本生理学会大会（岡山）

10. 高木厚司，岡田英一郎，粟生修司，大村　裕 (1989. 4) サル視床下部刺激による摂食課題遂行の検討。第66回日本生理学会大会（岡山）

11. 高木厚司，粟生修司，大村　裕 (1989. 6) 霊長類における視床下部摂食抑制系の検討。第30回日本心身医学会（名古屋）

12. 粟生修司，高木厚司，吉松博信，大村　裕 (1989. 6) 摂食と生殖：満腹中枢は雌の性行動を促進する。第30回日本心身医学会（名古屋）

13. Karadi, Z., Oomura, Y., Mishino, H., Scott, T. R., Lenard, L. & Aou, S. (1989. 7) Endogenous and exogenous chemosensitivity of lateral hypothalamic neurons in alert rhesus monkeys. XXXI International Congress of Physiological Sciences, (Helsinki)

14. Aou, S., Oomura, Y., Takaki, A. & Okada, E. (1989. 7) Sexual behavior elicited by electrical stimulation of the midbrain in female and male monkeys. XXXI International Congress of Physiological Sciences. (Helsinki)

15. Matsumoto, I., Oomura, Y., Nishino, H., Nemoto, S., Aou, S., Aikawa, T. (1989. 7) Effects of 2－buten－4－olide, a endogenous satiety substance, on plasma glucose, corticosterone and epinephrine. XXXI International Congress of Physiological Sciences. (Helsinki)

16. Aou. S., Okada, E., Takaki, A. & Oomura, Y. (1989. 10) Sexual behavior elicited by stimulation of the monkey midbrain. 19th Annual Meeting of Soc. for Neurosci (Phoenix)

17. 粟生修司，高木厚司，大村　裕 (1989. 10) 中枢性カルシウム調節機構。第13回神経科学学術集会（新潟）

18. 岡田英一郎，高木厚司，粟生修司，大村　裕，堀　哲郎 (1989. 10) 雄ザル性行動を誘発する中脳被蓋刺激の条件。第40回西日本生理学会（山口）

19. 高木厚司，粟生修司，大村　裕 (1989. 11) サルの摂食課題遂行に及ぼす視床下部刺激効果－電気刺激と化学刺激の比較検討。第10回日本肥満学会（東京）

《生 体 機 能 検 査 室》

1．加藤政隆，高木敏貴，成瀬　達，塩野谷恵彦 (1989. 3) 各種試験食および胃伸展による胃血流の変化。第75回日本消化器病学会総会（横浜）

2．高木敏貴，加藤政隆，成瀬　達，塩野谷恵彦 (1989. 3) 空腹時胃血流の周期的変化に於けるコリン作動性神経及びモチリンの関与。第75回日本消化器病学会総会（横浜）

3．成瀬　達，D. F. マギー (1989. 3) 胃の周期活動によるガストリン刺激胃分泌増強作用。第75回日本消化器病学会総会（横浜）

4．成瀬　達，尾崎　毅 (1989. 4) 腹腔動脈と前腸管膜動脈の血流の関係。第66回日本生理学会大会（岡山）

5．Naruse, S., T. Takagi, M. Kato, & T. Ozaki. (1989. 7) Gastric blood flow : its relation to motility and secretion in conscious dogs. XXXI International Congress of Physiological Sciences (Helsinki)

6．加藤政隆，高木敏貴，成瀬　達，塩野谷恵彦 (1989. 10) Human gastrin－releasing peptide (hGRP) の胃血流および胃酸分泌に及ぼす作用。第31回日本消化器病学会大会（旭川）

7．成瀬　達，安井章裕，D. F. マギー (1988. 10) 幽門部粘膜血流と食物の胃粘膜との接触の関係。第31回日本消化器病学会大会（旭川）

8．近藤孝晴，成瀬　達 (1989. 10) 運動と消化機能。第26回日本臨床生理学会総会（東京）

《組 織 培 養 検 査 室》

1．古家園子 (1989. 5) In vitro で形成される牛副腎髄質毛細血管皮細胞の有窓構造。日本電子顕微鏡学会第45回学術講演会（大阪）

《磁 気 共 鳴 装 置 室》

1．亘　　弘，村上政隆，瀬尾芳輝，鈴木英司，九鬼　覚，前田宗宏 (1989. 2) In Vivo 多核種

NMR : 2. 1T MRIS システムの現状。日磁医誌, 9 (S－1) ; 129.

2．前田宗宏，鈴木英司，九鬼　覚，瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘，岩崎　聖，打田日出夫 (1989. 2) 腎の ^{23}Na－MMR 。日磁医誌, 9 (S－1) ; 130.

3．瀬尾芳輝, Steward, M.. & Case, R. M. (1989. 4) 家兎唾液腺分泌中の細胞内 pH 動態。第66会日本生理学会　予稿集。123 (岡山)

4．前田宗宏，鈴木英司，九鬼　覚，瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘 (1989. 4) 腎の ^{23}Na 磁気共鳴画像の測定。第66会日本生理学会予稿集。123 (岡山)

5．Seo, Y., Steward, M. C. & Case, R. M. (1989. 4) Intracellular pH during secretlion by the perfused rabbit mandibular sallivary gland. Jpn. J. Physiol. 39 ; S56.

6．Maeda, M., Suzuki, E., Seo, Y., Murakami, M., & Watari, H. (1989. 4) Sodium－23 magnetic resonance imaging of the kidney. Jpn. J. Physiol., 39 ; S57.

7．前田宗宏，津島寿一，廣橋伸治，尾辻秀章，岩崎　聖，岩田和朗，大石　元，打田日出夫，平石泰三，瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘 (1989. 5) 腎の ^{23}Na－MRI の基礎的検討－皮髄コトラストに関して－第9回関西 MRI 研究会 (大阪)

8．Watari, H., Maeda, M., Seo, Y., Murakami, M., Kuki, S. & Uchida, H. (1989. 7) Sodium－23MRI of guinea pig kidney. International congress of physiological sciences, 31 ; 47.

9．Suzuki, E., Maeda, M., Kuki. S., Steward, M. Takami, H., Seo. Y., Murakami, M. & Watari, H. (1989. 8) Adenosine triphosphate compartmentation in the rat heart ; A ^{31}P spin－lattice relaxation study. Society of Magnetic Resonance in Medicine, 1 ; 115.

10. Maeda, M., Suzuki, E., Kuki. S., Seo. Y., Murakami, M., Watari, H., Iwasaki, S. & Uchida, H. (1989. 8) Sodium－23 MR imaging of ischemic kidney in quinea pig. Society of Magnetic Resonance in Medicine, 2 ; 662.

11. Steward, M., Seo, Y., Murakami, M. & Watari, H. (1989. 8) Effect of acetylcholine on unidirectional potassium fluxes across rat salivary gland membranes studied by ^{87}Rb NMR spectroscopy. Society of Magnetic Resonance in Medicine, 1107.

12. 前田宗宏，津島寿一，廣橋伸治，尾辻秀章，岩崎　聖，岩田和朗，大石　元，打田日出夫，平石泰三，瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘 (1989. 9) ^{23}Na－MRI による腎臓の尿濃縮能の評価に関する基礎的検討。日磁医誌，9 (S－2) 210.

13. Case, R. M., Rawlings, J. M., Seo, Y. & Steward, M. C. (1989. 10) Water permeability of cell membranes in the isolated perfused rabbit mandibular salivary gland measured by proton NMR spectroscopy. J. Physiol., 417 ; 46P

14. 前田宗宏，津島寿一，廣橋伸治，尾辻秀章，岩崎　聖，岩田和朗，大石　元，打田日出夫，平石泰三，瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘 (1989. 10) 腎の ^{23}Na－MRI の基礎的検討－皮髄コントラストに関して－。第 9 回関西 MRI 研究会講演論文集，1113－1114.

15. 前田宗宏，鈴木賢一，市川　修，鈴木英司，九鬼　覚，瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘，打田日出夫 (1989) MRI による緩和速度測定の精度評価：同一マグネットを用いた MRS との比較。第 9 回関西 MRI 研究会講演論文集 21 ; 204－205.

《動　物　実　験　施　設》

1. Yokoyama S. and Ozaki T. (1989. 7)Effects of electrical Stimulation of Meissner's plexus on the intestinal muscle. Proceedings of the International Union of Physiological Sciensces, XVII, 502 (Helsinki)

2. Tsuji S., Ozaki T., Anglade P. and Yokoyama S. (1989. 7) Peristaltic movement provoked in the small intestine deprived of both mucosa and submucosa. Proceeding of the International U nion of Physiological Sciensces, XVII, 503 (Helsinki)

3. Naruse S., Takagi T., Kato M. and Ozaki T. (1989. 7) Gastric blood flow : its relation to motility and secretion in concious dogs. Proceedings of the International Union of Physiological Sciensces, XVII, 499 (Helsinki)

4. 尾崎　毅，桑原厚和 (1989. 10) モルモット小腸一輪走縦走筋運動に対するマイスナー神経叢刺激の効果。第108回日本獣医学会（盛岡）

5. Kuwahara, A., Ozaki T. and Yanaihara N. (1989. 10) Effect of galanin on smooth muscle cont-

ractions in the guinea-pig ileum. Neurosci. Res. (suppl. 9) S126 第13回日本神経化学会（新潟）

【共同研究報告】

共同研究報告

〔目　　次〕

平滑筋ミオシンの収縮機構における役割（真崎知生他） …… 177

平滑筋 Ca 制御の調節因子に関する研究（大槻磐男他） …… 178

ミオシン ATPase 反応中間体の構造（田之倉優他） …… 181

シナプス小胞の機能に関する神経化学的・分子形態的研究
（西江　弘他） …… 183

神経特異的 C 系列ガングリオシドの同定と精製
（小幡邦彦他） …… 184

棘皮動物の系統発生に関する研究（雨宮昭南他） …… 185

分泌・吸収機能と高エネルギーりん酸化合物動態の同時測定
（菅野富夫他） …… 186

ANISOTROPIC DYNAMICS IN ORIENTED LIPID MULTIBILAYER
REVEALED BY VECTOR EPR SPECTROSCOPY （下山雄平他） …… 187

^{1}H-NMR による血漿アルブミン分子の構造転移と MOLECULAR AGING
および水構造の研究（曽我美勝他） …… 189

核磁気共鳴法による各種脳病変の検出と脳内水構造の研究
（山田　弘他） …… 192

核磁気共鳴による病変検出のための基礎的研究
（加藤一夫他） …… 193

分泌時の唾液線細胞の容積変化のシステム論的研究
（今井雄介他） …… 194

分泌時細胞容積変化と細胞間連絡（菅野義信他） …… 196

生体内酸化還元系における電子移動の分子機構の研究
（志賀　潔他） …… 198

脳腸ペプチドのノモクローン抗体による免疫化学的検討
（矢内原昇他） …… 199

移植腸管の生理機能に関する研究（桑原厚和他） …… 200

聴覚中枢電気活動の光学的測定（橋本　享他） …… 203

膜タンパク質の立体構造形成（美宅茂樹他） …… 204

生体膜に関する組織細胞化学的研究（高田邦昭他） …… 205

イノシトールリン酸 (IP_3) 感受生 K^+ チャネルの解析
（東田陽博他） …… 205

卵母細胞に誘導したグルタミン酸受容体の特徴付け
（小長谷紀子他） …… 206

上頚神経節内のナトリウム利尿ペプチドの存在とその生理作用の検討
（永田　豊他） …… 207

Ca 依存性 K チャネルに及ぼす細胞内 K イオンの希釈効果
（森元克士他） …… 209

大腸上皮機能の光学的方法による研究（鈴木裕一他） …… 211

脳下垂体前葉の GH 細胞の分泌活動の画像処理による研究
（征矢英昭他） …… 211

唾液腺分泌機構の光学的解析（瀬川彰久他） …… 212

内耳における音響受傷性の個体差に関する研究
（田中康夫他） …… 213

身体運動が消化管諸機能とその協調におよぼす影響
（近藤孝晴他） …… 214

高等動物細胞膜のアミノ酸輸送系の解析（石井哲郎他） …… 215

原発性高シュウ酸尿症Ⅰ型についての研究（市山　新他） …… 216

輸送 ATPase 分子の構造と機能（太田英彦他） …… 217

自然発症高血圧ラットの単離十二指腸吸収上皮細胞におけるカルシウム輸送
（山田正美他） …… 218

小腸の発生に伴う吸収細胞の糖輸送（上里忠良他） …… 221

スンクス（和名ジャコウネズミ）小腸刷子緑膜の糖消化吸収能
（武居能樹他） …… 224

網膜双極細胞の機能形態学的分類（田内雅規他） …… 225

グリア細胞の水代謝（冨田　稔他） …… 226

視細胞内節の細胞骨格構造と機能（臼倉治郎他） …… 228

網膜水平細胞の Ca および Na ホメオスタシスを
光応答機能と関連づけて理解する研究（安井湘三他） …… 229

網膜における中枢神経支配の免疫組織化学的研究
（河又邦彦他） …… 230

筋紡錘感覚神経終末における伸張感受性チャネルの超微形態
（伊藤文夫他） …… 231

大脳皮質視覚野における可塑性制御機構の研究
（小松由紀夫他） …… 232

培養神経細胞回路網の膜電位変化の光学的記録システムの開発
（時岡　良他） …… 233

神経細胞の表面糖鎖の役割－神経細胞表面抗原を特異的に認識する
モノクローナル抗体を用いた研究（村上富士夫他） …… 234

網膜視神経細胞の形態と機能の関連（渡部眞三他） …… 235

後根神経節細胞のペプチド合成調節機構（久野　宗他） …… 238

実験的パーキンソン病モデルにおける眼球運動の研究
（岩村吉晃他） …… 239

生体膜機能発現機構におけるＣキナーゼの役割
（亀山正樹他） …… 240

クロマフィン細胞の膜電流動態の解析と脳移植への応用
（西野仁雄他） …… 241

嗅覚識別における前頭連合野の役割（小川陽一） …… 242

Olfactory coding in the monkey lateral hypothalamus and
its catecholaminergic regulation （ Karadi, Z. 他） …… 242

脳－免疫系制御における視床下部・自律神経系の役割
（堀　哲郎他） …… 243

Meissner 神経叢の機能（横山正松他） …… 245

海馬の行動活性物質の探索（小野　哲他） …… 246

先天性 aganglionosis ラット消化管の神経支配
（長浜真人他） …… 247

脳内活性物質と針麻酔の関連性についての研究
（森　　和他） …… 248

ラット下部腸管の外来神経支配（沖　　充他） …… 249

Duchenne 型筋ジストロフィー特異的欠損蛋白質ジストロフィンの単離と
その構造解析（桑山秀人他） …… 251

高次運動領野の生理学的・神経組織学的研究
（丹治　順他） …… 252

平滑筋ミオシンの収縮機構における役割

眞崎知生（筑波大・基礎医学系）
江橋節郎（生理研）

平滑筋の収縮調節機構に関しては，ミオシンの調節軽鎖のリン酸化説が依然として有力である。しかしライオトニンを介するという事実もかなり確実になってきた。そこで本研究計画では，ミオシン重鎖，調節軽鎖の一次構造を決定し，それらのつくり出す構造と機能について検討することを目的とした。

従来までの研究で，胚ミオシン重鎖の全長 cDNA クローンを得てその全構造を決定し，それから胚ミオシン重鎖の一次構造，推定高次構造の決定を終了した。

さらに昨年度はニワトリ砂嚢平滑筋ミオシン調節軽鎖のクローンを単離し，そのコーディング領域のアミノ酸配列を決定したところ，従来蛋白質レベルの解析で分かっていたニワトリ砂嚢平滑筋のアミノ酸配列と10アミノ酸残基ほどが置換されていた。そこでこの mRNA を試験管内で転写，翻訳させ，二次元電気泳動を行ったところ，ニワトリは砂嚢平滑筋にみられる，親の調節軽鎖より少し酸性側に少量存在するアイソフォームに相当することがわかった。さらにこの翻訳産物を親の砂嚢平滑筋ミオシンに組み込み，ニワトリ砂嚢平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼでリン酸化を行った結果，親の砂嚢平滑筋ミオシンよりもリン酸化の速度が速いことがわかった。さらにその後の研究により，これら２種類のミオシン調節軽鎖の mRNA は，親の砂嚢にもそれぞれ十分量存在するが，胚型のミオシン調節軽鎖は親の砂嚢では蛋白レベルまで発現されていないことがわかった。

さらに本年度はこれらの結果を背景に，ニワトリ非筋細胞性ミオシン重鎖の解析，及び，砂嚢平滑筋ミオシン重鎖のフィラメント形成について，一次構造より，可能なフィラメント形態の推定と実際の形態について検討を行った。

ニワトリの線維芽細胞 cDNA ライブラリーより非筋細胞性ミオシン重鎖クローンを２種類採取できた。これら２つのクローンはゲノム上の異なった遺伝子部位にコードされていることがわかった。ノーザンブロット法によれば，この２種のミオシン mRNA は，線維芽細胞ばかりでなく種々の組織，すなわち脳，肺，腎，脾および骨格筋，心筋，平滑筋に発現されていることがわかった。しかし，これら２つの相対的量比はそれぞれの組織で大きく異なっていることがわかった。

これらの２種のミオシン重鎖の配列の相同性は極めて高いが，同時に平滑筋のミオシン重鎖のそれとも似ている。しかし，脊椎動物の骨格筋ミオシンあるいは原生動物の非筋細胞性ミオシン重鎖とは異なっている。これらのミオシン重鎖の相同性の比較からミオシン重鎖の進化系統樹を作成した。これによれば平滑筋ミオシン重鎖と非筋細胞を含む脊椎動物非横紋筋性ミオシン重鎖はきわめて近い関係にあり，横紋筋性のものとはかなり早い時期に分れており，さらに，これら

2群のミオシン重鎖の分岐点より，はるか以前に原生動物の非筋細胞性ミオシン重鎖が分かれたということになる。さらに我々はミオシン軽鎖キナーゼのcDNAをクローン化し，その全構造の決定を行っているがまだ最終的結論を得ていない。

一方一次構造から推定したミオシンの分子上の荷電分布にもとづき，平滑筋ミオシン分子間の相互作用を計算し，それをもとにどのようなフィラメントが形成され得るかという問題について検討している。さらにその結果を電子顕微鏡より実際に観察されたフィラメントと比較検討している。

平滑筋カルシウム制御の調節因子に関する研究

大槻磐男（九大・医）
江橋節郎（生理研）

ニワトリ筋胃ミオシンBの脱感作標本は，平滑筋0.25M NaCl抽出液を加えると再感作しCa感受性超沈澱を示すようになる。ウサギ骨格筋トロポニンはこの脱感作標本自体には全く再感作作用を示さず，また抽出液で充分に再感作した場合の超沈澱にも何らの影響も与えなかったが，不十分に再感作した超沈澱に対しては増強作用を示した（第1図）。このトロポニンの作用について検討を行い，以下の所見を得た。

(1) 最大増強効果を示すトロポニンの量は脱感作ミオシンBの約8分の1であった（1/8量トロポミオシン存在下）。

(2) トロポニン量を（脱感作ミオシンBの1/8以下の範囲で）変化させても超沈澱をおこすCa濃度の閾値は変化しなかった。

(3) 調製直後の新鮮ミオシンB超沈澱にはトロポニンを加えても何らの影響も見られなかったが，日数を経た標本で超沈澱能が弱まった場合にはトロポニンによる増強作用がみられた。

(4) トロポニンを構成する三成分のうちトロポニンTにのみ超沈澱増強作用があり，他の二成分については作用を認めなかった（第2図c, d）。これは平滑筋超沈澱に対してトロポニンがCa受容蛋白として関与しているのではないことを示している。

(5) トロポニンTのキモトリプシン処理サブフラグメントのトロポニンT_1とT_2（または$T_{2\alpha}$）のうち後者にのみ増強作用を見出すことができた（第2図f）。トロポニンT_2の増強作用はトロポニン複合体の場合と同じCa濃度範囲でおこることも判明した。

(6) トロポニンT_2（$T_{2\alpha}$）のC末端17残基を除いたフラグメント$T_{2\beta}$は増強作用を示さなかった（第2図f）。

以上の所見は平滑筋ミオシンBの中における骨格筋トロポニンT様因子の存在を示唆するものである。

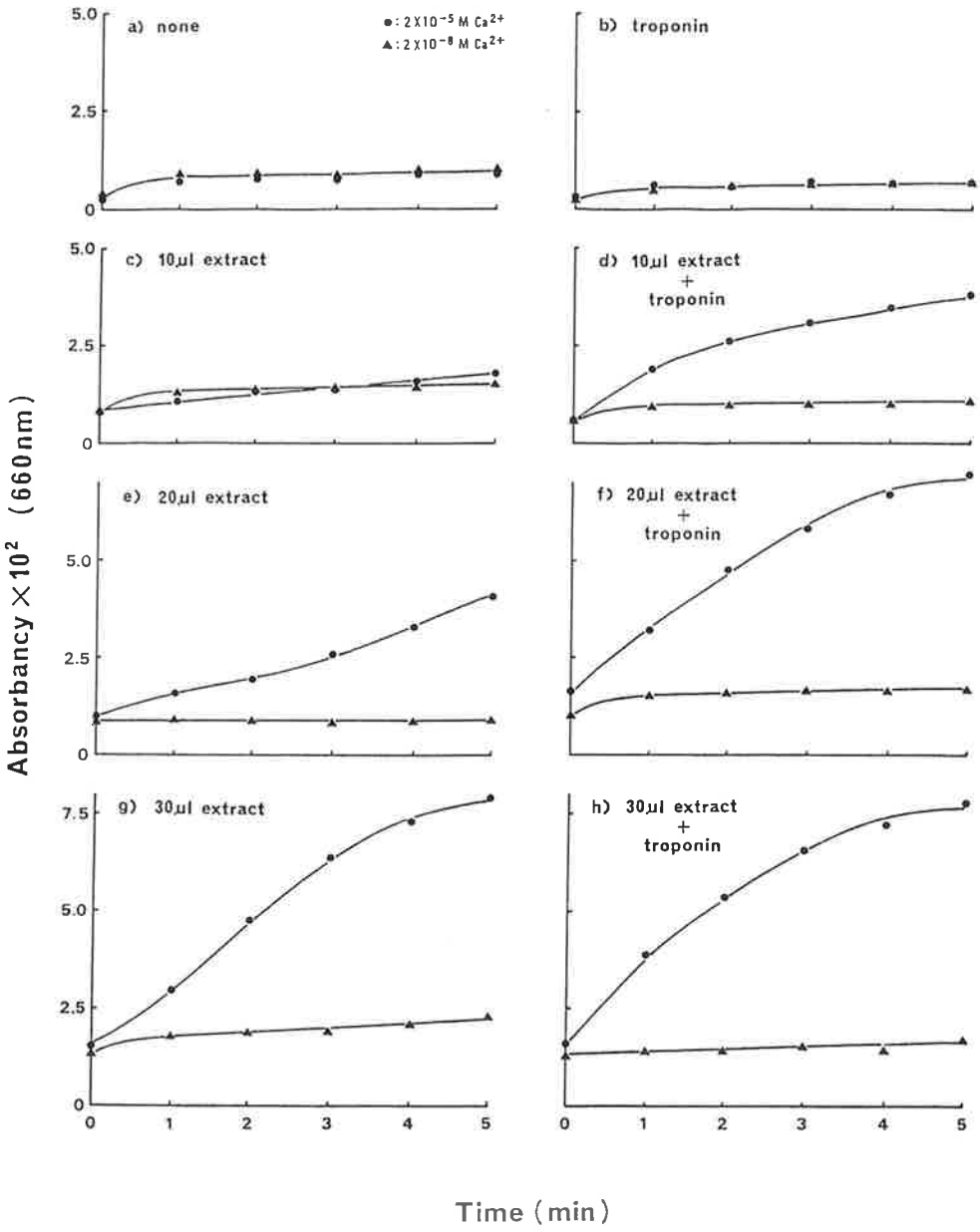


図1．ニワトリ筋胃ミオシンB脱感作標本超沈澱に対するニワトリ筋胃ホモジェネート抽出液およびウサギ骨格筋トロポニンの影響。

ミオシンBの調製，脱感作操作，および超沈澱の測定条件については参考文献に従った。トロポニンは脱感作ミオシンBの1/6量を加えた。

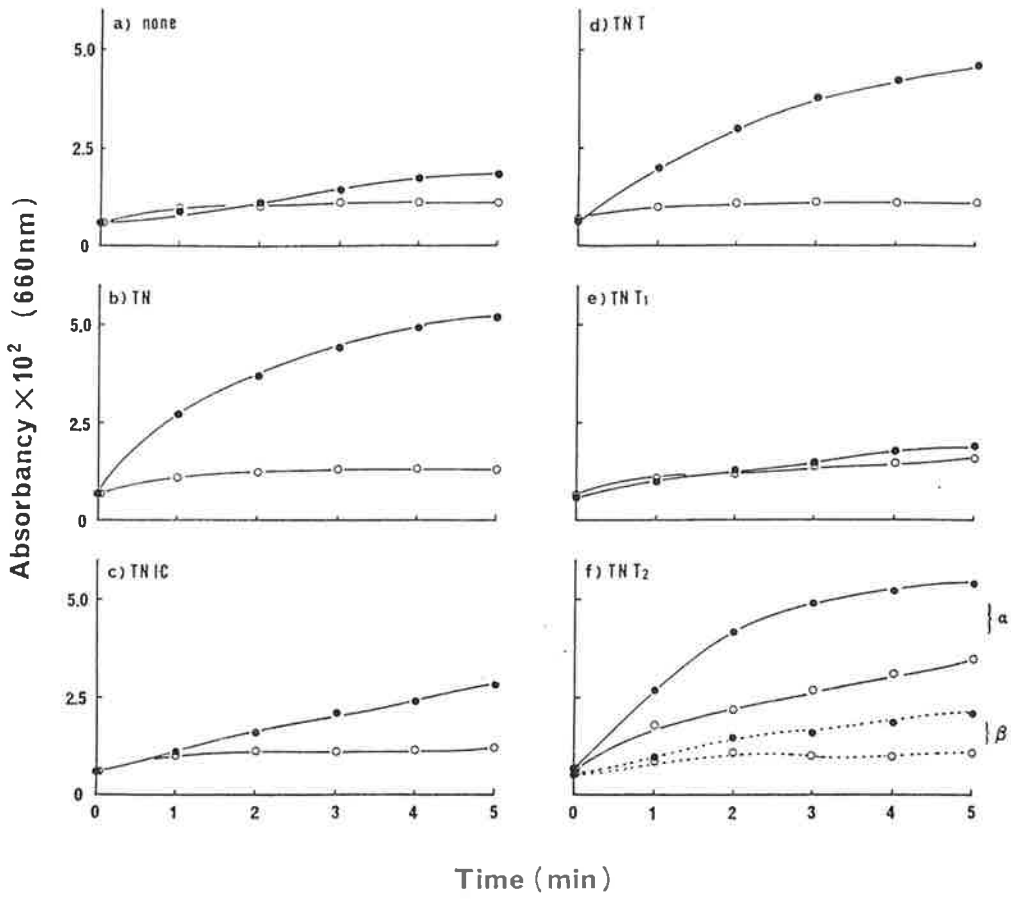


図２．ニワトリ筋胃脱感作ミオシンＢ超沈澱（10 μl 抽出液存在下）に対するトロポニンおよびトロポニン三成分の作用。
　トロポニンはミオシンＢの1/6量を加え，その他の成分はそれぞれトロポニンとの分子量比に応じた量を添加した。

文献

S. Ebashi (1988) Proc. Jpn. Acad. Ser. B **64** 98－101

ミオシン ATPase 反応中間体の構造

田之倉優（東大・理），江橋節郎（生理研）

ミオシンは筋肉の収縮タンパク質であり，そのATPase活性は化学エネルギーを力学エネルギーへ変換する過程において主要な役割を果たしている。ミオシンにおけるエネルギー変換の機序を分子レベルで理解するためには，ATPの加水分解に伴うミオシンの高次構造の変化，とくに反応中間状態におけるミオシンの高次構造を解明することが重要である。本研究では，ミオシンATPase反応中間体における立体構造およびヌクレオチドとの相互作用について，ミクロ環境および相互作用のよいプローブである核磁気共鳴(NMR)法を用いて測定を行った。

ミオシンはウサギ骨格筋から抽出し，キモトリプシン処理によりサブフラグメント1 (S1) を得た。図1Aに，25℃，pH7.0におけるヌクレオチドが存在しないときのS1の400 MHz ^{1}H

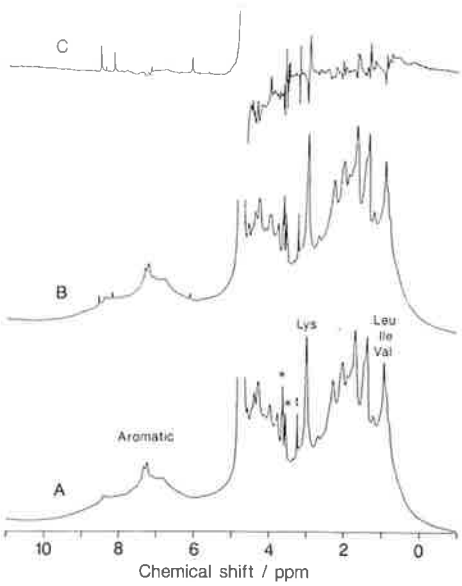


図1．ウサギミオシンS1の25℃, pH7.0における400 MHz ^{1}H NMRスペクトル。測定には，0.49 mM S1, 10 mM DTT, 10 mMりん酸緩衝液(pH7.0)を含む50%重水溶液を用いた。A）0 mM ADP, B）1.0 mM ADP, C）BからAを引いた差スペクトル（縦軸方向に2倍に拡大)。各スペクトルは，2,600回（A）および1,100回（B）の積算によって得られた（60°パルス，1.7秒間隔)。4.8ppmの強いシグナルは水によるもの，また*印をつけたシグナルは混入したグリセリンによるものである。t, Lys, Leu, Ile, Valで示したのはそれぞれ，トリメチルリジンのメチル基プロトン，Lysのϵ $-CH_2$, Leu, Ile, ValのCH_3プロトンによるシグナルである。aromaticは，芳香族アミノ酸の側鎖のシグナル領域を示す。化学シフトはDSSを外部基準として表した。

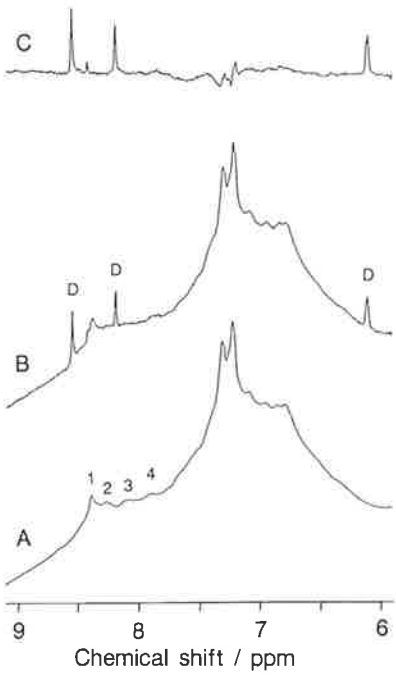


図２．図１Ａ，Ｂ，Ｃのそれぞれの芳香族領域(6－9ppm)を拡大したもの。１，２，３，４で示したのはHisのC_2－プロトン。ＤはADPのアデニン環(8.6および8.2ppm)およびリボースの1'－プロトン(6.1ppm)のシグナルである。

NMRスペクトルを示す。このスペクトルは，線幅の狭いシグナルが重なっている。線幅の広い成分は，分子内部のrigidな構造に由来するもので，中でもmobilityがとくに低い部分のシグナルはベースラインと区別がつかない程度まで線幅が広がっていると考えられる。一方，線幅の狭いシャープなシグナルは部分的にmobilityが高く他との相互作用の少ない部位に由来するもので，主として分子表面の残基によると考えられる。実際，図１Ａにおいてラベルしたトリメチルリジン，ロイシン，イソロイシン，バリンのCH_3プロトンならびにリジンのε－CH_2プロトンによるシグナルは，変性してランダムコイルになったタンパク質中に見いだされるものと化学シフトがほぼ等しいので，分子の他の部分からの影響は少ないと考えられる。図２Ａに芳香族領域だけを拡大したスペクトルを示す。この領域では少なくとも４個のヒスチジン残基のシグナルが区別して観測され，相互作用のよい指標になり得ることを示している。図１Ｂおよび図２Ｂはモル比２倍のADPが共存するときのスペクトルである。また図１Ｃおよび図２Ｃは，ＢからＡを差し引いた差スペクトルである。加えたADPに由来するシグナルが新たに観測される。8.4ppmのシグナルはS1による加水分解で生じたAMPのものと考えられる。ここで観測されたADPは，線幅が狭く遊離のADPに由来すると考えられる。このことは，昨年までの本年報に報告したよ

うに，S1 と ADP とが NMR 的に遅い交換であって，遊離の ADP と S1 に結合した ADP とが ^{31}P NMR で別々に観測されることと一致する。^{1}H NMR では S1 に結合した ADP のシグナルは分子運動が抑えられて線幅が広がり観測されないと考えられ，したがってミオシンのヌクレオチド結合部位は rigid な構造をしているものと推測される。差スペクトルは ADP によって影響を受ける幾つかのシグナルが観測され得ることを示しており，この点については今後の検討課題である。

シナプス小胞の機能に関する神経化学的・分子形態的研究

西江　弘（順天堂大・医・生理）
岡野桂樹（帝京大・医・生理）
小幡邦彦（生理研・神経化学）

神経系において，シナプスでの信号伝達を担っているシナプス小胞 (SVs) の構成成分は，モノクローナル抗体法により急速に解明が進んでいる。我々は，モルモットの大脳皮質から分離精製した SVs を用いてモノクローナル抗体 (Mab) を作製し 4 種の小胞蛋白 (SVP－30, 36, 38, 65) を同定している。分離精製した SVs を用いて，Mab と SVs との免疫反応を電子顕微鏡下で観察した。SVs には，Mab171B5 (SVP－38 に対する Mab) と反応するものと反応しないものがあった。これは，SVs のサイズや形とともに，構成成分の違いにより種々の SVs タイプが識別できる事を示唆している。脳組織の超薄切片の個々のシナプスにおいても，SVs のサイズや形態的な特徴から，異なる数種類のものが含まれている事が明らかになった。

さらに，超高分解能走査型電子顕微鏡（日立社製，SEM S－900 ）を用いて，分離した SVs を無蒸着状態で観察する事に成功した。導電性プレート上に，SVs を分散させた後化学固定し，更にタンニン酸とオスミューム酸による処理を施した。真空ポンプ中で乾燥するか，或は臨界点乾燥した後電顕観察し写真撮影した。加速電圧は 5kV－20kV が適当であった。無蒸着条件下で，超高倍率での観察により，小胞膜にチャネル様構造が存在することを明らかにした。また，小胞膜表面にはそれ以外に微細な突起状構造も認められた。シナプス伝達に際して，活性帯部位の極く近傍に存在する SVs だけが直接関与すると考えられている。そして，SVs はシナプス前線維末端において，ニューロフィラメントと結合している事が知られている。これらの事を考え合わせて，小胞膜の突起状構造やチャネル様構造がシナプス伝達に関わっていると推測される。

我々は，Mab171B5 を用いて免疫組織学的に，脳の発生に伴うシナプス形成の変化を検索したり，無神経節腸管での神経叢や平滑筋のシナプス形成の欠如の解明にも成功している。これは，種々の組織におけるシナプス形成の検索に関する新しい方法を提供するものである。急速凍結した試料から，厚さ 4 μM の切片を作成しコーティングしたスライドガラス上に張り付け，それに一次抗体を作用させた後さらに FITC ラベルした二次抗体を反応させた。この様に免疫組織的に

反応させた切片試料を，蛍光顕微鏡下で観察してシナプスの局在を調べる事が出来た。Mab171B5等のモノクローナル抗体をシナプス前部に注入する実験も試みている。抗体注入により，シナプス伝達が抑制される傾向が電気生理学的に認められたが，この事は，小胞蛋白であるSVP－38がシナプス伝達に関与している事を示唆していて，たいへん興味深い。

神経特異的C系列ガングリオシドの同定と精製

小幡邦彦（生理研）
安藤　進（東京都老人研）
平林義雄（静岡県立大・薬）
五十嵐道弘（群馬大・医）

ガングリオシドは脳に多い糖脂質で多くの種類があるが，哺乳類鳥類で知られていたものはすべてA系列，B系列に属するものである。安藤らは魚類（タラ）脳のガングリオシドを分析してC系列（T3, T2, T1c, Q1c, P1c等）と分類できるものが大量存在することを発見した。小幡はニワトリ初期胚の神経組織に結合するモノクローナル抗体を作製し，平林，安藤の協力によりそのうち2種はC系列ガングリオシドの異なるエピトープを認識することを明らかにした。これらの特異抗体を用いた高感度測定法により，哺乳類，鳥類でも発生過程の神経組織にはC系列ガングリオシドが存在することを見出した。五十嵐らが胎児脳を分画して解析したところ，C系列は特に成長円錐に集積していることはなく，細胞表面に均等に存在していると考えられた。さらに，培養したニューロブラストーマからの突起伸長に対し，Q1cやC系列混合物が強力な促進作用を持つことを見出した。すなわちC系列のうち未同定の微量成分が最も有効と考えられる。

培養神経細胞での作用機構の研究や動物脳内での神経再生に対する効果を検討するには多量の精製標品が必要である。本研究では10日ニワトリ胚1000羽分の胚全体または摘出脳からのC系列ガングリオシド精製を企てた。

9.5kgのニワトリ胚をアセトン中でホモゲナイズし，残渣をC/M系で抽出した。29.7ℓの抽出液をDEAE－Sephadexカラム（27φ×37.5cm）11の画分に分け，画分6，7，8をQAE－Toyopearlカラム（1.5φ×29cm）で分けた。そのピーク4をAmido 80カラム（6φ×200mm）にかけ，GT3 10.86mgが精製された。現在，他の成分についても精製中である。またニワトリ胚とはC系列の組成がかなり異なるタラからもC系列ガングリオシドを精製中である。

棘皮動物の系統発生に関する研究

雨宮昭南（東大・理）
鈴木　理，小幡邦彦（生理研）

フクロウニ類は，柔軟な殻を有し，原始的な形質を残すとされ，系統発生学上重要な位置を占めるウニである。このウニ類の発生については，イイジマフクロウニ *(Asthenosoma ijimai)* のみ報告があり，大型の卵（直径1.2㎜）を持つこの種の発生様式は，通常型のウニとは著しく異なり，幼生型形質の発現の多くを省略して，いきなり成体型形質の発現を行う直接発生型である。

近年，個体発生と系統発生との並行性を論ずる上で，発生におけるタイミングを調節するメカニズムに関心が向けられるようになってきた。プルテウス幼生期が長い通常型ウニにおいては，プルテウス形成に係わる遺伝子発現と，変態して成体型形質をつくる遺伝子発現とは，厳密にリンクしていると考えられるが，フクロウニ類においては，これらの遺伝子発現の間に解離が生じ，プルテウス形成に係わる大部分の遺伝子発現が削除され，成体型形質に係わる遺伝子発現が促進されていると予想される。*A. ijimai* と共に日本近海特産とされるカシパン類の１種 *Peronella japonica* は，直径0.3㎜の卵を生み，その発生様式は，小型の卵（直径0.1㎜）を産む通常型ウニの示す間接発生と，フクロウニ類の示す直接発生の中間型である。

本共同研究では，異なる発生様式をとる４種のウニ（上記２種のウニ，及び，通常型発生様式をとる，*Pseudocentrotus depressus, Astriclypeus manni*）を用い，それらの間で各形質の発現にタイミングの変化が生じているか否か調べた。用いた形質のマーカーは，分子マーカーとしてコラーゲンと骨片形成タンパク質 msp－130，形態的マーカーとして間充織細胞の出現の時期をとり，以下の知見を得た。

１）分子マーカーの発現順序は，コラーゲン（透明層），msp－130，コラーゲン（基底層）の順で，４種のウニの間で発現の順序に変化はみられない。２）*A. ijimai* では，間充織細胞の出現から msp－130 の発現までに著しい遅延（20時間以上）があるが，他の３種のウニでは第１次間充織細胞の胞胚腔内への移入直後から msp－130 は発現する。３）*P. depressus, A. manni, P. japonica* では，コラーゲンの発現は，透明層においては卵割期に，基底層においては胞胚期にみられるが，*A. ijimai* では，透明層においてはのう胚期直前，基底層においては変態開始期にみられる。

以上の結果から，発生様式の異なるウニの間での形質発現のタイミングは，直接発生型の *A. ijimai* と，他の３種のウニ，すなわち，中間型の *P. japonica*，及び，通常型の *P. depressus* と *A. manni* の間で，著しく変化していることが認められ，この事は，幼生型と成体型の遺伝子発現の解離が，直接発生型の進化する過程で，生じた事を示唆する。

分泌・吸収機能と高エネルギーりん酸化合物動態の同時測定

菅野富夫（北大・獣医）
亘　　弘，村上政隆（生理研）
松本武久（宇宙開発事業団）

分泌吸収機能は，ATPの代謝エネルギーによって維持されている。膵外分泌腺房細胞では，ATPの大部分はミトコンドリアにおける酸化的りん酸化によって産生され，分泌時のATP消費の主役は，一次能動輸送系であるNa, K-ATPaseである。この一次能動輸送系に種々の二次能動輸送系が連動して電解質分泌（輸送）が進行し，それに連動して［Ca^{2+}］$_i$依存性の酵素原果粒開口放出が起こる。腺房細胞を，生理的（低）濃度(5～20pM)のコレシストキニン(CCK)で持続的に刺激し分泌反応（消化酵素・酵素原放出と膵液の分泌）が持続しているときには，^{31}P核磁気共鳴装置(NMR)によって検出される細胞内ATP量はほとんど変化しないことをこれまで報告してきている。この結果は，生理的濃度のCCK刺激による分泌反応時には，ATPの産生と消費がよくバランスしていることを示している。このことは，これまで報告したように，生理的濃度のCCKで持続的に刺激したときの分泌反応の持続時にはチトクローム酸化還元状態の変化が記録できないという結果ともよく相応している。

今年度は，CCKおよびアセチルコリン(ACh)の濃度を薬理的あるいは病理的にまで高めたときにみられる分泌反応とエネルギー動態との解乖について報告する。ラット摘出膵潅流標本を100pM CCK-8（薬理的濃度）で持続的に刺激すると，外分泌反応は最大になり，膵組織中の無機りんの量が有意に増大するが，ATPとクレアチンりん酸の量は変化しなかった。さらにCCK-8の濃度を1nM（病理的濃度）に高めて標本を持続的に刺激すると，分泌反応は小さくなり，ATP量は減少し，無機りん量は増加するが，クレアチンりん酸量は増加傾向を示した。ACh濃度を高めたときにも，CCK-8高濃度刺激時と同様の変化が見られた。

これらの結果は，分泌刺激濃度を薬理的および病理的にまで高めると，ATP分解を極度に促進し，そのATP需要が大きすぎてクレアチンりん酸の細胞内転送が追付かない状態になることを示している。ここに，分泌反応とエネルギー産生・転送系との解乖が起こることになる。

ANISOTROPIC DYNAMICS IN ORIENTED LIPID MULTIBILAYER REVEALED BY VECTOR EPR SPECTROSCOPY

Yuhei SHIMOYAMA (Hokkaido Univ. of Education)
Hiroshi WATARI (Natl. Inst. for Physiological Sciences)

ABSTRACT Vector electron paramagnetic resonance spetroscopy (V-EPR) was successfully applied on the oriented lipid multibilayer to explore anisotropic dynamics of fluctuations in the multibilayer at slow motional domain. V-EPR analyzed accurately the slow anisotropic motions in gel phase. Anisotropic structure in correlation times of molecular fluctuation was found for the first time in the oriented lipid membranes, indicating that the anisotropy exists in both the magnitude as well as the time constant of the lipid motion. Axial rotation is more dominant than wobbling in the gel phase of multibilayer membranes.

Introduction : Spin labeling method with electron paramagnetic resonance (EPR) has been widely utilized to detect dynamic structure in lipid membranes[1]. Time scale of molecular motion in biomembranes ranges from 10^{-3} to 10^{-11} sec. However, fluctuation in the gel phase of lipid membranes can not be analyzed by the conventional EPR method, because the time range ($10^{-3}-10^{-7}$ sec) is much slower than the rigid limit[2]. Saturation transfer (ST) EPR has been developed to explore such slow motion of lipid ensemble at the gel phase[2]. Recently, we have shown that an integrated value of an ST-ESR signal changes in a sinusoidal manner and hence can be treated as a vector[3,4]. Using the vector EPR (VST-EPR), we could evaluate reliable rotational correlation times. In the present communication, we will report on an evidence of anisotropy in the correlation times of the lipid motion in oriented multibilayers by the integrated value and further discuss on the dynamic structure of the lipid membranes.

Experimental : Lipids used in this study were dimyristoyl phosphatidyl-choline (DMPC), and cholesterol which was added with 5 and 10 M% ratios. A spin label of 3-spiro-doxyl-5-cholestane (CSL) was mixed into the above mixture at 0.5 M%. An oriented multibilayer film was prepared by deposition of the mixed solution on a quartz plate (3×10mm) and evaporation under a wet nitrogen gas stream at a temperature just above the gel-liquid crystalline transition point. All the VST-EPR spectra were measured at the second harmonic absorption display (V_2) modulated by 50 kHz and demodulated by 100 kHz. The high-power phase maximum method [cf. Ref. 4] was used to determine the 90 degree out of phase display (V_2'). Correlation times of molecular motion were determined using the calibration curve of the integrated value vs. correlation time[5].

Results and Discussion : ST-EPR spectra of oriented multibilayer of DMPC containing 0, 5 and 10 M% of cholesterol were recorded with the magnetic field perpendicular and parallel to the mult-

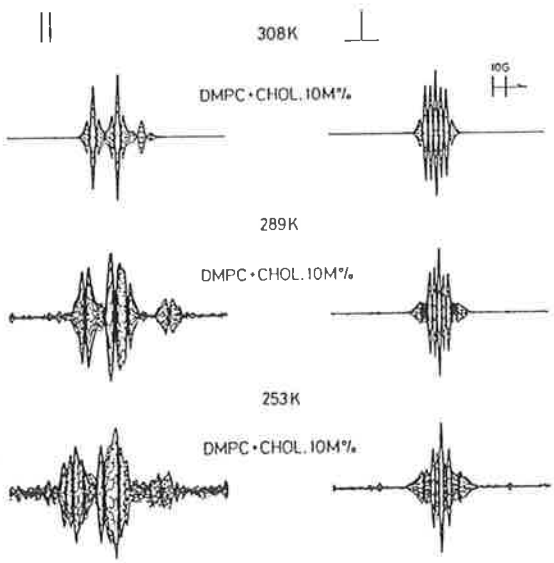


Fig. 1 V-EPR spectra DMPC-CSL multibilayer membranes recorded at second harmonics and at various phase.

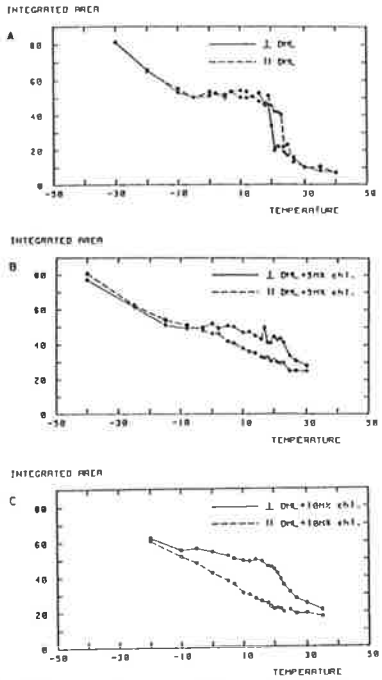


Fig. 2 Temperature variation of integrated value as evaluated by single integration of V_2.

ibilayer film surface (Fig. 1). The integrated value was also shown at various magnetic field. At the high microwave power, however, the integrated spectra can not be transformed to the V_1 signal and possesses a significant residue at the end of field sweep. For the DMPC multibilayer in absence of cholesterol, approximately three phases and one phase transition were detected at each direction (Fig. 2A). The integrated values are almost identical at all phases except the phase transition region i. e. 292 K to 296 K where the anisotropy was found. This indicates that the onset of tilt motion occurs prior to the long axis rotation[6]. In the case of 10 M% of cholesterol, the integrated value of perpendicular direction is larger than that of parallel direction at temperatures of the gel phase (Fig. 2C). The maximum difference was observed at a temperature of the gel phase just below the phase transition region where the perpendicular value is two times larger than the parallel one. Such anisotropy tends to converge at both low and high temperature regions. Using the calibration curve, we determined the characteristic time of wobbling motion of lipid molecule in the oriented multibilayer to be 10^{-3} to 10^{-6} sec and that of the axial rotation to be 10^{-6} to 10^{-9} sec[5].

The temperature variations of the DMPC multibilayers both with and without of cholesterol (Fig. 2B and C) indicates that an anisotropic structure exists in the correlation time of lipid motion. This is a clear evidence that the addition of cholesterol influences not only the molecular order

but the correlation time of the lipid ensemble. The variation of the integrated value shows that axial rotation is dominant over wobbling in the gel phase of multibilayer membranes.

Acknowledgment : This work was partly supported by Grant-in-Aide (NO 61850001) of the Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

References

(1) H. M. McConnell, in Spin Labeling ; Theory and Applications, L. J. Berliner, Ed. (Academic Press, New York) p. 525 (1976).

(2) D. Thomas, L. Dalton and J. Hyde, J. Chem. Phys. 65, 3006 (1976).

(3) Y. Shimoyama and H. Watari, Appl. Spectrosc. 39, 170 (1985).

(4) Y. Shimoyama and H. Watari, J. Chem. Phys. 84, 3688 (1986).

(5) Y. Shimoyama and H. Watari, Membranes 12, 40 (1987).

(6) M. Janiak, D. Small and G. Shipley, Biochemistry 15, 4575 (1976).

^{1}H−NMR による血漿アルブミン分子の構造転移と MOLECULAR AGING および水構造の研究

曽我美勝，恵良聖一，桑田一夫(岐阜大・医・第２生理)
松波謙一，植木俊介（岐阜大・医・反射研）
松永隆信，武内章二，佐藤真司（岐阜大・医・整外）
亘　　弘（生理研）

ウシ血漿アルブミン (BPA), ウシメルカプトアルブミン (BMA) は酸性 pH 域において N → F 転移 (pH4.45 → 3.75), 酸膨潤 (acid expansion, F → E 転移 ; pH3.60 → 2.80) なる二段階構造転移を示す。また中性～アルカリ pH 域では N → B 転移 (pH7.0 → 9.0) 及び分子内 SH, S−S 交換反応（Molecular aging, N−A 異性化反応）を示す。1989年，ヒト血清アルブミン (HSA) の X 線解析の結果が報告され，結晶状態での HSA の構造が明らかにされた。今回は HSA の各構造転移における異性体（N，F，E，B型）の構造について BPA (BMA) と比較研究した。

360 MHz ^{1}H−NMR を用いて Akasaka (1981, 1983) によるインバージョン・リカバリー法にて分子内交差緩和時間（T_{IS}； f_2 照射，−2.45, 4.36, 4.72, 7.13 または 8.65 p. p. m. を $\gamma H_2/2\pi$，20～107 Hz）を測定し，さらにスピン・エコー・^{1}H−NMR スペクトル（$[\pi/2-(\tau-\pi-\tau)_n]$ スピン・エコー・パルス系列，τ＝0.001秒，n＝5 または10（0.010秒または0.020秒 CPMG スペクトル））を測定した。

1．N → F 転移，F → E 転移：CD 測定による α −ヘリックス含量（$f(\alpha)$）は BMA の場合

表1．CROSS－RELAXATION TIMES (T_{IS}) OF HUMAN SERUM ALBUMIN IN 0.10 M Cl^- IN ACIDIC REGION

pD	f_2 (p. p. m.)	$\gamma H_2/2\pi$ (Hz)	T_{IS} (SEC) $-CH_3$	LYS	AROM
5.02(N)	8.65	107	0.63	0.71	0.91
3.74(F)	8.65	107	0.93	1.06	1.12
2.97(E)	8.65	107	1.22	1.33	1.82
5.02(N)	7.13	69	0.52	0.47	
3.74(F)	7.13	69	0.92	1.18	
2.97(E)	7.13	69	1.06	1.25	
5.02(N)	4.72	20			
3.74(F)	4.72	20			
2.97(E)	4.72	20			
5.02(N)	4.36	20	0.64	0.59	0.87
3.74(F)	4.36	20	0.79	0.94	1.59
2.97(E)	4.36	20	1.00	1.24	1.56
5.02(N)	−2.45	107	0.63	0.73	0.95
3.74(F)	−2.45	107	1.02	1.18	2.00
2.97(E)	−2.45	107	1.32	1.54	2.13

N→F転移で0.68→0.58，F→E転移で0.58→0.48と明瞭な二段階減少を示したが，HSA ではN→F転移で0.70→0.55，F→E転移で0.55→0.52と，f（α）はN→F転移で大幅な減少を示した。また分子の「固さ，rigidity」の変化を見るために表1に示すように T_{IS}を測定した。HSA も BPA 同様N→F→E型と構造が変化するにつれ T_{IS}値は長くなった。この結果はN→F，F→E転移により，HSA 分子の固さが減少し，側鎖，セグメント等の動きが増加することを示唆している。0.010秒，0.020秒 CPMG スペクトルも T_{IS}値の増加に対応して側鎖の動きの増加を示した。

2．N→B転移：HSA のN型，B型のf（α），f（β）は0.10 M NaCl 中ではそれぞれ（0.68, 0.15），（0.67, 0.15）であった。イオン強度（μ）～0の場合はそれぞれ（0.69, 0.15），（0.64, 0.18）となり，N→B転移における二次構造変化については HSA, BPA は差を示さなかった。−2.45, 4.36, 4.72, 7.03, 7.13p. p. m. を 20～107 Hz で f_2照射した際の分子内 T_{IS}値を表2に示す。μ～0の場合，HSA のN型，B型における T_{IS}値は BPA 同様，変化は見られなかったがμ＝0.10の場合，BPA のB型の T_{IS}値は増加したが HSA のB型の T_{IS}値は増加しなかった。0.010秒 CPMG スペクトル（図1）も T_{IS}値の変化に対応していた。即ち，μ～0の場合，BPA はN→B転移により分子の固さが減少したが，HSA では減少しなかった。

表2. CROSS−RELAXATION TIMES (T_{IS}) OF HUMAN SERUM ALBUMIN IN ALKALINE REGION

pD	SALT (M)	f_2 (p. p. m.)	$\gamma H_2/2\pi$ (Hz)	T_{IS} (SEC) −CH_3	T_{IS} (SEC) LYS	T_{IS} (SEC) AROM
7.33(N)	0.10	7.13	69	0.54	0.57	
9.41(B)	0.10	7.13	69	0.75	0.70	
7.33(N)	0.10	7.03	69	0.52	0.53	
9.42(B)	0.10	7.03	69	0.55	0.53	
7.33(N)	0.10	4.72	20	1.59	1.64	1.70
9.41(B)	0.10	4.72	20	1.49	1.47	1.67
7.33(N)	0.10	4.36	20	0.77	0.71	0.85
9.41(B)	0.10	4.36	20	0.74	0.71	1.00
7.33(N)	0.10	0.40	39	0.44	0.46	0.60
9.41(B)	0.10	0.40	39	0.41	0.54	0.48
7.33(N)	0.10	−2.45	107	0.78	0.73	0.78
9.41(B)	0.10	−2.45	107	0.73	0.78	0.81
7.31(N)	~0	7.13	69	0.69	0.66	
9.42(B)	~0	7.13	69	0.78	0.94	
7.31(N)	~0	7.03	69	0.57	0.56	
9.42(B)	~0	7.03	69	0.55	0.60	
7.31(N)	~0	4.72	20	1.18	1.14	1.37
9.42(B)	~0	4.72	20	1.28	1.45	1.49
7.31(N)	~0	4.36	20	0.71	0.62	0.82
9.42(B)	~0	4.36	20	0.73	0.69	0.92
7.31(N)	~0	−2.45	107	0.63	0.52	0.66
9.42(B)	~0	−2.45	107	0.60	0.49	0.58

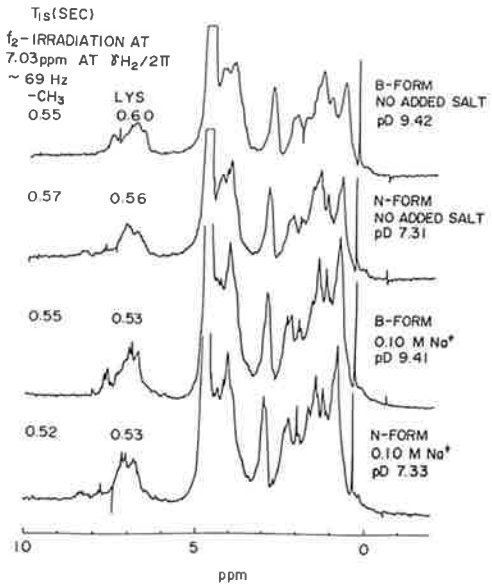


図1 0.010 SEC CPMG SPECTRA N-B TRANSITION (HSA)

核磁気共鳴法による各種脳病変の検出と脳内水構造の研究

山田　弘，岩間　亨，坂井　昇，安藤　隆（岐阜大・医・脳神経外科）
桑田一夫，曽我美勝（岐阜大・医・第2生理）
亘　　弘（生理研）

これまでにわれわれは蛋白質分子を f_2 照射することにより得られる蛋白質から水への分子間交差緩和時間（T_{1S}）が，浮腫脳組織や，脳卒中易発症ラット (Stroke-prone spontaneously hypertensive rat ; SHRSP) 脳組織の週齢による水構造変化を，水分子の縦緩和時間 (T_1) や，組織の含水量，ナトリウム濃度，カリウム濃度より鋭敏に反映することを見いだした。今回，SHRSP の両側総頚動脈結紮 (Bilateral common carotid artery occlusion ; BCAO) モデルを用い，脳虚血後早期の脳組織水構造変化を検討した。

近畿大学第1病理学教室より供与を受け，当教室にて繁殖させた10－22週齢の雌雄 SHRSP 及び大塚製薬徳島研究所より提供を受けた16－18週齢の雄 SHRSP を実験に用いた。エーテル麻酔下にラットの頚部正中切開を行い，両側の総頚動脈を剝離してナイロン糸を掛けた後創を閉じた。NMR 測定当日，エーテル浅麻酔下に BCAO を行い，BCAO 後，30分，60分，120分，180分の各時点で無麻酔下に断頭後，速やかに脳を取り出し，大脳皮質約90%，白質約10%からなる脳組織を内容積 75 μl の microcapillary に充填し，内径 1.1 mm の NMR 用ガラス毛細管に入れた後，スペーサーを用いて DMSO-d_6 を入れた 5.0 mm ϕ NMR 用試料管に挿入し，25℃にて 360 MHz FT-NMR を用いて緩和時間測定を行った。T_1 は inversion recovery 法，T_{1S}は Akasaka に従い，蛋白質の芳香族側鎖にあたる 7.13 p. p. m. を $\gamma H_2/2\pi \sim 69$ Hz で f_2 照射しながら inversion recovery 法を用いて見かけの縦緩和時間 T_1* を求め，この T_1* と T_1 とから T_{1S} を計算した。

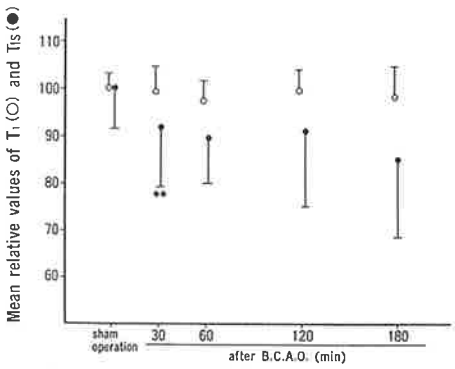


Fig. 1 Changes in mean relative values and standard deviations (bars) of T_1 (○) and T_{1S} (●) for water in the ischemic SHRSP brain tissues after B. C. A. O..

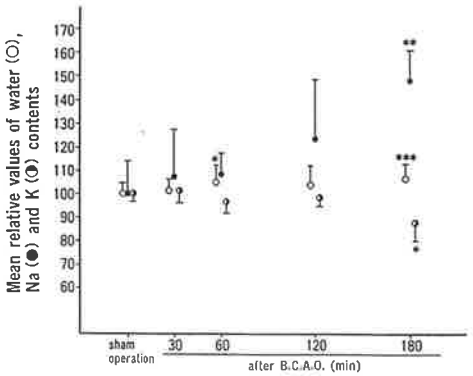


Fig. 2 Changes in mean relative values and standard deviations (bars) of water (○), Na (●) and K (◑) contents for the isctemic SHRSP brain tissues after B. C. A. O..

また，試料は湿重量を求めた後，110℃にて24時間乾燥し乾燥重量を測定した。乾燥重量測定後の試料を湿式灰化し，炎光光度法にて組織ナトリウム，カリウム濃度を測定した。コントロールには，sham-operationを施行したSHRSPを用いた。

昨年報告した如く，週齢によりSHRSPの脳組織の緩和時間は異なるため，BCAO後の各値は週齢及び繁殖施設の一致したコントロール群の平均値を100とした相対値に換算し，虚血後の変化を検討した。BCAO後，180分までT_1の相対値（Fig. 1, ○）に変化は認められなかった。一方，蛋白質分子から水分子へのスピン拡散速度の指標となるT_{1S}の相対値（Fig. 1, ●）は，BCAO後30分の時点よりコントロールに比し統計学的に有意な短縮を認め（＊＊，$P<0.01$），以後180分まで徐々に短縮した。組織の含水量の相対値（Fig. 2, ○）はBCAO後60分（＊，$P<0.05$），180分（＊＊＊，$P<0.001$）で有意な増加を認め，組織ナトリウム（Fig. 2, ●），組織カリウム濃度（Fig. 2, ○）の相対値はBCAO後180分の時点でそれぞれ有意な増加（＊＊，$P<0.01$）及び減少（＊，$P<0.05$）を示した。

以上，虚血に伴う脳組織水構造の変化は，T_{1S}値の短縮として最も早期に捉えられることができた。

核磁気共鳴による病変検出のための基礎的研究

加藤一夫，森　秀樹（岐阜大・医・第1病理）
曽我美勝，桑田一夫（岐阜大・医・第2生理）
山口　弘（生理研）

従来，多くのグループより腫瘍組織の水の縦緩和時間（T_1），横緩和時間（T_2）が長いことが報告され，その機構について含水量の変化，水構造の変化等の諸説がある。筆者らはラット正常肝組織と肝腫瘍の水のT_1，飽和移動法による蛋白質より水への交差緩和時間（T_{1S}）を測定し，腫瘍組織のT_1，特にT_{1S}が正常肝組織に比べ延長することを報告した。今回はインバージョン・リカバリー法により蛋白質より水へのT_{1S}を測定した。

動物は3カ月齢の雌ACI/Nラットを用い，正常肝組織，肝発癌物質N-2-fluorenylacetamideにより誘発され，継代皮下移植された肝癌，肝発癌物質ジエチルニトロサミン投与した肝臓について，T_1，蛋白質より水へのT_{1S}（f_2照射，7.13 p. p. m.：$\gamma H_2/2\pi \sim 69$ Hz）を360 MHz ^{1}H－NMRを用いて測定した。正常肝および発癌物質投与肝はリンゲル液で灌流脱血後，腫瘍は変性・壊死の少ない部分を，毛細管に採取して内径1.1 mmのNMR試料管にいれ，その周囲にロック用重水素化DMSOを満たして測定に供した。

T_1，T_{1S}とも腫瘍では正常肝に比して延長しており，T_{1S}ではT_1より大きな差が見られ，飽和移動法により測定されたT_{1S}とT_1との差とほぼ同様の差がみられた。

ウシ血漿アルブミンの溶液について，インバージョン・リカバリー法によるT_{IS}の測定では，一般に飽和移動法によるT_{IS}測定値より長い値が観察されている。肝腫瘍，肝ホモジネートについてT_{IS}の逆数を乾燥重量（％）に対してプロットし，乾燥重量＝０％に外挿すると，T_{IS}の逆数は０になり，飽和移動法よりインバージョン・リカバリー法によるT_{IS}値が正確なことがわかった。

ジエチルニトロサミン投与約50時間の肝臓では，50 mg/kg 体重 i. p. (n＝3) のT_1＝0.94±0.088（秒），T_{IS}＝0.67±0.15（秒），乾燥重量（％）＝26.6±2.10，100 mg/kg 体重 i. p. (n＝3) のT_1＝1.03±0.085（秒），T_{IS}＝0.79±0.12（秒），乾燥重量（％）＝23.9±0.74であり，正常肝とほぼ同様であった。ジエチルニトロサミンによる肝細胞の変化は非常に小さく，細胞内水構造の変化としては観察されないのだろう。三分の二部分肝切除後の再生肝ではT_{IS}の延長が認められているので，今回の投与量では肝の再生性変化は少なく，また再生をひきおこす細胞壊死もほとんどおこっていないことが示唆された。

分泌時の唾液腺細胞の容積変化のシステム論的研究

今井雄介，中張隆司，宮本　学，吉田秀世，相馬義郎（大阪医大・生理Ⅰ）
村上政隆，瀬尾芳輝（生理研・超微小）

腺細胞を形態学的に見るとき細胞膜には張力はないように見える。しかし唾液腺細胞は静止，分泌両定常状態で一定の細胞容積を維持している。我々は腺細胞が分泌時に収縮すること，刺激中は一定の容積を維持すること，さらに刺激停止により回復することを報告してきた。今回は，刺激時，非刺激時に係わらず腺細胞が一定条件で一定容積を維持する仮説を検討したので報告する。ここで仮説とは“このように考えたらどうだろう”という一つの提案である。

膜に張力がないということは膜を介して静水圧差がないことであり，静水圧差はないということは細胞で膜を介する実効的な浸透圧差がないこと，すなわち細胞内液は定常状態で外液と実効的に等張であることを意味する。

今回の実験は腺細胞が高張 Ringer 液潅流時に収縮することをインピーダンス法で測定した。高張 Ringer 液は 300mOsm Ringer 液に 100mM の蔗糖を加えたものである。結果は予想どうりで，高張液潅流時に，腺細胞が収縮したが，二つの点で興味のある実験結果となった。一つは浸透圧が３分の４倍になっているのに，容積は４分の３倍にまで収縮しないこと，今一つは安定な容積に急速に落ち着くことであった。第一の理由は腺細胞容積は水のみからなるものでなく，細胞内固形成分が含まれることによるものであるとみられる。

第二の安定な容積に急速に落ち着くことについては興味がある。実効的に等張である細胞容積が安定なことは外液を高張液にしているので，細胞膜イオン輸送機構に変化をきたし，内液も高

張液になっていると仮定できる。今回この調節機構を入れた回路モデルのシミュレーションにより検討した。

定常状態で細胞内液が等張であるということは，細胞内のイオン総量が一定に維持されていて，定常的な容積が保たれているということである。各イオンの輸送は各々インプットとアウトプット機構からなるが，Na については，受動的な電気化学拡散と，Na-K-2Cl 共輸送で入り，能動的な Na-K ポンプで出ていく。K については共輸送と能動輸送で入り，受動拡散で出ていく。Cl については共輸送で入り，受動拡散で出ていく。すなわち定常的な流れがあって細胞内各イオン量が決り，イオン総量が維持され，結果として容積が決ると見られる。

シミュレーション可能な回路モデルは，輸送を制御する膜の回路と輸送によりポテンシャルの変化する細胞内溶液区画の回路で表現できる。ことに細胞容積に依存した情報を K および Cl コンダクターに送るとするモデルとした。すなわち容積が大きくなればイオン透過性も上昇し，容積が小さくなればイオン透過性が減少するとした。容積変化率に対する透過性変化率の比を α と置き，それを変えてシミュレートした。

シミュレーション結果は容積変化率に対する透過性変化率の比 α を 3，すなわち容積が10％変化すると透過性は30％変化するとした場合，実験結果と一致する安定な容積に急速に落ち着く挙動が見られた。かつこのシミュレーション時には総イオン量に変化はない。実験的に腺細胞がこのような高浸透圧ショックによる収縮時にイオン総量を変化させないという結果は生理研の村上が NMR で見いだしている。

α を 0，すなわち容積が変化しても透過性に変化がないとした場合のシミュレーションでは，細胞容積は徐々に変化して行き，またイオン総量も減少して行き実験結果と異なるものになる。

容積が減少すると K と Cl の透過性が減少するとしたこのモデルシミュレーションでは，透過性変化で K と Cl のインプットとアウトプットがバランスし，イオン総量の変化がなく，安定な容積に落ち着くという結果となる。

結論として容積が変化すればイオン透過性が変化し，その結果容積が伴うとする仮説は，多くの研究者がすでに考えていることであるが，今回の高浸透圧ショックの唾液腺細胞にも当てはめることができると考えた。

分泌時細胞容積変化と細胞間連絡

菅野義信，柴　芳樹，佐々木康人（広島大・歯）
中張隆司，今井雄介（大阪医大）
村上政隆（生理研）

唾液腺細胞はコリナージックな刺激により，大量の水電解質の分泌を起こす。このとき細胞間連絡が抑制されるが，機構の詳細は明かでない。一方，潅流顎下腺実験系においてインピーダンス法により，分泌時には細胞容積が縮小することが見出された。この細胞の縮小と細胞間連絡の抑制には何らかの関係があると想定される。しかし，分離浮遊腺房系で，この縮小が起こるか否かは未だ定かでない。本研究は，分離浮遊腺房系において細胞容積が変化するか否かを測定し，同一系での gap-junction の連絡を定量化し，分泌制御と細胞間連絡の関連を明かにする目的で行われた。

〔方法〕

(1) ラット顎下腺腺房系の調整；Wistar-Hamamatsu, male rat を用い collagenase 処理により，分離腺腺房系標本を作製した。0.1%collagenase (type I, Sigma) 中で裁断し，37°C 20min 撹拌後，digest されていない細胞群を filter (150, 70um) で除去し，細胞は 3 回 modified Krebs solution にて洗浄し，poly-L-lysine でコートした培養器 (37°C) に移した。modified Krebs solution の組成 (mM) は，NaCl 103, KCl 4.7, $CaCl_2$ 2.56, $MgCl_2$ 1.13, $NaHCO_3$ 25, NaH_2PO_4 1.15, glucose 2.8, sodium pyruvate 4.9, sodium fumarate 2.7, sodium glutamate 4.9. 95% O_2, 5% CO_2 混合ガスで飽和し HEPES 12.5mM で pH7.4 に調整した。alubmin 2% を溶かし，cell damage を低減した。

(2) 分泌時腺房系の細胞容積測定；分離した腺房系は倒立顕微鏡ステージ上のチャンバー内で表面潅流した。干渉顕微鏡を video-enhenced contrast system (C1966, Hamamatsu Photonics) に接続し，4 frame の積算を表示するとともに VHS video recorder にて記録した。10秒ごとの video printer 出力を画像解析した。初期画像の腺房の長径，短径を測定し，つづく10秒ごとの画像において初期画像の長径，短径に対応する径を測定した。長径／短径はほぼ一定の値になった。容積の変化はこれらの径の初期値との比を 3 乗して，静止時に対する比容積として表した。

(3) 細胞間連絡の測定；5－7個の腺房細胞からなるクラスターを対象にし，10% Lucifer Yellow (m. w.＝457.3, Sigma, in 1M LiCl) を pneumatic pump module (PPM-2, Medical Systems) を用い，N_2 ガス圧により細胞内に注入し，隣接細胞への拡散を指標に出現率で定量化した。最初のサンプル（2分目）で，注入細胞から一つ以上の細胞へ dye が拡散した場合を dye-coupled とした。gap junction の透過性を評価するために，dye が拡散していった先の細胞の個数を数えた。細胞の個数は染色した核の個数でもとめた。

(4) 分泌刺激物質として acetylcholine を種々の濃度で作用させ，2） 3）の測定をおこなった。浮遊細胞系の viability を評価するために 100mM sucrose による高浸透圧ショックを作用させ，

細胞容積の変化速度から水分透過度をもとめ，isolated perfused gland と比較した。

〔結果〕

1．分離浮遊腺房系の水分透過度

-Jv＝LpRTNin/V-LpRTCout の式をもちい，-Jv（＝f_{acinar}）と 1/V をプロットし，Lp を算出した。その結果，分離浮遊腺房系 Lp＝3.3×10^{-6} l.atm^{-1}. sec^{-1}. g cell^{-1}, 血管潅流系 Lp＝$1.11\sim1.83\times10^{-6}$ となった。分離浮遊腺房では，浸透流により水を約3倍通し易い。

2．acetylcholine 濃度と細胞間連絡

acetylcholine を血管潅流した唾液腺に投与すると濃度依存性に水分泌を起こす。高濃度では tachyphylaxis が起こり，10^{-4}M で分泌が抑制された。

Lucifer Yellow の注入により細胞間連絡を測定した。dye の注入後2分で周囲の細胞に拡散した。acetylcholine 10^{-4}M を作用させて10分後，dye を注入しても，dye は注入細胞に限局したままであった。acetylcholine の濃度を変えて，細胞間連絡を測定した。10^{-6}M ではわずかに細胞間連絡が減少した。濃度増加にともない細胞間連絡が減少し，10^{-4}M で最小になった。しかし，完全になくなるわけではなく，4個の細胞に拡散するものが1個の細胞への拡散となった。高濃度の acetylcholine により著しい細胞内 Ca の増加することが報告されており，細胞内 Ca の増加が細胞間連絡を減少させたと考えられる。

3．acetylcholine 濃度と細胞容積

acetylcholine 投与（3分間）により細胞容積は濃度依存性に減少した。

resting の容積に対する容積比 (V/Vo) は，10^{-8}M で0.92±0.02 (6) at 1 min, 0.92±0.02 (6) at 3 min, 10^{-6}M で0.91±0.01 (11) at 1 min, 0.95±0.02 (11) at 3 min, 10^{-5}M で0.77±0.01 (11) at 1 min, 0.77±0.03 (11) at 3 min, 10^{-4}M で0.78±0.02 (9) at 1 min, 0.89±0.02 (9) at 3 min, 10^{-3}M で0.75±0.03 (8) at 1 min, 0.85±0.02 (8) at 3 min. 低濃度 acetylcholine では細胞容積は投与中，縮小したまま同じ容積を保ったが，高濃度では投与中にもかかわらず，細胞容積が増加し，戻っていった。初期に同様な細胞縮小（25％）を起こすにもかかわらず，刺激中に 10^{-5}M では容積を保ったが 10^{-4}M では容積が増大した。

〔考察〕

大量の水分泌を誘発する acetylcholine 投与で細胞内 K が脱出し，細胞外より Na が流入することが測定されてきた。しかし高濃度の acetylcholine 投与で細胞内に大量の Na が流入が起こるにかかわらず分泌が誘発されないことが説明できなかった。今回の実験より高濃度 acetylcholine 投与中に細胞容積が増大することが測定され，細胞内に水分が蓄積することを示した。このことは，Na などの溶質が細胞外に出られず，蓄積したために細胞内に浸透的に流入した水分も分泌されず蓄積したと考察できる。

著しく分泌が阻害され，細胞容積の拡大が起こる 10^{-4}M acetylcholine は細胞間連絡を最小にまで減少させた。このことは，大量の電解質および水が移動する場合，個々の細胞として機能することを細胞群が選択していることを示している。

生体内酸化還元系における電子移動の分子機構の研究

志賀　潔，二科安三，佐藤恭介（熊本大・医）
三浦　洌（関西医大）
堀池喜八郎（滋賀医大）
東城博雅（阪大）
亘　　弘（生理研）

フラビン蛋白による電子移動機構の統一的理解をめざし，ここではペルオキシゾームにあるD－アミノ酸酸化酵素(DAO)および電子伝達フラビン蛋白(ETF)を対象にして以下の研究を行った。

(1) DAOの基質であるD－アミノ酸と同じ両性イオン構造をしたトリゴネリン（N－メチルニコチン酸）を活性部位プローブとして用い，活性部位の構造を検討した。トリゴネリンはDAO中のフラビンの3－イミノ基がニュートラル(N(3)－H)な構造のものよりも脱プロトン化したアニオン型構造($N(3)^-$)のものに高い親和性を示した。またDAOとトリゴネリンとの結合過程(pH8.3)をストップトフロー法で調べたところ，速い過程で両者が結合し，続いておこる遅い過程でフラビンのN(3)－Hのプロトンが解離することが判明した。これらの現象はトリゴネリンの正電荷がフラビンの3－イミノ基に近い位置にあり3－イミノ基のプロトンと反発的な相互作用をしているとして理解できる。またDAO－トリゴネリン複合体のフラビン部分の吸収スペクトルもこのことを支持した。以上の機構はDAOとD－アミノ酸との反応過程においても成立していると思われる。すなわち，アミノ酸のアミノ基の正電荷はフラビンの3－イミノ基と反発的な相互作用をする。そしてこの相互作用は基質との反応過程で重要な役割を担うと考えられる。

(2) ETFのアポ蛋白はヘテロダイマーであり，ダイマーあたり1分子のFADを含んでいる。サブユニット間の相互作用がいかに活性発現に関与するかを明らかにするため，アポETFとFADとの結合反応を蛍光分光法により，速度論的・平衡論的に検討した。アポ蛋白保存液を目的の濃度に希釈後，FADと（アポ蛋白大過剰の条件で）反応させた。この反応は擬一次反応であった。アポ蛋白希釈直後のみかけの速度定数（k_{obs}）はアポ蛋白の濃度に比例して直線的に増大した。次にアポ蛋白希釈後の静置時間とk_{obs}の関係を調べた。k_{obs}は静置時間の増加とともに減少し，やがて一定の値におちついた。またこの希釈平衡後でのk_{obs}の値から，アポETFの濃度が低いほどFADと直接反応する成分の割合が減少することがわかった。これはアポ蛋白の二つのサブユニットαとβとが可逆的に解離会合し，その二量体がFADと結合することを示唆するものである。すなわちα－サブユニット，β－サブユニット，FADの間には$\alpha+\beta \rightleftharpoons \alpha\beta$，$\alpha\beta$＋FAD⇌ホロ蛋白という少なくとも二つの平衡系が存在していることを示している。

脳腸ペプチドのモノクローン抗体による免疫化学的検討

矢内原昇，星野　稔，望月　徹，井口和明，高塚直樹，井上　孝，石川純嗣，
大島啓一，佐藤圭吾，大野良文，長嶋智明，張　　涛（静岡県立大・薬）

脳腸ペプチドが，その前駆体のプロセシング産物であり，内分泌細胞のみならず，中枢や末梢神経系で生合成され，神経・内分泌調節ペプチドとして重要な役割を果しているが，すでに20種類以上の多彩なペプチドの存在が知られている。これら脳腸ペプチドの一次構造が明らかにされると，こうしたペプチドはいずれも生体超微量物質であるため，それに代わるものとして，提出化学構造に基づいて化学合成された合成ペプチドが機能の検索に用いられる。また，遺伝子構造解析の発展により，各種動物由来の脳腸ペプチド前駆体の全アミノ酸配列が明らかにされつつあるが，これらの知見は，新しい脳腸ペプチドの発見やヒト由来のペプチドの構造について多くの情報をもたらしている。

本研究は以上の情報を背景とし，脳腸ペプチドおよびその関連ペプチドを化学合成し，合成ペプチドを抗原として用い，モノクローン抗体を作製し，ラジオイムノアッセイ (RIA) および免疫組織化学により，中枢および末梢神経系における脳腸ペプチドの同定ならびに前駆体のプロセシングの解析を可能にするものである。

〔実験方法〕

1）化学合成：脳腸ペプチドおよびそれらの前駆体について，各種動物由来のペプチド，または前駆体の提出化学構造に基づき，親水領域および二次構造を解析するとともに，各種動物由来のペプチドにおけるアミノ酸残基の置換領域を考察したのち，合成すべきペプチドを選択し，それを自動ペプチド合成機（ベックマン社990型）を用いる固相法により合成した。本研究で合成した脳腸ペプチドおよびその関連ペプチドは，ガラニン（ブタ，ラット），GLP－1（ブタ），VIP（モルモット），オキシントモデュリン（ヒト，ブタ）である。

2）抗体の作製：上記合成ペプチドを免疫抗原とし，単クローン抗体の作製を行った。

3）抗体の特異性：得られた抗体については，RIA および免疫組織化学によりその特異性を検討した。

〔結果と考察〕

ブタガラニンの単クローン抗体の作製により，従来から問題であったＰ物質，ニューロキニン類等，構造類似の脳腸ペプチドを明確に免疫化学的に区別することが可能になり，その産生ニューロンを同定した。

GLP－1 (7－37) を抗原とし，GLP－1 特異モノクローン抗体を作製した。現在，それを用い，免疫化学的にその有効性を検討中である。

NPY および VIP（ブタ）特異モノクローン抗体の作製中である。これら脳腸ペプチドのモノクローン抗体は神経生理学的研究には必須の基質となりうると考えられる。

脳腸ペプチド　ソマトスタチン
エンドルフィン類
エンケファリン類
コレシストキニン (CCK)
VIP/PHI
P物質/ニューロキニンA（K物質）
ガラニン
ガストリン放出ペプチド (GRP)
ニューロペプチドY (NPY)/ ペプチドYY (PYY)
グリカゴン/グリセンチン/ GLP−1
ニューロテンシン
モチリン
カルチトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP)

移植腸管の生理機能に関する研究

桑原厚和，尾崎　毅（生理研）
長浜真人（愛知県コロニー発達障害研究所）
山口正人，渡辺　至，葛西森夫（東北大・第2外科・NTT東北病院）

近年，免疫抑制法及びmicrosurgeryの進歩により，種々の臓器の移植術が可能となりつつある。腸移植についても，ヒトにおける短腸症候群の根本的治療法としてその確立が望まれるが，移植後の腸管運動及び消化吸収機能が正常に保持されているかどうかは不明である。本研究は移植後腸管の消化管機能を生理学的に把握することを目的としているが，本年度は，まず，腸管移植術について検討を加えた。

材料には，純系ラットを使用し，ネンブタール麻酔下で，以下の操作を行なった。

(1)　Donor operation

手術用顕微鏡下でラットを正中創にて開腹し，大腸を上方に，小腸を下方になるように腹腔外に露出した。次に，腸管膜動・静脈をその基始部で周囲組織より剝離後，腸管膜を切開し長さ20−40cmのgraftを採取した (Fig. 1−1, 2)。

小腸結腸間膜を切開後，腸管膜動・静脈末梢側を結さつ切断し，最後に，先に周囲より剝離しておいた腸管膜動・静脈基始部を切断した (Fig. 1−3, 4, 5)。

graft動脈側より冷ヘパリン加ラクテートリンゲル液を低圧で還流し，血液を排出した。このようにして得た移植用腸管は，移植開始まで氷冷保存した。

(2)　Recipient operation

(1)と同様の麻酔を行ない，開腹後，下大静脈および腹腔動脈を周囲より剝離し，腎静脈尾部にクランプをかけ切開した。エチコン10−0ナイロン糸で静脈側より8針ないし10針で端側吻合を

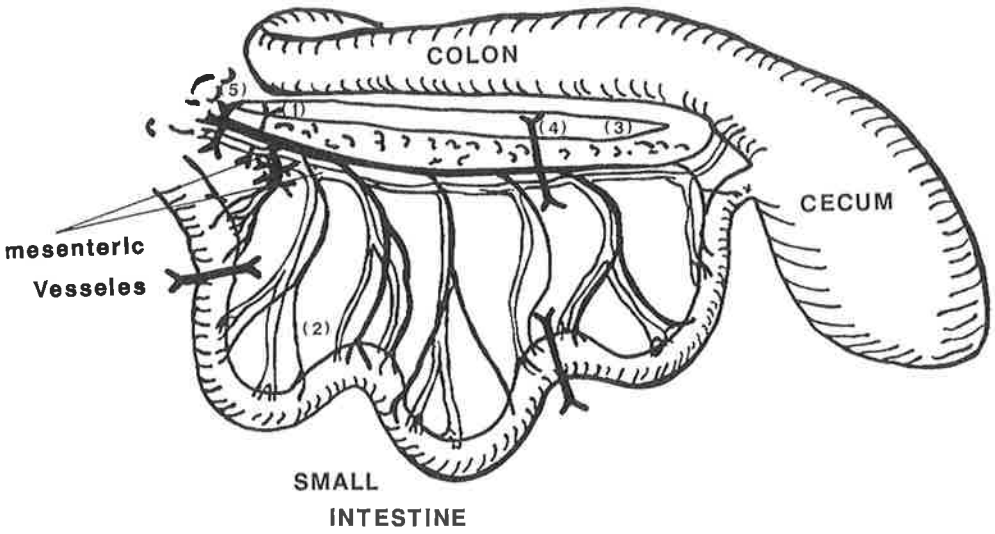


Fig. 1 DONOR OPERATION

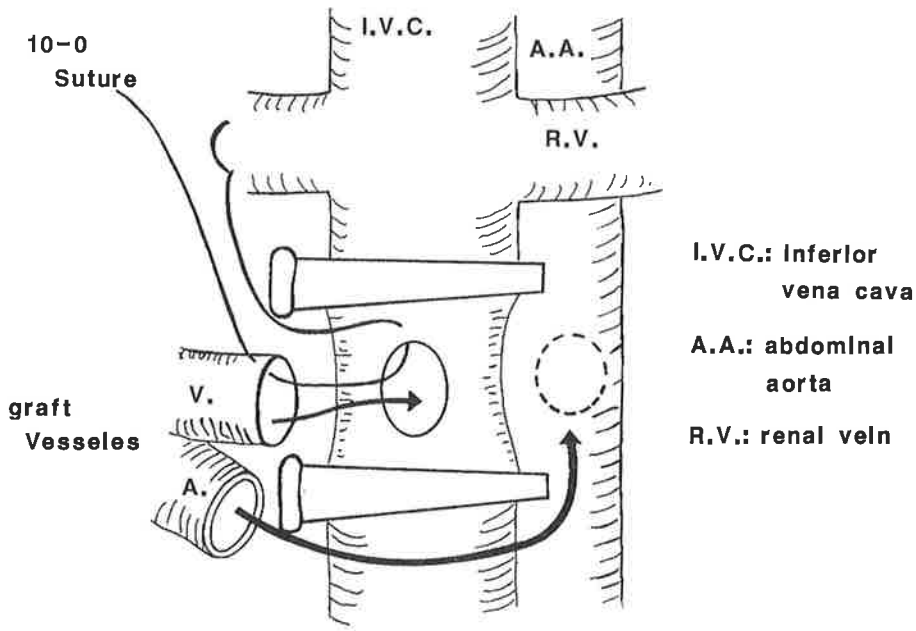


Fig. 2

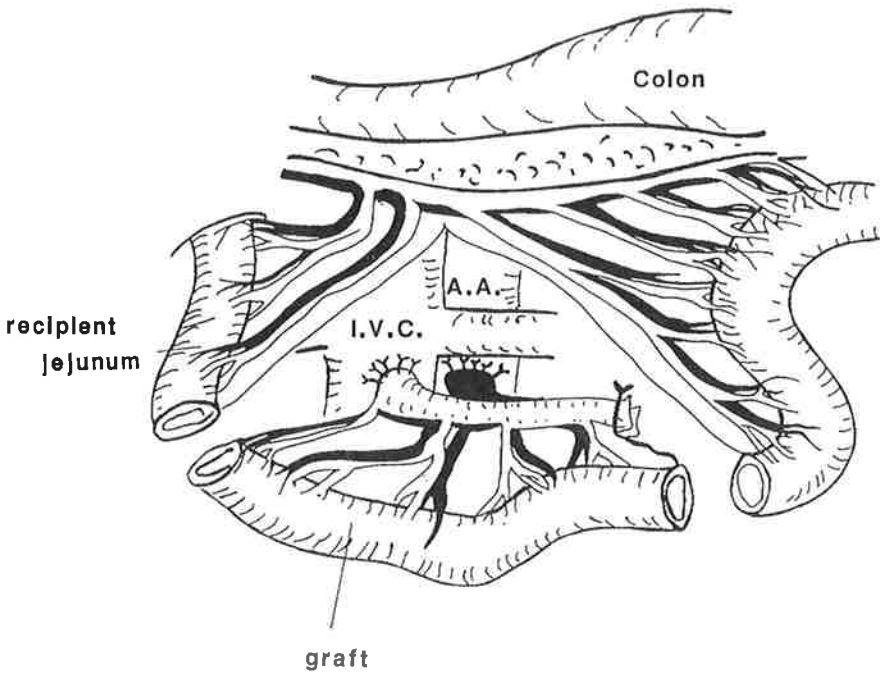


Fig. 3

行なった。次に，同様の方法で，動脈も端側吻合した (Fig. 2) 。

graft 動・静脈の血流再開後， recipient の上部空腸を切断し，この間に graft を端側吻合にて間置縫合する。

上述の操作により，血管は異所性に，腸管は同所性に移植が修了する。全移植操作は，今回の方法により１時間30分以内に修了することができた。移植ラットは，手術当日及び第１日目は水のみを与え，第２日目より固形飼料を給餌させた。

以上の移植術により，手術そのものからの recovery は100％得られるようになったが術後数日以内の合併症により，死亡する例もあり全体としては，80％の生存率がえられるようになった。

聴覚中枢電気活動の光学的測定

橋本　享（東医歯大・医用研）
山岸俊一（生理研・細胞器官系）
柳沢慧二（鶴見大・歯）

電圧感受性色素を用いて，聴覚中枢の電気活動を可視画像化し，聴覚中枢の機能的構造を解明することを目的とした。聴覚中枢全体の活動状況を同時的及び経時的に把握しようとする点に，本研究の主眼がある。聴覚刺激のように時間パターンに情報が含まれる場合，それに対応する中枢活動の空間的，時間的分布を実験的に研究するときに，膜電位感受性色素による光学的測定法は最有力な研究方法である。

ケタラール麻酔，人工呼吸した実験動物（モルモット，体重：250～350g）の大脳皮質聴覚領を直視下に置き，皮質表面に電圧感受性色素溶液 (RH414 : 5×10^{-4}) を与えて，聴ニュウロンを染色する。麻酔剤，筋弛緩剤を適当に補いながら，鎮痛剤を適宜与えて，光学的測定を行う。ハロゲンランプを光源として，干渉フィルタ (550 ± 20nm) によって得た光により，聴覚領を照射する。聴覚中枢電気活動に基づき発生する蛍光発光を，R610 フィルタを経て，実体顕微鏡とビデオ・カメラ（ニュービコン：松下通信機製）により観測する。聴覚刺激を与え，それに対応して発生する聴覚中枢電気活動を，蛍光発光の空間パターンの変化としてとらえるために，画像メモリ（Image Σ－Ⅲ，日本アビオニクス）の画像記憶機能と画像減算機能を活用して，背景画像の消去と応答画像の S/N の改善を図った。

画像メモリに収録した応答画像の時系列と，聴覚刺激に対する誘発応答の時間経過とを対比して，聴覚中枢電気活動の空間的局在の時間的推移と刺激パラメータとの対応関係を探索した。中枢電気活動の可視画像化には，応答画像の S/N の点から，多数のニューロンの同期的活動の存在が前提条件となっているが，背景画像の揺らぎに起因する画像減算の残渣を減らすことができれば，より微弱な応答画像を観測することが可能となるので，画像観測の空間分解能および時間分解能が向上し，単一ニューロン活動の可視画像化も可能となるものと期待される。現用のシステムでは，画像の揺らぎの軽減対策として応答画像の観測を心拍動に同期して行っている。心拍動に由来して周期的に揺らいでいる聴覚領表面をストロボ的に観測して，見かけの静止画像を得ようというものであるが，画像減算の残渣は －20dB 程度で，背景画像の消去は十分とはいえない。聴覚領を直視下に置くために頭蓋を解放している現在の方法を改善し，大脳皮質の心拍動による動き自体を小さくする工夫を加え，画像減算の残渣をさらに 20～30dB 程度軽減させたいと考えている。

聴覚刺激としては，正弦波純音刺激より実験動物の種固有の鳴き声を用いた方が，聴覚中枢に広範な応答を誘発させるために有効であった。動物固有の鳴き声のレパートリを用意して，順次刺激に用いたところ，中枢電気活動が複数個の島状の領域として，聴覚領に観察されたが，個体

差が大きく，種固有の応答パターンを確定するには至らなかった。今後の課題は，画像観測の妨害雑音となっている皮質の動きを抑える方策の確立である。

膜タンパク質の立体構造形成

美宅成樹（東京農工大・工）
久木田文夫，山岸俊一（生理研）

生体膜は能動輸送，興奮性，受容など重要な生体機能を担っている。そして，これらの生体膜の高度の機能は膜タンパク質によるということがわかっている。しかし，膜タンパク質の機能のメカニズムを理解するためにどうしても必要な立体構造の情報はまだ非常に限られたものである。そこで，本研究では，膜タンパク質の高次構造（二次構造，三次構造）を作る分子内相互作用を整理し，構造形成のシナリオを描くことを第一の目標としている。ここでは生理的にも非常に興味深いNaチャネルやバクテリオロドプシンを対象とする。

昨年度まではタンパク質立体構造の形成機構を理解するために，イカ巨大神経を用いてチャネルタンパク質の変性実験を行った。方法はアルコールによる変性を電気生理的手法で観測した。その結果，いずれの変性剤でも神経はある濃度領域で急激に不可逆的に興奮性を失った。これを変性濃度として，変性濃度とその変性剤の分配係数の関係をプロットしたところ，変性濃度と分配係数の間に非常にきれいな反比例の関係を得た。バクテリオロドプシンでも同様の結果が得られており，これら膜タンパク質は同じ機構で変性していることを示している。さらに，膜内に分配された変性剤の濃度が1Mを越えると変性が起こることなどから，疎水性相互作用は膜内への分配過程には重要な役割を果たしているが，変性そのものにはアルコールの水酸基による水素結合の切断が本質的であることがわかった。

本年度は変性現象とそれに非常に関係が深いと考えられるアルコールの麻酔作用を併せて調べた。麻酔作用は可逆であるのに対して変性は不可逆的な現象であるので，そのことを利用して判別することができる。今回はペンタノールを用い，内液にも外液にもペンタノールを加え，濃度の曖昧さを無くして実験を行った。ペンタノールを加えるとイカ巨大神経の興奮は徐々に抑えられるが，10mM程度までは効果は完全に可逆的であり，麻酔作用が働いていると考えられた。ペンタノール濃度をさらに上げると電流－電圧特性からみて明らかにイオンチャネルの変性が起こった。つまり，ペンタノールを洗っても電流－電圧特性は回復しなかった。そこで，イオンチャネルに対するペンタノールの麻酔作用及び変性キネティクスを種々のペンタノールの濃度で詳細に調べてみた。その結果，麻酔作用にはタンパク質あたり数個のペンタノール分子が関与しており，変性現象には更に5ないし10個のペンタノール分子の結合が必須であることが示唆された。これまで麻酔作用，変性作用の研究は多いが，本研究は両者の関係を詳細に調べたという意味で独自性がある。

生体膜に関する組織細胞化学的研究
——ラット腎臓 Na^+依存グルコース輸送体の局在

高田邦昭，川上速人，秋元義弘，平野　寛（杏林大・医・解剖）
山岸俊一（生理研）

腎臓におけるグルコースの再吸収は，細胞膜蛋白質であるグルコース輸送体（グルコーストランスポーター）によっておこなわれている。グルコース輸送体は，① $Na^+ \cdot K^+$-ATPase によって形成された Na^+の濃度勾配を用いて，グルコースを能動的に細胞内に取り込む Na^+依存グルコース輸送体と，②グルコース濃度に応じてその細胞膜透過を促進する促進拡散型グルコース輸送体の2種に大別される。今回は，腎臓でのグルコース再吸収の最初のステップに関与するとされる Na^+依存グルコース輸送体の局在を免疫細胞化学的に検討した。

Spraque-Dawley 系雄ラット腎臓を3％ホルムアルデヒト-PBS で室温で1～1.5時間固定した。2.3M ショ糖液浸漬をへて，試料を液体窒素中で凍結し，凍結準超薄切片 (1～1.5 μm) ならびに超薄切片を作製した。凍結準超薄切片は蛍光抗体間接法で，凍結超薄切片はコロイド金法（間接法，アビジン－ビオチン法）で免疫染色した。Na^+依存グルコース輸送体に対する抗体は，Hediger らにより一次構造が決定されたウサギ小腸 Na^+依存グルコース輸送体のC末端ペプチドを合成して抗原とし，ウサギで作製した。

近位尿細管のすべての分節 (S1, S2, S3) が，抗 Na^+依存グルコース輸送体抗体により染色された。陽性部位はファロイジンの蛍光二重染色で示される刷子縁と一致していた。凍結超薄切片を用いたコロイド金染色法に基く結果より，近位尿細管の微絨毛細胞膜が Na^+依存グルコース輸送体の局在部位であることが判明した。一方，側壁部および基底部細胞膜は陰性であった。また細胞頂部の小胞も標識されなかった。以上の結果から，グルコースの能動的再吸収には，近位尿細管の頂部細胞膜が関与していることが確認された。また微絨毛横断面の観察によれば，コロイド金粒子は主として細胞膜上ないしその細胞質側に分布しており，cDNA から予測される分子モデルと一致した。

イノシトールリン酸 (IP_3) 感受性 K^+チャンネルの解析

東田陽博（金沢大・医）
山岸俊一，古家喜四夫，古家園子（生理研）

研究目的

腫瘍神経細胞には細胞内に注入したイノシトールリン酸 (IP_3) により誘発される 20 と 40pS の

Ca^{2+}依存性K^+チャンネルの他，種々の膜電位依存性K^+チャンネルが存在する。今回，これら2種類のチャンネルを，細胞内Ca濃度測定と同時に測定し，そのキネティクスを明らかにするとともに，アパミンやツボクラリン等に対する感受性をも検索する。さらに，NG108－15細胞mRNAからマウス脳のAチャンネル遺伝子プローブにてK^+チャンネル遺伝子をクローニングする。

実験結果

1．神経腫瘍NG108－15細胞を培養し，電気生理用およびmRNA抽出用に分化培養した。

2．吸引電極によりギガオームシールを形成し，セルアタッチ状態でK^+チャンネルを測定し，別の電極よりIP_3を注入し，チャンネルの開閉を観察した。

3．mRNAより，cDNAライブラリーを作成した。s4セグメントを含む105マーを合成し，プローブした。K^+チャンネル遺伝子NGK1とNGK2のクローニングを行った。そのcDNAを，2種類のエクスプレションベクターに組み込み，一つはK^+チャンネルを含まないファイブロブラストにトランスフェクションした。他方，合成したmRNAをゼノバス卵母細胞に打ち込んだ。

4．NGK1, NGK2遺伝子とも，ファイブロブラスト，卵母細胞で，膜電位依存性のK^+チャンネルであることが証明出来た。

5．以上の結果は，神経興奮性の回復過程や，変調にK^+チャンネルが深く関与していることを示唆している。今後さらに，種々のK^+チャンネルの遺伝子構造解析をさらに進める必要がある。

卵母細胞に誘導したグルタミン酸受容体の特徴付け

小長谷紀子（瑞穂短大）
山本幸子，杉山博之（生理研）

グルタミン酸受容体にはイオンチャネル共役型受容体と代謝調節型受容体の二つのカテゴリーが知られており，さらに前者はアゴニスト特異性に基づき，NMDA型，QA型，およびKA型の3種類のサブタイプに細分類されている。ラット脳のmRNAをアフリカツメガエルの卵母細胞に注入すると卵母細胞はこれら3つのアゴニスト(NMDA, QA, KA)に対して電気生理学的に反応性を示すようになる。しかしこれらの3つのアゴニストのうち，QAおよびKAに対する反応は，この両者を明確に識別するアンタゴニストが知られていないために，同一の受容体を介した反応であるか否か，つまりそれぞれが一般に言われるQA型受容体およびKA型受容体に対応するのか否かはっきりしない点がある。事実，少なくとも卵母細胞においては，KAとQAが同一の受容体部位に作用すると考える根拠がある（KAによる電流応答がQAによって見かけ上競合的に抑制されることが知られている)。

そこでこの共同研究では，ラットの mRNA によって卵母細胞に誘導された QA 応答と KA 応答が同一の受容体を介したものであるか否かを検討した。すなわち，いろいろなバッチの mRNA と卵母細胞の組合せを用い，各々の組合せで発現してくる QA 応答と KA 応答の大きさの比を測定した。もし両者の両応答が同一の受容体を介しているものであるなら，この比は mRNA や卵母細胞のバッチに依らず一定のものであると期待される。

少なくとも 3 種類のメッセンジャー RNA, 4 種類の卵母細胞を用いた結果，同一の測定条件下で QA 応答に対する KA 応答の相対的な大きさは，各組合せ間で大きく変動した。すなわち QA 応答はほとんど検出されないにもかかわらず有意な KA 応答がみられた場合（相対比は少なくとも20以上）から，両応答が十分な大きさでみられた場合（相対比は平均約 6 ）までの範囲で，各実験毎にこの比は一定ではなかった。この結果は両応答が同一の受容体を介して起きていると考えると説明しにくく，各々の応答は別個の受容体を介して引き起こされているものであり，従って，中枢神経細胞で一般的に言われている QA 受容体および KA 受容体に相当するものであると考えられることがわかった。

上頚神経節内のナトリウム利尿ペプチドの存在とその生理作用の検討

永田　豊，田丸政男，藤田公和（保健衛生大・医・生理）
戎　弘志，小出　直（福友医学研）
杉山博之（生理研）

〈研究目的〉 心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) は，哺乳動物の心房筋細胞より分泌される体液性因子で，細尿管に作用して Na^+ 利尿を引き起こす結果，血圧の降下や体液量の調節に役立っている。この ANP は心房筋より抽出，精製されそのアミノ酸組成も明らかにされて，このペプチド免疫抗体を用いた高感度放射免疫測定法 (RIA) が開発されている。

この ANP-RIA を用いて生体内の ANP 分布が調べられており，脳の浸透圧中枢を含む視床下部に多量含まれていることが知られている。そこでわれわれはコリン作動性シナプスを含む上頚神経節 (SCG) の節前および節後神経繊維を切断した後，経時的に SCG 内の ANP 量の変動を測定して，SCG 内 ANP の由来と，その生理的機能への関与を検討した。

〈実験方法〉 ネンブタール麻酔下の成熟雄の頚部を切開し，SCG の節前，あるいは節後神経線維を切断後，回復させた後，経時的に SCG を摘出して RIA により ANP 含量を測定した。また組織内の ACh 合成酵素 (ChAT) 活性を測定した。

〈実験結果と考察〉

1 ）ラット各組織内の ANP 含量：

既に知られている如く ANP はその産生組織の心房内に高濃度見出されたが，中枢神経，特に

表1．ラット各種組織中の ANP 濃度

組　　織	(pg/mg 湿重量)
心　　房	12,365±2630(8)
心　　室	2,746± 194(6)
前　　脳	1,094± 256(8)
大脳皮質	900± 212(5)
橋・延髄	1,173± 130(6)
視床下部	2,811± 595(7)
上頸部交感神経節	773± 29(15)
節状神経節	301± 52(3)
血漿　(pg/ml)	257± 68(4)

平均値±標準誤差,( )匹数

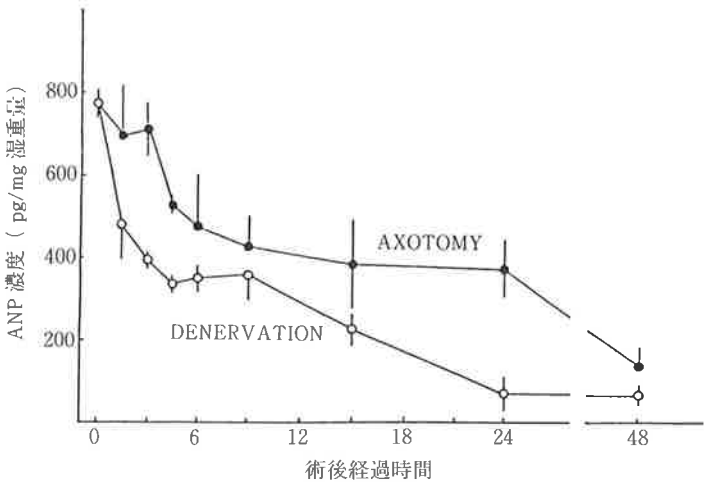


図1．節前及び節後神経切断術によるラット上頸部交感神経節内 ANP 濃度の経時的変化

視床下部や脳幹部組織にも比較的高濃度見出されている。また，SCG 内にも ANP はかなりの量含まれることが認められた（表1）。

2）節前神経切断 (denervation) 後の SCG 内 ANP 含量の変動：

成熟雄のコリン作動性の節前神経を切断すると，SCG 内 ANP 含量は急激に減少し，3時間後には元の量の1/2に達し，さらに24時間後にはほぼ0にまで低下した（図1）。近年 ANP はシナプス部で neurotransmitter あるいは neuromodulator として作用し得る可能性が示唆されており，cholinergic synapse では cyclic GMP を増大させる効果により，ACh の作用を修飾しうることが示唆される。denervation 後におこる SCG 内 ANP 量減少の時間的経過は，やはり denervation

後のSCG内ChAT活性の減少経過と比較的よく一致していることから，ANPはSCG内のcholinergic synapse伝達過程と密接に関連している可能性が考えられた。

3）節後神経切断(axotomy)後のSCG内ANP含量の変動：

節後神経切断(axotomy)後SCG内のANP含量は3時間まではほとんど変動しなかったが以後次第にゆるやかに減少し，24時間後には元の含量のほぼ1/2にまで減少し，48時間後にはわずかなANP量しか組織内には認められなかった（図1）。SCGの節後ニューロン軸索が支配している同例の顎下腺あるいは眼球を摘出して6時間後には，SCG内ANP含量は元の量の2/3にまで減少が認められた。このことからSCG内のANPの一部はその神経支配臓器から節後神経軸索を逆行性に輸送されてSCG内に蓄積されている可能性が示唆された。

〈文献〉

Nagata et al., (1989) J. Neurochem. 52, 1570－1575.

Ca依存性Kチャネルに及ぼす細胞内Kイオンの希釈効果

森元克士（尚絅短・幼児教育）
久木田文夫，山岸俊一（生理研・生体膜）

膜内側に存在するKイオン濃度がCa依存性Kチャネルの性質に及ぼす効果を調べる目的で，モルモット精管より単離した平滑筋細胞を用いてinside-out patch膜を作り，細胞内液中のKClを塩化コリンで置換希釈し，実験を行った。細胞外液中のKClは30mMとし，単一チャネル電流の電圧電流特性が直線性を出来るだけ保つようにした。

単一チャネルのKコンダクタンスは膜内側のKイオン濃度が高いほど大きく，Kイオン濃度の低下にともなって図1に示すように急激に減少した。特に細胞内液のKイオン濃度を58.4mMに希釈したものでは図1に示すようにこの図だけからは単一チャネル電流の個々のステップが読み取れない状態である。このチャネルを横切るK電流の低下の程度はそれぞれのトレースを35回加算平均して得られた図1のa, b, cを見ると更によく分かる。単一チャネル電流の電圧電流特性を図2に示すが，これを見ても同様である。また図2から明らかなように，細胞内液のKイオン濃度を希釈した際のKチャネルの予想平衡電位と単一チャネル電流値の測定値を電圧電流平面上で外挿した直線が電位軸をよぎる点が比較的良く一致した。このことから細胞内Kイオンの希釈効果は膜電位には大きな変化を与えないでチャネルの透過性を変化させていることが予測される。

図1に示すパッチ膜にはKイオンチャネルが少なくとも2個存在するので，このチャネルの開口確率を知るために，閉じた状態，1個のチャネルだけが開いている状態，2個のチャネルが共に開いている状態の3つの状態に分けてそれぞれの単位時間内の分布を取ったものが図3である。

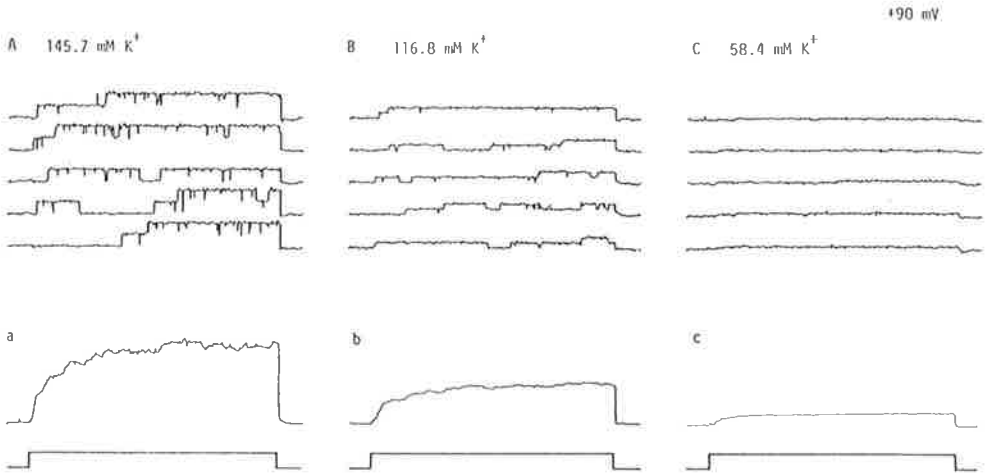


図１．Caイオン依存性Kチャネルの単一チャネル電流に及ぼす細胞内Kイオン濃度の効果。A，B，Cにはそれぞれ細胞内側のKイオン濃度が表記の時に得られた，膜電位が＋90mVに固定された際の，単一電流記録の例がそれぞれ５トレースづつ示されている。a，b，cにはそれぞれ35トレースの加算平均波形が示されている。最下段は与えた膜電位変化を示している。

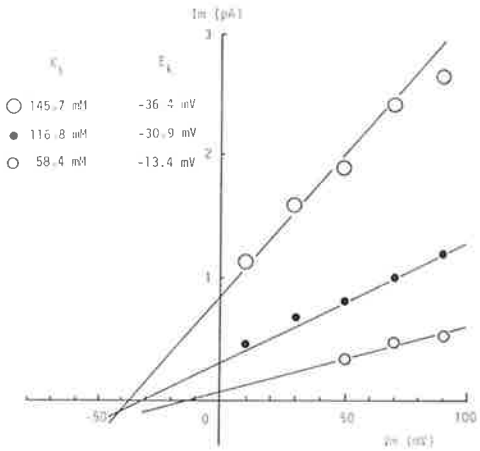


図２．図１で得られた単一チャネル電流の電圧電流特性。それぞれの細胞内Kイオン濃度の際の予想E_Kが図の左上に示されている。

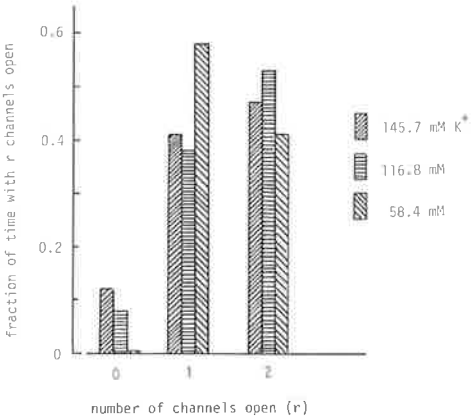


図３．固定膜電位が＋90mVの際のチャネルの開口状態の分布。それぞれの細胞内Kイオン濃度で得られたチャネルの開口状態の分布が示されている。0はチャネルが閉じた状態，1は1個だけのチャネルが開いている状態，2は2個のチャネルが同時に開いている状態を表している。

細胞内側のKイオンを希釈してもそれぞれのチャネルの開口状態の時間分布には大きな変化がみられていない。このことは細胞内に存在するKイオンの濃度はチャネルの開口機構にはほとんど影響を与えないということが予想される。

以上の結果から，細胞内Kイオンの希釈に用いたコリンの効果が無視できると仮定すると，細胞内のKイオン濃度は膜電位やチャネルの開口機構にほとんど影響を与える事なく，チャネルのイオン透過性のみを変化させていることが予測される。この機構がどの様な機作に基づくかに付いては今後の課題であろう。またKイオン以外の陽イオンが共存した場合のCa依存性Kイオンチャネルの単一チャネルレベルでの挙動に付いても今後さらに解析を加えて行くつもりである。

大腸上皮機能の光学的方法による研究

鈴木裕一（山形大・医・第二生理）
寺川　進（生理研）

ウサギ大腸粘膜細片をスライドグラスに乗せ，ノマルスキー顕微鏡観察をビデオカメラと画像処理装置を介して行った。これにより大腸クリプトの杯細胞がよく見え，また刺激による粘液顆粒の開口分泌の過程がリアルタイムでよく見えるようになった（生理学研究所年報10巻参照）。この方法を用い，本年度は以下の事を明らかにした。① cAMP は，それ単独では弱い分泌刺激活性を持つのみであるが，ムスカリン様アゴニスト及びヒスタミンによる分泌を著しく増強した。②同様の増強効果は，アデニル酸シクラーゼを活性化するフォルスコリンでも見られた。③ PCK 活性化を起こすフォルボールエステル (PDB) それ自体では，開口分泌を起こさなかったが，cAMP と共存させると一定の分泌反応がみられた。④ホスファターゼ阻害剤の存在下では，ムスカリン様刺激，及びヒスタミン刺激に対する反応が，一過性に変わり，持続しなくなった。以上の示したごとく，この方法は，杯細胞からの粘液分泌過程における分泌刺激のシグナルトランスダクションの解析に有効であることが明らかになった。

脳下垂体前葉の GH 細胞の分泌活動の画像処理による研究

征矢英昭，鈴木光雄（群馬大・内分泌研究所）
寺川　進，岩瀬範和（生理研）

成長ホルモン分泌の細胞内制御機構を調べる目的で，ラット脳下垂体前葉よりコラゲナーゼ処理により細胞を単離し，１日から３日培養してから，ノマルスキー顕微鏡下にビデオカメラと画

像処理装置を通して観察した。細胞内には0.4ミクロンほどの直径の分泌顆粒が充満し，全体としてゆっくりとしたブラウン運動をしているのが見られた。GRF を 100nM の濃度で微小なガラスピペットから単一の細胞に投与するといくつかの分泌顆粒が突然その明るさを変え，弾けるような反応を示した。この反応はクロマフィン細胞や杯細胞において見られた分泌反応と殆ど同じように見えたが，反応の速度に遅いものが含まれている点が特徴的であった。ソマトスタチンを投与してから GRF を重ねて投与すると反応は抑えられた。また，ソマトスタチン投与をしてからそれを取り除き，3分ほどしてから GRF を投与すると，顆粒の弾けるような反応は，何もせずに GRF を投与したときより多くなった。K 濃度の高い溶液を細胞にかけると，やはり顆粒の消失する反応が引き起こされた。このような結果は，多数の細胞をカラムに詰めてその灌流液のラジオイムノアッセーによって成長ホルモンの分泌を定量した結果と一致する。従って，顆粒の明るさの変化は，電子顕微鏡観察によって示唆されてきた成長ホルモン細胞（GH 細胞）の分泌顆粒のエキソサイトーシスを，光学顕微鏡でリアルタイムに観察したものであることが結論される。

唾液腺分泌機構の光学的解析

瀬川彰久（北里大・医）
寺川　進（生理研）

唾液は周知のように開口分泌によって分泌する。開口分泌の生理機構は近年になって分子レベルで明らかにされつつあるが，開口分泌の動的過程，すなわち分泌に伴う細胞内オルガネラの動きや膜融合後の形質膜の処理過程などについての解析は，光学顕微鏡の解像力が充分でないため，ほとんど進んでいない。そこで，光学顕微鏡に画像処理装置をセットし(videoenhanced microscopy)，電顕レベルの高解像度で，生きた唾液腺細胞の開口分泌の動的解析を行った。

ラット耳下腺，顎下腺をコラゲナーゼ処理により単離腺房とし，光学顕微鏡下で観察しつつイソプロテレノールで分泌刺激を与えた。観察にあたっては画像処理を real time で行い分解能 0.05 μm の高解像度でビデオレコーダーに記録した。

分泌顆粒は腺細胞頂上部に充満しており，分泌刺激の有無にかかわらずほとんど動いていなかった。しかし，分泌刺激後には，分泌顆粒の光強度が急速に (33ms～1s) 変化する現象が認められ，分泌顆粒は次第に消失していった。個々の顆粒の光強度の変化を定量化してみると，上記の急速な変化の直前には，ほとんど変化がないことが示され，光強度の変化は顆粒の動きというよりは，屈折率の変化，すなわち分泌顆粒の膜融合と，それにひきつづく内容物の放出過程を示すものと考えられた。このような光強度の急激な変化は，副腎髄質細胞，杯細胞，下垂体前葉細胞の開口分泌でも認められていることから，唾液腺における開口分泌を反映した変化であると考え

られた。

以上の結果は，唾液腺の開口分泌が，分泌顆粒の明らかな動きなしに進行することを示しており，これまでの常識に一石を投ずるとともに，今後の開口分泌の調節機構の解析に新しいアプローチの道を開いたものと考える。

内耳における音響受傷性の個体差に関する研究

田中康夫，井上庸夫，橋野恵里（獨協医大）
渡辺　昭（生理研）

衝撃性の強大音や反復性の騒音の曝露により種々の程度の聴力損失が起り，内耳では感覚毛の破壊や有毛細胞の変性の起ることが電顕的に示されている。聴力損失は高音部から始まり障害が強い場合は中音域に波及する。その初期段階の聴力像は 4000Hz を中心とした窪みを呈し，c^5 dip 型聴力損失と呼ばれている。しかし，同様な音響環境にあってもそのような dip 型難聴を起し易い人と起し難い人があり，受傷性の個体差は大きい。一方，誘発耳音響放射 (stimulated otoacoustic emission : OAE) は外有毛細胞機能に連係した蝸牛内微小機械系の振動を外耳道で音響反応として記録したものであるが，その個体差もまた大きい。音響受傷性の個体差の原因を知るために，蝸牛内機械系振動の指標として OAE を用い，音響障害と OAE の持続性の関係をしらべた。

正常な聴力を有する耳，dip 型聴力損失を有する耳，および片側性聴力損失の健側の正常聴力耳より OAE を記録した。外耳道に 2 連のプラスチック管よりなる音響プローブを挿入し，エアカフで密閉固定した。刺激には持続時間 3ms, 立上り/立下り時間/ ms の純音バーストを用い，刺激開始より 20ms の現象を256回加算平均し，X－Y レコーダに記録した。

OAE の持続時間が刺激音のそれの 2 倍以上，すなわち 6ms 以上である耳の頻度は正常聴力をもつ30耳では 9 耳，30.0％であった。dip 型聴力損失をもつ耳の頻度は81耳中77耳，95.1％であり，片側性 dip 型聴力損失例の健常側30耳では27耳，90.0％であった。持続が 6ms 以上になる持続性 OAE は正常聴力耳では OAE の見かけの閾値上 23.3dB ± 6.7, dip 型損失耳では 12.9dB ± 1.3, 片側 dip 型損失健常側では 13.5dB ± 2.0 の刺激音の増強により検出された。等価騒音レベル 90dB Leq の練習環境にある女子中学生吹奏楽部62名118耳の OAE の測定結果では，全耳数 59.4％に dip 型聴力損失を認め，その中 6ms 以上持続する OAE をもつ耳は82％，もたない耳は 34.8％であった。

OAE の持続が長い耳では前述のような OAE の成因から蝸牛微小機械系の同期性が高まっているものと考えられる。音響障害の初期像を呈する耳に持続性 OAE の頻度の高かった成績から，微小機械系の同期性の個体差が音響受傷性に関係しているであろうことが示唆された。

身体運動が消化管諸機能とその協調におよぼす影響

近藤孝晴（名大・保体センター）
渡辺　昭，尾崎　毅，成瀬　達（生理研）

我々は先の研究で，運動の胃酸分泌抑制作用は運動の強度と時間によると報告した。今回はその機序について血清ガストリンと胃排出の面から検討した。

〈対象・方法〉

胃瘻およびHeidenhain pouchを造設した雑種成犬5頭を用いた。これらのイヌは軽い散歩以外身体トレーニングは行わなかった。運動負荷はトレッドミルを用い，最も胃酸分泌抑制効果の強かった6km/hの速度で行い，運動時間は2時間とした。約18時間絶食の後に実験を行った。肉の缶詰(KAL KAN BEEF DINNER, カルカンフーズ社，粗タンパク質12%以上，脂肪6%以上，400g)を食べさせた後，ただちにトレッドミル上を走らせた。胃液はHeidenhain pouchのGregory cannulaに風船をつけ，約20mlの生理食塩水を入れ，washout法で採取した。酸は，この回収液5mlを，Radiometer社の自動滴定装置を用いて滴定した。食前および食後15，30，60，90，120分に採血を行い，血清ガストリンをダイナボット社のガストリンリアキットⅡを用いるRIA法で測定した。胃排出の実験では，サスタジェン（ブリストル・マイヤーズ）100g（蛋白質23.5%，脂肪3.5%，炭水化物66.5%，総エネルギー390Cal）と，非吸収性のマーカーであるポリエチレングリコール(PEG4000) 1.5gを微温等300mlに溶かして胃瘻より注入した。注入後15，30，45，60，90，120分目にそれぞれ胃瘻を再開放し，胃内に残留しているサスタジェンの量を測定，約2mlを測定用に採取し，残りを胃内に再注入した。時速6kmで運動をさせて同様の実験を行い，運動の効果を検討した。PEGの測定は，Malawerらの方法によった。有意差検定はpaired t testを用いた。

〈結果・考案〉

食事による血清ガストリン反応は運動の有無によって差がなかった（表1）。液体食の胃排出は1時間の運動で有意に遅延した。また，胃内容が1/2になるに要する時間は54.0±2.1分から68.4±4.5分に延長した。

運動による胃酸分泌の減少には，胃酸分泌刺激ホルモンであるガストリンとは関連がないこと

Table 1 Postprandial plasma gastrin (Means ± SE, pg/ml) with or without exercise

	0	15	30	60	90	120 min
Control	70±12	147± 9	131±12	115±11	108±15	97± 9
Exercise	67±18	144± 5	121± 8	114± 4	91± 9	92±12

がわかった。また，胃排出の遅延は胃酸分泌を刺激することが知られているので，胃排出の遅延も運動による胃酸分泌の減少と関連のないことがわかった。

〈結論〉

運動による胃酸分泌減少の機序については，胃血流などを含め今後さらに検討が必要である。

高等動物細胞膜のアミノ酸輸送系の解析

石井哲郎（筑波大・基礎医学系）
山田一夫（細胞器官系能動輸送）

アミノ酸膜輸送担体タンパク質は生命活動に必須の働きをしている。高等動物のアミノ酸輸送系は約10種類知られているが，それらを構成する担体タンパク質の実体は不明である。その理由は，タンパクが膜に微量しか存在せず，さらに活性定量が難しいため従来の生化学的方法では精製が難しいためである。今後，各輸送系の生体組織内での局在と代謝調節における役割を明らかにしていくためには，各輸送系を構成する担体タンパク質を同定し，それらの遺伝子の発現調節を検討する必要がある。最近，小腸のグルコース吸収を担う輸送タンパク質の構造（アミノ酸配列）が，遺伝子工学的手法で解明された。この方法は，mRNA をアフリカツメガエル卵母細胞へ注入して細胞膜への担体タンパク質の機能発現を指標として cDNA ライブラリーより目的のクローンをスクリーニングするのである。同様の手法が，アミノ酸輸送担体にも応用可能かどうか検討した。まず問題となることはカエル卵には中性アミノ酸を輸送する活性が存在していることであり，そのため中性アミノ酸輸送の発現アッセイ系としては，適当ではないと考えられる。そこで，アッセイ可能な系の１つとしては，酸性アミノ酸の輸送系が考えられる。シスチン・グルタミン酸交換輸送系（x_c^-）は，坂内四郎（筑波大）によって発見された輸送系であり細胞内へのシスチンの取り込みを行い，グルタチオン濃度を維持する働きがある。本輸送担体タンパク質は，多様な酸化的ストレスに晒された細胞に誘導される新しいストレスタンパク質と考えられる。マクロファージや血管内皮細胞は，本輸送活性を誘導する能力を持つことから，免疫機能や血管機能の保全との関連に興味が持たれている。また，脳での本輸送活性の存在が示唆されており，その生理的役割が注目されている。アフリカツメガエル卵母細胞での活性発現アッセイ法がこの輸送担体の構造決定に利用可能であるかどうか検討した。有利な点として次の３点があげられる，１．カエル卵母細胞はシスチンとグルタミン酸を取り込む活性が低い，２．細胞内総アミノ酸プールの約40％がグルタミン酸であるために [^{3}H] シスチンが交換輸送で充分量取り込まれる可能性がある，３．本輸送活性は誘導がかけられるため，cDNA を用いて差し引き法や±法等の簡便なスクリーニングの併用が可能である。実際に，酸素とジエチルマレイン酸によって x_c^- 系の活性が誘導されたマクロファージより mRNA を精製し，カエル卵母細胞へ注入したと

ころシスチン輸送活性の発現が観察された。この活性は，グルタミン酸で阻害され基質とならないアスパラギン酸によっては全く阻害されないことから，x_c^-系の活性と断定できた。しかしながら，問題点として，活性発現量が少ないためスクリーニングに用いるためには，取り込みアッセイの改良が必要と思われる。

原発性高シュウ酸尿症Ⅰ型についての研究

市山　新，西山孝三，船井恒嘉，伊藤武司（浜松医大・医・第1生化学）
藤田道也（生理研）

肝臓のセリン：ピルビン酸トランスアミナーゼ（以下SPTと略）はピルビン酸のほかシュウ酸の直接の前駆体であるグリオキシル酸を良好なアミノ基受容体とする酵素であり，動物種属により異なる独得のオルガネラ局在性およびホルモン応答性を持つ。すなわち，ラットではミトコンドリアとペルオキシゾームの両方に存在し，ミトコンドリアの酵素のみがグルカゴンとインスリンによりmRNAの増量を介して著しい誘導を受ける。ミトコンドリアとペルオキシゾームのSPTは同一または極めて類似した遺伝子の産物であるが，異なる開始部位から転写されるため5′末端部分の長さが異なる2種類のmRNAに由来するらしい。ミトコンドリアSPTのmRNAのみが翻訳産物のミトコンドリアへの移行のために必要なN末端延長ペプチドに対する翻訳領域を有していることが本酵素の二重のオルガネラ局在性の一つの原因と思われる。一方，ヒトではSPTはグリオキシル酸生成の主要細胞内部位であるペルオキシゾームのみに局在する。

シュウ酸過剰生産を来たす先天性代謝疾患の1つ，原発性高シュウ酸尿症Ⅰ型（Primary Hyperoxaluria Type I, 以下PHIと略）ではSPTに何らかの異常が認められる。多くの症例ではSPT活性が著しく低下しているが，SPTのミトコンドリアへの誤局在に基づくPHI亜型も最近報告された。本研究では，SPTの細胞内局在性を決定する遺伝子機構および上記PHI亜型におけるSPTの細胞内誤局在の原因を明らかにすることを終目的として，ヒトSPTのcDNAのクローニングと構造決定を行った。

ヒト肝ポリ（A）$^+$ RNAよりPhagemidベクター$pT_7T_3$18Uを用いてcDNAライブラリーを作成し，ラットSPT cDNAをプローブとしてヒトSPTに対する全コード領域を含む2個の陽性クローンを単離した。塩基配列からヒトSPTはラットSPTと同じく392個のアミノ酸残基からなり，またラットSPTと79.3%の相同アミノ酸配列を持つことが明らかとなった。更にRNAブロット解析，*in vitro*翻訳実験でヒトSPTのmRNA, 翻訳産物はそれぞれラットペルオキシゾームSPTのmRNA, 翻訳産物と同じく約1.7kb, 43kDaであった。しかし，このヒトcDNAの5′末端非翻訳領域の塩基配列はラットミトコンドリアSPT mRNAのN末端延長ペプチドをコードする領域の3′末端部分のそれと非常によく似ていた。ヒトSPT遺伝子の発現では，このN末端延長

ペプチドに対応する領域を非コード領域とするような転写開始点決定機構が働いているのではないかと推測される。なお，ラットのミトコンドリアとペルオキシゾームのSPTは後者のみN末端アミノ酸がブロックされているという点だけで異なっており，ヒトSPTのN末端アミノ酸もブロックされている。本研究ではこれらブロックされたN末端アミノ酸の同定も目論んだが期間中には目的を達成出来なかった。

輸送 ATPase 分子の構造と機能

太田英彦（浜松医大・医）
藤田道也（生理研）

目的

カオチン輸送 ATPase 分子の各部分が脂質二重層に対してどのような配向を持つのかを免疫化学的な手法によって明らかにすることを試みた。一次構造の明らかになった輸送 ATPase は多いが，一次構造から推定されるポリペプチドと脂質二重層との立体構造上の関連は必ずしも明かではない。しかし輸送機構の機能は脂質二重層との関連が不明のままでは解明できないであろう。ペプチド抗原に対する抗体を作成し，免疫電子顕微鏡的に抗原と脂質二重層との関連を観察すれば，ポリペプチド鎖のどの部分が細胞膜の細胞質側と細胞外側に露出しているかを直接示すことが可能であると考えられる。

方法

単離した細胞膜に膜タンパク質に対する抗体を結合させ，ついで金コロイドと結合させた第二抗体あるいはプロテインAを結合させる。さらにこれらを包埋し電子顕微鏡試料として超薄切片をつくり観察すれば脂質二重層と抗原性決定基との関連が分かると考えられる。ただし単離細胞膜や抗体などをなるべく①少量しか必要としない，②抗原性を保存するため未固定のまま抗体と反応させる，といったことが望ましいので方法や条件の検討を行った。対照とする生体膜としてマウス腎臓および小腸細胞側底膜，小腸微絨毛膜，赤血球膜などを用い，それらに存在する Na, K-ATPase などの配向を調べた。

結果と考察

抗原包埋剤としてはエポンと LR ホワイトを比較したが，後者でも形態の保存はかなり良好な結果もえられ，取扱が簡単であった。微量膜標品を処理するためには，ELISA 用の96穴プレートを用いる方法が報告されているが，その代わりの支持体をいくつか検討し，メンブレンフィルターを用いると良好な結果が得られることが分かった。フィルターに物理的に吸着した生体膜は比較的安定に結合しているが，表層の膜のみが第一・第二抗体と結合できることが見いだされた。

マウス小腸のスクラーゼに対する抗体を用いると微絨毛膜の細胞外側にのみに金コロイドが見いだされ，この方法が当初の目的にあった方法であることが示された。

自然発症高血圧ラットの単離十二指腸吸収上皮細胞におけるカルシウム輸送

山田正美，金子栄蔵（浜松医大）
花井洋行，藤田道也（生理研）

〈目的〉

本態性高血圧症およびその実験モデルである自然発症高血圧ラット (SHR) における消化管カルシウム (Ca) 吸収の異常が指摘されており，高 Ca 食投与による降圧効果の報告も増加してきている。消化管 Ca 吸収の主な部位である十二指腸では，反転腸管や Ussing chamber を用いた実験より，SHR での Ca 吸収低下が示唆されているが詳細は依然不明である。この研究では高血圧動物における消化管 Ca 輸送を上皮細胞レベルから検討することを目的とした。

〈方法および結果〉

生後12～14週令ラットより Weiser らの変法を用いて単離十二指腸吸収上皮細胞を調製した。走査電顕による観察では得られた細胞の大きさ，微絨毛の密度や形態に差は認められなかった。単離細胞への ^{45}Ca uptake を rapid filtration technique で測定した結果，37℃，1分間あたりの ^{45}Ca uptake は 0.16～4.0mM の Ca 濃度では SHR が正常血圧ラット (WKY) より有意に高く，Lineweaver-Burke plot による解析では Vmax は SHR : 5.6, WKY : 3.6nmol/mg protein/minute, Km は SHR3.0, WKY2.9mM であった。Fura-2 を用いた細胞質遊離 Ca^{2+} 濃度測定では，200 μM Ca 添加後7分で SHR が有意な上昇を示した（図1）。この細胞質遊離 Ca^{2+} 濃度上昇に細胞膜からの Ca 排出機構が影響しているか否かを検討するため，cell suspension に 200 μM Ca を3分間取り込ませた後に EGTAsolution（最終濃度 500 μM）を加え Ca efflux を測定した（図2）。SHR, WKY 共に細胞外液 Na 濃度増加にともない細胞質 Ca^{2+} 濃度は減少し，Na 非存在下では SHR の細胞質 Ca^{2+} 濃度減少速度の遅延が認められた。又，10秒後の Ca 排出率は Na 存在の有無にかかわらず SHR で有意に低く，140mM Na 存在下では全 Ca 排出における Na 依存性 Ca 排出の占める比率は WKY で28.4，SHR で46.1％と SHR で増大していた。^{45}Ca efflux の検討でも同様の傾向が認められた。

〈まとめ〉

以上の結果より，単離十二指腸上皮細胞レベルでは SHR は WKY に較べ主な Ca 排出機構である Ca ポンプの機能低下を有し，十二指腸上皮細胞での Ca 排出機構としてはマイナーコンポーネントである Na-Ca 交換系の代償的機能亢進が SHR で認められた。SHR での Ca 吸収低下メカニズムの一要因として，この十二指腸上皮細胞での Ca ポンプ機能低下が関わっている可能性が示唆された。

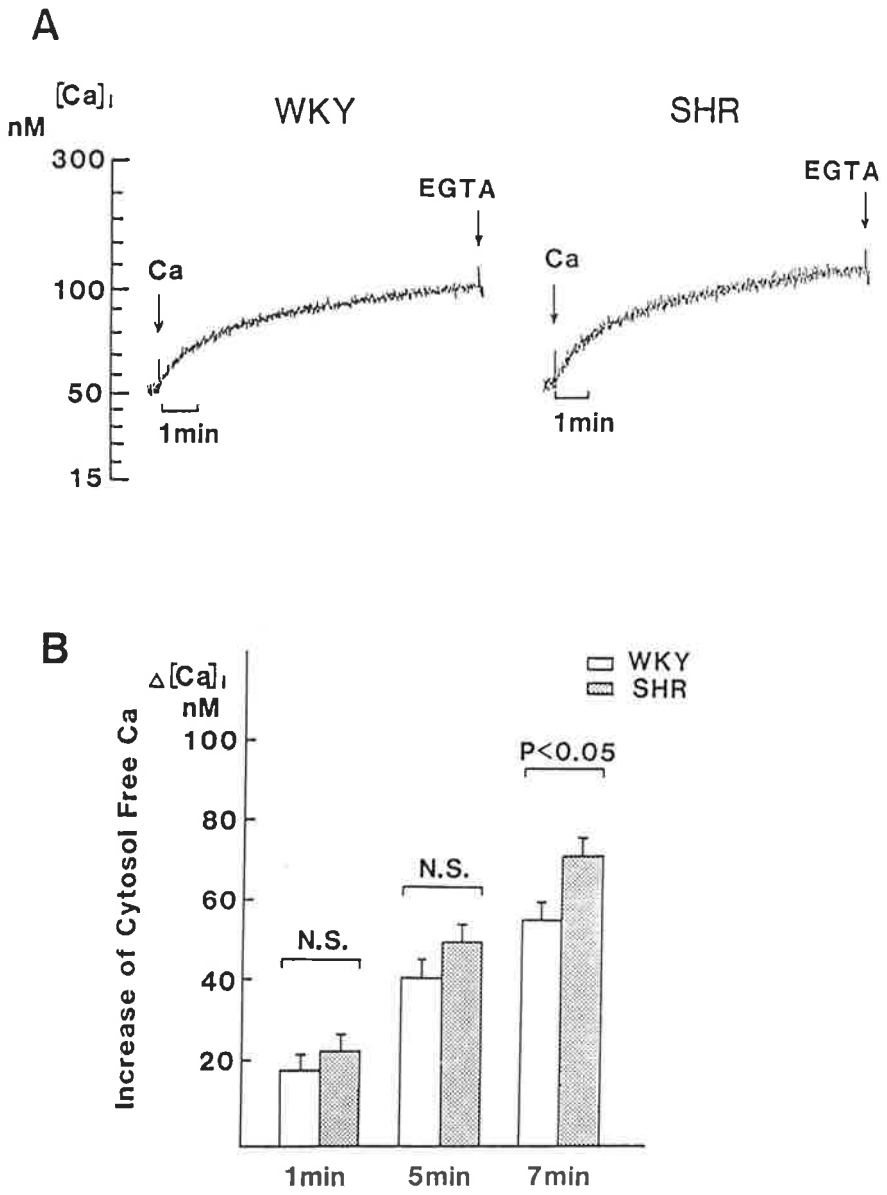


図1．A：細胞質遊離 Ca^{2+} 濃度の経時的変化
B：各時間における細胞質 Ca^{2+} 濃度増加の比較

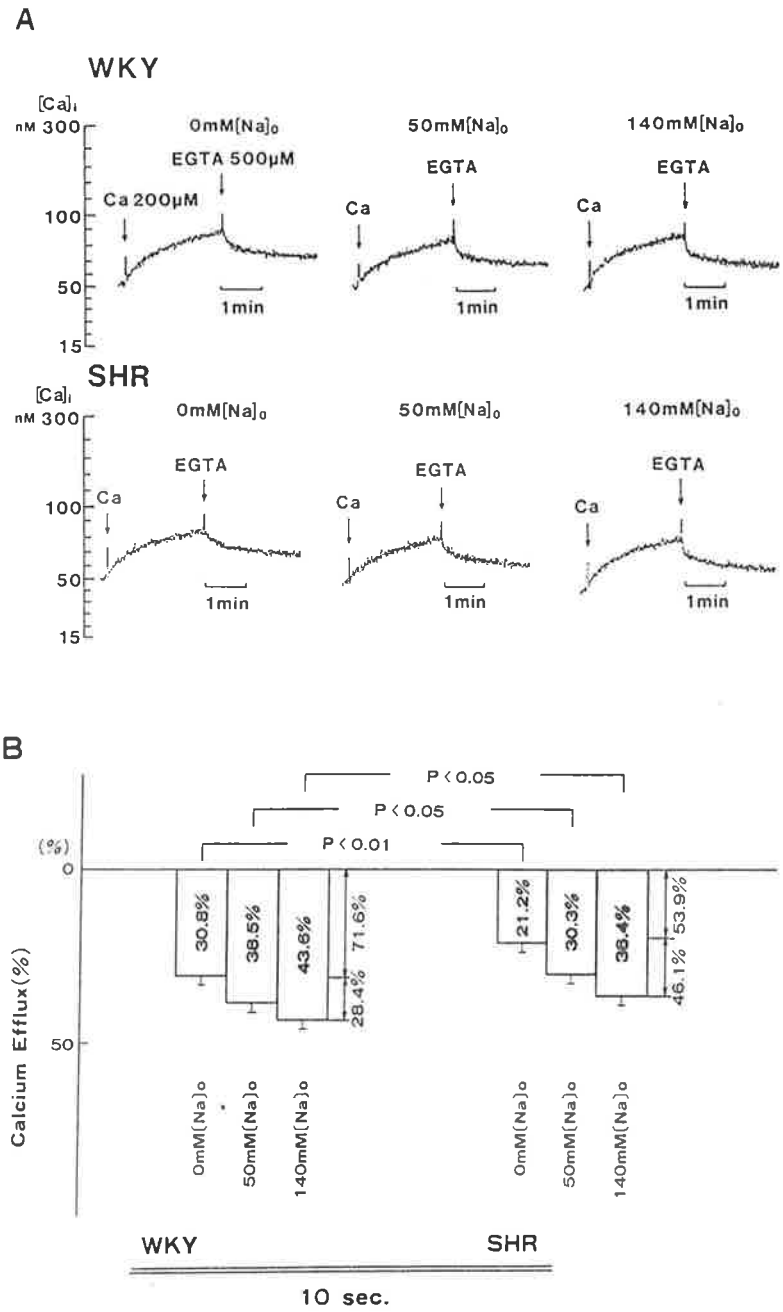


図２．A：Ca^{2+} efflux の経時的変化
B：Na^{+}存在下及び非存在下における Ca^{2+} efflux の比較

小腸の発生に伴う吸収細胞の糖輸送
（マウス小腸発生に伴う細胞膜ドメイン形成）

上里忠良（浜松医大）
藤田道也（生理研）

小腸上皮細胞は管腔側に微絨毛の小突起の構造を多数形成し，細胞極性を成す。このような上皮細胞の膜ドメインの形成は糖吸収などの生理的機能を維持する上で非常に重要である。本研究ではマウスを用いて腸の発生に伴う上皮細胞膜ドメインの形成を調べることにした。

方法は，まず微絨毛 (MVM) と側底膜 (BLM) を遠心分画法で精製し，それらに対する抗体を作成した。作成したポリクローナル抗体， anti-MVM 抗体および anti-BLM 抗体を用いて，胎児か成獣に至るまでの腸発生に伴う上皮細胞膜の変化を主にケイ光抗体法で調べた。まず MVM 抗体および BLM 抗体がそれぞれ Adult マウス小腸の微絨毛，側底膜を特徴的に染色することを確認した（図１）。

得られた各抗体を SDS- 電気泳動 -immunoblotting で調べると， MVM 抗体は比較的高分子の微

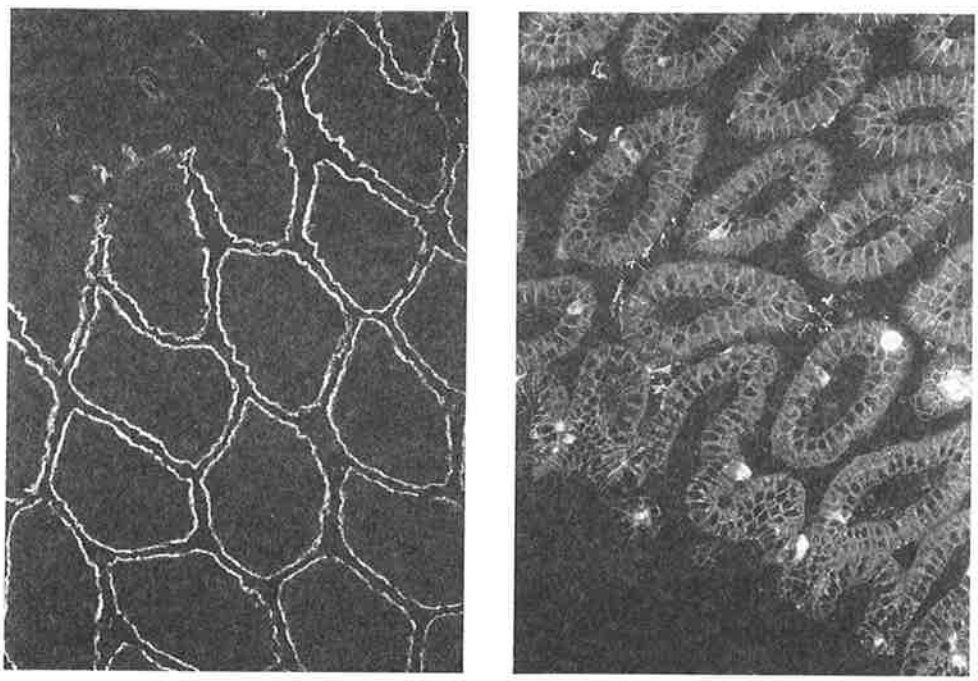


図１． Adult 小腸上皮細胞のケイ光抗体染色。
A ： anti-MVM 抗体
B ： anti-BLM 抗体

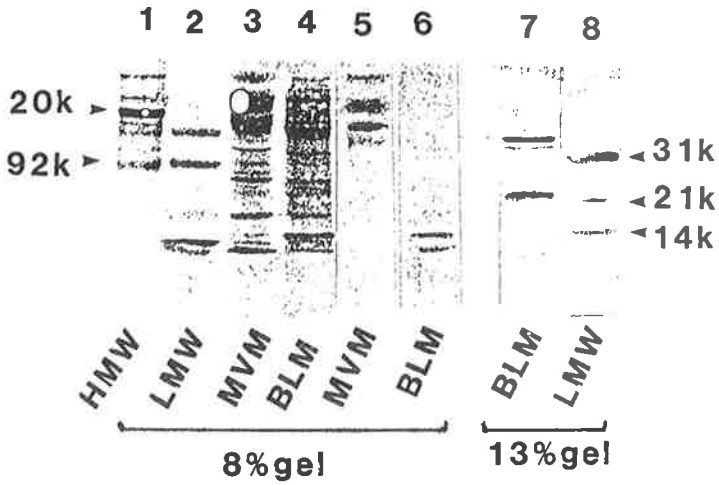


図 2．微絨毛膜 (MVM) および側底膜 (BLM) の immunoblotting. 1－4，8：タンパク染色；5－7：抗体染色 (HRP)；1，8：分子量マーカー

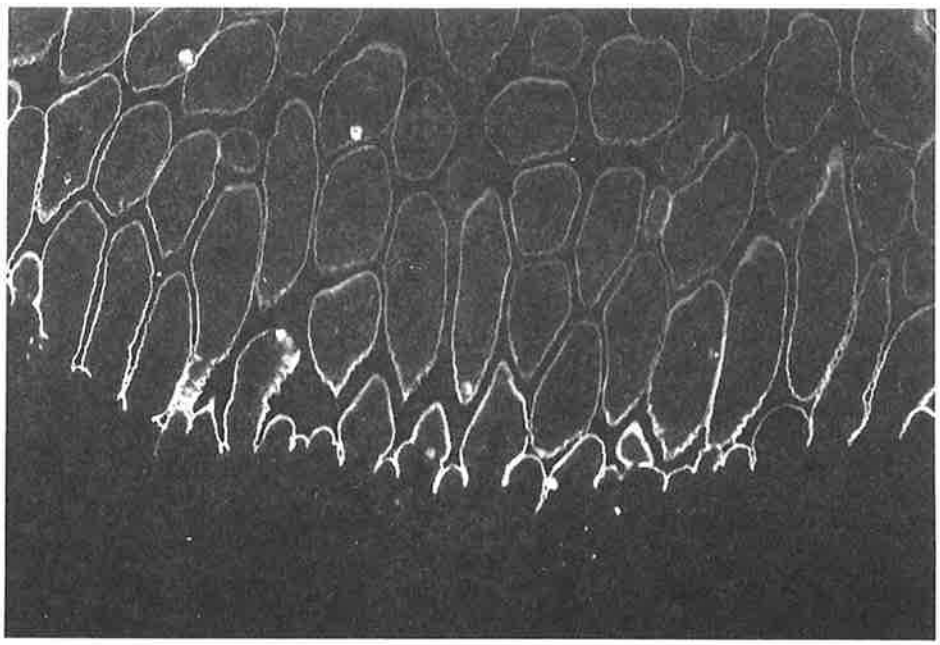


図 3．授乳期の小腸と anti-MVM 抗体の反応

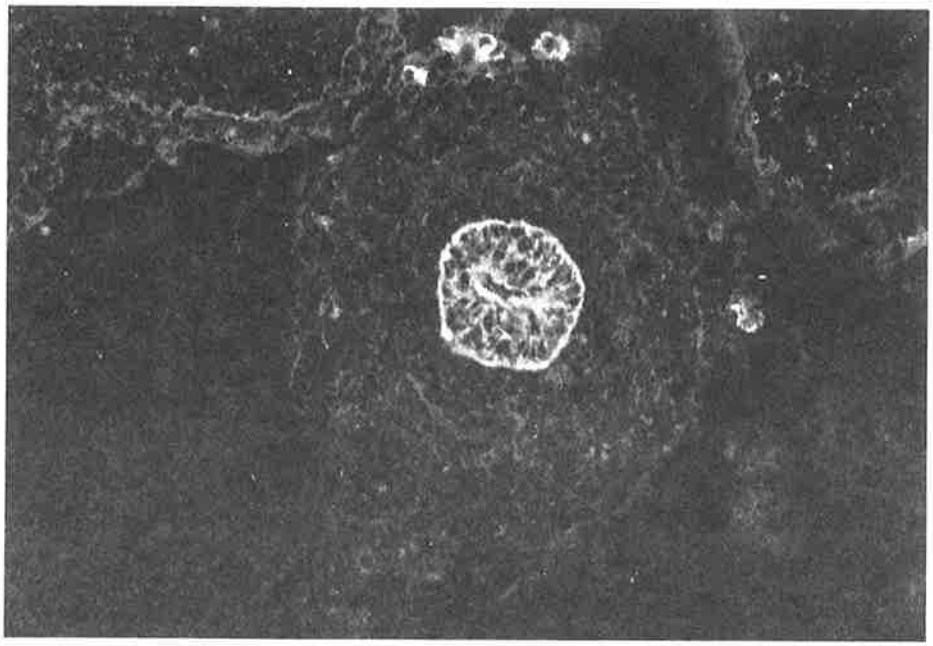


図４．胎児期の腸と anti-BLM 抗体の反応

絨毛タンパクと反応し，BLM 抗体は二つの低分子タンパクと反応することが分かった（図２）。これらの低分子タンパクは 21Kd, 40Kd で，BLM に specific であると思われる。

マウスの授乳期の小腸を MVM 抗体で調べると，生後２－３日では crypt 側が反応する（図３）。

そして離乳期直前から微絨毛が強く反応するようになる。これに対し，BLM 抗体で調べると授乳期でも胎児期でも比較的強く反応することが分かった（図４）。

胎児期の比較的初期（Fetus, 11－12日）から腸細胞は BLM 抗体に対してポジティブで，この時点での膜ドメインの区別は見られなかった。従って側底膜を構成しているタンパクは発生のかなり初期から存在し，微絨毛の形成（正確には adult 微絨毛膜抗体に対する抗原生）は授乳期後半に現われることが示唆された。

スンクス（和名ジャコウネズミ）小腸刷子縁膜の糖消化吸収能）

武居能樹（岐阜大・教養部）
横田邦男（名大・環境医学研）
藤田道也（生理研）

スンクス（和名ジャコウネズミ，*Suncus murinus*）は食虫目に属する最も原始的な哺乳動物であるが，系統発生学的にはラットやマウスなどのげっ歯目とは全く異なり，霊長類の直接の先祖で，ヒトと似た点が多いといわれている。幸い，名古屋大学で人工飼育，繁殖に成功し，実験動物としての有用性が明らかにされつつある。そこで，比較動物学視点からの研究の一環として小腸刷子縁膜の糖消化及び吸収機能の生化学的特性を明らかにする目的で本研究を開始した。

スンクスは野生集団由来のラインとそれらのライン間の交配群由来のラインを用いた。これらは名古屋大学環境医学研究所で育成されているものである。スンクス小腸からの刷子縁膜小胞の調製，二糖類水解酵素（スクラーゼ，イソマルターゼ，マルターゼおよびトレハラーゼ）活性とNa依存性グルコース輸送活性の測定および蛋白定量は常法にしたがって行った。なお，実験は個体毎に行った。

哺乳動物の小腸刷子縁膜に通常存在する二糖類水解酵素のうち，イソマルターゼ，マルターゼおよびトレハラーゼはどのスンクスにおいても検出された。マルターゼ活性がやや高いのを除けば，それらの刷子縁膜小胞の比活性は他の哺乳動物の値に比べて大きな違いはなかった。しかし，スクラーゼについては，活性が全く検出されない個体，活性の認められるものでもスクラーゼとイソマルターゼの活性比（S/I比）が高い個体と低い個体の合計3グループに分けることができるような結果が得られた。スクラーゼ活性の全くない個体はNem：NAG（野生由来のライン）およびNem：MI（交配群由来のライン）で見いだされた。スクロース含有水を飲ますとスクラーゼ活性欠損個体では体重の著しい減少が観察されたが，グルコース含有水ではそのような現象は見られなかった。事実，スクラーゼ活性欠損スンクスでもNa依存性グルコース輸送活性は正常であった。Nem：NAGの中でのスクラーゼ欠損型の遺伝子頻度は73.4％であり，Nem：MIでは調べた全ての個体がスクラーゼ活性欠損であった。スクラーゼ欠損遺伝子がスンクスにおいて保存できたのは，食虫目トガリネズミ科のスンクスは雑食性が強いものの高蛋白食で，スクロースを摂取する機会が少ないためであろう。Nem：NAGでの家系分析から，スクラーゼ欠損型は常染色体単一劣性遺伝子によって支配されていることが分かった。ヒトにおいても，スクラーゼ活性の欠損は常染色体単一劣性遺伝によるとされているので，これらのスンクスは疾患モデルとして有用なものと考えられる。今後は更に，国内で育成されているスンクスの他のラインおよび野生スンクスそのものについても検索の範囲を広げていきたい。

網膜双極細胞の機能形態学的分類

田内雅規（国立身障者リハセンター研）
金子章道（生理研・神経情報）

双極細胞は視細胞で受容した光の信号を神経節細胞に伝える役割を担う。双極細胞は光刺激によって脱分極あるいは過分極する二つのタイプが知られているが，形態学的には軸索終末の内網状層内分布を見ると各動物で十種弱に分類される。すなわち双極細胞には多様性があり，光情報が視細胞から双極細胞に受け渡される際に光情報の性質や双極細胞以後の処理過程にしたがって異なる型の双極細胞に振り分けられている可能性がある。本研究では双極細胞の特定の型を選択的に標識する試みを行い，その型の細胞がどの様な形態を持ち，また双極細胞総体の中でどの様な割合で存在するかを観察してその機能的役割を推論しようとしたものである。

実験には甲羅長 25cm 程度のクサガメ (Geoclemys reevesii) を用いた。双極細胞の標識のために 5, 6-dihydroxytryptamine （ 5, 6-DHT, セロトニン誘導体）と 4, 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を眼球内注入， Lucifer yellow CH を *in vitro* インキュベーション法で各々用いた。

5,6-DHT は 50 μg を眼球内に注入し，24時間後に眼球を摘出して強い青色光 (420-485nm)

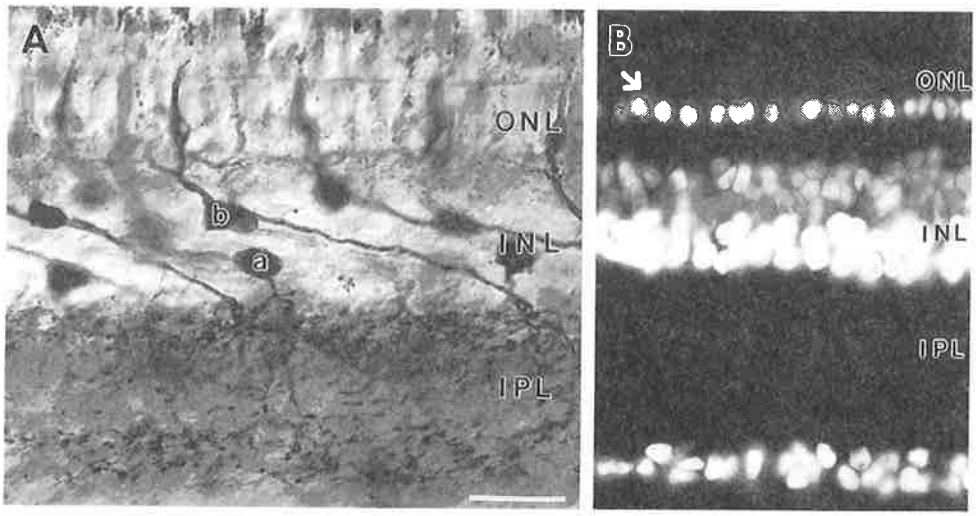


図１．網膜双極細胞の標識
Ａ：5, 6-DHT で標識された双極細胞 (b) とアマクリン細胞 (a).
Ｂ：DAPI で標識された網膜の細胞核，偏位双極細胞の核は矢印で示す． ONL, 外顆粒層 ; INL, 内顆粒層 ; IPL, 内網状層.
較正は 25 μm (A), 32 μm (B).

を Diaminobenzidine (DAB) 存在下で網膜に与えて反応させ，DAB 反応産物を顕微鏡下で観察した。それらは双極細胞とアマクリン細胞に局在している事が判った（図－１Ａ)。この 5, 6-DHT を取り込む双極細胞はその軸索突起の内網状層内分布から単一種であり，光照射時に過分極性に反応する型と見なされた。その細胞密度は網膜中心部で 4130cells/mm であった。一方核酸染色性を有する蛍光物質である DAPI を同様に眼球内に注入すると外顆粒層中の内側部にある細胞核のみが標識され，それらは二重染色あるいは細胞内染色法により偏位型 (displaced) の双極細胞であることが判った（図－１Ｂ，矢印)。その細胞密度は網膜中心部で 9400cells/mm であり，顆粒層の細胞の約1/3を占めていた。またその軸索終末の分布から脱分極性と過分極性の二種類のあることが推測された。全双極細胞は摘出眼球胚標本を 4% lucifer 溶液中で数十分 incubate する事により標識された。双極細胞の網膜中心部での密度は約 4 万 cells/mm であった。従ってインドールアミンを取り込む細胞は双極細胞全体の約11％であり，この型は必ずしも過分極型細胞を代表するものではないと考えられる。また偏位双極細胞は全双極細胞の1/4を占める事から細胞体の外顆粒層中の偏位が偶発的なものでなく何等かの特異的機能を持つ可能性が窺われた。

グリア細胞の水代謝
(培養グリオーマ細胞のゆらぎと攪拌効果)

冨田　稔，後藤文男，篠原　保（慶大・神経内科）
金子章道（生理研・神経情報）

MacDougall & McCabe[1]は，脳組織中に於て酸素ガスの diffusion が facilitate されることを報告し，その原因を細胞の代謝活性に求めた。Gotoh ら[2]は非代謝ガス，N_2 ですらもが脳組織で facilitate されることを認め，これを血管系の vasomotion によるものとした。昨年度私達はやはり非代謝性の水素ガスの transport が血管系を欠く細胞サスペンジョンにおいて facilitate されることを報告した[3]。今年度はこの細胞による facilitation の機序について解明を試みた。

方法：glioma C_6（NIH Nierenberg 研究室－金沢大学医学部付属神経情報施設神経物性研究部門東田陽博先生－藤田学園保健衛生大学生理学永田豊先生分与）を仔牛胎児血清加 DMEM で組織培養し，実験日に収集，細胞に DMEM 培養液を加えて dish に入れ，倒置型顕微鏡で観察し，video 装置により録画した。video 画面上で見られる細胞の大きさを，細胞の各 maturation の時期において５分毎に輪郭をなぞり，その変化を計測した。さらに浜松ホトニクス画像解析装置 (Argus 100) を用いて30秒間隔の細胞録画の subtraction を行い，細胞のどの部分に動きがあるか調べた。

結果：図１に５分間隔の細胞の輪郭を示す。細胞は絶えず変形，捻転，収縮，膨化していることがわかる。細胞膜の動きは平均２μm/20μm/300s であり，細胞直径あたりに換算すると± 3.3

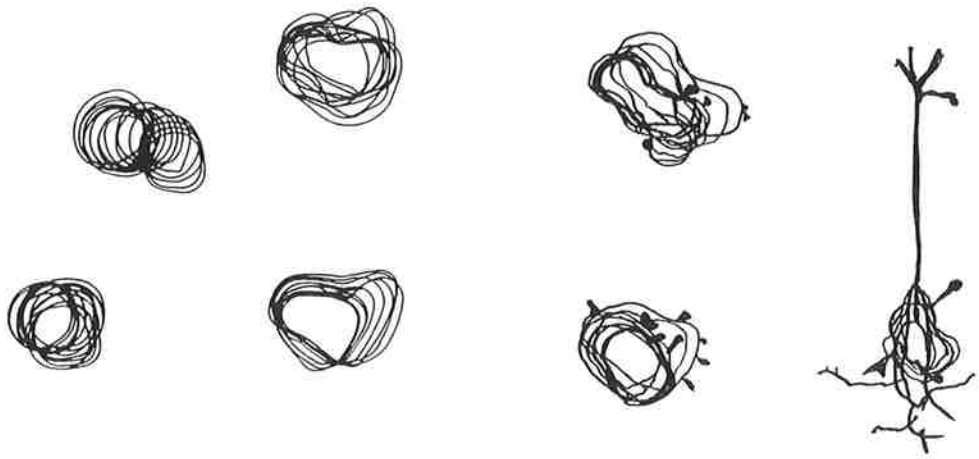


図１．ビデオテープ上の細胞（各 maturation における）の５分毎の輪郭の変化。

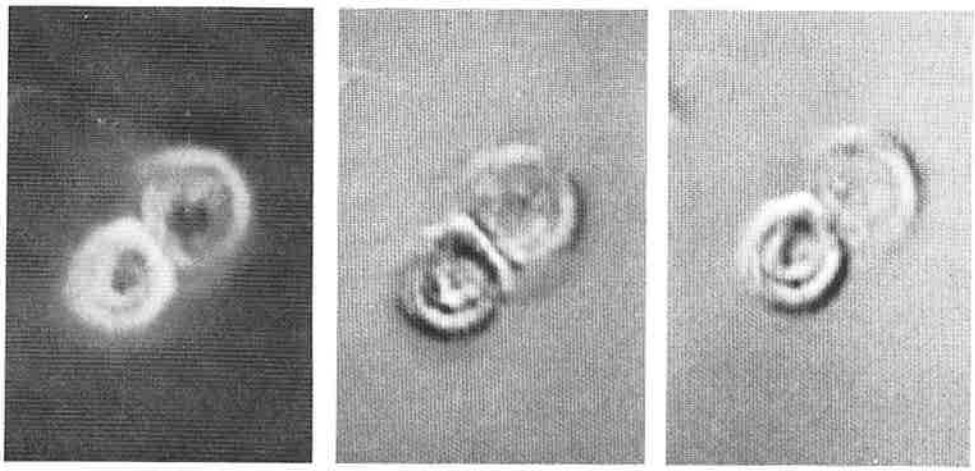


図２．30秒間隔の２枚の細胞画像 subtraction 像。Ａ：コントロール，Ｂ：30－０秒，Ｃ：60－30秒。細胞膜，核，細胞内小器官の動きに注意。

$\times 10^{-4}$/s であった。図２に２個の細胞の30秒間隔の subtraction 画像を示す。Ａは control, Ｂは０－30s, Ｃは30－60s の subtraction 画像である。写真から明らかなように細胞膜，細胞内の核，mitochondria を含む小器官が絶えず動いていることがわかる。細胞内小器官の最大の動きは± 3.3 $\times 10^{-2}$/s であった。

考案：組織の中で細胞は動きながら細胞外液を攪拌し，また細胞内でも核，小器官が揺らぎながら細胞内液を攪拌していることが示唆される。しかしここに測定した動きの大きさは，昨年報告した水素ガスの50％もの facilitation[(3)]を説明するには不十分である。実際にはこれらの機序だ

けでなく，更に video では見られなかった Kamiya[4]のいう endoplasmic flow, 小器官の jerky の動き， Nagasawa ら[5]の細胞膜を介するイオンの出入りに伴う水の coupled transport などの攪拌効果が加わっているものと想像される。

結論：細胞は絶えず動きながら細胞内外の水を攪拌しており，これは gas の transport を facilitation に貢献していると思われる。

文献

1) MacDougall, J. D. B. & McCabe, M. Nature 215 : 1173, 1967.

2) Gotoh F, Tazaki Y, Meyer JS. Exp Neurol 4 : 48, 1961.

3) Tomita, M., Gotoh, F. et al. in OXYGEN TRANSPORT TO TISSUE XII, edited by J Piiper et al., Plenum Publishing Co., New York, in press.

4) Kamiya N : Cytoplasmic streaming. Cell Struct Funct 9 (Suppl) : S81, 1984.

5) Nagasawa M, et al., Neurosci Lett 66 : 19, 1986.

視細胞内節の細胞骨格構造と機能

臼倉治郎（名大・医）

金子章道（生理研）

網膜視細胞は機能的にも構造的にも分極した細胞である。光受容部である外節は何百枚もの膜性円板からなり，毎日20枚以上の円板膜が新生代謝されている。一方，シナプス部は外節とは反対側にあり，ここでは多数のシナプス小胞が形成され，分泌され，信号伝達が行なわれている。しかし，これらの現象を詳細に検討すると重要であるにもかかわらず，その大半が未知であることがわかる。即ちどのように外節円板は形成されるのか，またシナプス部においてはシナプス小胞はどのようにしてシナプス前膜まで運ばれ，それに融合するのか，などである。これらの現象と運動系細胞骨格は極めて密接な関係にあると我々は推測し，その仕組みを明らかにするため形態的に骨格系を調べている。

免疫細胞化学的にその存在明かとなった細胞骨格蛋白は微小管および細線維としてのアクチンおよび中間径線維としてのビメンチンである。これらの蛋白の分布を全体的に眺めると微小管とアクチンは視細胞内節に広く存在する。またビメンチンは核周辺に最も多く認められた。一方外節には基部を除いてどの線維も存在しない。唯一存在すると思われる微小管も結合線毛の延長上にあり，外節先端部では形質膜下の細胞質に時々観察される程度である。一方，アクチンは外節基部，結合線毛の先端部分にのみ観察される。この辺りにはミオシンも存在し，円板膜形成にあずかっているという報告もあるが，我々の実験ではミオシンを確認できなかった。しかし，アクチンは外節ではこの付近にだけしか存在しないことから，円板膜形成あるいは外節形成に関係す

ると考えられる。マウスを用いて発生を追って急速凍結置換法により観察した。外節形成は生後約5日目より結合線毛の発生と共に始まるが，丁度そのころにアクチンも結合線毛上端に出現してくる。そして6日目頃より線毛の先端が膨らみ盛んに胞体を作り始める。アクチン線維はこの胞体形成に関与していると考えられる。後にこの胞体は融合し，つぶれて外節円板となる。したがって，従来とは多少異なった円板膜形成理論を持つに至った。

一方シナプス部であるが，シナプスではこれまでアクチンのみが豊富に存在することになっていたが，微小管も多数認められた。特に視細胞では微小管はシナプスリボン近傍にまで到達していた。形質膜直下を走行し，シナプス部を篭のように取り囲んでいることが判明した。またシナプス小胞は中枢のそれらと同様に微細フィラメントにより相互に結ばれており，自由でないことが形態から伺われる。これらの部分にはシナプス特有の細胞骨格であるシナプシン1やフォドリンなども当然存在するものと考えられるが，我々はまだその抗体を得ていないので，それらの線維を同定出来ないでいる。

今後の実験として，これらの線維蛋白の抗体あるいは antisense RNA を細胞内に注入しそれらの一部を崩壊させることにより，形態変化を誘導し，これらの蛋白の機能を推測したいと考えている。

網膜水平細胞の Ca および Na ホメオスタシスを光応答機能と関連づけて理解する研究

安井湘三（九工大・情報）
金子章道（生理研・神経情報）

脊椎動物視覚系2次ニューロンである網膜の水平細胞に関する研究は昔から非常に盛んであるが，とくに最近数年においてはイオン透過の膜機構の究明が著しく進歩した。すなわち，電位依存性の Ca^{2+}，K^{+}そして Na^{+}の非シナプス膜電流系，および視細胞の伝達物質として有力視されている L-グルタミン酸などの酸性アミノ酸で惹起される陽イオンのシナプス電流系が，主として金魚網膜より単離した水平細胞を用いて同定され，それぞれの性質が詳しく調べられた。他方，これら各種イオンの出入りを補償して細胞内ホメオスタシスを維持するための機構も働いているはずであり，主として Ca^{2+}と Na^{+}についてこの問題を解明することが本研究の主目的である。すでに報告したように，Na-Ca 交換機構と Na-K ATPase が金魚水平細胞に存在することをパッチ電極を用いた一連の whole-cell 膜電位固定実験により示すことができた（本年報，第10巻）。

現在，これらの結果に基づいて水平細胞膜機構の総合シンセシスという問題に取り組んでいる。すなわち，非シナプス電流系は全体としてN字型の電流・電圧曲線で記述されるが，これとシナプス電流系の特性曲線との交点が水平細胞の緩電位性光応答を決める，と考えられる。さらに，

Na-Ca 交換も Na-K ポンプも電気的に非中立であるからN字型の非シナプス成分に寄与している筈であり，従って光応答にも影響を与えているに違いない。システム工学の理論から電流系の安定性を考慮しつつ，以上の状況を目下解析中である。

本年度で得た主な実験結果は Ca イオン貯蔵庫に関することである。すなわち，－10～－30mV の膜電位固定下で，カフェインを外液に与えると単離水平細胞に一過性の三角波膜電流が外向きに生じた。この結果は endoplasmic reticulum が Ca ストアとして機能していることを示唆する。さらに，以下の実験により，この Ca 貯蔵庫の容量を見積ることを試みた。まず Co → Co + Na free → Na free → Co + Na free という順序の「イオン窓」を外液に施して，0mV 付近の膜電位固定下膜電流を記録した。Co → Co + Na free の切り替えは Co 効果が完了してから行った。Co + Na free → Na free とすると内向きに電流がシフトし始めた。Na free であるから Na-Ca 交換は作動していないが，Co^{2+}がはずれたので Ca 電流が流れ出したと解釈される。この内向き成分は徐々に増大するが，やがて極大となり以後減少して当初の Co + Na free のときのレベルに戻った。Ca 貯蔵庫が飽和したために細胞質中の Ca^{2+}量が高まり，その結果 Ca チャンネルの不活性化 (Ca-dependent Ca-channel inactivation) が起こったと考えてよい。事実，Na free → Co + Na free にしても膜電流に変化はなく，Ca 電流はこの段階ではもはや消失していることが Co テストで確認された。以上によれば，中間の Na free のイオン窓内で生じた内向き電流成分の積算から細胞内に流れ込んだ Ca^{2+}の総量が求まる。この結果は平均値が数 mM となり，従って水平細胞には大容量の Ca ストアが存在すると結論される。

網膜における中枢神経支配の免疫組織化学的研究

河又邦彦（秋田大・教育・生物）
大塚輝彌（生理研）

脊椎動物の網膜には中枢から遠心性神経繊維が投射することが知られている。最近，魚類の nervus terminalis （終神経）の一部が網膜に投射することが明らかになった。われわれは網膜におけるこの遠心性神経の役割を解明するため，これまでキンギョ網膜における終神経の神経終末の免疫組織化学的な解析を行なってきた（生理研年報10巻：49－50頁）。今回は，引き続き終末部の微細構造を解析した。

キンギョ網膜に投射する遠心性神経繊維は，視神経乳頭から網膜に侵入して視神経繊維層を放射状に走行し，視神経細胞層と内網状層を上行して最終的に内網状層の第一層に達する。ここで細かい樹状の軸索終末に分岐して網状構造を呈する。この神経終末には直径 0.5 μm 前後の膨大部が多数見られた。超薄連続切片を作製し，神経終末の立体再構築を行なった結果，膨大部の83％には直径約 40nm の小型の小胞が多数集積し，隣接する神経細胞の突起には膜の肥厚が認め

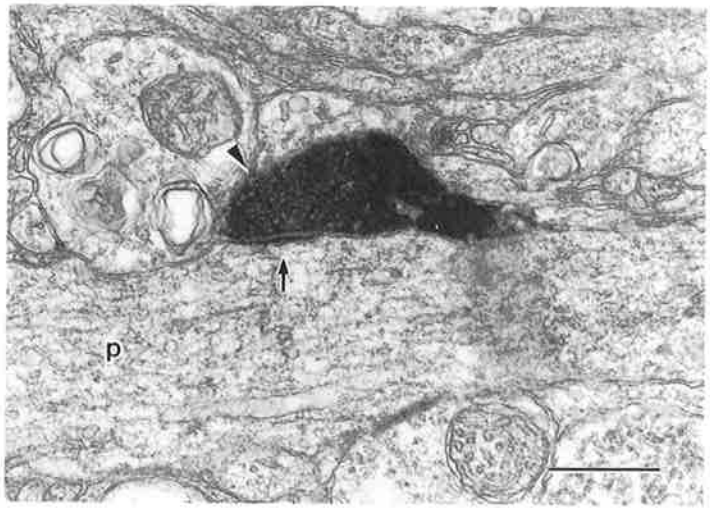


図１．キンギョ網膜遠心性神経線維の出力シナプスの電顕像
FMRFamide の抗体に陽性の遠心性神経線維の終末には小型のシナプス小胞が多数集積した膨大部（矢頭）が有り，隣接する網膜神経細胞の突起 (p) には膜の肥厚（矢印）が見られる。横棒は 0.5 μm 。

られた（図１）。これは遠心性神経繊維から網膜神経細胞への出力シナプスと考えられる。膨大部にはこの他に直径約 100nm の大型の小胞の集積も認められたが，後シナプス様の構造が見られなかった。

遠心性神経線維の生理的機能は不明であるが，今回は遠心性神経線維が網膜神経細胞の突起に出力シナプスを作ることを確認した。今後さらに小胞の内容物の同定と後シナプスの網膜神経細胞を明らかにする必要がある。

K.Kawamata, T. Ohtsuka, and W. K. Stell : Electron microscopical study of immuno cytochemically labeled centrifugal fibers in the goldfish retina.
J. Comp. Neurol., 293 : in press (1990)

筋紡錘感覚神経終末における伸張感受性チャネルの超微形態

伊藤文雄（名大・医）
藤墳規明（名工大）
大森治紀（生理研）

筋紡錘感覚神経の無髄軸索終末には伸張感受性イオンチャネルがあることは推察されている。

しかし，この無髄終末をパッチ電極でギガシールするには，あまりにも細い（直径 0.1 μm で長さ 100 μm 以上)。そこで我々はこのチャネルの超微形態を急速凍結割断法で膜内粒子をレプリカ上で探し，その中から伸張感受性イオンチャネルに相当する粒子を同定しようと本研究を計画した。

食用ガエルの半腱様筋から筋紡錘を単離し，その伸張応答を記録した後，凍結割断して感覚神経末端のレプリカを作り，電顕で観察した。特に今回は，ディープエッチング法を使って，無髄軸索内の細胞骨格と，軸索外の細胞外マトリックスとの連絡状況を検討した。

その結果，無髄軸索終末内には長軸に沿って微小管が走り，これと直交する横断軸には microfilament が網状細胞内骨格を作っていることがわかった。細胞膜上の伸張感受性チャネルやそれと細胞内骨格との連関は同定できていない。microfilament の 1 部は細胞外マトリックスとも網状構造を作り，さらに紡錘嚢や錘内筋線維表面とも連絡していた。これらの観察結果から，筋紡錘の伸張により感覚神経終末が容易に変形を受けること，細胞外マトリックスと無髄軸索内部との栄養因子の相互作用があることなどが推定できた。

大脳皮質視覚野における可塑性制御機構の研究

小松由紀夫，山本亘彦，黒谷　亨，外山敬介（京府医大）

大脳皮質視覚野細胞の視覚反応性は幼弱期の視覚体験によって可塑的な変化を受けることが知られている。Kasamatsu と Pettigrew (1976) は 6-Hydroxydopamine によって視覚野のノルアドレナリン作動性線維を化学的に破壊すると，片眼盲による視覚野細胞の眼優位性の可塑的変化が発現しなくなることを見いだし，視覚野の可塑性はノルアドレナリンによって発現が制御されるという説をだしている。しかし，他の方法で視覚野内ノルアドレナリン含量を減らしても必ずしも可塑性が失われないことから，この説に対する反対がある。本年度の研究では，視覚野の可塑性に対するノルアドレナリンの役割を検討する目的で，視覚反応の可塑的変化の基礎と考えられる長期増強に対するノルアドレナリンの影響を脳切片標本で調べた。

長期増強が最も発現しやすい生後 4 － 5 週の仔ネコより得られた標本において，白質の試験刺激 (0.1Hz) によって視覚野に誘発される電場電位の電流源密度解析を行い，sink から興奮性シナプス電流の大きさを求めた。長期増強の大きさを条件刺激（2Hz, 15分間）を与える前と後の sink の大きさの比で評価した。コントロール液では条件刺激を与えてもⅣ層やⅥ層の単シナプス性の早い電流はほとんど変化せず，Ⅱ－Ⅲ層とⅤ層の多シナプス性の遅い電流がわずかに増大するだけであった（1.3倍)。ノルアドレナリン (30 μM) や β アゴニストのイソプロテレノール (2.5 μM) を灌流液に加えると，Ⅱ－Ⅲ層とⅤ層の遅い電流の増強が促進され，Ⅱ－Ⅲ層では1.6倍に，Ⅴ層では1.9倍となった。しかし，Ⅳ層とⅥ層の早い電流には増強は見られなかった。

GABA 抑制を Bicuculline で抑えると全層で長期増強の発現が促進された。Ⅳ層とⅥ層の早い電流は共に1.7倍に，Ⅱ－Ⅲ層の遅い電流は1.8倍に，そしてⅤ層の遅い電流は1.7倍となった。この条件でβアンタゴニストのチモロール (20μM) を加えると，遅い電流の増強は小さくなり，Ⅱ－Ⅲ層で1.5倍，Ⅴ層で1.1倍となった。これに対して，Ⅳ層とⅥ層の早い電流の増強は全く影響を受けず，Ⅳ層で1.8倍，Ⅵ層で1.6倍であった。

Ⅳ層とⅥ層の早い電流は外側膝状体細胞から視覚野細胞へのシナプス伝達により生じ，Ⅱ－Ⅲ層とⅤ層の遅い電流は皮質細胞間のシナプス伝達により生じている。従って，ノルアドレナリンはβリセプターを介してⅡ－Ⅲ層とⅤ層での皮質細胞間のシナプス伝達の長期増強の発現を促進すると結論される。しかし，外側膝状体細胞から皮質細胞へのシナプス伝達の長期増強には全く関与していないと思われる。以上の結果はノルアドレナリンは視覚反応の可塑的変化を促進するという考えを支持する。しかし，その関与なしに可塑性変化が起こりうることも示唆している。

培養神経細胞回路網の膜電位変化の光学的記録システムの開発

時岡　良，田口隆久，葛西道生（阪大・基礎工学部）
谷藤　学，外山敬介（生理研）

本研究は電位感受性色素 (voltage-sensitive dye) を用いた膜電位の光学的測定を chick embryo の終脳神経細胞の初代培養系に適用するための実験装置の開発が主な目的である。

膜電位感受性の色素を用いた膜電位変化の測定の場合には，吸光度変化を記録する方法と，蛍光強度変化を記録する方法の２通りある。我々のシステムは培養皿上での単一の神経細胞からの光学的記録を目指すものであり，得られる光強度変化が，スライス等の試料に比べ，微弱なものになることが予想された。しかし，培養細胞のように background が小さくできる試料には，倒立顕微鏡を用い落射蛍光で測定することにより，S/N 比を上げ，シグナルが検出可能となると考えた。

微弱な蛍光変化を検出するには励起光強度の大きい光源ほど有利なので，光源は輝度の大きな水銀灯 HBO-100W/2 mercury-arc lamp (Osram W. Germany) を使用した。しかし，既製の点灯装置では数％のリップルがあり，このままでは使用は困難であることが判明した。そこで，A. Grinvald ら用いている arc-lamp shunt regulator を作製することにした。これはランプの揺らぎを reference フォトダイオードで検出・増幅し，ランプと並列に入っているトランジスタのベース部へ印加することにより，定電流電源からの電流を適当にバイパスするものである。例えば，ランプの光が明るくなったときにはV_{BE}を高くして，トランジスタへのバイパス電流量を上げ，ランプへの電流を減少させるようにフィードバック制御を行なうものである。この結果ランプのふらつきは50分の１程にまで減少した。

さらに，電磁シャッターの組み込みによる細胞への光化学ダメージの軽減，油浸の対物レンズを使用による開口数のアップ等の改良の結果， whole cell clamp したニューロンからの膜電位変化に対応した蛍光変化を検出できるようになった。 styryl 系の蛍光色素である RH-160, RH-237, RH-414, RH-421 のいずれを用いた場合にも膜電位 100mV 換算で数%の大きなシグナル（Δ F/F ）が得られた。

本研究により，この培養系での膜電位の光学記録の目処がたった。しかし，水銀アークの飛びによる揺らぎ（数 Hz 以下の遅い周波数成分をもつ）を除去できないことや，蛍光色素の泣き所である退色に起因する記録時間の制限（露光時間のトータルが数秒）など未解決な問題も残っている。今後はそれらの問題を克服し，フォトダイオードアレイ等にシステムアップし，多点同時記録を試みる予定である。

神経細胞の表面糖鎖の役割
—神経細胞表面抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いた研究—

村上富士夫，小田洋一，勝丸博信（阪大・基礎工学部）
谷藤　学，小坂俊夫，外山敬介（生理研）

細胞膜には糖脂質，糖蛋白質，プロテオグリカン等の糖結合物が存在するが，これらの糖結合物は細胞の分化，発生，癌化などの過程において重要な役割を果していると考えられている。また，神経系においてもこれらの糖結合物は細胞の移動，軸索の伸展，束形成，シナプス形成などの制御に関与していると考えられている。

最近得られたモノクローナル抗体 (MAb) 473 は，既存の概念では説明できない大脳皮質や中脳，脊髄などの神経細胞のサブセットを染色することが明らかになった。またその抗原分子はコンドロイチン硫酸プロテオグリカンらしいことが示され，その局在部位は細胞表面付近であることが明らかにされている。

いっぽう最近藤田らによって得られたモノクローナル抗体 374 も光顕下では同様な染色像を与えるが， MAb473 とは異なったニューロンのサブセットを染色する。この差を生ずる原因として MAb374 と 473 では抗原分子が全く異なることによる可能性と，異なるが類縁性がある可能性が考えられる。本研究ではこの問題に関する手掛りを得るために， MAb374 の抗原の局在を免疫電顕法によって検討した。

実験にはラットを用い，灌流固定後 (g. a. 0.1～0.5%＋p. a. 4%), マイクロスライサーを用いて切片を作製し， ABC 法で反応の後 DAB で発色させエポンで包埋した。観察は無染色でおこない，電顕は生理学研究所の Jeol－100CX を用いた。

大脳皮質，海馬，視床網様核を観察対象に選んだが，いずれの部位においても反応産物はシナ

プス終末部を除く神経細胞表面に観察された。DABによる反応産物に拡散が起こり得ることを考えると抗原の局在部位の詳細な特定は困難ではあるが，細胞表面付近の細胞外マトリックス，グリアのプロセス，無髄神経と思われる小さなプロセスの表面に反応産物が観察された。また神経細胞のゴルジ体も陽性であった。一部の細胞では細胞体膜直下の細胞質や樹状突起の細胞質に非連続的に反応産物が観察された。

以上の結果は，374抗体と473抗体の抗原の局在部位とに多くの共通性があることを示している。また374抗原の生化学的研究の結果は，これがMAb473抗原と同様プロテオグリカンであるとの考えを支持するものとなっている。このことはMAb374抗原と473抗原の間に類縁性のあることを示唆している。

網膜視神経細胞の形態と機能の関連

渡部眞三（発達障害研・生理）
福田　淳，森際克子（阪大・医・第2生理）
田内雅規（国立リハセンター研）
佐々木仁（兵庫医科大・第2生理）

ネコ網膜の視神経細胞 Retinal Ganglion Cells の形態学的分類は，Boycott & Wassle (1974) によってGolgi染色で得られた像の樹状突起の特長に基づきα，β，γに分類されたのが始まりである。これらの形態を持つ視神経細胞の生理学的性質，外側膝状体各層や上丘等の中枢投射部位，がその後報告されている。さらにHRP細胞内注入法を用いて，従来報告されていない形態の視神経細胞も近年明らかになりつつある。本研究の目的は，ネコやサルのような視覚のよく発達した動物の視神経細胞の形態と，それらの中枢投射の違い，および軸索再生の可能性を検討することである。

本年度は，日本学術振興会の短期招聘によって来日したR. W. Rodieck博士 (University of Washington, Department of Ophthalmology) との共同研究で，ネコの外側膝状体内側中間核 (Medial Interlaminar Nucleus, MIN) と翼部 (Geniculate Wing, GW) に投射する視神経細胞の形態をHRP細胞内注入法で調べた。そしてネコにおいても，視神経を切断した後に末梢神経の移植吻合によって視神経細胞の軸索が再生するかどうか，また視神経細胞のタイプによって特に再生しやすいもの，再生しないものがあるかどうかを検索した。

1．外側膝状体周囲核に投射する視神経細胞の形態

方法：笑気麻酔下，脳定位固定下でネコのMIN, GWにDextran分子に結合させた蛍光色素 (Dextran-conjugated Tetramethylrhodamine, Dxt-Rh, とDextran-conjugated Fluorescein) を注入し，数日後に再び笑気麻酔下でネコの眼球を摘出して網膜を取り出しAmes培養液内で数時間培養し

た。蛍光色素で逆行性に標識された視神経細胞内にHRPを注入し固定後DAB反応でその形態を求めた。結果：MINに投射する視神経細胞の形態はα細胞がほとんどであった。GWに投射する視神経細胞は均質な形態のε細胞のみであり，これらが均等に配列していわゆるhexagonal arrangeを形成していた。以上の結果の詳しい解析は，現在R. W. Rodieck博士の研究室で行なわれている。

2．末梢神経移植によるネコの視神経再生

ラットやハムスターで報告されている視神経細胞の軸索の移植末梢神経への再生が，ネコでも可能かどうかを調べた。方法：成ネコの左視神経を笑気麻酔下で切断してその網膜側断端に同一個体の坐骨神経を移植し，約60日後に同じ麻酔下で移植神経遠位端に15% HRP, 10% Dxt-Rhの混合液を圧注入した。2日後にNembutalで再び深麻酔し，移植手術をした左眼に至近から強力な光（3,000lux以上）を照射して，逆行性に標識されて視神経細胞体内にあるDxt-Rhを樹状突起全体に広げた。約30分後0.8% praformaldehyde-1% glutaraldehydeで潅流固定し，網膜を摘出して蛍光顕微鏡で観察し，さらにDAB反応の後伸展標本を作成して，軸索を再生した視神経細胞を調べた。結果：実験した13匹のうち3匹の網膜（3例）で手術が成功し，全視神経細胞の

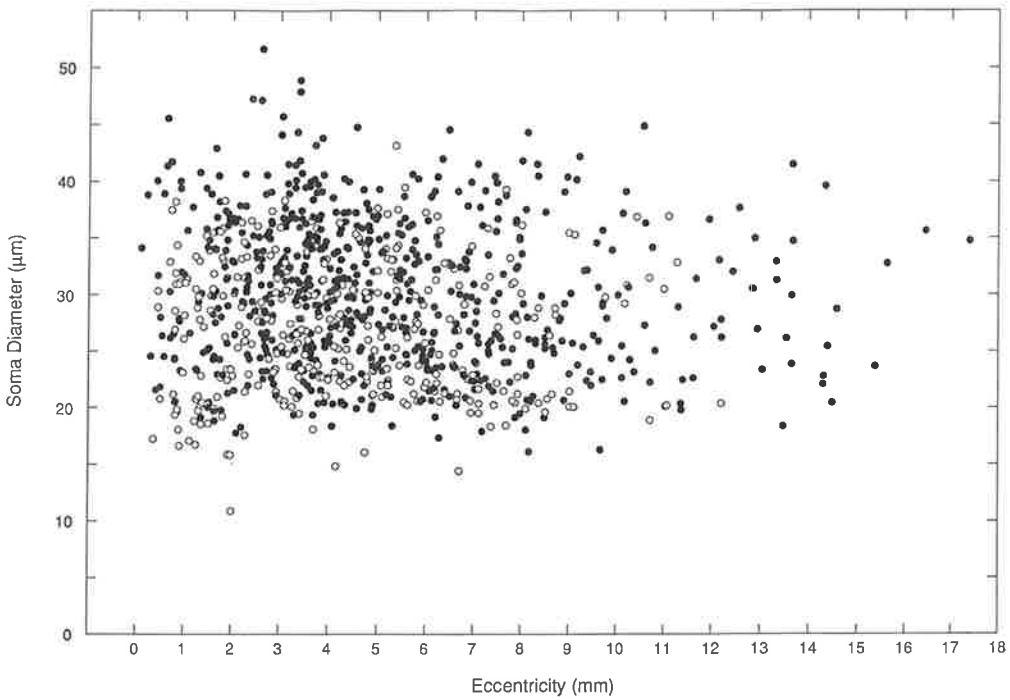


図1．軸索を再生した視神経細胞の直径（縦軸，μm）と中心野からの距離（横軸，mm）の関係。○：CTP-5 (N＝327), ●：CTP-6 (N＝663)。直径は細胞体の面積と同等の円に換算して求めた。分布が一様で特に傾向は認められない。

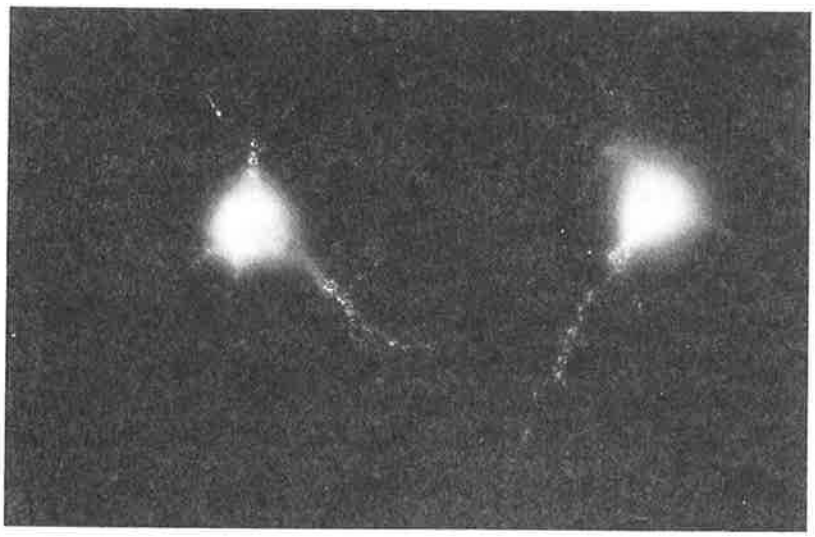


図２．Dextran-Rhodamine で標識された視神経細胞の落射蛍光顕微鏡写真。樹状突起に焦点が合わせてある。細胞体の大きさ（約 35 μm ）と樹状突起の形態から α 細胞の可能性が高い。

１％以下ではあるが軸索を再生していることが証明できた。軸索を再生した視神経細胞は網膜の全域にわたって見られたが，視神経乳頭に近いほどその密度が高い傾向を示した。HRP で標識された再生視神経細胞の細胞体の大きさを計測した結果，それらの直径の範囲は 10 μm から 50 μm であった。ほとんどの視神経細胞が変性していて正確な中心野が不明瞭のため，血管走行から想像される中心野を求め，そこからの距離 (Eccentricity) と細胞体の大きさとの間の相関関係を求めたが（図１），α，β 細胞に見られたような周辺部で細胞体が大きくなる傾向は認められなかった。Dxt-Rh で標識された顕微鏡像から，少なくとも α，β 細胞の軸索は再生していることが示唆された（図２）。

軸索を再生した視神経細胞の生理学的な性質と本来の中枢投射部位，網膜内でのシナプスの形態，さらには軸索再生が効率良く起こる方法の開発，中枢での reinnervation の生理・形態学的な検証，などが今後の課題である。

後根神経節細胞のペプチド合成調節機構

久野　宗，杉浦康夫，辻本哲宏，稲石洋子

後根神経節細胞にはカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) を含む多種のペプチドが存在するが，CGRP は感覚神経にも運動神経にも存在する点で特異的である。後根神経節細胞のペプチドの中で，サブスタンス P (SP) と CGRP の合成は神経成長因子 (NGF) によって促進されるが，VIP (vasoactive intestinal polypeptide) の合成は NGF に依存しないことが知られている。しかし，これらの結果は培養後根神経節細胞から得られたものであり，生体内における CGRP の合成が単に NGF によってのみ調節されているかは不明である。感覚神経細胞の NGF は末梢の標的組織から逆行性に輸送されるから，NGF に依存するペプチドの合成は末梢神経の切断により影響されることが予測される。本研究では，ラットの後根神経節の CGRP の含有量を測定し，末梢神経あるいは後根神経の慢性的切断によりどのように変化するかを検討した。

(1) 方法：

生後 4 ～ 6 週齢のラットの坐骨神経あるいは腰髄の後根を切断し，術後 9 日に腰髄の後根神経節を摘出し，CGRP の含有量を測定した。CGRP の定量には酵素免疫測定法を用いた。

(2) 末梢神経と後根切断の影響：

一側の坐骨神経を切断すると，術側の腰髄後根神経節の CGRP の含有量は正常側の約85％に有意に低下した。したがって，後根神経節の CGRP の合成は末梢からの因子によって促進的影響を受けていると仮定できる。これに対し，後根を切断すると，術側の腰髄後根神経節の CGRP 量は正常側の2.7倍に上昇した。したがって，中枢側からの因子は CGRP の合成を抑制していると仮定される。この両者の影響が加算するかを検討するために，坐骨神経と後根の両者を切断した。術後 9 日には，術側の後根神経節の CGRP 量は正常側の約81％で，坐骨神経の切断のみの場合と同様であった。この結果は，末梢側からの後根神経節の CGRP の合成促進と中枢側からの抑制効果は独立的な過程ではなく，末梢からの合成促進過程が中枢側から抑制されていることを示唆する。末梢側からの合成促進に参与する因子としては感覚神経のインパルスの活動性と NGF の供給が考えられる。このいずれが主要因子であるかは現在不明であるが，後根神経節の合成調節には少なくとも複数の因子が参与すると結論される。

(3) 前根切断の影響：

骨格筋の CGRP 含有量は除神経によって著しく低下するから，筋の CGRP は神経由来であることは疑い無いが，運動神経と感覚神経のいずれからより多く由来するかは明かでない。これを検討するために腰髄の前根を切断して運動神経を変性させた後にひらめ筋の CGRP 含有量の変化を測定した。一側の腰髄前根を切断して 9 日後では，術側の筋の CGRP 量は正常側の1.7倍に有意に増加した。同様に，腰髄の後根神経節の CGRP 含有量も術側は正常側の1.6倍に上昇した。したがって，運動神経の変性により後根神経節の CGRP の合成が促進されると仮定される。現

在，運動神経の除去がどのような機構によって感覚神経細胞の CGRP の合成調節のシグナルとなりうるかは不明である。

実験的パーキンソン病モデルにおける眼球運動の研究

岩村吉晃，坂本正裕，福田秀樹（東邦大・医・第一生理）
今井寿正（順天堂大・医・神経内科学）
彦坂興秀，加藤　誠，宮下暢夫（生理研）

研究目的

黒質のドーパミン作動性細胞は，運動の発現や調節にきわめて重要な働きをしている。しかし，その機構は明かでない。 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydro-pyridine (MPTP) とその類似物質は，黒質のドーパミン作動性細胞を選択的に破壊し，パーキンソン病に酷似した症状をひきおこすことが知られている。本研究では， MPTP とその類似物質をサルの黒質あるいはその投射領域である線条体に局所的に注入することによって，自発的な眼球運動（サッケード）や睡眠中の急速眼球運動がどのように障害されるかを調べる。

計画

スクリーン上の光の点を注視し，それを追って眼球運動をおこすようにサルを訓練する。全身麻酔下で手術をおこない，眼球運動測定のためのコイルを眼球結膜に装着し，線条体にむけてガイドチューブを刺入固定する。浸透圧ミニポンプをもちい，このガイドチューブを通して MPTP あるいはその類似物質を長期にわたって注入する。さまざまな課題をもちいて眼球運動（とくにサッケード）や頸筋筋電図を記録し，解析する。眼球運動を測定にはサーチコイル法をもちいる。まず，随意的な眼球運動の変化をいくつかの課題を用いて調べる。特に，視覚刺激にもとづくサッケードと記憶にもとづくサッケードの違いを明らかにする。次に，睡眠の REM 期に特徴的に現れる急速眼球運動がどのように変化するかを調べる。

研究成果

福田，坂本が中心となって睡眠中の眼球運動の研究をおこなった。サルが自然な睡眠を夜間継続してとれるような実験室の環境をつくった。脳波，筋電図，眼球運動の計測に加えて，赤外線ビデオ装置をもちいての観察も可能にした。

正常のサルでは，約１時間の周期をもつ自然睡眠が観察された。これは脳波の異なる周波数帯域の選択的な活動に一致していた。サーチコイル法によって眼球運動が正確に測定できた。REM 期の眼球運動は正常のサッケードに近い速度をもち，しばしば正中から40度以上偏位することがあった。

ヘミパーキンソニズムのサルでは睡眠周期が不明瞭だった。脳波上で深睡眠と判定される時期

が少なく，眼球運動の休止期と活動期の境界があきらかでなかった。眼球の位置が一側に偏位し，その方向は睡眠の前期と後期で異なる傾向にあった。

生体膜機能発現機構におけるCキナーゼの役割

亀山正樹，亀山亜砂子（生理研），M. S. Shearman, 西塚泰美（神戸大）
関口和生（大塚製薬徳島研），当瀬規嗣（北大），矢沢和人（旭川医大）

イオンチャネルの活動がチャネル蛋白のリン酸化によって調節されることは，多くの組織で提唱されているが，その決定的な証拠となる知見は少ない。この研究は，Cキナーゼがイオンチャネルの調節に果たす役割を明らかにする目的で計画され，主に心筋のCaチャネルを対象にしてAキナーゼの効果と対比させながら生化学的ならびに電気生理学的実験をおこなった。

心筋Caチャネルは，Aキナーゼの活性化によってその開口確率が増大することが知られているが，そのリン酸化の基質は，チャネル自体である可能性は高いものの未だ確定していない。また，Cキナーゼについても，フォルボールエステルによる心筋Ca電流の増大等から，Aキナーゼと同様の調節機構が提案されている。しかし，前年度のこの共同研究で，心筋Caチャネルを再構成したリポゾームからの，K脱分極で誘発されるCa流束がAキナーゼによるリン酸化では増大するが，Cキナーゼによっては影響を受けないことが明らかになった。このときリン酸化される膜蛋白を ^{32}P でラベルし，SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動／オートラジオグラフィー法で再度検討したところ，前年度報告したAキナーゼでリン酸化される170kの蛋白は220kの位置に検出された（この蛋白は壊れやすいものと思われる）。更に，Caチャネルの光親和性リガンドであるazidopineの膜蛋白への結合を調べてみると，220k蛋白がnifedipineで抑制される特異的結合を示すことが判明した。従って，この220k蛋白はCaチャネルの α_1 サブユニットと考えられる。一方，Cキナーゼでは，この220k蛋白はほとんどリン酸化されないことが再確認された。

つぎに，心筋Caチャネルのリン酸化による調節を再検討する目的で電気生理学的実験をおこなった。モルモットの単離心筋細胞において，50mM $BaCl_2$, 3 μM Bay K 8644（Caチャネルアゴニスト）をつめたピペットを用いてcell-attached形式のパッチクランプをおこないCaチャネル電流を記録した。この後，細胞抽出液中で膜パッチを引き離し，チャネルのrun-downを防止しつつinside-outパッチの状態にした。この条件下で，AキナーゼまたはCキナーゼをMgATP (3－5mM) とともに膜パッチの内側面に作用させ，Caチャネルの活動に対する効果を検討した。まず，Aキナーゼ (catalytic subunit, 140－1400U/ml or～0.1－1 μ M) では，チャネル活動の著名な増大が認められ，これは，既に報告されているようにチャネルの数や単一チャネルコンダクタンスの増加によるものではなく，開口確率の増大によるものであった。一方，Cキナーゼは，

心筋では優位に存在するtype III（α）を24－240U/ml (～0.1－1μM) の濃度で作用させたが，チャネル活動に著名な変化を認めなかった。以上の結果は，先のリボゾームを用いた実験結果と合致するもので，提唱されているCキナーゼによる心筋Caチャネルの調節は，存在するとしても，細胞内の代謝状態もしくはイオン環境の変化等を介する2次的なものである可能性が高いものと考えられる。

現在，Cキナーゼによるイオンチャネルの活動の調節が種々のチャネルについて様々の組織で示唆されているが，今後更に，キナーゼのチャネルに対する直接作用，リン酸化基質の同定，リン酸化とチャネル機能変化の相関などの研究を進めていく必要があると思われる。

クロマフィン細胞の膜電流動態の解析と脳移植への応用

西野仁雄，端谷　毅（名市大・医）
大森治紀，粟生修司（生理研）

神経組織の移植により障害された脳機能を修復することができるようになってきた。しかし脳内移植には，1）移植組織の選択・確保，2）栄養因子，3）免疫応答の制御など克服されなければならない問題点がある。本研究では，脳内移植に応用することを目標として，副腎組織を培養し，長期間生存可能なカテコラミン産生細胞をえた。

Wistar系妊娠ラットより胎仔（胎日令14～16日）をえた。背部切開により副腎をとり出し，実体顕微鏡下で血管，結合織を除去した。副腎を6～8個の組織片に分割し，グルコース，グルタミン酸，アスコルビン酸，ラット血清およびウシ胎仔血清を加えたダルベッコ modified essential medium（DMEM培地）で培養した。組織片から大型および小型の球形細胞および線維芽細胞が遊走し増殖した。これらの細胞は培養後約1週間でconfluentとなった。非酵素下で，できるだけ線維芽細胞を含まないようにして球形の細胞を採取し，継代培養を行った。チロシン水酸化酵素(TH)抗体を用いて免疫組織染色すると，大型の球形細胞はTH陽性であった。thymidine analogueであるbromodeoxy uridine (BrdU) のとりこみをBrdU抗体染色法で検索し，細胞の分裂（S期の有無）を調べたところ，大型球形細胞の一部はBrdU陽性であった。電顕を用いてこの大型球形細胞の微細構造を調べると，クロマフィン顆粒と見なされる電子密度の高い顆粒を内蔵することがわかった。これらの細胞は3カ月間以上にわたり，安定して培養可能であった。

以上，14～16日令のラット胎仔よりえた副腎組織を培養し，長期間にわたり安定して分裂増殖するカテコラミン産生細胞をえた。

今後は本細胞の発達にともなう膜電流特性の解析を行うとともに，運動障害の修復を目標として，パーキンソン病モデルラットへの移植に応用したい。

嗅覚識別における前頭連合野の役割

小川陽一（奈良医大・第１生理）

前頭連合野が嗅覚系と線維連絡を持つことは，解剖および電気生理学的に明らかにされてきている。そこで，嗅覚識別における前頭連合野の役割を明らかにするために，嗅覚弁別学習に対する前頭連合野破壊の効果を調べた。

密閉式Ｔ字型迷路を用いて，１頭のネコに餌を報酬とした嗅覚弁別課題を学習させた。におい物質は iso-amyl acetate と β -phenetyl alcohol を用いた。前者のにおいを入れた目標箱を選択することを正反応とした。訓練は１日10試行とし，矯正法で行った。学習基準は10試行中９試行以上の日が３日連続することとした。学習成立後， pentobarbital 麻酔下 (30mg/kg, ip) で前頭連合野 (gyrus proreus, gyrus rectus) を吸引除去した。手術後７日の回復期間の後，手術前と同じ手続きで再学習を行わせた。手術後の成績はチャンスレベルに低下し，その後回復を示したが再学習には手術前の学習よりも多くの試行数を必要とした。

また，同じＴ字型迷路を用いて，一頭のネコで視覚弁別課題（白－黒弁別）を学習させ前頭連合野破壊の効果を調べた。その結果，手術後一時的に成績の低下が生じるが，手術前の学習の約15％の試行数で再学習が成立した。

以上の結果は，前頭連合野破壊は手術後一時的に生じる非特異的障害だけでなく，嗅覚に特異的な障害を生じさせることを示唆している。

Olfactory coding in the monkey lateral hypothalamus and its catecholaminergic regulation

Karadi, Z.（生理研）
Oomura, Y.（九大・１生理）
Nishino, H.（名市大・生理）
Shimizu, N. and Aou, S.（富山医薬大・和漢研）

The activity of glucose-sensitive (GS) and glucose-insensitive (GIS) neurons was recorded in the lateral hypothalamic area (LHA) of monkeys during olfactory stimulation, a conditioned alimentary bar press task, and microelectrophoretic application of catecholamines. Olfactory stimuli evoked responses of 88% of the GS neurons, and 52% of the GIS cells responded to odors. The GS neurons were more broadly tuned across odorants than the GIS cells, and their responses to various smells with distinct hedonic value were also differential. The odor-responding GS neurons were depressed

CATECHOLAMINE EFFECTS ON ODOR-RESPONDING AND NONRESPONDING LHA CELLS

		Odor (+)		Odor (−)	
		GS	GIS	GS	GIS
NA	Increase	3	2	0	1
	Decrease	16	7	2	4
	No resp.	12	11	3	14
DA	Increase	2	12†	1	1
	Decrease	12*	1	1	3
	No resp.	17	7	3	15
	Total	31	20	5	19

GS neurons, with responses to odorants, are primarily inhibited, those of the GIS cells, mainly facilitated by DA (*$p<0.05$, †$p<0.001$; χ^2 test).

during the bar press and reward periods of the task, and were mainly inhibited by dopamine. The odore-responding GIS cell acitivity increased in response to cue light and tone, and was facilitated by dopamine. Histological examination disclosed topographic dissociation of the odor-responding GS and GIS cells : the former were located in more ventromedial regions than the latter. The results indicate that the GS neurons integrate multiple chemosensory inputs from both endogenous and exogenous soufces in the regulation of feeding ; whereas the GIS cells distinguish among fewer, more specific cues to control food acquisition behavior.

脳・免疫系制御における視床下部・自律神経系の役割

堀　哲郎（九大・医・第１生理）
新島　旭（新潟大・医・第１生理）
大村　裕（富山医薬大・和漢薬研）
粟生修司（生理研，九大・医・第１生理）
清原寿一，中島敏博（佐賀医大・医・生理）
大森治紀（生理研）

神経系及び免疫系の細胞には共通した情報伝達物質と受容体とが存在し，脳と免疫系との間には相互通信がある。我々は既に，脳が免疫系を修飾する現象として情動及び環境温熱ストレスや，視床下部刺激などが，脾臓の natral killer (NK) 細胞の活性を低下させる事を報告した。また，免疫系から脳へ信号が送られている証拠として免疫サイトカイン (IL-1, interferon α, TNF) が視床下部ニューロンに作用して発熱，睡眠，摂食抑制などを起こす事及びその調節機構を明らかに

した。更に，前年度の本研究において，免疫系信号の一つである IL-1 が視床下部を介して副腎及び免疫臓器の一つである脾臓の交感神経活動を増加させることも見い出した。つまり，視床下部は免疫系信号に応答し，内分泌系，自律神経系及びホメオスタシス系を作動させ，免疫系を制御する事が判明しつつある。

「学習された無力感」を誘発する情動ストレスを動物に与えると，脾臓の NK 細胞の腫瘍細胞攻撃能力が低下し，移植した悪性腫瘍の成長が加速する。これらの反応は naloxone で消失する。このストレス免疫系修飾における視床下部及び自律神経系の役割を調べた。

種々の opioid を脾細胞に直接作用させると， NK 細胞活性は高進する事が確認されている。そこで，β endorphin (10－25 μg) 或は morphine (10－25 μg) をラット脳室内或は視索前野前視床下部へ注入すると，脾 NK 細胞活性（ standard chromium release assay で調べた）は減少する事がわかった。更に，我々が以前，見出した様に，免疫サイトカインの一つである interferon α （ IFN α ）は視床下部ニューロンのオピオイド受容体を介してその活動を変化させるので，マウス IFN α (1000－2000U) をマウス側脳室内に投与し，10分後に脾 NK 細胞活性を調べた所，用量依存的に抑制された。これらの量の β endorphin, morphine, IFN α の静脈内投与では NK 活性は変化しない。上記 3 物質の脳内投与による脾 NK 活性低下は naltrexone 前処置により減弱ないし消失する。従って，上記のストレス免疫系変調の現象には，血中 opioid ではなく，ストレスにより賦活された脳内 opioid 系が関与していると結論される。

更に，この現象の脳からの遠心性機序を解明する為に，脾臓を支配する交感神経活動を記録しながら， IFN α (1000U) を側脳室内へ注入した所，10－20分後から神経活動が著明に増加し，1 － 2 時間持続する事を見い出した。脾臓交感神経を切断し，その末梢端を電気刺激すると，約10分後には脾臓の NK 細胞活性が著しく低下する事がわかった。更に，脾臓徐神経したラットで，IFN α 脳内投与による脾 NK 細胞活性低下が減弱する事を現在確認しつつある。以上の事から，ある種の情動ストレスによる脾 NK 細胞活性低下の少なくとも一部は，脳内オピオイド系の賦活→脾臓交感神経活動高進→ノルアドレナリン放出→ NK 細胞 β レセプターという機序で起こる事が推論される。脳内オピオイド系の賦活による下垂体副腎皮質系の活性化がこの現象にどの程度関与するかは現在追求中である。

Meissner 神経叢の機能

横山正松（福島県立医大）
石川一志（旭川医大）
尾崎　毅（生理研）

実験装置は昨年度（1989）生理学研究所年報第10巻記載の通りである。テンジクネズミの小腸の一部でL－字状切片を切り出し，縦走筋小片と輪走筋小片の接合部で，縦走筋及びAuerbach神経叢（以下A. pl.と略記）を静かに剝ぎ切除する。直下にある粘膜下層とMeissner神経叢（以下M. pl.と略記）を損傷しないよう細心の注意を払う。実験は，このM. pl.が露出していると思われる箇所に刺激電極を当て経壁的にM. pl.を刺激し，縦走筋及び輪走筋の反応を調べる。一連の実験終了後Methylen blueで染色し，組織学的にM. pl.の存在を確認する。

M. pl.の頻数電気刺激は，縦走筋に弱い収縮の促進を引き起こし，少し遅れて輪走筋に1～2回の強い収縮を起こす。この効果は縦走・輪走両筋に対し強い収縮を起こしたA. pl.刺激効果とは明らかに異なる。Atropin 10^{-5}M投与は縦走筋促進効果を著明に減弱し，場合によっては，緩除な弛緩が起こる。この抑制の本態はなお不明である。

M. pl.の頻数電気刺激によって起こる輪走筋収縮も，A. pl.刺激効果と同じく，縦走筋促進発現により遅れて起こる。この遅れの本態も不明であるが，Apamin 5×10^{-7}の投与によって遅れがなくなることから内在神経刺激によって先ず輪走筋に抑制効果が働いていることは十分考えられる。

C_6 10^{-5}M投与によって輪走筋収縮も，縦走筋促進も減弱するが消失することはない。

以上の成績からM. pl.からSynapseを介し，小腸縦走・輪走両筋に促進作用を，又縦走筋に弱い抑制作用を起こすことがわかり，M. pl.が小腸運動に調節作用を持つことが結論される。

横山はこの数年来，尾崎，S. Tsuji（Paris大）らとの共同研究でテンジクネズミの正常小腸管，粘膜除去小腸管，粘膜と粘膜下層除去（M. Pl.なし）小腸管の，蠕動発生と蠕動活動度を調べ，今年度次の表の成績を得た。M. pl.を除くと蠕動能力が著明に低下することがわかった。

表1．3種小腸管の伸展による蠕動活動度

	蠕動発生閾圧値 (cmH_2O)	蠕　動　波 (cm/s)	発生内圧値 (cmH_2O)
正常腸管	0.5－2.0	1.5－3.0	10.0
粘膜なし腸管	1.0－4.0	0.8－2.0	3.0
粘膜・粘膜下層なし腸管	6.0－9.0	0.3－0.9	0.5

海馬の行動活性物質の探索

小野　哲（都立立川短大）
内薗耕二（静岡県立大）
尾崎　毅（生理研）

[目的] 前年度までの本共同研究において，海馬の亜鉛結合物などの機能を調べるバイオアッセイ法として行動分析法を開発し，海馬抽出物投与の影響を調べてきた。これまでに，海馬ホモジネート上清を脳室内に投与すると一部の行動分析指標に変化が生じる事実を見出し[1]，またその上清の CENTRIFLO CF25 処理沪液には上記活性が認められなかった[2]。本年度は CENTRIFLO で沪過されない画分について検討した。

[方法] 行動分析は連続回避法（シドマン法）に準じた方法を用いたが，装置，行動分析条件，行動分析指標などについては文献３，４を参照されたい。

生理食塩水で20％モルモット海馬ホモジネートを得，12,000rpm, 20min 遠心上清をマイレク

表１．レバー押し行動に対する海馬抽出物脳室内投与の影響

処　　置	処置後（時　間）	行動分析指標[a)]							
		1	2	3	4	5	6	7	8
手術のみ									
生理食塩水	1.5								
	20								
海馬ホモジネート	1.5								
上清	20				↑				
海馬ホモジネート	1.5								
CENTRIFLO 沪液	20								
海馬ホモジネート	1.5								
CENTRIFLO 非沪過部	20								↑

a）指標 1 ： Response Rate (Responses/min)
2 ： Shock Rate (Shocks Deliverded/min)
3 ： Sum of Squares of Shock-Shock Intervals (Sec^2)
4 ： Lever Pressing Chain (Numbers of LPC/h)
5 ： Lever Pressing Chain (Means of SR TIME)
6 ： Lever Pressing Chain (No. of SR less than 5sec)
7 ： Lever Pressing Chain (No. of SR over than 100sec)
8 ： Maximum Response Density/min

スHA (MILLIPORE) で沪過。沪液を CENTRIFLO CF25 (AMICON) で処理後3回生理食塩水で洗った後，CENTRIFLO で沪過されない試料画分を得た。上記操作はすべて0－4℃の条件で行った。この試料又は生理食塩水を，シドマン法による訓練をのべ30時間以上くり返した Wister 系♂ラットの第三脳室に 2.0 μl/min の速度で 20 μl 投与，投与後1.5および24時間から行動分析を行った。今回は訓練したラット14匹中，最終的にデータとして採用し得るものは1匹のみであったため，生理食塩水投与の場合のみを対照群とし，上記試料投与の場合と比較した。

[結果] レバー押し行動に与える海馬抽出物投与の影響を8指標につき検討した結果を，これまでに得た結果と共に表1に示す。表中で上向き矢印は指標値の増加，下向きは減少，空欄は有意差がなかったことを示す（$P<0.05$）。今回得た試料を投与した際の影響は Marimum Response Donsity/min の増加のみが観察された。

[考察] 今回得られた結果は，1匹のラットに生理食塩水や試料液を反復投与して得た。したがって個体差の問題があり同様な実験をくり返す必要があり，他の対照も必要である。しかし，このラットに限れば Maximum Response Density/5min も増加傾向にあった（$P<0.1$）。今回変化を検出した Maximum Response Density は最近検討を開始した指標であり，指標の意味に関しては今後の検討課題である。

文献

1）生理学研究所年報 Vol. 19, (1988), p268－269

2）生理学研究所年報 Vol. 20, (1989), p252－253

3）T. Ono et al., (1987), J. Toxicol. Sci., **12**, 373－381

4）小野哲および和田攻，(1989), 日本衛生学雑誌 VOL44, p748－755

先天性 aganglionosis ラット消化管の神経支配

長浜真人（愛知県コロニー発達障害研・形態学部）

尾崎　毅（生理研）

我々は Hirschspurung 病のモデル動物である先天性 aganglionosis ラットの消化管を用いてその神経支配について形態学的に検索を行ない，消化管蠕動運動が欠如する部位に一致して myenteric plexus の存在しない部位が存在し，肛門側の大腸には神経節細胞の無い壁外性の神経線維束のネットワークが内輪外縦筋層間に認めた事を既に報告した。

今回はこの先天性 aganglionosis ラット消化管の submucous plexus について，光顕的・電顕的および免疫組織化学的に検索を行なった。アセチルコリンエステラーゼ染色，神経マーカーの一つである GTP 結合蛋白 α サブユニットの免疫染色により，myenteric plexus の存在する部位には，それに全く対応して submucous plexus の網目状構造が認められたが，逆に myenteric plexus

の存在しない部位では，submucous plexus の構造は認められなかった。肛門側の大腸では筋層間に認められた壁外性神経線維束の侵入と思われる神経線維束・神経線維が多数認められた。電顕的には，この神経線維束は表面平滑な神経周皮で堅く包まれており，末梢側の神経線維は細長い細胞体のシュワン細胞により覆われていた。また，筋層間のネットワーク同様に粘膜下にも神経節細胞は認められなかった。この神経線維群は tyrosine hydroxylase (TH), neuropeptide Y (NPY), VIP, substance P, 5-HT の免疫染色陽性の線維を多数混在させており，それぞれの末梢側では神経末端構造に相当すると思われる varicosity を多数認めた。これらの所見はヒト Hirschsprung 病の疾患部粘膜下に認められる不規則な神経線維群に極めて類似するものと思われた。

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，山田伸之，廖　登稔（明治鍼灸大）
星野　稔，矢内原昇，内藺耕二（静岡県立大）
尾崎　毅（生理研）

1．研究目的

針麻酔によって疼痛閾値が上昇することから針麻酔に鎮痛作用があることは明らかである。しかし，針麻酔の鎮痛機序については不明な点が多く，未だ定説はない。その中で脳内麻薬物質との関連性を支持する研究報告が多いが，脳内活性物質を同定するまでに至っていない。そこで脳内活性物質について検討する前に脳細胞の代謝系（グルコース代謝）に及ぼす影響とその作用部位について観察することにした。最近，鎮痛薬，麻酔薬の作用を評価する方法としてオートラジオグラフィ法による局所脳ブドウ糖消費量のマッピングが用いられている。今回は定性的であるが，デオキシグルコースによるオートラジオグラフィ法が針麻酔の鎮痛評価と脳内作用部位の解析法として有用であるかどうか，について検討したので報告する。

2．研究方法

1）実験対象：ウイスター系成熟ラット，300g～400g, 無刺激群，針麻酔群，侵害刺激群の3群に分けて，デオキシグルコース（DG：125uci/kg 注入）によるオートラジオグラムを作成し，比較検討した。

2）実験方法：①ハロセン吸入麻酔下にて [^{14}C] DG 注入と採血のための左大腿動脈，静脈にカニュレーションを行う。②覚醒後（①の行程1時間後），無刺激群は30分経過後に断頭し，オートラジオグラムを作成。針麻酔群は覚醒後，足三里相当部位に 15Hz で筋収縮が生ずる程度の強度で30分間針通電し，その後断頭。侵害刺激群は覚醒後，針麻酔群と同様，針通電を行うが，啼声をあげ，痛みが生ずる程度の強刺激を30分間行い，その後断頭。断頭後各群のオートラジオグラムを作成。

3）解析方法：オートラジオグラムをオプティカルデンシトメータで透過光量を測定し，画像解析装置でカラーオートラジオグラムに変換してパターンの比較を行った。

3．研究結果および考察

今回の実験は定性的であるため，局所脳ブドウ糖消費量の定量的な比較検討は行っていない。定性的なDGによるオートラジオグラムを比較検討すると，針麻酔群では無刺激群のパターンと比較して大脳皮質のDGの消費量が亢進するのに対し，侵害刺激群では逆に抑制される傾向が認められた。このことは針麻酔の刺激と侵害刺激は異なることを示唆するものであり，また，刺激強度による脳細胞の反応が異なることをも示すものと考えられる。しかし，定量的な方法を採用していないため，この点についてさらに検討の必要がある。なお，これまでDGによるオートラジオグラムに関する針麻酔の研究については報告がないが，PETによるヒトの針麻酔の結果と比較すると類似の結果が認められた。

ラット下部腸管の外来神経支配

沖　　充，堂本時夫（島根医科大・第2解剖）
尾崎　毅（生理研・動物実験施設）

大腸運動の神経性調節においては，腸管と壁外神経節との間の神経連絡が重要な課題となっている[1)]。しかし，神経路の形態学的研究は少なく，特にペプチド含有神経の神経路については不明な点が多い。ラットの骨盤神経節は，大型の神経節を形成し，骨盤臓器の神経支配を研究する上で構造上有利である[2)]。そこで，上部直腸と腸壁外神経節の間を連絡するペプチド含有神経の神経路を，軸索内逆行輸送法と蛍光抗体法を用いて調べた。

【材料と方法】成熟雄ラットの上部直腸壁に逆行性蛍光色素(Fluoro-Gold)を注入した。6日後に動物を4% paraformaldehyde-PBSで灌流し，骨盤神経節と下腸間膜動脈神経節を摘出し，クリオスタット切片を作製した。VIP, NPY, GAL及びTyrosine hydroxylase (TH)に対する特異抗体を用いて蛍光抗体法を行い，蛍光顕微鏡下でFluoro-Goldによる標識細胞（UV励起）とFITC標識細胞（B励起）を比較観察した。また，別のグループのラットでは，両側の骨盤神経節にFluoro-Goldを注入し，直腸の伸展標本を作製して，上述の方法で観察した。

【結果】上部直腸壁に注入したFluoro-Goldによって標識される細胞は，骨盤神経節（節細胞の約25％が標識），下腸間膜動脈神経節（20％）で観察された（図1. a, c）。これらの標識細胞は，下腸間膜動脈神経節ではNPYを，また骨盤神経節ではNPYまたはVIPを含むことが免疫染色の結果明らかとなった（図1. b, d）。また，これらの神経節の連続切片を染色し，比較した所，NPY陽性細胞のほとんどがTH陽性細胞と一致したが，VIP陽性細胞とTH陽性細胞とは一致しなかった。一方，Fluoro-Goldを骨盤神経節に注入すると，直腸の筋層間神経節内に標識細胞

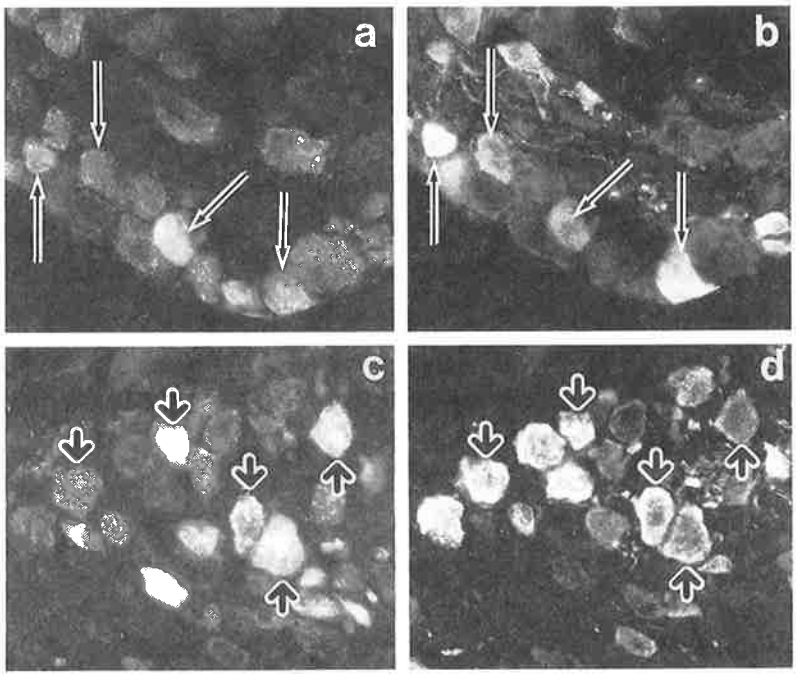


図１．Fluoro-Gold を上部直腸壁に注入したラットの骨盤神経節で観察された，Fluoro-Gold 標識細胞 (a, c) と VIP (b) あるいは NPY (d) 陽性細胞。
a と b，c と d はそれぞれ同一切片上での対応する細胞（矢印）を示す。　×240

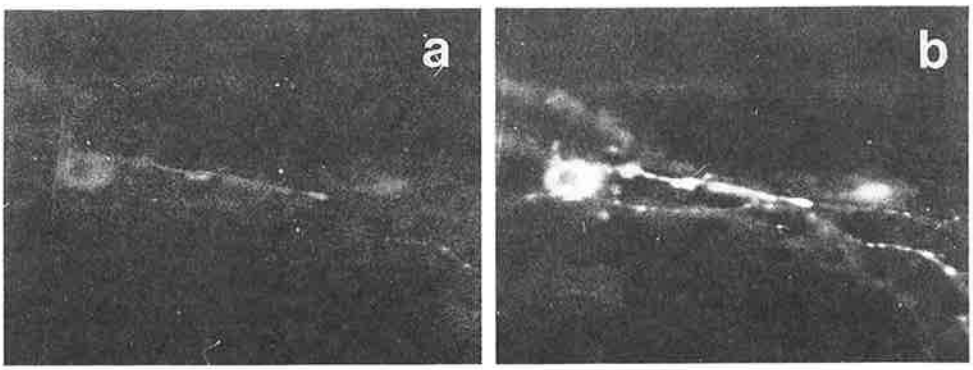


図２．Fluoro-Gold を骨盤神経節に注入したラットの筋層間神経叢で観察された，Fluoro-Gold 標識細胞 (a) と GAL 陽性細胞 (b)。　×240

が見いだされるが（図2, a），それらの一部はVIPまたは，GAL（図2, b）陽性を示した。また，腸壁内神経節細胞には，VIPとGALの共存も認められた。以上の結果，ラットの直腸は，下腸間膜動脈及び骨盤神経節内の交感性神経細胞を起始細胞とするNPY含有神経や，骨盤神経節内の非交感性神経細胞を起始細胞とするVIP含有神経の支配を受けていることが明らかとなった。一方，骨盤神経節には，腸壁内のVIPまたはGAL陽性細胞からの線維が認められる。ラットの生殖器の一部と骨盤神経節との間には反射弓が形成されていて，神経調節が存在するが[3]，同様な反射弓は，直腸と骨盤神経節との間においても存在し，ペプチド含有神経が関与している可能性が本研究から示唆された。従って，今後，直腸と骨盤神経節において相互に連絡しあうペプチド性神経の同定や，腸管運動とペプチド含有外来神経との関係について形態学的及び薬理学的研究を進めてゆきたい。

1）Growcroft P. J. et al. (1971), J. Physiol. **219** : 443－461.
2）Gabella G (1985), The rat nervous system Vol. 2 (ed. by Paxions G.), pp. 325－353.
3）Purinton P. T. et al. (1971), Nature New Biol. **231** : 63－64.

Duchenne型筋ジストロフィー特異的欠損蛋白質ジストロフィンの単離とその構造解析

桑山秀人（帯大・教養化学）
杉浦全代，江橋節郎（生理研）

実験材料は新鮮な豚筋肉（－80℃保存）を用い，ヒト・ジストロフィンの一部分（配列440－489および3495－3544の合成ペプチド）を抗原として作製したウサギ抗血清によりジストロフィンを同定した。ATP, プロテアーゼ阻害剤およびEGTAの存在下ハッセルバッハ・シュナイダー溶液（3容量で2回）さらに20mMTris（pH8.2, 3容量で4回）により筋組織の水溶性蛋白質をよく除去したのち，3%Triton X-100（pH8.8, 1容量）を加え，生体膜構成成分を抽出した。免疫抗体と特異的に反応する約400kDa蛋白質（ジストロフィン）は弱アルカリ性条件でTriton X-100により膜構造蛋白質成分として可溶化された。Triton存在下での粗ジストロフィンの分画濃縮において，江橋と古賀により報告されたジメチルスルホキシド(DMSO)による分画法を試みたところ，ジストロフィンは15－45%DMSO分画に効率よく沈殿濃縮された。従来から用いられている硫安塩析法はTritonが遊離するので使えなかった。DMSO分画法はTriton（非イオン性界面活性剤）存在下での蛋白質濃縮に非常に有効と思われる。濃縮した粗ジストロフィンはゲル濾過(TSKgel トヨパール HW75C), 陽イオンカラムクロマトグラフィー(TSKgelSP トヨパール 550C), およびSDS存在下ポリアクリルアミドゲル電気泳動(120mm×150mm×6mm)により，約400kDaの均一成分として単離された。（約100 μg/500g筋組織）。

精製物 (0.5mg) を 20%TCA で遠沈後，エーテル洗浄により SDS を除いた乾燥試料に 100 μl の 5%BrCN/70% ギ酸を加えた。得られた BrCN ペプチドを 8M 尿素存在下 HPLC でゲル濾過分離すると約 10kDa 分画に合成ペプチド3495－3544（ Met を含まない）の抗体と強く免疫反応を示す断片ペプチドが溶出した。逆相マイクロボアカラム (RPMB) をもちいる HPLC で免疫反応分画を精製後減圧乾固し， 50 μl の 0.1M NH_4HCO_3 さらに 1 μl の 0.1%Trypsin/1mM HCl を加えて加水分解を行なった。 Trypsin 分解物はさらに RPMB をもちいて分画精製した。得られた精製 trypsin ペプチドをシークエンサーで分析したところ 10－20 pmol の SerProAlaGlnIleLeuIle Ser-, AsnLeuGlnAlaGluTyrAsp-, および GlyLeuSerProLeuProSefProProGlu- が同定された。これらはそれぞれアミノ酸配列の3490－3497，3519－3525，および3535－3544に一致することからヒト・ジストロフィン遺伝子のＣ端側シーケンスは豚骨格筋中に存在することが示された。

高次運動領野の生理学的・神経組織学的研究

丹治　順（高次液性調節）
徳野博信（金沢大・医）
木村　実（自治医科大）

高次運動野とは，大脳皮質において一次運動野以外の，運動に関係の深い領野をいうが，運動前野と補足運動野がこれにあたる。この領野における従来の研究は生理学的・解剖学的な種々の手法によってなされてきたが，それら両者の研究を結び付けた統合的な研究は未だ極く少ない。この形態と機能の両面からの研究の意義は大きく，なすべき研究内容は膨大である。そこで今回はその最初の試みとして，大脳補足運動野の機能的同定と，その入出力の同定を試みた。

日本ザルを実験対象とし，まず覚醒無麻酔下に種々の運動を行わせて，その際の補足運動野細胞活動の特性を検索した。その特性から，上肢運動に関連する領域を特定した。次に WGA－HRP の局所注入を行って，その逆行性および順行性取り込みを観察した。大脳皮質の他領野との皮質～皮質間投射および基底核と視床を中心とする皮質下投射の両者について詳細な組織学的検索を行った。

【 磁気共鳴装置
共同利用実験報告 】

磁気共鳴装置共同利用実験報告

〔目　　次〕

概要…… 257

組織内水構造及びエネルギー代謝の研究
（曽我美勝他） …… 258

NMR によるヒト筋作業時のエネルギー代謝の研究
（森本武利他） …… 259

NMR (MRI) による内耳病変の検出
（肥塚　泉他） …… 260

^{23}NA MRI による腎機能の形態的観察
（村上政隆他） …… 261

^{1}H－MRI, MRS による上皮組織の水・基質輸送の研究
（M. C. Steward 他） …… 263

^{1}H－MRI によるサル脳内地図の作製とその応用
（宮下暢夫他） …… 263

先天性水頭症における，V－P Shunt 手術の効果
（武田信昭他） …… 264

磁気共鳴装置室

概要

1988年，本研究所には，生きた状態での生理機能を観測するために，実験動物のほかに人間の測定も可能な磁気共鳴画像装置 (MRI & MRS) を導入した。これは磁気共鳴という非常に小さいエネルギー現象を利用し，生体の画像やスペクトルを求めるものである。極超短波を使用するので，感度の点では他の測定法に劣るのはやむをえないとしても，組織構築を破壊することなく，多種多様の情報を提供してくれる特徴がある。

1988年度には装置の立ち上げを行い，これを用いての共同利用実験が開始された。1989年度には共同利用実験計画が２年目に入り，研究の公募を開始した。磁気共鳴画像装置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，1989年度は最終的に11課題が採択され実施された。これらは，(1)生体内部の非破壊三次元観察。(2)生体活動に伴う形態およびエネルギー状態の連続観察，の２研究テーマに分けられる。

本年度の磁気共鳴画像装置の利用状況の内訳は，のべ使用者グループは160，共同利用実験等99日，修理調整等51日であった。

磁気共鳴装置室では共同利用実験計画の援助の一環として３回の磁気共鳴装置共同利用ワークショップを行った。第一回ワークショップは1989年２月24－25日に行われ，1989年度共同利用実験研究者（所外22名，所内９名）を対象として，共同利用のガイダンス，装置性能／基本操作についての講習，実験に必要な周辺装置の使用等について打ち合せ，また，1988年度の基礎実験の成果を報告した。

第二回ワークショップは1989年７月31日－８月１日の両日，“生物，医学実験のための NMR 入門講座”として広く全国に参加者を求め開催された。細胞レベルから潅流臓器， in vivo での NMR 実験について具体的に解説していただくために，西川弘泰（明治鍼灸大学），成瀬昭二（京都府立医科大学），二岡祥子（ペンシルバニア大学），北岸恵子（大塚電子），犬伏俊郎（滋賀医科大学），村上政隆（生理学研究所）の招待講演を得た。参加者は53名（うち大学院生，学部学生が12名）であり，全国で行われはじめている医学，生物学分野での NMR 応用実験の若手研究者育成の一環を担った。

第三回ワークショップは1990年２月14日－15日の両日，“細胞内，細胞外 Na の緩和機構”のテーマで，スピン3/2の Na, K が細胞内外でどのような緩和機構をとるかについて，歴史的観点より振り返り，理論的考察，二量子フィルターを用いた最新の実験データについて討論した。 Y. Boulanger (University of Montreal), Z. Endre (University of Queensland), J. Pekar (National Institute of Health), C. S. Springer Jr. (State University of New York at Stony Brook), 西川弘泰（明治鍼灸大学），瀬尾芳輝（生理学研究所）を講演者として招聘し，参加者とともに細胞内，細胞外 Na の緩和機構を明かにし，生体内電解質の NMR 測定について問題点を解決する糸口を見いだすべ

く討論した。参加者は51人，うち理学，工学系の研究者が10人と，今後の研究の学際的広がりが約束された。

また1987年度には，磁気共鳴装置室運営委員会が設置され，1989年１月に第２回，1990年１月に第３回委員会が開催された。なお委員は，有水　昇（千葉大・医），曾我美勝（岐阜大・医），亘　　弘（生理研），山岸俊一（生理研），渡辺　昭（生理研），有井達夫（生理研）である。

組織内水構造及びエネルギー代謝の研究

曽我美勝，恵良聖一，桑田一夫（岐阜大・医・第２生理）
佐藤真司，武内章二，松永隆信（同・整外）
加藤一夫（同・第１病理），植木俊介，松波謙一（同・反射研）
岩間　享，山田　弘（同・脳外），亘　　弘（生理研・分子生理）

MRI は非侵襲的に組織異常を知り得る画像診断法として臨床に広く応用され始めているが整形外科領域への適用として関節内軟骨異常を早期に見出すことができれば関節鏡検査，関節造影法に取って代わり得る有力な診断法となる。組織内水構造研究の一環としてウサギ（月齢４カ月，体重2.5kg，オス）膝関節軟骨を用いて正常軟骨組織及びモノヨード酢酸にて惹起した実験的変形性関節症 (Osteoarthritis) における軟骨組織内の水構造について高磁場 MRI 装置 (2.1T) と 360 MHz ^{1}H－NMR スペクトロメーターによる結果とを比較検討した。

MRI 撮像に対しては股関節より分離したウサギ下肢を100㎜φ ^{1}H プローブに膝関節が中央になるように固定し，SE 法にて T_1 強調画像，T_2 強調画像の縦断面あるいは横断面を撮像した。^{1}H－NMR 計測にはウサギ膝関節の大腿骨関節面及び脛骨関節面より直径１㎜程度の軟骨小片を

表１

RABBIT KNEE ART. CART.

	CONTROL	OSTEOARTHRITIS
$W(H_2O)$(%)	82.9 ±2.09 (n=26)	83.1 ±2.57 (n=28)
	NO	
T_1 (SEC)	1.87±0.15 (n=29)	1.82±0.13 (n=34)
	NO	
T_{1S}(SEC) f_s, 1.95 ppm $\gamma H_2/2\pi$~69 Hz	2.46±0.62 (n=28)	1.99±0.76 (n=34)
	★★	
T_{1S}(SEC) f_s, −4.00 ppm $\gamma H_2/2\pi$~69 Hz	4.25 ± 1.26 (n=26)	3.33±0.76 (n=31)
	★★	

RABBIT KNEE ART. CART.

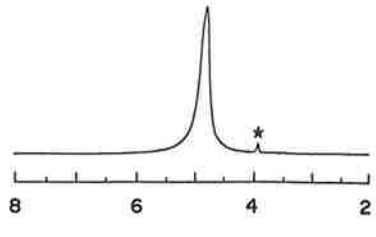


図１

採取し，それらを内径1.1㎜φのNMR用毛細管に入れ，ロック用DMSOを入れた5㎜φNMR試料管に挿入した（実験的変形性関節症の場合はモノヨード酢酸を膝関節に5mg/0.2ml単回投与し，その後2，4，8週間後に採取したものを使用した。それらは組織学的にも肉眼的にもヒト変形性関節症のそれと酷似していた)。MRIは日立社2.1T MRI装置，^{1}H－NMRはBruker社WM360wb型を用い，T_1，構成蛋白質より水分子への交差緩和時間（$T_{IS}(H_2O)$）を測定した。

^{1}H－NMRによるウサギ正常膝関節軟骨内の水分子の化学シフトは，図1に示すように4.74～5.02ppm（病的膝関節の場合は4.70～5.06ppm），含水量の平均(W (H_2O) %)，T_1の平均，T_{IS} (H_2O；f_2, 1.95ppm)の平均，T_{IS} (H_2O；f_2, －4.00ppm)の平均はそれぞれ表1に示す値であった。実験的変形性関節症の場合のそれぞれの値も表1に示すが，正常と病的膝関節において，水分子の化学シフト，含水量の平均，T_1の平均には有意差は認められなかったが，$T_{IS}(H_2O)$はT_{IS} (H_2O；f_2, 1.95ppm)，T_{IS} (H_2O；f_2, －4.00ppm)とも正常，病的軟骨間に有意差が認められた。一方，MRIでのT_1強調画像，T_2強調画像のいずれも画像上正常，病的軟骨間に明瞭な差は認められなかった。従って関節軟骨の病的異常を早期に見出すには通常のT_1, T_2強調画像法よりもむしろ$T_{IS}(H_2O)$イメージングが有力な手段になり得ることが示唆された。

NMRによるヒト筋作業時のエネルギー代謝の研究

森本武利，吉崎和男，能勢　博（京府医大・生理）
平川和文（神戸大・教養学部），亘　　弘（生理研・分子生理）

従来，筋肉バイオプシーなどにより解析されてきた骨格筋のエネルギー代謝について，非侵襲，非破壊的計測法であるNMR法を用いて測定するための基礎的な検討をおこなった。

〔方法〕対象は健康成人男子で，左側臥位のもとに左前腕内側の浅指屈筋の上に表面コイル（直径80㎜）をおき，^{31}P－NMRスペクトルを測定した。スペクトルの測定には生理研共同利用実験施設，磁気共鳴装置室の日立製MRI/MRS装置(^{31}Pの共鳴周波数：36MHz)を用いた。

〔結果および考察〕1．ヒト前腕骨格筋の^{31}P－NMRスペクトル測定(1)：^{31}P－NMRスペクトル測定用表面コイルを用い，前腕筋のリン化合物を定量した。安静状態を15分以上保った後，ラジオ波(RF)パルスを20秒ごとに繰り返し，16回積算してスペクトルを得た。筋細胞内のATP濃度を8.2mMとすると，クレアチン燐酸36±3 mM，無機燐酸4±1 mMとなり，筋細胞内pHは7.1±0.1であった（3名：mean ± S. D.）。さらに，RFパルスを2秒の繰り返しで32回積算したスペクトルでは，約1分の時間分解能で相対的濃度変化が解析できることが明らかとなった。

2．^{31}P－NMRスペクトル測定法の問題点：^{31}P－NMRスペクトル測定用表面コイルは直径80㎜のコイルのみがある。このコイルによるリン化合物の定量的分析時の問題点として，まず，ヒト成人の前腕にはこのコイル径では若干大きすぎ，測定対象となる腕の筋肉の部位が不明確であ

る。つぎに最大信号強度をあたえるRFパルス幅は約300μsであった。^{31}P－NMRスペクトルからリン化合物の濃度を定量するには約30ppm, すなわち36MHzの共鳴周波数では約1kHzの均一な励起スペクトル幅をもつRFパルスが必要である。この条件を満たすには50μs以下のRFパルス幅が望ましく(2), RFパルス強度の弱いことが明らかになった。

したがって，測定対象部位に適合した種々の直径の表面コイルの設置が不可欠であり，しかも上記の励起周波数帯域を満たすRFパルス強度が必要である。さらにRFパルスの速い繰り返しによる磁化の定常状態を保つにはダミーパルスの設定を可能にすること，また測定開始ならびに終了時間が明確にできるようなRFパルスのモニターが必要である。なお，^{13}C－NMRならびに他の核種のスペクトル分析は表面コイルが設置されていない為，今後の検討課題である。

〔文献〕 1．吉崎和男，能勢博，小田慶喜，森本武利，平川和文，村上政隆，亘弘，ヒト腕骨格筋の運動による代謝変化の^{31}P－NMRによる研究。日本磁気共鳴医学誌 10 : 260 (1990)
2．亘弘，スペクトロスコピーの原理。「MR入門講座テキスト」日本磁気共鳴医学会編，pp. 123－132,（昭和63年）

〔謝辞〕 種々の御協力・御助言いただきました生理研・村上政隆助教授，瀬尾芳輝博士，市川修，大河原浩の諸氏に感謝します。

NMR (MRI) による内耳病変の検出

肥塚　泉，佐野光仁，瀬尾　律，久保　武，松永　亨（阪大・医・耳鼻咽喉科）
瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘，大河原浩（生理研・分子生理）
市川　修（生理研・生理機能研究施設）

（はじめに） MRI－CTの病変検出能力はすでにX線CTをも凌駕するレベルにまで達している。しかしながら耳鼻咽喉科領域においては内耳，第Ⅷ脳神経など微小かつ繊細な器官あるいは組織の病変を対象としており，これらの部位の病変に対して画像診断を適用することは現在でも不可能である。我々は，生理動態画像解析装置を用いて，これらの器官および組織のMRI－CTによる画像描出能について検討を加えた。

（対象および方法） 測定対象は甲状腺腫瘍により亡くなった83才の女性の左側頭骨である。生前に難聴，耳鳴等の耳症状を訴えていない。死後約2時間半後に剖検を行い，その際に側頭骨を採取し直ちにWittmaack氏固定液にて固定，脱灰および脱水後セロイジンに包理した。セロイジンに包理されている状態で撮影を行った。パルスシーケンスはSpin Echo (TR＝700msec, TE＝50 msec) を用いた。スライス厚は2㎜とした。スライスムーブを用いることにより1㎜ごとの連続撮影を行った。MRI－CT撮影終了後，同ブロックを厚さ50～60μの連続切片とし，これを10枚おきにH－E染色し，光学顕微鏡あるいは実体顕微鏡にて観察した。光学顕微鏡，実体顕微鏡に

て撮影した写真とMRI－CTにて撮影した画像とを比較した。

（結果） 次に示す内耳の各部分についてのMRI撮影に成功した。蝸牛については各回転の基底板が明瞭に描出された。ライスネル膜については今回の測定では描出不可能であった。前庭系については，外側半規管膜迷路の一部が描出可能であった。その他鼓膜，中耳腔，卵円窓，正円窓も描出された。

（考察） 内耳は側頭骨錐体部内に存在するため，高分解能X線CTを用いたtarget imagingにてもアーティファクトが多く，これまで本部位における画像診断は主として内耳奇形，内耳道骨破壊を伴った聴神経腫瘍の診断等に限られていた。今回我々は，対象は人側頭骨ブロックではあるが，MRI－CTにて蝸牛については全回転にわたって基底板を描出する事ができた。また前庭系については膜迷路の一部を描出する事ができた。その他卵円窓，前庭窓についても明瞭に描出された。今回の測定に用いた側頭骨標本の蝸牛基底板の厚みを，同一部位の組織標本にて実測したところ約30μであった。一方今回のMRI－CT測定では描出する事が不可能であったライスネル膜については10μ以下であった。以上より今回我々が用いた生理動態画像解析装置の描出限界は20～30μ厚程度であると思われた。今回我々は，X線CTを含めたこれまでの画像診断機器では画像化する事が不可能であった蝸牛微細内部構造をほぼ無侵襲の状態で観察する事に成功した。今回我々が用いた生理動態解析装置は主磁石の静磁場強度が2.1Tと大きく，また傾斜磁場勾配についても0.8G/cmと比較的大きく，その結果，今回のような優れた空間分解能を得る事が可能になったと思われた。

^{23}Na MRIによる腎機能の形態的観察

村上政隆（生理研），前田宗宏（奈良県医大）

^{23}Na MRIは生体内電解質として分泌，吸収，運動，興奮など基本生理機能の基盤となる重要な役割を果たしており，NMR観測可能な物質として存在量も多いため臓器機能の形態的観察手法として有望視されている。しかし，感度が低いために^{1}H MRIにくらべ生体応用が遅れており，頭部領域における有用性が報告されている以外，他臓器の機能の形態的観察報告は少ない。今回，モルモット及びヒトの腎のNa画像の撮影を行い，モルモットにおいて腎阻血，脱水，水負荷の実験を行い，^{23}Na MRIによる腎機能の形態的観察を行った。

（方法）

静磁場強度2.11テスラの日立製超伝導型MRIを用いた。^{1}Hと^{23}Naの共鳴周波数は，それぞれ，90.0MHz, 23.81MHzである。モルモットの撮像には10㎝径のスロット・レゾネーター・コイルを用い，ヒトの撮像には20㎝径のサーフェス・コイル（自作）を用いた。解剖学的位置関係の参考のために^{23}Na画像に加えて^{1}Hの撮像も行った。

撮像条件は，繰り返し時間 150msec, エコー時間 19msec の SE 法，測定マトリックス 64×64, 加算回数128あるいは256を用いた。

モルモットの腎動脈を腎静脈，尿管とともに腎茎部で結紮し，腎茎部結紮の前後で横断像と冠状断像の撮像を行い，^{23}Na 画像上で腎の信号強度の変化を調べた。

モルモット (Hartley, female, 300－600g) を用いて，脱水と水負荷の状態で腎臓のナトリウム像の撮像と尿中ナトリウム濃度の測定を行い，腎臓のナトリウム像と尿中のナトリウム濃度を対比した。脱水状態にするために24－48時間絶食し，水負荷は体重の 3 パーセント量のグルコース溶液を経口的に投与した。

（結果と考察）

SE (150/19) の ^{23}Na 画像で，ヒトならびにモルモットの腎は著明な高輝度に描出されたが，腎に一致した高輝度の範囲は，^{1}H 画像上の腎の輪郭より小さかった。

^{23}Na 画像上，阻血後のモルモットの腎の信号強度は阻血前の約半分に低下し，腎の同定が困難となった。

腎髄質は，尿細管，集合管などいわゆる細胞外腔が多く，通常の状態で生成される尿は，高張である。腎の Na 濃度は，皮質では他臓器や筋肉と同程度であるが，髄質の Na は皮質の約 2 倍と高濃度である。^{23}Na 画像で高輝度の範囲が，^{1}H 画像上の腎の輪郭より小さかったのは，腎での Na の分布を反映して腎髄質を中心とした部分が高輝度を呈したためと考えられる。

また，^{23}Na 画像上で阻血後の腎の信号強度が低下するのは，次のように説明できる。阻血の状態になると細胞内から細胞外へ Na が汲み出されなくなり，細胞外から細胞内に Na が移動することになる。細胞外に比べて，細胞内の Na の横緩和時間が短いため，19msec のエコー時間で観測される信号は低下する。

脱水時の腎髄質は，皮質に比べて著明な高輝度を呈した。水負荷により髄質の信号強度は低下し，皮質と等信号強度となった。また，尿中のナトリウム濃度は，脱水時に高く，水負荷状態では低かった。腎髄質のナトリウム信号強度と尿中ナトリウム濃度の間には正の相関関係が認められた。

ナトリウム MRI により，脱水や水負荷に伴う腎髄質のナトリウム濃度の変化を捉えることができた。髄質の信号強度は，尿の濃度の程度の指標となる尿中ナトリウム濃度と相関がみられ，ナトリウム画像を用いた腎臓の濃縮能の形態観察が可能になった。

^{1}H－MRI, MRS による上皮組織の水，基質輸送の研究

Martin, C. Steward （ Manchester 大・生理）
鈴木英司（岐阜大・医・内科）
村上政隆，瀬尾芳輝（生理研・分子生理）

外分泌腺は浸透流により水分泌を行う。浸透流の駆動力は電解質の能動輸送により生じる上皮膜を介しての電気化学的ポテンシャルである。しかし，血管側から管腔側への水輸送路として，細胞膜を通るのか (transcellular route), 細胞間隙を通るのか (paracellular route) は未だ明かではない。

本研究において，我々は家兎唾液腺の上皮細胞膜の水透過係数を磁気緩和試薬である gadolinium diethylenetriaminepentaacetic acid (GdDTPA) を用い測定し，上記の両経路の妥当性を考察した。

ウレタン麻酔下に顎下唾液腺を摘出し，37℃で 10mM GdDTPA を含むクレブスリンガー液で定流潅流した。H－1 NMR 測定は BIOSPEC 150/4.7 磁気共鳴分光器を用い，測定周波数 200.4 MHz, 反転回復法により待時間0.01－0.45秒での信号強度を測定した。

潅流唾液腺では 2 成分 ($33.5sec^{-1}$) の水 H－1 T_1 緩和速度 ($1/T_1$) が測定された。速い緩和成分は，磁気緩和試薬により緩和が加速された細胞外の水に対応する。遅い緩和成分は，緩和が加速された細胞外の水が細胞内に入り細胞内の水の緩和を加速したものである。細胞内の水の緩和時間を 1 秒として，水の内向きと外向きの速度定数を求めると，各々 0.67, $4.12sec^{-1}$ となった。また，これにより水の拡散性透過係数 (Pd) と浸透性透過係数 (Pos) は各々，$1.24cm^3s^{-1}$/ 唾液腺，$1.33ul\ min^{-1}\ mosM^{-1}$ と推定された。唾液分泌速度は，分泌初期には 300ul/min, 定常分泌期には 50ul/min であり，transcellular route をとるとすると，特に分泌初期相で大きい浸透圧駆動力が必要となる。現在，細胞内 Na, K イオンの動態について Na－23, K－39, Rb－87 NMR 法を用いて実験を進めている。

^{1}H－MRI によるサル脳内地図の作製とその応用

宮下暢夫，加藤　誠，彦坂興秀（生理研・生体調節）

われわれは個々のサルの脳内構造を把握し，電極刺入や薬物投与などの脳内操作を正確におこない，またその結果を生体中で確認するために MRI を利用している。しかし，MRI は座標系を持たないためにそのままでは位置の同定が出来ない。この問題を解決するためにサルの頭部にマーカーを設置する方法を試みた。脳内地図の作製とその応用として今回はこの方法で尾状核の位置に同定し，ここにパーキンソン病惹起物質である MPTP (1－methyl－4－phenyl－1, 2, 3, 6－

tetrahydropyridine) を慢性的に持続注入した際の MRI について報告する。

〔方法〕

〈マーカーの設置〉ニホンザル（オス，体重 8 kg）の頭部を定位脳固定装置に固定し，その頭頂部に 4 本のポリエチレンチューブを定位的に垂直に立てた。MRI 撮影時にこの内腔を流動パラフィンでみたし，MRI で確認できるようにした。〈薬物の投与〉この MRI 上のマーカーをもとに尾状核の目的の位置を算出し，再び定位脳固定装置に固定しカニューレ先端をその位置に刺入し固定した。右尾状核内には MPTP 4mg/200 μl を，左尾状核内には生理食塩水 200 μl を浸透圧ミニポンプでそれぞれ 7 日間かけて慢性的に投与した。〈頭部の固定〉ネンブタール麻酔下でサルの頭部を直径30㎝のプローブのほぼ中央に冠状面，矢状面，水平面ともに垂直及び水平になるように固定した。〈撮影条件〉日立製2.14テスラ超伝導 MRI 装置を使用。IR 法（2000/500/25～33，加算10回），SE 法（3000/80，加算 4 回），スライス厚さ 2 ㎜，スライス間隔 5 ㎜で MPTP 投与前，投与後14日，36日，66日，生食投与後15日にそれぞれ冠状断，矢状断で撮影した。〈組織学的検索〉MPTP 注入開始後86日目に潅流し，Nissl 染色で注入部位を確認した。

〔結果〕

(1)マーカーから尾状核の目的の位置を正確に算出することができ，脳室造影などを行なうことなく MPTP 及び生食を用意に投与できた。(2) MPTP 投与後14日目の MRI では SE 法で尾状核内に直径約5.5㎜の high intensity lesion を認めた。IR 法では lesion の中心に high intensity を，その周囲に low intensity を認めた。これらの lesion は時間経過とともに縮小した。(3)生食投与後15日目の MRI では SE 法，IR 法ともに明らかな lesion は認めなかった。(4) Nissl 染色では右尾状核内に直径約 4 ㎜の範囲で神経細胞の脱落を認めた。一方左尾状核ではカニューレの軌跡と思われる gliosis を認めたのみであった。

〔まとめ〕

(1)このマーカー法によって MRI をもとに定位的に脳内操作をすることが可能となった。(2) SE 法で示された MPTP 投与後の high intensity lesion は神経細胞脱落の範囲とほぼ一致していた。

先天性水頭症における V－P shunt 手術の効果

武田信昭，須田喜久夫，佐藤　潔（順天堂大・脳神経外科）
橋本隆紀，小幡邦彦（生理研・分子生理）

水頭症発現ラット HTX に短絡術を施行し，これらの動物を手術時期により早期手術群（生後 7 ～10日齢），晩期手術群（生後 4 週齢）に大別した。手術はフローセン麻酔下に左頭頂部に皮膚切開をおき，lamda より前方 2 ㎜，右方 4 － 5 ㎜の部位にドリルで穿頭術を施行し硬膜を露出した。腹側は右背側部に切開をおき，腹腔を露出した。皮下に shunt passer を挿入し，これ

を介して内径 0.25inch, 全長12cmの特製 Dow Corning 社製 silastic catheter, valveless ventriculo－peritoneal shunt tube を設置した。頭側は burr hole より約 5 mm脳室内に tube を挿入し，腹側 tube より髄液の流出を確認した後に，アロンアルファを用いて挿入部を固定，ついで腹側 tube を腹腔内に挿入し，皮膚縫合を行った。

これらの動物を用いて任意の時期に MRI を施行した。ネンブタール麻酔下にて動物を鎮静化し，長時間の撮影を可能にした。fig. 1 は 4 週齢の水頭症発現 HTX fig. 2 は早期手術群12週齢の MRI 所見であるが，早期手術群 HTX では術後脳室の縮小化と脳皮質幅の増大が起こることが示されている。

fig. 1　IR, TE＝30msec, TR＝3000msec
TI＝700msec

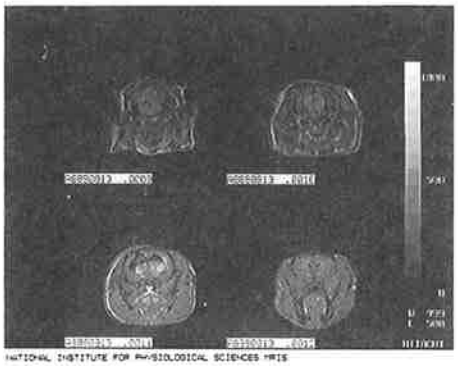


fig. 2　fig. 1 と同じ条件

【 超高圧電子顕微鏡
共同利用実験報告 】

超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告

〔目　　次〕

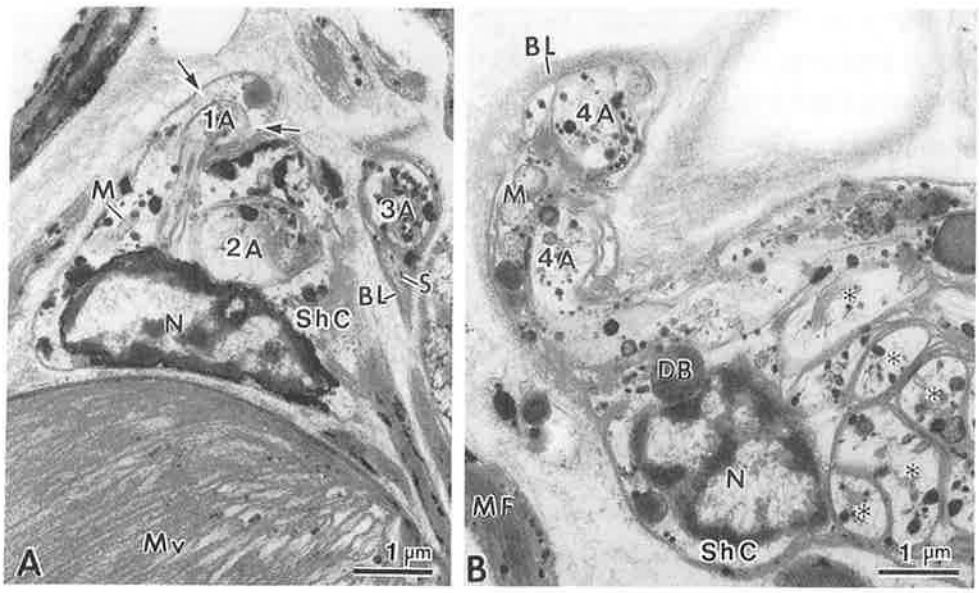
イソアワモチの皮膚光覚細胞の軸索と鞘細胞の関係（片桐展子他）…… 271
脊髄膠様質 Synaptic glomeruli の三次元的解析（猪俣賢一郎他）…… 272
神経膠細胞突起の三次元解析（浜　　清他）…… 273
培養糸球体細胞の機能と形態（追手　巍）…… 274
培養細胞全載組織化学的標本による細胞小器官の立体的観察及び
　雰囲気試料室による培養細胞の生態観察（永田哲士他）…… 275
人工イオンチャネルの微細構造観察（木下隆利）…… 277
解像限界の加速電圧依存性（神谷芳弘他）…… 278
分離肝及び肺胞マクロファージ内ライソゾームの三次元的構造の解析
　（酒井眞弘他）…… 279
網膜ミューラー細胞核膜における nuclear pores の分布密度および
　数的変化に関する超高圧細胞化学的研究（西川雅子他）…… 280
分泌系，上皮膜系細胞の細胞骨格の超高圧電子顕微鏡観察
　（佐々木貞雄他）…… 281
培養ヒト悪性グリオーマ細胞とヒト型モノクローナル抗体 (CLN－IgG)
　の作用機序に関する免疫電顕立体観察（垰本勝司他）…… 283
ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染細胞の超高圧電子顕微鏡観察Ⅲ
　（吉田まり子他）…… 284
腎糸球体超微細構造の観察（四方賢一他）…… 286
肥満細胞における脱顆粒機構の解明（田坂賢二他）…… 287
HTLV－I－associated myelopathy (HAM) 患者より分離された
　ウィルス粒子の超微形態（大脇祐治）…… 288
Trypanosoma evansi における三次元超微構造の研究
　（比留木武雄他）…… 289
単一筋線拘縮中の横行小管の走行（吉岡利忠）…… 290
基底膜形成過程の組織細胞化学的検討（秋元義弘他）…… 292
血小板立体微細構造に対する薬理学的研究－６－
　（西尾廣昭他）…… 293
リン脂質膜のリップル構造の３次元再構成（加藤　知他）…… 294

イソアワモチの皮膚光覚細胞の軸索と鞘細胞の関係

片桐展子，相川英三（東女医大・第２解剖）
有井達夫（生理研）

イソアワモチ（海産の腹足類）の外套の皮下組織に多数散在している皮膚光覚 (DP) 細胞は，この動物に特有な multiple photoreceptive system の一つで皮膚光覚に関与する (Katagiri, Y. et al. 1985)。これまで DP 細胞を含む試料の準超薄連続切片を超高圧電顕によって観察して DP 細胞の軸索の走行を立体構築し，DP 細胞の軸索が細胞の端部と基部の境界付近の特定の部位から出て皮下の結合組織内を複雑な経路を辿った後，鞘細胞に囲まれた小神経束に入ることを明らかにした（片桐ら1988)。今回 DP 細胞の軸索の鞘構造と鞘細胞の関係を明らかにするため DP 細胞の軸索が小神経束に入る部位の微細構造を観察した。

材料と方法：イソアワモチの外套背部の小突起を採取し，２％オスミウム酸水溶液で40℃，48時間処理，脱水過程で酢酸ウランによるブロック染色を施しエポン包理した。0.4 μm 厚さの連



図Ａ　DP 細胞の軸索 (1A) が鞘細胞 (ShC) に入る部位では鞘細胞の細胞質突起が軸索を取り囲み，鞘細胞内には他の DP 細胞の軸索 (2A) が入っている。鞘細胞の近くにある軸索 (3A) には鞘構造 (s) が認められる。
図Ｂ　数本の DP 細胞の軸索（＊）が鞘細胞に囲まれて小神経束を形成している。他の DP 細胞の軸索 (4A) が新たに加わるところである。
BL, 基底膜；MV, DP 細胞の微絨毛。

続切片を作成しグリッドに載せ，その上にホルムバール支持膜を貼り，酢酸ウランと鉛で電子染色後，超高圧電顕で2000倍から12000倍で観察した。

結果と考察： DP 細胞の軸索は起始部から経路の前半部は単独に結合組織内を不規則に蛇行しながら途中で筋細胞 (MF) としばしば交差または密着して走行し，経路の後半は他の DP 細胞の軸索と並んで走る。鞘細胞 (ShC) は DP 細胞間の結合組織内に個々に散在し，ヘテロクロマチンに富んだ核 (N) と明るい細胞基質が特徴で，核周囲部に dense bodies (DB), 大小の vesicles, filaments, ミトコンドリア (M) などの細胞小器官が認められる。DP 細胞の軸索は鞘細胞内へ次々と入り小神経束に成る。DP 細胞の軸索の表面は薄い鞘構造 (S) と厚い基底膜によって覆われているが，軸索が小神経に入る部位では鞘細胞の細胞質突起によって mesaxon 様に取り囲まれ（図 A の矢印），小神経内においては鞘細胞の細胞質によって隔てられており軸索同士が直接接することはなかった（図 B）。

小神経束を囲む細胞をこれまでグリア様細胞としてきたが，軸索の鞘構造と鞘細胞の細胞質は連続していることから軸索の鞘構造の形成に鞘細胞が関与すると推測され，鞘細胞と名づけることにした。イソアワモチの DP 細胞は腹足類の光受容細胞としての形態的特徴を備え脱分極性光応答を示すことで明らかなように，皮膚光覚に関与する光受容細胞の本体が明らかにされた数少ない眼外光受容器の一つである (Katagiri, Y. et al. 1985)。

一方，外套突起の結合組織内の神経束から光照射に対するスパイク応答が記録されているが，DP 細胞から出た軸索が集まって小神経束になることと合わせ，DP 細胞由来の光情報が中枢神経系へ伝達されることが示唆された。小神経束には由来の不明な線維も含まれておりこれらの線維や DP 細胞軸索間のシナプスの有無などについては，より高倍の観察が必要であり今後の研究課題である。

脊髄膠様質 Synaptic glomeruli の三次元的解析

猪俣賢一郎，五十嵐広明，那須史男，冨保和宏（東邦大・医・第 2 解剖）
有井達夫（生理研）

疼痛認知メカニズムにおいて，第一次感覚ニューロンは極めて重要な役割を演じている。形態学的にそのニューロンの小型神経節細胞体と脊髄膠様質部の軸索終末は稀有な電顕像を呈する。今回，Painful な糖尿病性ニューロパチーとビタミン B_1 欠乏実験動物を作製し，Thiamine monophosphatase (TMPase) をマーカーとして小型神経節細胞体とその軸索終末の動態を超高圧電顕にて解析を試みた。

〈材料と方法〉

Wistar 系成熟雄ラットを使用し，糖尿病ラットはストレプトゾトシンを 50mg/kg 投与して作

製し，8週目にアルデヒド系固定液にて固定した。ビタミン B_1 欠乏ラットは，ビタミン B_1 欠乏食にて飼育するとともにビタミン B_1 代謝拮抗剤であるピリチアミンを 1mg/kg を連日投与し，開始より3日目・7日目・12日目に同様の固定を実施し，両ラット腰椎レベルの後根神経節及び脊髄後角を取り出し，Inomata and Ogawa に従い TMPase 検出を実施した。エポキシ樹脂に包理した材料は厚さ1～5 μm の超薄切片を作製し，超高圧電顕 (H－1250M) にて観察した。

〈結果と考察〉

チアミン（ビタミン B_1）欠乏ラットは7日目を過ぎると食餌摂取量が減り，他栄養因子の関与が考慮されるため，3日目と7日目に実験を実施した。TMPase 活性は後根神経節小型細胞のゴルジ装置の網工部と vesicle 様小体に陽性を示した。チアミン欠乏ラット，糖尿病ラットにおいて TMPase 活性の局在に変化は認められなかったが，チアミン欠乏ラットでは TMPase 陽性 vesicle 様小体の数がコントロールと比較して7日目で有意に増加していた。さらに糖尿病ラットにおいても vesicle 様小体の数の増加傾向を認めた。

チアミンは Von Muralt の仮説以来神経系においては補酵素作用以外に神経伝達に関与している事が注目されている。また栄養性多発性ニューロパチーにおいてはチアミンレベルの低下が指摘される事も多い。糖尿病ラットにおいて神経ビタミンの投与により伝導速度が回復する事を考慮すると今回の我々の実験結果は，糖尿病においてはビタミン欠乏とくにチアミン欠乏状態が誘起され，これが知覚性の糖尿病性ニューロパチーの病因となっている事を示唆するものである。

神経膠細胞突起の三次元解析

浜　　清（早大・人間科学），有井達夫（生理研）

神経膠細胞突起は複雑繊細を極めており，光学顕微鏡では解像力不足のためその詳細を解明することができない。一方，超薄切片を用いる普通電顕では三次元構造の解析が不可能であり，連続切片からの立体再構築も正確を期し難い。吾々は超高圧電子顕微鏡の大きな透過能と高い解像力を利用して，神経膠細胞の立体観察を試みた。

材料としては成熟ウィスター系ラットの中枢神経系を用いた。アルデヒド混合液による灌流固定後サンプルを切り出し急速ゴルジ染色法を行った。アルコール脱水後エポン，アラルダイト混合レジンにより包埋，100 μm の切片を作成，光学顕微鏡による観察，記録を行った後，4～5 μm の切片を作成し二重銅グリットに取り超高圧電顕による立体写真撮影を行った。

今回は主として脳幹網様体および脊髄灰白質部の神経細胞体をとりかこむ星状神経膠細胞突起について観察した。これらの神経細胞の細胞体表面には多数の軸索突起が終末ボタンをつくりシナプスを形成していることが知られている。星状神経膠細胞突起は薄い板状となってこれらの終末をとりかこむ隔壁をつくり，全体としてみると神経膠細胞の薄い板でかこまれた小室の集りが

神経細胞体をとり囲む層を形成していることになる。２次元の画像では神経細胞の表面に神経膠細胞突起による網目がみられ，神経終末染色像とオフセット関係をなしていることが分る。それぞれの小室の神経細胞に向う面も，軸索終末部が神経細胞体とシナプスを形成する部分を除いては神経膠細胞の薄層によって蔽われている。このことは，軸索終末部と神経細胞体の間に，シナプス部を除いて神経膠細胞突起が介在するのがみられる超薄切片の所見とよく一致する。

神経膠細胞突起でつくられる小室による網目は細胞体部分のみでなく大きな樹状突起の表面に及ぶことがある。１つの神経膠細胞突起が隣接する神経細胞の表面を蔽う場合，また一つの神経膠細胞突起が神経細胞の一部分だけを蔽う場合が観察された。神経細胞のタイプと神経膠細胞突起の態度のこのような差との間の関連は明らかでない。

培養糸球体細胞の機能と形態

追手　巍（新潟大・医・附属腎研究施設免疫病態学部門）

私どもは腎糸球体培養細胞を電顕メッシュの上で単層培養し，培養細胞全載標本を作製して，超高圧電子顕微鏡で観察してきた。本年度は糸球体細胞のうちメサンギウム細胞に対するモノクローナル抗体を用い，酵素抗体法とかね併せて細胞表面にある機能エピトープの超微形態について検討した。また細胞－細胞相互作用の動態を知る目的で，血管内皮細胞とメサンギウム細胞の混合培養も行い検討した。

（方法） メサンギウム細胞の培養：既法（生理学研究所年報 10: 283, 1989 ）のごとく行った。血管内皮細胞の培養：臍帯静脈内皮細胞を使う。臍帯静脈内をよく生食水で洗浄し 0.25% trypsin－0.01% EDTA を注入し，室温で15分 incubate する。内皮細胞浮遊液を牛胎児血清 (FSC) で中和し，1000rpm, 5 分遠心して，pellet にする。細胞を 15% FCS, 50 μg/ml endothelial cell growth factor, 50 μg/ml heparin を含む medium (MCD 151) に浮遊し，fibronectin をコートしたフラスコにまく。電顕用試料の作製法 (whole cell mount technique) : メッシュ上で培養した細胞を，37℃に加温した，グルタールあるいはパラホルムアルデヒド液（前者は2.5，後者は2.0％）で固定する。免疫電顕はモノクローナル抗体（抗メサンギウム細胞膜抗体）を１次抗体として反応する。ついでビオチン化抗マウス抗体（アマルシャム社），金標識ストレプトアビヂン（アマルシャム社）を順次反応させる。メッシュ上の試料は洗浄後，1% OsO_4 で後固定し，2% uranium acetate 溶液で30分染色する。アセトン溶液で脱水し，臨界点乾燥後，カーボン蒸着した。超高圧電子顕微鏡は岡崎国立研究機構生理学研究所，H－1250M 型（日立製作所）を用い，1000kV で観察した。

（結論，考察） １）細胞全体を観察でき，細胞間の接触部位を立体的にとらえることが可能となった。２）免疫電顕への応用は，固定，抗体との反応，使用標識物質について検討が必要である。

3）昨年度は，HR－9の産出する細胞外基質上でのメサンギウム細胞の形態を中心に検討したが，fibronectinコート上ではメサンギウム細胞は異なった細胞増殖パターンをとった。以上のことから，超高圧電子顕微鏡により細胞全体を観察することは従来からの超薄切片による電顕法，走査電顕法と併用することにより，より多くの情報を得ることができることがわかった。ただ免疫電顕法への応用については，検討を要する点が多々あった。

培養細胞全載組織化学的標本による細胞小器官の立体的観察及び雰囲気試料室による培養細胞の生態観察

永田哲士，臼田信光（信州大・医），有井達夫（生理研）

培養細胞を電顕メッシュの上に単層培養して，組織化学的反応を行った後，臨界点乾燥して，培養細胞全載組織化学的標本を作製し超高圧電顕を用い細胞小器官を観察すると，それらの微細構造を立体視することができる。我々はこの方法により培養細胞のペルオキシゾーム[1)2)]，ゴルジ装置[3)]の微細構造についてすでに報告した。今回は初代培養ラット肝細胞のゴルジ装置をチアミンピロフォスファターゼ(TPPase)で，水解小体を酸性フォスファターゼ(AcPase)で，組織化学的染色を行い，立体観察した結果を報告する。

〔材料及び方法〕 成熟Wister系ラットの肝臓をコラゲナーゼ潅流法で分離し，肝細胞を培養液(Leibowitz L－15)に分離して，プラスチックプレートの底に沈めた金メッシュの上に培養細胞が伸展するようにして，CO_2ふ卵器で2～3日間培養した。金メッシュはフォルムバール支持膜を張り，カーボン蒸着してコラーゲンで被覆して培養に供した。培養細胞は単層形成後，2.5％グルタルアルデヒト前固定，①チアミンピロ燐酸を基準としたTPPase反応液，または②グリセロリン酸ソーダを基質としたAcPase反応液に浸透した後，$CeCl_3$で置換，3％グルタルアルデヒド液で後固定，脱水，臨界点乾燥して，培養細胞全載標本を作製した。これらの試料はいずれも超高圧電顕（生理研，日立H－1250M）により，加速電圧1000kVで観察し，同一視野を傾斜して写真撮影し，ステレオペアを作成して立体視した。また未固定の培養細胞は雰囲気試料室で生態観察を試みた。

〔結果及び考察〕 TPPase反応標本は，培養肝細胞の細胞膜の一部に陽性反応が認められたが，細胞質の中では電子密度高い陽性反応は核周囲部に限局して観察された。±8°の傾斜をつけて撮影したステレオペアで立体視すると，層板状の集団とその周辺を取り巻く小胞状の構造物とから成ることが明らかにされた（図1）。AcPase反応標本も，細胞膜の一部に弱陽性反応が観察されたが，細胞質の中には顆粒状に強陽性を示す小体が散見され，立体視すると反応陰性の糸粒体と小胞体の間に分散し，上下に重なっている三次元的位置関係が明らかとなった（図2）。なお未固定の培養細胞を雰囲気試料室で生態観察することは不成功に終った。

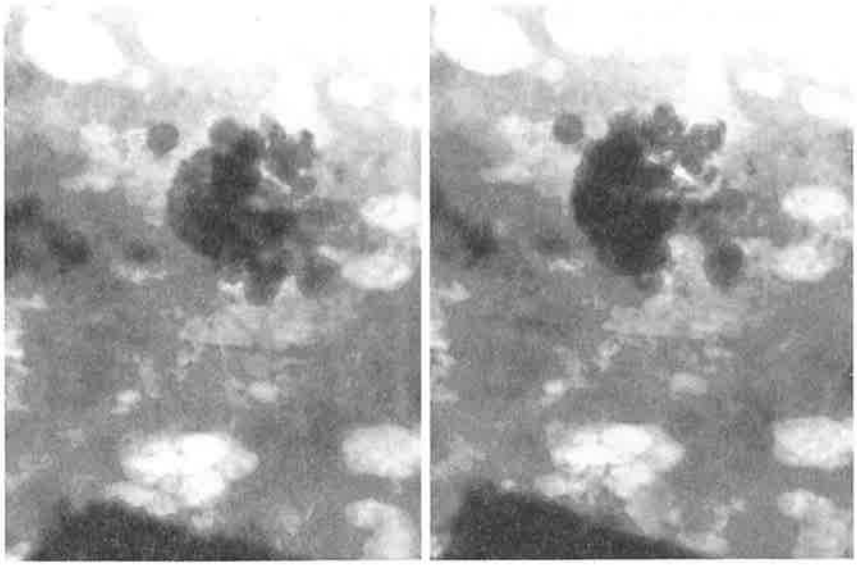


図1．培養ラット肝細胞全載標本。TPPase 反応，臨界点乾燥，超高圧 (1000kV), ± 8° ステレオ写真。写真中央に高電子密度のゴルジ層板があり，その周囲をゴルジ空胞が取り巻いている像が立体視される。
×5, 000

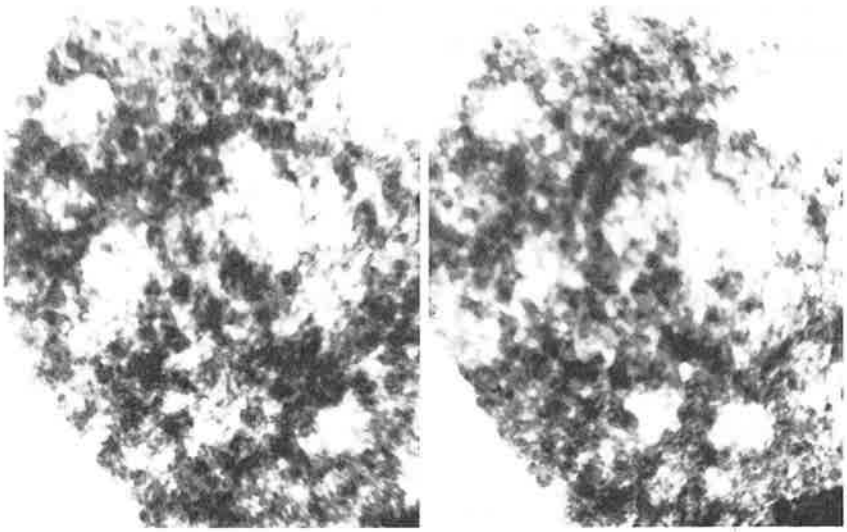


図2．培養ラット肝細胞全載標本。AcPase 反応及び臨界点乾燥，超高圧 (1000kV), ± 8° ステレオ写真。中央右に核があり，その周辺の細胞質に高電子密度の水碑小体が上下に重なって分散している。
×3, 000

〔**結論**〕培養ラット肝細胞を固定，TPPase 及び AcPace 反応により，ゴルジ装置及び水解小体を組織化学的に染色した細胞全載標本を作製し，超高圧電顕で立体観察した結果，これらの細胞小器官の三次元的構造と立体的位置関係を明らかにすることができた。

〔**文献**〕1）Nagata, T. et al. : Proc. XIIth Intern. Cong. Electron Microsc. II : 1183－1184, 1986
2）Nagata, T. et al. : J. Clin. Electron Microsc. 20 : 681－682,1987
3）永田哲士，臼田信光，浜清，有井達夫：生理研年報 9 : 473－474, 1988

人工イオンチャネルの微細構造観察

木下隆利（名工大・材料工学科）

1．目的：細胞間の物質交換を担う膜タンパク質は，その2つのチャネル形成ドメインを異なる細胞の二分子膜に埋め込んで細胞間の直接的な物質交換を可能にするとされている。

本研究では，細胞間の物質交換を仲介するタンパク質のモデルとして，両親媒性ポリペプチド2分子が連結したポリペプチドを人工的に調整し，このポリペプチドを脂質二分子膜に導入して微細構造に関する知見を得る。

2．実験方法：開始剤として1，3－ジアミノ2－プロパノールを用い，γ－メチル　L－グルタメートNカルボン酸無水物を，室温で40時間反応させ開始剤の両側にポリ（γ－メチル　L－グルタメート）を有するポリペプチド (MPrM) を得た。さらにトラフに蒸留水を満たし，水面上に MPrM の1，2－ジクロロエタン (EDC) 溶液を一定量展開し，MPrM 単分子固体膜を形成した。この単分子固体膜の水相側に配向した側鎖のみ選択的にアルカリ加水分解反応を行い，目的の両親媒性シーケンシャルポリペプチド (am. －MPrM) を得た。次にジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) と am. －MPrM のジメチルホルムアミド (DMF) 溶液をフラスコに注ぎ，溶媒を蒸発させることによりフラスコ内壁に薄膜を形成した。このフラスコに pH6.8 に調整した水を加え，0℃で窒素気流下で10分間超音波照射し，am. －MPrM を含む DPPC 二分子膜ベシクルを調整した。なお DPPC 濃度は 0.5mg/mL とし，DPPC と am. －MPrM のモル比は2.2×10^{-3}とした。さらに am. －MPrM を含む DPPC ベシクル構造は超高圧電子顕微鏡（H－1250M, 生理学研究所）を用いて観察した。具体的には，1mg/mL の am. －MPrM を含む 0.5mg/mL の DPPC ベシクル水溶液を2％の酢酸ウラニル水溶液でネガティブ染色して観察試料を調整した。倍率は45000倍で行った。

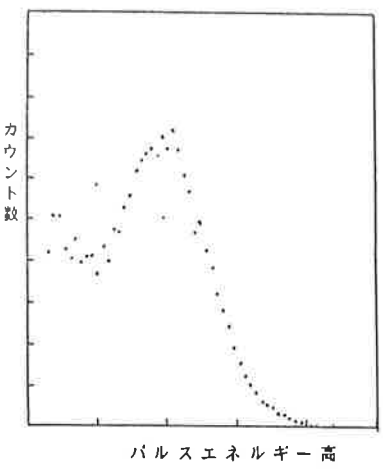
3．結果と考察：MprM 単分子固体膜の片側面を KOH でケン化反応して得た am. －MPrM のそれぞれ2本のポリペプチド鎖のアミノ酸配列は，am. －MPrM を V8 プロテアーゼで酵素分解して得たオリゴペプチドのゲルフィルトレーションクロマトグラフィー (GFC) の結果より，G をグルタミン酸，M をメチルグルタメートとして $(GGMMGMMMGMMGMMMGMM)_n$-なるアミ

ノ酸配列，すなわち両親媒性シークエンシャルポリペプチドであることが示された。この２本の両親媒性ポリペプチド鎖から成る am. －MPrM を担持した DPPC ベシクル水溶液 (pH6.8) をネガティブ染色法を用い，電子顕微鏡により直接観察した。注目すべき結果としてベシクル間の会合が数多く認められた。このベシクルの会合は２つの両親媒性ドメインを有するポリペプチドのそれぞれのドメインが異なるベシクルに埋め込まれたために生じた可能性があり，現在，異なるベシクル系を対象としてさらに詳しく検討している。

解像限界の加速電圧依存性

神谷芳弘（豊田工大），有井達夫（生理研）

カーボン薄膜の高分解能電子顕微鏡写真ではよく知られているようにピントにより複雑に変化する非晶質特有のコントラスト像がえられる。この像をフーリエ変換することにより電子顕微鏡の分解能に関する重要な情報を引き出すことが出来る。加速電圧が高くなるとコントラストは一般に低下するので強度測定に高精度が必要となり，写真のノイズの影響を受けやすくなる。特に分解能の限界に近い時にはコントラストはさらに減少する。昨年までに行ったフィルムのノイズについての研究の結果，分解能に関する研究に必要な強度変化はほぼ写真ノイズと同程度になることが明らかになったので今回非晶質カーボン膜の像を種々の露光で撮影し，種々の現像条件で現像したフィルムでのコントラストのノイズを調べた。一般に写真の黒化度が高くなると DE 特性が線形でなくなり，次第にコントラストが減少する。しかし一方，黒化度が高くなるとノイズの効果は減少するのでコントラストが忠実に再現出来かつノイズの影響をあまり受けない実験条件を設定することが必要になる。実験の結果 FUJI の FG フィルムを使用する場合現像条件（20℃10分），で黒化度 D＝2.5 でコントラストの減少は10％ノイズは測定領域 20 μm×20 μm で２％とすることが可能である。また測定領域を 50 μm×50 μm に増すことによりノイズを１％と下げることができることも明らかとなった。1000kV の加速電圧においてはカーボン膜での予備実験を行った。



YAG 結晶のシンチレーション

また最近写真に代る撮像方式として YAG シンチレーターを用いたイメージ・インテンシファイヤーが用いられるようになってきた。この方式による強度測定の精度について実験を行なった。方法は YAG 結晶の電子線による発光を測定する方法とし，電子顕微鏡のカメラ室の下部に YAG

結晶をおき，結晶からでる光をフォトガイドを通してフォトマルにうけその電気的パルスを増幅した後 PHA で分析した。PHA の結果を図にしめす。これより適当な検出器を用うれば電子一個一個を検出することが出来るので，かなりの測定精度をうることが可能であることがわかる。しかしこの精度で電子顕微鏡像の撮影にするためには短時間の測定（一画素の電子数が１または０程度の露光）を逐次重ね合わせることが必要でそのような強度集積装置を必要とする。適当な時間集積したのち一回の測定で測定するとその精度は減少する。これは一個の電子による発光と二個の電子による発光と区別できなくなることがあるため 100kV 電子に対しては写真による強度測定より精度が向上することが分った。加速電圧が高くなるにつれ精度向上が大きくなることが期待できる。

分離肝及び肺胞マクロファージ内ライソゾームの三次元的構造の解析

酒井眞弘，田中利和，小川和朗（京大・医・解剖２）

目的

ライソゾームは，その細胞の機能状態に対応して細胞内を活発に移動し，形態を変化させることのできる細胞内小器官であることが知られている。このライソゾームの動態に細胞内骨格系が不可欠であることが in vivo の実験系で証明されている。本年度はライソゾームと細胞内骨格系をより詳細に検討するために，ライソゾームを肝臓あるいは肺胞マクロファージより分離して，in vitro において細胞内骨格成分と反応させてそれらの関係を超高圧電顕下で観察した。

材料と方法

ウィスター系ラットの肝臓あるいは肺胞マクロファージより，Metrizamide の密度勾配遠心法を用いてライソゾームを分離した。分離ライソゾームとうさぎ筋肉より精製された G－ アクチンと混合し，actin polymerization buffer を添加して F－ アクチンに重合させ，さらにライソゾームと37℃で30分間反応させた。このライソゾームと F－ アクチンの混合液をホルムバール支持膜をはったグリッド上に滴下し，酢酸ウランでネガティブ染色を施して超高圧電顕下で観察した。アクチンフィラメントを同定するためには Heavy myosin (HMM) 修飾法にて試料を処理した。写真撮影には立体観察のために試料を± 8～10° 傾斜させて行った。

結果と考察

超高圧電顕下では，F－ アクチンは直径 5～7nm の微細線維としてホルムバール支持膜上に数多く観察されるが，特にライソゾームの周囲に非常に多くの線維成分が密集する傾向が認められた。また試料の立体観察により，F－ アクチンは線維の端がライソゾーム膜に付着するのではなくて，ライソゾーム膜に接するように存在していることが判明した。HMM 修飾法を用いてアクチンフィラメントの極性を観察すると，ライソゾーム膜に接するアクチンフィラメントは一

定の方向に向うのではなく，線維により異なっていた。これらの結果は，これまでに我々が報告してきたin vivoの所見と合致するものであり，さらにin vitroにおいてライソゾーム膜とアクチンフィラメントの相互関係を再現することが可能であることを示している。このようなライソゾームとアクチンフィラメントとの相互関係の上に微細小管がどのようにかかわっているかを検討するのが今後の課題である。

網膜ミューラー細胞核膜における nuclear pores の分布密度および数的変化に関する超高圧細胞化学的研究

西川雅子，石郷岡均（京大・眼科）

われわれはモルモット網膜においてGlucose－6－Phosphatase (G6Pase) 活性が網膜ミューラー細胞の小胞体および核膜に局在し，この酸素活性が正常および病的網膜においてもミューラー細胞同定のマーカーになることを報告してきた。この細胞化学的方法と超高圧電子顕微鏡を併用することにより，網膜ミューラー細胞核膜における nuclear pores の分布密度および数的変化について観察を試みたので，その結果を報告する。

〈方法〉

正常およびアルゴンレーザー光凝固（条件；100mW, 200 μm, 0.1sec ）を施行した有色モルモットを用いて灌流固定下に眼球摘出を行い，40 μm の切片を作製した。モルモット網膜における G6Pase 活性局在を Wachstein－Meisel 法にて検出した後，型通りに後固定，脱水，包埋を行った。1 μの切片を作製し，超高圧電子顕微鏡 (H－1250M) により観察した。画像解析装置（ RATOC 社）を用いて網膜ミューラー細胞核膜における nuclear pores の数および面積を分析して，その密度を算出した。さらに連続切片を作製して観察した結果を三次元立体構築（ RATOC 社）により解析し，各細胞における nuclear pores の総数を求めた。

〈結果〉

G6Pase 活性検出法および超高圧電子顕微鏡法を併用した観察法では，正常および病的網膜におけるミューラー細胞の同定および核膜に分布する nuclear pores の観察は容易に行うことが可能であった。今回検索した標本における正常モルモット網膜ミューラー細胞核膜に分布する nuclear pores の平均密度は9.11 μm^2であった。また，一つのミューラー細胞の核膜における nuclear pores の総数の平均は1588.5であった。

したがって，細胞化学的方法と超高圧電子顕微鏡を併用して連続切片を観察した結果を三次元立体構築（ RATOC 社）により解析することによって個々の網膜ミューラー細胞核膜における nuclear pores の密度および総数の算出が可能であった。また，今後本法を用いた研究はミューラー細胞核膜における nuclear pores の機能解明に大いに貢献できうると考えられた。

分泌系，上皮膜系細胞の細胞骨格の超高圧電子顕微鏡観察

佐々木貞雄，中垣育子，今井雄介，藤木　守（大阪医大）
有井達夫（生理研）

膵外分泌腺，胃腺，昆虫の絹糸腺や両生類の腎尿細管のような上皮膜系輸送細胞の厚切切片（1－3 μ）を作成し，超高圧電子顕微鏡を用いてそれぞれの細胞の立体観察を行ってきた。今回はカエル胃粘膜上皮細胞の立体観察を行った。また塩酸・エタノールによる胃粘膜上皮細胞の微細構造の変動についても検討した。

食用蛙より摘出した幽門前庭部胃粘膜を Ussing 装置に装着し，漿膜側を正常リンガー液で灌流した。またエタノールによる胃粘膜上皮細胞障害の検討については 10mM 塩酸・10％エタノールを管腔側に投与し対照と比較した。これらの実験ののち試料にグルタールアルデハイド，オスミウム酸後固定の二重固定を施し，ウラニールアセテートでブロック染色を行いエタノールで脱水，樹脂包理した。厚さ1－3 μの切片に電子染色を施し，超高圧電子顕微鏡（生理研：Hitachi H－1250M）のもとで± 8° の傾斜で観察，写真撮影した。

正常胃粘膜上皮細胞では，細胞全体が細長く円柱状に観察され核も楕円形に観察されている。細胞の管腔側辺縁部に存在する分泌果粒の集積は，電子密度の比較的高い内容物を含んだ一個一個の健常な分泌果粒によって形成されているのが超高圧電子顕微鏡写真による立体観察によってよくわかる。管腔側の微絨毛も良く発達しているのが観察される。それに対して管腔側に塩酸・エタノールを投与した胃粘膜上皮細胞では，核は円形に近く観察されるが細胞膜の極端な湾入と細胞間隙に広がりがみられる。管腔側辺縁部に存在する分泌果粒の集積も一個一個の健常な分泌果粒よりなるのではなく，すでに開口放出を連続的におこしたと考えられる分泌果粒の膜成分より形成されているように観察される。管腔側の微絨毛はまばらに観察されるのみである。

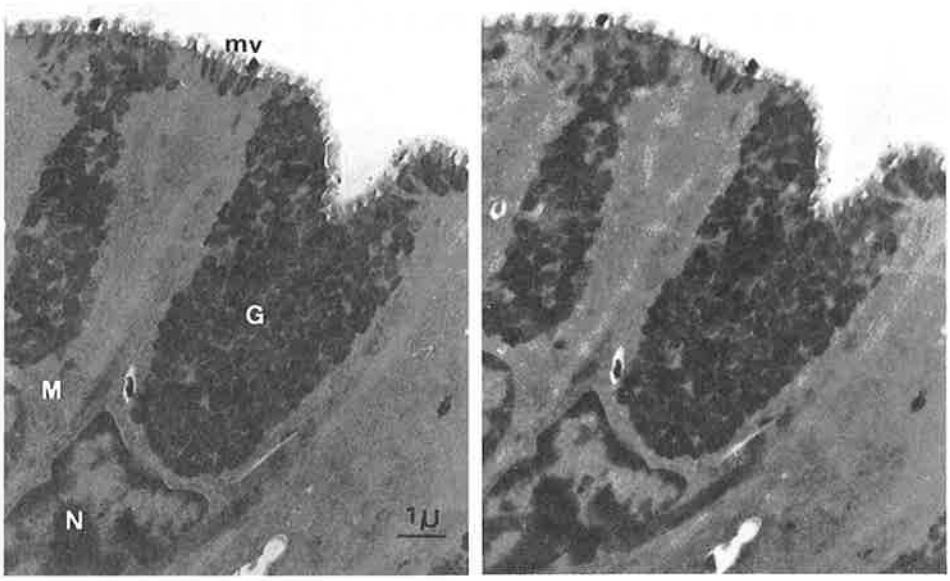


図1

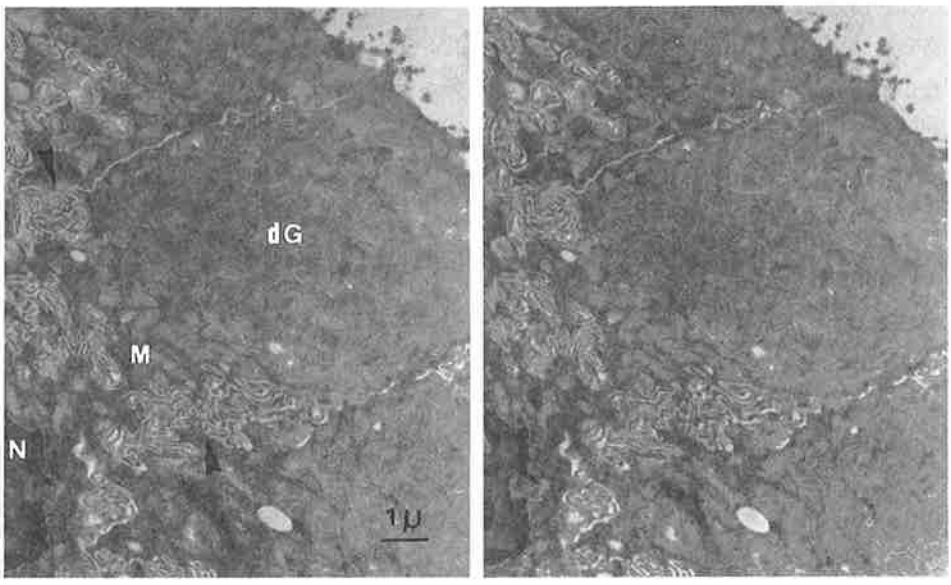


図2

図　胃粘膜上皮細胞正常時（図１）と塩酸・エタノール投与時（図２）のステレオ電顕写真。厚さ１μmの切片を±8°傾斜した。N：核，G：分泌果粒，dG：変性（開口放出を経た）分泌果粒，mv：微絨毛，M：ミトコンドリア，矢尻：細胞間隙。×6,000（図１，２）。

培養ヒト悪性グリオーマ細胞とヒト型モノクローナル抗体(CLN−IgG)の作用機序に関する免疫電顕立体観察

垰本勝司（兵庫県立成人病センター）
浜　　清（早大，人間科学）
小坂俊夫，有井達夫（生理研）

ヒト型モノクローナル抗体CLN−IgGはヒト$_X$ヒトハイブリドーマCLNH11から産生されるIgG2subclass抗体で，これまでの観察からヒト子宮癌と悪性グリオーマに特異的に反応することが判明した。この反応の詳細なメカニズムは不明であり，電顕レベルでの検討は行われていない。この特意的な反応を培養細胞を用いて経時的に観察し抗体が作用するメカニズムを知るため免疫電顕的手法を用いて観察した。

『実験方法』 ヒト培養グリオーマ細胞株U−251MG, U−87MG, U−373MG, MCA−1GB及び手術時に採取したグリオーマ初期培養細胞をサーモノックス板上に培養し，モノクローナル抗体CLN−IgGを加え，2，6，12，24，48時間作用させた後，金コロイド標識二次抗体で処理した。免疫反応終了後電顕固定し，アセトン系列で脱水後，臨界点乾燥し，カーボン蒸着を行い，日立H−1250M超高圧電顕にて加速電圧1000kVで立体観察した。

『結果』 4種類の細胞株と2種類の初期培養グリオーマ細胞で観察した結果，48時間までいずれの細胞でもCLN−IgGと細胞膜表面での反応が観察されたが，細胞株により反応の違いが明らかに認められた。細胞表面に最も金コロイドが数多く認められたのはMCA−1GB細胞であり，特に細胞突起の膜上にdiffuseに存在した(Figures)。次に反応が強かったのはU−373MGとU−251MGであり，いずれも細胞膜上に散在性に認められ，U−373MGではいわゆるCappingの所見が散見された。経時的観察では48時間で細胞表面での金コロイド粒子数がやや少ない印象があるものの有意の差は認められず，膜の形態学変化は明らかでなかった。細胞内への金コロイドの移行は明確でなく，特に核の周辺部は細胞質が厚く観察が困難で動的な把握は不可能であった。

『結論』 モノクローナル抗体CLN−IgGはヒト悪性グリオーマの細胞膜表面に存在する抗原を認識して特異的に反応することを超高圧免疫電顕で観察できたが，抗体の細胞内移行の有無に関しては明らかにできなかった。今後細胞膜の処理を行ったり，切片上での経時的観察により更に動態を明らかにしたい。

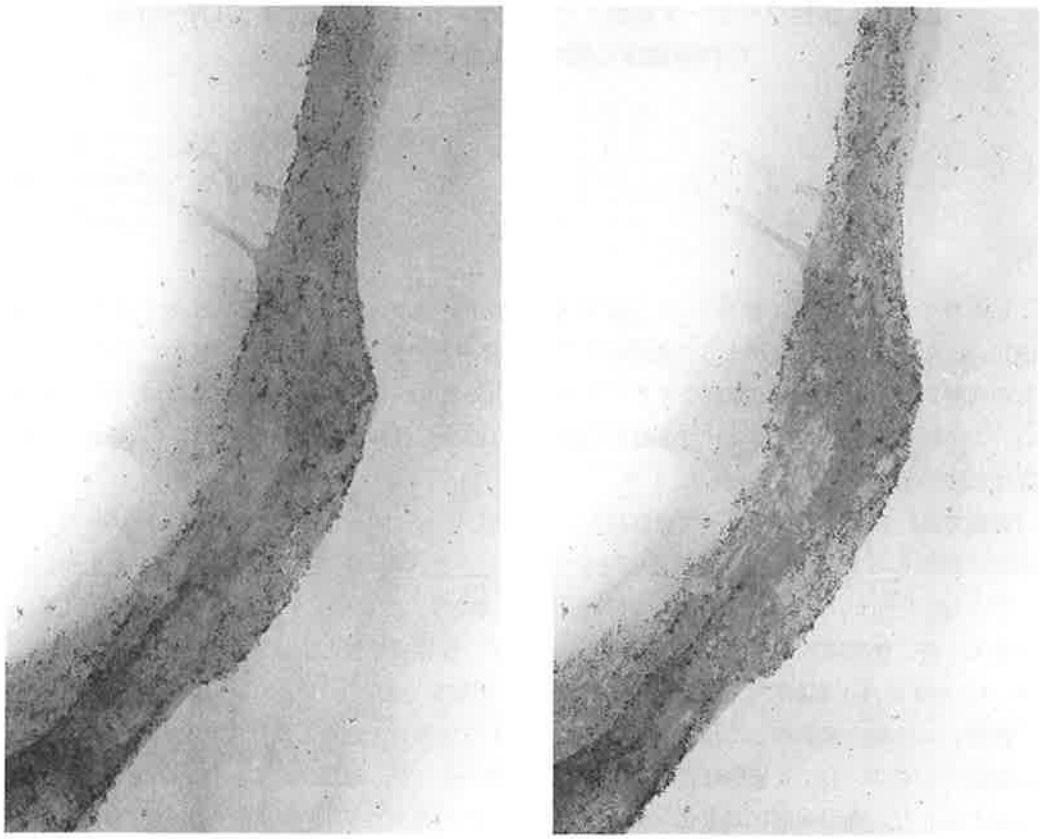


Figure ：
MCA－1GB グリオーマ細胞と CLN－IgG モノクローナル抗体との反応（24 時間）。細胞突起の膜表面に非常に多くの Colloidal gold particle が認められる。± 8° の傾斜で立体観察。

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染細胞の超高圧電子顕微鏡観察　Ⅲ
― HIV 持続感染細胞の観察―

吉田まり子，宇野文夫，新居志郎（岡山大・医・ウイルス）

【目的】

これまでに，HIV の微細形態およびウイルス粒子と感染細胞表面膜との相互関係について，超高圧電顕 (HVEM) 観察を試み，ウイルス粒子の成熟ならびに放出過程について報告した。今回は，異なる形態の HIV 粒子を産生する HIV 持続感染クローン細胞を用いて HVEM 観察を試み，

これらの粒子の微細形態と形成過程について検討した。同時に，超薄切片法による透過電顕(TEM)観察を行い比較検討した。

【材料と方法】

1） HIV 持続感染細胞：MT－4 細胞からクローン化された M10， M16 細胞を宿主細胞として，HIV の LAV 株で持続感染した細胞からクローニングした 2 種の HIV 持続感染細胞株， M10/LAVc1.2, M16/LAVc1.3 を使用した。これらは，いずれも非感染性で異なった形態の粒子を産生する。

2）電顕試料の作製法：HVEM 用には， poly－L－lysine でコートしたホルムバル膜上に感染細胞浮遊液を滴下し，吸着させたのち常法に従って二重固定した。アルコール系列による脱水，この途中で酢酸ウラニル加50％アルコールによる染色，脱水終了後酢酸イソアミルに置換し臨界点乾燥を行った。TEM 用には，感染材料を遠心沈澱したのち常法に従って固定，脱水，包埋した。

【結果】

H10/LAVc1.2 細胞では，超薄切片法による TEM 観察により，細胞の表面上にコアのないドーナツ様粒子を多数産生することが観察された。HVEM 観察においても，次に示すような形態的な特徴を有するドーナツ様の HIV 粒子を多数観察した。①粒子の中心に，小さな芯の様な高電子密度の物質を有することが観察された。②粒子の最外層のエンベロープの内側には，高電子密度の物質が比較的厚みのある層を形成して観察された。また，これらの高電子密度の層は完全に閉じた形ではなく一部は欠損しており，その外側をエンベロープが取り囲む像として観察された。

M16/LAVc1. 3 細胞は， TEM 観察により形態的に完備した粒子を産生することが観察された。HVEM 観察においても同様で，比較的均一な桿状のコアを有する粒子が細胞の表面上に凝集した像を観察した。また，これらの粒子のエンベロープの内側には，高電子密度の層は観察されなかった。

【考察】

前回までに，急性感染の系で HIV 粒子の微細形態並びに成熟過程について詳細に検討し， HIV 粒子は出芽部位で桿状のコアを有する成熟粒子を形成し表面膜から遊離することを報告した[1)]。今回は，異なる形態の HIV 粒子を産生する HIV 持続感染細胞を用いることにより，異なる段階の粒子の形成過程についてより詳細な知見を得た。M10/LAVc1. 2 細胞で観察されたコアのないドーナツ様粒子は，出芽部位において桿状のコアを形成できずに粒子形成が中断した状態と考えられ，エンベロープの内側の高電子密度の層が桿状コアの形成に関与していることが示唆された。

1） 岡崎国立研究機構生理学研究所年報，10巻， 275, 1989

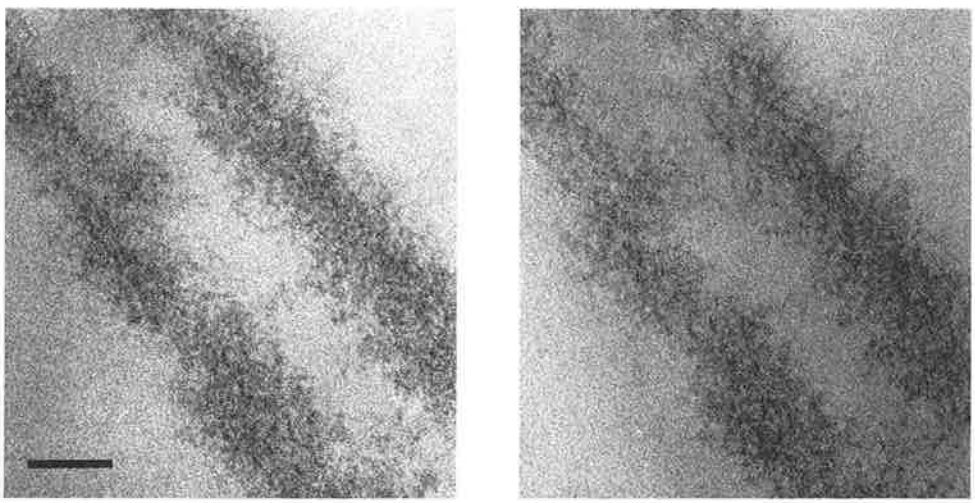
腎糸球体超微細構造の観察

四方賢一，槇野博史，太田善介（岡山大・医・第3内科）
有井達夫（生理研）

〔**目的**〕腎糸球体基底膜 (GBM) は糸球体における尿生成に関する main filtration barrier と考えられている。1977年我々はネガティブ染色法を用いて，ウシ，ヒトの GBM の電顕的観察を行い，GBM は細線維による網目構造から成り，その網目構造は直径約 3nm の均一な小孔を形成していることを証明した[1]。無処理の GBM を超薄切片法にて観察しても，この網目構造は観察できないが，我々は最近 GBM に化学的処理を加えることにより，超薄切片法でも観察可能であることを証明した[2)3)]。今回この GBM の立体的超微細構造をさらに広範囲にわたって観察するために，厚切り切片を作成して超高圧電顕にて観察した。

〔**材料及び方法**〕Wistar 系雄ラットの腎より Spiro の方法[4)]に準じて，GBM を分離した。分離した GBM を 0.01% elastase にて24時間，1% sodium dodecyl sulfate (SDS) 及び 2% 2−mercapto-ethanol にて72時間処理を行った。得られた試料を，GA, 四酸化オスミウムにて固定し，エタノール列にて脱水を行い，Epon812 に包埋し，厚切切片 (0.3−0.5 μm) を作成，酢酸ウラニウム，クエン酸鉛にて2重染色した。この切片を日立 H−1250M（生理研，1000kV）にて± 4° の傾斜をつけて写真撮影し，ステレオ組写真を立体観察した。

〔**結果**〕処理後の GBM では，GBM 内部の全体に細線維からなる多角形の網目構造が観察された (Figure)。網目の最小単位の小孔の直径は 3−5nm であり，細線維の幅は約 3nm であった。



化学的処理後の GBM の電顕像。全層にわたって細線維から成る立体的網目構造が観察される。(Bar＝100nm, ± 4°)

〔**考察及び結語**〕超高圧電顕を使用することにより，従来の超薄膜切片法に比べてより厚い試料をステレオ観察することができ，細線維によって形成される網目構造がGBMの全層にわたって普遍的に存在することが示された。網目を形成する細線維の幅は約3nmであり，我々の過去の研究結果より，主としてtype IV collagenによって構成されていると考えられる[2)3)]。この細線維によって形成される小孔の直径は3－5nmであり，アルブミン分子の短径（ヒトで3.8nm）に非常に近似している。このsizeの小孔をもつ網目構造がGBMの全体に普遍的に存在することから，この結果は，この網目構造が糸球体における尿生成に関する選択的ふるい分けに関与するとする，我々のmolecular sieve theoryをさらに支持するものと考えられる。超高圧電顕による厚切切片の観察はGBMの立体的超微細構造を検討するために有用であった。

〔**参考文献**〕

1）Ota, Z. et al. : Acta Med Okayama. 31 : 339 (1977)
2）Ichiyasu, A. et al. : Acta Med Okayama. 41 : 183 (1987)
3）Shikata, k. et al. : J Electron Microsc. 39 : 182 (1990)
4）Spiro, RG. : J Biol Chem. 242 ; 1915 (1967)

肥満細胞における脱顆粒機構の解明

田坂賢二，赤木正明（岡山大・薬），有井達夫（生理研）

Ⅰ型アレルギー反応の際に，肥満細胞からヒスタミンなどのchemical mediatorsが脱顆粒により遊離されることは知られているが，その遊離機構の詳細については不明のままである。Cytochalasin Dやcolchicineがヒスタミン遊離を抑制することから，細胞骨格系タンパクの関与が示唆されていたが，直接的な証明はなかった。著者等は，免疫電顕法や全載標本法を応用し，肥満細胞の細胞膜裏打ち部分や顆粒間隙に，アクチンフィラメントがネットワーク構造を呈していることを明らかにした。また，低張処理細胞の走査電顕による内部構造観察や超薄切片法により，顆粒はさらに小さい小顆粒の集合体で構成されており，それらは比較的太いフィラメントにより細胞膜や小胞体と連絡されていることも明らかにした。本研究においては，顆粒と連結している太いフィラメントの役割を検討する目的で，金コロイド含有medium中で脱顆粒を誘発した肥満細胞の内部構造を超高圧電子顕微鏡を用いて観察した。

【実験方法】ラット腹腔より得た肥満細胞をホルムバール支持膜を張ったシートメッシュ上に載せ，RPMI 1640培養液地中で，37℃，4時間培養した後，直径5nmの金コロイド含有medium中でcompound 48/80 0.2 μg/mlを作用させた。2% glutaraldehydeと0.1% ruthenium redの混液で1時間，1% OsO_4と0.1% ruthenium redの混液で30分間固定，飽和酢酸ウラニルで10分間染色を行った後に，脱水，臨界点乾燥を行った。得られた試料は，日立H－1250M（生理研，

1000kV ）超高圧電子顕微鏡で写真撮影した。

【結果と考察】肥満細胞は培養するとかなり扁平になるが，核周辺部は厚く電子線透過性が悪いため，超高圧電顕でも内部構造を観察することはできなかったが，細胞周辺部は薄く伸び，電子線透過性が良く，顆粒の周りに多数のフィラメントが観察された。48/80 を作用させると，脱顆粒が誘発され顆粒が細胞外に放出されるが，放出された顆粒はすぐに細胞から離れていくのではなく，細いフィラメントにより細胞と連結されていた。また，数個の顆粒がまとまって放出される mass degranulation も観察された。これらの顆粒が互いに細いフィラメントにより連結されている像も観察された。細胞周辺部には，変性した顆粒が多数観察され，それらの顆粒は太いフィラメントと連結していた。そのフィラメントの内部には多数の金粒子が観察された。また，変性した顆粒の内部にも金粒子が観察された。これらの結果は，顆粒と連結した太いフィラメントが，顆粒と細胞外とを連絡する canalicular system として機能している可能性を強く示唆している。

HTLV−I associated myelopathy (HAM) 患者より分離されたウイルス粒子の超微形態

大脇祐治（高知医大・第 2 病理）

〔目的〕超高圧電子顕微鏡 High voltage electron microscope (HVEM) による HTLV−I の観察において，それらの微細構造，ウイルス被膜における各種リンパ球マーカー発現やレクチンとの結合性について，細胞膜との関連性を主体に観察を行ってきた（生理学研究所年報 5 : 434−435, 1984 ; 同 8 : 506−508, 1987 ; 同 10 : 279−280, 1989 ）。これらの結果から通常型電顕観察に比し HVEM では， HTLV−I の微細構造，特に発芽様式の観察に有用であるのみならず，免疫電顕手法を用いた試料においても標識状況の観察に有用であることが示唆された（細胞 18 : 18−22, 1987 ; J. Clin. Electron Microscopy 23, 1990 in press ）。

今回は，抗 HTLV−I 抗体陽性の HAM および encephalopathy 患者から分離されたウイルス粒子について，成人 T 細胞白血病 (ATL) 由来の HTLV−I と比較しつつ HVEM による観察を行った。

〔方法〕 2 例の HAM および encephalopathy 患者脳脊髄液中リンパ球との混合培養により形質変換を生じた健常人リンパ球を細胞ペレットとなし，型の如くエポン樹脂に包埋し，準超薄切片については，酢酸ウラニルとクエン酸鉛染色を各20分ずつ行い，カーボン蒸着後，日立製 H−1250M 型 HVEM (1017kV) にて，直接倍率 ×20,000 で ＋12°〜−12° の傾斜をかけてウイルス被膜と細胞膜との関係について重点的に観察した。

〔結果と考察〕本検索で用いた細胞株におけるウイルス産生や HLA−D, CD25, HTLV−Ip19 な

どの抗原発現に関しては通常型電顕により確認している。本検索では，用いた２つの細胞株共に産生ウイルス量は，前回まで用いていたMT－２細胞に比較しはるかに小数であり，HVEM観察によりウイルス粒子を同定すること自体がかなり困難であった。しかし，同定できたウイルスに関しては，従来報告されているHTLV－Iの微細構造と基本的には同一であり，中心に核様体を有し被膜で囲まれたC型粒子であり大小不同性はあまり目立たないが成熟型に比し，未熟や発芽粒子が少ないという特徴は共通であった。又，細胞膜に近接した粒子では，傾斜をかけても細胞膜との直接連続性を示すものは見出し得なかった。更に胞体外HTLV－I粒子を大量に産生している細胞のHVEM観察において，粒子の融合像や連珠状構造が認められたが（細胞 18：18－22, 1987；J. Clin. Electron Microscopy 23, 1990 in press），今回の材料では産生粒子が少数であったためかそのような構造は認められなかった。

以上抗HTLV－I抗体陽性のHAM並びにencephalopathy患者から分離されたウイルス粒子は本質的には，ATL由来のHTLV－I粒子と同様の基本構造を有しており，HVEM観察においても相違点は見出し得ず，形態的には同一のものと考えられた。従って特に芽出様式についても既知動物由来C型粒子とは異なっていることが示唆された。

Trypanosoma evansi における三次元超微構造の研究

比留木武雄（島根医大・微生物・免疫），有井達夫（生理研）

【目的】

本研究は前年度の研究に引き続いて，*T. evansi* の超微構造を超高圧電子顕微鏡(H-1250M)を用いて調べ，従来の主として普及型透過型電子顕微鏡を用いて推定されてきた未知の構造の不明確な部分を三次元構造として観察する為に企画された。

【材料と方法】

前に報告した通りであるのでそちらを参照されたい（文献１）。

【結果と考察】

比留木は昭和59年（1984）11月に開催された日本熱帯医学会総会において本原虫体内に鞭毛膜を伴うことなく存在する"9＋2 STRUCTURE"のAXONEMEの存在することを報告し（文献２），同じ所見を示す電子顕微鏡写真を呈示してきた（第29回日本熱帯医学会，1987年，文献３）。本年度はThe 7th Japanese-German Cooperative Symposium of Protozoal Diseases, 1989）に超高圧電顕による三次元的所見と併せてこの知見を発表したところ，期せずして，ドイツのベルリン自由大学のU. Frevertらも，*Trypanosoma congolenses* で，同じ所見を見つけて同じ会場で発表していることがわかった。彼女らは，それらの所見は蛋白融解酵素pronase処理をすると該原虫で観察されるとしていた。報告者の材料は感染動物の血液から分離したものであり，まだこの

時点でそれらの所見がFrevertのいうように形態変化によるものなのか，正常構造として，生活環の一部にそのような形態をとる可能性があるのかについての論及すべきデータを何等持ち合わせない。

超高圧電子顕微鏡の所見は一旦，細胞外にでたと考えられる鞭毛が，再び細胞内に入り込むと考えられている所見を呈している。

文献

1．Hiruki,T. Existence of a connecting system in the flagellar apparatus and the accessory structures of *Trypanosoma evansi*.

2．比留木武雄　*Trypanosoma evansi*（台湾株）に於ける新知見，特にその超微形態面について　日本熱帯医学会雑誌，13 (2), 140－141, 1985.

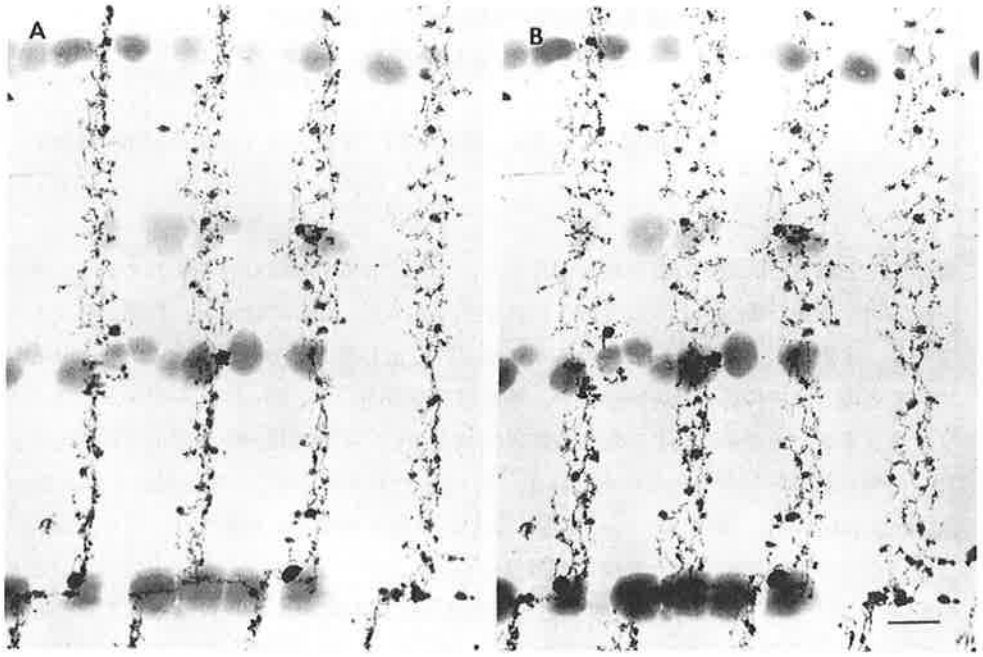
3．比留木武雄，有井達夫　超高圧電顕による *Trypanosoma evansi* の観察，特に膜下微小管の分布の様式について　日本熱帯医学雑誌，16 (2), 151, 1988.

単一筋線拘縮中の横行小管の走行

吉岡利忠（聖マリアンナ医大・第２生理学）

カフェイン，キニーネあるいはカリウム拘縮では筋節長の不揃いと，多くの場合，１個の筋節中においてＡ帯の位置の動揺が示される。これらの不揃いは，Ａ帯をささえる構造，たとえばコネクチンの働きや，クロスブリッジのアクチンフィラメントに結合する数，筋小胞体からのカルシウム放出能のちがい，あるいはフィラメントのカルシウム感受生の変化などが原因として考えられる。三次元構造において１本の筋原線維に含まれる１単位の筋節の中でのＡ帯の振舞いは張力発生に重要な意味を持つものと考え，昨年度に引き続き例数を増加し分析してみた。Ａ－帯の動揺は｜Ix－Iy｜/(Ix＋Iy)×100 として電子顕微鏡写真から測定し得た。ここでIxおよびIyは筋節中の両側Ｚ帯からＩ－フィラメンントの端までの距離である。5mMカフェイン拘縮３分後では，単一筋線維の中央部分で約40％，近位および遠位端では約10％のＡ－帯の動揺が得られた。すなわちＡ－帯の動揺は筋線維の中央部位で大きく両端（腱に近接する部位）では小さいことから，カフェインによる張力発揮は主に中央部に存在する筋節が関係しているものと考えられる。以上は普通透過型電子顕微鏡を用いて得られた結果である。

カフェイン拘縮中の筋節長の変化を知る目的でＺ帯上を走行する横行小管に注目した。超高圧電子顕微鏡用に試料を作成するため，ゴルジの方法により横行小管を染色した。長期間のインキュベーションにおいても横行小管に反応沈澱物が生じている筋線維，あるいは全く侵入していない筋線維がみられるがその原因は不明である。横行小管系は両性類の骨格筋の場合，Ｚ帯上を走行していることから，カフェイン拘縮中のＺ帯の走行の不規則性を得ることで筋原線維中の筋節



5 mM カフェイン拘縮 3 分後のゴルジ染色をした骨格筋線維。
横行小管に囲まれた筋原線維が推測される。黒い球はミトコンドリア。
傾斜角度± 8°, Calibration bar : 1 μm 。

の三次元形態を把握できる。図は 5mM カフェイン拘縮 3 分後の試料から得られた横行小管の走行である。筋原線維の各筋節では不規則に横行小管が続き，立体構造からは筋原線維をとり囲む走行が認められた。また横行小管が筋原線維の長軸方向に進む像も得られた。得られた横行小管の走行から，カフェイン拘縮中では筋節長に過伸展あるいは超拘縮像がいたるところにみられた。このような構造的特徴とA－帯の動揺は，カフェイン拘縮にみられる 2 相あるいは 3 相の拘縮曲線を引き起こす 1 つの要因であると考えている。以上の結果よりカフェイン拘縮中では筋節中の太いフィラメントが両側の細いフィラメントに同じ距離，すなわち同じ数のクロスブリッジが引き込まれるというものではなく，またクロスブリッジの全てが張力発揮のために動員されるものでもないと考えられる。

基底膜形成過程の組織細胞化学的検討
——表皮・真皮再結合実験——

秋元義弘，川上速人，高田邦昭，平野　寛（杏林大・医・解剖）
山岸俊一（生理研）

皮膚の表皮と真皮との境界には基底膜が存在し，これによって両者は仕切られている。基底膜は，一見安定で不変な構造のように受けとられがちであるが，実際には活発に代謝が営まれている場であり，皮膚も例外ではない。このように変易性に富む基底膜の形成過程を，in vitro 培養系を用いて表皮と真皮の再結合実験を行い，基底膜構成成分（IV 型ーコラーゲン，ラミニン，フィブロネクチン，テネイシン）に対する特異抗体を用いて免疫組織細胞化学的に検討した。

鶏胚（孵卵13日齢）の未分化な皮膚（脚部）を EDTA (0.4%，37℃，30分間）または Dispase（1000 units/ml，37℃，30分間）にて処理すると，表皮と真皮とに分離され，基底膜は除去される。このようにして得た表皮と真皮とを再結合し，ミリポアフィルターに貼り付け，合成培養液 (BGJb) にて 1 ～ 8 日間培養，基底膜の形成過程を免疫組織細胞化学的に観察した。再結合皮膚 (recombinant) を 4 %ホルムアデルヒド固定後，2.3M ショ糖に浸漬した。さらに初期胚の皮膚は凍結超薄切片を製作するのが非常に困難であることから，凍結準超薄切片 (0.3～1 μm) を作製，金コロイド標識法を用いて，H－1250M 型超高圧電子顕微鏡（加速電圧 1,000kV ）並びに JEM－2000FXII（加速電圧 200kV ）にて，それぞれ基底膜構成成分の局在を観察した。

再結合してから 2 ～ 3 日後，まず表皮基底細胞の基底面にヘミデスモゾームが出現し，続いてその直下に電子密度の高い基底板が断片的に形成された。反応陽性部位もこの基底板に一致して出現した（図 1 ）。この不連続な基底板は次第に相互に連結して，7 ～ 8 日後には連続性の基底板を形成した。反応陽性部位もまた次弟に連続性になっていった（図 2 ）。

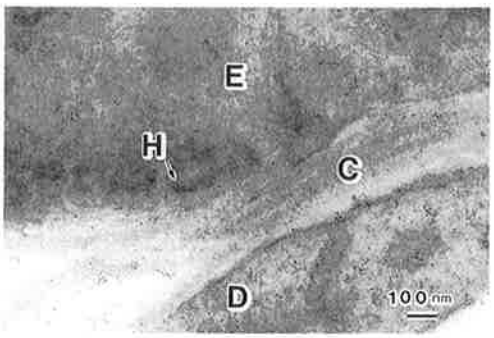


図 1　Recombinant 皮膚におけるラミニンの局在。培養 3 日目。ヘミデスモゾーム直下，表皮基底細胞並びに真皮の線維芽細胞に反応が認められる。E：表皮，D：真皮，H：ヘミデスモゾーム，C：コラーゲン線維。

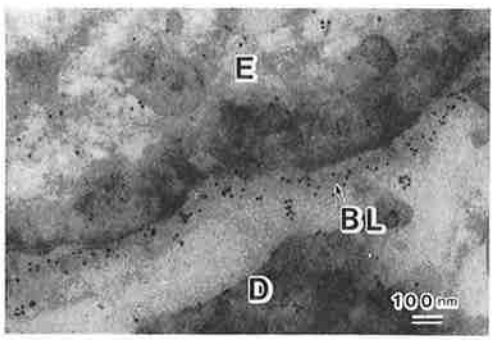


図 2　Recombinant 皮膚におけるラミニンの局在。培養 7 日目。基底板はほぼ連続性となる。反応陽性部位もまた次第に連続性になっていく。E：表皮，D：真皮，BL：基底板。

以上のように，凍結超薄切片を作製するのが非常に困難であり，かつ間質の細胞外基質のほとんどが免疫染色操作の過程で消失してしまうような試料では，厚めに薄切した切片を加速電圧が通常より高い透過電子顕微鏡下で観察することにより，構造を保持したまま抗原部位を容易に追究することが可能である。

血小版立体微細構造に対する薬理学的研究―6―

西尾廣昭，瀬川富朗（広島大・医・総合薬学）

ウサギ血小板の立体微細構造，特に開放小管系 (OCS) あるいは小胞系とセロトニン貯蔵部位である濃染顆粒 (dense body) との，機能的，形態学的関連性について超高圧電子顕微鏡 (HVEM) により三次元的に観察し，薬理学的考察を行う目的で，昨年度の共同利用研究に引続き，検討を加えた。すなわち，これまでの臨界点乾燥法，凍結置換法に引き続いて，本年度は試料の乾燥法として，より artifact およびコンタミの少ないと考えられている組織凍結乾燥法による，より簡便な試料作成法を確立した。さらに，この方法を用いて，血小板立体微細構造に対する各種処理，すなわち，formvar grids 上でのポリカチオンによる活性化，concanavalin A (Con A), あるいは，Ca^{++}処理の影響についても検討を行った。

〔実験方法〕 組織凍結乾燥法としては，以下のような操作法により行った。これまでに確立した方法(1)により，予め poly－L－lysine 処理した電顕用 formvar grids 上で固定，染色した正常ウサギ血小板試料を 25% さらに 50% DMSO 水溶液で洗浄し，液体窒素にて急速凍結を行い，すぐさま組織凍結乾燥装置（EM スコープ，FD－500）により凍結乾燥を行った。各々試料は Carbon 蒸着後，HVEM により検鏡した。薬物作用の影響は，血小板懸濁液中であるいは，formvar grids 上で薬物を作用させることにより検討した。

〔実験結果および考察〕 超薄切片法で同定されている血小板細胞内微細構造のうち，本実験方法による，超薄切片法によらない HVEM 電顕像においても，dense body, α－顆粒，OCS, ミクロチュブルスおよびミトコンドリア等ほぼすべての血小板内部微細構造が同定され立体的観察が可能であることが明かとなった。しかし，個々の血小板の間では，その微細構造は非常に変化に富んでいた。このことは，血小板の特異的な生成過程，あるいは成熟・老化過程を反映しているものと思われる。Formvar grids 上での活性化により，血小板は周辺部に偽足様突器を形成し，不規則な球状へと変形し，そのため極端に電子密度が上昇したため内部微細構造の観察は出来なかった。同じく，formvar grids 上で Con A 処置を行っても不規則な球状への変化が認められたが，この処置によっては血小板の中心部のみが高電子密度を呈しており，ポリカチオン処理の場合とは明らかに異なっていた。高濃度 Ca^{++} (5mM) 存在下で固定を行っても，血小板の活性化を示す電顕像は得られなかったが，一般的に細胞内顆粒の電子密度の上昇が認められた。血小板立体微

細構造への薬理学的影響についてより詳細な検討を行うためには，今後，数多くの血小板についての観察が必要であると思われる。なお，本研究の一部は文部省科学研究費補助金（課題番号63571098）を用いて行われたものである。

(1) 西尾廣昭，瀬川富朗，生理学研究所年報，第9巻，493 (1987)

リン脂質膜のリップル構造の3次元再構成

加藤　知，八田一郎（名大・工・応物），有井達夫（生理研）

リン脂質は，生体膜の主成分の一つとして生体膜の基本構造を成し，膜タンパク質の生理活性にも重要な役割を担っていると考えられる。リン脂質二重層膜の物性やリン脂質分子間の相互作用の詳細な研究は，生体膜の活性を調べる上で重要な基礎データを与えるであろう。われわれは，リン脂質膜の示す相転移現象に着目し，各相における物性や構造を様々な各度から検討してきた。本研究では，ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) 等のリン脂質で見られるリップル相についてその3次元微細構造を電子顕微鏡観察により明らかにすることを試みた。リップル相では，膜面が周期12－15nmの3次元的な波打ち構造（リップル構造）を取ることが知られているが，その振幅や対称性などの微細構造に関してはなお議論がある。われわれは，これまでこの通常周期のリップル構造のおよそ倍の周期を持つ倍周期リップル構造に関してその出現条件等を検討してきた。ここでは，凍結割断法により得られたレプリカ膜を試料として超高圧電子顕微鏡の回転傾斜ステージにより倍周期リップルのステレオ写真を撮り3次元再構成を試みた。レプリカ膜は，DPPCリポソームを38℃（リップル相）から液体フレオン中に急速凍結し，蒸着装置内で割断後，白金カーボン蒸着することにより作製した。得られたDPPCリポソームは，多重層から成り，その割断面は膜に沿った方向以外に膜面に垂直方向の割断面も見られる。

通常周期のリップル構造は，畝の方向が互いに120°ずつ異なるドメインから成るパターンを形成することが知られているが，ステレオ写真によりそのドメイン境界で膜面が3次元的に折れ曲がっている場合が観察された。これは，リップルのドメイン形成を考える上で，重要な知見を与える。われわれは，リップルの形成機構と炭化水素鎖の膜面に対する傾きの間に相関があり，ドメイン境界ではこの傾きの整合性により膜面の折れ曲がりが生じると考え，さらに膜面に垂直方向まで含めたリップル構造の3次元的なパターンの解析を進めている。リップルの振幅や形状の対称性については傾斜した際に対応点を決めるのがむずかしく，現在方法を検討中であるが，これまで得られた結果では，倍周期リップル構造は膜面に垂直方向に何らかの非対称性を持つことが示唆される。この点に関しては，双面レプリカ法により割断してできる2つの面の両方を対比観察することを試みたが今のところ成功していない。今後上記の諸点に加えて，多重層膜の層間の関係まで含めて解析できるように切片の3次元再構成等を試みていきたい。

【研　究　会　報　告】

研究会報告

〔目　　次〕

Molecular Neurobiology の展望（代表者：小幡邦彦）
（1989年６月16日～17日） …… 299
光情報系の学際的理解（代表者：外崎　昭）
（1989年８月４日～４日） …… 306
消化器の機能及びその調節機構（代表者：鈴木裕一）
（1989年８月24日～25日） …… 322
聴覚の比較生理学（代表者：柳沢慧二）
（1989年10月27日～28日） …… 333
脳腸ホルモンの生理作用に関する研究会（代表者：菅野富夫）
（1989年11月７日） …… 340
内外受容器のブドウ糖分子受容識別機構の特性と役割（代表者：足立　明）
（1989年12月４日～５日） …… 345
生体内における水構造と水輸送及びNMR－CTの研究（代表者：曾我美勝）
（1989年12月８日９日） …… 355
細胞膜輸送活性と細胞の代謝（代表者：北里　宏）
（1989年12月15日～16日） …… 366
生体系の機能と電解質－10年のあゆみと展望（代表者：曾我美勝）
（1990年１月８日～９日） …… 382
脳内分泌機能の反回制御(代表者：鈴木光雄）
（1990年１月25日～26日） …… 396
睡眠促進物質研究会（代表者：井上昌次郎）
（1990年２月１日～２日） …… 409
筋収縮の分子レベルにおける基本的機構（代表者：馬詰良樹）
（1990年２月10日～11日） …… 419
ギャップ結合細胞間連絡の上皮細胞における生理機能（代表者：菅野義信）
（1990年２月19日～20日） …… 421
神経科学と光学的計測技術（代表者：神野耕太郎）
（1990年３月12日～13日） …… 428

『Molecular neurobiologyの展望』

1989年6月16～17日
代表者　小幡邦彦（生理研）
世話人　小幡邦彦

1．神経特異的cDNAクローンの取り方
三木直正（金沢大がん研究所）

2．オルタナテイブスプライシングの機構
鍋島陽一（精神・神経センター）

3．トランスジェニックマウスで何が分かるか
勝木元也（東海大医学部）

4．細胞タイプ特異的転写制御因子の捜し方
鈴木義昭（基生研）

5．ホメオティック遺伝子の神経発生での役割
黒岩　厚（東京都神経研）

6．ミエリン形成障害ミュータントmldマウスの遺伝子解析
御子柴克彦（阪大蛋白研）

7．ヒトチロシン水酸化酵素遺伝子の構造
金田典雄，小林和人，永津俊治（名大医）

8．アルツハイマー病アミロイドβ-proteinの遺伝子導入による培養細胞での発現
丸山　敬，吉川和明（東京都精神研）

9．神経特異タンパク質drebrin Aの遺伝子構造
児島伸彦，白尾智明，小幡邦彦（生理研）

10．神経組織における免疫グロブリンスーパーファミリーに属する蛋白質の構造と役割
植村慶一（慶応大医）

11．ヒト脳記憶過程の“Tracing circuit”モデルとATP・アデノシンの役割，
および分子進化的意味
黒田洋一郎（東京都神経研）

12．一部中枢ニューロン周囲を染める抗体群
藤田　忍（三菱生命研）

13．運動ニューロンの軸索成長を可能にしている候補分子
田中英明（群馬大医）

14．哺乳類の終脳セグメントに特異的な膜蛋白質
森　憲作，岡　昌吾，今村一之（大阪バイオサイエンス研）

15. 大脳－赤核投射の生後発達

村上富士夫，東　秀二（阪大基礎工）

討論参加者

三木直正（金沢大），鍋島陽一（精神神経センター），勝木元也（東海大），鈴木義昭，鈴木利治，井上貴文（基生研），黒岩　厚，黒田洋一郎（東京都神経研），田中英明（群馬大），北村邦男（埼玉医大），植村慶一，川村光毅，湯浅茂樹（慶大），宮田雄平，小向正幸，斉藤文子，宇井久美子（日本医大），藤田　忍（三菱生命研），吉川和明，丸山　敬（東京都精神研），松永　勉（浜松医大），堂前純子（名市大），金田典雄，笹岡俊邦，石井　晃，鷲見千穂，小林和人（名大），久野　宗（京大），村上富士夫，勝丸博信，東　秀二，御子柴克彦（阪大），森　憲作，今村一之，岡　昌吾（大阪バイオサイエンス研），小幡邦彦，赤川公朗，白尾智明，児島伸彦，寺田庄一，橋本隆紀，山岸俊一，杉山博之，山口和彦（生理研）

研究会概要

神経系の機能は，遺伝子の細胞特異的，時期・活動特異的な発現により作られた多様な分子によって担われている。これらの分子構造や遺伝子発現調節機構は近年ますます発展する分子生物学的技術を利用して研究され，Molecular genetic neuroscience, Molecular neurobiology 等と呼ばれている。わが国では，このとり組みが十分とはいえず，これに対応する日本語訳も定着していない。

本研究会は，この分野の研究で，今後の発展の基盤を作ることを目的とし，既に業績をあげている者とこれからとり組もうとする者が集まり神経特異的 cDNA クローニング，転写調節因子の研究法，高次神経機能との関係などいくつかの話題提供のもとに十分な討論と情報交換を行った。

神経特異的 cDNA クローンの取り方

三木直正（金沢大がん研）

ある組織に特異的な機能を調べるのに，その組織に特異的に発現している蛋白質の機能を調べれる方法は大変有効である。脳に特異的な mRNA は約30,000種と計算されている。従って，これらの蛋白質及び遺伝子の性質や働き，さらにこれらの相互作用を一つ一つ明らかにすることにより，神経系の機能を分子レベルから追及できると考えている。本研究会では，私達が見いだした，網膜に特異的な蛋白質である visinin および MEKA について紹介した。これらの遺伝子のクローニング法については，プラス・マイナス法および抗体を用いた方法を紹介すると共に，これらの遺伝子の解析により得られた蛋白質の情報化から，これらの蛋白質の機能を推定する方法についても具体的に説明した。さらに，色覚物質遺伝子のクローニングおよび色覚異常のメカニズムについても， Nathans らの研究を紹介した。

トランスジュニックマウスで何が分かるか

勝木元也（東海大・医・ DNA 生物学）

ヒトゲノムプロジェクトが成功し，ヒトゲノムのすべての塩基配列が決定されたとしても，遺伝子の生物機能について予測することは困難である。遺伝子の機能を知るには，遺伝子を細胞に戻し，どのような条件で発現し，遺伝子産物の働きは何かなどを調べる必要がある。そのとき，受精卵への遺伝子導入は，受精卵が全能性をもつ細胞であることから，生物固有の最も興味ある個体発生を通して遺伝子機能を調べる方法となる。また，突然変異を作ることも可能である。今回は，次の 3 例について遺伝子導入マウスによって得られた知見を報告した。

1）アンチセンス DNA 導入による特定遺伝子機能の抑制。
2）導入遺伝子の体細胞突然変異による個体発癌。
3）インターロイキン 2 遺伝子導入による予想外の運動失調の発症。

細胞タイプ特異的転写制御因子の捜し方

鈴木義昭（基礎生物研）

トランスジェニック動物，細胞への DNA トランスフェクション検定系，および無細胞転写系

などを活用することができるようになって，細胞タイプ特異的な遺伝子の転写制御に関わる因子を追求する道がひらけてきた。加えて，ゲルシフト検定法やフットプリント法の特異性に根ざしたDNA－蛋白質相互作用の特異性を手がかりとして，1988年にはcDNAクローニングの新しい技術が開発されることとなった。これらの技術の活用により，転写制御因子を一たんDNA結合因子としてそのcDNAをクローン化した後，その因子の転写機能を検定・同定して，特異的転写制御因子を解析する方策が確立したのである。

これらの技術の開発とその特異性について論じつつ，カイコ *Bombyx mori* の絹糸腺に特異的に発現される遺伝子であるフィブロイン遺伝子およびセリシン遺伝子の転写制御因子を解析している経過について紹介を行なった。

ホメオボックス遺伝子と神経発生

黒岩　厚（東京都神経科学総合研）

ショウジョウバエの体節形遺伝子として解析が進んでいる分節化遺伝子やホメオティック遺伝子は神経系の形成にも関与しているデータが提出されている。これらの遺伝子の多くは共通してホメオボックスと呼ばれる配列を蛋白産物中に持ち，遺伝子発現制御因子としての蛋白機能の中で特にDNA結合能を持つ部分と考えられている。この様な配列はショウジョウバエのみならずヒトに至るまでの脊椎動物の遺伝子中にも存在し，これをを有する遺伝子はホメオボックス遺伝子と称されている。脊椎動物のホメオボックス遺伝子は共通して中枢神経系での発現が認められ特に脊髄での発現は前後軸に沿った領域特異性を示す。この様な発現パターンはショジョウバエのホメオティック遺伝子にきわめて類似しており，遺伝子機能も同様なものではないかと期待されている。

ミエリン形成障害ミュータント mld マウスの遺伝子解析

御子柴克彦（阪大蛋白研・蛋白質機能制御部門）

ミエリン形成障害をおこす突然変異動物の一つである mld (myelin deficient) マウスはミエリン塩基性蛋白質 (MBP) 遺伝子の発現障害をおこしている。mld マウスの遺伝子解析の結果，MBP遺伝子の重複変異がおきていた。しかも上流域の遺伝子内に逆位配列がみられ，その結果アンチセンスRNAが形成されていた。また逆位を示すイントロンの領域に免疫グロブリンクラススイッチ領域が含まれていた。

ヒトチロシン水酸化酵素遺伝子の構造

金田典雄，小林和人，永津俊治（名大・医・生化）

チロシン水酸化酵素はカテコールアミン生合成の第一律速酵素でチロシンからドーパを生成する。ヒト本酵素のcDNAならびに遺伝子DNAのクローニングを行なったところ，本酵素はN末端近傍の構造がわずかずつ異なる4種のアイソザイムとして存在し，これらの多型性は単一遺伝子からの選択的スプライシングによることが明らかになった。これらのアイソザイムをCOS細胞で発現させたところ，酵素分子あたりの活性はそれぞれ異なることが示された。

アルツハイマー病アミロイドβ-proteinの遺伝子導入による培養細胞での発現

丸山　敬，吉川和明（東京都精神研，分子生物）

アルツハイマー病の脳に蓄積するアミロイドの主成分であるβ-proteinを選択的に発現する培養細胞系の作成を試みている。ヒトおよびラットのアミロイド蛋白前駆体cDNAをもとにしてβ-protein領域およびそれを含む3'側領域に対応する塩基配列をsite-directed mutagenesisを用いて作成した。この配列を挿入した発現ベクターをDEAE-dextran法を用いてCOS-1細胞に導入し，細胞内で一過性に発現しているβ-proteinを免疫細胞化学法によって検出したところ，細胞核近傍に陽性反応物質の集積が認められた。

神経特異タンパク質drebrin Aの遺伝子構造

児島伸彦，白尾智明，小幡邦彦（生理研・神経化学）

ニワトリ脳の発生段階に応じて特徴的な発現，消失パターンをもつ酸性タンパク質drebrinは，2種類の幼若型(E1およびE2)と1種類の成熟型(A)に分類される。我々は，既に幼若型2種のcDNAをクローニングすることによって，それらの構造上の違いを同定した。今回，成熟型に対応するcDNAをクローニングし，その塩基配列を決定して，幼若型drebrinとの違いを明らかにした。2種の幼若型drebrin cDNAの違いは，129 bpの挿入配列の有無であったが，成熟型のcDNAには，上記の挿入配列の直前に更に138 bpの挿入があった。これらのcDNAをプローブとしたゲノムDNAのサザンブロット解析の結果から，これら3種のdrebrin mRNAは，単一遺伝子からスプライス部位の選択の違いによって生ずることが示唆された。また，各drebrin分

子の発現時期，発現部位が異なることから，スプライシングの違いを，発生時期，細胞種によって特異的に調節するメカニズムが存在すると考えられる。

ヒト脳記憶過程の "Tracing circuit" モデルと ATP・アデノシンの役割，および分子進化的意味

黒田洋一郎（東京都神経研）

ヒト脳の記憶過程に関して，大脳皮質連合野の発生学的遅れによる，シナプス結合のダイナミックな変化による記憶ニューロン回路の長期保持を骨子とする "Tracing circuit" モデルを提唱した (Neurochem. Int. **14**, 309, 1989)。回路内シナプスにおいて，高頻度刺激によって放出される ATP・アデノシンの側抑制および Ecto-protein kinase によるシナプス形成・保持が予想された。類人猿からヒトへの脳の進化と言語能力の発生は，大脳皮質ニューロン数の増加のみならず，連合野でのシナプス結合の可塑性を規定する調節遺伝子の変異で説明できる。

一部中枢ニューロン周囲を染める抗体群

藤田　忍（三菱生命研）

中枢神経系のニューロンの多様性を研究するために，一部のニューロンにのみ結合するモノクローナル抗体を検索したところ，抗体 473, 376, 1B5, 374 等の一群の抗体が発見された。二重染色によりこれらは異なるニューロンのサブセットに結合することが判明した。また切片のコンドロイチナーゼ処理により，抗原性が消失するもの (473, 376), 出現するもの (1B5), 変化を受けないもの (374) があることが明らかになり，ニューロンのタイプによって異あるプロテオグリカン様分子が関与していることが示唆された。

運動ニューロンの軸索成長を可能にしてる候補分子

田中英明（群馬大・医・薬理）

モノクローナル抗体 (MAb) SC1 は初期ニワトリ胚脊髄ニューロンのうち運動ニューロンの細胞表面に特異的に，また一過性に結合する。MAb M7412 は運動ニューロン軸索の通路に一過

性に発現される膜蛋白に結合する。抗体アフィニティカラムによりそれぞれの抗原を精製したところ，分子量10万と７万の糖蛋白であった。精製した抗原をもとにポリクローナル抗体を作製し，λgt 11の発現ライブラリーからそれぞれのcDNAを得た。

哺乳類の終脳セグメントに特異的な膜蛋白質

森　憲作，岡　昌吾，今村一之（大阪バイオサイエンス研・神経科学）

免疫組織化学的スクリーニング法により，ウサギの終脳に特異的に結合するモノクローナル抗体がみいだされた。この抗原分子を精製したところ，分子量130KDaのサブユニットの４量体からなる糖蛋白質で，調べたすべての哺乳類の終脳ニューロンの表面膜に選択的に発現していた。この蛋白質をtelencephalinと名付け，現在その一次構造の決定および終脳における機能の推測のための研究をおこなっている。

大脳－赤核投射の生後発達

村上富士夫，東　秀二（阪大・基礎工）

子ネコでは大脳皮質感覚運動野の一側性破壊によって，成ネコでは観察されない交差性の皮質－赤核投射が生じるが，これには著しい年令依存性がある。我々はこの可塑性の年令依存性と大脳－赤核投射の生後発達との関係を知る目的で，生後７日～73日の子ネコの大脳皮質にPHA-Lを注入して皮質－赤核線維を染色した。皮質－赤核線維はこの間に著しい変化を示し，トポグラフィーの形成，分枝の形成などが観察された。

『光情報系の学際的理解』

1989年8月4日～6日
代表者　外崎　昭
世話人　金子章道

Ⅰ．特別講演

1）光によるDNA損傷とその修復

安井　明（東北大・抗酸菌病研）

2）心理物理学的手法による視覚構造の研究

池田光男（東京工大・大学院総合理工）

3）松果体と網膜

森田之大，保　智己（浜松医大・生理）

Ⅱ．一般講演

1）錐状体細胞の組織化学

斉藤多久馬（自治医大・解剖）

2）外節円板膜の形質側表面構造

外崎　昭，鷲岳　宏，石川　誠，吉田美加（山形大・医・解剖）

3）視細胞光応答波形形成におけるカルシュウムイオンの役割

河村　悟，村上元彦（慶大・医・生理）

4）網膜錐体および杆体のcGMP-activated channel

渡辺修一，村上元彦（慶大・医・生理）

5）コイ網膜色対立型双極細胞について

新保　清（聖マリアンナ医大・生理）

6）ウグイ網膜の水平細胞の光応答

霜田幸雄（杏林大・医・生理）
橋本葉子（東女医大・生理）

7）抗protein kinase C抗体に対する反応性を指標とした網膜双極細胞の分類

鈴木参郎助，細野　道，金子章道（生理研・神経情報）

8）イモリ網膜の再生過程における光応答の発現に関する研究

斉藤建彦（筑波大・生物科学）

9）ネコ神経節細胞受容野の構造と機能

塚本吉彦（兵庫医大・解剖）

10）末梢神経の移植による軸索損傷網膜神経節細胞の再生

田内雅規（国立リハ・センター研）
福田　淳，森際克子（阪大・バイオ研）

11）成熟ラット視覚系に対する甲状腺ホルモンの効果

武田　守，鈴木光雄（群馬大・内分泌研）
小野田法彦（群馬大・生理）

12）片眼摘出によるコイの網膜投射領域の変化

伊藤博信，吉本正美（日本医大・解剖）

13）網膜内層の神経伝達は糖尿病で傷害されるか？　－ERGによる検討－

白尾　裕，加藤　要，佐々木次寿，
河原崎正裕，田村敏博，河崎一夫（金沢大・医・眼科）
川口博治（金沢市）

14）網膜水平細胞入力の解析

宮地栄一，村上元彦（慶大・医・生理）

15）網膜水平細胞層の生理工学モデル

臼井支朗，神山斉己（豊橋技術科学大・情報工学）

16）膜電位固定法によるコイ網膜水平細胞の研究

山田雅弘（電総研）
J. C. Low, M. B. A. Djamoz (Univ. London)

17）イソアワモチに見られる皮膚光覚細胞の軸索の超高圧電顕による観察

片桐展子（東女医大・解剖），浜　　清（早大・人間科学）
片桐康雄，島谷祐一，橋本葉子（東女医大・生理），相川英三（東女医大・解剖）

18）マウス松果体細胞の日内リズムとこのリズムに及ぼす上頚神経節除去の影響

松嶋少二（旭川医大・解剖）

19）遺伝子から見たニワトリ視物質の機能と構造

徳永史生（東北大・理・生物物理）

20）視細胞に特異的なMEKA蛋白質の精製と同定

郭　哲輝，三木直正（金沢大・がん研・薬理）

21）Ca-Binding Protein Calbindin Immunoreactive Structure及び
Parvalbumin Immunoreactive Structureの網膜における局在について

濱野啓子（阪大・医・眼科）

22）網膜における遠心性神経線維

河又邦彦，大塚輝彌（生理研・神経情報）

23）鯉網膜細胞による5, 7-DHT取り込みの経時的経過

根岸晃六（金沢大・医・神情研）

Ⅲ．話題提供

南極報告　　森田之大（浜松医大・生理）

討論参加者

松嶋少二（旭川医大），徳永史生，安井　明（東北大），外崎　昭，鷲岳　宏，石川　誠，吉田美加（山形大），鈴木光雄，武田　守，小野田法彦（群馬大），斉藤多久馬（自治医大），斉藤建彦（筑波大），山田雅弘（電総研），田内雅規（国立リハ），霜田幸雄（杏林大），伊藤博信（日本医大），村上元彦，河村　悟，宮地栄一，渡辺修一（慶応大），北原健二，吉田希望，伊従直子，久保朗子（慈恵医大），冨田恒男，豊田順一，近藤博明，鯨岡　徹，新保　清（聖マリ医大），立花政夫，岡田　隆（東大），橋本葉子，片桐展子（東京女医大），池田光男（東京工大），宗宮弘明（麻布大），中村孝文（静岡大），森田之大，内田勝久，保　智己（浜松医大），臼井支朗，石井宏幸，神山斎己，中内茂樹（豊橋技科大），粟谷　忍，寺崎浩子，矢が崎悌司，小畑秀一（名大），嶋崎裕志（椙山女大），金子章道，大塚輝彌，金田　誠，鈴木参郎助，J. Downing, 河又邦彦，倉橋　隆，谷藤　学（生理研），根岸晃六，河崎一夫，白尾　裕，河原崎正裕，郭　哲輝（金沢大），宇治幸隆，杉本　充，宮村直孝，有馬美香，沢田達宏，土井泰明（三重大），遠山正弥，仙波恵美子，J. J. Miguel, 森際克子，濱野啓子（阪大），塚本吉彦（兵庫医大），藤本正昭，柳瀬　浩（広島大），安井湘三（九州工大）

研究会概要

最近，地球の生物学的環境を広く見直す研究が進み，従来のようにヒトを中心とする至適環境の生理学に留まっていると，光と生命活動の科学的理解が停滞する恐れが出てきた。そこで平成元年８月４，５，６日，特別講演３題，一般講演23題，話題提供１題を集めて，学際的交流を目指す本研究会が開かれた。網膜の電気生理学を軸に，話題は細胞の光損傷回復，視物質の遺伝機構，松果体の機能形態，視覚の心理学などにおよび，若手研究者を中心に，計76名の参加者が討論に参加した。世話人，金子章道教授の特別の配慮により，岡崎花火大会を楽しむなど，研究者の個人的交流の場としても，大きな成果を挙げることができた。

Ⅰ．特別講演

光による DNA 損傷とその修復

安井　明（東北大・抗酸菌病研）

細胞の癌化および癌の物理化学療法に深く関連している，光による DNA 損傷の修復機構の解明が，新しい分子生物学の知識と技術を用いて進められている。

５種の生物の光回復酵素の遺伝子をクローニングしてアミノ酸配列を比較することにより，補助因子や DNA に結合する部位を推定することができた。また，藍藻の遺伝子を大腸菌で発現させることにより，藍藻の酵素がデアザフラビンがなくても光を吸収して二量体を開裂させることがわかった。他の実験の結果からも，FADH が酵素活性に必須であり，デアザフラビンがプテリンは光の吸収効果の増強に使われていること考えられる。

光回復酵素活性のある大腸菌は紫外線を照射したのち，光回復しなくとも，酵素活性のない大腸菌よりもたくさん生き残ることが知られている。この理由として，光回復酵素はこの場合に除去修復の働きを助けるからと考えられている。すなわち，光回復酵素は此の場合に，ピリミジン二量体を除去修復の酵素に見つけ易くすることによって，除去修復と共同して修復効果を高めている。

心理物理学的手法による視覚構造の研究

池田光男（東京工大・大学院・総合理工）

人間の視覚メカニズムを研究する手法として心理物理学がある。これは光刺激を眼に与え，その反応を心理学的応答で捉えるものである。したがってこの方法で測定できるのは入力と出力のみである。にもかかわらず視覚内部の各部位のメカニズムが明らかにできるのは何故かという率直な疑問に答えるため，本講演を試みる。心理物理学的手法の特徴として，１．反応の精度（再現性）がきわめて良い。２．反応の種類がこまかく分類できる。

白色参照光と，700nm の赤の光とを並べて呈示し，二つの光の明るさが等しくなるように赤の光を調節させる。同じことを 690, 680, 670nm などの光についても試み，「明るさの分光感度」を得る。これは眼の中の明るさ感覚をもたらす部位の性質を捉えていることになる。

松果体と網膜

森田之大，保　智己（浜松医大・生理）

発生の初期，脳室を囲む間脳壁からいくつかの膨出部が現れ，それらの一対が側眼に，正中線上の無対のものが松果体に分化する。網膜と松果体の共通物質として，メラトニン，NAT, S-抗原，IRBP などが知られている。

変温動物の松果体には，光受容細胞，神経節細胞，またおそらく介在神経細胞がある。松果体に微小電極を挿入し，光にたいする過分極応答を記録することができる。神経節細胞からの応答は，すべての波長において，自発性放電が抑制される非感色性応答と，短波長光による抑制，中－長波長光による放電頻度増大を伴う感色性応答がある。これらは，光環境の日周変化や，日長変化をともなう季節的変化を知るために役立つであろう。

Ⅱ．一般講演

錐状体細胞の組織化学

斉藤多久馬（自治医大・解剖）

cGMP 代謝酵素の桿状体外節における存在様式は，従来の化学固定を先行させる組織化学によると，cGMP 合成酵素 guanylate cyclase (GC), cGMP 分解酵素 phosphodiesterase (PDE), GMP 分解酵素 5'-nucleotidase (5'N) のいずれもが外節円板膜内腔に存在することを示唆するような所見が与えられ，細胞内信号発生機構のモデルと食い違うところが多い。我々は，急速凍結置換酵素組織化学を開発して，GC, PDE, 5'N のいずれもが円板膜の細胞質側に局在する所見を電顕的に明確にした。さらに明・暗環境下における PDE 活性の検出を試み，明環境において，暗環境におけるよりもはるかに高い活性を認めることができた。これらを踏まえて，短時間光照射における PDE 活性の変動を観察し，円板膜の周辺より活性の上昇が現れることを明らかにした。

外節円板膜の形質側表面構造

外崎　昭，鷲岳　宏，石川　誠，吉田美加（山形大・医・解剖）

光受容細胞の細胞内情報伝達機構は，円板膜の形質表面に局在するトランスジューシン (Gt) により開始される。Gt の局在を電顕的に証明する研究は，急速凍結法 (Roof and Heuser 1982)

によりなされたが，この方法は，観察領域が狭く限られ，円板膜を広く観察したり，細胞の種類や異条件下の円板膜を比較したりする実験には適さない。我々は，オスミウム固定により，円板膜のいわゆる割断性を除去したのち，メタノールにより氷晶形成を抑制しつつ凍結を行い，ディープエッチングにより広く形質表面を露出する方法を開発した。

円板膜形質表面には，7－12nmの粒子が不規則に分布し，その分布密度は円板ごとにかなり大きく変異を示す。多くの所見から，それら粒子には形質細胞骨格の成分と本来形質表面に付着しているGt成分が，混在していると考えられる。

視細胞光応答波形形成におけるカルシュウムイオンの役割

河村　悟，村上元彦（慶大・医・生理）

視細胞内のcGMP濃度は合成系と分解系のバランスで決定される。調整直後の新鮮標本では，カルシウムがcGMP分解系にも大きく影響を与えることが明らかになった。すなわち光によるPDEの活性化は，高カルシウム濃度下では長く持続し，低濃度下ではすばやく不活性化される。inside-out杆体外節を灌流液で充分洗うと，もはやカルシウム濃度による応答の差は認められない。

この結果を昨年度の結果と総合して考察すると，明順応時，光応答が短時間で終了する分子機構は以下のように説明することができる。明順応にともない，視細胞内のカルシウム濃度は低下する。そのため光によって一旦活性化されたPDEは暗時に比べてより短時間のうちに不活性化される。同時に，guanylate cyclaseも活性化されるため，結果的に分解系，合成系あいまって，暗時に比べて光照射後のcGMPの供給が増え，すばやく暗時のレベルまで回復する。

網膜錐体および杆体のcGMP-activated channel

渡辺修一，村上元彦（慶大・医・生理）

杆体と同様に，錐体もまたcGMPをsecond messengerとしていると考えられる。しかし錐体のcGMP-activated-channelの性質，さらには異なる種類の錐体ごとにその性質が異なるか，などの問題については報告がない。コイの各種錐体と杆体について，inside-out patchの標本で調べた。その結果，全ての視細胞がすでに報告されている杆体チャンネルと同様に短いopeningを示し，電流－電圧曲線も過分極側ではほぼ直線であった。しかしsingle channel conductance（γ）は錐体では15.2 ± 0.2pS (mean ± S. E. M., n＝24)であり，錐体の各型の間では差が見られなか

った。杆体のγは，11.9 ± 0.7pS (n＝5) であった。これらコイのγは，toad, tiger salamander, bullfrog の杆体における値よりも小さい。

cGMP-activated channel には動物種による差があり，一方同一種の中では，異なる視物質を持つ視細胞も同じ性質のチャンネルを持つことが示唆された。

コイ網膜色対立型双極細胞について

新保　清（聖マリアンナ医大・生理）

on 中心と off 中心型の色対立型細胞の形態を明らかにするため，HRP および Lucifer-yellow による細胞内染色を行なった。on 中心型色対立型細胞は，タイプⅠ双極細胞 (Saito et al 1983), off 中心型は，off 型タイプⅠ双極細胞であった。470, 530, 560, 620nm の波長に対する応答を，背景光の有無，細胞膜の過分極の有無の条件下で記録したところ，スペクトル応答のプルキニエの移動が認められ，杆体と錐体の双方からの入力があることが示唆された。両細胞型において，過分極時に光応答が増大した。膜抵抗変化の状態から，on および off 中心型色対立型細胞の光応答に，Na イオンが関与していると考えられた。これは杆体入力と赤錐体入力が，on 中心型双極細胞にたいして異なったイオン機構を経て影響を与えるとの報告 (Saito et al 1979) に一見矛盾する。

ウグイ網膜の水平細胞の光応答

霜田幸雄（杏林大・医・生理）
橋本葉子（東京女医大・生理）

ウグイ網膜水平細胞は，スペクトルおよび強度応答特性により，単相性，2 相性，3 相性，4 相性，および杆体水平細胞の 5 種類に分類される。電顕的には，2 相性および 3 相性水平細胞には，錐体のほかに杆体がシナプスをつくり，入力が混合されていると考えられる。2 相性水平細胞の脱分極応答は，水平細胞から杆体へのフィードバック・シナプスによると考えられる。3 相性水平細胞の応答は，杆体の入力による応答を含むことが示唆される。また受容野の中心部よりも周辺部において，光応答の潜時が長い。また 500nm 光に対する脱分極成分が明順応により消失する。これらの結果も，脱分極応答が杆体の入力によるものであることを示唆する。しかしそれは直接入力の結果ではなく，受容野周辺部からのネガティブフィードバックにより形成されると考えられる。

抗 protein kinase C 抗体に対する反応性を指標とした網膜双極細胞の分類

鈴木参郎助，細野　道，金子章道（生理研・神経情報）

キンギョ，マウス，ネコ，ウサギ全網膜からパパインにより単離した双極細胞を，抗 RKC 単クローン抗体にたいする反応性を利用して分類することを試みた。キンギョでは61％，マウス84％，ネコ89％，ウサギ84％の双極細胞が PKC 免疫陽性であった。キンギョでは，rod-dominant On type の他に，形態の異なる数種類の双極細胞が陽性を示した。陰性を示す双極細胞は，形態の特徴から，cone 入力を受けるタイプと考えられる。今回用いた哺乳類の網膜は rod-dominant であり，多くの双極細胞が rod-bipolar cell と考えられるが，11－16％の陰性細胞があり，陽性の双極細胞に比較すると，細胞体が小さく，軸索が太く，樹状突起が長いなど，形態学的特徴が認められた。

この PKC 免疫反応性による分類が，ON/OFF あるいは rod/cone 入力による分類と関連づけられるか，今後検討を加える。

イモリ網膜の再生過程における光応答の発現に関する研究

斉藤建彦（筑波大・生物科学）

MS222 による麻酔下に，虹彩のやや外側において眼球を開き，白く見える網膜を視神経の根元から除去し，角膜は再び元の位置に戻す。網膜切除後，再生の速い標本では約10日で ERG の出現が見られた。しかし多くの標本では，約14日でそれが見られた。この頃の ERG は，光感度が低く波形も単相（主に過分極）性である。1.5－２月の間にほぼ正常な ERG が記録されるようになった。凍結切片を作成し，再生網膜の形態の変化を観察した。14日頃の網膜は，周辺部において一層の細胞配列を示し，中心部には疎らな細胞が認められた。30日頃には，２層の細胞配列が，さらに46日頃の網膜では内，外網状層の区別が可能になった。

単離網膜細胞の電気的膜特性を調べたところ，再生５カ月および２カ月の網膜では，正常のものと違いがなかった。

ネコ神経節細胞受容野の構造と機能

塚本吉彦（兵庫医大・解剖）

神経節細胞の応答は，中心周辺拮抗的な同心円状の受容野をもつ。その感度分布は，正負2個のガウス関数の差曲線でよく近似され，中心部はドーム状である。その機構は，平均的な明るさからの変化に応答してコントラストを検出するために働き，皮質細胞の受容野の構成要素を提供すると考えられる。中心受容野の錐体記号が，ベータ細胞の応答に集約される時の，信号対雑音比の改善率を計算する式が導き出された。改善率最大の条件を満足するとき，固有方程式が得られ，第1固有値として最大改善率，固有ベクトルとして最適感度分布が求められる。

神経節細胞の軸索は，活動電位の放電頻度の高低によって信号を脳へ送るが，何段階に識別できるかという意の，通信路容量を固有の性質として持つ。並列回路による錐体信号の空間的加算によって，神経節細胞へ入力される信号の情報量が神経節細胞自体の通信路容量に一致するように設計されているものと考えられる。

末梢神経の移植による軸索損傷網膜神経節細胞の再生

田内雅規（国立リハ・センター研）
福田　淳，森際克子（阪大・バイオ研）

ラット視神経を切断したのち，眼球を強膜側から穿刺し同一個体から摘出した坐骨神経の一端を穿刺孔に挿入移植し，他端を頭蓋上に留置する。術後最高3カ月までの種々の時期に，再生神経節細胞を標識した。神経節細胞の再生過程は一様ではなく，移植後どの期間においても樹状突起および軸索の形態が正常なものと異常なものの2種類がかならず存在していた。正常な形態のものは，術後の退行を免れたか，あるいは移植後の軸索再生が比較的早期に行なわれたかのいづれかの可能性が考えられる。また，異常な再生細胞は，軸索，樹状突起の退行変性がかなり進行したある時期から回復，伸展したために形態の異常を呈していると推測される。

成熟ラット視覚系に対する甲状腺ホルモンの効果

武田　守，鈴木光雄（群馬大・内分泌研）
小野田法彦（群馬大・生理）

正常対照群，甲状腺摘除群，甲状腺摘除－甲状腺ホルモン補充群について，ネンブタール麻酔下において，光刺激，電気刺激による誘発電位および網膜電図ｂ波の潜時を各視覚経路で測定した。さらに二点刺激法により視神経の伝導速度を測定した。甲状腺摘除群の一次視覚野，外側膝状体に生じた光刺激に対する誘発電位の潜時および網膜電図のｂ波の潜時は，正常対照群に比して有意に遅延した。甲状腺ホルモンを投与すると，潜時の遅延の回復が認められた。一方，視交叉と外側膝状体電気刺激に対する中枢側の潜時を測ると，対照群と実験群の間に，差が認められなかった。

これらの結果から，甲状腺摘除により生じる視覚誘発電位の遅れは，主に外側膝状体より末梢側に起因することが示され，網膜内で起こる可能性が高いと考えられる。

片眼摘出によるコイの網膜投射領域の変化

伊藤博信，吉本正美（日本医大・解剖）

孵化後６カ月以内のコイの右眼球を摘出し，１年以上飼育したのち，残存側の視神経にHRPを注入して順行的に標識し，網膜投射領域と終末形態の変化について調べた。灌流固定時のコイの大きさは，13－17㎝であった。正常なコイの左視神経について対照実験を行なった。正常な視神経の網膜投射領域は：１） optic hypothalamus, ２） tectum, ３） nucleus pretectalis superficialis pars parvocellularis, ４） area pretectalis pars dorsalis et pars ventralis, ５） nucleus dorsolateralis thalami, ６） nucleus of posterior commissure, ７） nucleus of accessory optic tract であり，１）のみが両側，他はすべて対側性投射であった。実験群では，すべての投射領域が両側性であった。また実験群のコイの終末は，捻れ，折れ曲がり，枝別れなどを示し，とくに対側投射領域において著明であった。

網膜内層の神経伝達は糖尿病で傷害されるか？
― ERG による検討―

白尾　裕，加藤　要，佐々木次寿，
河原崎正裕，田村敏博，河崎一夫（金沢大・医・眼科）
川口博治（金沢市）

網膜症初期における ERG 律動小波の異常が，アマクリン細胞の異常を示すものか否かを検証するため，ウサギ in vitro 網膜のアマクリン細胞にたいする抑制性伝達物質，拮抗物質および候補物質の作用を調べ，さらに DA についてウサギ in vivo 網膜により実験を行なった。

多くの所見から，網膜症初期における ERG 律動小波の異常は，網膜内層とくにアマクリン細胞の伝達異常を反映する可能性が示唆された。その機序としては，網膜内層の循環不全による直接的な傷害に，網膜内 DA 合成低下による経シナプス性の影響が加味されていると考えられる。

網膜水平細胞入力の解析

宮地栄一，村上元彦（慶大・医・生理）

最近 dopamine を灌流により網膜に投与すると，D1 receptor を介して，水平細胞の cAMP が上昇し，gap junction の遮断が起こることが判明している。そこで cAMP またはその誘導体を直接水平細胞に注入して，gap junction を遮断し，細胞内通電法により水平細胞の電流－膜電位特性を調べてシナプス入力の解析を行い，三原色過程から反対色過程への変換機構解明の手がかりを得ることを試みた。

その結果，水平細胞の入力抵抗は著しく上昇し，細胞内通電により細胞の電流－膜電位特性を求めることができた。cAMP の効果は，注入後まもなく消失するので，多くの実験は誘導体により行なった。L 型 (H1) 水平細胞の過分極性応答は，膜抵抗の増大を伴い，またこの光応答の逆転電位が 0mV 付近にあること，またC型 (H2) 水平細胞では，短波長側の過分極応答が膜抵抗の逆転を伴い，長波長側のそれは膜抵抗の減少を伴うことなどが判った。さらに極性の異なる光応答の逆転電位は完全に一致し，ほぼ 0mV であった。したがって両水平細胞のシナプス入力は，同じイオン機構によるものと推論される。

網膜水平細胞層の生理工学モデル

臼井支朗，神山斉己（豊橋技術科学大・情報工学）

水平細胞層の時空間情報処理機構を解明するため，イオン電流特性を数式記述した単離水平細胞モデルをベースに，シナプス伝達や細胞間結合などの生理学的知見を基に，水平細胞層を再構成し，計算機シミュレーションにより解析を行なった。モデルは，赤錐体，緑錐体，L型水平細胞，R/G型水平細胞から構成した。錐体には，各々のスペクトル特性を与え，光刺激による伝達物質放出の過程を3次の線形系で記述した。L型およびR/G型水平細胞は，それぞれ赤錐体および緑錐体から主入力を受け，L型は，赤錐体および緑錐体にフィードバック作用を及ぼすと仮定した。同型水平細胞の間のgap junctionによる電気的結合は，線形であると仮定し，線形コンダクタンスで記述した。

スペクトル応答特性および刺激位置特性のシミュレーション解析により，このモデルに実験データの基本的特徴が再現されることが確認され，さらに未知の結合関係の存在も示唆された。

膜電位固定法よるコイ網膜水平細胞の研究

山田雅弘（電総研）
J. C. Low, and M. B. A. Djamoz (Univ. London)

水平細胞のサブタイプにおける，細胞膜の電気的特性と視細胞入力シナプスの性質を知るため，暗順応コイの剝離網膜により，二連電極による膜電位測定を行なった。5μMのドーパミンにより，水平細胞間gap junctionの抵抗を高め，膜電位固定を可能にした。step状またはramp状のcommand電位を与えて，電流－電圧(I－V)曲線を求めた。青，緑，赤(460, 533, 688nm)の単色光の拡散光で照射した。

杆体入力型水平細胞および3種の錐体入力型水平細胞は，すべて同様のI－V曲線を示した。またすべての水平細胞において，負抵抗を示すものがあり，Caチャンネルの存在が示唆された。すべての水平細胞において，3単色光にたいするシナプス電流の逆転電位が静止電位よりも正の側にあり，起電力がNaおよび（または）Caイオンによることが示唆された。

膜電位固定下での水平細胞のシナプス電流は，入力シナプスによるイオンチャンネルの電流変化を反映している。

イソアワモチに見られる皮膚光覚細胞の軸索の超高圧電顕による観察

片桐展子（東女医大・解剖）
浜　　清（早大・人間科学）
片桐康雄，島谷祐一，橋本葉子（東女医大・生理）
相川英三（東女医大・解剖）

外套背部の小突起を採取し，２％オスミウム酸溶液で40℃，48時間処理し，脱水過程で酢酸ウランによるブロック染色を施し，エポン821に包埋した。厚さ 0.4 μm の連続切片約700枚を作成し，酢酸ウランと鉛染色を施し，H-700 電顕により 200kV, さらに H-1250M 超高圧電顕により 1000kV 透過電顕観察を行なった。

皮膚光覚細胞 (DPC) は，ほぼ球形 (40-50 μm), 皮下組織中に単独または群をなして分布する。端部に密生微絨毛をもち，基底部に特異な形状をもつ核があり，細胞質にはオスミウムに濃染する photic vesicles が多数含まれる。軸索は，端部辺縁の微絨毛基部から起こり，複雑な経路を蛇行したのち，同僚細胞に発する軸索と並走し，小神経束を形成する。これは，やがて背眼に由来する視神経に合流し，外套神経を構成すると推測される。DPC 細胞体と軸索に終わる，遠心性シナプス終末は発見されなかった。

マウス松果体細胞の日内リズムとこのリズムに及ぼす上頚神経節除去の影響

松嶋少二（旭川医大・解剖）

松果体細胞の核および細胞内器官の量的日内変動を測定した。核の大きさは，明期の初めに最大となり，暗期の前半に最小となる。分泌顆粒と空胞の頻度とゴルジ装置および多胞体の量は明期の後半に増加し，暗期の前半に減少する。シナプスリボンおよびミエリン様構造の頻度と，ミトコンドリアおよび小胞体の量は，明期の後半で小さく，暗期の前半で増加する。デンスボディの量は日内諸時点で一定である。これらを上頚神経節手術群の結果と比較すると，松果体細胞には，少なくとも３種の日内リズムが存在し，交感神経により調節されていると言える。核の大きさのリズムは，手術により完全には消失せず，その他の未知の調節機構も関与すると考えられる。

遺伝子から見たニワトリ視物質の機能と構造

徳永史生（東北大・理・生物物理）

ヒトの視物質のアミノ酸配列を比較すると，赤色覚色素と緑色覚色素はひじょうによく似ており，数千年前に分化かしたと推定される。この二者を一つのグループとみなし，青色覚色素およびロドプシンに比較すると，アミノ酸配列の相同性は，いずれも40％台であり，ロドプシン，青色覚色素，赤・緑色覚色素グループの分化が，六億年前頃，ほぼ同時に行なわれたと推定される。もしそうならば現生脊椎動物は，基本的にこれらすべての視物質遺伝子を持つと考えられる。我々は，ニワトリ視物質遺伝子のクローニングを行い，ロドプシンおよび4種の色覚色素に対応すると推定される遺伝子DNAをもつクローンを得た。ロドプシンのエキソンⅣに対応する部分が，すべての色覚色素の遺伝子塩基とアミノ酸配列において保存され，重要な共通部位であることが示唆された。またウシ，ヒト，ニワトリに相同な塩基配列が6個所あり，細胞特異的発現を共通的に制御する配列である可能性が示唆された。

視細胞に特異的な MEKA 蛋白質の精製と同定

郭　哲輝，三木直正（金沢大・がん研・薬理）

我々が単離したcDNAクローンのなかにMEKA蛋白をコードするcDNAが含まれていた。MEKA蛋白は，分子量3.2万の酸性可溶性蛋白であり，網膜以外には含まれず，網膜視細胞にのみ局在し，光刺激により細胞内分布が変化することが明らかになった。ウシ網膜可溶性分画から，32kDの蛋白とともに，同量の36kDおよび10kDの蛋白が得られた。32kDのみが抗MEKA抗体血清と反応し，36kDおよび10kDは，Tβγ血清と反応することが明らかにされた。MEKA蛋白の性質は，33K（視細胞特異的燐酸化）蛋白に似ており，これらが同一蛋白であると結論された。

Ca-Binding Protein Calbindin Immunoreactive Structure 及び Parvalbumin Immunoreactive Structure の網膜における局在について

濱野啓子（阪大・医・眼科）

カルシウム結合蛋白 calbindin (Cab) および parvalbumin (Pal) は，ともにシナプスにおける二

次伝達物質であるCaイオンの調節に関与すると示唆されている。間接蛍光抗体法により，CabおよびPalの局在を観察した。Cab：キンギョでは陰性，カエルでは錐体内節の一部が弱陽性，アマクリン細胞，神経節細胞の一部にも陽性が認められた。ヒヨコでは，錐体，双極細胞，アマクリン細胞，内網状層，神経節細胞および軸索線維が，強陽性を示した。ラット，モルモット，イヌでは，水平細胞が強陽性を示し，アマクリン細胞および内網状層が弱く標識された。神経節細胞は，一部陽性を示した。ヒトでは，錐体，水平細胞，アマクリン細胞，内網状層，神経線維層，少数の双極細胞，神経節細胞が強陽性を呈した。Pal：キンギョ，カエル，モルモット，ヒトで陰性であった。ヒヨコでは，アマクリン細胞，内網状層の一部，神経節細胞の一部に陽性が認められた。ラットでは，アマクリン細胞の一部，内網状層の一部，神経細胞の一部のみ弱陽性。イヌでは，水平細胞が強陽性，アマクリン細胞の一部，神経節細胞の一部が弱陽性であった。

網膜における遠心性神経線維

河又邦彦，大塚輝彌（生理研・神経情報）

terminal nerveの網膜内の走行を精査するため，コイwhole-mount網膜において，抗FMRFamide抗体－ABC－DAB法を行った。terminal nerveは約65本の直径0.2－1.3 μmの無髄線維よりなる。視神経乳頭から神経線維層を網膜辺縁部に向い，ある地点で直角方向に向きを変えて内網状層に入り，分岐しながら内網状層第一層に達する。ここで細かい分岐をくりかえして軸索終末の網状構造を形成する。65本の線維は，合計88万個の出力シナプスを有すると推定される。

光応答により同定されたアマクリン細胞にHRPを電気泳動的に注入し，さらにterminal nerveの抗体染色を行い，アマクリン細胞と軸索終末の接触部位を電顕的に検索した。その結果，terminal nerve終末は，off型アマクリン細胞の突起にシナプスすることが明らかになった。

嗅覚に連動した視覚機能の中枢制御の可能性が考えられる。

鯉網膜細胞による5, 7-DHT取り込みの経時的経過

根岸晃六（金沢大・医・神情研）

もしコイのDA細胞が5, 7-DHTを取り込むならば，DA細胞の電気生理に役立つと考え，本実験を計画した。種々の量(2.5, 10, 20 μg/eye)の5, 7-DHTを等量のDAとともにコイ（体長5－6㎝）の眼球内に注入投与し，免疫組織学的に検索した。5, 7-DHTは，まず大型（注射後1－4h）の，ついで小型のインドールアミン細胞(4－12h)，双極細胞(8－12h)，さらに少数の光受

容細胞 (12－24h) に，経時的に取り込まれた。レセルピンで前処理したコイの眼球に，5, 7-DHT と DA の混合液を注入すると，上述の取り込み時間が促進され，さらに一部の水平細胞，神経節細胞，ミュラー細胞による取り込みが観察された。しかし，DA 細胞と PKC 陽性双極細胞は，5, 7-DHT を取り込まなかった。

『消化器の機能及びその調節機構』

1989年8月24～25日

代表者　鈴木裕一（山形大）

世話人　尾崎　毅

1．腸・大腸の機能と形態の進化論的解釈

星　　猛（静岡県立大・栄養科学）

2．腸管壁の立体構造

上原康生，小室輝昌（愛媛大・医）

3．消化管運動における Gut Peptide agonist の基礎と応用

伊藤　漸（群馬大・医療短大）

4．消化管壁内在神経細胞におけるエンケファリンの作用にともなう細胞内カルシウムの動態

片山芳文（東医歯大・難研）

5．消化管内在神経の機能

尾崎　毅（生理研・動物実験施設）

6．カプサイシンによって誘起される腸ー腸反射

祢屋俊昭（岡山大・医）

7．消化管系のリンパ循環

大橋俊夫（信州大・医）

8．腹部内臓循環：無麻酔状態の動態

成瀬　達（生理研・生理機能）

9．エタノールによる胃粘膜微小循環障害と内因性プロスタグランジン E_2 の役割

鹿取　信（北里大・医）

10．pH Deflection を利用したラット十二指腸アルカリ分泌の測定方法

竹内孝治（京都薬大）

11．プロトンポンプ H, K-ATPase の機能・構造・分布

竹口紀晃（富山医薬大・薬）

12．ウナギの腸の塩及び水吸収とその制御

安藤正昭（広島大・総合科学部）

13．モルモット単離壁細胞の K^+ チャネル活性と酸分泌刺激応答

岡田泰伸（京大・医）

14．小腸吸収上皮細胞の形質膜グルコーストランスポーター
及び細胞内小胞体膜の膜透過性に関する最近の知見

藤田道也（浜松医大）

15. 大腸杯細胞におけるエキソサイトーシスの光学顕微鏡的観察

寺川　進（生理研・能動輸送）

16. 短鎖脂肪酸の粘膜刺激による結腸の運動・分泌応答

矢島高二（ヤクルト中央研）

17. 大腸における運動分泌連関

鈴木裕一（山形大・医）

18. 大腸粘膜でのイオン輸送の神経制御

桑原厚和（生理研・細胞内代謝）

19. 消化器の免疫機能とその制御機構

名倉　宏（名大・医）

腸・大腸の機能形態の進化論的解釈

星　猛（静岡県立大・栄養科学）

複雑な生体機能系の研究には，個々の要素的機能の系並びに生体全体における役割と意義，各要素的機能間の相関，機能統合における組合わせと制御の最適性，各種調節因子の優位性順位（ハイラーキィ）等を明確にする必要がある。また複雑な形態を有する系では形態の機能的意義を解明する必要がある。栄養補給系（消化器系）は形態的にも機能的にも極めて複雑な系で，管細上に多様な機能のヘテロ性も存在する。そのような系における各部の機能，形態の必要性，生理学的意義，最適性等を明確にするためには，比較生理学的研究に立脚した消化論的検討が重要な意味をもつ。今回は哺乳動物にのみ発達し，草食動物，肉食動物，海生／陸生哺乳動物間に著しい形態的差異の見られる大腸の機能的意義，淡水へ遁走（順応）したあとの動物にのみ見られる栄養素の Na^+ 依存性吸収機構と H^+ 依存性吸収機構の機能的相関とその意義，ムチン分泌機能の腸管機能の統合における意義等について現在までに得られた知見を基に考察を試みた。

腸管壁の立体構造

小室輝昌（愛媛大・医）

消化管は，変異に富んだ生理機能を統合する，高度に分化した器官であり，その充分な理解の為には，機能発現の“場”である壁構造の精細な解析が必要である。本報告では材料にラット小腸を用い，各種顕微解剖学的手法を応用して，走査型電子顕微鏡及び透過型電子顕微鏡により，小腸壁各要素の三次元的構築を明らかとした。殊に，絨毛に関しては，上皮基底膜孔の免疫現象との関連性，微細循環網を被う細胞性網状構造の吸収機能調節の可能性について考察した。また，粘膜下結合組織層については，螺旋状に走る膠原線維の枠組み構造の特徴から，管壁の骨格としての役割について検討した。筋間神経叢に付帯する Cajal の介在細胞の観察では，同種細胞間，筋細胞との間に Gap junction の認められるところから，刺激伝達の可能性が推定された。

消化管運動における Gut-Peptide agonist の基礎と応用

伊藤　漸（群馬大・医短大）

14員環 macrolide の内 3 位に cladinose, 5 位に desosamine をもつ erythromycin 等は消化管収

編運動を刺激する。その特長は近位胃をふくむ上部消化管に強力な律動性収縮をひきおこす点で motilin の生物活性に類似する。われわれは抗菌力のない約200種の新らたに合成した erythromycin 誘導体の構造活性相関を検討し，一群の化合物， motilide を同定した。特に desosamine の dimethylamino group 構造が収縮運動亢進作用を密接に関与し，中でも propergyl 基を加えた四級アンモニウム (EM536) は in vivo assay で erythromycin の約3000倍 9 活性を示した。この EM536 は摘出家兎十二指腸条件で 10^{-9}M から motilin と同一性質の etropine, TTX 抵抗性の収縮を刺激し，外液 Ca^{++} や verapamil 添加でその収縮は抑制された。又単離家兎平滑筋細胞を motilin 同様刺激し，更に家兎十二指腸筋薄片での [^{125}I]-motilin receptor binding を 10^{-8}M から用量反応性に抑制した。motilied はイヌやヒトで空腹期収縮を惹起し， motulin のもつ全ての生物活性を発現した。従って，現時点では motilide は motilin asonist であり， morphune と生体内の opiates の関係と同一である。 motilide の一種である EM523 は臨床方 1 相試験を clear し，径口投与で十二指腸潰瘍の空腹期胃排出の改善や糖尿病性胃排出障害等に著効が認められている。

消化管壁内在神経細胞におけるエンケファリンの作用にともなう細胞内カルシウムの動態

片山芳文，平井恵二（東医歯大・難研）

モルモットの消化管壁内在神経系（消化管神経系）におけるエンケファリンの作用機構にカルシウムが関与することが電気生理学的に明らかにされている。そこで，まずエンケファリンの作用にともなう細胞内カルシウム濃度の変化を解析した。このために，消化管神経系ニューロンから細胞内微小電極法により電気生理学的記録を行うと同時に，カルシウムの濃度を蛍光色素 (fura-2) を用いて光学的に測定した。10 μM～3 μM のメチオニンエンケファリンはアウエルバッハ神経叢 S 細胞では μ 受容体，マイスナー細胞叢ニューロンでは δ 受容体を介して，膜抵抗の減少をともなう過分極を起す。このとき細胞内カルシウム濃度は低下するが，膜電位固定条件下ではカルシウム濃度低下の程度は減弱する。場合によっては無変化或は逆にカルシウム濃度が上昇することもある。この傾向は低濃度のエンケファリンの場合度々観察された。

消化管内在神経の機能

尾崎　毅（生理研・動物実験施設）

腸管の蠕動反射におけるマイスナー神経叢の役割を調べる目的で，摘出したモルモットの回腸

を用いて露出したマイスナー神経叢を経壁的に電気刺激を行ない，縦走筋及び輪走筋の機械的活動に及ぼす効果を検討した。

一般に刺激部位より口側では輪走筋に促進が見られるのに対し，肛門側では刺激により輪走筋の自発性収縮の停止が見られるかあるいは無効である事が多かった。口側における輪走筋の促進はアトロピン耐性の収縮はスパンタイド，及びカプサイシンの前処置により消失した。アパミンの前投与は肛門側における輪走筋の自発性収縮の抑制を廃止し，口側における促進を増強した。

これらのことから，マイスナー神経叢から輪走筋に至る神経路にはサブスタンスＰを伝達物質とする１次ニューロンの他にアパミン感受性の抑制性神経及びアトロピン耐性の促進神経が含まれており，縦走筋に対してはサブスタンスＰ性１次ニューロンと共にコリン作動性の促進神経が含まれていると考えられた。このことは，マイスナー神経叢が蠕動反射の神経路の一部を構成しているとする仮説を支持するものである。

カプサイシンによって誘起される腸ー腸反射

祢屋俊昭（岡山大・医・二生理）

ウレタンで麻酔し，人工呼吸下にガラミンで非動化したイヌで，小腸の一分節に腸間膜動脈からカプサイシンを持続注入して知覚性のＣ線維を刺激すると，迷走神経の遠心性刺激によって生じたコリン性の小腸運動促進効果が反射性に抑制された。この抑制効果は交感神経切除後あるいは第６頚髄の横断後に消失し，除脳後には約50％に減じた。また，腸間膜動脈神経と大内臓神経から記録した求心性および遠心性放電はカプサイシンによって増加した。さらに，カプサイシンの反射性効果はフェントラミンあるいはヨヒンビンで消失した。以上の結果から，知覚性のＣ線維は交感神経を求心および遠心路として，上脊髄性にα_2アドレナリン受容体を介して，腸壁内のコリン性ニューロン活動をシナプス前性に抑制して，腸運動を抑制すると考えられる。

消化管系のリンパ循環

大橋俊夫（信州大・医・第１生理）

消化管系におけるリンパ系の意義は大別すると，(1)脂肪を中心とする栄養物質の吸収・輸送路であること，(2)消化管内腔の体液性免疫状態を調節制御するための情報伝達路であること，(3)絨毛上皮細胞の機能・形態学的維持機構であることの３つに分類することが出来る。本講演ではこうした背景をもとに，小腸絨毛の中心乳び管におけるリンパ産生機構と腸間膜に分布する集合リ

ンパ管のリンパ輸送機構について最近のトピックスを中心に解説した。すなわち，リンパ産生機械では，毛細リンパ管である中心乳び管の形態学的特性：open junerion と anchoring filament の存在と毛細リンパ管の能動的なリンパポンプ能について最近の知見を解説した。さらに水溶性低分子物質の吸収路としての役割についても述べた。一方，リンパ輸送機構では，能動的リンパ輸送機構の主体であるリンパ管平滑筋の心臓様収縮の機能・形態学的特性について触れ，毛細リンパ管のリンパポンプの主体を占めている可能性について討議した。

腹部内臓循環：無麻酔状態の動態

成瀬　達（生理研・生理機能）

麻酔下に，ビーグル犬の腹腔動脈およびヒトの上腸間膜動脈に相当する前腸間膜動脈もしくは左胃動脈の根部に電磁血流計の慢性埋めこみ型プローブを装着し，１週間の回復期を置いた後，意識下に血流を測定した。

(1) 空腹時の腹腔および上腸間膜動脈の平均血流量は 200－300ml/ 分であった。腹腔動脈では約100分の周期で血流の自発的増加を認めた。

(2) 空腹腔の左胃動脈血流は胃運動の周期的増加に同期して増加した。100分間隔の腹腔動脈血流の周期的増加は胃運動に伴う胃血流の周期的変動に由来すると解釈された。

(3) 摂食により胃運動および血流の周期的変動は消失した。摂食と共に腹腔動脈および左胃動脈血流は急速に増加したが，その増加は一過性であり空腹時の値に速やかに戻った。

(4) 一方，食物の胃からの排出と共に上腸間膜動脈血流は徐々に増加し，３－５時間にわたり高値を持続した。

(5) 無麻酔状態で長時間計測することにより，腹部内臓循環は摂食時のみならず，空腹時にもダイナミックに変動することが明らかとなった。また，腹腔動脈領域と上腸間膜動脈領域では血流動態は全く異なる。

エタノールによる胃粘膜微小循環障害と内因性プロスタグランジン E_2 の役割

鹿取　信，西山和男，上野晃憲（北里大・医・薬理）

高濃度エタノールをラット胃内腔に投与しておこる胃粘膜の暗赤色の変化は，集合細静脈を中心に起るうっ血による。胃粘膜血流を生体顕微鏡でみると，胃粘膜が50％エタノールに接すると直ちに血流が停止し，集合細静脳脈を中心にうっ血がおこり，30分位するとその基部に出血がみ

られた。30%エタノール3分間胃内腔に投与後，胃壁内にLTC_4が産生され強く細静脈を収縮する可能性がある。胃粘膜障害は5－リポキシゲナーゼ阻害薬で抑制された他，1.0M NaClを内腔に与えても予防出来た。安静時には胃壁内のPGはほとんどないが，0.3～1.0M NaClにより，胃壁内に用量依存的にPGE_2が産生され，これが胃平滑筋活動電位を抑制していた。産生されたPGE_2は粘膜筋抜収縮抑制を介し，または直接に集合細静脈の収縮を抑制してうっ血を予防する可能性がある。

pH Deflectionを利用したラット十二指腸アルカリ分泌の測定方法 —コリン作動性薬物の効果—

竹内孝治，仁井田博道，岡部　進（京都薬大・応用薬理）

十二指腸アルカリ分泌の神経性調節に関しては未だに不明な点が多く，特にコリン作動性薬物の効果については一致した結果が得られていない。今回，我々はpH deflectionを利用した新しいアルカリ分泌の測定法を考案し，主としてコリン作動性薬物の効果及びその特性につき検討し，以下の結論を得た。(1) pH deflectionを利用したHCO_3分泌変化の検出法は弱い刺激に対しても敏感に反応し，PGsばかりでなくコリン作動薬（Carbachol, Bethanechol, Baclofen, TRH誘導体）のアルカリ分泌に対する効果を定量的に捉えることが可能であった。(2)十二指腸アルカリ分泌は内因性PGsばかりでなくCholinergic systemの影響も受けており，その効果の発現はM2-receptorを介したCa^{2+}依存性の機構によるものと推察される。(3)また，末梢性と中枢性のコリン作動薬ではindomethacin感受性に差異が認められ，迷走神経刺激によるアルカリ分泌はその機序に内因性PGsを含む可能性が指摘される。

プロトンポンプH, K-ATPaseの機能・構造・分布

浅野真司，竹口紀晃，田淵圭章（富山医薬大・薬）

要約

1．胃酸のH^+分泌動能輸送ポンプであるH, K-ATPaseの一次構造・機能について概説した。

2．ウサギ大腸後半部に胃型H, K-ATPaseが存在することを，間接蛍光免疫組織染色により得た結果より示した。

1．胃H, K-ATPaseは分子量約11万の4つのサブユニットからなりたっている。イオン輸送

能を有するためには，サブユニット間の相互作用が必須である。エネルギー受容部位のアミノ酸配列は，Ca-ATPase や Na, K-ATPase と多くの類似点を有する。私達の教室では，この H, K-ATPase に，H^+ポンプ以外に Cl^- チャネルもあわせて存在することと発見した。2SH ⇌ S−S によってチャネルが閉⇌開する。H, K-ATPase の C 末端側に Cys が多数存在し，システインボックスを形成しているが，このシステインのどれかが，S−S 架橋に関与していることを提案してきている。このシステインボックスは他の Na, K-ATPase や Ca-ATPase には存在しない。

2．胃 H, K-ATPase を抗原として，Na, K-ATPase や Ca-ATPase と交差しないモノクローナル抗体を作製した。これらの抗体の中で，HK4001 は H, K-ATPase の酵素活性を100％阻害するとともに，H^+輸送能を阻害した。この抗体を一次抗体として，二次抗体として抗マウス FITC 抗体を使って，ウサギ大腸を染色した。盲腸や結腸前半部は染色できなかった。横行・下行結腸や直腸に存在する大腸腺が染色でき，胃 H, K-ATPase と同じ epitope が大腸後半部に存在することがわかった。H, K-ATPase は管腔側細胞膜と細胞膜中に存在することがわかった。またこの epitope は，H, K-ATPase の K^+低親和性部位に関することを，染色の塩濃度依存性より示した。

ウナギの腸の塩及び水吸収とその制御

安藤正昭（広島大・総合科学部）

海水ウナギの腸は Na^+-K^+-Cl^- 共輸送により NaCl を吸収し，水を吸収している。同様な Na^+-K^+-Cl^- 共輸送は腎臓のヘンレ係蹄上行脚やカレイの腸でもみられているが，これらの系ではこの共輸送系は HCO_3^- の影響を受けないと報告されている。しかしウナギの腸の Na^+-K^+-Cl^- 共輸送は外液の HCO_3^- に依存しており，HCO_3^- 欠除リンガー液中では約半分に低下する。海水ウナギの腸には HCO_3^- 輸送系も存在し，刷子縁膜と基底側膜に HCO_3^- 分泌と吸収の機構がそれぞれ備わっているものと考えられる。刷子縁膜の HCO_3^- 取り込みはフロセミドやブメタミドで Na^+-K^+-Cl^- 共輸送を抑えると抑えられることから Na^+-K^+-Cl^- 共輸送と密に連結しているものと考えられる。またこの膜での HCO_3^- 分泌は粘膜側液の Cl^- に依存し，Na^+を必要としないことから Cl^-/HCO_3^- 交換輸送によるものと考えられる。この HCO_3^- の分泌はまた漿膜側液の Na^+に依存し，Cl^- を必要としないことから，基底側膜での HCO_3^- の取り込みは Na^+に依存した機構であると考えられる。ウナギの腸の上皮細胞には少なくとも 4 種類の HCO_3^- 輸送系が存在し，これらが細胞内 HCO_3^- 濃度（結果として細胞内 pH ）の調節をしているものと考えられる。以上の結果はウナギの腸の Na^+-K^+-Cl^- 共輸送系は細胞内 pH により制御されており，細胞内 pH を調節することにより Na^+-K^+-Cl^- 共輸送を制御できることを暗示している。

モルモット単離壁細胞の K^+ チャネル活性と酸分泌刺激応答

岡田泰伸，小寺　徹，上田俊二（京大・医）

モルモット胃底部より酵素的に単離した壁細胞にパッチクランプ全細胞記録法を適用し，K^+ チャネル活性とその酸分泌刺激による変化を調べた。細胞内外 Cl^--free 条件下において，＋30mV 以上の陽電圧コマンドパルスに対して外向き電流の，－100mV 以上の陰電圧コマンドに対しては内向き電流の活性化がみとめられた。いずれもその tail current 解析より K^+ チャネル活性化によることが明らかとなったが，それらの活性キネティクスや K^+ チャネル阻害剤感受性の差異よりそれぞれ異った K^+ チャネルであるものと結論された。Ca^{2+} 動員性酸分泌刺激物質（CCh, イオノマイシン）投与により，これら２つの K^+ 電流は何ら影響を受けなかったが，新たに一過性の Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル電流の活性化がみとめられた。

小腸吸収上皮細胞の形質膜グルコーストランスポーター及び細胞内小胞体膜の膜透過性に関する最近の知見

藤田道也（浜松医大）

（藤田）マウス小腸円柱上皮細胞の細胞内小胞体 (ER) 系は細胞質の相当な容積を占めると思われる。しかも，栄養物の吸収時にいかに多量の溶質がこの細胞質を通過していくかを思えば，ER 膜の透過的性質について多大の興味がもたれる。この研究では溶質として L- アラニンと D- グルコースを用い単離した ER 膜の透過能を調べた。その結果，ER 膜は浸透的には活性であるが，アミノ酸・糖に対する透過性をもたないことが示唆された。

（上里）消化管上皮細胞の微絨毛膜 (MVM) 形成過程を検討するために，マウス小腸粘膜上皮細胞 MVM に対して調製した抗体を用いて KATO-111 細胞（胃癌由来）を検索した。KATO 細胞では電子顕微鏡的に MVM 様の構造が細胞内小胞の内部に形成されることが知られている (microcyst)。今回調製した抗体を用いて，KATO 細胞を検索したところ，microcyst は抗体と反応することが分かった。このことは，本来細胞表面に形成されるべき MVM が細胞内部に形成されており，癌細胞では細胞の正常な極性や細胞内転送が撹乱されていることを示唆している。

大腸杯細胞におけるエキソサイトーシスの光学顕微鏡的観察

寺川　進（生理研・機能協関）

ウサギ大腸の粘膜を細切してクリプトが10個程度含まれる標本をつくり，加温酸素化した溶液で灌流しながら，画像処理で強化したノマルスキー顕微鏡下に観察した。個々の細胞を光学的に切断したような像が得られ，杯細胞中の粘液顆粒がよく見えた。カルバコールを灌流液に加えると，顆粒の一つ一つが急速にその光強度を変え弾けるような反応を示した。時には粘液物質様のものが放出される様子も捉えられた。顆粒の反応は，約60ミリ秒の立ち上がり相と，それに続く４秒から１分程のゆっくりとした下降相を持っていた。立ち上がり時間は顆粒の直径との相関があり，最も速いものは15ミリ秒であった。この反応の数を個々の細胞で数えることにより，分泌活動の超高感度実時間定量が可能となった。これにより，cAMP のセカンドメッセンジャーとしての役割と，脱感作への蛋白燐酸化の関与が示された。

短鎖脂肪酸の粘膜刺激による結腸の運動・分泌応答

矢島高二（ヤクルト中央研・生理）

下部消化管発酵の主要な産物である酢酸・プロピオン酸・酪酸などの短鎖脂肪酸は，吸収されてエネルギー源として動物に利用されるばかりでなく，管腔内の化学刺激因子として上皮細胞の増殖や増加，結腸の運動・分泌を促進する。刺激因子としての作用は濃度依存性で，直接効果細胞を刺激するのではなく作用は間接的である。管腔側からの短鎖脂肪酸は，まず結腸上皮に存在する化学受容細胞を刺激する。刺激により受容細胞から伝達物質（ホルモン）が放出され，ホルモンは粘膜下に走行する感覚受容神経を刺激することによって，刺激情報が壁在神経系に伝達されると考えられる。すなわち短鎖脂肪酸による結腸の運動と分泌（Cl^- 分泌）応答は，腸内分泌細胞と壁在神経を介した粘膜内反射によって引き起こされる。

大腸における運動分泌連関

鈴木裕一（山形大・医・第二生理）

大腸において，蠕動運動に伴い一過性の管腔内負電位の増大が観察された。この電位変化は，テトロドトキシン及び，Cl^- 分泌阻害剤 Bumetanide により抑制されたことより，運動に伴い神

経反射を介して Cl^- 分泌が一過性に亢進したためであると考えられた。さらに，大腸をバルーンよってあるいは管腔内圧を上昇させることによって伸展させても，一過性の管腔内負電位増大が起こることも観察された。この電位変化もテトロドトキシンや Bumetanide で抑制されたので，伸展刺激により神経を介しての Cl^- 分泌反射が存在することが明らかになった。

大腸粘膜でのイオン輸送の神経制御

桑原厚和（生理研・細胞内代謝）

消化管の各種の機能は，基本的には消化管管壁に存在する筋間神経叢および粘膜下神経叢により制御されている。粘膜でのイオン輸送の制御には粘膜下神経叢が重要な役割を果たしていることが，最近の研究から明らかに成りつつある。モルモット下部大腸を用いた実験から，粘膜下神経叢の電気刺激により，short-circuit current が増加し，この増加は Cl イオンの分泌によるものであることを明らかにした。Cl イオン分泌には，コリン作動性および非コリン作動性神経が関与しており，コリン作動性神経においては，muscarinic receptor が重要であることを明らかにした。一方，非コリン作動性神経においては，多くの brain-gut peptides の関与が予想されるが，中でも VIP および substsance P が，Cl イオン分泌に重要であることを明らかにした。以上，大腸粘膜でのイオン輸送の神経制御について概説した。

消化器の免疫機能とその制御機構

名倉　宏（東北大・医・第二病理）

消化器をはじめ全身の粘膜表面は多種多様の微生物や食餌性抗原に曝露されているが，生体はその局所において分泌型 IgA (sIgA) およびその産生を司どっているリンパ装置 (GALT) によって防御されている。その生体防御機構は mucosal immune system と呼ばれ，IgG による systemic immune system と区別されている。本研究会では以下の諸点を概説した。①腸内抗原による感作は GALT の主要なリンパ装置であるパイエル板によってなされ，それに対して特異的に反応する IgA 産生細胞（形質細胞）とＴリンパ球が腸管粘膜固有層や絨毛上皮細胞間に出現する。②形質細胞で産生された IgA は腸管上皮細胞で産生された糖蛋白 (SC) と結合し，管腔内に分泌され抗原の排除にあたる。③この mucosal immune reeponse は肝臓によって制御されている。そしてその結果腸管はじめ全身の粘膜機能の恒常性がはかられていると考えている。

『聴覚の比較生理学』

1989年10月27日～28日
代表者　柳沢慧二（鶴見大）
世話人　大森治紀

1．カエル卵形嚢及び球形嚢有毛細胞におけるシナプス後電位
須貝外喜夫，矢野二郎，杉谷道男，大山　浩（金沢医大・第1生理）
2．ヒヨコ蝸牛有毛細胞の遠心性シナプスのトランスミッターとモジュレーション
大森治紀，山口和彦，重本　尚（生理研）
3．求心性神経の符号化部位と順応過程
小原昭作，菅原美子，岡野桂樹（帝京大・第1生理）
4．カナマイ耳中毒チックにおける聴器有毛細胞の再生
橋野恵理，田中康夫（独協医大・越谷病院）
5．蝸牛神経核聴ニューロンの応答の検討
棚橋汀路（名大・分院・耳鼻科）
6．哺乳類聴覚領の構造の種間比較
堀川順生，細川　浩，村田計一（東京医歯大・難治研）
7．耳から発振するベビー；Audible s－OAE の一症例
鈴木雅一，田中康夫，井上庸夫（独協医大・越谷）
都筑俊寛（埼玉県小児医療センター）
8．抗 PIP_2 抗体による染色像と小脳発生
堀越哲郎，柳沢慧二（鶴見大・歯・生理）
宮沢淳夫，吉岡　亨（早稲田大・人間科学）
9．子音識別ニューロン，帯域雑音受容ニューロンの反応成立機序
丸山直滋，斉藤勝則，工藤雅治（新潟大・脳研）
10．モルモット聴覚中枢における音声の情報処理
谷口郁雄，田中英和（東京医歯大・難治研・耳鼻科）
11．聴覚信号としての音声と音楽
亀田和夫，鎌田　勉（北大・歯・生理）

研究会概要

聴覚研究では，最近受容細胞レベルの研究が急速に進展しているが，実際に研究を行っている人たちから話をきいて，理解を深めた。近年のトピックスとして，耳から発する音の問題があるが，実例を聞きその細胞レベルのメカニズムを話合った。ヒトの脳においてどのように音が認識

されているのか，まだまだ未知の点が多い。そのためいろいろな動物を使って，いろいろの脳のレベルで実験が行われている。これらの報告を聞き，活発に討論を行い理解を深めることができた。幅広い研究領域の人たちが集って意義深い研究会となった。

カエル卵形嚢及び球形嚢有毛細胞におけるシナプス後電位

須貝外喜夫，大山　浩，矢野二郎，杉谷道男（金沢医大・第1生理）

遠心性線維の電気刺激によりIPSPが有毛細胞で記録される。非選択性コリン作動薬カルバコールCChやAChでは，IPSP逆転電位付近に達する過分極が発生し，この後IPSPの振巾が減少した。この振巾の減少はレセプタの脱感作によると考えられる。アトロピンの前処置でIPSPが消失している場合でもCChによる過分極は発生するが，d-ツボクラリンでIPSPが消失した後ではCChによる過分極は発生しない。結果はカエル前庭器におけるIPSPおよびCChやAChで起こる過分極がニコチン様作用を介していることを示唆する。

ヒヨコ蝸牛有毛細胞の遠心性 synapse の transmitter と modulation

重本　尚（生理研）

AChは有毛細胞においてムスカリン性受容体を介して，細胞内貯蔵部位からの放出によるCa応答を起こし，電気的には過分極応答を起こす。Ca応答のdose-responseのKd値は約200 μM，Hill係数はおよそ1である。1 μM CGRPを1時間作用させると，AChによるCa応答の大きさは約3倍に増大したが，dose-responseのKd値とHill係数は変化せず，また反応前の細胞内Ca濃度も影響されなかった。AChとの共存がコリン作動性シナプスで知られるATPは，2相性のCa応答を生じた。Ca-free溶液中での実験から，速い応答はCa流入を，遅い応答は細胞内貯蔵部位からのCa遊離を示唆する。膜電位固定下にATPは速い内向き電流と引き続く外向き電流を生じた。

求心神経の符号化部位と順応過程

小原昭作，菅原美子，岡野桂樹（帝京大・医・生理）

ゴンズイ電気受容器の求心神経は規則的な静止時放電を示し，両極性に頻度を増減する。順応過程は遅速二相からなり，極大上刺激に対しても約20秒で完全に順応する。このうち遅い順応相は求心性シナプス前，受容細胞の特性に依存し，遅速二種のCa電流が関与する。シナプス後，神経末端でのPSPは遅速二相に分離でき，二種の受容体の存在を示唆する。また神経末端を選択的に脱分極すると（細胞外通電），一過性応答の後，最大200Hz以上の持続放電が得られる。

すなわち，求心神経の符号化部位も遅速二相の応答特性を示す。したがって，速い順応相にはシナプス前・後の複数の要因が関与すると考えられる。

最近，ザリガニ受容器で単一の細胞内電極と不連続電流固定法を用い，ウリジンがスパイク順応を可逆的に促進することを示した。単一電極による電流・電圧固定法をゴンズイ受容器の求心神経末端にも適用して，符号化部位の応答特性をさらに追求する。

カナマイ耳中毒チックにおける聴器有毛細胞の再生

橋野恵里，田中康夫（獨協医大・越谷病院）

ごく最近，ヒヨコ内耳において音響外傷後に聴器有毛細胞の再生が起こることが明らかになった。我々はアミノ配糖体の一種であるカナマイシンの慢性投与後にもこのような再生現象が生ずるか否かを検討するために，孵化後4日めのヒヨコにカナマイシンを 200mg/kg× 10日間投与した後の basilar papilla の回復過程を走査電顕を用いて観察した。蝸牛の約35～40％の領域においてカナマイ中毒による有毛細胞および支持細胞の重篤な損傷が観察されたが，投与終了1日後にはすでに基底領域に小さな不動毛束が散在的に再生しているのが認められた。投与終了2週間後には basilar papilla はほぼ正常な状態にまで回復し，その表面は新たに再生した有毛細胞および支持細胞によって埋め尽くされていた。

蝸牛神経核聴ニューロンの応答の検討

棚橋汀路（名大・分院・耳鼻科）

麻酔した猫蝸牛神経核聴ニューロンより短期間順応の条件下で probe tone 応答の PSTH 型，スパイク頻度，膜電位を測定した。pauser や build-up 型ニューロンではインターバル 40ms, 持続 100ms の masker により probe tone の応答スパイクは150～200％に増加し， PSTH は持続放電型となった。閾値は 5～10dB 下がり，ニューロンの dynamic range は 20dB 以上広がった。順応を示さない持続放電型ニューロンでは 80～160ms のインターバルで probe tone 応答は著減又は消失した。しかしながら細胞内記録により EPSP の測定ではスパイク応答の消失にもかかわらず EPSP には変化をみなかった。

哺乳類聴覚領の構造の種間比較

堀川順生，細川　浩，村田計一（東京医歯大・難研神経生理）

ラットの聴覚領における周波数の配列様式を調べ，他種の動物の聴覚領との比較を行なった。ラットの聴覚領表面に垂直な方向には最適周波数 (BF) に関する柱状構造が形成されている。表面に平行な方向では，聴覚領の中央付近に BF が 50～60kHz の領域がありその領域を境にしてその前後及び背腹方向で周波数配列の逆転が見られる。また，この領域の後背側及び前腹側には別の領域が存在している。中央の領域を周波数配列から 2 つに分け，前方を AAF, 後方を AI と呼び，後背側及び前復側の領域をそれぞれ PD 及び AV と呼ぶ。応答潜時は PD 及び AV (12～25 ms) が AAF 及び AI (6～14ms) より有意に長く，PD 及び AV での情報処理が AI 及び AAF よりも後段であることを示唆している。ラット聴覚領の周波数配列様式はマウスのもの (Stiebler 1987) と非常に良く似ている。また，ネコ (Phillips 1982) やモルモット (Hellweg 1977) にも周波数配列の前後軸方向での反転に関する類似性が認められる。

耳から発振するベビー；Audible s-OAE の一症例

鈴木雅一，田中康夫，井上庸夫（獨協越谷病院・耳鼻咽喉科）
都筑俊寛（埼玉県立小児医療センター）

内耳が原因と考えられる，他覚的耳鳴の一症例について報告した。症例は生後10カ月の男児で，母親は生後 4 カ月頃より一側の耳から高音の発振のあることに気ずいていた。聴覚検査（条件検索聴覚検査，聴性脳幹反応）では，4000Hz 以上の高音部に難聴のあることが示唆された。自発耳音響検査で，11250Hz に単一周波数ピークをもつ反応が記録された。音圧は 35～40dBSPL であった。

他覚的耳鳴を自発耳音響放射としてとらえた報告は，本邦で 4 例めである。

抗 PIP_2 抗体による染色像と小脳発生

堀越哲郎，柳沢慧二（鶴見大・歯・生理）
宮沢淳夫，吉岡　亨（早大・人間科学）

我々は，ホスファチジルイノシトール 4, 5- 二リン酸 (PIP_2) でウサギを免疫して得た抗血清を

用いモルモット内耳有毛細胞を免疫組織化学的に染色すると，有毛細胞のステレオシリアが強く染色されることを既に示している。さらに最近になり，PIP_2 に対してさらに特異性の高いモノクロナル抗体の作製に成功した。この抗体の有効性を確かめるためにラット小脳について免疫組織化学的に染色を行ったところ，各種の神経細胞及びグリア細胞の核，またプルキンエ細胞の樹状突起などが染色され，しかもその染色性や染色部位が小脳の発生段階にともない変化すること等が示され，この抗体を用いることで組織内の PIP_2 の分布及び量的変化を検出できる可能性が示された。このモノクロナル抗体を用いてモルモット内耳有毛細胞を染色したところ，抗血清での結果と同様におもにステレオシリアが染色され，ここに PIP_2 が多く存在している可能性が示された。

子音識別ニューロン，帯域雑音受容ニューロンの反応成立機序

丸山直滋，斉藤勝則，工藤雅治（新潟大・脳研）

ネコ聴覚野の子音識別ニューロン，帯域雑音受容ニューロンは帯域雑音に最も強い連続反応を示し，両者で帯域雑音の中心周波数に対する選択性が異なる。これらニューロンの反応はスペクトル包絡に依存したものとこれまで考えてきたが，最近，これらの中に波形包絡に依存した反応を示すニューロンも見つかっており，刺激の変動が反応の要因となっていることが示唆された。また，有効中心周波数範囲が非常に限局し，狭い興奮野とその周りの抑制野を刺激が出入りすることにより反応が成立すると考えられるニューロンが見いだされた。子音識別ニューロン，帯域雑音受容ニューロンは有効中心周波数範囲の少しずつずれた同様の下位ニューロン複数個から，性質の同じ入力を選択的に受け取っていると考えられた。

モルモット聴覚中枢における音声の情報処理

谷口郁雄，田中英和（東京医歯大・難治疾患研・聴覚機能）

モルモットの内側膝状体と皮質聴覚領で音声に関して，どのような情報処理が行われているか，それぞれのニューロンの応答特性から検討した。内側膝状体のニューロンの中には，純音には応じないが，音声にはよく応じるニューロンが存在する。これはこのレベルで既に音声情報の処理に対して特殊化しているニューロンが存在することを意味する。皮質はＡⅠとＡⅡの領域に分けられる。ＡⅡのニューロンはＡⅠに比べて同調特性が鈍く，音声に対して応じにくいものが比較的多い。潜時は両者に差はなかった。おそらく，ＡⅠとＡⅡは独立して，パラレルな情報の入力

があるのであろう。

聴覚信号としての音声と音楽

亀田和夫，鎌田　勉（北大・歯）

古くから教科書などで聴覚域の中央に「音声域」が図示されているが，実際の測定に基づくかどうか疑問である。われわれは音声域を実測した（一部本研究所研究会で既報）が，比較のため「音楽域」を測定したところ両者は意外に類似していた。耳間交代による以前の実験結果でも，刺激条件によって音声と音楽の中枢処理機構に差があると考えられる場合と，差のない場合とがあった。

そのためEEGトポグラフの方法によって音声と音楽の聴取を比較した。言語などの精神活動の際に脳波の周波数分布は高いほうに偏移するが，言語的タスクのもとでは左脳特に側頭部に速波活動の中心を見出した。音楽聴取のときは，左右両側に中心のある例もあったが左に中心を持つ例も多かった。音声も音楽もともにヒト固有の聴覚信号であるから，その音響特性や処理機構に共通性が多いことに不思議はないであろう。

『脳腸ホルモンの生理作用に関する研究会（第３回）』

1989年11月７日

代表者　菅野富夫（北大・獣医・生理）

世話人　耳　　弘

１．泌尿生殖器における脳腸ホルモンの分布と役割

藤田恒夫，岩永敏彦（新潟大・医・解剖）

２．脊髄におけるタキキニン・コリン作動性機構

大塚正徳，吉岡耕一（東医歯大・医・薬理）

３．脳ナトリウム利尿ポリペプチド(BNP)の視床下部ニューロンに対する作用

山下　博，山本繁樹（産業医大・第１生理）

４．卵母細胞に発現させた脳内アミノ酸応答の分布

柳沢慧二，堀越哲郎，浅沼　厚（鶴見大・歯・生理）

後藤佐多良（東邦大・薬学）

５．脳腸ホルモンの生理作用における $[Ca^{2+}]_i$ 振動の意義

菅野富夫（北大・獣医・生理）

６．ヘロデルミンの構造と機能

矢内原昇（静岡県立大・薬学・生物薬品化学）

研究会概要

尿道は，消化管と同様に，セロトニン分泌細胞を主体とするパラニューロンとサブスタンスPとCGRPを共に含有しているニューロンが分布している器官である。陰茎には，VIPを含むコリン作動性神経とNPYを含むアドレナリン作動性神経が優位に分布し，勃起に関与している。タキキニン含有一次求心性神経線維ニューロンが活性化され，放出されたアセチルコリンがムスカリン受容体を介して単シナプス反射を抑制する機構があるらしい。脳ナトリウム利尿ペプチドはバゾプレシン分泌（広義）ニューロンに直接作用し，抑制効果を現す。大脳および小脳から抽出したmRNAをツメガエルの卵母細胞に注入するとGABA応答が現われ，脳幹よりのmRNAではグリシン応答が現われた。ラット遊離腺房標本の腺房細胞を生理的濃度のコレシストキニンで持続的に刺激すると，$[Ca^{2+}]_i$ が振動性に上昇した。この上昇は脳腸ホルモン効果の持続に関与していると思われる。ヘロデルミンは，イヌにおいて，VIP同様の血流増加効果を現わすが，その効果はVIPよりも低いが持続時間は長い。効果の持続に関与するアミノ酸残基を分析した。

以上の結果に示すように，脳腸ホルモン分泌パラニューロンとニューロンの形態と局在が一層明確になり，それらホルモンの生理作用，作用時間の持続に関与するペプチド構造および標的細胞内の情報処理機構について検討が進められた。

泌尿生殖器における脳腸ホルモンの分布と役割

藤田恒夫，岩永敏彦（新潟大・医・解剖）

脳腸ホルモンの存在意義を明らかにする目的で，細胞構成が比較的単純な陰茎と尿道における脳腸ホルモンの分布を調べ，若干の生理実験を行なった。

VIP は陰茎に大量に含まれており，勃起の伝達物質と目されている。我々は陰茎の血管系を調べ，海綿体洞に開く直前のらせん動脈が重要であることを見出し，この血管を支配する神経の同定を光顕および電顕レベルで行なったところ，VIP を含むコリン作動性神経と NPY を含むアドレナリン作動性神経が優位であることが判明した。勃起の状態を海綿体血圧の上昇で判定する実験系（イヌ）により，アセチルコリンはすばやいが短時間の勃起を，VIP は反応はにぶいが長時間の勃起をおこすこと，両者を同時に用いると相加作用以上の効果が得られることがわかった。アドレナリンと NPY はともに勃起を消退させるが，ちょうどアセチルコリンと VIP のような関係がある。インポテンス患者では VIP が減少することが想像される。器質的な場合には確かに減少するが，機能的なインポテンスでは局所の VIP は逆に上昇していた。

尿道は尿が通るだけの管と考えられていたが，ここには消化管と同じように内分泌細胞と神経が豊富に存在する。しかし，それらの構成要素は非常に単純で，内分泌細胞のほとんどはセロトニン細胞で，神経の多くは substance P と CGRP を同時に含む神経であった。セロトニン細胞は尿から情報を得て，セロトニンを分泌するパラニューロンであり，神経は知覚神経と思われる。尿道は構造と機能において単純な組織なので，これら脳腸ホルモンの働きを追及する上で格好のモデルになると思われる。

脊髄におけるタキキニン・コリン作動性機構

大塚正徳・吉岡耕一（東医歯大・医・薬理）

［目的］ 新生ラット摘出脊髄標本において，皮神経刺激によって起こる単シナプス反射の抑制機構について調べた。

［方法］ 0－3日齢のラットから胸髄以下の脊髄と大腿神経および坐骨神経の主要な枝とを連続した状態で取り出し，人工脳脊髄液で灌流した。筋枝神経の試験刺激によって得られる単シナプス反射を前根から記録し，皮神経の条件刺激による単シナプス反射の抑制を調べた。

［結果］ 大腿四頭筋の筋枝や大腿屈筋群の筋枝の試験刺激によって得られる単シナプス反射は，皮神経（伏在神経や腓腹神経）の条件刺激（50Hz, 5 発刺激，C 線維刺激強度）によって約20秒間続く抑制を受けた。この抑制は strychnine や bicuculline によって拮抗されなかったが，

edrophonium によって増強され，atropine によってほぼ完全に拮抗された。さらに，この抑制はタキキニン拮抗薬である spantide によっても著しい拮抗を受けた。灌流適用した acetylcholine および substance P は単シナプス反射を抑制し，それらの抑制は atropine により拮抗された。

［**結論**］以上の結果からタキキニン含有一次求心性線維によって脊髄内のコリン作動性ニューロンが賦活化され，放出された acetylcoline がムスカリン受容体を介して単シナプス反射を抑制する機構の存在が示唆された。

脳ナトリウム利尿ポリペプチド (BNP) の視床下部ニューロンに対する作用

山下　博，山本繁樹（産業医科大・第1生理）

1988年松尾らにより発見された脳ナトリウム利尿ポリペプチド (BNP) は，心房性ナトリウム利尿ポリペプチド (ANP) に類似した構造を有するが，明らかに異なる遺伝子からなるペプチドである。その作用に関して ANP と同様な作用を有すると考えられているが，詳細は不明であり特に中枢神経系に対しては明かではない。そこで，我々はラット脳の視床下部スライス標本を用いてその作用について検討を加えた。視床下部の第3脳室前壁側部 (AV3V) ニューロンに対して BNP は約30％に用量反応的に抑制反応を示しその植は 10^{-10}－10^{-11}M であることが示唆された。またその効果は ANP の抑制効果と同程度であり反応するニューロンもほぼ同一のニューロンであった。次に，視索上核 (SON) ニューロンに対しては，BNP は ANP と異なり，より強力に抑制作用を示すことが判明した。以上の結果より，BNP は ANP より強力に脳内で作用していることが示唆され，またその作用は脳室周囲核を介するのみならずバゾプレッシンニューロンに直接に抑制作用を示すことが示唆された。

卵母細胞に発現させた脳内アミノ酸応答の分布

柳沢慧二，堀越哲郎，浅沼　厚（鶴見大・生理）
後藤佐多良（東邦大・薬）

抑制性のトランスミッターあるいはモジュレーターとして知られている4種のアミノ酸について，ツメガエルの卵母細胞を用いて解析を行った。ラットの大脳，小脳，脳幹それぞれより抽出した mRNA を卵母細胞に注入して外来性の受容体を発現させた。この卵母細胞について GABA，グリシン，タウリン，βアラニンに対する応答性を電位固定法により観察した。大脳および小脳より抽出した mRNA では GABA 応答が，脳幹よりのものではグリシン応答が大きくえられ，伝

達物質受容体 mRNA 脳内分布が卵母細胞に発現されていることが確認された。これらの応答には脱感作がおこるので，4種のアミノ酸についてクロスしておこる脱感作を調べてみると，GABA とグリシンはそれぞれ独立しているが，それ以外は重複していた。アンタゴニストの効果も GABA とグリシンで差があり，両者が異った受容体であることを示唆した。タウリンとβアラニンは GABA, グリシン両受容体に作用する。

脳腸ホルモンの生理作用のおける $[Ca^{2+}]_i$ 振動の意義

菅野富夫（北大・獣医・生理）

脳腸ホルモンは，古典的神経伝達物質に比し，多種多様な作用を有していると考えられている。これらの脳腸ホルモンの特徴と考えられるのは，古典的神経伝達物質に比し，その効果が持続することである。効果持続時間を決める機構は，標的細胞のホルモン受容体にホルモンが結合している時間と細胞内情報伝達系の活性化持続時間にあると予想される。細胞内情報伝達物質として普遍的な $[Ca^{2+}]_i$ 濃度上昇は，一過性であるという報告が多く，それが持続的効果に変換される機構は確定していない。近年，種々の細胞の持続的反応に伴って $[Ca^{2+}]_i$ 振動性上昇が記録され，我々もラット遊離腺房標本の腺房細胞を生理的濃度のコレシストキニンで持続的に刺激した時に，$[Ca^{2+}]_i$ が振動性に上昇することを記録した。$[Ca^{2+}]_i$ 振動が脳腸ホルモンの効果持続の有力な機構であると考えられる。

ヘロデルミンの構造と機能

矢内原昇（静岡県立大・薬学・生物薬品化学）

Helodermin (Hd) は，北米毒トカゲ (Gila Monster) の毒液中より単離精製，構造決定された35アミノ酸残基からなるポリペプチドである。そのN端部配列は，VIP, PHI, secretin との高い共通性がみられる。こうした構造上の類似性から Hd は，哺乳類および鳥類以外の動物から初めて発見された VIP-secretin 様のペプチドであることが明かとなった。Hd はイヌにおいて VIP と同様，血流増加作用を示すが，その効果は，VIP に比し1/16と低力価である。しかしながら，その作用は持続的であり，その半減期は VIP の6倍以上という生理活性ペプチドとしては，他に例を見ない特徴的な作用を有している。我々はすでに Hd のN端およびC端関連ペプチドを用い，Hd の持続効果発現には31位 Thr 残基よりC端側ペプチド配列と，C端部のβ－ターン構造が必須であることを明らかにした。以上の知見をもとに本研究室では，強い血流増加作用を持つ VIP

の活性部位がそのN末端部領域であり，その作用持続発現にはHdのC端部が必須であることを考え合わせ，VIPとHdの構造を合わせ持つ，VIP (1-11)-Hd (12-31)-NH_2, [Gly^5]-VIP (1-11)-Hd (12-31)-NH_2 およびVIP (1-11)-Hd (15-31)-NH_2 の3種類の新しいHd誘導体をデザインし合成したのち，その作用についてVIPおよびHdと比較検討した。その結果，3種類の誘導体の血流増加作用は，いずれもHdのそれの1/5以下であった。3種の誘導体の中でも最も高活性を示した[Gly^5]-VIP (1-11)-Hd (12-31)-NH_2 を用い，さらにVIPおよびHdとの相互作用を検討した結果，本ペプチドはVIPとは相加的に血流量を増加するが，一方Hdには拮抗的に作用することが示された。これらの知見は，イヌ大腿動脈血流増加作用の発現においてVIPとHdが互いに異なる受容体を介して作用していることを示唆している。

『内外受容器のブドウ糖分子受容識別機構の特性と役割』

1989年12月4日～5日

代表者　足立　明（岡山大・歯・口腔生理）

世話人　大森治紀

1．膵β細胞の電気的活動と細胞内 pH

北里　宏（滋賀医大・第2生理）

2．糖阻害剤下でのブドウ糖誘発電気活動へのカルバコールの効果

坂本康二（福岡大・医・第1生理）

3．小腸刷子縁膜糖担体の比較生理学的研究

星　　猛（静岡県立大・食品栄養科学）

4．末梢グルコース感受装置による自律神経反射

新島　旭（新潟大・医・第1生理）

5．ストレスと血糖調節　―交感及び迷走神経の役割―

斎藤紀文，田中克明，永瀬　肇，井上修二（横浜市大・医・第3内科）

6．視床下部グルコース受容機構とカルシウム代謝調節

粟生修司（九大・医・第1生理）

7．脳内 fibroblast growth factor とグルコースとの関係

大村　裕（富山医薬大・高次神経機能制御部門）

8．2, 5-Anhydro-D-mannitol と摂食調節

坂田利家，黒川　衛（九大・医・第1内科）

9．グルコキナーゼのラット肝細胞内分布

豊田行康，三輪一智，光山幸恵，奥田　潤，野々垣常正，青木重久（名城大・薬・臨床生化学）

10．味細胞における糖応答発生のメカニズム

外崎肇一（朝日大・歯・口腔生理）

11．アフリカツメガエル卵母細胞に発現した Na^+/グルコース共輸送担体　－第2報－

永田克己・市川　修・日地康武（鳥取大・医・第1生理）

12．ギムネマ・シルベスタ葉に含まれる新しい甘味抑制物質

井元敏明，宮坂昭子，市川　修，永田克己，日地康武（鳥取大・医・第1生理）

13．甘味覚阻害物質のインスリン分泌に及ぼす影響　－第2報－

仁木　厚，仁木初美，橋岡俊樹（愛知学院大・歯・内科）

14．あま味および旨味によるインスリン分泌

足立　明（岡山大・歯・口腔生理）

青山光徳（岡山大・歯・保1）

参加者氏名

大森治紀（岡崎国立共同研・生理研），大村　裕，佐々木和男（富山医薬大・高次神経機能制御），星　　猛（静岡県立大・食品栄養科学），新島　旭（前新潟大・医・第1生理），仁木　厚，仁木初美，橋岡俊樹（愛知学院大・歯・内科），藤田恒夫（新潟大・医・第3解剖），北里　宏（滋賀医大・第2生理），日地康武，井元敏明，市川　修，永田克己（鳥取大・医・第1生理），奥田潤，三輪一智，豊田行康，田口忠緒，村田富保，酒向博樹（名城大・薬・臨床生化学），坂本康二（福岡大・医・第1生理），井上修二，田中克明，斎藤紀文（横浜市大・医・第3内科），粟生修司，高木厚司（九大・医・第1生理），坂田利家（九大・医・第1内科），外崎肇一（朝日大・歯・口腔生理），足立　明，北田泰之，小橋　基，船橋　誠，青山光徳（岡山大・歯・口腔生理）

膵β細胞の電気的活動と細胞内 pH

北里　宏（滋賀医大・第2生理）

β細胞は細胞外グルコースに反応して脱分極しスパイクを発生する。この脱分極に ATP-sensitive K-channel と pH 感受性を有する Ca-activated K-channel の何れがより本質的に関与しているかを明らかにするために実験を行い，以下の結果を得た。

1）細胞内への Ca^{2+} 流入を抑制する操作を行うと脱分極が起った。2）細胞内への Ca^{2+} 流入を抑制した後，細胞外 Na^{+} 濃度を 25mM に下げると，更に脱分極した。3） dihydropyridin 存在下で amiloride を与えると，反復的り発生していた遅いスパイクの振幅は増大した。4） Ca^{2+} を含まない Krebs-Ringer 中では，SITS 投与により postspike hyperpolarization のレベルは過分極方向へ移動した。以上から，静止時においても Ca-activated K-channel は或る程度開いた状態にあり，細胞内酸性化によりこれが閉じ，Kコンダクタンスが減少すると考えられる。

糖阻害剤下でのブドウ糖誘発電気活動へのカルバコールの効果

坂本康二（福岡大・医・第1生理）

アセチルコリンは，Phospholipase C を活性化してインシュリン分泌を促進すると報告されている。本実験では，ブドウ糖阻害剤下で，カルバコール (10^{-6}－10^{-4}M) が活動電位を誘発するかどうかを検討した。ブドウ糖除去下で消失したトルブタマイド (0.1－0.3mM) 誘発活動電位はカルバコール投与で回復されなかった。一方ブドウ糖誘発活動電位も，フロリジン (5mM), マノヘプチローズ (1mM) が存在すると，カルバコール誘発活動電位はみられない。すなわち，外液にブドウ糖が存在しないか，糖阻害剤が存在すると，10^{-4}M の高カルバコール投与でも，膜の脱分極はみられるが，活動電位の誘発はみられない。しかし，外液 Na 濃度を同時に減少すると，マノヘプチローズ存在下でもカルバコールによる誘発活動電位が見られ，しかもこの電位はアトロピン (10^{-6}M) で抑制される。よってカルバコール誘発電位は糖存在下で発生し，Na はその調節になんらかの関係があると推測される。

小腸刷子縁膜糖担体の比較生理学的研究

星　　猛（静岡県大・食品栄養科学）

小腸反転嚢標本を用いた輸送電位記録法によると，刷子縁膜糖 /Na^+共輸送体の基質特異性を各種動物について広範にかつ簡便に比較研究しうる。海生生物については軟体動物，硬骨魚共糖輸送電位の発生は見られず，汽水魚のボラから記録しうるようになる。系統発生樹上それ以上の位置にある動物では全て類似した特徴をもつ糖輸送電位を発生する。すなわち淡水魚，両生頼，爬虫類，鳥類，哺乳類では何れも D-pyranose 環をもち，D-glucose と同位の C_2-OH 及び C_6 構造もつ糖に反応して Michaelis-Menten 速度論に従う Na^+依存性，phlorizin 感受性の輸送電位を生起する。但し C_3-OH のメチル化の影響は動物差が著しく，α -methyl glucose, galactose, 6-Deoxy-glucose は何れの動物でも D-glucose に比して約1/2程度親和性が低い傾向が見られる。

末梢グルコース感受装置による自律神経反射

新島　旭（新潟大・医・第１生理）

末梢グルコース感受装置の主なものとしては舌にある味覚の甘み受容器，小腸のグルコース受容器，肝一門脈系のグルコース感受装置の三つが挙げられる。前二者のコーヂング機構は類似しており，糖受容器を介して求心性神経活動を発するものである。グルコースのほかシュクロースなどにも反応する。肝一門脈系のグルコース感受装置はこれと異なり，グルコースを介する Na ポンプの活性化により求心性活動の抑制をおこす機構で，グルコースに特異的に反応する。このように前二者ではグルコースによる求心性活動の発生，後者では求心性活動の抑制，と反応は異なるが，迷走神経膵臓枝の遠心性活動はいずれのグルコースの刺激でも増強し，反射性インスリン分泌をおこす。また同時に，副腎神経など交感神経活動の抑制も観察される。グルコース感受装置からの入力と，迷走神経膵臓枝，内臓支配交感神経への出力との間に主として延髄を中心とする統御機構の存在が示唆される。

ストレスと血糖調節
—交感及び迷走神経の役割—

斉藤紀文，田中克明，永瀬　肇，井上修二（横浜市大・第３内科）

急性ストレス時の糖代謝に対する自律神経系の関与を検討する目的で絶食ラットに拘束ストレスを負荷し，血糖変化と耐糖能をみた。

１．交感神経系の関与

腹部交感神経切断，副腎髄質摘除，副腎摘除，偽手術ラットを用いて検討したところ，偽手術ラットのみがストレスによる血糖上昇と耐糖能障害を呈した。さらに交感神経－副腎系を介して分泌されるエピネフリンが主要な役割をはたしているものと判明した。

２．副交感（迷走）神経系の関与

腹部迷走神経切断，偽手術ラットを用いて検討したところ，迷走神経切断ラットは偽手術ラットより顕著な耐糖能障害を呈した。また迷走神経末梢遠心性ブロッカーであるメチルアトロピン前投与にても同様の所見を得た。

以上より，急性ストレス時の糖代謝には交感，副交感系がともに関与し，そのtonusの差により血糖上昇や耐糖能障害の程度が変化しうるものと考えた。

視床下部グルコース受容機構とカルシウム代謝調節

粟生修司（九大・医・第１生理）

視床下部にはグルコースに脱分極応答を示すグルコース受容ニューロンや逆に過分極を起こすグルコース感受性ニューロンが存在し，摂食行動や糖代謝の調節に重要な役割を果たしている。最近，視床下部がカルシウム代謝の調節にも重要な役割を果たしていることが明らかにされつつあり，少なくともその一部が視床下部グルコース受容機構を介している可能性が示唆されている。側脳室にカルシトニンを投与すると血中カルシウムが長時間にわたり低下することが報告されているが，カルシトニンは視床下部外側野のグルコース感受性ニューロンに対して特異的に抑制作用を示す。また視床下部内側部を電気的に刺激すると副甲状腺ホルモンが低下し，それに引き続いてカルシウムが低下する。カルシトニンは変化しない。

脳内 fibroblast growth factor とグルコースとの関係

大村　裕，佐々木和男（富山医薬大）
花井一光（九大・理）

摂食後あるいは腹腔内グルコース投与で脳脊髄液 (CSF) 中に酸性 fibroblast growth factor (aFGF) が著明に増加する。摂食は，この増加によって抑制され，抗体によって促進される。従って，aFGF は満腹物質である。aFGF の摂食抑制は，摂食中枢内のグルコース感受性ニューロンの蛋白キナーゼ C を介するものである。aFGF は，in situ hybridyzation 法で調べた結果，脳室壁の上衣細胞で生成され，CSF 中のグルコース増加で放出される。放出はグルコース増加後1.5時間でピークになり5時間でもとのレベルに帰る。膵臓 B 細胞がグルコースでインスリンを放出するが，aFGF の放出機序は同じものであろう。

aFGF の CSF 中にピークになる時点で，マウスに受動型逃避学習を行うと，著明な学習効果が著われる。このことは aFGF が学習の定着に何らかの作用を及ぼしている可能性がある。また aFGF をスナネズミの側脳室に持続的に注入しておくと，短時の脳虚血による海馬 CA_1 ニューロンの変性を完全に抑制することができる。

以上のことは aFGF が満腹物質として作用するだけでなく，脳内での種々の生理学的過程に大きく関与していることを示している。

2, 5-Anhydro-D-mannitol と摂食調節

坂田利家，黒川　衛（九大・医・第1内科）

これまで glucose anmlogues の構造と生理活性の関係について調べてきた[1・2]。今回，fructose analogue である 2, 5-anhydro-D-mannitol (2, 5-AM, 2-deoxy-fructose) をとりあげ，その摂食調節性を glucose analogues とも対比し，検討した。2, 5-AM を明期（1100時）に，Wistar King 雄性成熟ラットの第3脳室内へ注入したところ，24 μmol/rat で有意の摂食誘発を認めた（表1）。しかし，同量の腹腔内投与では誘発を認めなかった（表1）。即ち，末梢を介した誘発でないことが証明された。

Friedman らは末梢投与ながら，明期投与では促進性に，暗期投与で抑制性に作用するとした[3]。そこで，明期注入後の24時間摂食パターンを測定したところ，注入直後の摂食誘発も，注入後の後半期（暗期）では摂食抑制性に作用した（図1）。即ち，2, 5-AM による摂食調節は，投与時期とは関係なく，二相性に発現することが判明した。2, 5-AM による液性応答を調べたが，血糖を変動させないこと，その摂食調節は少なくとも視床下部腹内側核を介すこと等が明らかにな

った。

文献

1．Fujimoto, K. et al. Am. J. Physiol. 251 : R481－R492, 1986.

2．Sakata, T. et al. Intern. J. Obesity 11 (Suppl. 3) : 27－33, 1987.

3．Tordoff, M. G. et al. AmJ. Physiol. 254 : R150－R153, 1988.

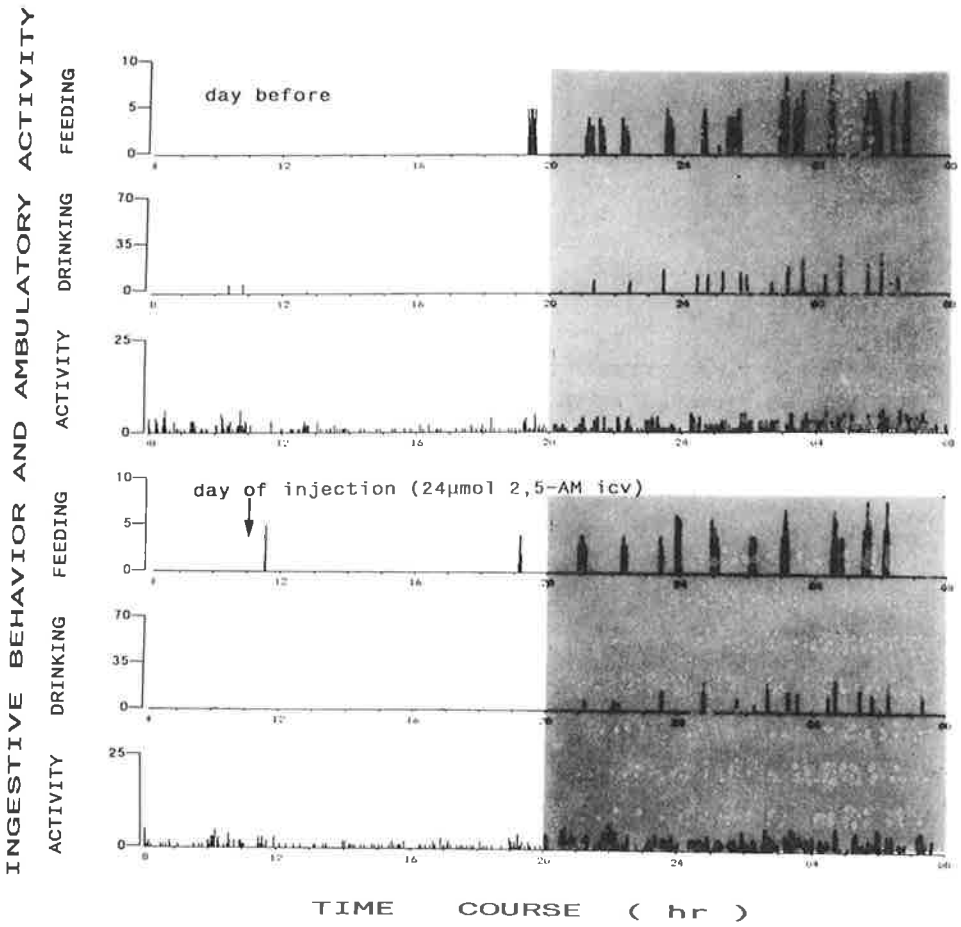


Fig. 1 Twenty-four-hour feeding, drinking and exploration patterns before and after infusion on 24 μ mol 2, 5-anhydro-D-mannitol (2, 5-AM) into the rat third cerebroventricle at 1100 hour during the light period.

Table 1. Feeding elicitation after infusion of 2, 5－anhydro－D－mannitol (2,5－AM) into the rat third cerebroventriole (icv) or peritonium (ip) at 1100hr

Behavior	2,5-AM(μmol)(icv)				2,5-AM (μmol)(ip)	Saline (μmol)(icv)
	6	12	18	24	24	1.5
Feeding Frequency	0/6	1/6	4/6[a]	5/6[b]	0/6	0/6
Latency (min)	-	5.3	16.0 ±1.4	12.2 ±3.6	-	-
Duration (min)	-	2.3	4.8 ±0.6	10.3 ±4.9[c]	-	-
Drinking Incidence	0	0	0	0	0	0
Exploration	－	±	＋	＋	－	－

a=p<0.05, b=p<0.01 vs saline controls. c=p<0.05 vs 12 and 18 μmol doses.

グルコキナーゼのラット肝細胞内分布

豊田行康，三輪一智，光山幸恵，奥田　潤（名城大・薬・臨床生化学）
野々垣常正，青木重久（愛知医科大・第二病理）

グルコースのリン酸化を触媒するグルコキナーゼ (GX) (EC. 2. 7. 1. 1) は，肝臓における糖代謝に関与しているが，その役割については不明な点が多い。そこで，免疫組織化学的方法ならびに有機溶媒 (glycerol) 中での細胞核単離法により，ラット肝における GK の細胞内分布を調べた。

ラット肝切片の免疫組織化学的染色の結果，GK に対する反応は，肝実質細胞にのみ見られ，しかも細胞質よりも細胞核に強い反応が見られた。一方，2.2 M Sucrose を用いた細胞核単離法では，細胞核画分に GK を見出すことはできなかったが，glycerol を用いた方法では，GK を保持したまま細胞核を単離することが出来た。

以上の結果，GK は，ラット肝実質細胞の細胞核に高濃度に存在していることが分かった。

味細胞における糖応答発生のメカニズム

外崎肇一（朝日大・歯・口腔生理）

味覚の受容器である味細胞は舌背面の tough で water proof なケラチン層に点在する各種乳頭内の味蕾内に数十個存在し，その先端は味孔で互いに密な tight junction を形成して外界と接している。Procion yellow を記録細胞に注入してみると蔗糖刺激に脱分極性電位を発生し，その際膜抵抗の増大もしくは変化の認められないような味応答を発生する味細胞が染色されていることが蛍光顕微鏡下観察でわかった。味細胞内に cGMP, cAMP, TEA を electrophoretic に注入すると細胞内電位は脱分極し膜抵抗は増大する。このことは蔗糖が味受容膜に吸着すると味細胞内の二次伝達物質が働らき膜の K^+ ion 透過性を減少させることによって蔗糖への味応答が発生すると考えられた。蔗糖以外の各種味刺激に対しては味細胞は様々な味応答様式をしめすが，単糖，二糖類に対しては蔗糖と同様な応答様式を示す。しかし応答の大きさや膜抵抗変化の程度は糖の種類や細胞によって異なる。

アフリカツメガエル卵母細胞に発現した Na^+/グルコース共輸送担体　—第2報—

永田克己，市川　修，日地康武（鳥取大・医・第1生理）

ラット小腸から抽出した mRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し，卵母細胞を −60mV に膜電位固定すると，Na^+/グルコース共輸送担体の活性は 20mM グルコース灌流下 Na^+ による約 1nA の内向き電流として観察され，この担体のグルコースに対するミカエリス定数 (Km) は 1.7mM であった。しかし，ラット小腸でこの担体により吸収されるガラクトースを 20mM で灌流しても内向き電流は見られなかった。これは，卵母細胞で mRNA が翻訳されるときの翻訳後修飾過程が異なるためにこの担体の基質特異性が変化した可能性を示唆する。

ギムネマ・シルベスタ葉に含まれる新しい甘味抑制物質

井元敏明，宮坂昭子，日地康武（鳥取大・医・第1生理）

ギムネマ・シルベスタ葉の温水抽出物から，ギムネマ酸以外の物質で，ヒトおよびラットにおける甘味応答を特異的に抑制する分画を得た。この抑制効果はショ糖のみならずブドウ糖，果糖などの糖類，グリシン，アラニンなど甘味を呈するアミノ酸，人工甘味料であるサッカリンに対

しても認められ，甘味に共通の変換過程に作用している可能性が示唆された。また，ジジフィンやホドルシンなどの配糖体の作用と異なり，抑制効果が数時間にわたって持続するという特徴を示した。

甘味覚阻害物質のインスリン分泌に及ぼす影響　—第2報—

仁木　厚，仁木初美，橋岡俊樹（愛知学院大・歯・内科）

膵β細胞と甘味受容細胞の糖認識機構を比較するため，甘味覚を特異的に阻害するヘキソース誘導体の，ラット膵島よりのインスリン分泌に対する影響をみた。

グルコースおよびマンノースのp-ニトロフェニール誘導体は，グルコースによるインスリン分泌を阻害した。この作用はαアノマーにβアノマーより強く見られた。これら誘導体は膵島グルコース酸化を阻害せず，非糖刺激物質によるインスリン分泌にも影響しなかった。一方，ガラクトースの誘導体はグルコースによるインスリン分泌阻害作用を示さなかった。Chlorosugarもグルコースによるインスリン分泌を阻害したが，p-ニトロフェニール誘導体に比べて膵β細胞への親和性は極めて低いことが示された。

あま味および旨味によるインスリン分泌

足立　明（岡山大・歯・口腔生理）
青山光徳（岡山大・歯・保1）

摂食時のインスリン分泌は2相性を示し，摂食開始後5分までに現れる分泌は，Cephlic phaseと呼ばれ，味覚が重要な要因であると考えられている。ラットの口腔内に，味溶液注入用のカテーテルを慢性的に挿入し，また採血用の慢性心カテーテルを右頸静脈に挿入した。術後一週間の回復期間をおいて，実験を開始した。このようにラットが受動的に味溶液を与えられる条件下においても，あま味刺激がCephlic phaseのインスリン分泌をひきおこすことがわかった。うま味として知られているグルタミン酸ナトリウム(MSG)溶液を口腔内に注入した場合も同様なインスリン分泌が認められた。これはMSGがあま味を伝達する求心系を興奮させるためにひきおこされたものと考えられる。

『生体内における水構造と水輸送及び NMR-CT の研究』

1989年12月 8 日～ 9 日

代表者　曽我美勝（岐阜大・医）
世話人　亘　　弘（生理研）

A．膜のダイナミクスと水構造

吉川研一（名大・教養）

B．腎近位尿細管細胞の水電解質輸送に対する pH の役割

藤本　守，窪田隆裕，萩原暢子，久保川学，少作隆子（大阪医大・第２生理）

1．生体内分子の受容体認識過程における水構造の役割　―モデル系からのアプローチ―

精山明敏，前田信治（愛媛大・医・第２生理）
吉田　登，藤本昌利（北大・理・錯体化学）

2．アルカリ金属ハロゲン化物水溶液への糖類の溶解度

梶原一人，村瀬則郎，権田金治（東京電気大・工・理工）

3．高電荷密度をもつ高分子電解質の解離挙動について

南方　陽，西尾卓広（浜松医大・物理）
川口正剛（豊橋技科大）

4．生体内における水構造と ^{1}H-NMR 情報

恵良聖一，桑田一夫，藤田裕子，曽我美勝（岐阜大・医・２生理）
加藤一夫（岐阜大・医・１病理）
岩間　亨（岐阜大・医・脳外）
植木俊介（岐阜大・医・反射研）
天野　肇（岐阜大・医・眼科）
亘　　弘（生理研）

5．プロトン NMR によるラット水晶体水とタンパク質相互作用の解析

西川弘恭（明治鍼灸大・生理）
貝塚由利子，森　利彦，赤木好男，照林宏文，糸井素一（京都府立医大・眼科）
森山祥彦（京都府立医大・化学）

6．^{1}H-NMR 法による骨格筋細胞内の水の構造解析

山田武範，杉　晴夫（帝京大・医・第２生理）

7．筋肉内水分子の拡散係数の NMR による測定

吉崎和男，横井則彦，森本武利（京都府立医大・第１生理）

8．Heinz 小体形成赤血球の変形能とプロトン緩和時間

上坂伸宏，飯野正昭，長谷川節雄（日本医大・第１生理）
山田武範（帝京大・医・第２生理）

9．高 K^+ を含む等張溶液中の HeLa 細胞容積調節機構

池原敏孝，高橋　章，山口久雄，細川敬子，宮本博司（徳島大・医・第１生理）

10．分泌時細胞容積変化と細胞間連絡

中張隆司，今井雄介（大阪医大・第１生理）
佐々木康人，柴　芳樹，菅野義信（広島大・歯・口腔生理）
村上政隆（生理研）

11．腺細胞の水含量調節機構回路モデルシミュレーションによる検討

今井雄介，中張隆司，吉田秀世，宮本　学，相馬義郎（大阪医大・第１生理）

膜のダイナミクスと水構造

吉川研一（名大・教養）

神経の興奮・心筋の拍動・受精卵の卵割・脳波・サーカディアンリズム等，生物は，様々なレベルでリズムを自ら作り出している。これらは，全て非線形振動としての特質を有しており，そのことが，生命現象の本質とも係わっている。生物のこのようなリズムの発生には，いずれも生体膜が必要不可欠である。膜は一般に，水－油－水の三層の界面であるとも言える。そこで，膜や界面で，どのような条件のもと，如何なるリズム（発振）が生じるのかを知ることは，大きな意義がある。ここでは，人工的な膜や界面でのリズム現象の実験例を紹介する。その際，非線形振動系の特有の性質である，分岐現象・多重周期振動・カオス・引き込み（同調）などの面白い事項を取り上げながら解説したい。

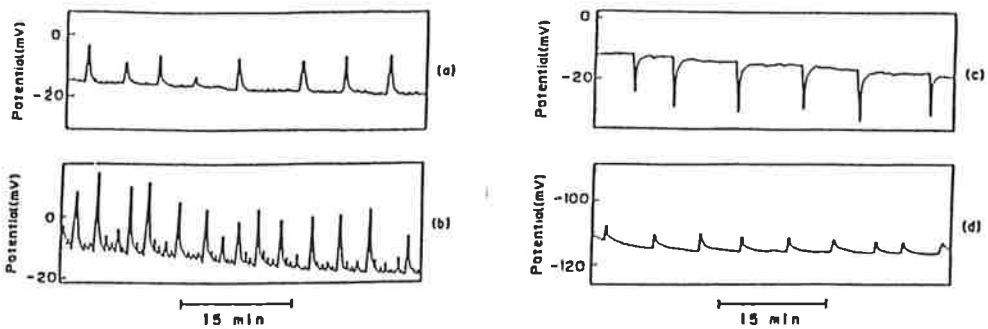


Fig. 1 Oscillations of electrical potential by the addition of 0.5ml of
(a) 0.1M sodium chloride. (b) 1M sucrose. (c) 0.001M quinine chloride.
(d) 0.03M hydroctloric acid to left aqueous phase.

腎近位尿細管細胞の水電解質輸送に対する pH の役割

藤本　守，窪田隆裕，萩原暢子，久保川学，少作隆子（大阪医大・第２生理）

腎尿細管の水・電解質輸送機能は，体液または細胞外液の物理化学状態のわずかな変化に対応して変化する。中でも，酸塩基平衡の異常時には H^+ 分泌や HCO_3^- 再吸収機能を可変的に調節するのが腎尿細管上皮の特性である。しかしこの作用発現にかかわる細胞内伝達機構，特に膜を介する H^+ や HCO_3^- 輸送機構とそれに対する細胞内 pH や Ca^{2+} の役割などの詳細についてはほとんどわかっていない。

我々は細胞内pHやCa^{2+}活量変化を調べるために主としてイオン選択性微小電極法を用いた。実験は食用蛙(100－150g)の二重灌流腎で行った。すなわち大動脈系と腎門脈系を別々に灌流するものである。まず正常対照条件（室温22°C in vivo）の灌流腎において，冷血動物用Ringer液(1.5% CO_2, 98.5% O_2 通気，pH7.65, HCO_3^- 15 mM)にて尿細管内外を灌流した。細胞内外のイオン活量の変化と同時に静止膜電位(E_M)を測定し，イオン駆動力の変化をも分析した。アシドーシスでは1.5% CO_2, 98.5% O_2 通気，pH＝6.7, HCO_3^- 1.5 mMのRinger類似液を，また，アルカローシスでは1.5% CO_2, 98.5% O_2 通気，pH＝8.0, HCO_3^- 30 mMの液を数分間灌流し，その時の電解質の挙動の違いを調べた。またオポッサム腎近位尿細管由来の培養細胞で膜のイオンチャネルの性質をも調べた。

尿細管周囲側の膜電位はアシドーシス時に脱分極し，アルカローシス時に過分極した。近位尿細管の細胞内のCa^{2+}活量は，アシドーシスで減少し，アルカローシスで増加した。この現象は，単純なCa結合体の酸・塩基解離では説明できない。細胞外液のNa^+やK^+変化を含む多くの実験条件下で，H^+とCa^{2+}の濃度の間には一定の反比例関係が観察され，得られたプロットは，ほとんどすべて一つの双曲線上に乗る。細胞外液のCa^{2+}を除くと，この双曲線全体が細胞内Ca^{2+}の低くかつpHの高いほうにシフトし，細胞内Ca^{2+}活量は細胞外Ca^{2+}活量の影響を受けていることを示す。上記の関係では，細胞内の1当量のH^+の上昇と共に，Ca^{2+}がほぼ4当量程度も低下していることになる。これは，細胞膜または細胞内膜におけるCa-H-ATPaseの積極的関与および有機P・Ca結合体の結合・離脱によるCa^{2+}とH^+の両者の挙動とそれぞれの緩衝作用の結果を反映するものであろうと思われる。

外液のK^+を上昇せしめ，膜電位を脱分極させると，細胞内が高Ca・高pH（細胞内アルカローシス）に傾く。この細胞内アルカローシスは，尿細管周囲膜を介する起電性HCO_3^-去出が減少したためと解せられる。一方，外液のNa^+を下げると，軽い脱分極ならびに細胞内pHは低下（細胞内アシドーシス）し，細胞内Ca^{2+}も低下する。したがって，細胞内のpHもCa^{2+}も共に細胞外Na^+の影響を受けていることを示す。実験条件では，Ca^{2+}低下は，Na^+/Ca^{2+}交換機構では説明できず，むしろ細胞内pHの低下に由来する二次的効果である可能性が高い。

次に，オポッサム腎のイオンチャネルの研究によると，近位尿細管膜に存在する約70 pSのK^+チャネルは，細胞内二価陽イオン（Ca^{2+}，Mg^{2+}）により不活性化され，ATPによって再活性化される。このチャネルは，細胞内pHの影響を強く受け，アルカリ側で活性化，酸性側で不活性化される。その変曲点は室温で7.5辺りである。

以上より，1）近位尿細管の細胞内pHは，主に細胞内外のK^+とNa^+によって大きい影響を受ける。2）細胞内のCa^{2+}とH^+は密接な関係にあり，pHを変化させる要因はCa^{2+}活性を変える。しかし細胞内Ca^{2+}を変える要因には必ずしも細胞内pHを変えない要因が含まれている。3）尿細管の膜にはpH感受性のイオンチャネルが存在し，細胞内pHによって膜電位，イオン透過性，ならびにポンプ機構が部分的に制御される可能性が大である。その他，われわれの小胞研究によれば，管腔内へのH^+駆出機構には細胞内小胞の働きも一部関与することが示されてい

る。

参考文献

1) Fujimoto, M. et al. : The effect of cAMP on ion transport in the proximal tubular cells in bullfrog kidney. Jpn. J. Physiol. **38** : 619－641, 1988

2) Fujimoto, M. et al. : Relationship between cytosolic activities of calcium and pH in frog proximal tubule. Jpn. J. Physiol. **40** : 273－295, 1990

3) Kubota, T. et al. : Intracellular calcium measurements with PVC-resin Ca selective microelectrodes in frog proximal tubules and sartorius muscle fibers. Jpn. J. Physiol. **40** : 79－95, 1990

4) Ohno-Shosaku, T. et al. : Regulation of inwardly rectifying K^+ channels by intracellular pH in opossum kidney cell. Pfluegers Arch. **414** : 1990 (in press)

生体内分子の受容体認識過程における水構造の役割
—モデル系からのアプローチ—

精山明敏，前田信治（愛媛大・医・第２生理）
吉田　登，藤本昌利（北大・理・錯体化学）

生体内反応の多くの初発過程は，分子認識とそれにつづく分子取り込み過程よりなる。本研究では，近年酵素モデルとして注目をあびているシクロデキストリン (CDx) を用い水溶液中における有機分子取り込みにともなう熱力学的及び活性化パラメーターの変化を求め，分子取り込み現象（包接化現象）における水構造の役割を検討した。(1) CDx はゲスト分子の疎水性の強い部分と相互作用をし，取り込みの速度はゲスト分子の水和状態の影響を大きく受けていることがわかった。(2)分子取り込みにともなう自由エネルギーの変化（ΔG）は，－10～－25 kJ/mol であり，エンタルピー変化（ΔH）とエントロピー変化（ΔS）の間には良い補償関係がみられた。(3)包接錯体生成及び解離過程の活性化エントロピーは大きな負の値を示した。前者にはゲスト分子の自由度の凍結，後者には水分子の氷状構造の形成が大きく関与していると考えられる。

アルカリ金属ハロゲン化物水溶液への糖類の溶解度

梶原一人，村勢則郎，権田金治（東京電機大・理）

塩化ナトリウム水溶液に対するガラクトースの溶解度（30℃）を測定した。それらの結果から塩化ナトリウムのモル数 (nNaCl), ガラクトースのモル数 (nGal) 及び水のモル数 (nH_2O) を算出し

た。nNaCl/nH_2O 値（塩化ナトリウム水溶液の濃度）が大きくなるに従い，nGal/nH_2O 値（水に対するガラクトースの溶解性）は上昇し，nNaCl/nH_2O＝0.122（塩化ナトリウムが飽和）のとき nGal/nH_2O＝0.0711 となった。したがって，塩化ナトリウム水溶液は，その濃度が高くなるに従いガラクトースを塩溶させる作用が大きくなる。また，塩化ナトリウム水溶液に対するグルコースの溶解度から，塩化ナトリウム水溶液は，その濃度によりグルコースを塩溶及び塩析させる作用があると考えられる。これは，ガラクトースとグルコースの構造の相違（4位の炭素に結合しているHとOHが逆向）によるものと思われる。

高電荷密度をもつ高分子電解質の解離挙動について

南方　陽，西尾卓広（浜松医大・物理）
川口正剛（豊橋技科大・物質工学）

ポリマレイン酸等高電荷密度をもつ高分子電解質やマレイン酸共重合体のように解離基間間隔が不均一な高分子では，見かけの pK 値は(1)解離度 α＝0.5付近で jump し2段解離を示し，(2) α＜0.5迄の pK 値の増加は α＞0.5のときの増加よりも常に小さい。上記中(1)はほぼ解決できたが，(2)は未解決であった。

我々は解離基間間隔が不均一な1次元格子模型を用いて，近傍にある2個の解離基 (i, j) 間の解離の確率の相関 P (i, j) は最近接で負，次は正と交互に変化することを少し離れた解離基間相互作用を表す電位項に取入れた。更に解離基近傍の誘電率が α と共に減少することを考慮すれば(2)はかなり定量的に説明できることが判った。

また有限長の不均一間隔をもつ1次元格子模型を用いて解離過程を純統計的に取扱い，計算機シミュレーションにより解離に伴う自由エネルギーを求めることにより，pK 値の変化が(2)のようになることを確かめた。

生体内における水構造と ^{1}H-NMR 情報

恵良聖一，桑田一夫，藤井裕子，曽我美勝（岐阜大・医・第２生理）
加藤一夫（岐阜大・医・病理）
岩間　亨（岐阜大・医・脳外）
植木俊介（岐阜大・医・反射研）
天野　肇（岐阜大・医・眼科）
亘　　弘（生理研・分子生理）

生体内の水構造を解析する基礎として，ウシ血漿アルブミン (BPA) のゾル（ BMA 溶液）・ゲル（ BPA*ゲル）変換，合成高分子ゲル（ソフトコンタクトレンズ， SCLs ）及びマウス水晶体（２，４，８週齢）を用いて，主に蛋白質又は鎖状高分子プロトンより水分子への交差緩和時間（ T_{IS}）測定により，各々の水構造を比較研究した。

蛋白質の溶液→ゲル変換により， BPA*ゲル内の水の T_{IS}は，蛋白濃度10％以上で，特に著しく減少し， BPA*分子内の T_{IS}値よりも短くなった。このことは， BPA*ゲル中では結合水量が増加し，蛋白質から水へと速やかに交差緩和することを示唆している。

また， SCLs 及びマウス水晶体を f_2 照射 (7.13 又は －4.00 ppm, 69 Hz) して求めた1/ T_{IS}値は，乾燥重量がそれぞれ26.8％，25％以下では～０，それ以上では増加した。このことは，乾燥重量がそれぞれ26.8％，25％近傍で SCLs 及びマウス水晶体内の水構造が変化することを示唆している。

プロトン NMR によるラット水晶体水とタンパク質相互作用の解析

西川弘恭（明治鍼灸大・生理）
貝塚由利子，森　和彦，赤木好男，照林宏文，糸井素一（京都府立医科大・眼科）
森山祥彦（京都府立医科大・化学）

規則的に配列した水晶体タンパク質と水を主とするラット水晶体について，前研究会では水晶体水の NMR 緩和時間 (T_1 と T_2) を検討し報告した。今回種々の週令の摘出された水晶体を試料とし水晶体タンパク質のプロトン NMR スペクトルを得，検討を加えた。試料として摘出されたラット水晶体（ wistar 系，オス，４－10週令）をメジウム中に置いてプロトン NMR 測定を行った。 NMR 測定は 300 MHz, 重水ロック， 1331water suppression パルス系列で行い，化学シフトの外部基準として DSS を用いた。

４週令ラット水晶体のプロトン NMR スペクトルにメジウムと水晶体に含まれる低分子（ HEPES,

乳酸）の共鳴線以外に水晶体タンパク質の脂肪族アミノ酸側鎖プロトン由来の共鳴線が4 ppmより高磁場側に得られた。週令の異なる水晶体では加令に伴う水晶体タンパク質のアミノ酸配列および高次構造の変化に由来すると考えられるスペクトルパターンの差異が認められた。

^{1}H-NMR 法による骨格筋細胞内の水の構造解析

山田武範，杉　晴夫（帝京大・医・生理）

ウシガエル骨格筋より筋束を作り，筋細胞内の水プロトンのNMRスペクトルおよび緩和過程を核磁気共鳴装置（JEOL GX400, プロトン共鳴周波数：400MHz；室温）を使って測定した。

筋束を高張，または低張のリンゲル液に浸したところ，横緩和時間が著しく変化した。また筋肉を引き延ばして，アクチンフィラメントとミオシンフィラメントの重なりがほとんどない状態にした場合，さらに，筋束をサポニンで処理し筋細胞膜に穴を開けて，硬直結合を作らせた場合にも横緩和時間に変化が見られた。これらの結果は，筋肉内でアクチンおよびミオシンフィラメントが作る格子の生理的な状態変化によって，筋肉細胞内の水の構造が変化することを示している。

一方，筋線維を磁場に対して色々と方向を変えた時に，筋細胞内の水プロトンのNMRスペクトルがどのように変化するかを調べた所，化学シフトおよび1/2線幅が筋線維と磁場のなす角度に依存して変化することがわかった。これは，水プロトンが筋細胞内で方向性を持った配列をしている，すなわち筋線維内に方向性をもって存在するフィラメントに沿って水が配列した構造を取っている可能性を示している。

筋肉内水分子の拡散係数の NMR による測定

吉崎和男，横井則彦，森本武利（京府医大・第1生理）

パルス磁場勾配NMRを用いて筋肉中における水分子の拡散の筋の線維軸に対する方向依存性について検討した。

試料はウシガエルの大腿二頭筋，および筋線維の軸方向依存性については指間筋を用いた。筋肉を単離したのち，10 mm径のNMR管につめ室温（24℃）で測定した。装置は日本電子製PFT−100 NMR (^{1}Hの共鳴周波数：100 MHz) およびFSE−60E NMR (60MHz) を用いた。それぞれのパルス磁場勾配の強度は39 gauss/cmおよび14 gauss/cmであり，蒸留水あるいはトリス・リンゲル溶液の水の拡散係数を 2.25×10^{-5} cm^2/sとして計算した。

筋肉中の水分子の拡散係数は，測定時間（拡散時間）が 10, 20, 40 ms では一定であり，水溶液中の約0.6倍であった。さらに筋肉中の水分子の拡散は周囲の筋線維の方向に依存し，水分子が筋線維軸に直角に拡散する場合は平行に拡散する場合に比べて拡散速度は約0.9倍と小さい傾向が認められた。

Heinz 小体形成赤血球の変形能とプロトン緩和時間

上坂伸宏，飯野正昭，長谷川節雄（日本医大・第1生理）
山田武範（帝京大・医・第2生理）

赤血球の変形能は循環動態を左右する重要な因子の一つであり，その低下は，脳梗塞，心筋梗塞など重篤な虚血性循環障害を惹起する。又，赤血球の老化，崩壊過程の引き金として活性酸素種による過酸化反応の関与が注目されている。赤血球変形能の規定因子として，赤血球の幾何学的因子，細胞内部粘度，膜の粘弾性等があるが，それら規定因子の巨視的現象に対する微視的・分子論的根拠は脆弱である。今回，赤血球老化のモデルともなり得る Heinz 小体形成赤血球（Phenylhydrazine 処理赤血球及び各種赤血球 Ghost, 不安定 Hb 症患者赤血球）のレオロジー特性を調べ，変形能の低下を明確に見出し，変形能規定因子に関する巨視的にはもとより微視的にも新しい知見を得た。特に，細胞内部粘度の効果として漠然と説明されていた現象が，Hb の状態変化及び Hb と膜との相互作用に依存し，おそらくは，その分子論的機構として水の構造変化が重要な役割を担うであろうことを報告する。

高 K^+ を含む等張溶液中の HeLa 細胞容積調節機構

池原敏孝，高橋　章，山口久雄，細川敬子，宮本博司（徳島大・医・第1生理）

ouabain を含み，異なる Na^+，K^+ 組成（$Na^+ + K^+ = 150$mM, 一定）の溶液で HeLa 細胞を incubate すると種々に異なる $Na^+ + K^+$ 量と水分量をもつ細胞が得られた。この2成分間には直線関係がみられることより，細胞内 $Na^+ + K^+$ 量は細胞内水分量の指標になることがわかった。これを利用し，以下の等張溶液中での細胞容積調節機構について調べた。100 μM ouabain を含み，Na^+ 濃度が 70 mM, K^+ が 80 mM の高 K^+ 液で細胞を incubate すると，液交換直後より細胞内 K^+ 量の急激な増加を生じ，その後減少に転じ (regulatory volume decrease), 約60分で一定値に達した。この最初の K^+ 量の増加は，外液 Cl^- の gluconate 置換によって阻害され，後半の減少は，10 μM BAPTA, 0.5 mM DIDS, 1 mM quinine 添加および Cl^- の NO_3^- 置換により阻害され

た。すなわちこれらの細胞内イオンおよび水分量の調節機構にはK^+とCl^-がcoupleし，特に後半の減少機構にはCa^{2+}依存性K^+ channelとCl^-channelが関与することが示唆される。

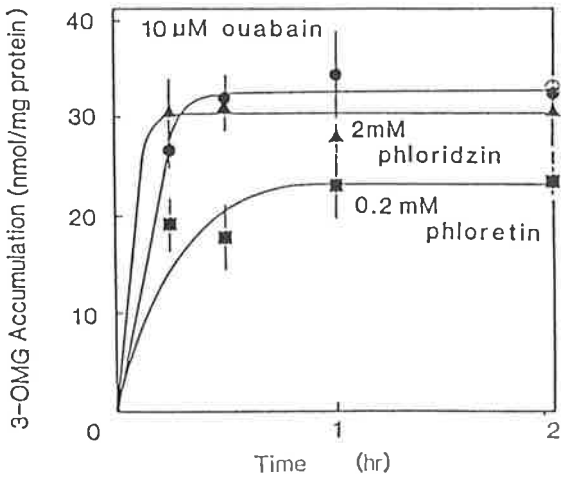


Fig. 1 Effects of phloretin and phloridzin on 3-OMG accu mulation in HeLa cells as functions of incubation time.
●; control, ○; ouabain-free

3-OMG Accumulation (nmol/mg protein)

分泌時細胞容積変化と細胞間連絡

中張隆司，今井雄介（大阪医大・第1生理）
佐々木康人，柴　芳樹，菅野義信（広島大・歯・口腔生理）
村上政隆（生理研）

唾液腺細胞はコリナージックな刺激により，大量の水電解質の分泌を起こす。このとき細胞間連絡が抑制されるが，機構の詳細は明かでない。分離浮遊腺房系において光顕レベルで細胞容積の変化とgap-junctionの連絡を定量化し，分泌制御と細胞間連絡の関連を追跡した。静止腺では，注入後2分でLucifer Yellowは周囲細胞に拡散した。acetylcholineを投与すると，dyeは注入細胞に限局し細胞間連絡の減少を示した。acetylcholineの濃度を変え細胞間連絡を測定すると，acetylcholine濃度増加にともない細胞間連絡は減少し，10^{-4} Mで最小になった。細胞容積はacetylcholine濃度依存性に減少した。低濃度acetylcholineでは細胞容積は投与中，縮小したまま同じ容積を保ったが，高濃度では投与中にもかかわらず，細胞容積が増加し，戻っていった。

高濃度 acetylcholine 投与中に Na などの溶質が細胞外に出られず，蓄積したために細胞内に浸透的に流入した水分も分泌されず蓄積したと考察できる。著しく分泌が阻害され，細胞容積の拡大が起こる 10^{-4} M acetylcholine は細胞間連絡を最小にまで減少させた。このことは，大量の電解質および水が移動する場合，個々の細胞として機能することを細胞群が選択していることを示している。

腺細胞の水含量調節機構回路モデルシミュレーションによる検討

今井雄介，中張隆司，吉田秀世，宮本　学，相馬義郎（大阪医大・第1生理）

細胞膜を介して静水圧差も実効的な浸透圧差もない腺細胞はどうして一定の容積を維持しているか？　今回，ラット顎下腺を高張の Sucrose Ringer 液で潅流し，細胞容積を変化させる実験を行った。高張液で急速に細胞は収縮するがすぐ安定な容積を維持し，対照液に戻すと元の容積に回復する。なお同条件下の細胞収縮時に細胞内イオン量は変化しないことを村上らは観察している。細胞内の実効浸透活性をもった溶質量と，やはり浸透活性をもった細胞内水分量によって決る。イオンにたいして input と output に各様の機構を持っていて定常的なイオンの in-output balance で溶質量が決り，結果として一定の容積を維持している。イオン透過係数は収縮時に減少しているものと推論すると一定外液条件下で一定の細胞容積を持つシミュレーションが回路網モデルより可能となる。さらに腺細胞は自己容積感受装置をもち，イオン拡散の透過性を調節することによって微妙な“自らの”容積定常状態が保つものと考察された。

『細胞膜輸送活性と細胞の代謝』

1989年12月15日～16日

代表者　北里　宏（滋賀医大・第２生理）

世話人　山岸俊一（生理研・生体膜）

1．膵β細胞におけるピルビン酸，フェニルピルビン酸の作用

北里　宏，梅村典靖（滋賀医大・第２生理）

2．プリナージック刺激による肝細胞の「Ca^{2+}」$_i$変動と糖新生

柏倉　正，小池正彦，竹口紀晃（富山医薬大・薬）

3．小腸刷子縁膜からのアラニン輸送担体の単離と分子生理学

中西　真（自治医大・第２生化）

平田　肇（自治医大・第１生化）

4．Na^+，K^+-ATPaseのアセブリンおよび輸送過程におけるβ－サブユニットの役割

大森浩一郎，田代　裕（関西医大・第１生理）

5．シュワン細胞による軸索外表面Kイオン濃度の調節

久木田文男，山岸俊一（生理研・生体膜）

6．OK細胞Kチャネルの調節機構

少作隆子（大阪医大・第２生理）

7．低張液ショックによるイオンチャネルの活性化（腎近位尿細管）

河原克雅（東大・医・第２生理）

8．細胞容積調節機構と小胞膜融合

岡田泰伸，挾間章博，橋本　晃（京大・医・第２生理）

9．細胞外浸透圧変化で細胞内K, Naは変化するのか？　―NMRによる細胞内K, Naの測定―

村上政隆，瀬尾芳輝，亘　　弘（生理研・超微小）

中張隆司（大阪医大・第１生理）

10．[Ca^{2+}]$_i$振動と細胞膜輸送活性

菅野富夫（北大・獣医・生理）

11．分泌細胞での膜容量増加反応の意義

丸山芳夫（自治医大・第２生理）

12．近位尿細管S_3セグメント基底側膜におけるクロールイオン輸送機序

根東義明，五十嵐裕，多田啓也（東北大・医・小児科）

Frömter, E.（ゲーテ大・医・生理）

13．接合尿細管の機能

吉富宏治，八十嶋弘一，今井　正（自治医大・薬理学）

14. 尿細管イオン輸送に対するカテコラミンの作用機構

藤本　守他（大阪医大・第２生理）

15. 眼房水産成と毛様体上皮のイオン輸送

斎藤禎隆（東北大・医・第１生理）

16. サル単離汗腺分泌細胞の分泌刺激物質による細胞容積変化

鈴木裕一（山形大・医・第２生理）

佐藤賢三（アイオワ大・皮膚科）

17. 腺細胞容積調節機構の仮説　―細胞内イオン量の調節機構―

今井雄介，中張隆司，吉田秀世，宮本　学，相馬義郎（大阪医大・第１生理）

研究会参加者

菅野富夫（北大・獣・生理），鈴木裕一（山形大・医・第２生理），斎藤禎隆（東北大・医・第１生理），根東義明（東北大・医・小児科），丸山芳夫，（自治医大・第２生理），平田　肇（自治医大・第１生化），中西　真（自治医大・第２生化），吉富宏治，八十嶋弘一（自治医大・薬理），河原克雅（東大・医・第２生理），星　　猛（静岡県大・食品栄養科学），柏倉　正，小池正彦（富山医薬大・薬），山岸俊一，久木田文夫，古家喜四夫，筒井泉雄（生理研・生体膜），村上政隆，瀬尾芳輝（生理研・超微小），北里　宏，尾松万里子，梅村典靖（滋賀医大・第２生理），岡田泰伸（京大・医・第２生理），今井雄介，吉田秀世，相馬義郎，中張隆司（大阪医大・第１生理），藤本　守，小寺邦彦，窪田隆裕，萩原暢子，少作隆子，長野文昭，久保川学，山口　淳，米原　亨，森　禎章（大阪医大・第２生理），田代　裕，大森浩一郎（関西医大・第１生理）

研究会の概要

近年イオンチャネル活性と細胞の代謝状態との関係が少しずつ明らかとなり，細胞の諸機能とイオンの流れとの相互関係を代謝の面から理解することが可能となりつつある。本研究会においては昨年に引続いて神経線維，内分泌細胞から各種上皮細胞におよぶ広範な研究が発表された。演題数の増加と共にその内容は更に充実したものとなり，自由に議事を進行した為，熱心な討論が夜半までくりひろげられた。特に，80年代を締めくくる意味で，河原克雅氏に「1980年代の明るい10大ニュースと90年代の生理学」という話題のもと打ちとけた雰囲気の中で90年代の展望を語って頂き，非常に好評であった。生理研ならではのこの研究会が細胞生理学の核として確実に成長して来たという強い印象を与えるものであった。

膵β細胞におけるピルビン酸，フェニルピルビン酸の作用

北里　宏，梅村典靖（滋賀医大・第2生理）

血漿中の glucose 濃度が高くなると，膵β細胞は insulin を放出する。一方，細胞外液の glucose 濃度を高くすると膵β細胞は脱分極し，spike を発生する。この電気的活動と insulin 放出との間には並行関係があることは広く認められている。glucose 投与によって脱分極が起こる際には K^+ conductance の低下が認められる。K^+ conductance のこのような低下は細胞外 glucose 濃度が高くなり，glucose 代謝が亢進し，細胞内 ATP 濃度上昇の結果 ATP-sensitive K^+ channel が閉じることによるという見解に研究者の意見はほぼ一致している。phenylpyruvate はそれ自体代謝されない物質であるにも拘らず，これを細胞外から作用させると glucose を与えた場合と同様に insulin の放出が起こることから，細胞内 ATP 濃度の上昇による K^+ conductance の低下を介する機構の他に，insulin の放出を来たす機構が存在するのではないかと考えられる。この点を明らかにする為に行ったものがこの研究である。

phenypyruvate 6mM を 2.8mM glucose を含む Krebs-Ringer 液に加えたところ，β細胞は脱分極し，その脱分極の上に多数の spike の発生が認められた。これに対して，pyruvate 6mM を 2.8mM glucose を含む Krebs-Ringer 液に加えても脱分極は認められなかった。しかし，pyruvate の濃度を 30mM にすると脱分極が認められた。次に，2.8mM glucose を 6mM phenylpyruvate で置換すると，細胞外液には glucose が存在しないにも拘らず，脱分極が起こり，spike の発生が認められた。phenylpyruvate は insulin 放出を惹き起こすが pyruvate は insulin 放出を起こさないこと，及び phenylpyruvate は脱分極を起こさせるが pyruvate は膜電位を殆ど変化させないことを考え合わせると，phenylpyruvate の作用は glucose の insulin 放出促進機構と同様に膜電位変化を介して現れると考えられる。細胞外液中の phenylpyruvate は細胞膜の脂溶性部分を貫いて細胞内に入り，phenyl 基を離して pyruvate となり，これが代謝されて細胞内 ATP 濃度が上昇し，その結果 K^+ conductance が低下し，脱分極が起こるのであろう。

プリナージック刺激による肝細胞の［Ca^{2+}］$_i$変動と糖新生

柏倉　正，小池正彦，竹口紀晃（富山医薬大・薬）

遊離肝細胞の懸濁系にて，プリナージック刺激下における細胞内［Ca^{2+}］$_i$変動と（Fura 2 プローブによる），グルタミンからの糖新生機能に対する刺激効果を測定した。

〔結果・考察〕

1） ATP, ADP, GTP の刺激で，細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度は一過性に上昇し，引き続いて基底レベ

ルより高い持続性の上昇応答を示した。最大刺激能力は，ATP, ADP, GTP＝vasopressin ＞ phenylephrine の順であった。このとき，AMP, adenosine は，これらの応答を引き起こさなかった。

2）いろいろな阻害剤を用いた実験から，一過性のピークは細胞内 Ca^{2+} ストアに由来し，持続性の上昇は，細胞外 Ca^{2+} に依存すると考えられた。また，Ca^{2+} 流入には，La^{3+} sensitive Ca^{2+} channel の関与が示唆された。cAMP による Ca^{2+} 動員は，プリナージック刺激や α，アゴニストによる機構とは異なると考えられた。

3）P_{2p} プリナージック刺激によって，グルタミンからのグルコースの糖新生機能は大きく増強された。これらの合成機能の増大は，アゴニストによる細胞内 Ca^{2+} プールからの動員によってトリガーされる成分と，これを持続させるために，細胞外 Ca^{2+} の流入によって引き起こされる成分とがあると考えられた。さらにこれらの Ca^{2+} 動員は，ミトコンドリア内の redox state をより還元型に移行させ，グルタミンからのグルコース新生に有利に働くと考えられた。

小腸刷子縁膜からのアラニン輸送担体の単離と分子生理学

中西　真，平田　肇（自治医大・生化）

哺乳動物においてアミノ酸を含む栄養素の吸収は生命を維持するための必須の現象である。栄養素吸収の主な器官である小腸には種々のアミノ酸に対する輸送系が存在することが知られており，刷子縁膜小胞を用いた研究からそれらの輸送体の多くは細胞内外の Na^{+} の電気化学的ポテンシャルを駆動力として2次性能動輸送を行っていることが明らかになっている。しかしながらこの輸送系の膜タンパク質は可溶化に対して不安定であり，再構成及び精製が困難なことから輸送の分子機構についてはほとんど解明されていない。我々はこれらのアミノ酸に対する2次性能動輸送体を精製し，その分子機構を解析することを目的として研究を進めてきた。今回は，アラニンを指標として中性アミノ酸に対する輸送タンパク質の可溶化・再構成と部分精製を行い，その性質について検討を行った。

（実験方法） 小腸刷子縁膜小胞は Ca^{2+} 沈澱法により単離した。単離した刷子縁膜を 0.6M NaI で処理して，その後に 1.0% CHAPS, 4M Urea を用いて処理し，その不溶性画分のタンパク質を回収した。不溶性画分のタンパク質をさらに 0.25% $C_{12}E_8$ で可溶化し，超遠心後の上清画分から Bio-beads SM-2 を用いて $C_{12}E_8$ を除去し，大豆リン脂質とともに凍結・融解・超音波処理によりプロテオリポソームに再構成した。

（実験結果及び考察） (1)小腸刷子縁膜を CHAPS と Urea を用いて処理するとアラニン輸送活性はほぼ完全に不溶性画分に回収された。さらにこの不溶性画分を $C_{12}E_8$ の濃度を変化させて可溶化し，再構成後のアラニンの取り込み活性を調べたところ 0.25% の濃度で可溶化した時に最

大の活性を示し，それ以上の濃度では界面活性剤による失活と思われる活性の低下が認められた。(2)可溶化・再構成後のプロテオリポソームはリポソーム内外の Na^+ 濃度勾配に依存してアラニンの輸送活性を示し，この活性はモネンシンでほぼ完全に阻害された。(3)可溶化上清についてDEAE-TOYOPEARLカラムクロマトグラフィーを行ったところ，アラニン輸送活性は20－90mM NaCl画分に回収され，比活性は145pmol/mg protein/secで刷子縁膜小胞と比較して63倍に上昇した。(4)部分精製した輸送タンパク質はGly, Proを除く他の中性アミノ酸に対しても高い輸送活性を示し，さらにこれらのアミノ酸はアラニンの輸送を拮抗的に阻害した。(5)部分精製した標品を用いてアラニンの輸送活性に対する速度論的解析を行ったところ2つのみかけのkmを示した（km_1＝0.34mM, km_2＝31.9mM）。以上の結果から非イオン性界面活性剤である $C_{12}E_8$ により中性アミノ酸に対する輸送タンパク質が小腸刷子縁膜から比較的安定に高い回収率で可溶化されることが明らかになった。これまでの刷子縁膜小胞を用いた研究ではその不安定性や他のアミノ酸輸送系が混在するために正確な基質特異性など詳細な輸送機構の解析には限界がある。この点からも各輸送体の精製及び再構成が重要であり，現在この中性アミノ酸輸送体のさらなる精製を検討中である。

Na, K-ATPaseのアセンブリおよび輸送過程におけるβ subunitの役割

大森浩一郎，田代　裕（関西医大・第1生理）

Na, K-ATPase α subunitはcatalytic subunitとして機能しているが，β subunitはまだその機能について不明の点が多い。しかしながら最近，β subunitの働きを示唆するいくつかの結果が報告され，Na, K-ATPaseの細胞膜への輸送およびその活性発現にβ subunitが重要な役割を果たしている可能性が示されている。

我々はNa, K-ATPaseのアセンブリと細胞膜への輸送におけるβ subunitの役割を詳細に明らかにする目的で，β subunitのN末側半分（膜貫通領域を持ち，3個の糖鎖結合領域を欠く）をHeLa細胞において発現させ，新たに発現された蛋白質（β_N）と宿主HeLa Na, K-ATPaseとのアセンブルの可否，またβ_Nの発現によって宿主Na, K-ATPaseがどのような影響をうけるかを検討した。

ラット脳のβ subunit cDNAより得たN末側半分に相当するcDNA断片をpSV2TKneoを用いてHeLa細胞にトランスフェクトし，G418でスクリーニングを行い，β subunitの断片蛋白質（β_N）を発現しているHeLa細胞のクローンを得た。このクローンについて[^{35}S]メチオニンを用いてパルス・チェイス実験を行い，次いで抗Na, K-ATPase抗体，抗α，抗β subunit特異抗体などを使用してラベルされたNa, K-ATPaseとβ_Nを免疫沈降させ，宿主HeLa細胞のNa, K-ATPase α，β subunitとβ_Nの生合成，アセンブリ，輸送を解析した。

その結果，β_Nはαおよびβsubunitとアセンブリできず，また細胞膜にも輸送されないことが分かった。β_Nの細胞内局在を蔗糖密度勾配遠心法で調べたところERに局在していることが判明した。β_Nを発現している細胞と発現していない細胞間で宿主αとβのアセンブリの程度を比較すると，β_Nを発現している細胞ではコントロールと比べてα，βのアセンブリが約半分程抑えられていた。β_Nは宿主Na, K-ATPaseと最終的に複合体を形成することはできないが，ERに局在し，αあるいはβと何らかの相互作用をしてアセンブリを阻害しているものと思われた。β_Nのαないしβに対する作用を解明することによってα，βsubunitのアセンブリ機構を詳細に明らかにすることができると考える。

文献

1．Omori, K. *et al.* : Characterization and expression of a cDNA clone for the beta subunit of rat brain Na^+, K^+ -ATPase. (1988) Prog. Clin. Biol. Res., 268B, 127－134.

2．Omori, K. *et al.* : Expression, localization, and function of a cDNA fragment for the β subunit of rat Na, K-ATPase in HeLa cells. (in preparation).

シュワン細胞による軸索外表面Kイオン濃度の調節

久木田文夫，山岸俊一（生理研）

無髄神経線維では軸索の周りをシュワン細胞が取り囲んでいるが，その機能は明かでない。近年脳のグリア細胞との類推から様々な機能が推定されているが，生体の中にある状態に近い系での実験的な研究は始まったばかりである。本研究では実験的に扱い易いイカ巨大軸索とその周りのシュワン細胞とからなる標本を用いて，シュワン細胞による軸索外表面Kイオン濃度の調節機構に焦点を当て実験を進めた。

実験方法は細胞内灌流したイカ巨大神経線維を用いた電気生理学的な方法であるが，下記の様な手続きで実験を進めた。1）シュワン細胞－軸索の間隙にKイオンを軸索膜のKチャネルを通じて細胞内から注入する，2）軸索外表面のKイオン濃度を軸索膜Kチャネルの平衡電位Ekを測定することにより求める（軸索の遅延整流性KチャネルをKイオン選択性電極として用いる），3）ステップ状に注入したKイオンによる軸索外表面Kイオン濃度の変化を測定する。本方法ではKイオン濃度の測定自体が軸索外表面Kイオン濃度を変化させるためKイオン濃度の継続的測定は出来ない。代わりに，Kイオンの注入時間を変えて3）の方法を繰り返して時間変化を求める。頻回刺激により派生する活動電位のスパイク列の後過分極の変化もEkの変化の指標となるが，注入するKイオン量を一定に出来ないなど正確な測定は出来ない。

シュワン細胞と軸索膜との間の間隙は通常数十nmで極めて狭く細胞外とは隣接するシュワン細胞の間の細い通路をとうして通じており，＋50mVの脱分極により外向きのK電流を10ms流し続けると軸索外表面のKイオン濃度は100mM程度まで上昇する。これはイカ巨大神経線維

において特に著しいKイオンの蓄積である。シュワン細胞－軸索膜の系をKイオンが流入する軸索膜，Kイオンが貯まる厚さΘの間隙，透過性Pをもつシュワン細胞層の細い通路からなる3隔室モデルで解析するとPとΘが求められる。このモデルから導出される微分方程式は抵抗と容量が直列につながった等価回路に一定電流を流した際の電圧の変化を表す微分方程式と同じで，容易に解析できる。

浸透圧勾配を細胞内とシュワン細胞層の外側である細胞外に与えると（シュワン細胞層の方が軸索膜に比して半透性が低いため）シュワン細胞－軸索膜間隙への水の流入と流失に差が生じる。この結果，外向きの浸透圧勾配を与えた場合（細胞外液の浸透圧が細胞内液の浸透圧より高い場合），シュワン細胞－軸索膜間隙が拡大してKイオンの蓄積は減少し，逆向きの浸透圧勾配を与えるとこの間隙が縮小してKイオンの蓄積は増大する。又，細胞外液のKイオン濃度を予め高濃度にすると以後のKイオンの蓄積は増大する。つまりKイオンを加えるとシュワン細胞－軸索膜間隙が狭くなるように見える。

現在までの所，軸索外表面のKイオン濃度の調節はシュワン細胞層の物理的拡散障壁の作用の変化（形態的な変化）に基づくと考えてよさそうだが，シュワン細胞の能動的な作用についての検討は薬理学研究とモデルの改善をも含め今後の課題となる。

OK細胞のKチャネルの調節機構

少作隆子（大阪医大・2生理）

序論

腎近位尿細管細胞の周囲側膜にはK^+コンダクタンスが存在し，これは種々の物質の再吸収に重要な役割を果たす。本研究の目的は，このK^+コンダクタンスがどの様な細胞内因子の調節を受けるかを調べることである。

オポッサム腎由来のOK細胞は，近位尿細管細胞に近い性質を示し，近位尿細管のモデルとして広く用いられている培養細胞である。我々はパッチ・クランプ法によりこのOK細胞の膜より数種類のイオンチャネルを見いだした。その内の1つである70 pS K^+チャネルは，生理的条件下での本細胞のK^+コンダクタンスの大半を担うと考えられた。今回は，この70pS K^+チャネルの細胞内pH，Mg^{2+}，ATP依存性について報告する。

結果

1） whole-cell clampにより得られた細胞膜全体のコンダクタンスは，growth phase期の細胞では小さく，monolayer期以降で増加した。また，膜のコンダクタンスの90％以上がK^+コンダクタンスであった。以下の実験結果は，monolayer以降の時期の細胞より得られたものである。

2）約80％のcell-attacted patchで，弱い内向き整流を示す70pS K^+チャネルが観察された。他

のイオンチャネルはごく稀にしか観察されないことより，この 70pS K^+チャネルが本細胞の K^+ コンダクタンスの大半を担うと考えられた。以下は，この K^+チャネルの性質について調べた結果である。

3） Mg^{2+} -free 液中で inside-out patch にするとチャネルの活性は長時間安定であったが，Mg^{2+} を含む液中ではチャネル活性は次第に低下 (run-down し，チャネルは ATP を加えることにより再び活性化された。分解されない ATP の類似物質である AMPPCP ではチャネルは活性化されなかった。

4） inside-out patch で細胞内 pH の影響を調べたところ，チャネルの開確率は著しい pH 依存性を示すことが分かった。チャネルは酸性側で抑制，アルカリ側で活性化され，その half-maximum activation は pH7.5 付近であった。酸性側 pH の抑制効果は，ATP 存在下では可逆的なのに対し，ATP 非存在下では部分的に不可逆的であった。

考察

以上の結果より，OK 細胞の 70pS K^+チャネルの活性が，細胞内 Mg^{2+}イオン，ATP および pH の影響を強く受けることが判明した。また，これらの因子によるチャネル調節のより詳しいメカニズムについては今後の課題である。

低張液ショックによるイオンチャネルの活性化（腎近位尿細管）

河原克雅（東大・医・第 2 生理）

ウサギ腎近位尿細管初代培養細胞を使い，低張液ショックによるイオンチャネルの活性化を whole-cell clamp 法で調べた。電極内液 (mM) : 145KCl, 1.2$MgC1_2$, 0.08EGTA, 10HEPES, 0.5ATP ; pH7.4. bath 液 (mM) : 140NaCl, 4.7KCl, 1.8$CaCl_2$, 1.2$MgCl_2$, 10HEPES ; pH7.4. 培養細胞（単層）を trypsin で単離し (single-cell), 2 時間静置後低張液ショック (3/4isotonic) により活性化するイオン電流を測定した。細胞内外液の Ca 濃度 (mM) は（電極液 /bath 液）1） 0Ca＋0.08EGTA/1.8 Ca, 2） 0Ca＋0.08EGTA/0Ca, 3） 0Ca＋5EGTA/0Ca であった。活性化した K 電流は（細胞内→外），1）36，2）9，3）3pA であった。Cl 電流の活性化の時間経過は K 電流より約 1 分遅かった。K/Cl チャネル電流はそれぞれ独立して活性化し，細胞内から細胞外へイオンが移動し局所的浸透圧勾配を形成し，細胞容積調節に貢献すると考えられる。

細胞容積調節機構と小胞膜融合

岡田泰伸，挟間章博，橋本　晃（京大・医・生理）

多くの細胞は異常浸透圧環境下におかれても元の体積近くへと復帰するところの容積調節能を持っている。またこの機能への多くのイオンチャネル系の関与が最近明らかにされはじめている。低張負荷下での小腸上皮細胞 (Intestine 407) の細胞膨張には，伸展感受性 Ca^{2+} 透過チャネルや，容積調節性 K^{+} 及び Cl^{-} チャネルの賦活化と，細胞内 Ca^{2+} 動員が伴われることを私達は既に明らかにしている。今回，Neher らが開発した位相感受性検出法を改良して膜電位変化が伴われる系へも適用可能とし，本細胞の浸透圧性膨張時における膜コンダクタンス・膜容量の同時測定を行った。その結果，この過程には容積調節性イオンチャネル賦活下による膜コンダクタンス増のみならず，表面積増大を示す膜容量増が観察された。細胞内 Ca^{2+} 除去，ATP 除去，コルヒチン添加又はサイトカラシン添加はこの容量増のみを抑制し，細胞内小胞膜の形質膜への融合が膜容量増の原因と考えられた。この生理的意義についても若干の検討を加えた。

細胞外浸透圧変化で細胞内 K, Na は変化するのか？
― NMR による細胞内 K, Na の測定―

村上政隆，瀬尾芳輝，亘　　弘（生理研）
中張隆司（大阪医大・１生理）

唾液腺細胞はコリナージックな刺激により，大量の水分泌を起こす。原唾液の分泌は等張ないし低張であり，浸透流によるとされるが，機構の詳細は明かでない。今回血管潅流唾液腺系をもちい，細胞膜の水分透過度を測定し，基底側膜より水分が流入するときの細胞内外の浸透圧差を推定した。また，細胞膜を介して浸透圧差をつけたとき細胞内 K, Na が変化するかどうかを NMR により測定した。

細胞膜の水分透過度は細胞膜を介して浸透圧差をつけ，細胞の縮小時の細胞容積変化速度と細胞容積の逆数をプロットし，その傾きよりもとめた。細胞容積はインピーダンス法により測定した。

50－150mM sucrose により，$0.9-1.9 * 10^{-6}$ l. atm^{-1}. sec^{-1}. $g\text{-}cell^{-1}$ の値を得た。これは 50mOsm の浸透圧差で 100 μl/g-min の浸透流を起こすことを意味する。すなわち，細胞膜の水分透過度が変化しなければ，分泌時に基底側膜より水分が浸透的に流入する場合は細胞内外に 50mOsm の浸透圧差が必要であると推定できる。

細胞膜を介して浸透圧差をつけたとき細胞内 K, Na が変化するかどうかを NMR により測定し

た。細胞内 K は inversion recovery 法，細胞内 Na は double quantum filter 法により測定した。150mM sucrose および 75mM NaCl で浸透圧差を付けたが，いずれも細胞内 K, Na 量に変化を与えなかった。このことは細胞膜があたかもセロファン膜のようにふるまい，輸送蛋白を活性化させない限り水のみを透過させ細胞内 K, Na 量を変化させないことを示している。

今回の実験により唾液腺において，水分の移動時に，容積調節性のイオンチャネルの活性化は大きな成分ではなく，基底側膜は半透膜として働くことが示された。

$[Ca^{2+}]_i$振動と細胞膜輸送活性

菅野富夫（北大・獣医・生理）

Fura-2 等の Ca^{2+}濃度感受性物質を細胞内に取り込ませ，細胞質 Ca^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]_i$）を連続的に測定する方法が開発されて以来，種々の細胞について刺激－反応連関に伴う Ca^{2+}振動が記録されるようになった。ニューロンや筋肉細胞等の興奮性細胞では，イオンチャンネルの開閉に関連する $[Ca^{2+}]_i$振動が記録されている。分泌細胞では，分泌反応とそれに伴う細胞膜物質輸送の変動に関連する $[Ca^{2+}]_i$振動が記録されるようになってきている。北大獣医生理学講座では，倒立顕微鏡に蛍光顕微鏡装置とノマルスキー装置とを装着し，$[Ca^{2+}]_i$の変化と細胞内微細構造との関連を解析できる新型顕微鏡を使用し，ラット摘出膵腺房標本の腺房細胞 $[Ca^{2+}]_i$振動を記録することができた。この振動は，生理的な低濃度のコレシストキニンで持続的に刺激した際に記録された。外液 Ca^{2+}を除くと，刺激直後の一過性 $[Ca^{2+}]_i$上昇のみが残り，それに引き続く振動性変動は消失した。画像解析を行った結果，$[Ca^{2+}]_i$振動が起こるのは，腺房細胞の血管側で粗面小胞体に富む領域であり，酵素原顆料に富む腺腔側では記録しにくいことが明らかにされた。更に $[Ca^{2+}]_i$が上昇した腺房細胞から隣接腺房細胞へは細胞間接合部を通って Ca^{2+}が拡散する証拠も得ている。

分泌細胞での膜容量増加反応の意義

丸山芳夫（自治医大）

細胞膜は電気等価的にコンダクタンスとキャパシタンス（膜容量）の並列回路としてあらわせる。前者は膜に存在するイオンチャネルの活動を，後者は細胞膜（脂質二重膜）表面積の増減を反映している。分泌細胞においては，膜容量の増加は開口放出現象（細胞膜と分泌顆粒膜の癒合－ホルモン，消化酵素などの高分子物質の分泌）を反映している。刺激から開口放出へ至る過程は

様々の情報変換レベル（受容体，細胞内メッセンジャー，分泌顆粒輸送，癒合等のレベル）において制御されており，未だ不明の点が多い。最近，パッチクランプ法による膜電流計測とロックインアンプを用いた位相検出法の組み合わせにより単一分泌細胞での微小膜容量変化の経時的計測が可能となり，分泌細胞におけるシグナル伝達機序の一端が明かになりつつある。パッチクランプ法の利点は細胞内を任意の人工溶液にて透析できることにあり，同法により種々の機能性物質を細胞内に投与し，膜容量の増減を指標として分泌シグナル伝達機構を再構成できるかもしれない。

膜容量の増加を招く細胞内機構には大別して，カルシウム依存性と非依存性のふたつの機構が知られている。前者の機構は膵外分泌腺での消化酵素，副腎髄質細胞でのカテコールアミンの分泌において，後者の機構は，肥満細胞によるヒスタミンの分泌応答にて代表される。膵外分泌細胞での細胞内カルシウム上昇機構は，受容体－Gp 蛋白－フォスフォリパーゼC（イノシトール三リン酸－Cキナーゼ系）のシグナル伝達経路により，副腎髄質細胞のそれは電位依存性カルシウムチャネルの活性化により説明される。一方，肥満細胞膜容量は細胞内 GTP γS の存在で著しく増加し，未だ同定されていないG－蛋白の関与が指摘できる。多様なシグナル伝達機構の相互作用までも考慮すると，開口放出に至るまでの過程（刺激－分泌連関）は複雑多様な様相を呈しており，現在のところ一括して論ずることはできない。今後の研究指針として，パッチクランプ法を用いた機能性タンパク質の細胞内投与実験は，分泌の制御を物質的に解明する上で意義あることと思われる。

近位尿細管 S_3 セグメント基底側膜におけるクロールイオン輸送機序

根東義明，五十嵐裕，多田啓也（東北大・医・小児科）
E. Frömter （ゲーテ大・医・生理）

近位尿細管 S_3 セグメント基底側膜における酸塩基輸送にはたすクロールイオン輸送の役割を明らかにするため，ウサギ腎単離尿細管を微小潅流し，イオン電極で，基底側細胞膜電位 (Vb)，細胞内クロールイオン活性（$[Cl^-]_i$）・pH (pHi) を測定した。生理的溶液中での Vb, $[Cl^-]_i$, pHi は各々 −67.0 ± 1.4mV, 29.9 ± 1.5mmol/l, 7.27 ± 0.03 だった。溶液側クロール濃度を下げると Vb は過分極し，$[Cl^-]_i$が低下し細胞内がアルカリ化した。全溶液からの Na^+除去は必ずしもこれらを抑制しなかった。1mMSITS はこれらを抑制し，単独でも細胞内をアルカリ化し $[Cl^-]_i$をやや低下させた。低クロール溶液中で溶液中重炭酸濃度を下げると，$[Cl^-]_i$が上昇，pHi が低下し SITS で抑制された。

以上のことより，S_3 セグメント基底側膜には，Na^+イオンと共役しない Cl^-/HCO_3^- 交換輸送系が存在し HCO_3^- の再吸収に関与することが示唆された。細胞内に取り込まれる Cl^- イオン

の細胞外への輸送機序については今回の研究では明らかとならなかった。

接合尿細管の機能

吉富宏治，八十島弘一，今井　正（自治医大・薬理）

接合尿細管は遠位部ネフロンセグメントの中にあって，NaCl と Ca^{2+}の再吸収，K^+の分泌，H^+/HCO_3^- の輸送などの重要な役割を果たしている。しかし，接合尿細管がどのようなイオン輸送機構を有しているのかこれまでのところわかっていない。従ってはっきりしたネフロンセグメントの境界を有しているウサギの接合尿細管を単離灌流し，微小電極法，イオンフラックス測定法，顕微蛍光測定法などを用いて，イオン輸送機序を解明した。

接合尿細管は2種類の異なる細胞群から成り立っている。即ち，接合尿細管細胞と間在細胞である。微小電極法を用いてそれぞれの細胞の持つ電気生理学的特徴を判別した。管腔側と血管側を同じ組成のリンゲル液で灌流すると，経上皮電位は -3.0 ± 0.4mV (n＝49) であり，経上皮抵抗は $26.9 \pm 2.5\ \Omega cm^2$であった。このことは接合尿細管が比較的 leaky epithelia に属することを示す。無作為に細胞穿刺を行なってみると，基底側膜電位の分布は2群に分かれ，接合尿細管細胞は -73.1 ± 1.1mV (n＝77) であり，間在細胞は -28.1 ± 1.8mV (n＝39) であった。また，基底側膜抵抗分画はそれぞれ 0.50 ± 0.05 (n＝22) と 0.04 ± 0.01 (n＝9) であった。基底側膜のイオンコンダクタンスは，接合尿細管細胞が大きな K^+コンダクタンスと小さな Cl^- コンダクタンスを有しているのに対し，間在細胞の基底側膜は大きな Cl^- コンダクタンスのみから成り立っていた。接合尿細管細胞の管腔側膜には Na^+コンダクタンスと K^+コンダクタンスが存在し，間在細胞の管腔側膜には明らかなイオンコンダクタンスは存在しなかった。

これまでサイアザイド系利尿薬はラットの微小灌流成績から遠位尿細管に作用すると言われていたが，正確な作用の局在部位は明らかではなかった。サイアザイド系利尿薬の一種である trichlormethiazide (TCM) を遠位曲尿細管 (DCT), 接合尿細管 (CNT), 皮質部集合尿細管 (CCD) の管腔内に投与し，アイソトープによる Na^+，Cl^- フラックスを測定したところ，CNT のみにおいて経上皮電位を変えずに Na^+，Cl^- フラックスを減少させた。このことはサイアザイド系利尿薬が電気的に中性なイオン輸送機構に作用し，その作用の局在は接合尿細管であることを示している (J Clin Invest 82 : 721－730, 1988)。同時に，接合尿細管のなかでも間在細胞ではなく，接合尿細管細胞においてのみ，基底側膜電位の過分極を引き起こすことから，接合尿細管細胞の管腔側膜に Na/Cl 共輸送担体が存在している。

副甲状腺ホルモン (PTH) は接合尿細管において adenylate cyclase 活性を増加させ，Ca^{2+}輸送を増加させることが知られている。Ca^{2+}輸送の詳細な機序を明らかにする為に，fura-2 を用いた顕微蛍光測定法により Ca^{2+}フラックスと細胞内 Ca^{2+}濃度の測定を行なった。接合尿細管の

血管側の Na^+ を除くか，ouabain を投与する事により，PTH により刺激される Ca^{2+} フラックスの増加は消失する。このことは Ca^{2+} の輸送に Na^+ の濃度勾配を利用した二次性能動輸送，即ち，Na^+/Ca^{2+} exchanger の存在が不可欠であることを示している。Na^+/Ca^{2+} exchanger の存在は，基底側の Na^+ 除去により細胞内の Ca^{2+} 濃度が大きく増加する事から確認された。PTH の単独投与により，細胞内の Ca^{2+} 濃度は飽和曲線に近い持続した増加を示すことから，PTH による Ca^{2+} フラックスの増加は，管腔側膜からの Ca^{2+} の流入が増加したものと推定される。しかし，管腔内を EGTA を添加した Ca^{2+} -free の溶液で灌流すると，持続性の Ca^{2+} の上昇が起こらない代りに，PTH により持続性の細胞内 Ca^{2+} の減少が見られることから，PTH には基底側膜からの Ca^{2+} の汲み出しにも作用している事が判明した。さらに興味深い事に，PTH の投与により管腔側膜電位が2相性の変化，即ち，管腔側膜は始めに脱分極し，続いて過分極を示す。最初の脱分極は，amiloride により阻害されない非選択的陽イオンチャンネルが開口する事によるもので，Na^+ と Ca^{2+} の細胞内への流入が起こる。細胞内 Ca^{2+} の増加のために2次的に amiloride で阻害可能な Na^+ チャンネルが閉じてしまう事により，管腔側膜の過分極が起こると考えられる。

尿細管イオン輸送に対するカテコラミンの作用機構

藤本　守，小寺邦彦，窪田隆裕，萩原暢子，久保川学，
少作隆子，長野文昭，山口　淳，森　禎章（大阪医大・第2生理）

序論

ネフロン近位部のイオン輸送ならびにその調節機構に関しては，特に最近腎神経（主に交感神経）の水・電解質に対する調節機構が存在すると指摘され，in vivo での研究が盛んになった。しかしその調節の部位や機構はあまりわかっていない。今回，われわれは，蛙腎近位尿細管イオン輸送に対するカテコラミンと細胞内セカンドメッセンジャーであるサイクリック AMP (cAMP)，Ca^{2+} の作用機構ならびに H^+ との相互関係を細胞レベルで調べた。

方法

食用蛙二重灌流腎を用い二連イオン微小電極で近位尿細管細胞と管腔内穿刺を行った。尿細管周囲側の灌流液としては，正常組成をもつ Ringer 液と pH や Na^+ の濃度を変えたリンゲル類似液とそれらの溶液に Norepinephrine (NE, 10^{-6}～10^{-7}M), Phenylephrine （PHE, 10^{-7}M, α_1アゴニスト，Dopamine (DA,10^{-6}M), dibutyryl cAMP (db-cAMP, 10^{-4}M) などを溶かした灌流液を投与した時の細胞膜電位 (E_M)，細胞内 pH （pH_i），Ca^{2+} （Ca_i），Na^+ （Na_i）と管腔内 pH （pH_{TF}）の経時的変化を測定した。さらに，腎組織片を用いた acridine orange 蛍光測光法で細胞内小胞による H^+ 輸送をも検討した。

結果

NE 投与によって Ca_i上昇と共に pH_{TF}が低下した。E_Mの変化（主として過分極）と同時に酸性の細胞内小胞数は減少し，Na_iの振動（初期減少，後に上昇を伴う），管腔液再吸収率の増加を認めた。PHE 投与では，Ca_iの初期下降後の上昇，Na_iの初期上昇・後回復と pH_{TF}の低下を認めた。DA または Db-cAMP 投与では，一過性の pH_{TF}上昇，pH_i上昇，E_Mの過分極と酸性の小胞増加，および Na_i減少に伴い管腔液再吸収率の軽度減少を示した。PCO_2 一定の下に周囲側液を酸性化すると pH_iの低下と共に Ca_iの低下，アルカリ化すると pH_iの上昇を認めた。管腔液から Na^+を除去すると，管腔液の酸性化が止まり，緩徐な pH_iの減少と E_Mの脱分極が生じたが，この時 db-cAMP や DA を投与すると，pH_iの上昇，pH_{TF}の回復が見られた。

考察

近位尿細管では，NEは α_2受容体を介し，細胞内の cAMP を下降させ，1）pH_i低下と尿酸性化，2）水・Na^+の再吸収促進，3）Ca_i上昇に伴い，酸性の小胞分泌による尿酸性化の促進を起こす。それに対し，DA_1その他の受容体を介し細胞内 cAMP 上昇をもたらす因子は，Na^+/H^+交換機構ならびに一過性に小胞分泌機構を弱め，尿酸性化を抑制すると共に水・Na^+再吸収を抑制することが想定される。

以上のように，カテコラミンや種々の液性因子は Ca_iや pH_iの変化を伴う。したがってその関連性を解明することが重要と思われる。

眼房水産生と毛様体上皮のイオン輸送

斎藤禎隆（東北大・医・第1生理）

毛様体上皮は Na^+，Cl^-, HCO_3^- を主成分とするほぼ等張性の眼房水を分泌する。分泌量の2/3ウアバインで抑制されることから，後房に面した無色素上皮細胞の基底側膜に存在する Na^+/K^+ポンプが主要なイオン輸送機序と考えられている。一方，液性，神経性伝達物質などが眼房水の dynamics に影響することが知られているが，Na^+/K^+ポンプの他にどの様なイオン輸送機序が関与しているか，詳かでない。

今回，私はラット毛様突起に於て，微小電極法による上皮細胞膜電位測定，パッチクランプ法による無色素上皮細胞基底側膜のイオンチャネルの観察，蛍光指示薬 BCECF および Fura 2 を用いた細胞内 pH および Ca^{2+}濃度の顕微測定を通じて，イオン輸送機序を検討して以下の諸点を明らかにした。

1．膜電位は −60〜70mV で極めて一定しており，色素細胞層および無色素細胞層全体が電気的に連結して等電位となっていると思われる。後房側への各種薬物の投与の効果は以下の通りである。アセチルコリン投与は一過性の過分極に続く脱分極を生じ，ノルアドレナリン，イソプ

ロテレノール，フォルスコリンはいずれも持続性の脱分極を生じた。K^+チャネル阻害剤キニンとBa^{2+}は大きな脱分極を生じたが，TEAは無効であった。Cl^-チャネル阻害剤9－ACは過分極を生じ，DIDSは過分極に続く脱分極の二相性の変化を，NPPBは脱分極を生じた。

2．無色素細胞の基底側膜に，脱分極及びCa^{2+}濃度上昇により開口確率の増大するコンダクタンス160pSのK^+チャネル，及びCa^{2+}に依存せず，脱分極で開口する300pS前後の大きなコンダクタンスを持つCl^-チャネルを見出した。

3．無色素細胞内Ca^{2+}濃度は静止時に50～100nMであり，後房側へのノルアドレナリン投与は何ら変化を与えなかったが，アセチルコリン投与は顕著なCa^{2+}濃度の増加を誘起した。

4．細胞内pHは7.0～7.4の範囲にあり，後房側へのCl^-/HCO_3^-交換輸送阻害剤DIDS投与や細胞外液Cl^-の除去は直ちにpH増加を，またNa^+/H^+交換輸送阻害剤アミロライドの投与または細胞外液Na^+の除去はpHの低下を生じた。

以上の結果，無色素上皮細胞にはNa^+/K^+ポンプの他にK^+チャネル，Cl^-チャネル，Na^+/H^+およびCl^-/HCO_3^-交換輸送系が存在することが明らかとなった。これらイオン輸送機序の活動により，Na^+，Cl^-とHCO_3^-に富んだ眼房水が産出されるものと思われる。細胞内Ca^{2+}やcAMPなどの細胞内情報伝達系によるイオン輸送の調節メカニズムの解明を今後の研究課題としたい。

サル単離汗腺分泌細胞の分泌刺激物質による細胞容積変化

鈴木裕一（山形大・医・第2生理）
佐藤賢三（アイオワ大・皮膚科）

単離したサル汗腺分泌細胞を，ノマルスキー顕微鏡下で観察しつつ，汗分泌をひきおこすムスカリン作動薬(Methacholine : MCh)を与えた所，細胞容積が約20％ほど低下することが見い出された。この容積低下は①細胞外液K濃度を増加すると抑制され，一方Cl濃度の低下では亢進すること，②Kチャネルブロッカーの Quinidine及びBa^{2+}により抑制されること，③Clチャネルブロッカーの Diphenylamine-2, 2-carboxylic aidである程度抑制されること，より，MChによりKチャネルとClチャネルが活性化され，KClが細胞外に放出されたためであると推論した。さらにこの容積低下はCaイオノフォアの Ionomycinによってもひきおこされることより，これらのチャネルはCaイオンによって活性化される可能性も示された。

腺細胞容積調節機構の仮説
—細胞内イオン量の調節機構—

今井雄介，中張隆司，吉田秀世，宮本　学，相馬義郎（大阪医大・1生理）

今回潅流顎下腺の細胞容積のインピーダンス測定および形態学的測定より，100mM Sucrose 付加 Ringer 液潅流が唾液腺細胞を約80％まで収縮させ，かつ定常的な一定容積状態が保たれるという実験結果と，また Na-K-2Cl 共輸送機構を抑制する薬物 Bumetanide は唾液腺細胞の容積を数％減少させるという結果を得た。一方村上は NMR による潅流顎下腺の細胞のイオン量測定実験より，同条件下の細胞収縮時に細胞内イオン量が変化しないことを明らかにした。これら事実と回路網モデルによるシミュレーションから腺細胞容積調節機構を検討した。

腺細胞は自己容積感受装置をもち，それが細胞膜イオン拡散の透過性を変えると仮定（透過性は収縮時下がり，膨大時には上がる）してシミュレーションを行うと，外液条件変化によっても細胞はほぼ一定のイオン量を維持し，容積変化が抑制された収縮実験にあうシミュレーション結果となる。細胞はイオンにたいして input と output に各種各様の機構を持っていて定常的なイオン量を維持し，結果としてある容積を維持する。これは容積調節機構というよりも細胞内のイオン総量を一定に保つ機構として役立っているものであって，二次的効果として容積変化を抑制する機構として働くものと理解される。

『生体系の機能と電解質―10年のあゆみと展望―』

1990年1月8日～9日
代表者　曽我美勝（岐阜大・医）
世話人　亘　　弘（生理研）

A．生体機能と電解質

筋収縮の分子的機構について

三井利夫（阪大・基礎工），大島広行（東理大・薬学）

B．ゆらぎと高次構造形成過程及びそのパターン

1．電解質溶液論的アスペクト

① イオン性高分子ラテックス一原子・分子の新しいモデル

伊藤研策，松岡秀樹，伊勢典夫（京大・工）

② 荷電高分子系のゆらぎの整流と機能の発生

今井宣久（名大・理）

③ 高分子ラテックス溶液における秩序形成のレーザー解析

曽我見郁夫（京産大・理）

④ コロイド粒子間の超長距離相互作用

吉野茂雄（名大・理）

2．フラクタル的アスペクト

⑤ フラクタル成長現象一般

宮島佐介（中部大・工）

⑥ DLAを中心としたフラクタル成長

本田勝也（名大・工）

⑦ バクテリアにおけるDLA成長

藤川　浩（都立衛生研）

C．生体分子の構造・機能と電解質

① 蛋白質中の金属イオンの結合サイト
（α-Lactalbumin-Lysozyme系について）

須貝新太郎（北大・理・高分子）

② 高分子電解質の電位差滴定の統計力学的解析

西尾卓広，南方　陽（浜松医大・物理）

③ 血漿アルブミン分子の構造転移と荷電

恵良聖一，桑田一夫，曽我美勝（岐阜大・医・第2生理）
亘　　弘（生理研）

④ イオン性高分子の溶液粘度

山中淳平（福井大・工）
松岡秀樹，北野博巳，伊勢典夫（京大・工）

⑤ 熱測定から見た蛋白質安定性と水素イオン濃度との関係

城所俊一，高橋卓也，黒田　裕（東大・理・物理）

⑥ Ca^{++}結合蛋白質について

飯田壮象（名大・理）

⑦ ポリペプチド鎖のβシート形成における静電相互作用

前田　悠（九大・理・化学）

D．生体膜系と水電解質輸送

① 脂溶性イオンによる微小小胞の膜電位測定
—脂溶性イオンの膜への吸着および透過—

加茂直樹，吉本　稔（北大・薬）
出村　誠（東京農工大・工）

② 非チャンネルたんぱく質・人工ペプチドのチャンネル挙動

高木雅行（阪大・教養）

③ 細胞膜の Na^+，K^+，Cl^- 共輸送と ATP

池原敏孝，高橋　章，山口久雄，細川敬子，宮本博司（徳島大・医・第1生理）

④ 生体イオン輸送系の回路網熱力学

今井雄介（大阪医大・第1生理）

⑤ エキサイトーシスにおける水の役割の諸相

寺川　進，樊　津紅（生理研・機能協関）
鈴木裕一（山形大・医・第2生理）
熊倉鴻之助，今泉美佳（上智大・生命科学研）
瀬川彰久（北里大・医・解剖）

⑥ ^{23}Na NMR と私

亘　　弘（生理研・超微小形態生理）

筋収縮の分子的機構について

三井利夫（阪大・基礎工）
大島広行（東理大・薬学）

最近，筋肉が収縮する際のアクチン分子とミオシン頭部の相互作用に関係した実験的研究が進み，Huxley らのいわゆる首振り説では説明し難いことが多くなってきた。我々は首振り説に代る考え方として，ミオシン頭部のブラウン運動の方向が ATP を使って制御され，その結果フィラメント滑りが起るという仮説を提案し，この仮説に基づく定式化と計算を行い，下記のような実験結果をよく説明することができた。

(1)荷重と収縮速度の関係，(2)特に負の張力に対しミオシンの運動速度は一定であるという最近の茶圓らの結果，(3)荷重とエネルギー放出率の関係，(4) ATP 1 分子の加水分解反応でミオシン頭部がアクチンフィラメント上を 60nm 以上走れるという柳田らの結果，(5)急速筋長変化に伴う張力の過渡的変化。

イオン性高分子ラテックス
——原子・分子の新しいモデル

伊藤研策，松岡秀樹，伊勢典夫（京大工）

単分散性のイオン性高分子ラテックスは直径が3000 Å 程度のとき，限外顕微鏡で観察できる。この分散液を十分に精製すると，粒子は格子様に配列する。この格子構造内における粒子の格子振動，格子欠陥の生成，およびその周辺における粒子の振動の異方性がビデオ録画，画像処理によって議論された。また相隣る格子面の振動に，フォノン類似の動きが認められた。一般にこの種の格子構造は限られた大きさを持つことが観察され，また時間とともに変動する。検討の結果，結晶化の初期段階では，小さな構造は消失し，大きな構造が生長するという Ostwald の熟成則が認められた。さらに粒子間距離の直接測定から動径分布関数を導き，これより構造因子 S (Q) を求めたが，S (Q) が通常“液体的”といわれる場合でも，実空間内に比較的小さい格子構造の存在することが確認された。また直接観察により二体衝突速度走数を求め，Smoluckowski 理論値より常に小さいことが判明した。

荷電高分子系のゆらぎの整流と機能の発生

今井宣久（名大・理）

荷電高分子溶液系の最も大きい特徴は，系に含まれる種々のゆらぎの機構，例えば，高分子のまわりの低分子イオンのゆらぎ，荷電鎖のゆらぎ，高分子の並進ゆらぎ，高分子集合体のゆらぎなどが緩和時間の長さに応じ段階別に区分される一方，しかもこれらが互いに静電的に couple していることである。この見地に立つ時，高分子イオン系の統計熱力学的性質の議論にあたっては，時間∞での完全平衡状態での高分子構造はあまり重要ではなく，各測定時間帯ごとに取り得る安定構造とその機能は何かを解明することが重要である。本講演では，上記静電ゆらぎのうち，荷電ゆらぎと高分子イオン集合体における高分子のゆらぎの二つについて，それらのゆらぎの非対称性により発生する整流機構の例をあげ新しい静電相互作用とその機能に関する理論を述べる。

高分子ラテックス溶液に於ける秩序形成のレーザー解析

曽我見郁夫・愿山　毅（京産大・理）

レーザー回折法は，高分子ラテックス溶液内部で進行する三次元的な秩序形成過程の研究に適している。特に，コッセル線回折法を用いると，ラテックス系の対称性の変化を詳細に観測し記録することが可能となる。十分に脱塩した高分子ラテックスの準希薄溶液を短冊型クオーツセルに入れて静置し，数百日にわたって後方コッセル回折像を撮影し分析した結果，溶液内の秩序形成が次のような過程を経て進行することが見いだされた：「二次元の六方稠密構造」→「ランダム層状構造」→「一方向に滑り面を持つ層状構造」→「積層不整」→「多周期積層構造」→「面心立方双晶」→「面心立方構造」→「体心立方双晶」→「体心立方構造」。この系列で矢印→は第二種の相転移を表し，濃度が約３％以上の溶液では秩序化は面心立方構造で終止する。尚，時間の許す範囲で，高電荷を持つ高分子間に作用する長距離引力に関する考察の結果を報告する。

コロイド粒子間の超長距離相互作用

吉野茂雄（名大・理・物理）

コロイド粒子間の相互作用は，どんなに遠くに及ぶ条件下でもせいぜいポテンシャルの第二極小が 20nm であり近距離力であると言うのが定説である。しかしながら筆者は，生命現象を研究

する過程でいくつかの疑問を持ち，それを明らかにするには学問体系の基礎の一つであるコロイドのこの定説（実験及び理論）に疑問を持つに至り実験をした。光学顕微鏡下でコロイド粒子の分布と運動を観測していると，コロイドは「対」を形成し動径分布関数に5μm程度と50μm程度の2つの山が存在する。これはDLVO理論から得られる値より2桁から3桁遠い超長距離相互作用である事を示している。そこで従来の理論が静的であるのに対して「動的電気多重極子説」を提唱した。従来の説によると，塩濃度が高いと遮蔽が十分になされ静電相互作用は無視されるが，新しい説から予測されるように実験結果は塩濃度が高くても流動場を与えると超長距離の「対」を形成した。

フラクタル成長現象一般

宮島佐介（中部大・工）

従来，樹木状の成長形態を示すものは多くあるが秩序のない構造のため，余り物理学の対象とならなかったが，マンデルブロの導入したフラクタル次元の概念により比較分類することが可能となり，学問の仲間入りが許される様になって来た。

拡散律速凝集，コロイド中の凝集，リアス式海岸の様相，雲の形，果ては宇宙の星の分布までも単にばら蒔かれているのではなく，その形態に内在する法則性をその発生の機構から理解できる様に，又は理解しようとする様になってきた。

一口でフラクタル次元とはコンパクトな面積，体積がその大きさの2倍，3倍に比例するのと同様に，ある乱れた形のある領域内の体積V_1と2倍の大きさの領域内の体積をV_2とするとき，$\log_2 (V_2/V_1)$で与えられ，一般に非整数である。例えばコロイド中の凝集については拡散律速だと1.75，反応律速だと1.98であり成長機構の違いが数値に現れていることは注目に値する。同様のことは多くの例で見られフラクタル次元が指数として役立つことを示している。この概念はマルチフクタルとさらに拡張され次の講演で述べられる。

フラクタル成長に関する多くの例はヴィーチェック著「フラクタル成長現象」朝倉書店に見られる。

DLA を中心としたフラクタル成長

本田勝也（名大・工）

拡散に支配された凝集 (Diffusion-Limited Aggregation ; 略称 DLA) 結晶成長を記述する最もシンプルなモデルとして計算機シミュレーション用に提案されたが，そのシンプルさのためかえって広い汎用性がある。DLA モデルは次のように定義される。はじめにメッシュに切った空間の原点に種を置いておき，十分遠方の任意に選ばれた点から放出された粒子は格子上をランダムに動き，種に隣接する格子点に到達すると静止し，種とあわせて 2 粒子が連なるクラスターに成長する。このプロセスを何千何万回続けるとフラクタルパターンが形成される。この成長プロセスは，拡散場におけるそれと等価であり，したがって DLA クラスターは種々の現象において見られる。講演では，電析における金属葉を始めとするいくつかの実例を示し，さらに，フラクタル次元の理論的な導出について説明した。

バクテリアにおける DLA 成長

藤川　浩（都立衛生研）

DLA に関する成長実験は，生命科学分野では今まで報告がなかった。今回私達は，ある種の細菌（枯草菌）が寒天平板上で DLA にしたがった成長をすることを見出した。栄養源としてペプトン (1g/l) のみを加えた寒天平板上に試験菌株を接種する。これを湿潤箱にいれ，35℃で培養すると，接種した原点から枝状のコロニーが生じ，3 週間後には直径約55㎜の DLA 状クラスターに成長する。このパターンはボックスカウンティング法によれば約1.71の次元を持つフラクタルである。成長中は DLA の特徴である遮蔽効果が認められる。寒天中のペプトン濃度を上げていくとコロニーの各枝が太くなり，ついには円形の菊花状になる。またある湿潤度を持つ平板上では，本菌は dense radial 状に成長する。さらに表面湿度が高い場合，薄い膜状に平板一面を覆う。
（共同研究者：松下　貢（中央大））

蛋白質中の金属イオンの結合サイト
（α-Lactalbumin-Lysozyme 系について）

須貝新太郎（北大・理・高分子）

蛋白質の形態の理論的予測は，蛋白質の設計上大切であり，電解質性も考察されているが，金属蛋白質の金属イオンの配位による安定化の理論的扱いは，困難な様である。α－ラクトアルブミン（α-LA）は1ケの Ca^{2+} の結合で天然状態が安定化し，構造のゆらぎも小になるが，中間状態は安定化しない。Ca^{2+} はまきもどり中間体の天然への活性化状で結合する。一方リゾチーム (LYZ) は金属イオンが結合しなくとも天然状態は充分安定であるが最近α-AL 様の Ca^{2+} 結合サイトを持ったLYZ が見出された。馬では Ca^{2+} を除くと中間状態を観測できる様になるが，α-LA ほど天然状態は安定化しない。鳩のLYZ はアポ状でも中間状態は観測出来ない。

これら相同蛋白質の Ca^{2+} 結合サイトとそれによる天然状態の微妙な安定化について述べる。

高分子電解質の電位差滴定の統計力学的解析

西尾卓広，南方　陽（浜松医大・物理）

高分子電解質の電位差滴定の新たな数値計算法を考案し，一次元格子状の高分子鎖モデルについて基本的な解離特性を調べた。

この計算法では，高分子鎖を N 個の解離基をもつ同一の格子状ユニットが多数連なっているものと見なした。静電相互作用は Debye-Huckel 型とし，ユニットにおけるすべての解離状態のエネルギーをもとに統計力学的解析を実行した結果，N を12以上とすれば，十分信頼できる解離曲線が得られることがわかった。

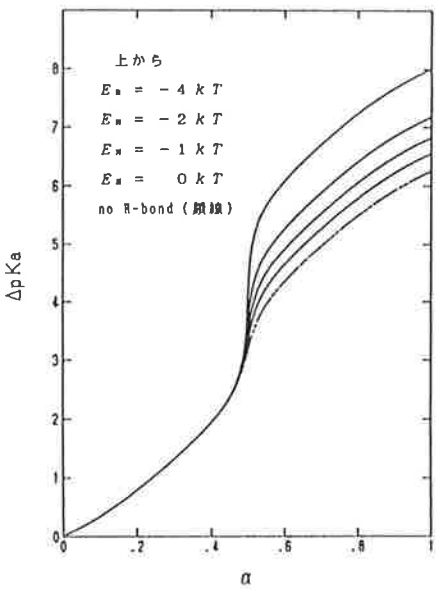
この方法の特徴は以下のような点にある。

1）計算が比較的簡単で，熱力学的諸量が求まる。

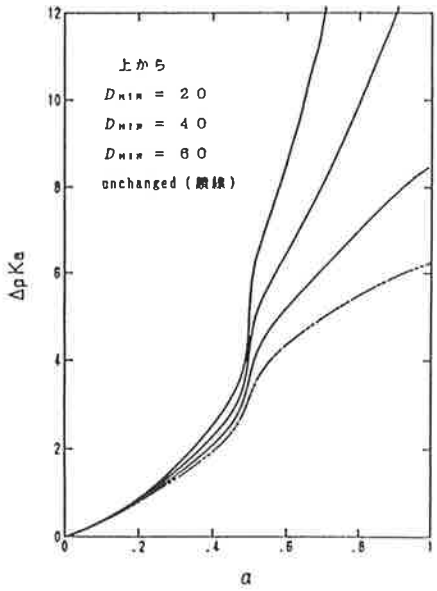
2）解離基間の長距離相互作用を十分考慮できる。

3）解離にともなうパラメータ変化の導入が容易である。

解離基の配置やイオン強度への依存性のみならず，水素結合の考慮（図A）や解離にともなう高分子鎖近傍の誘電率変化の導入（図B）によって，マレイン酸重合体等の高電荷密度の高分子の実験結果を説明する上で示唆にとむ結果が得られた。



図A　水素結合の効果



図B　誘電率変化

（ともに，1 : 3 Lattice, I=0.1, Do=78.55, t=25°C）

血漿アルブミン分子の構造転移と荷電

恵良聖一，桑田一夫，曽我美勝（岐阜大・医・生理）
亘　　弘（生理研）

ウシ血漿アルブミン (BPA) は，0.10M KCl 中，酸性 pH 域で N → F 転移 (pH4.5 → 3.8), 酸膨潤（F → E 転移，pH3.6 → 2.75）なる二段階構造転移を示す。

1．molten-globule state

分子容，二次構造含量は native state に近いが，側鎖や部分的な segment の動きはむしろ denatured state に近い状態を molten-globule state と呼ぶ，α-lactalbumin, cytschrome c などで見出されている。BPA と SDS との複合体 (ADm ; m は SDS と BPA のモル比，$0 \leq m \leq 12$) の N → F 転移において，AD_{10} や AD_{12} では固有粘度や二次構造変化は殆ど観察されなかったが，ζ 電位を補正した酸滴定データ，^{1}H-NMR による側鎖の交差緩和時間（T_{IS}），スピン・エコー・スペクトルなどの結果から，複合体の F 型は N 型に比し側鎖の可動性が増加し，AD_{10} や AD_{12} の F 型は molten-globule state であることを見出した。

2．BPAのF型ゲル（BPA*－ゲル）と溶液状態における水性状の差異

^{1}H-NMRを用いて，BPA*－ゲルと溶液状態（ウシメルカプトアルブミン，BMA）での水のT_1，T_2，T_{IS}を測定し，両者の水性状を比較研究した。T_1，T_2，T_{IS}値はいずれもBPA*－ゲルの方がBMA溶液よりも短く，その差はT_{IS}で顕著であった。これは，ゲル状態では蛋白質－水分子間相互作用が強く，結合水も多く，自由水との交換速度も速いことを示唆している。

イオン性高分子の溶液粘度

山中淳平（福井大）
松岡秀樹，北野博巳，伊勢典夫（京大・工）

ビニル系のイオン性高分子は，無限希釈において棒状に伸びた形態を取っているとする考えが一般的である。この推論の根拠となっているのは，極限粘度と分子量Mの関係式$[\eta] = NM^{\alpha}$における指数αが2であるというFuossらの報告である。この報告では，還元粘度$\eta sp/C$が高分子濃度Cの減少にともない単調に増加すると仮定して$[\eta]$が決定されているが，$\eta sp/C-C$のプロットには希薄領域にしばしば極大が観察され，Fuossらの推論には疑点が残る。我々は，ポリスチレンスルホン酸ナトリウム希薄水溶液の$\eta sp/C$が，$C < 10^{-3}$g/dlの濃度域において極大を取ることを確認し，$\eta sp/C$のせん断速度＝0および$C = 0$への外挿により，極限粘度を再評価した。得られた指数αは1.2－1.6であったが，これはイオン性高分子が棒状より若干収縮した状態にあることを示唆すると考えられる。さらに高分子ラテックス希薄分散系の粘度挙動に関する最近の知見についても発表を行った。

熱測定から見た蛋白質安定性と水素イオン濃度との関係

城所俊一（東大・理・物理）

熱測定法および解析法の進歩により，断熱型示差走査熱量計による測定が，現在，蛋白質の物理的安定性を実測する手法として，最も信頼のおける測定法の一つとなっている。本講演では，熱測定により調べた球状蛋白質の熱力学的な安定性について，最近明らかになってきた諸性質を紹介する。特に，熱転移前後の熱力学関数変化の，溶液中の水素イオン濃度依存性について述べる。これらの熱力学関数変化の温度依存性は，熱転移前後の熱容量変化により決められており，この熱容量変化は，主に，転移前後で蛋白質を構成しているアミノ酸側鎖が水和するための寄与によると考えられている。これに対し，熱力学関数変化の水素イオン濃度依存性は，転移前後で

の蛋白質分子の水素イオン結合数変化により決定される。即ち，高次構造をとることによりアミノ酸側鎖の pK が変化することが，水素イオン濃度依存性の原因であり，この pK 変化には，蛋白質内部での静電的な相互作用が影響していると考えられる。

カルシウム結合蛋白質について

飯田荘象（名大・理）

トロポニンＣとカルモジュリンはいわゆる“ＥＦ－ハンド構造”を持った Ca 結合蛋白質であり，一次構造上も三次構造上も似た構造をしている。両者とも解離基を非常に多量に含み，それらによる静電相互作用は蛋白質の構造を決める上からも又その生理機能にも重要な役割を果たす。トロポニンＣは Ca を結合するとそのヘリックス含量が50％程度増加することで知られているが，その主な原因は静電的相互作用に依っていることが分かった。トロポニンとカルモジュリンはほぼ同じ構造をしているが，Ca 結合の様子は異なっている。生理的機能を考えるとき，Ca 結合に際して協同性があるかどうかは重要な問題である。我々は Ca －電極を用いてトロポニンとその複合体及びカルモジュリンの Ca 結合を正確に測定し，Ca －結合部位間に協同性の存在することを示した。トロポニン複合体では Ca 結合の協同性が非常に強まり，その生理的機能との関連が注目される。

ポリペプチド鎖のβシート形成における静電相互作用

前田　悠（九大・理）

ポリペプチドβシートの安定性と形成速度に関する研究の現状をまとめた。安定性については，水素イオン滴定から残基当り －(300～400) cal/mol となっており，α－ヘリックスより約二倍安定である。この差は主にエントロピーに由来するらしい。βシート形成速度については，蛋白質の折れたたまりよりも遅いという実験データを巡って，長年混乱していた。しかし，我々の最近の研究から，ポリペプチド鎖の電荷密度がβシート形成速度に大きく影響することが明らかとなり，混乱がかなり解消された。例へば，５残基に１ケの正味荷電をもつ鎖は約0.1秒で折れたたまりβシートを形成するが，４残基に１ケとなると，約10^3秒かかる。βシートの研究では，分散状態が多様であるので，会合のないβシートを得る実験條件を設定することが重要である。静電相互作用は，安定性や形成速度ばかりでなく，この会合の制御にも重要な役割を果している。

脂溶性イオンによる微小小胞の膜電位測定
—脂溶性イオンの膜への吸着及び透過—

加茂直樹，吉本　稔（北大・薬）
出村　誠（東京農工大・工）

細胞膜機能の発現に膜電位が重要な役割をしている例が多く知られている。細胞の膜電位は微小電極を刺入して測定されるが，この方法は細胞内小器官や細菌のような微小細胞には適用できない。このような微小細胞の膜電位を推定する方法の一つに脂溶性イオンの細胞内外の分配を利用する方法がある。我々は，脂溶性イオン選択性電極を作成し，RI ラベルされた脂溶性イオンを用いる方法に比べて簡単かつ real time に膜電位を推定する方法を開発した。脂溶性イオンを用いる方法は光学的な方法に比べて原理は明快であるが，細胞膜や細胞内成分への吸着の問題点がある。本講演では，(1)脂質二分子膜を用いて，voltage-jump 法による種々の脂溶性陽イオンである phosphonium ion の透過速度の測定，(2) liposome 膜への吸着が entropy 支配の疎水結合であること，および膜脂質の相転移の吸着におよぼす影響，(3)高度好塩菌膜ベジクルやラット肝ミトコンドリアへの吸着測定，(4)膜電位推定のための吸着の補正法について，述べる。

非チャンネルたんぱく質・人工ペプチドのチャンネル挙動

高木雅行（阪大・教養）

生体膜機能を発現する主要な分子の一つがイオンチャンネルたんぱく質である。この分子は α－ヘリクスの数本が束になっていて，束（円筒）の上下面と中心の穴（チャンネル）の部分が電荷を帯びているので親水性，外側面は疎水性（生体膜を構成する脂質と親和性が高い），というのが一般的な特性であろう。

水溶性たんぱく質でも何本かの α－helix を持ったものは，油相中で上記の特性をもつ構造がとれるならばイオンチャンネルの機能を示すことが期待される。実際，血漿アルブミン（曽我美勝　精製），チトクローム c は或る確率で脂質 2 分子膜に潜入し，美しい単一チャンネル電流を現わした[1)]。合成両親媒性ペプチド（21残基）を脂質 2 分子膜に組み込むと，膜内で数本のペプチド（α－helix）が凝集してイオンチャンネルを形成することが知られている[2)]。

1）M. Takagi, M. Sosami and H. Watari (be in prparation)
2）J. D. Lear, Z. R. Wasserman and W. F. DeGrado, Science, 240 (1988) 1177－1181.

細胞膜の Na^+, K^+, Cl^- 共輸送と ATP

池原敏孝，高橋　章，山口久雄，細川敬子，宮本博司（徳島大・医・第1生理）

2 μM CCCP と各濃度 (0～5mM) の Glucose を組み合わせた溶液で HeLa 細胞を incubate すると細胞内 ATP が種々の濃度に調節される。この細胞を用いて ouabain 非感受性，furosemide 感受性 Rb^+ influx （J_{Rb}）を測定し，Na^+，K^+，Cl^- 共輸送機構の速度論的解析を行った。ATP は共輸送体の Rb^+ 親和性を増加することにより J_{Rb} を刺激する。Hill plot および非直線回帰を行い，カイ2乗検定により最適な回帰曲線を求めると，$1Rb^+$ 取り込みに2分子の ATP が関与することが示唆される。2 μM CCCP に刺激される乳酸生成は 10 μM ouabain によって減少するが，さらに furosemide を添加してもこれに影響しない。細胞内 cyclic AMP の増加は，J_{Rb} には影響しない。以上の結果とすでに報告した研究 (Miyamoto, et al. 1986) より，この Na^+，K^+，Cl^- 共輸送機構に対し，Na^+ と Cl^- が同時に結合し，次いで K^+ と Cl^- が同時に結合するときに2分子の ATP が調節因子として関与することを提唱する。

生体イオン輸送系の回路網熱力学

今井雄介（大阪医大・1生理）

自然は自然にできたものであって，何かが何かのために目的を持って構築したものではない。人工システムがシステム思考の結果作られているのに対して，自然システムは自然にある機能体に人が意味を与えてシステムと呼び，思考対象にしているものである。

生体膜のイオン輸送現象もシステム思考をもちいて考察することができる。回路網熱力学はその手段を提供する。局所における単純な熱力学過程（パワーの散逸，蓄積，変換）を基本素子とし，その組み合せ構造をもってサブシステムとする。基本素子は情報を受容して性質を変えるものとする。素子上の過程は単純な熱力学関係式であるので，サブシステムであるモジュールはシミュレーションに使える連立微分方程式を導く。

膜モジュールと溶液区画モジュールの組み合せ構造体は，化学反応を含む細胞膜輸送系のカプセルモデルとなる。さらに細胞カプセルの組み合せ構造体は上皮膜輸送モデルとなる。このハイパーモデル化法により，どのレベルの生体イオン輸送系もシミュレーション可能となり，各種の予測と理解に役立つものとなる。

エキソサイトーシスにおける水の役割の諸相

寺川　進，樊　津紅（生理研・機能協関）
鈴木裕一（山形大・医・第２生理）
熊倉鴻之，今泉美佳（上智大・生命科学研）
瀬川彰久（北里大・医・解剖）

細胞からの分泌はいわゆる開口放出（エキソサイトーシス）によって行われることが，形態学的，生化学的研究によって結論されてきたが，我々はこのことを光学顕微鏡的観察によっても確認し，そのダイナミックな過程を調べた。１）分泌顆粒によっては開口放出後膨大化する。このことは，顆粒内容が全て初めから可溶化しているのではなく，開口してから溶け始めることを示している。２）唾液腺では色素が細胞外から開口した顆粒内へ浸入するが，副腎髄質細胞では同じ色素が開口した顆粒内へ侵入しない。これは，開口した顆粒膜の部分で水の外向きの透過が促進され，内容が外に押し出されている可能性を示している。

^{23}Na-NMR と私

亘　　弘（生理研・超微小形態生理）

京都府立医大在職中，電気生理学的に得られている細胞内イオンの情報と異なる情報を得ようとして，昭和49年度の科学研究費により ^{23}Na-NMR の購入を申請した。というのは電気化学的に得られるイオン量は濃度でなく活量であると教えられていたし，活量と濃度の比である活量係数が0.7と言う数字を聞かされては，電気生理学はなにをしているのかと思っていた。カエル筋の ^{23}Na-NMR についての報告以来，ラット筋，カエル皮，ラット腎臓，ウサギとラット脳，ウサギ神経，カエルとラット肝臓など多くの報告があったが，いずれも，^{23}Na-NMR スペクトルの信号強度は同一組織の灰化後炎光光度法で得る Na 量の約40％で，残りは検出されないというもので一抹の不安があった。^{23}Na-NMR を生体に適用する場合，^{23}Na の自然存在比が100％で，相対感度が比較的大きいこと，及び Na イオンは生体中で高濃度であること，という他の核種に競べ測定上の有利な点があったし，当時，NMR は波長掃引の方式の (CW-NMR) より，感度的に有利なフーリエ変換の方式 (FT-NMR) に代わりつつあり，緩和時間が短いので，FT-NMR であればパルス繰り返し時間が短く，単位時間あたりの多数回の加算ができるという有利性が加わった。したがって装置さえ入手できれば何とか成ると安易に考えていたのは事実であった。

幸いにも科学研究費が通り，機種選定，価格交渉，設置場所の交渉，電源や恒温室の費用捻出等の問題が解決し，装置が納入されたものの，文献を読めば読む程度理解の出来ないことばかり

で，私にとって ^{23}Na-NMR は高嶺の花でしかなかった。しかし西川弘恭，吉崎和男，村上政隆，瀬尾芳輝，前田宗宏君らの努力で ^{23}Na-NMR の生理学への応用に就いて新しい展開がなされたものである。

『脳内分泌機能の反回制御』

1990年1月25日～26日

代表者　鈴木光雄（群馬大・内分泌研・生理）

世話人　寺川　進

1．下垂体後葉ホルモンの遺伝子発現

河田光博（京府医大・第1解剖）

2．オキシトシン細胞の反射性 burst 発射に影響を及ぼす因子

根来英雄（福井医大・第2生理）

3．K－オピオイドレセプター・アゴニストによるバゾプレシン分泌抑制

山田研一（国立佐倉病院・内科・臨床研究部）

吉田　尚（千葉大・医・第2内科）

4．循環系ペプチドの反回制御

山下　博（産業医大・第1生理）

5．視床下部下垂体系の情動ストレス反応

尾仲達史・八木欽治（自治医大・第2生理）

6．CRF－ACTH－副腎皮質系の反回制御

廣重　力（北大・医・第1生理）

7．甲状腺と脳機能―成長ホルモン分泌をめぐって―

鈴木光雄（群馬大・内分泌研・生理）

8．Hormone effects on transcription factor synthesis in brain, and migrations of neuroendocrine cells into brain

Donald W. Pfaff (The Rockefeller University)

9．脳・免疫系連関における免疫サイトカインと視床下部ニューロンの役割

堀　哲郎（九大・医・第1生理）

10．サイトカインと下垂体機能

深田順一・井村裕夫（京大・医・第2内科）

11．神経回路網の性分化と性ホルモン―前腹側脳室周囲核を中心として―

新井康允・村上志津子（順天大・医・第2解剖）

12．前脳から腹側中脳に投射するニューロンにおけるエストロジェン抑制効果にみられる性差

佐久間康夫（弘前大・医・第1生理）

13．LHRH ニューロンの LHRH による自己調節

貴邑冨久子（横浜市大・医・第2生理）

14. 脳内の新しいグルコースセンサーと内分泌機構

大村　裕（富山医薬大）
佐々木和男（日本臓器・生物活性科学研）

15. 脳下垂体前葉のGH細胞の分泌活動の画像処理による研究

征矢英昭，鈴木光雄，寺川　進，岩瀬範和（生理研・機能協関）

下垂体後葉ホルモンの遺伝子発現

河田光博（京府医大・第１解剖）

下垂体後葉ホルモン分泌ニューロン系を用いて，神経細胞における遺伝子発現機構を形態学的立場から in situ ハイブリダイゼーション法によって解析した。室傍核，視索上核は血管分布のきわめて豊富な領域であるため，血中の浸透圧変化に対して後葉ホルモン系の遺伝子発現が容易に起こりうると考えられる。２％食塩水をラットに１，４，14日間投与し続けると，視索上核の腹側部（バソプレシンニューロン領域）のみならず背側部（オキシトシンニューロン領域）においても rRNA の発現が認められた。次に，バソプレシン，オキシトシン mRNA のさまざまな生理学的実験に対する変化を，それぞれの mRNA に特異的な合成オリゴヌクレオチドプローブを作成して検索した。その結果，室傍核，視索上核において，バソプレシン，オキシトシン mRNA 量は浸透圧変化に対応して著しく増加することが確認された。さらに，エストロゲン／プロゲステロンを卵巣摘出ラットい投与し，オキシトシン mRNA 量の変化を同様の方法を用いて半定量化した。視索上核のオキシトシン mRNA 量はエストロゲン／プロゲステロン投与によっても変化を示さなかったが，室傍核におけるオキシトシン mRNA は著しく増加した。このことは，性ステロイドホルモン受容体が前者においては存在せず，後者においてのみ認められている事実と一致する。オピオイドは，オキシトシンニューロンの電気活動や軸索終末からの放出を抑制させることが知られている。長期間オピオイド処理を施したラットに，アンタゴニストであるナロキサンを投与すると，血中オキシトシン量は顕著に増加したが，視索上核におけるオキシトシン mRNA 量は変化を示さなかった。

オキシトシン細胞の反射性 burst 発射に影響を及ぼす因子

根来英雄（福井医大・第２生理）

ウレタン麻酔下の授乳期ラットの室傍核，視索上核から記録される神経分泌細胞の発火活動の約半数は，乳仔による持続的な吸啜刺激に応じて，乳腺に乳汁射出が起こる10～15秒前に一過性の burst 発射を示す。乳汁射出時にはバゾプレッシン放出が見られないことから，この特徴的な burst 発射を示すニューロンは OXT 分泌細胞であると考えられている。全ての OXT 細胞において burst 発射は同期して起こっているものと推定される。オキシトシン細胞の burst 発射は，乳首からの求心性刺激がないと決して起こることはないが，一方，この求心性刺激は burst 発射を起こす以外にはオキシトシン細胞の発火活動に何らの影響も与えない。これらの事実から，Lincoln と Wakerley [1]は，吸啜刺激とオキシトシン細胞の活動との関係を説明するために求心

性入力に対するgate機構の介在を推定した。しかし，現在までこのgate機構の実体にかかわる証拠は何らも見つけられていない。

オキシトシンを吸啜刺激下のラットの第三脳室内に投与すると，オキシトシン細胞のburst発射の大きさおよび発現頻度が共に増大することが明らかにされている[2)]。我々は，内因性に放出されるオキシトシンにも，burst発射発現の促進作用があることを確かめるために，下垂体後葉に反復刺激(50Hz, 3～5S)を加えてオキシトシン細胞を逆行性に興奮させたところ，外因性オキシトシンの効果と同様，burst発射の促進効果が見られた。さらに，室傍核をpush-pullカニューレで灌流しながらオキシトシン細胞を逆行性に興奮させたところ，灌流液中のオキシトシン濃度が上昇することが確かめられた。この結果は，オキシトシン細胞の存在する神経核内にもオキシトシンの放出が起こること及び，そこに放出される内因性オキシトシンによってもオキシトシン細胞のburst発射活動が促進されることが示唆された。

1) Lincoln, D. W. and Wakerley, J. B. : J. Physiol. 250, 443－461, 1975.
2) Freund-Mercier, M. J. and Richard, P. : J. Physiol. 352, 474－466, 1984.

Kーオピオイドレセプター・アゴニストによるバゾプレシン分泌抑制

山田研一（国立佐倉病院・内科・臨床研究部）
吉田　尚（千葉大・医・第2内科）

目的：K-opioid receptor activationによるAVP分泌制御機構を解明すること。K-opioid receptor agonistの投与は，著明な水利尿をきたすことが知られており，その水利尿作用機序の解明にあたり，①AVP分泌抑制を介するのか，腎への直接作用が関与しているのかどうか，次に②もしAVP分泌抑制を介するのであれば，AVP分泌過程のうちでK-opioid receptor activityの関与部位はどこかを検討することから上記テーマを考察した。

方法・結果及び考察：①a. 正常ラットに特異的K-opioid receptor agonist (U62066E)投与にて用量依存的に水利尿を認め，選択的K-opioid receptor antagonist (MR2266)にて水利尿作用の抑制を認めた。中枢性尿崩症ラットではその作用を認めなかった。b. 脱水ラットの血中AVP (p-AVP)を特異的，用量依存的に抑制，更にc. inner medullary collecting duct (IMCD)のAVPによる水透過性に影響を与えなかった。従って，主としてK-opioid receptor activationによる水利尿は，AVP分泌抑制によることが推察された。そこで②次に抑制部位の検討の為，全く異なった二つのAVP分泌刺激［A. 浸透圧刺激（高張食塩水負荷），B. baro-reflex activation（出血）］に対するU62066E及びMR2266の効果を検討した。両刺激に対して，ともに特異的，用量依存的にAVP分泌を抑制した。以上のことは，K-opioid receptor activationは浸透圧刺激，圧受容体反射によるAVP分泌刺激をともに抑制し，その抑制活性はAVP分泌過程のneural lobe上でおきている

ことが推察された。

循環系ペプチドの反回制御

山下　博（産業医大・第1生理）

循環系調節に係わるアンジオテンシン (AII), 心房性ナトリウム利尿ホルモン (ANP), 血管内皮細胞由来のエンドセリン (ET) などは，血管などの末梢標的器官に直接働くとともに，中枢神経系内にもそれらの存在が認められ，神経ペプチドとして働いている可能性がある。この末梢由来の循環系ペプチドの中枢神経系への情報伝達機構に関連して，脳血管関門を欠く脳室周囲器官（脳弓下器官・ SFO, 終板器官・ OVLT ）などのニューロンの AII, ANP と ET に対する化学感受性について述べる。実験はラット脳スライス標本を用いて，ペプチドを含む液で灌流し，単一ニューロン活動の変化を細胞外記録で調べた。

1．AII の効果：SFO と OVLT のニューロンは AII に対して用量依存性に興奮反応を示した。その閾値は 10^{-10}～10^{-11}M で高マグネシウム・低カルシウム灌流溶液中でも興奮反応は認められた。この興奮反応は AII の拮抗剤であるサララシンにより消失した。

2．ANP の効果：OVLT を含む第3脳室前壁腹部 (AV3V) のニューロンの約30％は ANP により抑制反応を示したが，SFO ニューロンは14％のみ抑制反応を示した。しかし，SFO ニューロンで AII による興奮反応が ANP により拮抗されることが分かった。

3．ET の効果：AV3V ニューロン（約25％）は ET により顕著な興奮反応を示した。閾値は 10^{-3}M であった。この興奮反応は無カルシウム溶液中でも認められ，またニカルジピンにより ET の興奮反応は減弱しなかった。これまで ET の作用にカルシウムチャネルの関与が指摘されているが，中枢神経系ニューロンでは ET の作用機序にカルシウムチャネルは関与していないことが示唆された。

視床下部下垂体系の情動ストレス反応

尾仲達史・八木欽治（自治医大・第2生理）

侵害刺激によりバゾプレシン分泌が増強されるという結果とされないというデータが報告されている。そこで侵害刺激および恐怖ストレス刺激をラットに与え血漿バゾプレシン濃度を測定した。その結果，侵害刺激はバゾプレシン分泌を増強するが恐怖の情動ストレス刺激は逆に抑圧することを見いだしたので報告する。痛み刺激は麻酔下のラットのバゾプレシン分泌細胞を興奮さ

せるが，侵害刺激として電気ショック (FS) をラット肢掌に与えると高頻度，短時間（ 50Hz, 60秒間） FS はバゾプレシン分泌を強度依存性に増強した。他方，低頻度，長時間（ 0.05－0.2Hz, 300秒間）の FS はバゾプレシン分泌は抑圧し，この低頻度 FS のパルス間隔の間にラットはすくみ行動を示した。さらにこのバゾプレシン分泌抑圧反応は麻酔下では検出されず増強反応のみが観察された。以上のデータは，「侵害刺激はバゾプレシン分泌を増強するが，恐怖の情動ストレスは逆に分泌を抑圧する」と考えると合理的に説明できる。そこで恐怖の情動ストレス刺激として FS を予知させる刺激を与え，血漿バゾプレシン濃度を測定した。まずラットに音刺激（ 3 秒間）と FS （ 1 秒間）を組み合わせて与える訓練試行を行い， 1 日以上間をおいて音・環境刺激を与えるテスト試行を行った。テスト試行の音・環境刺激は動物にすくみ行動を誘発し， ACTH 分泌を増強した。このとき浸透圧刺激下にあるラットのバゾプレシン分泌は抑圧された。学習により習得されたこのバゾプレシン分泌抑圧反応は訓練後少なくとも 2 日間以上保持された。また，テスト刺激を繰り返し与えることにより消去することも可能であった。さらに恐怖の情動ストレス刺激は，浸透圧刺激，循環血液量減少刺激（ PEG または DEXTRAN の腹腔内投与）や侵害刺激 (FS) に対するバゾプレシン分泌増強反応をも抑圧した。以上の結果は，恐怖の情動ストレスがバゾプレシン分泌を抑圧することを示唆する。

さらにこのバゾプレシン分泌抑圧反応における内因性オピオイドの役割を調べたところ，オピオイドアンタゴニストであるナロキサンはこの反応を阻止しなかった。ところが情動ストレス刺激に対するオキシトシン分泌増強反応はさらに促進された。従って情動ストレス反応に内因性オピオイドが関与するかどうかは対象とする神経内分泌系の種類により異なると結論される。

CRF－ACTH－ 副腎皮質系の反回制御

廣重　力（北大・医・第 1 生理）

CRF－ACTH－Corticosteroid 系あるいは視床下部－下垂体－副腎皮質系 (Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical system, 以下 HPA 系と略す）の分泌制御機構については，すでに数多くの研究が行われてきた。それらは，当然のことながら， HPA 系のヒエラルキーの各レベルにおける入力－出力関係（特性解析）に集中した。まず CRF 放出のための入力解析，ついで ACTH 放出に関係する要因分析，さらに副腎皮質ホルモン分泌の dynamics 研究があい前後して精力的に行われた。 Vale らによる CRF の化学構造の解明（1981）以後は主として CRF の分泌動態に関する研究が RIA による CRF 含有量の測定のみならず， CRF mRNA をも併せて測定することによって CRF の合成速度をもうかがう方向で進められている。一方 CRF そのものの測定から明らかになったことは，下垂体レベルでの ACTH 放出が単に CRF のみならず，バゾプレッシンやカテコールアミンによって修飾されている事実の再発見である。これらの物質は， CRF の化学的本体が

明らかにされる以前から，ACTH 分泌になんらかの形で関与していることが強く示唆されていたものである。このような事実は，HPA 系の制御様式多因子的支配であり，あらためて「多因子制御」の解析方法を我々に問いかける。さらにヒエラルキーの上位構造から下位構造への入力の時間経過に着目すると持続的入力と断続的入力とに区分される。このヒエラルキーの信号伝達形式の解析はいわば「遠心路的」であるが，これに対して今回の主題である HPA 系の反回制御はいわば「求心路的」に作動特性解析と言うことができる。HPA 系のフィードバック抑制制御については，すでに「濃度」依存型と「速度」依存型の二種類の存在が示唆されてから久しいが，「濃度」依存型のフィードバック抑制に関与すると思われる glucocorticoid receptor の解析が現在盛んに進められている。これに反し「速度」依存型に関係する receptor の解析は行われていない。おそらく分離された receptor- 細胞内信号伝達系を用いた分子生物学的研究が必要になろうが，適切な実験系の確立のためにいましばらくの時を必要としよう。

甲状腺と脳機能—成長ホルモン分泌をめぐって—

鈴木光雄（群馬大・内分泌研・生理）

甲状腺ホルモン (TH) は脳の成長，発達にとって不可欠であるばかりでなく，成熟動物の中枢神経系の形態と機能の維持にも必要である。雄性ラットにみられる拍動的成長ホルモン (GH) 分泌は約3.5時間の周期でみられるが，甲状腺を摘除して機能低下とすると，その特徴的な拍動分泌は消失する。そこで GH 分泌に関与する視床下部の室周核 (Pe) の SRIF と弓状核 (Arc) の GRF ニューロンの局在と機能について研究した。先ず SRIF ニューロンのうち TI ニューロンの局在を明らかにし，次いで同ニューロンの神経回路網を SRIF 分泌試験法を用いて解析した。その結果 Pe の SRIF ニューロンは視床下部と辺縁系では OVLT, VMH, LHA, PMV, Me, LS, BST が，脳幹では CG, LC, Sol, LRt との連絡があることが判った。一方 Arc の GRF ニューロンであるが，VMH と ABL の電気刺激が GH 分泌を誘発すること，ABL 刺激は ST を通って Arc に至ることを明らかにした。ABL 電気刺激による GH 分泌の特異性を明らかにするために総ての下垂体前葉ホルモン分泌をみたところ，GH 分泌のみが促進された。甲状腺摘除ラットは，VMH 電気刺激，クロニジン，hpGRF 注射に対する反応性が低下している。最近われわれは SRIF が GH 分泌細胞の GRF の反応性の維持にも関与していることを明らかにした。甲状腺摘除動物の GRF ニューロンの活性の低下とともに SRIF ニューロン活動も低下するとすれば，下垂体の反応性も更に低下するものと考えられる。したがって TH は種々の段階を通じて GH 分泌を調節している可能性が考えられた。

脳・免疫系連関における免疫サイトカインと視床下部ニューロンの役割

堀　哲郎（九大・医・第1生理）

脳と免疫系との間には両方向性の communication があり，それは脳及び免疫両系の細胞には共通の情報伝達物質と受容体が存在することにより可能となっている。脳が免疫系を制御している証拠は次のようである。①情動ストレスが免疫反応に影響する。②味覚刺激などを用いて，免疫反応の古典的条件づけが出来る。③視床下部や辺縁系の破壊などにより，免疫反応が抑制あるいは増強される。④免疫細胞にはホルモンや神経活性物質の受容体が存在し，それらを通じて免疫細胞の機能が修飾される。一方，免疫系が脳へ信号を送っていることを示す知見としては，①免疫反応進行とともに視床下部のニューロン活動やノルアドレナリン代謝回転が変化する，②免疫細胞が活性化されると神経系や内分泌系が放出するのと同様のペプタイドを放出する，③免疫細胞が放出するサイトカインに対し，視床下部ニューロンが反応し，その結果，内分泌系，自律神経系及びホメオスタシス機能に，多彩で生体防衛反応上有意義な方向性変化を惹起する，などである。

一部の免疫サイトカイン (IL－1, IFN α，TNF) は，脳内でも microglia や astrocyte により産生される。IL－1 と IFN α が惹起する中枢神経反応である発熱と摂食抑制の少なくとも一部はこれらの物質がそれぞれ，視索前野の温度ニューロン及び視床下部腹内側核のグルコレセプターニューロンへの作用によることが，脳スライス標本を用いた実験で判明した。また，IL－1 および IFN α のニューロンへの作用は，それぞれ，アラキドン酸カスケード及びオピオイド受容体機構を介することもわかった。また，脳では内因性解熱物質として，リンパ球では IL－1 内因性拮抗物質として働くと考えられる α MSH は，IL－1 のニューロンに対する作用をブロックできるが，IFN α に対するそれには影響しない。α MSH は脳でも末梢でも IL－1 により誘導されるので，上記の結果は，ニューロン及びリンパ球における IL－1 の過剰作用に対し，α MSH がフィードバック物質として働く事を示す。

サイトカインと下垂体機能

深田順一，井村裕夫（京大・医・第2生理）

ストレス等に対する生体防御機構の中で中心的役割を果たすホルモンである Glucocorticoid (GC) の副腎皮質における合成・分泌は，直接的には下垂体 corticotroph から分泌される副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) を中心とする proopiomelanocortin (POMC) 由来ペプチドによって調節されるが，この下垂体機能はさらにその上位すなわち視床下部から下垂体門脈血中に分泌される ACTH 分

泌ホルモン (CRH) あるいはアルギニンバゾプレッシン (AVP) を中心とする分泌刺激因子によって促進的に，また逆に血中 GC によって抑制的に調節されている。この GC の合成・分泌に関する調節機構，特にその中でも GC による視床下部－下垂体レベルでの抑制すなわち反回調節機構の詳細については未だ未解決の問題が多く残されている。我々はこれまでラット視床下部 CRH と下垂体前葉 POMC の前駆体遺伝子発現に対する GC の影響と比較し，GC の下垂体前葉に対する効果に比べ，その視床下部 CRH に対する影響は比較的軽微である。当初単球由来のリンパ球活性化因子として見い出されたインターロイキン－Ⅰ (IL－1) (Basedowsky) が，免疫，炎症，細胞増殖，分化制御や発熱作用をもち，また強い GC 分泌刺激活性を持つことが報告され注目されている。我々は，ヒト IL－1 を無麻酔のラットに投与し，ヒト IL－1 が用量依存的にラット血中 ACTH 濃度を上昇させること，およびヒト IL－1 の反復投与によりラット視床下部－下垂体－副腎系の重量およびホルモン量が増加することを見いだした。さらにこれらの効果の IL－1 上の活性部位を明らかにする目的で遺伝子工学的手法によりその一部を修飾したアナログを作成し，その ACTH 分泌刺激活性を検討していく過程で，発熱活性を著しく欠きながら ACTH 分泌刺激活性を残した IL－1 βアナログを見いだした。このペプチドを合成 GC ホルモンを比較的長期に投与して二次性副腎機能低下を来したラットに投与し，視床下部－下垂体－副腎機能の回復過程に対する効果を検討した結果を合わせて報告する。サイトカインの副腎 GC 合成，分泌に対する刺激作用は，この作用がひいては逆にサイトカイン合成に抑制的に影響し，この意味でこれまでの GC の反回調節系に新たな視点を付け加える可能性があり，その全貌の解明が期待される。

神経回路網の性分化と性ホルモン
―前腹側脳室周囲核を中心として―

新井康允，村上志津子（順天大・医・第２解剖）

生後発生の過程で性ホルモンが性ホルモン受容体含有ニューロン系のニューロン数，軸索や樹状突起の成長及びシナプス形成を制御することが知られているが，今回はラットの周期的なゴナドトロピン分泌を調節すると考えられる視束前野の前腹側脳室周囲核 (AVPvN-POA) の体積と，神経核を構成するニューロン数に対するアンドロゲンの影響を中心に検討した結果を報告する。

ラットの AVPvN-POA の大きさに性差があり，雌の方が雄より大きく (Bleier et al., 1982)，しかも周生期のアンドロゲン投与により雌の AVPvN-POA の体積が雄のレベルまで減少する (Ito et al., 1986) ことがすでに知られている。アンドロゲンが発生過程で AVPvN-POA に働く場合，芳香化されて効く可能性が高い。

成体で AVPvN-POA のニューロン数は雌で2340±111，雄では1521±84と有意に雄の方が少ない。周生期の雌にアンドロゲンを投与するとニューロン数が有意に減少することから，この性差

は神経核の体積の場合と同様に周生期の精巣からのアンドロゲンの働きによると思われる。

新生雌ラットに生後5日間アンドロゲンを投与し，AVPvN-POAの神経核の領域内のpycnosis像を調べてしると，アンドロゲン投与群でpycnosis像が有意に増加することが判明し，アンドロゲンはこの神経核では細胞死を促進するように働いているのではないかと考えられる。AVPvN-POA内にチロシン水酸化酵素(TH)陽性ニューロンが存在することが知られているが，その数は雌ラットでは460±20，雄では196±12と有意に少ない。AVPvN-POAにおいて新生期のアンドロゲン投与に反応してpycnosisを示すのがこのTH陽性ニューロンなのか，THの酵素活性が新生期のアンドロゲンによって不可逆的に抑えられているのかは現在のところ不明である。AVPvN-POAニューロンに対してアンドロゲンがどのような機序によってニューロン数を減少させるのか，そしてアンドロゲンに特異的に反応して減少するのはどの様なニューロン集団なのはさらに研究中である。

前脳から腹側中脳に投射するニューロンにおける エストロジェン抑制効果にみられる性差

佐久間康夫（弘前大・医・第1生理）

性ホルモンの分泌における反回制御にかかわる中枢機構の解明は，排卵を始めとする生殖内分泌の周期的現象の理解に欠くことができない。しかしながらホルモン分泌を指標とする研究は，下垂体と中枢神経機序の双方が関係するため，様々な困難に直面している。性ホルモンに依存するもうひとつの現象に，それぞれの動物や性に固有の生殖行動がある。ラットの生殖行動は単純な要素の組合せからなっていて数量化が容易であり，また行動は中枢神経系の直接の調節の下にあるから，特定の行動要素に関わる神経回路を同定し，性ホルモンがこれに及ぼす作用を調べることにより，反回制御に欠かせないホルモン濃度感知の際の液性惰報から神経性情報への変換機序の一機を明らかにすることが可能である。雌ラットのロードーシス反射の発現に促進的な役割を果たしている腹内側核から中脳中心灰白質に投射する系では，エストロジェンによるニューロンの興奮性の上昇が起ることを逆行性興奮の誘発閾値や絶対不応期の測定により明らかにした。この促進が見られるのは，エストロジェンにより行動の出現する雌あるいは出生当日去勢雄に限られている。今回この行動の抑制的調節に与っている前脳から腹側被蓋野に下行する系を同定し，同様にエストロジェン感受性を調べたところ，この系のニューロンは行動の発現と並行して抑制されることが判った。当面，性ホルモンによって惹起されたこれらの現象の生理学的基盤の解明を期している。

LHRH ニューロンの LHRH による自己調節

貴邑冨久子（横浜市大・医・第２生理）

LHRH ニューロンの分泌機能が LHRH 自身により影響をうける可能性は1971年にはじめて Hyyppa らによろ提唱され，その後の多くの研究は，LHRH が LHRH 分泌を抑制的に調節する，いわゆる負の自己調節機序が視床下部内側底部で作動していることを示してきた。しかし，我々は最近，少なくとも２つのタイプの LH 分泌，すなわち，１）卵巣ホルモンの正 feedback により惹起される LH サージと，２）卵巣摘除下でのパルス状 LH 分泌，に関わる LHRH 分泌は，この点について報告したい。

１．卵巣ホルモンの正 feedback により惹起される LH サージ

４日性周期回帰ラットの発情前期の臨界時刻前に，LHRH あるいはその拮抗的誘導体 [D-pGlu^{1}, D-Phe^{2}, D-Trp^{3,6}] LHRH を，内側視索前野あるいは第３脳室内に慢性留置カテーテルを通して投与し，排卵性 LH サージに及ぼす影響を検討した。内側視索前野内への LHRH 5ng 投与は LH サージ開始を促進し，ピーク値を増加させ，LHRH 拮抗剤 100ng 投与は，LH サージ上昇期の LH 濃度減少と下降期の LH 濃度の増加，すなわち LH サージの遅延を惹起した。内側視索前野領域では LHRH ニューロンが回路を形成しているという形態学的報告と併せ，ラットの LH サージに関与する LHRH の大量分泌は内側視索前野内に分泌される LHRH が及ぼす正の feedback 作用によって調節されている可能性が推測された。

２．卵巣摘除下でのパルス状 LH 分泌

最近，我々は，自由行動下の卵巣摘除ラットにおいて，約20－30分周期で繰り返すパルス状 LH 分泌に同期して急激な上昇を示す多ニューロン発射活動 (MUA) を視床下部弓状核－正中隆起部で記録し，個々の LH パルスと同期する MUA 上昇をマルチユニットバーストと呼んだ。LHRH 5 μg/kg 静脈内投与はマルチユニットバースト出現に影響を与えなかったが，50 あるいは 100 μg/kg 投与によって１－８分後に予定外のマルチユニットバーストが出現した。前述したような LHRH ニューロン回路の存在を考え併せると，LH パルスを導く LHRH パルスは，脳内に分泌される LHRH が自己あるいは隣接の LHRH ニューロンの分泌活動をたかめる正の feedback 作用によって調節される可能性が示唆された。

脳内の新しいグルコースセンサーと内分泌機構

大村　裕（富山医薬大）
佐々木和男（日本臓器・生物活性科学研）

脳脊髄液中の酸性線維芽細胞成長因子 (aFGF) は摂食後，著明に増加する。aFGF をラット第Ⅲ脳室内に投与すると量－反応的に摂食量を抑制する。摂食抑制は 10pmol 程度である。aFGF 抗体を両側摂食中枢 (LHA) に暗期の 1 時間前に投与すると，摂食量はは 3 時間で，1.5倍も増加する。満腹物質である aFGF による摂食抑制の機序を知るために，aFGF を電気泳動的にグルコース感受性ニューロン (GSN) に投与すると，長い潜時の後に長い持続性の活動抑制がくる。電気泳動的に GSN にプロテインキナーゼ C を直接活性化させる物質を作用させると，同じような潜時と持続時間で抑制を引き起こす。つまり aFGF はプロテインキナーゼ C を介して効果を発揮している。aFGF 抗体で脳切片を染色すると，摂食後 2 時間で LHA, 海馬，扁桃体などのニューロンが染色される。摂食前は脳室壁の上衣細胞が染色でき，上記ニューロン群は染色できないのに，摂食後は上衣細胞の aFGF は空になって脳実質の方に流れ出して，上記ニューロン群が aFGF を取り込んでいる。aFGF の cDNA プローブを用い，in situ ハイブリダイゼーション法で検索すると，上衣細胞が aFGF の mRNA をもっている。このことはブドウ糖投与後，上衣細胞から aFGF が脳脊髄液中および脳内に放出されること，この aFGF を LHA, 海馬，扁桃体などのニューロン群が取り込むことを示している。

さて aFGF の上衣細胞から脳内への放出機構は，摂食による脳脊髄液中へのブドウ糖濃度増加（2mM から 4mM へ）に由来する。すなわち第Ⅲ脳室にブドウ糖を注入すると，2 時間で aFGF が著明に増加し，5 時間でもとのレベルに戻る。マンニトールでは無効である。すなわち膵臓 B 細胞のブドウ糖によるインスリン放出と同じ機構で，摂食後脳内にも膵と同じ神経内分泌機構が発現しているのである。

脳下垂体前葉の GH 細胞の分泌活動の画像処理による研究

征矢英昭，鈴木光雄（群馬大・内分泌研）
寺川　進，岩瀬範和（生理研）

成長ホルモン分泌の細胞内制御機構を調べる目的で，ラット脳下垂体前葉よりコラゲナーゼ処理により細胞を単離し，1 日から 3 日培養してから，ノマルスキー顕微鏡下にビデオカメラと画像処理装置を通して観察した。細胞内には0.4ミクロンほどの直径の分泌顆粒が充満し，全体としてゆっくりとしたブラウン運動をしているのが見られた。GRF を 100nM の濃度で微小なガ

ラスピペットから単一の細胞に投与するといくつかの分泌顆粒が突然その明るさを変え，弾けるような反応を示した。この反応はクロマフィン細胞や杯細胞において見られた分泌反応と殆ど同じように見えたが，反応の速度に遅いものが含まれている点が特徴的であった。ソマトスタチンを投与してからGRFを重ねて投与すると反応は抑えられた。また，ソマトスタチン投与をしてからそれを取り除き，3分ほどしてからGRFを投与すると，顆粒の弾けるような反応は，何もせずにGRFを投与したときより多くなった。K濃度の高い溶液を細胞にかけると，やはり顆粒の消失する反応が引き起こされた。このような結果は，多数の細胞をカラムに詰めてその灌流液のラジオイムノアッセーによって成長ホルモンの分泌を定量した結果と一致する。従って，顆粒の明るさの変化は，電子顕微鏡観察によって示唆されてきた成長ホルモン細胞（GH細胞）の分泌顆粒のエキソサイトーシスを，光学顕微鏡でリアルタイムに観察したものであることが結論される。

『睡眠促進物質研究会』

1990年2月1日～2日

代表者　井上昌次郎（東医歯大・医用器材研）

世話人　山岸俊一

1．睡眠物質研究―1990年代の展望

井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

2．睡眠促進物質 SPS-B の単離と構造解析

菰田泰夫，本多和樹，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

3．SPS-B について（その3）

本多和樹，菰田泰夫，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

4．ウリジン，チミジン及びアザウリジン誘導体の睡眠作用とその作用機序

山本郁男，渡辺和人，古田悦子，越上　誠（北陸大・薬）

木村敏行，Ing Kang Ho (Univ. Mississippi Med. Center)

5．単一ニューロンにおける連続放電とウリジンの抑圧効果―スパイク順応の促進

小原昭作（帝京大・医），尾崎　毅（生理研），

内薗耕二（静岡県立大），西江　弘（順大・医）

6．ヒト成長ホルモン (hGH) 高感度測定法を用いた hGH 分泌の睡眠依存性の検討

定松美幸（豊郷病院），

飯田英晴，加藤進昌（滋賀医大）

7．睡眠－覚醒リズム障害に対するビタミン B_{12} の応用

大川匡子，三島和夫，菱川泰夫（秋田大・医），

高橋清久（国立精神神経センター）

8．哺乳動物の冬眠機構の研究―冬眠期に著変する血中タンパク質の同定―

近藤宣昭（三菱化成生命研），近藤　淳（三菱化成総研）

9．ラベンダー抽出物のラットにおける睡眠－覚醒修飾作用

岡野泰久，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研），

柴田柾樹（ロッテ中央研）

10．絶食ラットの睡眠－覚醒におよぼす高麗人参抽出物の安定化作用

李　成弼，本多和樹，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研），

李　榮浩（韓国清州大・医）

11．レム睡眠発現における MHBAA の役割

奥平進之，鳥居鎮夫（東邦大・医），

萩野幸司，大重英敏，工藤　清（ライオン研）

12. 血液中のγ－Br 検出法

柳澤　勇（東京医大）

13. DSIP 類縁体の睡眠促進作用とその構造活性相関

木村昌由美，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

14. セロトニン受容体刺激による体温変化とデルタ睡眠誘発ペプチド(DSIP)

綱島浩一，高橋清久（国立精神神経センター），
加藤進昌（滋賀医大），
増井　晃（西山病院）

15. 下位脳幹部における DSIP の鎮痛ならびに睡眠誘発作用部位
—脳実質内微量注射による検討—

中村明弘，塩見浩人（福山大・薬）

16. ラット視索前野の睡眠ニューロンについて

小山純正，早石　修（大阪バイオサイエンス研）

17. アカゲザルの視床下部における睡眠と覚醒の調節

尾上浩隆，小野桂子，小山純正，渡辺恭良，早石　修（大阪バイオサイエンス研）

研究会参加者

井上昌次郎，菰田泰夫，本多和樹，木村昌由美，岡野泰久，清水和正（東京医歯大・医用器材研），山本郁男，渡辺和人，古田悦子（北陸大・薬），小原昭作（帝京大・医），定松美幸（豊郷病院・精神科），大川匡子（秋田大・医），近藤宣昭（三菱生命研），奥平進之（東邦大・医），柳澤　勇（東京医大），綱島浩一（国立精神神経センター），塩見浩人，赤池昭紀，中村明宏，田村　豊（福山大・薬），小山純正，尾上浩隆，小野桂子（大阪バイオサイエンス研），岡野善郎（久留米大・医），加藤進昌（滋賀医大），永木　茂（東京女子医大），萩野孝司，堀内　卓（ライオン㈱），山本光三（鐘渕化工・生物化学研），尾崎　毅，山岸俊一（生理研）

研究会の概要

これまでの研究会と同様に，今年度も学際的および国際的な傾向があきらかで，広い分野の研究者がさまざまな新しい成果を披露し，活発な討論が行われた。17題の発表および31名の参加者は，昨年度とほぼ同数であった。しかし，今回初めて参加した研究者が10名にも達し，そのうち発表を行った研究者が6名もあったことは，睡眠物質にかかわる研究内容と研究者層が着実に拡大していることを示すものであろう。そのなかで，秋田大の大川講師によるビタミン B_{12} の作用に関する臨床研究と，三菱化成生命研の近藤博士による冬眠物質同定にいたる経緯についての特別講演とは，たいへん興味深い新しい話題として大きな注目を浴びた。また，常連の東京医歯大の菰田助教授と本多助手による睡眠促進物質 SPS-B の同定とその睡眠誘発作用の解析は，この研究会が育てた研究成果の一つとして誇りうるものであろう。ほかにも，今回はとくにすぐれ

た研究が多く，その内容は以下の要約で窺うことができよう。今回も新進気鋭の研究者に座長を依頼して自由に議事進行してもらった。また，立食形式の懇親会をサングリア２階特別室で開催して好評であった。

睡眠物質研究―1990年代の展望

井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

1990年代の到来を機に，現代の睡眠物質研究の流れを辿りつつ，将来を展望してみることにする。1960年代初めから再出発した睡眠物質探求の研究は，1970年代後半まで低迷しながらも着実に進展していった。この年代を「模索期」または「錬金術の時代」と呼べるであろう。つづく1980年代は，多くの候補物質があいついで登場した時期であった。この年代を「発見期」または「期待と混乱の時代」と呼べるであろう。いま迎えた1990年代は，睡眠の調節機構やその生理的役割にせまる新奇な実験と理論の展開が待たれている。この年代を「発展期」または「認識と応用の時代」と呼べるようにしたい。なお，他国の研究動向として，とくにソ連とアジア諸国の活動にふれ，また，３月にレザルクで開催される第10回欧州冬季神経科学会議のために私がオーガナイズした「内因性睡眠調節物質」のプログラムを紹介する。

睡眠促進物質 SPS-B の単離と構造解析

蒜田泰夫，本多和樹，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

睡眠促進物質 (SPS) は，断眠したラットの脳幹抽出物に含まれる内因性活性物質である。脳幹抽出物をイオン交換（SP セファデックス）ついでゲル沪過（セファデックス G10）クロマトグラフィーで精製し，睡眠促進効果を示す画分，SPS-A および SPS-B を分離した。粗 SPS-B についてゲル沪過（セファデックス G15）クロマトグラフィーで精製後，さらに各種の条件による高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) で分取を行い，取取画分の睡眠促進効果を検討した結果，μBondasphere カラムで分取した単一ピークの画分に有意な活性を見いだした。そこで，断眠ラット470匹分の粗 SPS-B について HPLC で直接大量分取を繰り返し行い，単一ピークに相当する純粋な SPS-B を 0.9mg 得た。核磁気共鳴 (H^1, ^{13}C, ^1H-^1HCOSY) および質量分析 (FAB-MS) スペクトルにより SPS-B の構造解析を行い，その結果推定した標準品と SPS-B を同定することができた。

SPS-B について（その3）

本多和樹，舩田泰夫，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

断眠ラット脳幹抽出物には睡眠促進物質(SPS)としてウリジンおよびSPS-Bが含まれている。すでにSPS-Bは同定されているので，その標準品を10, 20, 25, 50, 100nmolの各用量で100 μlの生理食塩液に溶かし，暗期(20:00－08:00)の始まる1時間前から10時間かけて，雄ラット第三脳室内に連続注入して，SPS-B同様の睡眠促進活性があるかどうか検討した。生理食塩液のみを投与した前日の暗期と比較すると，SPS-B標準品は20, 25および50nmolの各用量で，徐波睡眠(SWS)量をそれぞれ17.7% ($p < 0.01$), 34.6% ($p < 0.001$)および13.4% ($p < 0.05$)増加させた。逆説睡眠(PS)量は25nmol投与で86.0% ($p < 0.05$)の増加を示した。以上の結果より，SPS-Bの標準品は，SWSとPSの両方を有意に増加させることが判明した。注入期後半に脳温上昇がみられたが，SPS-Bの標準品の発熱作用は報告されていないので，この脳温上昇は何らかの発熱物質を介した結果と考えられる。

ウリジン，チミジン及びアザウリジン誘導体の睡眠作用とその作用機序

山本郁男，渡辺和人，古田悦子，越上　誠，木村敏行（北陸大・薬），
I. K. Ho（ミシシッピ大・医）

演者らは，ウリジン及びチミジンのN^3位誘導体は，マウス脳室内投与によって正向反射消失を指標とした睡眠作用を発現することを既に報告した。今回，生体異物である6-アザウリジンを選び，N^3位誘導体を合成，ウリジン，チミジン誘導体との比較検討を行った。その結果，これらヌクレオシドのN^3位にベンジルやキシリン基を導入すると単独睡眠作用を発現すること，ペントバルビタール睡眠延長作用並びにジアゼパム運動失調作用を増強させることが明らかとなった。受容体結合実験より，N^3-ベンジルウリジンが$GABA_A$及びベンゾジアゼピンレセプターに影響することが示されたと同様に，N^3-ベンジル-6-アザウリジン(1mM)も特異的[^{3}H]-GABA結合を36%, 6-アザウリジン(1mM)は25%減少させた。ベンゾジアゼピンレセプターへの特異的[^{3}H]-Flunitrazepam結合において，N^3-ベンジル-6-アザウリジンのみが25%減少させた。さらに，N^3-ベンジルチミジンも両レセプターに影響を及ぼすことが判明した。従って，ヌクレオシド誘導体の作用機序として，これら受容体への関与が考えられる。

単一ニューロンにおける連続放電とウリジンの抑圧効果—スパイク順応の促進

小原昭作（帝京大・医），
尾崎　毅（生理研），
内薗耕二（静岡県立大），
西江　弘（順天堂大・医）

ザリガニ受容器で，伸張刺激に対する求心神経の連続放電はウリジン投与により抑圧される。この抑圧の機構をさらに，細胞内記録と定電流刺激によって調べた。GABA は抑制性シナプス伝達物質であり，急速に細胞の入力抵抗を減少させて脱分極通電に対する連続放電を完全に停止させる。一方，ウリジンは，GABA と同等またはより低濃度で，徐々に放電の持続期間を減少させる。このとき，入力抵抗，膜電位，スパイクの振幅，波形などはほとんど変化しない。同時記録した瞬時周波数F（＝1/t, t はスパイク間隔）は時間とともに減少する。ウリジンは，このスパイク順応を促進して，放電期間の減少をもたらす。これは軸索起始部 (encoding site) への作用と考えられる。なお効果の発現，回復には数十分を要し，浸透または代謝の過程を示唆する。すなわち特異的な膜受容体の関与は考えがたい。uridine 5'-monophosphate（非浸透性の誘導体）は無効であった。

ヒト成長ホルモン (hGH) 高感度測定法を用いた hGH 分泌の睡眠依存性の検討

定松美幸（豊郷病院精神科），
飯田英晴，加藤進昌（滋賀医大）

6 名の健常男子成人被験者について，夜間通常睡眠（0時－7時）と睡眠相を 6 時間遅らせた場合の血液中の GH 分泌と PRL 分泌について検討した。今回用いた高感度酵素免疫測定法 (EIA) によって GH の最低レベルを検出することが可能になった。その結果，1）入眠前すでに GH は上昇傾向にあること，2）22時，8時頃に谷を作ること，3）18時前後にピークをもつこと，4）入眠直後ピークに達し，以後低下することが明らかになった。睡眠相を遅らせた場合も 1），3）については同様の結果が得られたが，睡眠中はむしろ後半に高い傾向が見られた。個人について比較した場合，睡眠相を遅らせたことによって短い周期の変動が現れた。PRL については RIA によって測定したが，入眠 2 ～ 3 時間後にピークに達し，睡眠後半にかけて高値を維持することが共通してみられた。PRL 値は REM 睡眠の後高値を示し，GH とは異なり睡眠依存性であることが明らかになった。

睡眠ー覚醒リズム障害に対するビタミン B_{12} の応用

大川匡子，三島和夫，菱川泰夫（秋田大・医），
高橋清久（国立精神神経センター神経研）

ビタミン B_{12} (VB_{12}) の睡眠障害への応用の最初の報告は Kamgar-Parsi ら[1]が非24時間睡眠－覚醒リズムを示した学生に応用したものである。今回は，VB_{12} 投与により睡眠－覚醒リズム障害が改善した5例（年齢14－60歳，男性3名，女性2名）を報告した[2]。睡眠－覚醒リズム障害のタイプは非24時間睡眠－覚醒リズム2名，睡眠相遅延症候群2名，不眠1名である。VB_{12} は1～1.5mg/日（毎食後/分3）投与とした。VB_{12} 血中濃度は治療前において4症例中3症例では正常範囲内，1症例では高値であり，いずれも VB_{12} 欠乏ではなかった。また，VB_{12} 投与と同時に，同調因子を強化することが必要であった。VB_{12} の作用機序として，VB_{12} が同調機構に作用して同調を容易にさせるものと考えられる。

1．Kamgar-Parsi, B., Wehr, T. A., Gillin, J. C. : Successful treatment of human non-24-hour sleep-wake syndrome. Sleep, 6 : 257－262, 1983.
2．大川匡子，三島和夫：光療法とビタミン B_{12}. 精神科治療学，5 : 45－56, 1990.

哺乳動物の冬眠機構の研究
―冬眠期に著変する血中蛋白質の同定―

近藤宣昭（三菱化成生命研），
近藤　淳（三菱化成総研）

最近，われわれは冬眠下シマリスにおいて心臓の電気的機械的性質が著しく変化していることを見いだした。しかも，この心機能の変化は冬眠開始前にすでに始まっていたため，生体機能を変化させる冬眠関連物質が存在する可能性を提案した。蛋白化学的手法を用いた研究により，シマリスの血漿中に冬眠に関連した蛋白質分画を見いだした。この血漿蛋白質分画は 140kD の分子量に相当し，冬眠中の動物において著しく減少していた。長期低温暴露による冬眠誘導実験から，この 140kD 分画の減少は冬眠開始前にすでにおこり，冬眠期間中持続することが示された。さらに，低温暴露中に 140kD 分画が減少しなかった動物では冬眠は誘導されなかった。このような 140kD 分画の減少は4種の蛋白質（分子量 55, 27, 25, 20kD ）の著しい減少あるいは消失に起因していた。少なくとも 25kD 蛋白質は新奇のものであった。これらの結果は，動物が冬眠可能な期間，血中から消失する冬眠関連蛋白質の存在を示している。

ラベンダー抽出物のラットにおける睡眠ー覚醒修飾作用

岡野泰久，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研），
柴田柾樹（ロッテ中央研）

ラベンダーの花穂の抽出物（ラベンダー油）を LD12 : 12 （明期＝ 08:00－20:00 ）のもとでラットに与え，自発活動，飲水，脳波，脳温および覚醒－睡眠に及ぼす影響を調べた。慢性実験では，水道水，ラベンダー油を溶かした水，水道水を各１週間ずつ与えたところ，自発活動量，飲水量ともに変化がみられなかった。急性実験では，暗期の始まる30分前に第１－４日は水道水，第５日にラベンダー油 (1mg または 2mg) の水溶液，第６日に水道水をゾンデで胃内に投与し，第４日と第５日とを比較した。 1mg 投与群で暗期に覚醒量が減り，徐波睡眠量が増え，総睡眠量も増えた。 2mg 投与群では明期に覚醒量が減り，総睡眠量が増えた。徐波睡眠潜時は 1mg 投与群および 2mg 投与群で短縮され，逆説睡眠潜時は 2mg 投与群で短縮された。脳温はいずれの実験によっても大きな変化を示さなかった。これらの結果から，ラベンダー油は急性的に入眠を早めること，活動量を減らし睡眠を促進する効果があることがわかった。

Stabilizing effect of Panax ginseng extract on sleep and wakefulness in food-deprived rats

李　成弼，本多和樹，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研），
李　榮浩（韓国清州大・医）

The amount of wakefulness and slow wave sleep significantly fluctuated during 48-h food deprivation and subsequent recovery periods in freely behaving male rats. In contrast, such fluctuations were significantly less prominent in age-matched male rats chronically treated with Panax ginseng extract via drinking water. It is speculated that the ginseng extract may exert a stabilizing effect on sleep-waking disturbances which eventually accounts for its outstanding health-improving activities.

レム睡眠発現における MHBAA の役割

奥平進之，鳥居鎮夫（東邦大・医），
萩野幸司，大重英敏，工藤　清（ライオン研）

生体内に存在する有機ブロム化合物 (MHBAA) は内因性レム睡眠物質の１つと考えられるが，それがレム睡眠のコリン作動性機構に関係することを実験的に証明するために，LD＝12：12（明期 06:00－18:00, 暗期 18:00－06:00 ）の明暗条件下で飼育した体重３～５kg，10匹の雄ネコの脳橋背側部に合成 MHBAA (683nmol) を微量注入し，覚醒，ノンレム，レム睡眠量の変化を48時間観察した。明期投与 (10:00) では，入眠潜時が有意に短縮し，レム睡眠潜時が短縮傾向を認めた。24時間における覚醒量は減少し，レム睡眠量が増加した。１時間毎のレム睡眠量は，投与後１，３，６，15時間で有意に増加した。暗期投与 (22:00) では，入眠，レム睡眠潜時とも延長傾向を認め，睡眠・覚醒量に有意差を認めなかった。しかし投与後５時間ではレム睡眠量が有意に増加した。外因性 MHBAA は，日内変動をもつ内因性 MHBAA と競合しながら橋背側部のコリン作動性ニューロンに働いて，レム睡眠を積極的に増加することが示唆された。

DSIP 類縁体の睡眠促進作用とその構造活性相関

木村昌由美，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

デルタ睡眠誘発ペプチド (DSIP) は，９つのアミノ酸から成るノナペプチドである。DSIP の睡眠誘発作用とその分子構造との関連を調べる目的で，これまでに，３種の DSIP 類縁体の睡眠に対する効果を検索し発表した。本報告では，新たな７種の DISP 類縁体 2.5nmol 当量をラット脳室内に夜間連続注入して，それぞれの睡眠誘発作用を比較，解析した。D-Tyr^1/DSIP は注入中期と注入終了後に徐波睡眠 (SWS) を誘発させ，暗期12時間における SWS の出現回数と逆説睡眠 (PS) の出現時間を有意に増加させた。また，D-Ala^2, Tyr^6/DSIP は注入期前半の SWS と PS を促進した。一方，D-Tyr^2/DSIP は注入期後半に SWS を減少させ，D-Tyr^1, D-Ala^2/DSIP は PS の出現時間を短縮させた。D-Val^2/DSIP, cyclo-(Gly-DSIP), cyclo-(Gly/D-Ala^2/DSIP) は有意な睡眠誘発作用を示さなかった。従って，DSIP はわずかなアミノ酸置換によって睡眠を促進・抑制する両極的な活性を示し，睡眠調節と分子構造の密接な関連が推察された。

セロトニン受容体刺激による体温変化とデルタ睡眠誘発ペプチド (DSIP)

綱島浩一，高橋清久（国立精神神経センター武蔵病院），
加藤進昌（滋賀医大），
増井　晃（西山病院）

前回，われわれはDSIPがアポモルフィンの体温低下作用を強める方向に働いていることを報告し，体温調節機構においてDSIPがドパミン(DA)と深いかかわりがあることを示した。そこで今回，5-ヒドロキシトリプタミン(5-HT)に関して，前回と同様の検討を加えた。(1) 5-HTを直接脳室内に投与すると体温は低下するが，DSIP (1 μg) は5-HTによる体温低下を強める方向に作用した。(2) 5-ET_{1A}，5-HT_2両方の受容体のアゴニストである5-MeODMTの投与では，2.5 mg/kg以上ではラットの体温は上昇し，それ以下では0.5mg/kgを最大とした体温低下が見られた。DSIP (1 μg) を前投与すると5-MeODMTのみの投与群と比較して，より体温を低下させる方向に作用した。(3) 5-HT_{1A}受容体の特異的なアゴニストである8-OH-DPATを投与すると体温は低下するが，DSIP (1 μg) がその体温低下作用を強める方向に作用した。以上の結果は，DSIPが5-HT受容体と深いかかわりを持つ可能性を示唆している。

下位脳幹部におけるDSIPの鎮痛並びに睡眠誘発作用部位
—脳実質内微量注射による検討—

中村明弘，塩見浩人（福山大・薬）

ラットの下位脳幹部にDSIPを微量注射し，DSIPの鎮痛作用部位を検索した結果，延髄の傍巨大細胞網様核 (NRPG) および巨大細胞網様核 (NRGC) がDSIPに対して非常に感受性の高い鎮痛作用部位であった。そこで，これらの部位にDSIPを微量注射した時のラット脳波に与える影響を観察した。鎮痛用量のDSIPをNRPGに微量注射しても，ラットの睡眠覚醒状態に有意な影響は及ぼさなかった。一方，NRGCに鎮痛用量以下のDSIPを微量注射すると，睡眠時間（徐波睡眠＋逆説睡眠）が有意に増加した。これらNRPGおよびNRGCにおけるDSIPの鎮痛並びに睡眠誘発作用は，オピオイド拮抗薬ナロキソンの皮下前投与によって有意に抑制された。以上の結果より，延髄のNRPGはDSIPが鎮痛作用を選択的に発現する作用部位であり，NRGCはDSIPが主として睡眠を誘発する作用部位であると推定された。また，これらの部位におけるDSIPの作用発現には，内因性オピオイド系が関与していることを示唆された。

ラット視索前野の睡眠ニューロンについて

小山純正，早石　修（大阪バイオサイエンス研）

ラット視索前野 (POA) における睡眠調節の神経機構を明らかにする目的で，無麻酔のラットを用い，POA から睡眠段階に応じて活動の変化するニューロン（睡眠ニューロン）を記録し，その活動様式，分布，覚醒中枢である後部視床下部 (PH) との線維連絡について調べた。その結果，1）ラットの POA には，発火頻度が睡眠時に上昇するニューロン（Sニューロン）と覚醒時に上昇するニューロン（Wニューロン）が存在した。2）それらのニューロンには，発火頻度の変化が持続的に見られるものと，睡眠・覚醒段階の変化時にのみ一次的に発火頻度の変化するものとがあった。3）Sニューロンは POA のかなり広い領域に，Wニューロンは主に POA の外側に分布する傾向が認められた。4）PH に電気刺激を加え，POA ニューロンの軸索を逆向性に同定することにより，POA のSニューロンの中には PH に投射しているものがあることを確認した。以上の結果は，POA のニューロンが睡眠・覚醒の開始，維持，終了等の調節に関与していることを示す。また，POA 部が覚醒中枢である PH における睡眠・覚醒調節機構を修飾している可能性が示唆された。

アカゲザルの視床下部における睡眠ー覚醒の調節

尾上浩隆，小野桂子，小山純正，渡辺恭良，早石　修（大阪バイオサイエンス研）

脳内における PGD_2 と PGE_2 による，二元性の睡眠ー覚醒調節機構が提唱されている。すでに PGD_2 の睡眠誘発の作用部位は睡眠中枢であり，かつ PGD_2 の受容体が密に存在する視索前野であることが示されているが，PGE_2 の覚醒作用の作用部位については全くわかっていない。そこで今回，PGE_2 を視床下部へ微量注入し，睡眠に対する効果についてアカゲザルを用いて検討を加えた。PGE_2 を視索前野/視床下部前部に微量注入した場合，睡眠量の減少や覚醒時間の増加が顕著な心拍数の増加，脳温の上昇とともに認められた。しかし，同用量の PGE_2 を視床下部後部へ注入した場合には，覚醒時間は顕著に増加したものの，心拍数や脳温はまったく変化しなかった。このことは PGE_2 の覚醒作用は発熱作用とは独立した機構であることを示しており，PGE_2 が PGD_2 とともに，視床下部における睡眠ー覚醒の調節系に働いていることを示唆している。

『筋収縮の分子レベルにおける基本的機構』

筋肉の微細構造はどこまで判っているのか：
ミオシン頭部の中身，ドメイン，そして筋原線維の構築

1990年２月10日～11日

代表者　馬詰良樹

世話人　江橋節郎

１．アクチン結合部位の性質

山本啓一（放送大・教養・科学）

２．ATP 結合によるドメイン相互作用の変化

平塚寿章（旭川医大・化学）

３．ミオシン ATPase の F- アクチンによる活性化機構

盛田フミ（北大・理・化学第２）

４．電子顕微鏡で見たミオシン頭部の構造とその変化

徳永万喜洋（東大・教養・物理）

ミオシン頭部の構造変化

片山栄作（東大・医・薬理）

６．ESR で見たミオシン頭部のスピンラベル軽鎖 LC2 の角度

荒田敏昭（阪大・理・生物）

７．ミオシン頭部分子内運動の蛍光プローブ法による検出

宮西隆幸（長崎大・医・生化）

８．急速凍結電顕法を用いた収縮筋の格子構造の分析ケージド化合物を用いた
凍結システムの開発

月田承一郎（都臨床研・超微形態）

９．X 線回折で見える筋肉中のミオシン頭部の配置

八木直人（東北大・医・薬理）

10．コネクチン母分子の単離とその性質

丸山工作（千葉大・理・生物）

11．横紋筋の弾性フィラメントの電子顕微鏡観察

船津高志（都臨床研・超微形態）

12．X 線回折でみたコネクチンの生理学的意義

田中秀洋（帝京大・医・生理）

13．内外の網目構造による筋原線維への側方圧迫

竹森　重（慈恵医大・第１生理）

討論参加者

山田和広，若林健之，米谷快男児，遠藤　実，松原一郎，藤目　智，須藤和夫，小川靖男，大沢文夫，柳田敏雄，井上明男，児玉孝雄，若林克三，神谷　律，新免輝男，黒田清子，山田武範，飯野正光，尾西裕文，大槻磐男，御橋広真ほか，計60余名，八木直人と石渡信一がオーガナイザー

研究会概要

筋収縮の化学・力学エネルギー変換メカニズム研究は，未だ分子レベルの解決には至っていない。形態は機能と密接に関連しており，ひとつの現象の一側面が機能であり，また他方の側面が形態である。収縮現象の生理学的な理解のためには，その裏側である形態的な理解が不可欠であるという考えから，本研究会では，微細形態に関連する方面の研究者をシンポジストとして集めて，筋研究者全体のためのシンポジウムを開催した。シンポジウムは，提供される話題を厳選して数を絞り，討論の時間を豊富に用意するよう企画された。聴衆とシンポジストとの間に多くの実質的な討論がなされ，現在の筋研究における問題点が明確にされた。本研究会における成果は，機能・形態両分野の研究の一層の発展に大いに役立つものと思われる。

『ギャップ結合細胞間連絡の上皮細胞における生理機能』

1990年２月19日～20日

代表者　菅野義信（広島大・歯・口腔生理）

世話人　亘　　弘

１．ラット顎下腺腺房細胞のギャップ結合の変動

菅野義信（広島大・歯・口腔生理）

２．骨髄間質細胞 H-1/A は，心筋型 (Cx. 43) ギャップ結合を発現し，その発現は脂肪細胞分化の初期段階で低下する。

梅沢明弘，渡辺陽之輔（慶大・医・病理）

３．ギャップ結合の免疫組織化学的研究

松本　明（順天堂大・医・第２解剖）

４．小腸ギャップジャンクションの生後変化

太田英彦（浜松医大・医・第２生化）

５．膵腺房細胞の分化とギャップ結合―器官培養による研究

山本正夫，片岡勝子（広島大・医・第２解剖）

６．ラット胃粘膜のギャップ結合に関する組織学的検討

興井　隆（日本新薬・中央研）

山本正夫，片岡勝子（広島大・医・第２解剖）

太田英彦（浜松医大・医・第２生化）

竹田　晃（愛媛大・医・臨床検査）

７．insogladine の培養胃上皮細胞のコミュニケーションに対する作用

上田房雄，興井　隆，亀田幸明，三村清隆，木村喜代史（日本新薬・中央研）

８．ギャップ結合と裏打ち構造

渡辺　皓，外崎　昭（山形大・医・第１解剖）

９．ギャップ結合の細胞化学―プロテインキナーゼＣの細胞内局在について―

藤本　和，酒井眞弘，田中利和，小川和朗（京大・医・第２解剖）

10．肝細胞ギャップ結合のＣキナーゼによる抑制制御

矢田俊彦（鹿児島大・医・第１生理）

Birgit Rose, Werner R. Loewenstein

(Department of Physiology and Biophysics, University of Miami School of Medicine)

討論参加者

伊藤和郎（日本大・医・第３内科），峯　徹哉（東大・医・内科），大草敏史（東医歯大・医・第

1内科），神山斉己（豊橋技術科学大・工・情報工学），児玉隆治（基生研），金子章道，山岸俊一，亘　弘，村上政隆，寺川　進，花井洋行（生理研），杉江茂幸（岐阜大・医・第1病理），武居能樹（岐阜大・教養），明坂年隆（朝日大・歯・第2解剖），奥野泰由，立野知世（住友化学工業・安全性研），佐々木康人，廣野　力（広島大・歯・口腔生理），津志本元（大塚製薬・徳島研），宮下哲一（愛媛大・医・第1生化），野間昭典（九大・医・第2生理），柴田洋三郎（九大・医・第2解剖），今永一成（福岡大・医・第1生理）

研究会概要

ギャップ結合の研究で，問題となっていることは，分子構造，構成蛋白質の生化学的性質チャネル開閉の制御機構，多様なギャップ結合の生理的意義などである。

分子の一次構造はすでに解明され，蛋白質の分子量によってコネクション46 (Cx46), Cx43, Cx32, Cx26などに分けられている。このうち上皮細胞に存在するのは，主にCx32である。

本研究会は上皮細胞にみられるギャップ結合の研究を中心に，2日間にわたり開催された。研究対象は，唾液腺，骨髄，肝臓，脳，小腸，膵臓，胃，副腎，心臓など広範囲にわたり，ギャップ結合の生理機能，特に制御機構でのCa^{2+}・Cキナーゼおよびチロシンキナーゼの役割，Cx32に対する抗体を用いた免疫組織化学や電顕で観察したギャップ結合の時間的・空間的変動とその意味などに関して，最新の研究成果が発表され，活発な討論が行われた。

1日目の夜，岡崎国立共同研究機構内の職員会館二階で懇親会が開かれた。ギャップ結合研究会としては，国内で唯一の本研究会を通じて，参加者同士の充分な情報交換が行われ大変有意義であった。

ラット顎下腺腺房細胞のギャップ結合の変動

菅野義信（広島大・歯・口腔生理）

細胞内ギャップ結合近傍の Ca^{2+} 濃度上昇がギャップ結合の閉鎖，開孔の制御を行うことは早くから知られていた。又細胞外の発癌促進剤 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) が極めて低濃度でギャップ結合の閉鎖を来すことから，ギャップ結合を制御する細胞内情報伝達機構にも関心が向けられて来た。ラット顎下腺腺房をコラゲナーゼで分離し，自律神経作動薬に反応する標本で，ギャップ結合の開閉制御機構の一部が明らかになった。コリン作動薬は 10^{-6}M からギャップ結合を閉鎖し，10^{-4}M でほぼ最大に働く。この効果は atropine, verapamil でほぼ完全に拮抗乃至抑制される。他の Ca^{2+} 流入阻止剤である Ni もほぼ同様の効果で，外液中の Ca^{2+} の除去も同じ効果となることから，細胞内 Ca^{2+} の濃度上昇は細胞外からの流入と思われる。H-7, W-7, TPA, diacylglycerol の効果から，Ca^{2+} による情報伝達系は protein kinase C, calmodulin 等の関与が考えられる。

骨髄間質細胞 H-1/A は，心筋型 (Cx. 43) ギャップ結合を発現し，その発現は脂肪細胞分化の初期段階で低下する。

梅沢明弘，渡辺陽之輔（慶大・医・病理）

骨髄では血液細胞の他に間質細胞の存在が知られ，間質細胞による造血支持能は明らかになっている。ここでは間質細胞間連絡の内，ギャップ結合を介する連絡を検討した。

骨髄間質細胞間のギャップ結合の存在の有無に関しては様々な報告があるが，フリーズフラクチャー法ならびに薄切法で電顕的にマウス骨髄間質細胞間にギャップ結合の存在を明らかにした。細網細胞間は，骨髄内で網目構造をしており細胞間の接着にはギャップ結合がみられ，タイトジャンクションは認められなかった。

マウス骨髄間質細胞株である H-1/A 細胞を利用したところ，心臓型のギャップ結合蛋白質 (Cx. 43) の発現が見られ，肝臓型 (Cx. 32) の発現はなかった。H-1/A 細胞の脂肪細胞への分化の過程で Cx. 43 の発現は低下し脂肪合成のキイエンザイム (GPD) の発現に先行する。分化の過程で H-1/A 細胞は血液増殖因子 (CSF-1) の産生が低下し，ギャップ結合を介する連絡との間に相関がみられた。

ギャップ結合の免疫組織化学的研究

松本　明（順天堂大・医・第２解剖）

ラットの肝臓から精製したギャップ結合 (GJ) を抗原として得られたモノクローナル抗体（Mab-GJ, 6-3G11, 愛媛大・竹田　晃博士提供）とポリクローナル抗体（Pab-GJ, 浜松医大・太田英彦博士提供）が中枢神経系の GJ と反応するか否か免疫組織化学的に調べた。両抗体とも1%BSA・PBS で10倍に希釈し，FITC と結合した２次抗体を用い，Wistar 系の新生及び成熟雄ラットの肝臓及び脳のクリオスタット切片標本を検索した。肝臓に関しては，両抗体とも未固定，0.5% パラホルムアルデハイド (PFA) 固定標本によく反応するが，1%PFA には部分的にしか反応せず，2%PFA には全く反応しない。両抗体は未固定の一部の脳の海馬領域や上衣細胞に反応するが，PFA の濃度を上げると反応しなくなる。しかし，Pab-GJ は 2%PFA と 0.2% ピクリン酸混合液で固定した一部の標本の海馬領域や上衣細胞に反応した。

小腸ギャップジャンクションの生後変化

太田英彦（浜松医大・第２生化）

ラクターゼ，スクラーゼなど小腸の上皮細胞の膜酵素がマウスやラットの離乳期に大きく増減することはすでによくしられている。ギャップジャンクション (GJ) も胎児期や生後すぐには小腸上皮細胞に見いだされるにもかかわらず成熟した動物ではおもにクリプトにしか見られない。Cheng & Bjerknes (1988) は GJ が生後まもなく消失することをしめし，その理由を小腸上皮細胞の周辺の浸透圧の変化により説明している。

この仮説を検討するため酵素抗体法によりマウスの小腸上皮細胞の GJ と Na, K-ATPase の増減の時間経過を追跡した。その結果① GJ は生後２－３週間まで存在すること，② Na, K-ATPase は生後ごく初期から GJ と共存することをみいだした。これらは，すでに報告された機能的な GJ の消失過程とは矛盾する結果であり，Cheng らの仮説とは相反する結論が導かれた。

膵腺房細胞の分化とギャップ結合―器官培養による研究

山本正夫，片岡勝子（広島大・医・第２解剖）

胎生13－16日膵組織は未分化な上皮細胞によって構成され，ごく小型のギャップ結合がまれに

観察されるのみである。胎生17－18日膵組織は急速にチモーゲン顆粒の合成を始め膵腺房細胞が分化する。これと同時に大型のギャップ結合が出現する。我々は膵腺房細胞と小腸の上皮細胞の分化にギャップ結合がある種の役割を果たしている可能性があると考えている。そこで Serum free の培養液を使用して器官培養が可能かどうか調べた。胎生14日の膵原器を切りだし培養した結果，膵組織は経時的に生体中と同じ経過をたどり分化を生じる事が分かった。また培養液からトランスフェリンとインシュリンを除去し，培養液中のホルモン増殖因子をすべて除いてもその結果は変化しなかった。この結果から膵腺房細胞の分化に外来性のホルモンは関係しない，また胎生期膵器官培養標本は実験的検索のモデルとして有用であると考えられる。

ラット胃粘膜のギャップ結合に関する組織学的検討

興井　隆（日本新薬・中央研）
山本正夫，片岡勝子，太田英彦（広島大・医・第２解剖）
太田英彦（浜松医大・医・第２生化）
竹田　晃（愛媛大・医・臨床検査）

ラット胃粘膜上皮性細胞に存在するギャップ結合を凍結割断レプリカ法並びに免疫組織学的に検討した。胃表層粘液細胞の間にはよく発達した不整形のギャップ結合が認められた。副細胞間及び主細胞間にもギャップ結合が見られたが小型であった。壁細胞にはギャップ結合は見られなかった。私達は表層粘液細胞間のギャップ結合に注目し，その発達程度を数値化することを試みた。さらに表層粘液細胞の成熟度とギャップ結合の発達程度の相関についても検討したところ，表層粘液細胞間のギャップ結合は，細胞が成熟しながら胃小窩を上行するにつれて発達することが示された。以上のことから表層粘液細胞の分化・成熟，あるいは表層粘液細胞の胃粘膜防御機構にギャップ結合が何らかの役割を担っている可能性が示唆された。

irsogladine の培養胃上皮細胞コミュニケーションに対する作用

上田房雄，興井　隆，亀田幸明，三村清隆，木村喜代史（日本新薬・中央研）

irsogladine maleate は新しいタイプの胃潰瘍治療薬で，その作用機構は胃粘膜血流増加作用と，粘液細胞 cAMP を増加させることから，細胞間コミュニケーション増強によるものと考えられる。そこで培養ウサギ胃上皮細胞における細胞間コミュニケーションに対する irogladine の影響を検討した。４代継代培養細胞を用い 10% FCS 含有 DMEM 中に被験薬物を加え，４時間作用

させた後，Lucifer Yellow CH を細胞内注入した。本培養細胞のコミュニケーション能は phos－phodiesterase 抑制，adenylate cyclase の非特異的活性化，ならびに dibutyryl cAMP の投与によって増強され，また，TPA の投与によって抑制された。irsogladine はこのコミュニケーション能を 10^{-5}M 以上で増強する傾向を示し，10^{-4}M では有意に増強した。従って，irsogladine は細胞間コミュニケーションを増強して，胃粘膜上皮細胞の統合性を強化して抗潰瘍作用を発現していると考えられた。

ギャップ結合と裏打ち構造

渡辺　皓，外崎　昭（山形大・医・第1解剖）

肝細胞や副腎皮質細胞などの細胞間には，ギャップ結合 (GJ) がよく発達している。これらの GJ の大部分の領域には，細胞骨格様の裏打ち構造が認められない。ところが，GJ を含む形質膜の細胞内取込みを思わせる領域には，アクチンを主体とする細胞骨格線維が出現し特徴的配列を示す。ウシガエルおよびモルモットの副腎ステロイド産生細胞の GJ は，その著しい例である。一方，電気的シナプスと呼ばれる GJ には，それが小規模であるにもかかわらず，明らかに分化した裏打ち構造が認められる。ニワトリ毛様体神経節のシナプス部と，ウシガエルおよびモルモットの副腎クロマフィン細胞間に，定常的に裏打ち構造を持つ GJ の例を見ることができる。総じて，これら GJ と裏打ち構造の間に，重要な機能的関係があると考えられる。

ギャップ結合の細胞化学
—プロテインキナーゼCの細胞内局在について—

藤本　和，酒井眞弘，田中利和，小川和朗（京大・医・第2解剖）

プロテインキナーゼC (PKC) がギャップ結合 (GJ) の細胞間連絡機構に関与することが推察されている。本研究では，家兎肝ならびに心筋細胞における PKC の細胞内局在とホルボールエステル処理による動態変化を，免疫細胞化学的に検索した。免疫標識は，心筋細胞のクロマチンを含む核基質，筋形質（Ⅰ帯付近），筋小胞体，デスモゾーム，GJ に認められた。肝細胞において，核基質，細胞質（グリコゲン野），滑面小胞体，ディッセ腔側の微絨毛に標識は認められたが，GJ は標識されなかった。新鮮肝未凍結切片（100 μm 厚）を 100nM TPA に20分間浸漬した場合，GJ ならびに毛細胆管の閉鎖結合に標識が認められた。以上の所見は，1）PKC は心筋細胞 GJ に生理的条件下で存在する，2）細胞間連絡を阻害する TPA は PKC の GJ への誘導

を引き起こす，３） PKC は GJ のみならずその他の細胞間結合装置の機能にも関与する可能性を示唆する。

肝細胞ギャップ結合のＣキナーゼによる抑制制御

矢田俊彦（鹿児島大・医・第１生理）
Birgit Rose, Werner R. Loewenstein
(Department of Physiology and Biophysics, University of Miami School of Medicine)

ギャップ結合透過性は，cAMP により促進的に，細胞内 Ca^{2+}，H^{+}により抑制的に制御されることが知られている。これらと並んで重要な細胞内情報伝達因子である Protein Kinase C (PKC) のギャップ結合に対する作用を検討した。肝細胞株 Clone 12B 細胞間の色素移行は，PKC を活性化する Diacylglycerol (DG) 添加により速やかに抑制された。その抑制は一過性であり，それは細胞による DG の急速な代謝によることが示唆された。一方，phorbol ester TPA はこれを持続性に抑制した。細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+}遊離を阻害する作用の知られる TMB8 はこれらの抑制と拮抗した。しかし，カルモジュリン阻害剤は上記の抑制に影響しなかった。従って，PKC 活性化は細胞内貯蔵部位からの Ca^{2+}遊離を介してギャップ結合を抑制するものと示唆される。同時に，TMB8 には PKC 抑制作用も知られているので，PKC 活性化がギャップ結合を直接に抑制する可能性も残されている。

『神経科学と光学的計測技術』

1990年3月12日～13日
代表者　神野耕太郎（東京医歯大）
世話人　外山敬介

Ⅰ　講演

1．電位活動の光学的測定の実験的背景と研究の展開
神野耕太郎（東京医歯大）

2．ダイオードアレイによる神経反応の多点同時計測
飯島敏夫，松本　元（電総研）

3．CooledCCD カメラによる神経反応のイメージ化
外山敬介（生理研・高次神経機構）

4．Confocal 顕微鏡による形態学的研究
藤田哲也（京府医大・第2病理）

5．共焦点走査型顕微鏡による細胞内イオンの測定
久場健司（佐賀医大・生理）

6．非染色の神経活動に伴う光学的シグナル
渡辺　昭（生理研・機能協関）

7．高速画像処理によるエクソサイトーシスの可視化
寺川　進（生理研・機能協関）

8．Fura2 を用いたトランスデューサー機構の研究
大森治紀（生理研・生体システム）

9．画像処理による細胞内 Ca 濃度変化の解析
工藤佳久（三菱化成生命科学研）

Ⅱ　指定討論

1．光学的測定法の測定限界
橋本　享（東京医歯大・医用器材研）

2．新しいカルシウム指示薬を用いた細胞内カルシウム濃度の測定
廣田秋彦（東医歯大・医）

3．アメフラシ神経活動の光学的多点同時計測
塩野　悟（三菱電機中央研）

4．走査型レーザ顕微鏡の原理と特徴
篠原大三（㈱オリンパスエンジニアリング）

研究会概要

機能染色色素と光学的イメージ処理技術の進歩により，神経活動に伴う生理過程を空間パターンとしてとらえることが可能となり，微小電極法の限界を越える神経生物学の新しい研究手法として期待されている。Ca 感受性色素による細胞内 Ca 濃度変化の計測，電位感受性色素による神経活動の空間パターンのイメージ化などがその例である。しかし，このような光学的計測技術はまだ初歩的段階にあり，有力な神経科学の計測手法として確立されるためには，１）被計測過程に対して高忠実度かつ高感度の特性を持つ色素の開発，２）高い時間的および空間的分解能を持つ光学的計測およびイメージ処理技術の確立が必要である。これらの技術的改良は個々の研究者の経験と着想に負うところが大であったが，これを研究者と技術者の系統的な情報交換により一層促進することが望ましい。本研究会では，このような観点から，光学的計測法に従事する研究者と技術者を広く集め，光学的計測手法に於ける技術的な問題点，必要とされる研究開発，将来の可能性等が，総合的に討論された。

【コンファレンス】

「神経系の発生，再構成のメカニズム」

1990年２月７日～11日

代表者　小幡邦彦

1．The role of the NMDA receptor in retinal ganglion cell innervation of the optic tectum.

Constantine-Paton, M.

2．Cell surface molecule A5 : Putative involvement in retinal central connection.

Fujisawa, H.

3．How does the projection of avian optic nerve fibers mature?

Nakamura, H.

4．Dynamics of axonal growth and target recognition in the retionotectal system of fish.

Stuermer, C. A. O.

5．Development of neuronal circuitary in LGN－VC coculture preparations.

Toyama, K.

6．Accurate reconstruction of three complementary laminar afferents to the adult hippocampus by embryonic neural grafts.

Raisman, G.

7．Neural transplantation in the rodent cerebellum.

Kawamura, K.

8．Phenotypic plasticity of grafted catecholaminergic cells in dopamine-depleted caudate in the rat.

Nishino, H.

9．Development and plasticity of corticorubral projections in the kitten.

Murakami, F.

10．Cytology of peripheral nerve regeneration.

Ide, C.

11．Optic nerve regeneration by peripheral nerve transplant.

Fukuda, Y.

12．Nerve net formation in the simple nervous system of hydra.

Koizumi, O.

13．In vitro synapse formation between cerebral cortical neurons.

Kuroda, Y.

14．Studies on the cellular and molecular basis of axon outgrowth inhibition in vivo and in vitro.

Silver, J.

15. Two types of serotoninergic fibers in the ventral horn of spinal cord of the newly hatched chick.

Okado, N.

16. Development of muscle nerve in the teleost fish, medaka.

Ishikawa, Y.

17. Analysis of neural crest cell migration and lineage.

Bronner-Fraser, M.

18. Motoneuron outgrowth from the spinal cord in the chick embryo.

Tanaka, H.

19. Sympathetic innervation-mediating protein.

Kuromi, H.

20. In situ analysis of cell lineage and axonal guidance in the developing amphibian visual system.

Fraser, S. E.

21. Nerve-muscle interaction during early phase of synaptogenesis.

Poo, M. −m.

22. Short- and long-term synaptogenesis by NG108−15 neuroblastoma-glioma hybrid cells.

Higashida, H.

23. Neurite growth and synapse formation on artificial matrix.

Fukuda, J.

24. Cadherins in selective cell adhesion and neurogenesis.

Takeichi, M.

25. Possible involvement of neurite outgrowth factor (NOF) -receptor in axonal outgrowth from developing chick retina.

Miki, N.

26. Possible involvement of a novel protease in neurite outgrowth of PC12h cells.

Kawashima, S.

27. Intense seizure-like activity in mass cultures and microcultures of dissociated hippocampal neurons.

Furshpan, E. J.

28. Studies on the developmental and differentiation of the nervous system using mouse mutants.

Mikoshiba, K.

29. Involvement of membrane cytoskeleton in the function of growth cone.

Sobue, K.

30. GAP−43 as a "calmodulin sponge", and some implications for calcium signalling in growth cones.

Skene, J. H. P.

31. Expression of three drebrin isoforms in the developing nervous system.

Shirao, T.

32. Axonal guidance mutants identified with antc-tubulin antibodies that bind to specific neurous in C. elegans.

Siddiqui, S. S.

概要

第15回生理研コンファレンス「神経系の発生，再構成のメカニズム」(Mechanisms of Neural Development and Reorganization) が国外より９名 (Constantine-Paton, Yale ; Stuermer, Tubingen ; Raisman, London ; Silver, Cleveland ; Bronner-Fraser, Irvine ; Fraser, Irvine ; Poo, Columbia Univ.; Furshpan, Harvard ; Skene, Stanford), 国内より23名の演者を得て，平成２年２月７日より２月10日にわたり開催された。生理研の講堂を埋める約100名の聴衆を集め，１）視覚系特に網膜視蓋路の発生，２）中枢神経系における神経路形成と移植後再構成，３）末梢神経系における選択的神経成長，４）培養系における神経成長促進因子や細胞内因子の役割などのテーマについて，演者との間で熱心な討論が交わされた。特異的神経経路の形成における諸種の細胞認識因子や抑制因子の固定とそれらと神経電気活動の役割分担についての解明が急速に進んでいることが印象的であった。神経系の発生と可塑性の基礎的研究には問題点を明確にとらえ，胚や移植を用いた in situ 系と培養による in vitro 系を組みあわせた総合的アプローチが不可欠であることが示された。

【セミナー報告】

セ ミ ナ ー 報 告

〈生理研セミナー〉

Mammalian Hair Cell Physiology

Prof. Jonathan Ashmore (Bristol Univ.)

（1989年5月15日）

There are two populations of sensory hair cell found in the mammalian cochlea. I shall describe the ionic currents that can be measured in isolated cells using patch clamp methods and the high frequency motility found in the subpopulation of outer hair cells. This motile mechanism may allow the mammalian cochlea to encode complex sounds over the full auditory range.

Retinal Projections to the Primate Brain.

Dr. R. W. Rodieck (The Univ. of Washington)

（1989年5月15日）

The optic nerve is a bottle-neck, through which pass the axons of the retinal ganglion cells. There are a variety of ganglion-cell types, distinguished by their morphology, by the region of the brain to which they project, and by the nature of the information they convey. Recently it has been possible to provide a detailed picture of some of these pathways, by means of intracellular injections of ganglion cells, retrogradely labelled with markers placed in different portions of the brain.

In Vivo Electron Spin Resonance (ESR) imaging

Dr. Lawrence J. Berliner (The Ohio State Univ.)

（1989年5月17日）

The promise of new methods of non-invasive detection of tissues, organs and physiological metabolites has come with the advent of magnetic resonance imaging (MRI) and in vivo magnetic resonance spectroscopy. Most recently, electron spin resonance (ESR) has been developed for in vivo systems. While free radical processes in carcinogenesis and aging have been studied in the past

principally by in vitro methods, we are now utilizing ESR spectroscopy for non-invasive detection in living animals. Due to the intense interest in nitroxides as potential MRI contrast agents (and built－in ESR imaging agents), we are currently studying the pharmacokinetics of nitroxides directly in vivo as a probe of redox metabolism in various tissues. The results are also promising for assessing the feasibility of ESR imaging measurements at the tissue site of interest.

ムスカリン性受容体反応
M-current and their control mechanism

Dr. David A. Brown (Univ. College London)

（1989年5月19日）

Brown教授が発見したムスカリン性アセチルコリン受容体反応によって不活性化されるK$^+$電流（M電流）の分布や他の伝達物質による制御，細胞内セカンドメッセンジャーによる制御等に関し，基礎から最新の話題まで話して頂いた。

Is molecular biology becoming a part of physics?

Dr. John Maddox （"Nature" 編集長）

（1989年7月24日）

"Nature" の編集長， Dr.John Maddoxが，23日来岡，24日に上記の予定でセミナーをされました。御存知のようにDr. Maddoxは，多彩な国際的活動で知られ，文明批評についても当代のオピニオン・リーダーの一人であります。Dr. Maddoxの都合で，大変慌ただしいスケジュールとなりました。

The distribution of GABA－immunoreactive synapses in the inner plexiform layer of macaque monkey retina.

Dr. Margaret Koontz (Univ. of Washington)

（1989年8月8日）

We used postembedding immunocytochemistry with electron microscopy to analyze the distribution of GABA immunoreactivity in large montages of central monkey retina.

GABA＋ amacrine-to-bipolar synapses were concentrated at 20% and 80% IPL depth in the

inner plexiform layer, GABA+ amacrine-to-ganglion cell synapses at 30% and 70% depth, and GABA+ amacrine-to-amacrine synapses at 40−60% and 75−100% depth. GABA+ synapses also occur in the ganglion cell layer and nerve fiber layer, where they may mediate inhibitory control of ganglion cells.

Conformational drift and hysteresis of dissociated oligomeric proteins.

Prof. G. Weber (Univ. of Illinois)

(1989年8月24日)

Protein solutions of dimers and tetramers at micro to nanomolar concentrations dissociate into subunits when subjected to pressures under 2.5kilobar. The equilibrium plots of apparent degree of dissociation v. pressure obtained on decompression are shifted to lower pressures with respect to those on compression, indicating a hysteresis with loss of subunit affinity. On return to atmospheric pressure the tetramers of lactate dehydrogenase and glyceraldehide phosphate dehydrogenase have very low enzyme activity which returns rapidly (hours) if kept at 25°C but remains low so long as the temperature remains close to 0°C. Stmilar inactivations of these proteins are observed when dilute solutions, showing no conspicuous dissociation, are kept at atmospheric pressure and cold-room temperature for a few days and the spectroscopic properties of the resulting tetramers are quite similar to those of the pressure inactivated species and distinct from the native material. Cold and pressure inactivation, as well as hysteresis are postulated to take place by the same mechanism : dissociation → conformational drift of the subunits → reassociation into a different tetramer species. Dimer-monomer equilibria with conformational drift has been simulated by stochastic cell dynamics. It predicts a shortened concentration span of the isopiestic, isothermal equilibrium dilution curve, of the type and magnitude observed by Xu and Weber in yeast enolase.
(1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 5268).

The insulin A and B chains contain sufficient structural information to form the native molecule in solution

Prof. C. L. Tsou (Institute of Biophysics, Academia sinica)

(1989年8月24日)

演者 Tsou 教授は New Trends in Biological Chemistry in Honour of Prof. Kunio Yagi (名古屋)

に，招待講演者として来日されたのを機にセミナーをお願いしました。

Neurofilament proteins : structure and function

Harish C. Pant (National Institute of Neurological and Communicative Disorder and Stroke, NIH, Bethesda)

（1989年10月14日）

ニューロフィラメントは神経細胞内に広範に存在し遅い軸索輸送に関係している。軸索内に分布しているニューロフィラメントは燐酸化エピトープに対するモノクロナル抗体と反応し，脱燐酸化エピトープに対する抗体とは反応しない。細胞体やグリアのニューロフィラメントは逆の傾向を持つ。ニューロフィラメントの燐酸化は放射化したATPを用いて追跡できる。燐酸化はリジン，セリンの多い部位に起こる。軸索中にはカルパインが存在し，酸性脱燐酸化酵素によって，軸索中のニューロフィラメントが脱燐酸化されるとこのカルパインによる消化が始まり，ニューロフィラメントは脱重合する。カルパインの活性化にはミリモル程度のカルシウムイオンの存在が必要である。このような高いカルシウムイオン濃度が達成されるのは，軸索が破壊されたときであり，カルパイン依存性のニューロフィラメントの脱重合はその修復機構に関係していると考えられる。また，神経終末において，繰り返しの興奮が起こると，局所的にはかなり高いカルシウム濃度が達成されるはずで，終末の形態変化との関係も考えられる。CAMPやフォスファチジルセリンが共存すると，カルパインのCa濃度感受性が上がり，10 μM程度のCaによっても活性化されるようになる。カゼインを用いて軸索原形質の燐酸化酵素活性を調べると，30KDのフラクションに活性が出現する。これは，プロティンキナーゼAの分子量に近い。ニューロフィラメント関連性の機能はこのような燐酸化と脱燐酸化によって制御されていると考えられる。（寺川）

Modulation of synaptic transmission in the retina.

楊　雄里（上海生理研究所・所長）

（1989年10月17日）

網膜神経回路の動作状態は決して固定されたものでなく，さまざまな因子によって修飾されている。例えば，white perchの水平細胞の応答は長時間の暗順応によって応答性が低下するとともに，水平細胞間の電気的な結合も減弱する。この変化は可逆的であり，背景光照射をすることによって回復する。ドーパミンの投与は暗順応状態をつくり出す。こうした変化はドーパミン作動性の網状層間細胞が水平細胞に作用して発現すると考えられる。さらに，網状層間細胞は内網

状層においてGABA作動性，あるいはグリシン作動性のアマクリン細胞から制御を受けている。このように，明，暗順応過程は視細胞の感度変化だけでなく，網膜神経回路の動作によっても制御されていることが明らかになった。

Neural Substrates for the Action of Clonidine in Brain.

Donald J. Reis (Cornell Univ. Medical College)

(1989年10月18日)

リース教授は長年 molecular biology から behaviour まで種々の手法をもちいて catecholaminergic system の解析を続けている。今回はクロニジンが α_2 －adrenergic receptor 刺激作用をもつだけでなく non－adrenergic の imidazol－recepter に作用すること及び脳内のクロニジン様物質について巾広い視点から最新の知見を紹介していただいた。

RAPID CHARACTERIZATION OF PROTEINS AND PEPTIDES BY ELECTROPHORETIC TRANSFER AND MICROSEQUENCING

Kiyoshi Nokihara (Gesellschaft für Biotechnologische, Forschung)

(1989年10月31日)

A rapid and simple method for determining the primary structure of different size synthetic peptides, natural proteins/peptides and recombinant proteins using electroblotting on polyvinylidene diflouride (PVDF) membranes followed by sequencing is described. The synthetic materials, which were generated by three different strategies using solid phase peptide synthesis (SPPS) with conventional cleavage, can be directly characterized by this method without purification. The method is very powerful, especially for peptides containing intramolecular disulfide linkages. The method was developed further into the "Twice-Blotting" procedure, in which the material was separated first by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and blotted onto the PVDF membrane. The band with the expected molecular weight was cut out and chemically or enzymatically cleaved. After the second SDS-PAGE followed by blotting, each band was sequenced directly to reveal N-terminal 20－25 amino acid residues. Furthermore, after fractionation of the crude tissue extracts on analytical reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC), each fraction was blotted and sequenced. With the assistance of a computer utilized homology search, we have rapidly characterized several new peptides/proteins. The present method providing information simultaneously on the molecular weight, immunoreactivity and N-terminal

sequence, is rapid and simple for screening proteins, and peptides, especially for those which are difficult to purifiy by conventional methods, and is able to give sequence information necessary for DNA cloning.

Micromechanics of Muscle Contraction
筋収縮の分子機構

Prof. Manuel F. Morales (Univ. of California)

(1989年11月7日)

Morales 教授は，ミオシンのダイナミクスを中心とした筋収縮の分子機構研究における第一人者である。同教授は，戦後我が国で最初に開かれた筋収縮国際シンポジウム（1957）に主賓として来日されたが，その後数多くの日本人が同研究室を訪れ，その薫陶を受けたばかりでなく，常に日本の研究者の良き友人として我が国筋研究の発展に貢献された。今回モラレス研究室同窓生の招きを受けて来日されたのを機に講演をお願いしました。

Biophysical behavior of single blood cells.
(e. g., erythorocytes. leukocytes and platelets)

宇佐美駿一教授（コロンビア大学）

(1989年11月8日)

Viscoelastic behavier of individual blood cells.
赤血球・白血球及び血小板の膜の粘弾性の測定をし cytosketon との関係を観察実験した。

Studies on the Rieske iron-sulfur cluster in the mitochondrial ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase : analyses by mutations. EPR, and EXAFS.

Dr. Tomoko Ohnishi (Univ. of Pennsylvania)

(1989年11月16日)

The cytochrome b c_1 segment of the mitochondrial respiratory chain contains a binuclear iron-sulfur cluster which has unusual physico-chemical properties, namely, a unique EPR signal (q_{x*y*z} = 1.80, 1.90, 2.03) and an atypically high redox midpoint potential (150 − 330mV). Recently the

involvement of one or two nitrogen ligands in this Rieske-type(2Fe－2S) cluster has been reported based on the chemical assay and various spectrocopic analyses, such as EPR, Mossbauer, ENDOR and resonance Raman, of isolated Thermus thermophilus HB-8 protein by Fee and his collaborators. In collaboration with Drs. Gatti and Tzagoloff in New York and Dr. Meinhardt in my laboratory, I have studied 11 yeast respiratory defective mutants with replacement of a single amino-acid residue in the Rieske iron-sulfur protein. Thermodyn namic and EPR analyses of these mutants have been helpful in delineating the active domain of the protein and have suggested a possible model of the catalytic center (Cxxxxc.....cxxH). Similar iron-sulfur ligand strudture was favored by EXAFS studies of the isolated bovine heart Rieske iron-sulfur protein.

Why does a mouse drink? — Search for mechanisms of the polydipsia in the inbred mice.

Prof.Kiyomi Koizumi (State Univ. of New York)

（1989年12月19日）

小泉喜代美教授は，米国神経生理学界のトップレベルにある方ですが，故 Brooks 教授と教科書を執筆されるなど，医学教育の面でも大活躍をされております。今回サバティカルで来日されたのを機に講演をお願いしました。

Separation and Characterization of Neuropeptide-Inducing Factors in Heart Cell Conditioned Medium.

那波宏之（京都大学　医学部　免疫研）

（1990年１月８日）

An intriguing question regarding neuronal development is how neurons choose which neurotransmitter/peptide to express among over 40 candidates. Heart cell conditioned medium contains at least three different peptide-inducing factors : one induces acetylcholine, substance P somatostatin and VIP while supressing neuropeptide Y and catecholamine expression, a second factor induces only VIP, and a third factor induces only somatostatin. These observations suggest the possibility that many, distinct, diffusible factors can influence the choice of transmitter/peptide phenotype in developing neurons.

EFFECTS OF BEHAVIORAL STATE ON NEURONAL RESPONSES IN MONKEY VISUAL CORTEX.

Dr. John H. R. Maunsell

Department of Physiology and Center for Visual Science. (Univ. of Rochester)

(1990年1月29日)

Many neurons in the sensory regions of cerebral cortex become more or lese active depending on the animal's attention or behavioral state. In the visual cortex of the macaque monkey, effects of attention are seen even in relatively early stages of extrastriate visual cortex. We have been recording the activity of isolated neurons in area V4 in trained, behaving macaque monkeys in order to further characterize behavioral effects.

Monkeys were trained to perform an orientation delayed mach-to-sample task. When the animal performs this task some V4 neurons change their level of response depending on which orientation the animal is looking for. For example, a particular neuron might be active during all trials in which the animal is looking for vertical, but not during trials in which he is searching for horizontal. We have been able to show that many of these neurons have a degree of task specificity, in that they are silent during stimulus presentations while the animal fixates passively, without performing the matching task. We have also been able to show that changes in activity during the matching task occur regardless of the modality used to provide the sample orientation. In light of this, we believe that such cells are encoding a form of symbolic representation of the orientation being sought, rather than a sensory representation of the sample stimulus.

Axon-Schwann cell interaction in the squid : wider implications for neurone-glial signalling.

Dr. Nancy J. Abbott (King's college, University of London.)

(1990年3月14日)

ロンドン大学の生理学研究室の副教授 N. J. アボット博士が学術振興会の招へい研究者として来日された機会に表題のようなセミナーをお願いしました。同博士は Plymouth 臨海実験所のグループリーダーも兼ねています。神経細胞とシュワン細胞の相互作用がテーマですが，広くニューロン，グリア間相互作用の一環としてお話して頂きました。これまで，さほどその生理機能が明らかでなかったシュワン細胞，グリア細胞が積極的に神経細胞周囲の K^+ を吸収したり，グルタミン酸を放出して神経細胞活動を調節すること等，数々の興味ある知見の発表がありました。

PLASTICITY IN THE BASAL GANGLIA

Dr. S. T. Kitai (The University of Tennessee)

(1990年 3 月29日)

Plasticity in the basal ganglia will be presented in terms of : (1) morphological and physiological events associated with the cortical innervation to the grafted embryonic neostriatal tissue in the a dult neostriatum, (2) innervation patterns and cellular compositions of the embryonic nigral tissue in the neostriatum. (3) deveropmental pattern of the neostriatal transmitters in primary monolayer culture preparation, and (4) ionic currents and firing patterns of neostriatal neurons in *in vitro* slice or tissue culture preparation studied with intracellular recording or a patchclamp method. Significance of these findings will be discussed in terms of physiological function and clinical therapeutic approach to the basal ganglia.

〈お別れセミナー〉

大脳皮質 GABA ニューロン： Golgi, EM, Immunocytochemistry

小坂俊夫（生理研　液性情報）

近年，神経細胞の化学的性質についての知見が増大したことにより，神経系を考える上で従来の純形態的分類とは異なる視点である化学的性質に基づく神経細胞の分類も可能になりつつあるように思われる。GABA は中枢神経系における主要な抑制性神経伝達物質であり，GABA ニューロンは中枢神経系全般に広く分布し，各部位での情報処理に重要な意味を持っていると考えられている。本講演では我々が進めている大脳皮質（新皮質，海馬，嗅球）における GABA 系について，共存している他の神経活性物質，特殊なカルシウム結合蛋白等，更にレクチン，単クローン抗体等により認識される特定の細胞群の細胞表面近傍の特殊物質等を免疫細胞組織化学によって示し，そのようないわば化学的マーカーを用いて GABA ニューロンを subpopulations に分類する試みを示した。

「座骨神経移植による視神経線維の再生」

福田　淳（生理研　高次神経機構）

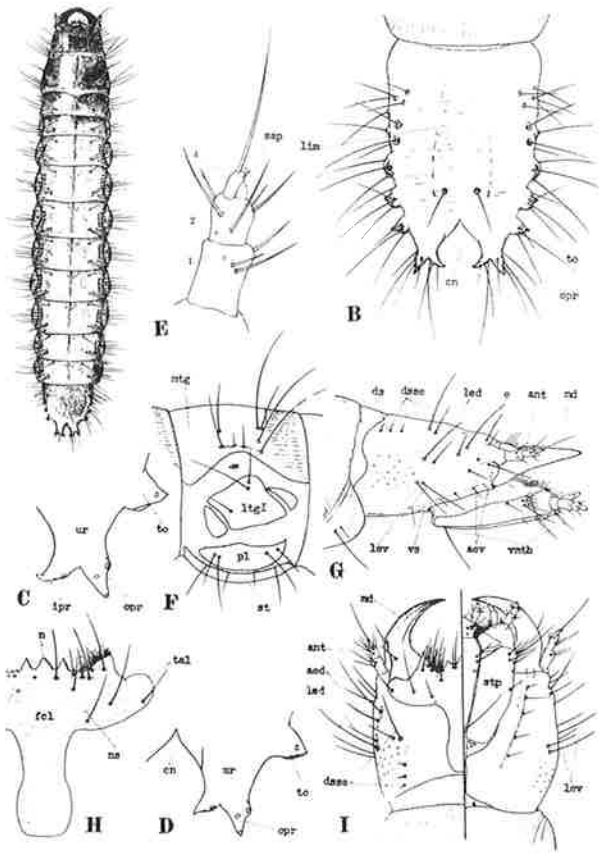
成熟哺乳動物の視神経を切断して坐骨神経を移植することによって軸索再生が起こり，さらにその再生軸索終末は一次中枢である上丘のニューロンとあらたにシナプスを形成する。モントリオールのアグアヨー教授らとの共同研究により，その再生した網膜－上丘シナプスが生理学的に機能することを示してきた。しかし，正常の上丘ニューロンに比べると，再支配を受けた上丘ニューロンの光反応性は弱く，光受容野を同定できないものがほとんどであった。そこで，今回は再生した網膜神経節細胞を逆行性軸索流を用いて全伸展標本上で同定し，その樹状突起の形態学的特徴を調べ正常とは異なったさまざまの形態所見を確認することができた。さらに，移植片断面を電子顕微鏡的に観察し，再生軸索がかならずシュワン細胞の細胞質か基底膜に接触していることを明らかにした。この観察と，移植片の抗ラミニン抗体による免疫組織化学法による観察は，視神経の軸索再生には坐骨神経の基底膜にあるラミニンが重要な役割を演じていることを示唆している。

コメツキムシの世界

大平仁夫

私は終戦後の混乱がまだ続いていた昭和22年４月に岐阜にある財団法人名和昆虫研究所に入所した。昭和24年２月に東京農業大学昆虫学研究室へ，昭和27年４月に愛知学芸大学（現在の愛知教育大学）へ転任した。昭和５３年４月に生物科学総合研究機構生理学研究所へ配置換になり，技術課長として研究所の創設に参画，技術課の研究支援体制の整備にあたってきた。そしてこの３月末日で停年退職をすることになった。

私が名和昆虫研究所に入ったのは，そこで昆虫の研究をしたかったからである。最初はチョウ類やトンボ類を手掛けたり，ガ類の専門家になろうと思って文献を集めたりしたが，独学で基礎知識がないために，どれも少し深くやろうとすると種々の壁につきあたり，能力の限界を知らされた。そこで，もう一度基礎からやり直すつもりで東京農業大学昆虫学研究室へ入った。



演者自筆のコメツキムシ幼虫の形態図

１種ごとに詳細な図を書き，80種書き上げるのに５年間かかった。

私は研究室の裏にある物置を改装して，そこで自炊生活をした。その頃でもまだ食糧難が続いていたので，飢をしのぐために農場の一部を借りて小麦や甘藷を作った。午前中は研究室で，午後は畑仕事という生活であった。ある日，畑を耕していると土中よりコメツキムシの幼虫が出てきた。先生は「この虫の研究は日本では大変おくれている。君，これをやってみないか」と言われたのが，この研究をライフワークとするきっかけになったように思われる。

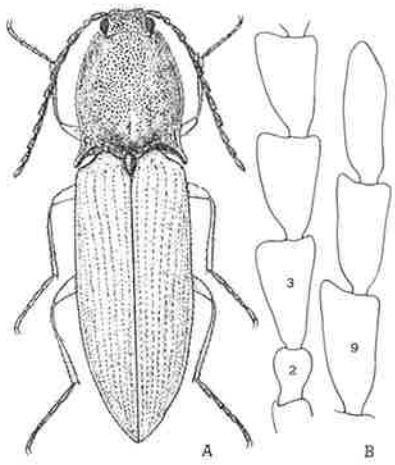
昭和27年に昆虫学研究室の主任教授が愛知学芸大学へ転任になったので，私も教授の手伝いをするため，そこに移った。それから10年ののち，昭和37年２月に「日本産コメツキムシ科幼虫の形態学的並びに分類学的研究」がまとまり，東京農業大学で農学博士の学位を得た。その後，昭和41年８月に第一次八重山諸島自然科学調査団を結成，当時まだ米国の統治下にあった琉球列島の調査を行った。この調査団（主として愛知教育大学の学生とそのOBで結成）は第三次より「東南アジア自然科学調査団」に名称を改め，昭和48年までに第六次まで行った。調査範囲は琉球列島，韓国，台湾，香港，タイ，マライ半島，シンガポール，インドネシア，ボルネオ島に及んでいる。これらの調査活動は，その後の私の日本のコメツキ相の構成要因を考えて行くうえでの重要な糧になっている。

コメツキムシの幼虫は土壌中や朽木中に生息し，主として捕食性である。幼期の短いものは１～２年で成虫になるが，通常は３～４年，長いのは10年近くもかかるのがいて，生息環境によっても若干の長短は生ずるが，長期間の飼育は容易ではなく，生息場所は人目にふれない所なので，採集することも簡単ではない。

私が研究に着手した昭和24年当時，日本でコメツキムシの幼虫は不完全なものも含めて20種足らずであったが，私は80種あまりを明らかにした。幼虫の生息場所は，外国の類似種の生態などから判断したり，成虫の行動などから推察したり，暇があればシャベルでこれと思う場所の土を掘りかえしたり，朽木をくずしたりして探しまわった。前述のように長期間の飼育が困難なので，見出された幼虫のうちで老熟に近い個体を選んで飼育，成虫にして確認した。

昆虫の幼虫期は，成虫になる一過程で，各部の形質の分化の究極は成虫に現れるが，その分化途上にある幼虫の形態を調べることによって，相互間の類縁関係がより具体的に推察できる。しかし，幼虫の各部の分化は成虫のように発達していないため，体表面に生ずる毛の位置，点刻，感覚孔，しわの一つ一つまで重要な意味を有することが多いので，まず詳細な形態図を作らねばならない（第１図参照）。環境，研究費，生活などさまざまなハンディと闘いながらの日常であった。生活費は最小限にきりつめ，すべてをこの研究にあてた。そのような日常の中で少しずつ明らかになって行くコメツキムシの世界への夢と創造と発見の喜びは，私の青春の生きがいでもあった。そして，日本のコメツキムシの幼虫による最初の系統表を作成した。この研究は世界のこの仲間の研究者間でも高く評価され，今でも幼虫の研究では必ずといってよいほど私の論文が引用されている。

一方で，成虫の分類も日本産の種では世界の水準からかなりおくれた状態にあったので，成虫の分類も手掛けることにした。私が幼虫の研究を始めた当時は，日本産の種は約250種であった。



演者自筆の新種記載の原図

(*Actenicerомorphus nipponensis* Ôhira, 1973)

現在では600種近い種が判明していて，日本に産すると思われる全種の80％くらいは明らかになったと判断している。私のこれからの課題は，幼虫で私が構築した系統図と成虫で構築された系統図を統一させ，私なりのコメツキムシの全体図（曼陀羅図）を画きあげ，後世へ申し送りをすることであると思っている。また，それが今まで私を支援していただいた方へ報いる道であると思っている。

私はこの研究所にきて本当によかったと思うことは，学術研究の実体を肌で感じることができたことで，この経験は今後の私のコメツキムシの研究をまとめるうえでの大きな支えになって行くものと思われる。

江橋所長などが言われたように，私の表の顔は技術課長であり，裏の顔の一つはコメツキムシ研究者の顔であったと思われるが，着物でも裏地があって表地が生きるのであって，それぞれのもつ役割は異なっても，物事を仕上げていく過程では共通するものがあって，私がこの研究所にきて少しでも役立つことがあったとすれば，このことではなかったと思われる。しかし，色々と皆様にご迷惑をおかけしたことも多かったと思われるが，皆様のおかげで無事退官の日を迎えることができ，心から御礼申し上げる。

皆様色々お世話になり有難うございました。

『生理研セミナー　脳の細胞生物学』

Axonal guidance in vivo and in vitro.
（Friedrich Bonhoeffer　マックス・プランク研究所）…… 455

神経移殖研究の現状と展望
（高坂新一　国立精神神経センター）…… 455

Reverse Genetics ― Duchenne 型筋ジストロフィーを中心に―
（杉田秀夫　国立精神神経センター）…… 455

Microdialysis の適応と限界
（加藤　武　横浜市立大）…… 456

哺乳動物中枢神経ニューロンにみられる 4 種類の Ca 電流
（赤池紀生　東北大）…… 456

「脳の細胞生物学」

Axonal guidance in vivo and in vitro

Friedrich Bonhoeffer (Max－Planck 発生生物学研究所 Tubingen)

（1989年７月８日）

Borhoeffer 教授は実験核物理学，大腸菌の分子遺伝学を専攻後，発生神経生物学に転じ，現在，網膜視蓋投射の形成機構の解析における第一人者である。胚および培養において神経がどのように標的を選択するかをしらべるには，少数の神経をラベルして追跡する必要があるが，氏はこれに超高感度 SIT カメラや蛍光色素 diI を用いた先駆者である。これらの他にも多くのアイデア，装置を考案，駆使している。本セミナーではこれらを総合した研究成果と分子メカニズム，特に抑制因子の役割が述べられた。

神経移植研究の現状と展望

高坂新一（国立精神・神経センター神経研究所）

（1989年10月16日）

1970年代より飛躍的な進展を遂げてきた神経移植技術は，神経科学のさまざまな研究分野で広く応用され，多くの研究成果があげられてきた。中でもパーキンソンモデル動物へのカテコラミン産生組織，あるいは細胞を移植し行動改善が見られたとする仕事はその代表的なものである。しかしこれらの研究が進められてきた過程で脳における移植免疫機序あるいはドナーとしての遺伝子導入細胞の必要性など新たな問題点が数多く指摘され始めている。本セミナーではこれらの問題点につき演者らが行っている研究を例にあげ論じた。

Reverse Genetics ―デュシャンヌ型筋ジストロフィーを中心に―

杉田秀夫（国立精神・神経センター神経研究所）

（1989年10月26日）

従来遺伝性疾患研究は，原因となる蛋白質を発見し，これを出発点として遺伝子異常を突き止める方法，即ち "Forward Genetics" が主であったが，原因となる蛋白質が全くわからない遺伝性疾患に対し，まず遺伝子座を決定し，次いでその遺伝子がコードする蛋白質を明らかにするという "Reverse Genetics" が昨今の遺伝子工学の進歩により可能となった。本セミナーでは演者ら

が研究しているデュシャンヌ型ジストロフィー (DMD) をモデルとして "Reverse Genetics" について概説した。

Microdialysis の適応と限界

加藤武（横浜市立大）

（1989年11月27日）

最近 in vivo brain dialysis 法が広く用いられるようになった。これまでは動物を殺して脳内の神経伝達物質量の変化を調べていたため，神経活動による伝達物質の生合成量と放出量とを区別することができなかった。放出量を測定する方法として push-pull や in vivo voltammetry, そして近年登場した PET,MRI などがある。

push-pull 法は脳内で分泌されるあらゆる物質を集めることができ，大変有用な方法である。しかし，技術的に多くの困難があり，一般には使用されていない。これに代わる簡単な方法として， in vivo brain dialysis 法が登場した。本セミナーでは演者らが使用している透析チューブの作りかた，これまでに測定された物質，そしてこれからの研究方法と限界について演者らのデータを示しながら述べる。

哺乳動物中枢神経ニューロンにみられる 4 種類の Ca 電流

赤池紀生（東北大・医・病態生体情報学）

（1990年 2 月26日）

演者らは脳虚血に脆弱性を示すラット海馬 CA1 領域の錐体細胞に T, N や L 型とは全く異なる第 4 の膜電位依存性 Ca 電流を発見した。

本セミナーでは，まず① CNS ニューロンにみられる T 型 Ca チャネルが末梢のそれと比較するとき，有機 Ca 拮抗剤に対して非常に違った感受性を有することについて N や L 型 Ca チャネルでの結果も含めて introductory に紹介した。引き続き②第 4 の Ca コンダクタンスについて，そのチャネルの CA1 領域における解剖学的局在，電気的膜特性，薬理学的性質， T 型 Ca チャネルとの位置的からみあい等に関して詳細に解析し，その生理的役割について考察した。

〈昼食セミナー〉

細胞表面膜の起電性 Na−Ca 交換は，連続か？同時モデルか？

李　金鳴

（1989年 4 月10日）

担体を介する Na と Ca イオンの交換は，連続的（ピンポンモデル）か，同時に起きるのかを調べるため，モルモット単一心室筋細胞の Na−Ca 交換電流をホールセルクランプ法で測った。外向き電流のみ発生する系で，細胞内 Na 濃度を増やすと，細胞外 Ca の Km 値は大きくなるが，Km/imax 値は変化しなかった。この結果は連続モデルを支持する。

雌ザルの中枢性性行動調節機構

粟生修司

（1989年 4 月17日）

雌の性行動の中枢性調節機構はラットのロルドーシス反射で詳細に解析されているが，この行動は受身的な反射行動であり，性行動の一部の成分にすぎない。サルではパートナーの識別過程および能動的な自発性行動を含めてニューロンレベルで解析することが可能である。今回は雌ザル視床下部の性行動 (Presenting) 中のニューロン活動ならびに視床下部および中脳刺激により誘発される Presenting の性質について述べ，さらに性行動と摂食の相互調節系について考察した。

組換体レトロウイルスによる心筋細胞系譜の解析

三川　隆

（1989年 5 月 1 日）

心筋は心房筋細胞，心室筋細胞および伝導系細胞の少なくとも 3 種類の分化細胞から形成されている。発生過程において各細胞の由来は不明である。Cornell Univ. Med. College で試みている組換体レトロウイルスを用いた心筋細胞の細胞系譜解析の中間報告をした。

超高圧電顕立体写真と平行投影近似

有井達夫

（1989年５月８日）

一般に電顕立体写真では平行投影近似が成り立つことが知られている。この近似の有効性は超高圧電顕立体写真を三次元画像解析するときの座標値の精度に直接影響するので実験的にこの妥当性を検討し照射条件との関連においてその適用限界をあきらかにした。

特異的モノクローン抗体を用いた培養網膜神経細胞の解析

赤川公朗

（1989年５月22日）

ラット網膜の single cell suspension を得た後，単層培養及び再凝集培養を作製した。この系に，網膜の各細胞種を特異的に認識するモノクローン抗体を用いて，細胞同定，性質の検討をした。その結果，再凝集培養系では， in vivo に類似した組織様構築が認められた。

脳はいかにして音の方向を知るか？

藤田一郎

（1989年５月29日）

眼をつむって耳をすまして下さい。生理研下の坂道をのぼる車の音や，隣の部屋のタイプライターの音が聞こえてくるかも知れません。脳はどのようにして，これらの音の来る方向を知るのでしょうか。その情報処理過程において脳が解決しなくてはならない問題を概説し，特に，その問題解決に神経細胞の活動の“抑制”がどのような寄与をしているかを述べました。主人公はメンフクロウという美しい鳥です。

DMSO による蛋白質分画

江橋節郎

（1989年６月５日）

蛋白質精製の古典的方法は，塩（硫酸アンモン）によるものと，有機溶媒（アルコール，アセトン）を用いるものに大別できるが，偶然の機会に， DMSO が広範に応用できる優秀な材料で

あることを見出した。

網膜における遠心性神経線維

大塚輝彌

（1989年 6 月19日）

魚類網膜の遠心性神経線維は LHRH や FMREamide などの抗体に陽性反応を示す。我々（大塚，河又）は細胞内染色法と免疫電顕法を用いて，この遠心性神経線維がシナプス結合する網膜神経細胞を明らかにした。

クロロマフィン細胞におけるエキソサイトーシスの動態

樊　津紅

（1989年 6 月27日）

あなたは講演をしようとしてドキドキしたことはありませんか？このドキドキは副腎からのアドレナリンの放出によっておこるのです。セミナーでは，そのときのあなたの副腎髄質細胞にどのようなことが起こるのかをビデオでお見せします。用いた画像処理光学系は，単一細胞の分泌活動を最も高い感度で定量的に，かつ，長時間連続的に測定することを可能にし，また，分泌の最小単位であるエキソサイトーシスのダイナミックな解析を可能にします。内分泌組織の活動に伴って生ずる散乱変化と同じ光信号が培養した単一のクロマフィン細胞においても発生することが分かり，それがいわゆるエキソサイトーシスそのものに起因することが結論できました。分泌顆粒は分泌準備のために常に揺動しており，顆粒の膨張は開口の結果起こること，カルシウムは開口を直接引き起こしているのではないことなどが示唆されました。分化したクロマフィン細胞の神経終末部における開口放出についても併せて報告しました。

機械エネルギー変換及び有毛細胞への遠心性神経支配機構

大森治紀

（1989年 7 月 3 日）

電気生理学及び Ca 画像法によって明らかにした有毛細胞トランスデューサー機能をまとめ，更に Ca 蛍光顕微測光によって明らかにした，ムスカリン性の抑制性神経支配機序を考察した。

雄ザル性行動における中脳の関与

岡田英一郎

（1989年 7 月24日）

本部門の先の実験結果，雄ザルの視床下部の電気刺激で，性行動の要素であるタッチング，マウンティング，そしてスラスティングが誘発されることが示された。わたしたちは，視床下より下位の中脳の電気刺激でもタッチング，マウンティングが惹起しうることを見出した。

Functional attributes of chemosensitive neurones in the monkey forebrain : Glucose sensitive and glucose insensitive neurones.

Zoltan Karadi

（1989年 9 月11日）

The lateral hypothalamic area (LHA) and amygdaloid body (AMY) are intimately involved in the feeding regulation,partly through their specific,so called glucose sensitive (GS) neurones whose activity changes in response to a broad variety of endogenous and exogenous chemical and other sensory signals. Differential attributes of the GS and the glucose insensitive (GIS) neurones were discussed.

ラットの末梢神経におけるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) の軸索輸送

樫原康博

（1989年 9 月18日）

CGRP は，感覚神経・運動神経を含む多種の神経細胞体に存在し，神経筋接合部においては栄養因子的効果を発現することが示唆されている。我々は，高感度酵素免疫測定法による CGRP の定量法を開発し，末梢神経における CGRP の分布と，その軸索輸送速度を測定した。その結果，感覚神経・運動神経いずれにおいても CGRP は細胞体から正向性に約 1mm/hr で輸送されていることが明らかになった。

Autoimmune demyelination in the central mervous system.

German A. Roth

(1989年 9 月21日)

Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) is a suitable animal model for studying pathologic and immunologic mechanisms involved in autoimmune demyelination in the CNS. We studied the CNS lipid alterations occurring during the course of the disease, effect of immunosuppressive agents, alterations induced in organotypic CNS tissue cultures by antibodies against myelin components, and lately the clinical, immunologic and biochemical differences occurring in two strains of rats with different susceptibility to EAE.

サル覚醒下における視床下部摂食調節機構の検討

高木厚司

(1989年 9 月25日)

これまでの実験から内側視床下部は，摂食抑制系が存在すると推測されているが，その実験の困難さから in vivo での神経学的な機能解明は充分とはいえない。そこで，今回オペラント摂食課題を訓練した雄アカゲザルを用い空腹・満腹状態での電気および化学刺激の効果を観察し，同時に摂食課題遂行に関連した神経発火活動パターンと視床下部内外側で比較検討した。

Transmitter Action at Cat Retinal Ganglion Cells.

James E. G. Downing

(1989年10月 6 日)

We have begun to examine the neuropharmacological basis of the different receptive field properties of cat retinal ganglion cells (GCs), using whole cell voltage clamp recordings from acutely dissociated adult tissue. Sub－classes of physiologically characterised GCs have been determined on the basis of (I) their soma diameters and (II) their projection to central visual nuclei (lateral geniculate and/or superior colliculus). Data are presented from a screen including GABA, Glycine, Acetylcholine and Glutamate. The sensitivities of all categories of GCs, prepared from peripheral retina was found to be similar. In contrast to results for the inhibitory transmitters, desensitisation of the current responses to acetylcholine and glutamate were essentially dose-independent. The former underwent rapid desensitisation, even at threshold doses. The latter was characterised by sustained

inward currents, even in the presence of mM glutamate. The possible contribution of these receptoral properties to the shaping of sustained and transient retinal signals was discussed.

反動物実験の論理と動物実験の倫理

尾崎　毅

（1989年10月11日）

最近我が国においても，動物実験をめぐって様々な反動物実験の主張や，明瞭な動物実験反対の行動が表われるようになってきました。一方研究を遂行する側には動物実験の倫理性が求められていますが，両者の間には大きな溝があるように見えます。今回は，動物実験反対運動の主張する論点と立場について考えてみました。

冷血動物網膜はヒトの網膜のモデルになり得るか？——マウスとキンギョの網膜双極細胞のカルシウム電流と薬理学的性質の相違——

金子章道

（1989年10月16日）

網膜の研究には旧くから魚類の網膜が好んで用いられてきた。キンギョの網膜は細胞が大きいこと，色覚が発達していることなど優れた実験材料であることはいうまでもない。しかし，最近，われわれはマウスの網膜から単離した双極細胞を調べたところ，さまざまな点でキンギョの細胞とは異なっている性質を見出した。視覚機能との関連で，これらの相違点を考えてみた。

可塑性の神経化学を始めるにあたって

小幡邦彦

（1989年10月23日）

キンドリングは弱い刺激をくり返す全身けいれんを起こすようになって，これが生涯残る状態で脳の可塑性のモデルとみなすことができる。

内側中隔核を刺激して作成したキンドリング・ラットの海馬につき，①蛋白質の二次元電気泳動，②ペプチド含有ニューロンの免疫組織化学，③特異的 mRNA の検索を計画している。

GLUTAMATE RELEASE FROM VERTEBRATE PHOTORECEPTORS

George S. Ayoub

(1989年10月30日)

Release of the endogenous transmitter, glutamate,was measured from individual cone photoreceptors using a microfluorometric technique. The release observed was elicited upon depolarization of the cone with extrinsic current,and was detectable simultaneous with stimulation of the cell. Depolarization-induced release of endogenous glutamate was from the synaptic pedicle of the cells, and this release decreased with subsequent stimulations. The fluorometric technique employed for glutamate identification was described,in addition to a presentation of the data obtained from photoreceptors.

ネコ網膜神経節細胞の電圧依存性チャンネル

金田　誠

(1989年11月 6 日)

蛍光色素の脳内注入によって逆行性にラベルしたネコ網膜神経節細胞をパパイン処理により単離し，パッチ電極を用いた電圧固定法によって電圧依存性の膜イオン電流を解析した。神経節細胞は細胞体の大きさによって 2 群れに大別出来たが，そのいずれにも I_{Na},I_K,I_{Ca}, の各電流が存在した。しかし I_{Na}の不活性化からの回復時間は大型細胞では速く，小型細胞では遅かった。I_{Na}が W, X, Y 細胞の情報変換機構にどのように関係しているのか考えてみた。

Caチャンネルのリン酸化による調節：再構成チャンネルを用いた生化学的アプローチ

亀山亜砂子

(1989年11月13日)

L－type Ca チャンネルは心筋をはじめ他の細胞でも A－ キナーゼ (C－AMP dependent protein kinase) で調節を受けていることが知られている。精製された骨格筋の Ca チャンネルは A－ キナーゼによりリン酸化を受けることが in vitro 実験で確立しているが，心筋においては Ca チャンネルのリン酸化は示されていない。むしろ，ニワトリの心筋 Ca チャンネルはリン酸化を受けないとの報告がある。Ca の flux を調節する A－ キナーゼは本当に Ca チャンネル自体をリン酸化するのか，またリン酸化されるとすればサブユニットのどの部分なのかを牛心筋 Ca チャンネ

ルの再構成リポゾームを用いて調べたので報告した。

被殻，淡蒼球を可逆的にブロックした時の運動異常と大脳基底核の機能

加藤　誠

（1989年11月20日）

大脳基底核は，運動制御のどのような側面に関係しているのかよくわかっておらず，近年，発展の著しい運動制御の神経モデルには運動関連領野や小脳は含まれていても基底核が含まれることは少ない。そこで，本研究では，サルに step tracking task を行わせて，基底核の入力，出力部位にあたる被殻，淡蒼球内節に，抑制物質であるムシモールやこれらの部位での興奮性伝達物質グルタメイトの拮抗薬であるキヌレン酸を注入し，運動の異常，変化を調べた。被殻のブロックでは，運動中の拮抗筋活動が高進し，淡蒼球のブロックでは，運動の正確な停止ができなくなった。これらの結果と基底核の回路から，運動制御の神経モデルとの関連について考察してみた。

Ca チャンネルはなぜ rundown するのか？

亀山正樹

（1989年11月27日）

電位依存性 Ca チャンネル電流が実験中に減少，消失することは多くの Ca チャンネル研究者が経験するところである。我々はこの rundown 現象が Ca チャンネルの調節機構に深く関係しているとの想定のもとに，この現象の解明に取り組んでいる。本セミナーでは，心筋 Ca チャンネルの inside-out パッチにおける rundown と，その背後にあるチャンネル調節機構を中心に話題を提供した。

シュワン細胞による軸索外表面 K イオン濃度の調節

久木田文夫

（1989年12月 4 日）

無髄神経線維であるイカ巨大神経線維の周りには巨大なシュワン細胞層が取り囲んでいる。このシュワン細胞は，「脳のグリア細胞の働き」との類推により，神経活動により変化する軸索外表面 K イオン濃度を調節する作用があると推定されている。この仮説のもとに現在進めている実験について紹介した。

運動神経終末端の発芽形成と機能的可塑性

久野　宗

（1989年12月18日）

末梢神経の伝導を慢性的にブロックすると，その麻痺筋の運動神経の終末端に発芽が形成され，その神経筋接合部における伝達物質の放出量は増加することが知られている。両者には因果関係があり，伝達物質の放出増加は発芽形成の機能的反映と仮定されている。詳細に検討すると，両者に因果関係は存在しなかった。

消化管の“小さな脳”について

桑原厚和

（1990年１月22日）

消化管には，中枢神経系に匹敵する数の神経細胞が存在している。この神経系に対して，自律神経系という言葉を提唱したJohn Newport Langleyは，交感，副交感神経系から独立して，腸管神経系という名称を与えた。各種の消化管機能は，基本的には，中枢神経系から独立してこの腸管神経系により制御されていると考えられている。最近，消化管の消化吸収分泌機能や内分泌免疫機能と関連して，腸管神経系の重要さが注目されつつある。今回は，消化管粘膜でのイオン輸送を指標として，腸管神経系の働きについて紹介した。

抗 PKC モノクローン抗体を用いた網膜双極細胞の分類

鈴木参郎助

（1990年１月29日）

我々の研究室ではキンギョやマウスの網膜から単離した双極細胞を用いてその電位依存性膜電流や伝達物質による応答膜電流の特性を検討してきた。双極細胞には脱分極性の光応答を示すものと過分極性の光応答を示すもの，杆体から入力を受ける細胞と錐体から入力を受ける細胞などいくつものサブタイプがある。しかし，単離後はサブタイプを確認することは極めて困難である。今回，双極細胞のPKC様免抗反応性を検討し，単離双極細胞の分類を試みたので紹介した。

サブトラクション法を用いて作製したcDNAライブラリーより脳の機能分子を探る試みーラット海馬でキンドリング形成により増加する分子はあるか

児島伸彦

（1990年2月5日）

脳は，他の臓器に比べて構成面でも機能面でも多様でありmRNAの種類も多い。その中には，あるニューロンのサブタイプでのみ発現されるもの，またある特定の発生時期あるいはある生理的条件下で発現されるものが数多く含まれている。この種のmRNAから翻訳される分子は脳の中で重要な生理機能を持っていると考えられるが，個々のmRNAは脳で発現されるmRNA全体の中では微量であり，検出，同定することが難しい。一方ある特定のcDNAを効率よく単離する手段として，そのcDNAを含むライブラリーから含まないライブラリーをサブトラクト（差し引き）する方法があり，神経科学の分野にも応用され始めている。今回はその具体的方法についてを，我々が現在作製しているキンドリングを形成したラット海馬のcDNAライブラリーを例として解説し，現時点までの進行状況を報告する。

イモリ単離嗅細胞における匂い情報変換機構

倉橋　隆

（1990年2月20日）

脊椎動物は，鼻腔内嗅粘膜に存在する嗅細胞で匂いを受容する。イモリからコラゲナーゼ処理を用いて単離した嗅細胞にホールセル記録法を用いて，匂い物質（アミルアセテートやリモネン）に対する応答の解析を行ったところ，受容器電位の発生には陽イオン選択性チャネルが関与していることが明らかとなった。ところで近年，嗅覚情報変換にアデニレートシクラーゼーcAMP系が関与しているとする仮説が提唱されている。その仮説を検証するため，イモリ嗅細胞にパッチ電極からcAMPを注入したところ，顕著な電流応答が観察され，その応答には1）感受性の繊毛部位での局在性，2）アルカリ金属イオンに対する透過性比や3）Ca依存性の脱感作など，匂い物質によって誘起される応答との間に特徴的な類似性が観察された。この結果からcAMPが匂い情報変換のセカンドメッセンジャーである可能性が強く支持された。

ヒヨコ蝸牛有毛細胞における ACh と ATP による Ca 応答と電気的応答

重本　尚

（1990年 2 月26日）

有毛細胞は抑制性遠心性線維の神経支配を受けており，ACh がこのシナプスの伝達物質であることが示唆されている。Fura－2 を用いた細胞内 Ca 濃度の測定では，ACh は有毛細胞においてムスカリン性受容体を介して，細胞内貯蔵部位からの放出による Ca 濃度の増大（Ca 応答）を起こした。1 μM CGRP を 1 時間作用させると，ACh による Ca 応答の大きさは 3 倍に増大した。電気的には ACh は K channel を活性化することにより過分極応答を起こした。ACh との共存がコリン作動性シナプスで知られる ATP は，2 相性の Ca 応答を生じた。Ca－free 溶液中での実験は，速い応答は Ca 流入を，遅い応答は細胞内貯蔵部位からの Ca 遊離を示唆した。

Simultaneous ultrastructural localization of vasoactive intestinal polypeptide and acetylcholine—like cation in rat endocrine pancreas.

Philippe Anglade

（1990年 3 月 5 日）

Vasoative intestinal polypeptide (VIP) and acetylcholine (ACh) are neurotransmitters playing a major role in the pancreatic functions, among them the control of hormonal secretion. Moreover, a neurosecretion in endocrine pancreas (in particular VIP neurosecretion) has been postulated.

Here, we used a method allowing ultrastructural localization of both VIP and ACh-like cation. We found that the Vip immunoreactive nerve endings also contained ACh-like cation, while a part of nerve endings displaying ACh-like cation did not show any VIP immunoreactivity. Almost all the VIP-immunoreactive nerve terminals were in contact with endocrine cells but not in the next vicinity of blood vessels. However,some nerve terminals containing ACh-like cation were seen in position to release their neurotransmitters towards the blood vessels.

脳下垂体前葉細胞における分泌顆粒の動態

岩瀬範和

（1990年 3 月19日）

電顕などの形態学的研究から，脳下垂体前葉ホルモンの分泌機構はエキソサイトーシスであると考えられ，この分泌促進は，視床下部ペプチドによる分泌刺激が，細胞膜への顆粒輸送を活性

化することによって引き起こされるものと想像されている。我々は，このことを検証するために，生きた細胞に於ける分泌活動をビデオカメラで捉え，そのダイナミックな特性を調べた。その結果，顆粒運動とエキソサイトーシスは，異なる因子によって制御されていることが示唆された。

Kは心筋細胞のNa/Ca交換機構に関与しているか

安井健二

（1990年3月26日）

Na/Ca交換機構の化学量論比は一般に種々の細胞で，3Na：1Caであると理解されてきた。しかし最近，salamanderやbovineの眼の桿体外節で，NaとCaの他にもKがNa/Ca交換機構で運ばれ，その化学量論比は4Na：1Ca＋1Kであると報告された。これまでの心筋細胞ではNa/Ca交換電流の逆転電位から化学量論比を求めていたが，Kの非存在下か低濃度の条件下で測定されていた。今回我々はモルモットの単一心室筋細胞でwhole-cell clamp法によりNa/Ca交換電流の逆転電位を細胞内外にKを存在させて測定した。結果はNa/Ca交換機構の化学量論比は，3Na：1CaでありKは関与していないと結論した。

生理学研究所年報　第11巻

印　　刷　平成２年10月31日
発　　行　平成２年11月１日
編集者発行　大　森　治　紀
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
ファクシミリ〈0564〉52－7913