岡崎国立共同研究機構

生理学研究所年報

第 14 巻



1993

はじめに

生理学研究所年報第14巻をお届けいたします。1992年度における生理学研究所の活動のすべてが要約されております。この年度は多くの部門で人事の移動がおこなわれた時期でありました。研究スタッフ、研究テーマを一新したそれぞれの部門では新しい研究の展開をめざしておりますが、まだその成果はこの年報にあらわれておりません。その意味で前の世代の業績のしめくくり的なものとも言えますが、来年、再来年に向けてこの中から伸ばすべきを伸ばし、新しく育ってくるものをはぐくんでゆくためのよすがと致したいと思っております。どうぞご高覧のうえご鞭撻、ご叱正をおねがいいたします。

1993年12月

濱　清

主な職員（1992年度）

所　　長　濱　　清

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（～1993. 3.31）
助　　手	児島伸彦
〃	山肩葉子
〃	鈴木　理（～1993. 3.31）
〃	橋本隆紀（1992. 4. 1～1993. 3.31）
〃	吉川武男（1992. 4. 1～1993. 3.31）
協力研究員	櫻井　孝（1992. 4.20～1993. 1.19）
特別協力研究員	STORK　Oliver（1992. 4. 1～1993. 3.31）
大学院学生	鈴木恵理香
特別研究学生	早川晃一
〃	高橋正紀
〃	小林裕明

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
〃	石川　透（1992. 7. 1～）
協力研究員	鈴木貴祐（1992. 4. 1～1993. 3.31）
外国人研究員	AMMER.　Ute（1992. 9. 1～）

細胞内代謝部門

客員教授	菅野富夫
客員助教授	佐藤洋一（1991. 4. 1～）
助　　手	葉原芳昭
〃	桑原厚和
特別協力研究員	NEVALAINEN Timo（1992. 9. 6～1992.11. 1）
大学院学生	BUSIK. Julia V.
特別研究学生	丹羽光一
〃	大森俊明

細胞器官研究系

生体膜研究部門

教　　授	山岸俊一
助　　手	久木田文夫
〃	古家喜四夫
〃	筒井泉雄
大学院学生	加藤健一
特別研究学生	大林雅春

能動輸送研究部門

客員教授	高井義美（1992. 9. 1～）
客員助教授	貝淵弘三（1993.11. 1～）
助　　手	白瀧博道（1992. 9. 1～）
〃	夏苅直己（～1992. 6.30）

機能協関研究部門

教　　授	岡田泰伸（1992. 9. 1～）
助 教 授	寺川　進（～1993. 4. 1）
〃	老木成稔（1993. 2. 1～）
助　　手	狭間章博（1992.10. 1～）
助　　手	富永真琴（1993. 3.16～）
〃	中山　孝（～1992.12.31）
特別研究学生	上条　篤

生体情報研究系

神経情報研究部門

教　　授	池中一裕 (1992.11. 6～)
助 教 授	大塚輝彌
助　　手	倉橋　隆
〃	中平健祐 (1993. 1. 1～)
協力研究員	鹿川哲史 (1993.1 20～)
特別研究学生	平野穣

高次神経機構研究部門

客員教授	外山敬介 (～1993. 3.31)
客員助教授	平野丈夫 (～1993. 3.31)
助　　手	谷藤学 (～1992. 4. 1)

情報記憶研究部門

助　　手	樫原康博

液性情報研究部門

教　　授	月田承一郎
助　　手	月田早智子
〃	永渕昭良
〃	米村重信
協力研究員	安田宝子 (～1992. 5.31)
大学院学生	武内恒成
〃	佐藤茂樹
〃	石原　悟
〃	竹田　寛
〃	古瀬幹夫
特別研究学生	船山典子
〃	笠原英子
〃	川島明代志

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門

教　　授	彦坂興英
助　　手	加藤　誠
〃	宮下暢夫
〃	宮内　哲
協力研究員	加藤美弥 (1992. 6. 1～)

高次液性調節研究部門

客員教授	丹治　順
客員助教授	渡邊雅彦 (1993. 2. 1～)
助　　手	稲瀬正彦 (1992. 4. 1～)
特別協力研究員	李　葆明 (1992。9. 1～1992.11.30)
受託研究員	岡村宏樹 (1992。12。8～1993. 3.31)
外国人研究員	HALSBAND. Ulrike (1992. 7. 1～)
特別研究学生	進藤勝博

生体システム研究部門

助　　手	山口和彦

統合生理研究施設

高次脳機能研究プロジェクト

教　　授	佐々木和夫
助　　手	松崎竜一

感覚・運動機能研究プロジェクト

助 教 授	南部篤
受託研究員	大城理 (1992。10。1～1993. 3.31)
外国人研究員	FROMM. Christoph (1992.11。1～1993。2。28)

自律機能研究プロジェクト

教　　授	柿木隆介 (1993. 3. 1～)
客員教授	栗城真也

生理機能研究施設

超高圧電子顕微鏡室

助 教 授	有井達夫

組織培養標本室

助　　手	古家園子

生体機能検査室

助手　成瀬　達

特別協力研究員　魏　睦新（1992. 9.14～）

動物実験施設　助教授　尾崎　毅

技術課　課長　南　定雄

研究系技術班　班長　大庭明生

分子生理研究系技術係

技官　内藤知津江
〃　大河原　浩
〃　鍋田弥生（～1993. 3.31）
〃　高木正浩
〃　阿部ゆかり（1992. 4. 1～）
〃　山本友美（1992. 4. 1～）

細胞機関研究系技術係

係長　小原正裕
技官　三輪晃子
〃　小島美香（～1993. 4. 1）
〃　佐藤茂基
〃　村瀬覚哉

生体情報研究系技術係

技官　森　将浩
〃　大石久美子
〃　水谷裕美
〃　関口直美
〃　高須千滋子

生体調節研究系技術係

主任　瀬尾　道
技官　伊藤嘉邦
〃　吉友美樹
〃　戸川森雄

研究施設技術班　班長　小川良齋（～1993. 3.31）

生理機能技術係

係長　市川　修
主任　伊藤昭光
技官　水谷文保
〃　永田理恵子（～1993. 3.31）
〃　吉村伸明

統合生理技術係

技官　永田　治
〃　竹島康行

実験動物技術係

技官　佐治俊幸
〃　小木曾　昇

電子顕微鏡技術係

係長　前橋　寛

工作技術係

係長　加藤勝己
技官　山口　登

1992年度　生理学研究所年報

目　　次

はじめに

主な職員（1992年度）

研究活動報告

分子生理研究系 …… 8
細胞器官研究系 …… 25
生体情報研究系 …… 50
生体調節研究系 …… 66
統合生理研究施設 …… 76
生理機能研究施設 …… 87
動物実験施設 …… 94
技術課 …… 98

研究発表

発表論文 …… 117
学会発表 …… 148

共同研究報告 …… 179

磁気共鳴装置共同利用実験報告 …… 247

超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告 …… 281

生体磁気計測装置共同利用実験報告 …… 307

研究会報告 …… 313

新プログラム国際シンポジウム報告 …… 469

生理研コンファレンス …… 475

セミナー報告

生理研セミナー …… 483
昼食セミナー …… 493

【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 …… 8

概　要

キンドリング脳で増加する物質の分子クローニング
（児島伸彦，小幡邦彦）

シナプス可塑性におけるリン酸化の役割
－キンドリングにおけるリン酸化シナプシンⅠの増加－
（山肩葉子，小幡邦彦）

超微小形態生理研究部門 …… 10

概　要

アンモニウムーパルス実験中のK^+の動態
（村上政隆，瀬尾芳輝，石川　透）

パルス磁場勾配 NMR 法による寒天ゲル内 Na^+の自己拡散定数の測定と動的モデルの検討（瀬尾芳輝，村上政隆）

ラット顎下腺外分泌細胞の血管側外向きＫイオン輸送におけるＫイオンチャンネルの役割（石川　透，村上政隆，瀬尾芳輝）

Investigation of organic anion and cation transport in rat kidney using ^{19}F NMR spectroscopy. (U. Ammer, Y. Seo, and M. Murakami)

細胞内代謝研究部門 …… 17

概　要

膵腺房細胞[1]及び副腎随質細胞[2]の分泌反応と細胞内カルシウム動態に及ぼすクロロブタノールの二重効果（葉原芳昭，藁科　彬，菅野富夫）

モルモット膵腺房細胞刺激－放出関連に及ぼすモルモット VIP の効果[1]
（葉原芳昭，菅野富夫，望月　徹，矢内原昇）

EFFECT OF A RECEPTOR-MEDIATED Ca^{2+} ENTRY BLOCKER,SK&F 96365, ON CALCIUM AND SECRETORY RESPONSES IN RAT PANCREATIC ACINAR CELLS.[1]
(Julia Busik, Yoshiaki Habara, Tomio Kanno)

筋上皮細胞の形態的多様性に関する研究（佐藤洋一，菅野富夫）

細胞器官研究系

生体膜研究部門 …… 25

概　要

小腸絨毛下の筋繊維芽細胞の形態変化と細胞内 Ca^{2+} 反応

（古家喜四夫，古家園子，山岸俊一）

イカ巨大神経 Cl チャネルに対する細胞内 Ca の効果（筒井泉雄，山岸俊一）

麻酔作用及び変性作用から見た Na チャネルの構造（久木田文夫，美宅成樹）

ヤリイカ巨大軸索のシュワン細胞の性質（久木田文夫，ブラウン，E.）

アオリイカの長期飼育（久木田文夫，奥長之助）

モルモット輸精管の収縮特性（加藤健一，筒井泉雄，山岸俊一）

機能協関研究部門 …… 32

概　要

細胞容積調節機構とイオンチャネル（岡田泰伸，挟間章博，久保町子）

多重光学顕微鏡法による神経終末情報伝達の分子機構解析

（寺川　進，熊倉鴻之助）

網膜基底膜の細胞外マトリックスに対する抗体の作製（中山　孝，古家園子）

能動輸送研究部門 …… 45

概　要

smg p25/*rab*3A p25 の標的蛋白質 (Rabphilin) の同定と構造決定

（白瀧博通，貝淵弘三，高井義美）

生体情報研究系

神経情報研究部門 …… 50

概　要

初代培養細胞を用いたグリア細胞特異的遺伝子プロモーターの解析

（中平健祐，池中一裕）

神経発生に異常を示す遺伝子突然変異マウスの解析（鹿川哲史，池中一裕）

シナプス伝達効率長期増強を誘導する MCD ペプチドの作用機序に関する研究（藤本一朗，池中一裕）

錐体視細胞の伝達物質の免疫組織化学的解析（大塚輝彌，平野　穣）

液性情報研究部門 …… 57

概　要

カドヘリン結合タンパク質 α カテニンの異常と癌転移機構

（永渕昭良，月田承一郎）

スペクトリンと結合する 220kDAJ 裏打ちタンパク質の解析（伊藤雅彦，米村重信，永渕昭良，木谷(安田)宝子，月田早智子，月田承一郎）

ラディキシンと結合する膜蛋白質の同定
（月田早智子，大石久美子，関口直美，月田承一郎）
PCR 法によるバンド4.1スーパーファミリーの解析
（武内恒成，月田承一郎）
ラディキシン，モエシン，エズリンのバキュロウイルスを用いた大量産生とそれを用いた各蛋白質の性状の解析
（佐藤成樹，船山典子，月田承一郎）
分裂溝の形成機構に関する分子生物学的解析
（米村重信，永渕昭良，月田承一郎）
タイトジャンクションの構成蛋白質の同定（古瀬幹夫，平瀬徹明，伊藤雅彦，永渕昭良，米村重信，月田早智子，月田承一郎）
自己免疫による心筋炎の病態解析（笠原英子，伊藤雅彦，月田承一郎）
高次神経機構研究部門 …… 62
概　要
大脳皮質視覚野における興奮性神経回路の光学的計測法による解析
（外山敬介，谷藤　学）
情報記憶研究部門 …… 63
概　要
自然細胞死期における運動神経細胞生存維持因子の mRNA の発現
（久野　宗，樫原康博）
生体調節研究系
高次神経性調節研究部門 …… 66
概　要
サルの手続き的記憶学習の成立　－新しい行動課題を使って－
（加藤美弥，彦坂興秀）
誘発電位による CROSSMODAL ATTENTION の研究
（宮内　哲，岡村宏樹，彦坂興秀）
サルの淡蒼球外節神経細胞の視覚刺激と眼球運動に伴う活動
（加藤　誠，彦坂興秀）
生体システム研究部門 …… 71
概　要
培養神経細胞成長突起先端部のＫチャネルに及ぼすアラキドン酸の作用
（山口和彦）
神経突起形態調節における Ca イオン及び神経細胞膜特異的蛋白質 HPC-1 の役割（山口和彦，古家喜四夫，赤川公朗）

高次液性調節研究部門 …… 73
概　要
視床における一次運動野への投射ニューロンと淡蒼球内節からの神経終末の分布の比較（稲瀬正彦，瀬尾　道，丹治　順）
統合生理研究施設 …… 76
概　要
NO-GO 電位の電気生理学的および磁気生理学的研究
（佐々木和夫，玄番央恵，南部　篤，松崎竜一）
聴覚および視覚皮質神経活動の 2 ダイポール解析
（栗城真也，大城　理，竹内文也，小林哲生）
ヒトの高次脳機能の臨床神経生理学的検索（柿木隆介）
視覚始動性反応時間運動に伴うヒト大脳皮質活動の磁場計測
（南部　篤，松崎竜一，玄番央恵，佐々木和夫）
生理機能研究施設
生体機能検査室 …… 87
概　要
Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide の血管拡張作用
（成瀬　達，軒原清史，V. Wray (GBF)）
組織培養標本室 …… 89
概　要
小腸絨毛下筋線維芽細胞，筋層介在細胞，グリア細胞を認識するモノクローナル抗体の作製（古家園子，永田理恵子，中山　孝）
超高圧電子顕微鏡室 …… 90
概　要
超高圧電顕 TV 像の感度と分解能多結晶蛍光体－オルシコン撮像管の場合について（有井達夫，吉村伸明）
動物実験施設 …… 94
概　要
ペプチドの生物学的検定のためのマグヌス法の改良
（佐治俊章，尾崎　毅）
技術課 …… 98
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】

本部門は神経系の組織構築および可塑性の分子機構を明かにすることを目標としており，神経組織に特異的なタンパク質やcDNAをモノクローナル抗体技術と分子クローニング技術を用いて同定し，その構造を決定するとともに，これらの分子の組織内発現の調節様式，培養細胞での発現と作用などを解析することによって，その生理的役割を研究している。

脳可塑性としてはラットのキンドリングを取り上げている。海馬の入力系に弱い電気刺激をくりかえし加えると，その刺激でけいれんが誘発されるようになり，そのけいれん誘発性は一生維持されるので，その分子的基盤を探っている（次の2項目）。また海馬のスライス標本において興奮の伝播様式とmRNA変化との対応を明かにする目的で，東京都神経科学総合研究所関野祐子，福井大学工学部谷藤　学と共同で，膜電位感受性色素を用いた光学的活動計測による解析と活動測定後のスライスに対してin situハイブリダイゼーションを行いc-fosなどの遺伝子発現を調べた。またメタンフェタミンやハロペリドールなどの抗精神薬で行動変化をきたしたラットで，線条体と黒質における神経伝達物質合成酵素のチロシン水酸化酵素と神経栄養因子のmRNAが変化することをin situハイブリダイゼーションで明かにした。また神経細胞の細胞核を特異的に染めるモノクローナル抗体からその抗原分子のcDNAクローニングを行った。

本年度の研究スタッフの異動として，吉川武男が東京医科歯科大学精神神経学教室医員から助手に就任し，抗精神薬投与による遺伝子発現を研究し，平成5年3月に辞職して，米国NIH精神衛生研究所に留学した。桜井　孝（神戸大学医学部生理学教室大学院終了）が特別協力研究員（非常勤の講師）として，長期増強を起こした上丘スライス標本においてプロテインカイネースCサブタイプのmRNAの変化を研究し，平成5年2月辞任して米国ワシントン州立大学に留学した。森本高子（大阪大学理学部大学院終了）が日本学術振興会特別研究員として培養神経細胞におけるシナプス小胞のエクソサイトーシスの細胞生物学的研究に従事し，平成5年3月米国コロンビア大学に留学した。

また児島伸彦助手は平成4年12月文部省在外研究員として米国コロンビア大学に留学した。年度末に赤川公朗助教授は辞任して杏林大学医学部教授に就任し，橋本隆紀助手は辞任して東京都清瀬病院精神科医師になった。ドイツ国Bielefeld大学生物学部学生Oliver Storkが特別協力研究員として滞在し，in situハイブリダイゼーションで黒質網様部ドーパミンニューロンの機能を考察した。この成果を卒業論文として上記大学に提出して卒業を認められたので，5年度も当部門で研究を継続する。

キンドリング脳で増加する物質の分子クローニング

児島伸彦，小幡邦彦

ラットで中隔キンドリングが長期的に維持される際に中隔の標的である海馬で発現が増加する分子を同定しその役割を明かにすることを目標とし，昨年度までにキンドリングラットの海馬とコントロールのそれからcDNAライブラリーを作成し，サブトラクションやディファレンシャルスクリーニングを利用してクローニングを行った。キンドリングで増加しているとして得られたクローンの塩基配列を決定したところ，チトクロム酸化酵素(CO)のサブユニットIIとIIIがあったので，本年度はこれらについての解析を行った。

海馬ではキンドリングでサブユニットIIが1.8倍に，サブユニットIIIが1.3倍に増加しているが，大脳皮質と小脳では変化がなかった。サザン解析を行ったところミトコンドリア遺伝子のコピー数は変化していなかったので，転写活性の増加か分解の抑制により上記mRNAが増加していると結論された。COは核遺伝子でコードされるサブユニットも持つので，そのうちのサブユニットIVとVbにつきラットのcDNAを作成して調べたところ，これらには変化がなかった。ついで酵素活性を海馬のホモジネート及び組織切片（組織化学）で調べたところ，これも変化していなかった。サブユニットの一部だけが増加していることは，どのような意味があるのか，たとえばけいれんなどの状況により残りのサブユニットが増加してタンパク質が機能するための準備状態であるのか，さらに検討を続ける予定である。

シナプス可塑性におけるリン酸化の役割
—キンドリングにおけるリン酸化シナプシンⅠの増加

山肩葉子，小幡邦彦

中枢神経系におけるシナプス可塑性は，学習・記憶の基本現象と考えられている。このシナプス可塑性のメカニズムを明らかにするために，キンドリングをモデルとして，生化学的解析を進めている。キンドリングとは，脳局所への痙攣閾値以下の反復電気刺激によって，初めは無反応であった動物が次第に自動運動を，遂には全身痙攣を発現するに至り，しかもこの反応性が，もはや刺激の反復を中止した後にも数ケ月以上にわたって持続するという現象である。キンドリングにおける可塑的な変化も，シナプス伝達効率の変化がその基礎にあると考えられているが，その詳細については不明である。そこでまず，神経伝達物質の放出調節やシナプスの長期増強，さらにはある種の学習・記憶に関与することが知られてきているカルシウム・カルモジュリン依存性プロテインキナーゼⅡ（以下，カルモジュリンキナーゼⅡと略称）に着目し，キンドリングの

メカニズムにこのキナーゼが関わっているかどうかを明らかにすることを試みた。

そのために，シナプシンⅠのリン酸化状態が，キンドリング完成後の脳において変化しているかどうかを，シナプシンⅠのカルモジュリンキナーゼⅡによるリン酸化を特異的に認識する抗体を用いたイムノブロットによって，検討した。シナプシンⅠは，シナプス前終末に局在するシナプス小胞結合蛋白のひとつであり，カルモジュリンキナーゼⅡによって特異的にリン酸化されることにより，神経終末からの神経伝達物質の放出のしやすさを調節することが知られている。キンドリングラット脳の海馬，大脳皮質ホモジネートサンプルにおいては，コントロールラット脳のサンプルに比べて，シナプシンⅠのカルモジュリンキナーゼⅡによるリン酸化が，有意に上昇していることが観察された。一方，キンドリングにおいては可塑的な変化を示さないと考えられる小脳においては，シナプシンⅠのリン酸化状態に変化は認められなかった。脱リン酸化型，リン酸化型を含めたシナプシンⅠの全量には，いずれの部位においても，有意な変化は認められなかった。

このように，キンドリングにおいて，シナプス可塑性の変化が生じていると想定される脳部位で，カルモジュリンキナーゼⅡに特異的なシナプシンⅠのリン酸化が上昇していたことから，これらの脳部位での神経終末におけるカルモジュリンキナーゼⅡの活性が，絶対的あるいは相対的に上昇していること，また，これらの部位における神経伝達物質の放出のしやすさが増大していることが推定され，シナプス前におけるこれらの機序が，キンドリングにおけるシナプス伝達効率の上昇に，寄与している可能性が示唆された。

超微小形態生理研究部門

【概要】

超微小形態生理部門は，生体分子の物理化学的挙動や超微小構造がどのようにマクロな生理機能とむすびつくのかを研究している。そのために，細胞環境を破壊することなく生体電解質，生体分子の動的挙動および量を測定できる核磁気共鳴法を測定法として用い，物質輸送，エネルギー代謝，細胞内分子の運動をテーマに研究を進めている。今年度は蛍光光度計を購入し，臓器から細胞実験系でも細胞内 pH, Ca を測定できるシステムを構築し，炎光光度計を追加してK輸送測定の強化を計った。

分子運動グループは，細胞内電解質をはじめとする生体分子の緩和時間を測定し，生体分子が生体内の種々の区画でどのような運動状態にあるのかを研究している。細胞内陽イオンは3/2の核スピンをもつため緩和は四重極相互作用により大きな影響をうける。本年は，パルス磁場勾配法を用い，Na^+ イオンの自己拡散係数を測定し，細胞内 Na^+ イオンのうちフリーの運動状態にある分画を検討した。物質輸送グループは，唾液腺細胞をはじめとする上皮膜細胞の高い輸送能力に着目し，各輸送体による Na^+，K^+，Cl^- などの輸送が細胞の全エネルギー代謝のなかでどのよ

うな位置にあるかを多核種磁気共鳴，臓器灌流，酸素消費測定，経時的イオン出納測定法などをくみあわせ研究している。本年からは２つのプロジェクトが新たに加わった。ひとつは，外分泌細胞基底側膜に存在するＫイオンチャネルが血管側Ｋイオン輸送経路としてどの程度関与するかを，顎下腺灌流標本の静脈側Ｋ流出量を指標に実験する計画。また，Ｆでラベルした基質の輸送を in vivo 腎で測定するシステムを，F-19NMR 法を基礎に構築し始めた。継続課題としては，N-14NMR 法を用い細胞内のアンモニウムイオン量を測定し，アンモニウムーパルス実験中にアンモニウムイオンとその他の電解質がどのような動態を示すかを検討した。

平成４年７月シドニー大学より石川　透が助手として採用された。マックスプランク生物物理研究所の Dr. Ute Ammer が平成４年９月に文部省外国人研究者として来所，１年間の共同研究を開始した。平成４年９月にホムブルグ大学（ドイツ）の I. Schulz, マンチェスター大学（連合王国）の R. M. Case, K. Lau, J. Seo, M. C. Steward, NIEH (USA) の J. W. Putney, NIH (USA) の B. J. Baum, R. J. Turner が来所し，情報交換と共同研究打ち合せを行なった。マンチェスター大学の Dr. Martin C. Steware, Peter Brown は平成５年２月に来所し，２週間共同研究を行なった。亘弘は，８月に第11回国際磁気共鳴医学会（ベルリン）に出席した。村上政隆と石川　透は，UCSF（サンフランシスコ）にて生体電解質の拡散係数測定について，トロント大学（カナダ），NIH（ベセスダ）にて，上皮膜輸送についての情報交換と共同研究打ち合せを行なった。瀬尾芳輝は７月から18日間，マンチェスター大学（連合王国），マックスプランク生物物理研究所（ドイツ）にて情報交換と共同研究打ち合せを行ない，第11回国際磁気共鳴医学会（ベルリン）に出席した。瀬尾芳輝は，３月に９日間，フラウンフォッファー研究所にて生体電解質の緩和時間について共同研究を行なった。本共同研究には，市川　修技官が技術支援のため参加した。シドニー大学医学部学生の Mr. Benedict Ng が Optional Term Program の一環として11月に来所し，10週間灌流実験による唾液腺水電解質輸送について研究指導を受けた。

アンモニウムーパルス実験中のK^+の動態

村上政隆，瀬尾芳輝，石川　透

エネルギー代謝が活発になると有機酸産生が増加するのはもとより，Na/H antiporter の様に電解質輸送には細胞内 pH と深くかかわりのあるものが多く，上皮細胞 pH 調節機構は研究課題の一つである。細胞内 pH を人工的に変化させる方法として従来よりアンモニウムーパルス法が用いられてきた。しかし，前年度 N-14NMR 法により細胞内の NH_4^+ の測定を行った結果 (Seo & Murakami (1991) Proc R Soc Lond 193 : 347), 20mMNH_4Cl を灌流すると，細胞内 NH_4^+ 量は急速に 50mmol/l ICF まで増加し，さらに緩やかに 70mmol/l ICF に至る大量増加が起こった。このとき細胞内K^+の動態を Inversion recover NMR 法 (Seo et al. (1987) J Magn Reson, 75, 529) に

て測定すると，20分間でコントロールの60％に減少し，NH_4Cl を洗い流すと，細胞内K^+はすみやかにコントロールレベルに戻った。

92年度は，このKイオン流出経路がどのようなものであるか分析することにあった。材料は，ラット顎下唾液腺を血管灌流し，静脈よりの流出液を30秒毎に採取し，Kを炎光光度計にて測定した。灌流は動脈より一定流速で行うので静脈流出液のK濃度はそのまま正味の血管側への流出速度を反映する。Inversion recovery NMR 法は細胞内K量の情報をもたらし，このK^+流出，流入の測定は時間分解の高い測定であり，NMR 法を補完する。

結果と考察：1）NH_4Cl＝20mM を灌流 (2ml/min) すると，流出液のK濃度は 4.4mM 急速に上昇し初期1－2分でピーク値 (5mM) を示した。その後低下し，約4－5分でプラトー (4.55－4.6mM) となり，15－20分間でさらに低下し30分でほぼ流出は停止した (4.4mM)。これは，K流出経路に最低2種類あることを示している。2）ouabain 1mM は，初期ピーク値，プラトー値共に増加させ (peak 5.5mM, plateau 4.8mM), Na/K ATPase が細胞内のアンモニウム増加時にもK取込み活性を持つことを示した。3）bumetanide 50 μM は，K流出に対し有意な変化を起こさなかった (peak 5mM, plateau 4.6mM) が，アンモニウム除去後のK取込みの一部は bumetanide-sensitive であり，Na/K/2Cl cotransport によるものであることが示された。4）高濃度の amiloride 1mM は初期ピークを抑制した (4.7－4.8mM)。plateau はやや増加した (4.7mM)。NH_4Cl を洗い流すと，K^+の取込みが見られた。高濃度の amiloride が non specific にチャネルを抑制した結果と考えられる。5）K流出経路の Ca 依存性を調べた。まず，Ca＝0mM の灌流液で灌流した細胞外の Ca を除去し，さらに細胞内 Ca ストアを枯渇させるために，acetylcholine＝1 μM で刺激した。その上で ouabain＝1mM を添加し，NH_4Cl＝20mM を灌流した。Ca＝0 ではK流出の初期ピークは抑制された (4.7mM) が，plateau 値は抑制されなかった (4.7－4.8mM)。この結果は初期K流出は Ca 依存性の輸送経路によるものと結論される。今回の実験により，細胞内アンモニウム増加時に，Ca 依存性のK流出が細胞内の陽イオン－ホメオスタシスに重要な役割を果たすことが明かになったが，細胞内アンモニウム増加と細胞内 Ca がどのように連結するかが次の課題となる。

パルス磁場勾配 NMR 法による
寒天ゲル内 Na^+の自己拡散定数の測定と動的モデルの検討

瀬尾芳輝，村上政隆

細胞膜を横切る電解質の動きは，興奮，分泌，吸収，運動などの細胞の生理機能の基本と考えられる。しかし，細胞質内 Na^+，K^+の動的挙動の情報はほとんどない。我々は，細胞内 $^{23}Na^+$ イオンの緩和を二量子フィルター NMR 法により測定し，$^{23}Na^+$ イオンが遅い運動状態にある

（$\omega \tau_c >> 1$，相関時間 (correlation time τ_c)，ラーモア周波数（ω））ことを見いだした[Seo Yet al., BBA 1034 : 142, 1990]。次の問題は，細胞内液における ^{23}Na 核の緩和機構の解析である。これまで，緩和の温度依存性，濃度依存性，静磁場依存性を調べ，細胞内液における $^{23}Na^+$ が，1）均一の遅い運動状態であるのか (static model)，2）遅い運動状態の $^{23}Na^+$ と速い運動状態の $^{23}Na^+$ が交換しているが平均化され観測されているのか (exchange model) を検討し，後者の妥当性が示唆されてきた。

本年度はさらに検討を加えるために，パルス勾配磁場 NMR 法を用い，$^{23}Na^+$ イオンの自己拡散係数を測定し，拡散係数の値を用い，速い運動状態にある $^{23}Na^+$ イオンの横緩和速度定数を推定する方法を開発した。寒天ゲルを細胞内液モデルとして用い，$^{23}Na^+$ イオンの横緩和速度定数の磁場依存性を種々の寒天濃度で測定し，exchange model の仮定のもとに遅い状態にある $^{23}Na^+$ イオンの相関時間と四重極結合定数を推定した。

1）横緩和速度定数の測定：寒天ゲル中の $^{23}Na^+$ イオン（1，2，3，4％寒天，1M NaCl in water）の横緩和速度定数を 8.45T および 2.34T の磁場で測定した（25℃）。^{23}Na NMR スペクトルは AMX-360wb (Bruker, 8.45T), MSL-100 (2.34T) spectrometer, 10mm 径広帯域プローブを用い観測した。T_2 二量子フィルター（D-90°-τ /2-180°-τ /2-90°-δ -90° 取り込み）を用い測定した。creation time（τ）を変え測定した FT スペクトルのピーク高より横緩和速度定数を決定した。

2）自己拡散係数の測定：寒天ゲル中の $^{23}Na^+$ 自己拡散係数を，MSL-100 (2.34T) spectrometer にて傾斜磁場はマイクロイメージングユニットを用い，自作コイル（15㎜径）にて測定した。パルス磁場勾配スピンエコー法（D-90°-t_1-δ -t_2-180°-t_1-δ -t_2-取込み）を用い，磁場勾配は，5.4mT/cm, 90°pulse＝18 μSec, 180°pulse＝36 μSec, δ は 0.3msec から 4msec まで変化させ，自己拡散係数を測定した[Karger J et al., In : Advin Magn Reson 12, 1, 1988]。

3）Discrete exchange model（交換モデル）

細胞内液にて，遅い運動状態の Na^+ と extreme narrowing の速い運動状態の Na^+ が交換すると仮定した。横緩和時間と拡散係数は以下のように記述される。

$$1/T_{2i} = s_{free}\ (1 - P_b) + s_i P_b \qquad (1)$$

$$D = D_{free}\ (1 - P_b) + D_b P_b \qquad (2)$$

但し，$1/T_{2i}$ は $1/T_{2f}$ 及び $1/T_{2s}$，D は拡散係数の測定値，s_i は横緩和速度定数（s_1，s_2），また D_b は遅い運動状態にある Na^+ の自己拡散係数。s_2 は，$|1/2><1/2|$ コヒーレンス，s_1 は，$|-1/2><-3/2|$ 及び $|3/2><1/2|$ コヒーレンスにそれぞれ対応する横緩和速度定数であり，P_b は遅い運動状態にある $^{23}Na^+$ 全体量に対する比率（$1 \geqq P_b \geqq 0$），これは寒天分画に比例する。s_{free} と D_{free} は速い運動状態の $^{23}Na^+$ の緩和速度定数および自己拡散係数。

緩和時間として観測される値は，s_{free} と s_1 の時間平均した値である。遅い運動状態にある Na^+ の分画は，速い運動状態の $^{23}Na^+$ に比べ小さいと予測されるが，横緩和速度定数（s_1，s_2）の値は s_{free} と比べ，10－100倍大きいと推定される。（1）式に観測された速度定数をあてはめ，すたつの状態を推定できるが，このとき今一つのパラメータとして寒天ゲル中の $^{23}Na^+$ の s_{free} の

正確な値が必要になる。式（2）に示すように，観測される拡散係数Dは，厳密にはD_{free}とD_bの時間平均と考えられる。しかし，観測される値は，D_bとP_bの値がD_{free}や$1-P_b$に比べかなり小さいために，実質的にはD_{free}にほぼ等しい。すなわち，観測される寒天ゲル中の$^{23}Na^+$の拡散係数は，extreme narrowingの速い運動状態の$^{23}Na^+$の動きを表している。

$^{23}Na^+$の緩和速度定数は溶液の粘度に強く依存する。glycerol/水の溶液系の$^{23}Na^+$自己拡散係数を種々の粘度のもとで測定し，自己拡散係数と緩和時間の関係を求めた。この関係を用い，種々の濃度の寒天ゲル中のextreme narrowing状態の$^{23}Na^+$の緩和速度定数s_{free}を求めることができた。$^{23}Na^+$の緩和速度定数（s_1，s_2）の寒天ゲル中にて25℃で2.34T (x), 8,45T (o)において測定した値に対し，Discrete exchangeモデルにより最適化した結果，遅い運動状態にある$^{23}Na^+$の比率P_b（1％寒天，1M NaCl）は，9*10－4と計算された。四極子結合定数e^2qQ/hおよび相関時間の値は，1MHz, 16nsecと推定された。最適化の結果，測定値は$r^2=0.98$とよくモデルにフィットした。e^2qQ/hは1MHzと推定され，予測範囲(0.2MHz－2MHz)に入った。これらの結果は，寒天モデルの交換モデルとしての有効性を支持している。現在，本手法を単純な系から生体系に導入するため，人工系としてポリアクリルアミドゲル，細胞として赤血球についての基礎実験を行っている。

本研究において技術的支援を得た服部宏之，市川　修，高木正浩，大河原浩諸氏に感謝します。また，有益な議論を賜ったC. S. Springer教授，J-H. Lee, S. Wimperis, H. Shinarの諸博士に深謝します。

ラット顎下腺外分泌細胞の血管側外向きKイオン輸送における Kイオンチャンネルの役割

石川　透，村上政隆，瀬尾芳輝

パッチクランプ法などの電気生理学的研究により，種々の外分泌細胞の細胞膜に存在するイオンチャンネルが同定され，それらの生物物理学的特性や薬理学的性質が明らかになってきた。ラットやマウスなどのげっ歯類の唾液腺外分泌細胞の基底側膜には数種類のKイオンチャンネルが存在することが報告されており，特にその中でmaxi-Kイオンチャンネルについての情報が蓄積されてきている。maxi-Kイオンチャンネル活性はアセチルコリン投与や細胞内Caイオン濃度上昇により増加することからアセチルコリンによって引き起こされる水及び電解質輸送に重要な役割を果たしていることが想定されていくが，生理的機能に対する関与について直接的な証拠はない。本研究の目的はできるだけ無侵襲の標本を用い，アセチルコリンなどの分泌刺激に応答するKイオンチャンネル活性を反映すると考えられる細胞内から細胞外への外向きのKイオンフラックスを想定し，それらを生理学的及び薬理学的に特徴ずけることにある。またこれらの研究は，計画

しているパッチクランプ法によるチャンネル分子レベルの研究の焦点をしぼることにもある。本研究ではラット顎下腺を人工灌流液で血管灌流してアセチルコリン刺激後の静脈からの流出液のKイオン濃度を炎光光度計で測定することにより外分泌細胞の血管側膜を介する正味のKイオンフラックスを算定した。外分泌細胞の基底側膜に存在するNa-K-ATPaseとNa-K-2Clをウワバイン(1mM)とブメタニド(50 μM)で抑制し，細胞外から細胞内への内向きのKイオン輸送系の関与を最小限にした。この条件下でアセチルコリン(1 μM)を灌流液に加えると，二相性のKイオンフラックス反応が観察された。1つは刺激後最初の二分間で見られる一過性の非常に大きな反応で，もう一つはその後に5分以上続く小さな反応であった。この実験条件で観察されるKイオンフラックスが顎下腺細胞内に由来することは，39K-NMR法により細胞内K含量が減少していることから確認された。アセチルコリン(1 μM)によって引き起こされる二相性のKイオンフラックス反応は灌流液中のCaイオンを除去したり，細胞内Caイオン貯蔵部位を枯渇させるような実験条件で完全に抑制されたことから，この二相性のKイオンフラックス反応が細胞内からのCaイオン動員による細胞内Caイオン濃度上昇によって制御され，Ca依存性Kイオンチャンネルが関与していることが示唆された。また2つの反応相は薬理学的に異なる性質を有していたので，少なくとも二種類のKイオンチャンネルが関与していることが明かとなった。現在この実験系を用いてさらに血管側外向きKイオン輸送系を薬理学的に特徴ずけるとともにその制御機構等の研究を進めている。

Investigation of organic anion and cation transport in rat kidney using ^{19}F NMR spectroscopy.

U. Ammer, Y. Seo, and M. Murakami

One of the most important functions of the kidney is the excretion of substances, which were applied to the organism or were produced during cellular metabolism. Another important function is the reabsorption of useful substances which have been filtered. The urinary excretion of all these substances is due to glomerular filtration, and to secretory or reabsorptive transport processes located mainly in the S3 segment of the proximal tubule.

In order to investigate the transport of organic ions in kidney tissue, in vivo ^{19}F NMR spectroscopy was applied to monitor renal contents and how tissue contents of these substrates can be influenced. Thereby we tried to apply the experimental protocol which was used in a previously performed study using a fluorescence technique (Ammer et. al., J Am Soc Nephrol 1993, 3 : 1474-1487). In that study a fluorescent test substrate (sulfofluorescein) with high affinity for the transporter of hydrophobic anions was applied together with inulin, a marker for the filtration. The re-

nal excretion of the fluorescent substrate was demonstrated to be decreased by inhibitors of the conrtaluminal uptake in proximal tubular cells and increased by stimulation of the transporter after glutarate application.

In order to find useful test substances to study transport of hydrophobic anions (PAH-transporter) and dicarboxylate transport, the specific affinity of several ^{19}F labelled compounds towards these transporters was determined by stop-flow micropuncture experiments. For the PAH-transport system we found 3-trifluoromethylhippurate (TFMH) and for the dicarboxylate-transporter tetrafluorosuccinate (TFS). The specific affinity, expressed as apparent $K_t$value, of TFMH was 0.05mmol/l for the PAH-transporter and that of TFS 0.13mmol/l for the dicarboxylate-transporter respectively.

In the next step we had to bulid up and to optimize the setup for the planned experiments. First of all we used a homebuild probe for ^{19}F NMR spectroscopy (Dr. Juretschke, Hoechst). Its sensitivity in the JEOL-EX 90-system was tested using solutions of TFMH and TFS.

The next step was the development of a heating system, which allowed to keep the body temperature of the animal inside the magnet during the experiment constant. Then we performed the first experiments, where the ^{19}F labelled compound together with inulin was injected in a bolus. By analizing the urinary excreted amounts of both compounds (NMR spectroscopy and OD measurements using the anthrone method for inulin) and the tissue content (in arbitrary units), we optimized the concentrations of the injected compounds.

The net direction of renal transport was determined by comparison of urinary excreted amounts of the labelled substances to that of inulin. TFMH is secreted by the rat kidney, while TFS seems to be net filtered.

In order to study the role of the transport system for hydrophobic anions, apalcillin was applied. The effect of apalcillin on renal excretion of TFMH was studied by application of the compound directly before injection of TFMH. Compared to the control experiment, where the excretion of TFMH was determined without interfering compound, tissue content of TFMH and its urinary excretion were strongly reduced after apalcillin pretreatment. This effect of apalcillin on urinary TFMH excretion can be explained as contraluminal inhibition of secretion. The transport of TFS was investigated using succinate as interfering substance. Application of succinate decreased the tissue content of TFS, but had no effect on urinary excretion. At the moment it is not clear, if the inhibition of tissue uptake of TFS is caused by luminal, contraluminal or inhibition at both cell sides.

Further steps of this study will be to determine in vivo the intracellular concentrations of ^{19}F labelled compounds and to continue the pharmacological investigations of the transporters for organic anions and cations.

細胞内代謝研究部門

【概要】

当部門では細胞の分泌活動にともなう細胞内カルシウムイオンの動態を探ることを研究の焦点としている。菅野富夫（北海道大学），葉原芳昭に加え，２月から Julia V. Busik （ノボシビリスク大学）が文部省留学生として，４月から佐藤洋一（旭川医科大学）が客員助教授として赴任し，また阿部ゆかり技官が新たに着任した。蛍光顕微測光装置と顕微画像解析装置を設置し，fura-2 を細胞内に導入し，このカルシウム感受性色素の蛍光の時間的・空間的変化をとらえ，一方で細胞の分泌反応を測定して刺激－放出連関過程における細胞内カルシウムイオンの動態特性を細胞レベルで明らかにすることを目的としている。この目標に沿って，本年は次のような研究を行った。１）薬物保存剤として使用されているクロロブタノールのカルシウムイオン動態に及ぼす作用，２）局所刺激による細胞内カルシウムイオンの細胞内，細胞間伝播，３）カルシウム流入阻害剤の SK&F 96365 の効果，４）局所麻酔薬プロカインの膵臓での新しい作用機序，５）カルシウム動態にたいする VIP の作用，６）各種分泌細胞を包んでいる筋上皮細胞のレーザーコンフォーカル顕微鏡による観察，７）パネート細胞の細胞内カルシウム動態，８）膵腺房標本形態の観察。またこの研究プロジェクトに沿って，９件の共同研究申し込みがあり，全国から多くの共同研究者が当部門に設置された設備を使用するために来所した。旭川医科大学の大森行雄とは副腎髄質細胞の生後発達とカルシウムについて，北海道教育大学旭川分校の浅田尚登とは膵臓腺房細胞のエネルギー供給系とカルシウムについて，新潟大学の藁科彬とはカテコールアミン分泌と細胞内カルシウムについて，同，山口賢一とは副腎皮質球状層細胞の分泌調節とカルシウムについて，防衛医科大学の田尻久雄グループとは急性膵炎と細胞内カルシウムについて，上智大学の熊倉鴻之助とはウシ副腎髄質細胞の分泌活動とカルシウムについて，名古屋市立大学の磯部芳明とは視交叉上核培養細胞の細胞内カルシウムについて，福井医科大学の近藤隆（現神戸大学）とはハイパーサーミアと細胞内カルシウム動態についてそれぞれ共同研究を行った。また本年，５月には英国ロンドン大学の Giovanni E. Mann 博士が，さらに９月から10月にかけてはフィンランド，トルク大学の Timo Nevalainen 教授が短期滞在し，共同研究及び生理研セミナーを行った。

膵腺房細胞[1]及び副腎髄質細胞[2]の分泌反応と細胞内カルシウム動態に及ぼすクロロブタノールの二重効果

葉原芳昭
藁科　彬（新潟大）
菅野富夫（生理研・北海道大）

通常治療薬の保存剤として広く用いられているクロロブタノールが膵腺房と副腎髄質細胞の細胞内カルシウム動態に顕著な効果を示すことが明らかとなった。クロロブタノール(1mg/ml)はコレシストキニンオクタペプチド(CCK-8), カルバコール(CCh), およびG蛋白質の直接活性化物質であるフッ化ナトリウム(NaF)で引き起こされた分泌反応を強く抑制した。クロロブタノールの濃度を4mg/mlに上げるとそれ自身で最大分泌反応を引き起こした。5pMのCCK-8あるいは0.3μMのCChで引き起こされる振動性の細胞内化変動は1mg/mlのクロロブタノールの存在下では完全に消失した。100pMのCCK-8で引き起こされる初期の急速な上昇と引き続く緩慢な低下から構成される二相性のカルシウム変動は，クロロブタノールによって振動性の変動に変化した。クロロブタノールは[^{125}I]-CCK-8及び[^{3}H]-N-methylscopolamineの腺房細胞受容体への結合を用量依存性に抑制した。以上より薬剤保存剤として広く用いられているクロロブタノールが，膵腺房細胞の分泌活動に薬理学的効果を示すことが明らかとなった。この作用機序は多岐にわたると考えられるが，細胞内カルシウム動態を変化させ，その結果として分泌機能を抑制する機序が重要なものであると推定される。またラットの遊離副腎髄質細胞で認められる自発性カルシウムスパイクの発生もクロロブタノールで抑制されることが明らかとなった。クロロブタノールが興奮－収縮連関を抑制する事実も報告されており，カルシウムイオンが関与する細胞機能にたいして普遍的に薬理効果を及ぼすと考えられ，この保存剤を含有する調剤を用いる場合，特に局所投与で用いる場合にはこの点に注意する必要がある。

1）Habara, Y. and Kanno, T. Br. J. Pharmacol. (1993) 109 : 685-692.
2）Warashina, A., Habara, Y. and Kanno, T. (1993) 14 : in press.

モルモット膵腺房細胞刺激－放出連関に及ぼすモルモットVIPの効果[1]

葉原芳昭
菅野富夫（生理研・北海道大）
望月　徹，矢内原昇（静岡県大）

血管作動性小腸ペプチド(VIP)がコレシストキニンやアセチルコリン類似アナログによる膵

房細胞の分泌を促進することが知られている。VIPは細胞内のcAMPを増加させる。開口放出は細胞内カルシウムイオンによって調節されていることが知られている。本研究では，刺激－放出連関時の細胞内情報伝達におけるカルシウムイオンとcAMPのクロストークの可能性について検討を行った。

モルモットの膵臓をコラゲナーゼで処理して新鮮分離腺房細胞を作製し，モルモットのVIPを用いてfura-2による細胞内カルシウム濃度と分泌反応にたいする効果を検討した。10μMのカルバコールで膵腺房細胞を持続的に刺激すると，単一細胞では刺激初期の振動性変動に続いてドーム型上昇を伴った細胞内カルシウム濃度の変動がみられた。これに10nMのモルモットVIPを加えてもカルシウム変動に影響は認められなかった。低倍率の対物レンズを使用して，細胞集団全体を測定対象としてカルシウム濃度平均値の変動を記録してもVIPによる変化は認められなかった。また，100μMのカルバコールで刺激すると，急速で一過性の細胞内カルシウムイオン濃度上昇に引き続き，緩慢な濃度の減少が認められるが，この変化にたいしても10nM VIPは無効であった。細胞集団のカルシウム濃度平均値を測定してもVIPは無効であった。細胞内カルシウムイオン濃度は10nM VIP単独投与では変化しなかった。30μMカルバコール刺激による反応にもVIPは無効であった。しかし，カルバコールで引き起こされる分泌反応は，VIP添加で促進された。

細胞内cAMPを増加させるVIPが細胞内カルシウムイオン動態にたいして無効であることから，放出刺激が受容体に作用し細胞内カルシウムイオンを上昇させるまでの過程にたいしては，cAMPは影響を及ぼさないものと考えられる。しかし，細胞内cAMP濃度の変動範囲を広げて，膵腺房細胞の刺激－放出連関に及ぼすcAMPの影響を詳しく分析していく必要がある。今後，細胞内cAMP濃度の測定を含めて，より詳細に検討する必要がある。事実，最近，dbcAMPを投与すると細胞内のカルシウム変動に影響が現れる傾向があることがわかった。実験条件を含めてさらに検討しなければならない。

1）Habara, Y., Kanno, T., Mochizuki, T. and Yanaihara, N. Biomed. Res. (1992) 13 : suppl. 2, 205-211.

EFFECT OF A RECEPTOR-MEDIATED Ca^{2+} ENTRY BLOCKER, SK&F 96365, ON CALCIUM AND SECRETORY RESPONSES IN RAT PANCREATIC ACINAR CELLS.[1)]

Julia Busik, Yoshiaki Habara,
Tomio Kanno （生理研・北海道大）

Since pancreatic acinar cells are known to be lacking voltage-dependent Ca^{2+} channels and no

information is available about another type of Ca^{2+} channels in the plasma membrane, the main pathway for extracellular Ca^{2+} influx in pancreatic acinar cells could be receptor mediated Ca^{2+} entry (RMCE).

Recently RMCE have been found to selectively be blocked by some imidazole derivatives (SK&F 96365, SC 38249) in various types of cells. These drugs may give us a clue to distinguish extracellular Ca^{2+} entry from intracellular Ca^{2+} release involved in the stimulus-secretion coupling in pancreatic acinar cells.

Effects of SK&F 96365 on the Ca^{2+} dynamics and the secretion were examined in isolated acini of rat pancreas. SK&F 96365 inhibited secretory response induced by 100 pM CCK-8 or 3 μM CCh, the concentrations known to induce the maximal secretory response, in a dose-dependent manner with IC_{50} of 47.7 μM or 42.0 μM respectively. Furthermore, SK&F 96365 inhibited secretory response induced by a G-protein activator, NaF (15 mM), in a dose-dependent manner with IC_{50} of 40.1 μM.

Stimulation of isolated Fura-2-loaded or isolated perifused acini with 100 pM CCK-8 caused Ca^{2+} and secretory responses both of which consisted of initial rapid rise followed by sustained plateau phase. SK&F 96365 at 30 μM partly and at 100 μM completely inhibited the sustained plateau phase, but did not the initial phase of 100 pM CCK-8-induced Ca^{2+} and secretory responses. The time courses of Ca^{2+} and secretory responses to 100 pM CCK-8 in the presence of 100 μM SK&F 96365 resembled the time courses in the Ca^{2+} -deficient conditions.

From these results we can conclude that in rat pancreatic acinar cells :

SK&F 96365 inhibits some steps of signal transduction process after G-protein activation, rather than the steps of specific binding of secretagogues to receptors.

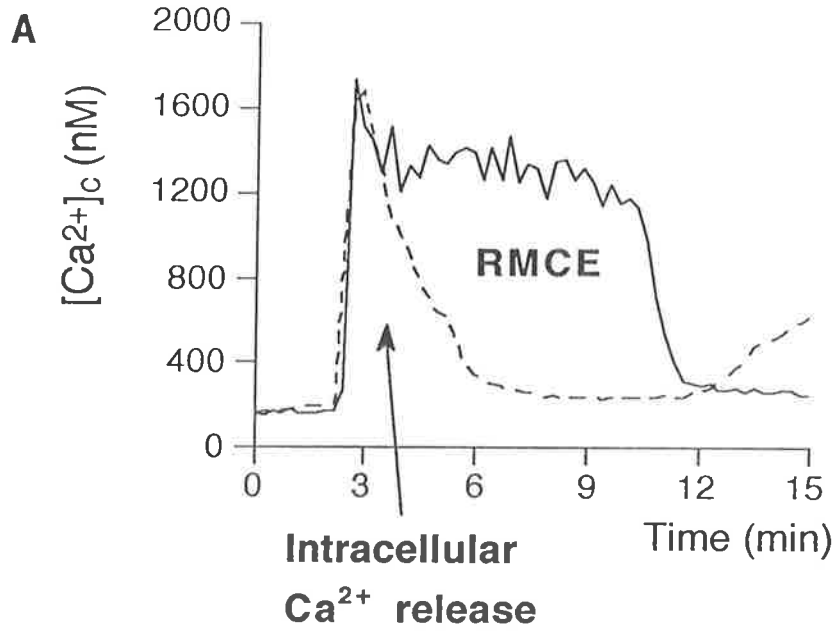
SK&F 96365 selectively prevents RMCE induced by 100 pM CCK-8, but causes little, if any, changes in intracellular Ca^{2+} release.

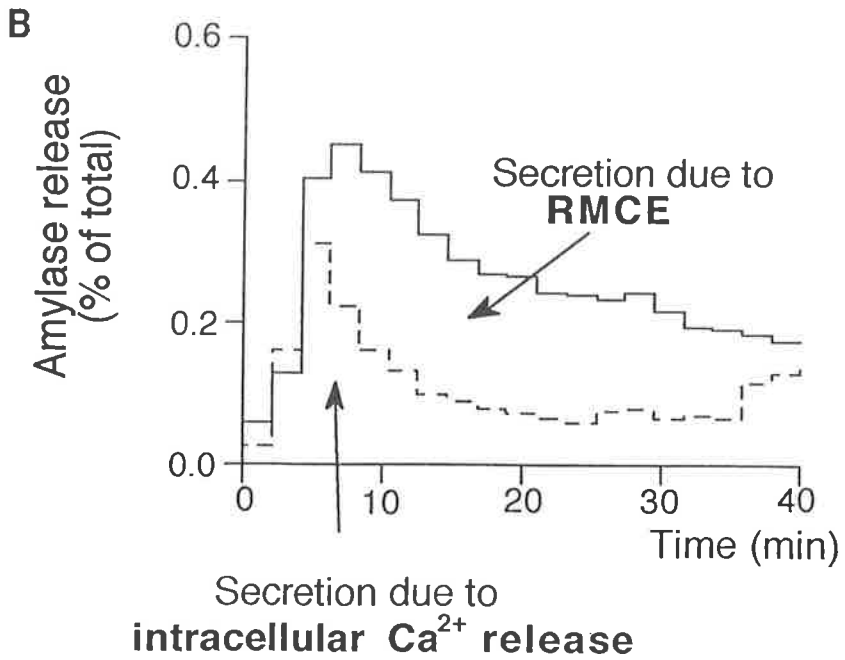
Blockage by SK&F 96365 of RMCE results in complete inhibition of sustained secretory response to 100 pM CCK-8.

1) Busik, J., Habara, Y., Maruyama, T. and Kanno, T. (1993) E up J. Pharmacal. Mol Pharmacal. Sect. 247 : 273-281

Fig. 1. Effect of 100 μM SK&F 96365 on the time course of 100 pM CCK-8-induced Ca^{2+} (A) and secretory (B) responses. Solid lines show the responses in the absence of SK&F 96365, dotted lines show the responses in the presence of 100 μM SK&F 96365.

Ca^{2+} dynamics and amylase secretion induced by 100 pM CCK-8 consist of two parts : (1) initial increase in $[Ca^{2+}]_c$ and amylase secretion, which were insensitive to SK&F 96365 and may be due to intracellular Ca^{2+} release and (2) sustained $[Ca^{2+}]_c$ elevation and amylase secretion, which can selectively be blocked by SK&F 96365 and may be due to RMCE.


A
2000
1600
1200
800
400
0
[Ca2+]c (nM)
RMCE
0
3
6
9
12
15
Time (min)
Intracellular
Ca2+ release


B
0.6
0.4
0.2
0.0
Amylase release
(% of total)
Secretion due to
RMCE
0
10
20
30
40
Time (min)
Secretion due to
intracellular Ca2+ release

筋上皮細胞の形態的多様性に関する研究

佐藤洋一（生理研・旭川医大）
菅野富夫（生理研・北海道大）

哺乳動物の多くの外分泌腺では，腺終末部の腺細胞を取り囲む薄い平滑筋様の細胞が存在する。上皮組織由来であるこの細胞は筋上皮細胞と呼ばれ，分泌物の排出に関与していると考えられてきた。筋上皮細胞は，突起を多方向に伸ばしているため，通常の薄い組織切片をもとに細胞全体の形を把握するのは困難であった。これまでは，組織化学的方法（Alkaline phosphatase 活性を示す筋上皮細胞を厚めの組織切片で染め出す）や走査電顕（組織を固定してから割断し，酸やアルカリで結合組織を溶かした標本を作製）などで，筋上皮細胞の形態が調べられてきた。しかしながら，全ての筋上皮細胞が Alkaline phosphatase 活性を示すとは限らず，切片が厚いと解像度も低下してしまう。走査電顕では，組織標本の作製法に熟練を要し，しかも表面構造しか解らないという欠点がある。我々は，外分泌腺・内分泌腺組織における細胞内情報伝達系を研究する手段として，分離腺組織標本を作製してきた。この分離腺組織標本を用いて，筋原線維に対する抗体を使って免疫組織化学的に筋上皮細胞を染色すると，比較的容易に筋上皮細胞の全体像がとらえられた。加えて，細胞内の筋原線維束の走行も明瞭に観察された。

ハートレイ系モルモット（オス，体重300～500ｇ）のハーダー腺，涙腺，顎下腺，舌下腺，耳下腺を取り出し，コラゲナーゼ（ワージントン社：30－60U/ml in Hepes-buffered Ringer's solution）で腺組織の結合組織を消化し（37℃，60min），腺終末部（腺房もしくは腺胞）を分離した。分離腺房・腺胞を 4% paraformaldehyde で固定（数時間，４℃）した後，抗平滑筋アクチン抗体（シグマ社，A2547）の入ったリン酸緩衝液に滲漬した（１晩，４℃）。次いで，ビオチン化二次抗体で処理し，FITC あるいは Peroxidase-DAB で標識・発色し，共焦点レーザー走査顕微鏡 (LSM-CBD, Olympus, Tokyo, Japan) と明視野光学顕微鏡で観察した。

ハーダー腺の腺終末部は，脂質分泌細胞からなり，内腔の広い腺胞構造を呈していた。涙腺の腺終末部は内腔の狭い腺胞構造で，モルモットでは粘液細胞から構成されていた。ハーダー腺と涙腺の腺胞・腺房の外形は球形～楕円形を呈し，径が約 50－100 μm と大きく，数個～十数個の星型の筋上皮細胞が腺胞・腺房基底面を被っていた（図１，２，３）。これらの筋上皮細胞は腺胞・腺房を籠状に取り巻くように配列していた。筋上皮細胞は，核を含む細胞体部と突起とからなっていた。細胞体部からは比較的幅広い一次突起が多方向に出され，更にその突起は細い二次突起に二分していた。筋上皮細胞の一次突起・二次突起には抗アクチン抗体に染まる筋原線維が含まれていたが，その局在には差が見られた。二次突起では筋原線維が突起全体に含まれていたのに対し，幅広の一次突起では，筋原線維は突起全体に均質に分布はしておらず，主に突起の辺縁に集合して太い束として認められた。一次突起に見られた太い筋原線維束は，細胞体部では，１）細い線維束に拡散してしまう，または２）細胞体辺縁に沿って走り，隣接する一次突起に入

り込む，あるいは３）そのまま太い線維束として細胞体を横切り，反対側の突起にまで伸びている像が観察された。また，太い筋原線維束が細胞体部で直交している場合もしばしばあった。細胞体部や一次突起・二次突起から，しばしば小突起が出ていた。脂質分泌性のハーダー腺の筋上皮細胞の方が粘液分泌性の涙腺のものより，突起が全体的に幅広い傾向がみられたが，基本的な形態に明確な差は認められなかった。

モルモットの舌下腺終末部は管状腺で，典型的な粘液腺細胞から構成されていた。筋上皮細胞は紡錘形をしており，幅広い突起が腺終末部を輪状に取り囲むように配列していた（図４）。腺終末部の大部分は筋上皮細胞により包み込まれていた。突起の枝分かれは二分岐パターンを示しておらず，枝わかれした突起は短かった。筋原線維は細胞全体に一様に分散し，束状の局在を示す事はなかった。

主に漿液腺細胞からなる耳下腺と顎下腺の腺房は，ほぼ球状の外形を呈し，径は20－30μmであった。個々の腺房を１～２個の筋上皮細胞が取り巻いていた。筋上皮細胞は細胞体部から多方向に突起を出していたが，それは細長く，腺房のわずかの部分が筋上皮細胞により被われているにすぎなかった（図５，６）。突起から伸びてきた筋原線維束が細胞体部を横切る像が，しばしば観察された。耳下腺と顎下腺の筋上皮細胞の形態的差は無かった。

従来までは，主に乳腺等の研究を基に，筋上皮細胞の収縮は腺腔を狭め，腺細胞から内腔に出された分泌物の排出に関与していると考えられてきた。けれども，今回の実験で確認された筋上皮細胞の形態的な多様性を考慮すると，全ての筋上皮細胞が同様の機能を持つとは思われない。腺終末部の内腔の広さや分泌する物質の違いが，筋上皮細胞の形態を左右していると言うよりもむしろ，腺終末部の大きさと形状（管状か球状か）が，筋上皮細胞の形態を規定しているようである。耳下腺や顎下腺では，筋上皮細胞の機能として腺房を支持する外骨格的な役割を想定した方が良いかもしれない。

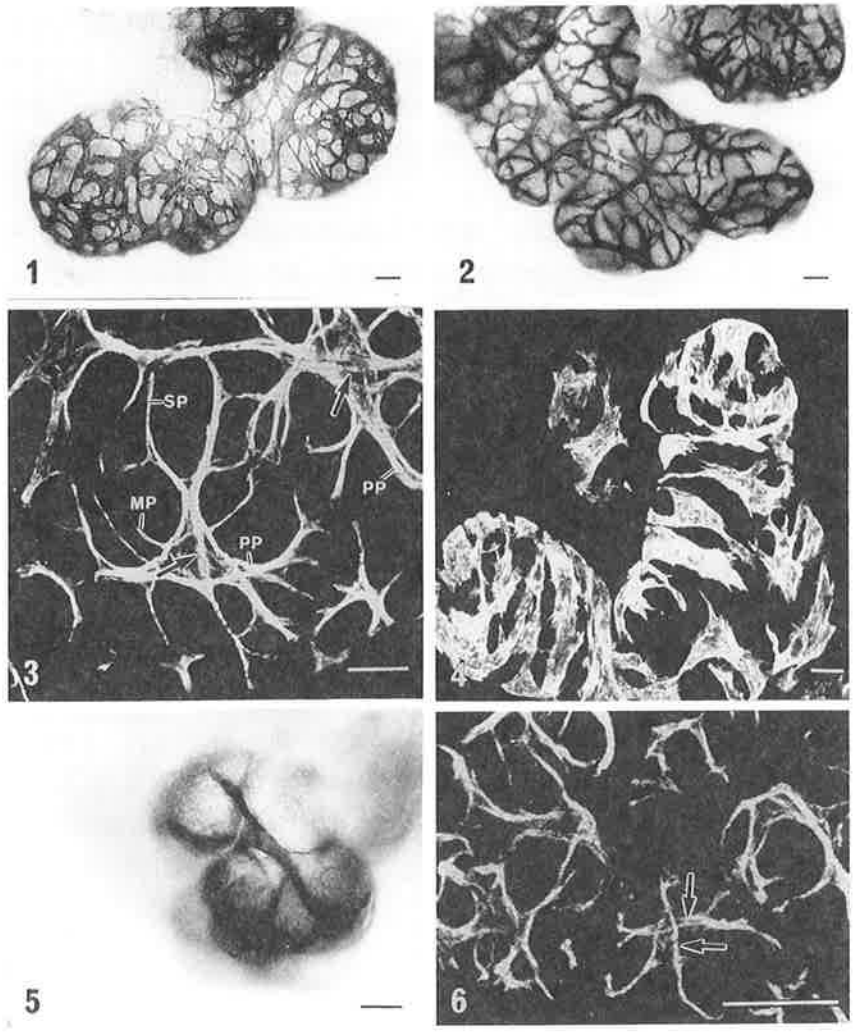


図1　ハーダー腺腺胞。Peroxidase-DAB 発色。球状の腺胞を星型の筋上皮細胞が取り囲む。

図2　涙腺腺胞。Peroxidase-DAB 発色。腺房を取り囲む筋上皮細胞が籠状を呈している。

図3　涙腺腺房。FITC 標識。レーザー顕微鏡写真。筋上皮細胞内の筋原線維束（矢印）が，細胞体部を横切っている。一次突起 (PP) と二次突起 (SP) の他に，小突起 (MP) が見られる。

図4　舌下腺終末部。FITC 標識。レーザー顕微鏡写真。紡錘形の筋上皮細胞が，輪状に腺終末部を包んでいる。

図5　顎下腺腺房。Peroxidase-DAB 発色。腺房にまとわり付く筋上皮細胞。

図6　耳下腺腺房。FITC 標識。レーザー顕微鏡写真。筋上皮細胞の細胞体を筋原線維束が横切っている（矢印）。

図1～6　スケールバーは 10 μm

細胞器官研究系

生体膜研究部門

【概要】

生体膜部門は各種細胞のイオンチャネル活動，リセプター活動，サイトーシス活動等を探索し，細胞がいかに固有の生理的活動を発現するか，というメカニズムの解明を目指して研究を進めてきている。

神経膜については，イカ巨大神経標本を用い，細胞内 Ca^{2+} およびアニオン種に依存する Cl^- コンダクタンスの発現機序，神経インパルスの伝播に関係する細胞外イオン蓄積とそれを除去するシュワン細胞の役割の検討，神経膜チャネル活動に及ぼすアルコールの作用等の問題が検討された。

培養乳腺細胞のミルク分泌活動機序について，細胞間シグナル物質と細胞内 Ca^{2+} の役割が検討された。またモルモットの精管平滑筋細胞の Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル活動や興奮・収縮連関について新しい知見を得つつある。

国際共同研究では，文部省国際学術研究「海生軟体動物を用いた神経生理学の新展開」の第2年目の日英共同研究が進められ，1991年6月～8月にかけて，久木田，筒井，山岸（生理研），井上（徳島大）が Plymouth の海洋生物学研究所において，海洋生物学の神経細胞，筋細胞を対象に共同研究を行った。1992年1月～3月にかけては，Drs. Brown, Williamson が来訪し，神経ーシュワン相互作用，シュワン細胞の形態と機能に関する実験を行った。

共同研究としては，森元（尚絅短大），橋本（東京医科歯科大），美宅（東京農工大），榎本（島根大），井上（徳島大）各氏との共同研究，および超高圧電顕共同利用実験（平野）が進められた。

小腸絨毛下の筋繊維芽細胞の形態変化と細胞内 Ca^{2+} 反応

古家喜四夫，古家園子（組織培養），山岸俊一

小腸絨毛下でネットワークを形成している筋繊維芽細胞はコラーゲン等を産製し細胞外マトリックスを作る働きをしている事が知られている。さらにこの細胞はアクチンに富み，互いにギャップ結合でつながっており，絨毛や毛細血管にも足をのばし，それらの間の物質，情報等のやりとりにも関与していると考えられている。この詳しい性質を知るため，ラット（10－14日齢）の十二指腸から筋繊維芽細胞を単離，培養しその性質を fura-2 を用いた細胞内 Ca^{2+} 測光法によって調べた。

電顕オートラジオグラフィーで昨年明らかにしたようにこの細胞は強力な血管作動物質である

エンドセリン (ET) の受容体を持っているが，その他各種血管作動物質及び神経伝達物質の受容体を持っている事が Ca^{2+} 測光法によって示された（図１）。ET 投与によっては一過性の細胞内 Ca^{2+} 増加とそれに引き続き Ca^{2+} 振動が引き起こされたが，この Ca^{2+} 反応の初期相は Ca^{2+} 除去液中でもみられたが，持続相は消失したことから，それぞれ細胞内 Ca^{2+} ストアーからの遊離と外液からの流入が寄与していると考えられる（図２上段）。

筋繊維芽細胞は通常の培養条件では偏平な形態を示すが血清濃度を下げ dBcAMP (1mM) や Forskolin, cholera toxin で処理すると十数分以内に突起のある星状に変化する。この形態変化は可逆的で血清濃度を上げると再び偏平になる。さらに ET （１および３）によっても dBcAMP の効果は打ち消され偏平になる。360nm で励起した fura-2 蛍光強度 (f360) は Ca^{2+} に依存せず，その細胞体中心部での変化は細胞の厚みに依存していることから，それを形態変化の指標とし，形態変化と細胞内 Ca^{2+} との同時測定を行った。この時，蛍光の退色やリークによる影響を避けるため細胞体全体での蛍光強度で規格化した (normalized f360)。図２下段に示すように形態変化は Ca^{2+} 除去液中でも通常と同じようにみられた。また BAPTA を取り込ませた細胞では Ca^{2+} 反応は消失したが，形態変化は同様に誘起された（図３）。一方 Substance-P 等 ET 以外の活性物質では Ca^{2+} 反応はみられたが形態変化はみられなかった。また dBcAMP 灌流によって形態が星状へ変わる時には細胞内 Ca^{2+} の変化はみられなかった。以上のことからこの細胞の形態変化は細胞内 Ca^{2+} 濃度には依存しない過程によっていると考えられる。いくつかの種類の細胞において ET はその受容体活性化によって adenylate cyclase を抑制する事が知られており，その経路を介した細胞内 cAMP 濃度の減少によって形態変化が起こったと考えられる。ET の受容体としては，平滑筋タイプの ET_A の特異的阻害剤である BQ123 が低濃度では効かない事から，上皮タイプの ET_B が関与していると想像される。

以上のような小腸絨毛下の筋繊維芽細胞の性質は脳のアストロサイトの性質と酷似しており，機能的にも同じような働き，即ち異種細胞間の情報伝達やその制御を担っている事が示唆される。

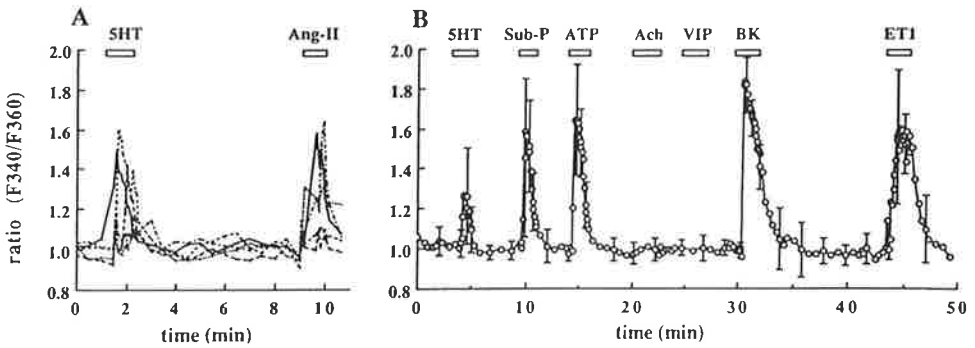


図１　各種血管作動物質，神経伝達物質による培養筋繊維芽細胞の細胞内カルシウム反応。Serotonin (5HT), Angiotensin-II (Ang-II), Substance-P (Sub-P), ATP, Bradykinin (BK), Endothelin-1 (ET1) に反応するが，Achethylcholine (Ach), VIP は効かなかった。

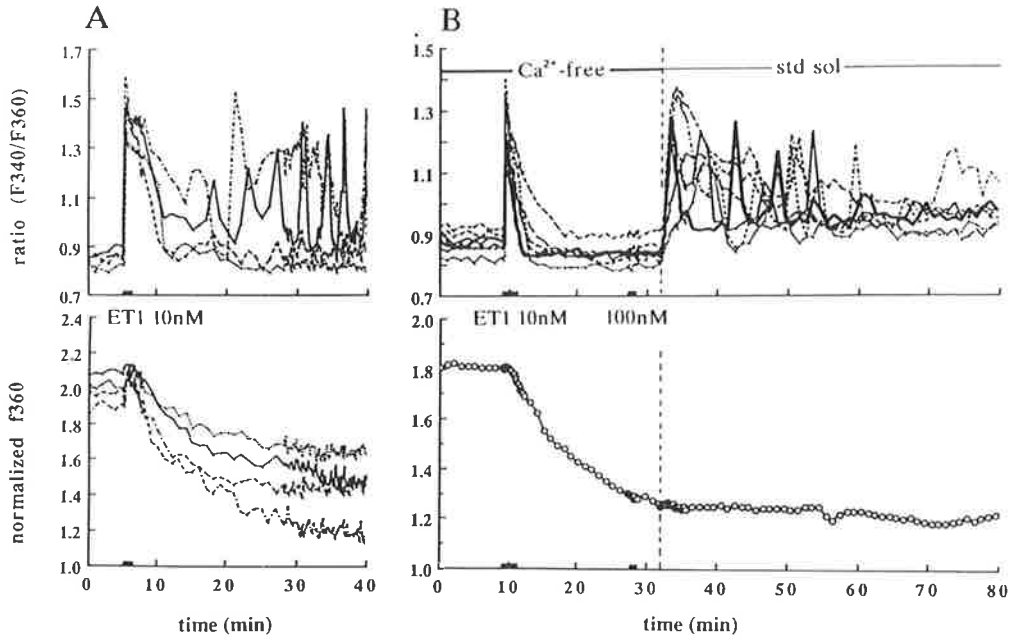


図2　通常リンゲル液（A）及びカルシウム除去液（B）中での，ET1 によるカルシウム反応（上段；ratio）と形態変化（下段；normalized f360）。ET によって，一過性細胞内カルシウム増加の初期相とカルシウム振動の持続相がみられたが，カルシウム除去液中では持続相は消失した。形態変化はどちらも同様に起こった。

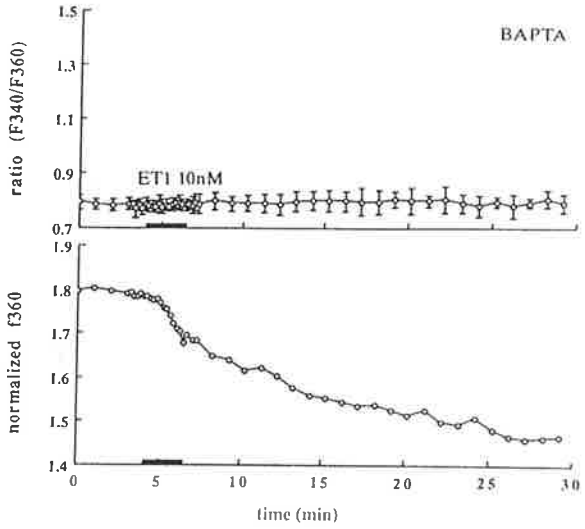


図3　BAPTA-am で処理した細胞ではカルシウム変化（上段）は消失したが形態変化（下段）は同じ様にみられた。

イカ巨大神経 Cl チャネルに対する細胞内 Ca の効果

筒井泉雄，山岸俊一

イカ巨大神経に存在する Cl チャネルは細胞内液の種々の条件（例えば Ca 増加）によってコンダクタンスが増加することが山岸らによって報告されている。またこの Cl チャネルは細胞内アニオンによってコンダクタンスが制御されていることを昨年度報告したが，Ca が濃度依存的にどのようにコンダクタンスを制御しているかは現在のところ明らかではない。今回，EGTA を用いて Ca 濃度を段階的に調整した溶液を細胞内灌流させることによって，Cl チャネルコンダクタンスに対する Ca の濃度の効果を観測した。Cl 電流は Na, K 電流を抑制した状態で細胞外溶液を $MgCl_2$ したとき測定される電流と細胞外溶液を $MgSO_4$ に置き換えた後測定される電流の差電流として測定した。細胞内 Ca 濃度を10^{-9}Mに一定させている状態では Cl 電流は極めて小さく安定している。細胞内 Ca 濃度を10^{-7}～10^{-6}Mに上昇させると，Cl 電流の急激な増加がみられる（このとき同時に nonselective なリーク電流も上昇している）。この Cl 電流の増加は細胞内 Ca 濃度を再び10^{-9}Mに戻しても減少しなかった。さらに細胞内 Ca 濃度を＞10^{-6}Mに上昇させることによって Cl 電流は再び増加した。また，10^{-7}～10^{-6}Mの場合と同様に，細胞内 Ca 濃度を減少させることによっても，Cl 電流の回復はみられなかった。このことは，細胞内 Ca 濃度依存的に Cl コンダクタンスを上昇させる機構が存在し，今回用いた灌流条件では非可逆的に働いていることを示している。この Ca の濃度に依存する Cl コンダクタンスの増加は，生理的 Ca 濃度（10^{-7}～10^{-6}M）から起こりはじめる。このことから，基本的には興奮（その他）に伴いイカ巨大神経中の細胞質 Ca 濃度が増加すれば Cl コンダクタンスが上昇し，Cl チャネルの起電力が出現して細胞静止膜電位変化に何らかの貢献をしている可能性が示唆される。

麻酔作用及び変性作用から見た Na チャネルの構造

久木田文夫，美宅成樹（東京農工大）

イカ巨大神経線維の細胞内灌流標本を用いて，1価の脂肪族アルコールの作用を調べた。このアルコールは典型的な全身麻酔剤様の Na 電流抑制作用と膜タンパク質の変性作用を有することが知られている。本研究では Na チャネルタンパク質の膜中での高次構造の変化を反映している現象として麻酔作用と変性作用を生理学的な実験手法で解析することを目指している。又，本研究は一次構造の報告されているイカの Na チャネルタンパク質の実験データを用いて膜中の高次構造を予測する理論的な研究と相補的な研究として位置づけ研究を進めている。

変性作用の解析は伝統的な生理学や薬理学的な研究に於いては難しい問題であるが，本研究で

は1）化学的に安定したイカ巨大神経線維のNaチャネルを対象とすること，2）速度論的な手法で解析すること，3）薬理作用（麻酔作用）として既に研究されている薬物を用いることにより，説得力のある解析を行うことに成功した（参考論文）。変性作用の重要な律速過程に4－8個のアルコールがNaチャネルの分子間水素結合部位に結合する過程があることが示唆できた。

麻酔作用は非常に興味のある生理的な現象であるが，Naタンパク質の構造と言う視点から眺めると新たな展開が期待できる。現在のところ，麻酔作用は変性作用とは独立で，変性していないNaチャネルタンパク質に対して短時間に一定の割合のNaチャネルタンパク質の機能を抑制する可逆的な過程である。変性作用と異なりアルコール結合部位は1－2個である。変性は麻酔状態にある時間と麻酔状態にあるNaチャネルタンパク質の量に比例して進行する。

【参考文献】

Kukita, F., Mitaku, S. Journal of Physiology (1993), 463, pp523-543

ヤリイカ巨大軸索のシュワン細胞の性質

久木田文夫，ブラウン，E.（プリマスMBA）

イカ巨大神経線維のシュワン細胞の形を膜電位を測定後，Lucifer Yellowを注入することにより，調べた。

イカ巨大軸索の周りのシュワン細胞は軸索の長軸方向に配向した，基本的には紡錘形をした偏平な細胞である。太い部分は長さが297±87μm (n＝55) で幅は31±10μmである。細い複数の突起を持っているが，細い突起も含めた全長は526±114μmであった。膜電位は約－50mV前後であるが，－44mV程度の細胞群と－56mV程度の細胞群に分かれる傾向にあり，この原因や生理的な意味について様々な角度から検討している。

シュワン細胞の役割の一つと考えられるKイオンの除去作用の生理的重要性について，活動電位の形や反復刺激に対する応答などのコンピュータシミュレーションで解析しつつある。

アオリイカの長期飼育

久木田文夫，奥長之助（伊根町）

アオリイカは短期間に成長することで知られており，その飼育もイカ類の中では比較的容易である。生理学研究所伊根実験室では，従来ヤリイカを用いた研究を進めてきたが，長期飼育の容易なアオリイカを用いた研究プロジェクトを開始した。イカを用いた研究は今までは神経線維の

太いことを利用して研究が進められてきており，大きなイカが対象であった。このことは逆に，最近の発達した顕微技術を用いる際には欠点となっている。本研究は比較的小さなイカを用いて，動物全体を用いた実験やシュワン細胞や神経細胞の酵素処理に依る単離や細胞培養，結合組織の少ない巨大シナプス標本の作成，神経細胞の発生学的な研究等の足場を作るための不可欠な研究である。

具体的には９月中旬に入手した体長10㎝程のイカを約半年間飼育することに成功した（このイカは水槽の改造・増設の際，移動時の水温調整のミスによりショック死した)。餌はイカが捕食し易い大きさの生きたアジを与えた。水温（水温20度前後）を僅かに下げると捕食を減少させることが出来，上げると捕食を増加させ体長を大きく出来た。この結果，必要な大きさのイカを長期間保存することも可能であることが明らかになった。このシーズンに飼育したイカの最終的な体長は25㎝以上であった。

モルモット輸精管の収縮特性

加藤健一，筒井泉雄，山岸俊一

平滑筋は，主に内臓器官壁及び脈管壁を構成し，内容物の輸送や撹拌などの機能をつかさどっている。また，平滑筋は同じ種の動物においても臓器によって，あるいは同じ臓器でも部位によって性質が多様であることが近年多くの研究により明らかになっている。我々はモルモットの輸精管平滑筋に着目し，その収縮の特性を組織レベルから及び細胞レベルから明らかにすることを目的として研究を進めている。今回は特に収縮特性について報告する。

モルモットより摘出した輸精管を Ca^{2+} -free の生理食塩水中にて外表面の結合組織を取り除いた後，睾丸側，中部，前立腺側の３つの部位に分け，それぞれをトランスデューサーに接続して縦走筋方向の収縮反応を観察した。主に，ACh, ATP, NA （ノルアドレナリン）により誘発される収縮を観察した。これらのアゴニストは，TTX により神経活動を抑制した条件でも非存在下と同様の収縮を誘発するので，直接筋に作用していると考えられる。この３種類のアゴニストに対し，睾丸側では一過性の大きな収縮とそれに続く持続性の収縮が観察された。中部ではほぼ睾丸側とにた収縮性を示すが，持続性の収縮が一過性の収縮に対して小さい傾向にあった。前立腺側ではほぼ一過性の収縮のみしか観察されなかった（図１)。それぞれのアゴニストに対する収縮反応は睾丸側がもっとも高く，中部，前立腺側に行くにしたがって低くなった。前立腺側では，脱感作が大きく同じ濃度の反復刺激に対して安定した反応が得られないことが多い。

次に細胞内カルシウムストアが NA (10^{-4}M) に誘起される持続性収縮にどのように関与しているかを調べる目的で，カフェインを用いて実験を行った。NA により誘起される持続性の収縮は，NA 存在下で数分間安定して持続する。このことから，NA 投与後３分後の収縮長を基準とし，

その点でカフェインを投与して投与後3分の変化率を調べた。その結果カフェインは持続性の収縮を弛緩させた。この弛緩の度合いは濃度依存性（1×10^{-3}M～20×10^{-3}M）であり（図2），20×10^{-3}Mでは3分後にほぼ完全に弛緩（自然長）した。

カフェインが，ホスホジエステラーゼ(PDE)を抑制するという報告(Butcher, R. & Sutherland, E., J. Biol. Chem., 237, 1244-1250, (1962))から，PDEの抑制効果を持つイソブチルメチルキサンチン(IBMX)を同様に投与した結果，カフェインと類似した効果が得られた。以上のことから，輸精管のNAによる持続性収縮状態は細胞内cAMP濃度に依存して維持されている可能性が示唆された。

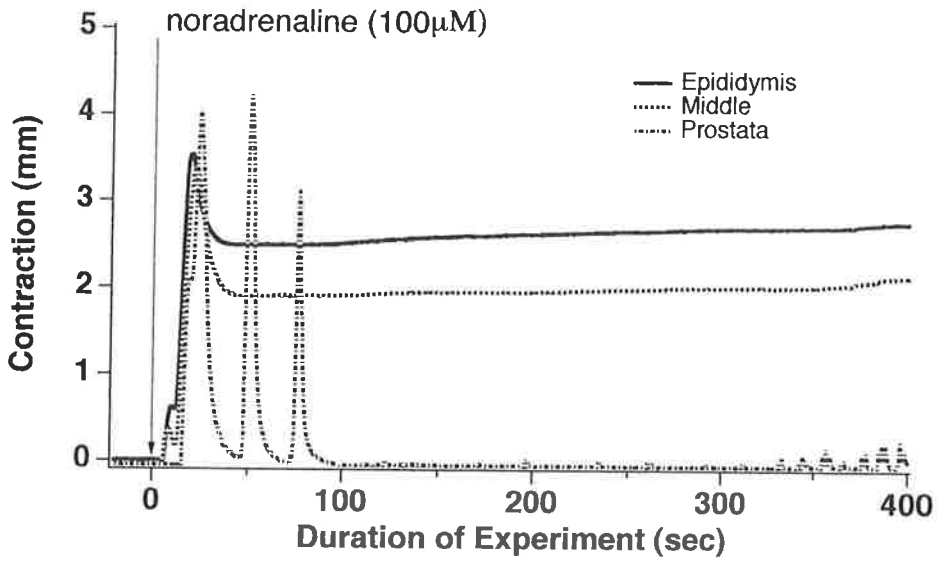


図1　NA (10^{-4}M) により誘起された輸精管の収縮特性

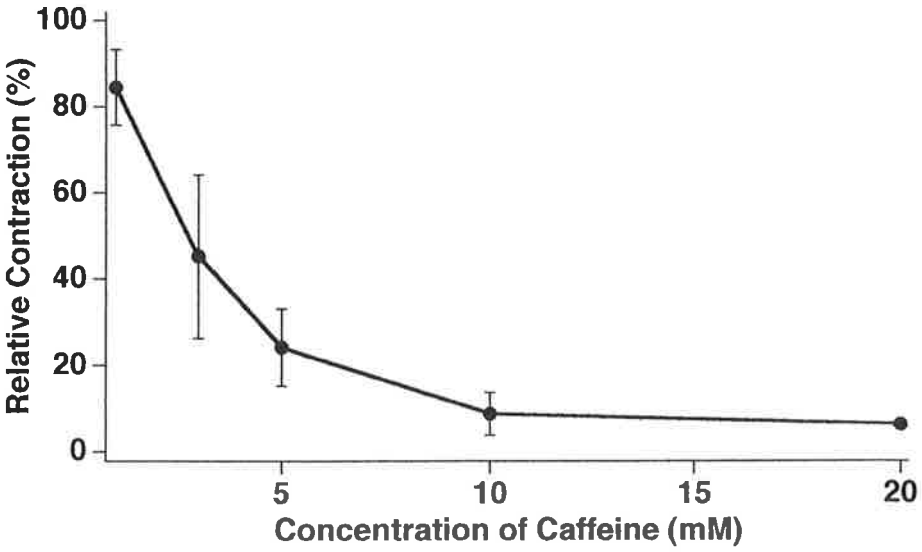


図2　カフェインによる持続性収縮弛緩作用；濃度－反応曲線

機能協関研究部門

【概要】

本部門では，イオンチャネルやキャリアーやポンプなどの膜輸送蛋白の活性制御機構，それらの細胞機能における役割，および神経活動機構などについて研究している。岡田と挟間は主として細胞容積調節機構について，寺川は神経伝達物質放出機構について，そして中山は神経成長円錐伸展機構についての研究を行った。

細胞容積調節機構とイオンチャネル

岡田泰伸，挟間章博
久保町子（京都大・医・生理）

ほとんどの細胞は異常浸透圧環境下に置かれ続けても一時的に収縮や膨張を強いられはするが，その後短時間のうちに元の正常容積へと復帰する。低浸透圧環境下での浸透圧性膨張後の容

積調節能は調節性収縮と呼ばれる。私達のこれまでの研究により，図１に示すごとく，上皮細胞の調節性収縮のメカニズムはK^+チャネルとCl^-チャネルの並列的開口による KCl 流出が水流出を駆動することに帰せられること（文献１，２），そしてこの過程に細胞内Ca^{2+}動員（を行う種々のチャネル）が重要な制御的役割を果たすこと（文献３－５）が明らかになった。

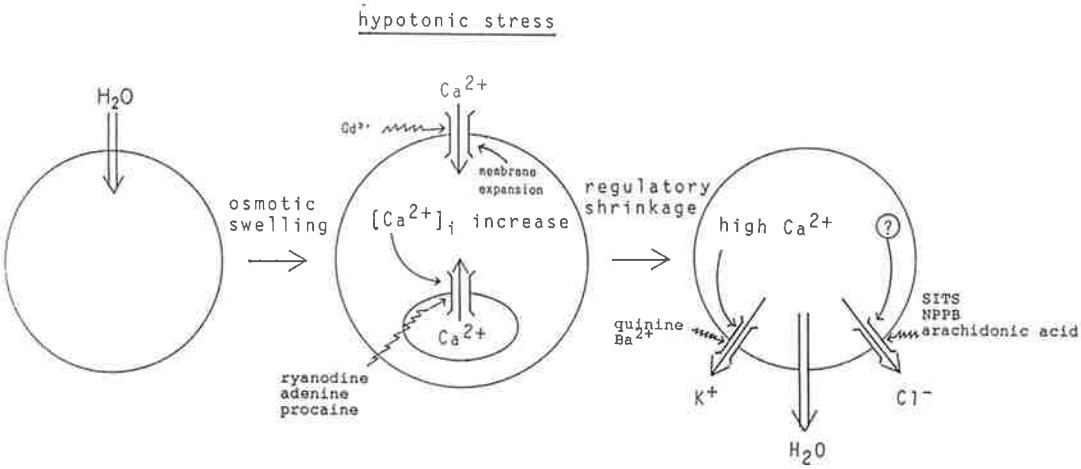


図１：低浸透圧環境下での細胞容積調節メカニズム。

1992年度はまず，パッチクランプ法を用いてヒト小腸上皮株細胞の容積調節性Cl^-チャネル電流の性質を調べた。その結果，このCl^-チャネルが図２に示すような特異な電位依存性を示すこと，図３のようにアラキドン酸で顕著に抑制されることなどを明らかにした（文献６）。

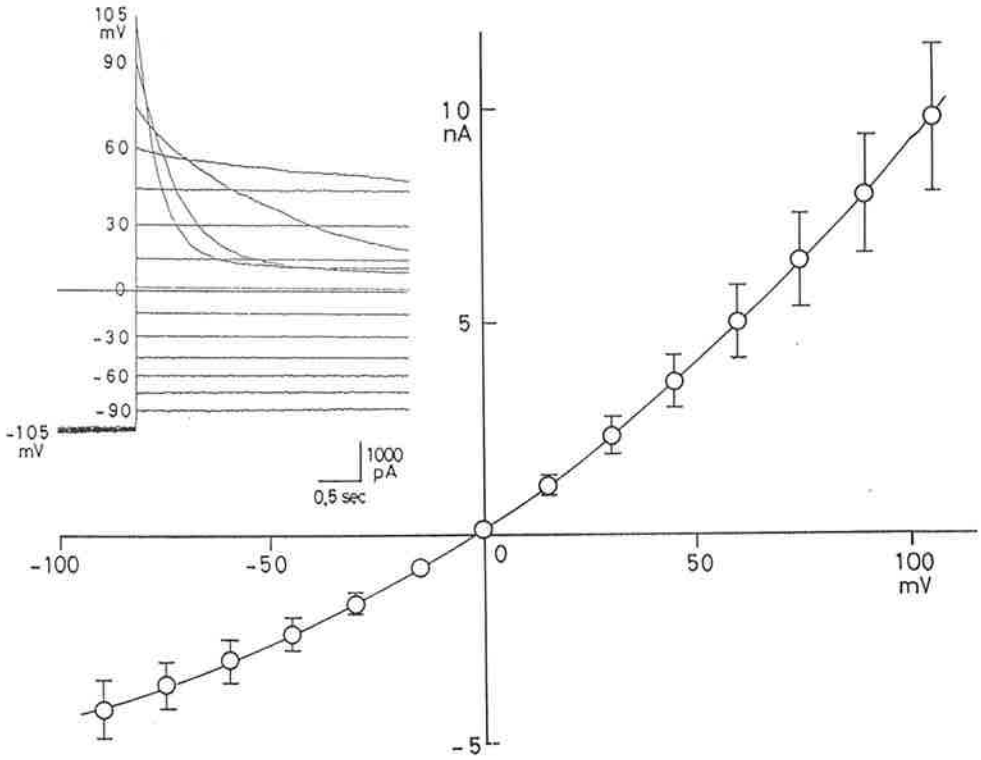


図２：培養小腸上皮細胞の容積感受性 Cl^- チャネル電流の電位依存性。（文献６より）。

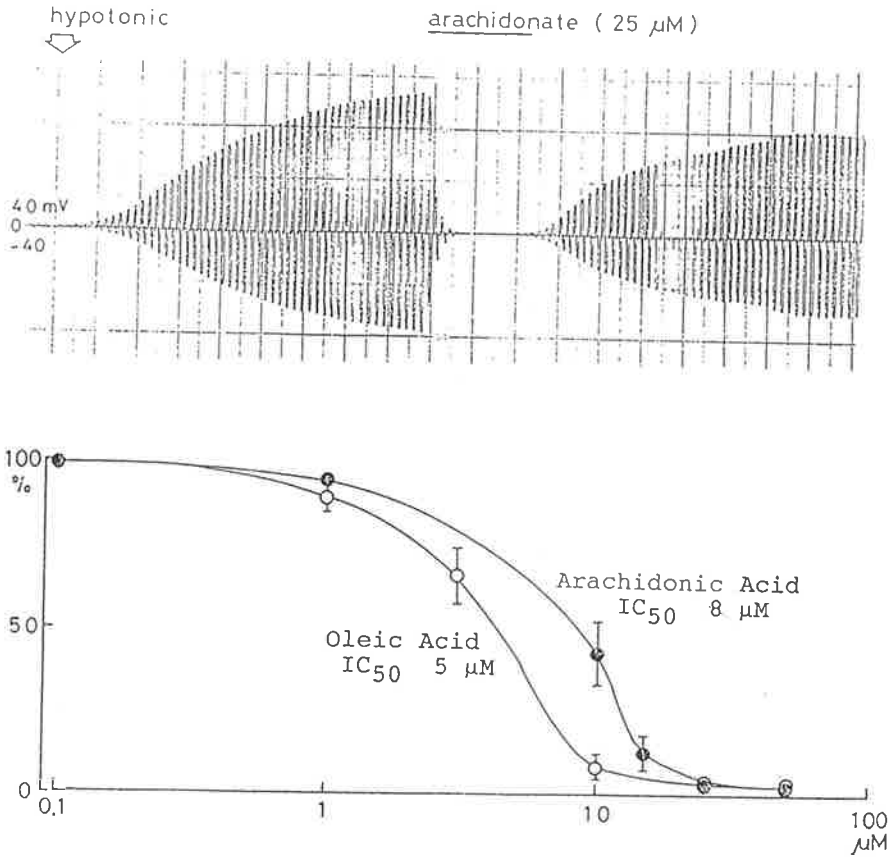


図３：培養小腸上皮細胞の容積感受性 Cl^- 電流のアラキドン酸及びオレイン酸感受性。(文献６より)。

また，同上皮細胞に図４で示すような私達自身が開発した位相感受性膜容量・膜電流同時測定法を適用して浸透圧性膨張時にエキソサイトーシスによる膜容量（表面積）増の発生すなわち新膜挿入が行われ（図５），これが阻止されるとその後の容積調節ができなくなること，しかし容積調節性イオンチャネルの動員はこのエキソサイトーシスによって行われるものではないことなどをはじめて明らかにした（文献７）。

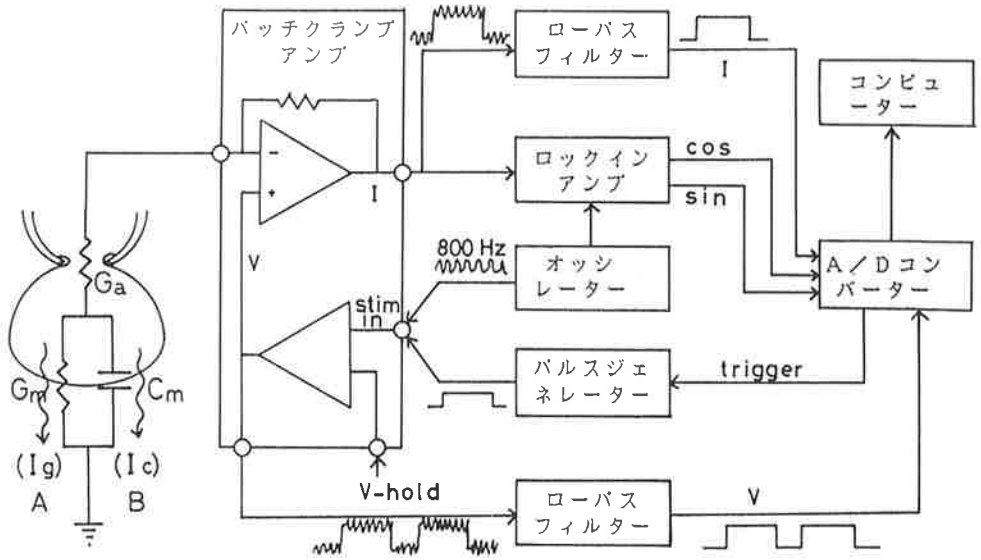


図4：膜容量・膜コンダクタンス・膜電位の同時記録システム。(文献7より)。

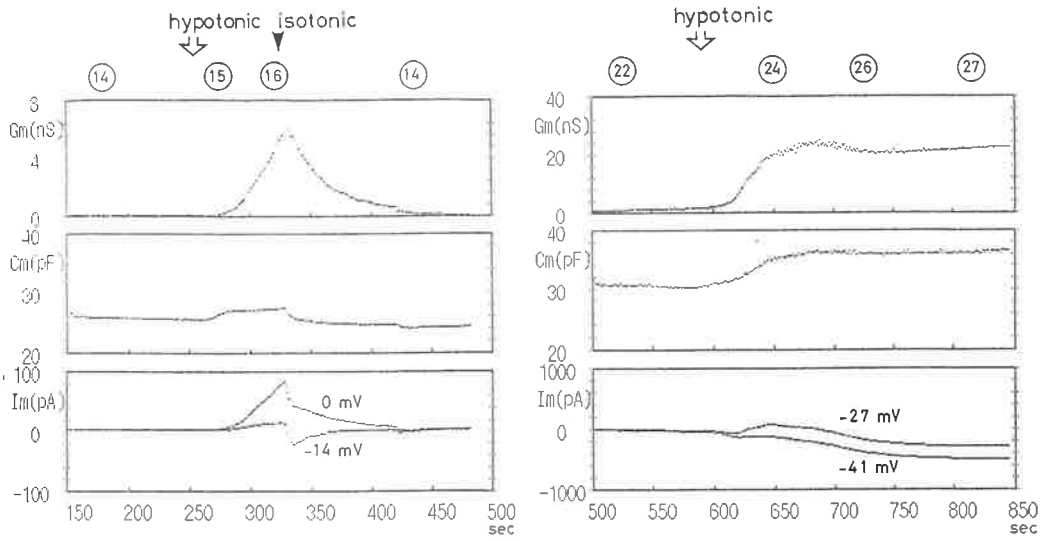


図5：低浸透圧性細胞膨張時の膜容量(Cm)増。膜コンダクタンス(Gm)及び膜電流(Im)も同時に増大している。但し，円内数字は細胞直径(μm)を示す。(文献7より)。

【文献】

1. A. Hazama & Y. Okada (1988) Ca^{2+} sensitivity of volume-regulatory K^+ and Cl^- channels in cultured human epithelial cells. J. Physiol. 402, 687-702
2. Y. Okada & A. Hazama (1989) Volume-regulatory ion channels in epithelial cells. News Physiol. Sci. 4, 238-242
3. A. Hazama & Y. Okada (1988) Involvement of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release in the volume regulation of human epithelial cells exposed to a hypotonic medium. Biochem. Biophys. Res. Commun. 167, 287-293
4. A. Hazama & Y. Okada (1988) Biphasic rises in cytosolic free Ca^{2+} in association with activation of K^+ and Cl^- conductance during the regulatory volume decrease in cultured human epithelial cells. Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 416, 710-714
5. Y. Okada & A. Hazama & W. -L. Yuan (1990) Stretch-induced activation of Ca^{2+} -permeable ion channels is involved in the volume regulation of hypotonically swollen epithelial cells. Neurosci. Res. 12, S5-S13
6. M. Kubo & Y. Okada (1992) Volume-regulatory Cl^- channel currents in cultured human epithelial cells. J. Physiol. 456, 351-371
7. Y. Okada, A. Hazama, A. Hashimoto, Y. Maruyama & M. Kubo (1992) Exocytosis upon osmotic swelling in human epithelial cells. Biochim. Biophys. Acta 1107, 201-205

多重光学顕微鏡法による神経終末情報伝達の分子機構解析

寺川　進
熊倉鴻之助（上智大・理）

神経細胞はその軸索終末部から伝達物質を放出し，遠くの細胞や，近接の細胞に情報を送る。この終末部における神経活動は，生体制御や知的機能の基礎をなしている。従って，この部位の反応機構を解析することによって，システムとしての高度な生体機能を物質的，分子的な法則から説明できる可能性が高い。しかし，これまでの電気生理的な研究方法では，伝達物質の放出の程度を正確に知ることはできるが，その放出に至るまでに節前終末内でのどのようなことが起きているのかを直接知ることはできなかった。節前終末内の顆粒の変化を直接調べるには1万倍以上の超高倍率で無固定の標本を観察対象とするビデオマイクロスコピーの手法が適している。本研究では，超高倍率ビデオ強化式微分干渉法によって神経終末内に見られるエキソサイトーシスの動的な特性を調べ，トランスミッター放出に関するいくつかの仮説を直接的に検証した。さら

に，この観察と同時的に，かつ独立的に，同一標本で蛍光観察が行える多重光学顕微鏡装置を開発し，神経終末の活動を直接捉えた。これによって，トランスミッター放出過程としてのエキソサイトーシスの動特性と，細胞内メッセンジャーとしてのCa信号の特性との比較を行った。

【方法】

標本としては，ウシ副腎髄質よりコラゲナーゼ処理によって単離したクロマフィン細胞を用いた。これを，コラーゲンコートしたカバーガラス上に1～3週間接着培養して神経細胞型へ分化させ，シナプス類似構造を形成させた。培養液には10%ウシ胎児血清と10mMのHEPES (pH 7.4) を含むDMEM溶液を用いた。Caイメージングとビデオによるエキソサイトーシス観察を同一標本で同時に行うために，すでに使用しているビデオ顕微鏡を一部改良した。蛍光観察のための照明に380nmの光を，ビデオマイクロスコピーのための照明に650nmの光を用い，ダイクロイックミラーを使って500nm領域の光と650nm領域の光を分離し，独立の蛍光像と微分干渉像を得た。分離された光は非常に弱くなったので，100倍の紫外対応対物レンズ (N. A＝1.3) を使い，高感度でかつ低ノイズのICCDカメラを用いて像を捉え，高い分解能を達成しながら神経終末のエキソサイトーシスと細胞内Ca濃度変化の同時イメージングを行った。微分干渉像の観察からエキソサイトーシスをした顆粒の位置，大きさ，数とその分布，等を観察し，同時に蛍光法によって，細胞内Caイオン濃度の2次元分布を観察し，エキソサイトーシスとの相関性を調べた。

【結果と考察】

クロマフィン細胞は比較的偏平な形になって培地に接着し，数本の長い線維状突起を出し神経細胞様の形をとった。突起の先端は隣の細胞に接着しシナプスによく似た特別な形態を作った。このような部位で節前線維を刺激すると終末内の分泌顆粒が多数弾けるような急激な変化をするのが見られた。この反応は外液中のカルシウムイオンを取り除くか，外液中に微量のカドミウムイオンまたはランタンイオンを加えると完全に消失した。反応した顆粒の見かけの大きさは，最も小さなものでは0.2ミクロンを切るほどであった。反応はコラーゲン基質に接着した細胞膜面と溶液に面した膜面でも起こったが，隣接細胞との接触面において特に高い頻度で起こった。繰り返し刺激をすると一回刺激の整数倍数よりはるかに大きな反応が起こり，促通現象が見られた。また，繰り返して刺激をすると10回ほどで反応性は低下し，疲労現象が観察された。このとき，終末内の顆粒数は減少することが分かった。このような性質から，微小な顆粒の弾けるような反応はエキトサイトーシスであると結論した。ビデオ画像に見られるエキソサイトーシスの反応の解析から，これまで広く信じられていたエキソサイトーシスの開始に関する2つの仮説的な機構はいずれも誤りであることが分かった。

【エキソサイトーシスの開始機構に関する仮説】

エキソサイトーシス開始の信号に関する第1の仮説は膨潤仮説である。この仮説によれば，分泌顆粒の膜融合の直前には顆粒限界膜のイオンチャネルが活性化し，顆粒内の浸透圧が上昇して水の流入が起こり顆粒が膨潤する。これが顆粒膜と細胞膜の融合の直接的な引き金となると考え

られている。第２の仮説は衝突仮説である。この仮説によれば，刺激のないときは顆粒が細胞膜に接着するのを妨げる機構（アクチン繊維網）があり，刺激によってこれが取り除かれると顆粒が細胞膜に接着し，接着しさえすれば融合が進行するものとされる。

【膨潤仮説の検証】

終末では，一回の短い電気パルス刺激によって多数のエキソサイトーシスを引き起こすことができる。これは，エキソサイトーシス開始のタイミングを正確に決めた状態で個々の顆粒の反応を比較できることを意味している。顆粒の膨潤仮説に従えば，小さな顆粒は大きな顆粒に比べてより早いタイミングでエキソサイトーシスを起こすことが予言されている。これは，小さな顆粒の方が表面積／体積の比が大きくなり，一定面積の顆粒膜を通しての水浸透の効果が強く現れ易いと考えられるからである。そこで，電気刺激によって誘発されたエキソサイトーシス顆粒の直径とその顆粒のエキソサイトーシス反応の起こった時刻の関係を調べた（図１参照）。この解析結果によると，特に小さい顆粒が大きい顆粒よりも早くエキソサイトーシス反応に入るわけではないことがわかる。これは膨潤仮説が予言する性質に反するのでこの仮説を否定する強い根拠を与える。

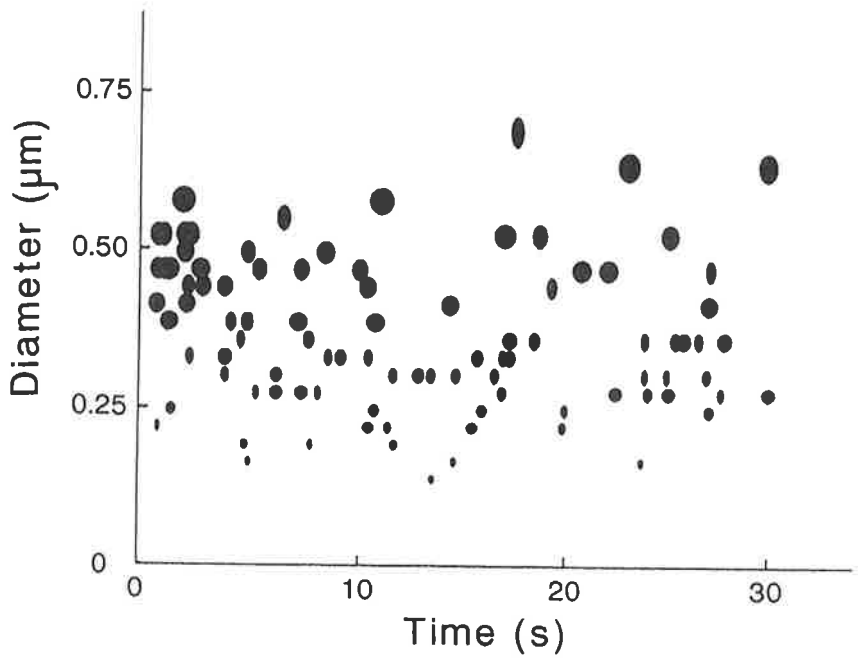


図１．エキソサイトーシス反応をした顆粒の大きさ（縦軸）と刺激からその反応までの遅延時間（横軸）との関係。クロマフィン細胞の終末に接着させた微小ピペットから，単一パルス（１ミリ秒，1.5μA）の電気刺激を時刻０のときに与えた。各点の大きさと形状は実際の大きさに比例的に合わせてある。

反応する顆粒の直接観察によっても，エキソサイトーシスの急激な反応の直前に直径が増加することは無いことがわかる。ビデオ画面で顆粒を囲む領域の明るさを４ミリ秒の時間分解能で測定すると，顆粒内容が放出されるのにともなって，顆粒の明るさは初めの明るさの10％以上急激に変化するが，その直前には明るさの変化は１％も認められない。このような測定からも顆粒は，エキソサイトーシス反応の直前には膨大化しないことが結論される。一方，エキソサイトーシス反応の直後には顆粒はΩ形になるが，この構造はしばしば直径を増大させるのが認められる。顆粒内容が細胞外液にさらされることによって浸透圧的な活性が高まるために，水がΩ形の中に引き込まれて開口後に顆粒膨大が起こると考えられる。

【衝突仮説の検証】

エキソサイトーシスの開始に関する第２の仮説についても検証した。終末内に充満している無数の顆粒はそれぞれに常に揺動しており，細胞膜に不規則に接触しているように見える。刺激によってこの運動性は変わらないか，もしくは多くの例で数10秒のうちに減少する。このことは多くの顆粒を含む２枚のビデオ画像の差分を取ることによって定量的に示すことができる。顆粒の運動によって時々刻々の画像は変化するので，差分画像にはその変化の程度に応じた濃淡が生じる。その濃淡の強いほど，顆粒の動きが速いことになる。濃淡の強さは，画像面のすべての点の明るさの分布ヒストグラムを作ると定量的に測定できる。刺激の無いときと刺激してエキソサイトーシスが盛んに起こっているときのそれぞれについて，一秒の時間間隔で得た２枚の連続画像間の差についてこのような解析をすると，刺激によって顆粒の運動はフォーカス面（Ｘ－Ｙ軸）方向にも光軸（Ｚ軸）方向にも全体として低下することがわかる。

微分干渉顕微鏡には標本を光学的に薄切りにする能力がある。薄切りの厚さは１μｍ程度であるが，その光軸上の位置は0.1μｍの精度で決めることができる。顕微鏡フォーカスの微調節ノブにロータリーエンコーダーを直結し，フォーカス位置を0.1ミクロンの精度で記録しながら，単一の顆粒の３次元的な位置を追跡すると，顆粒は細胞膜にブラウン運動的に近づいたり，離れたりしていることがわかる。細胞質の深部から細胞膜に近づいて，しばらくは膜（近傍）に留まり，再び細胞内に離れていくという運動をするものが多数見られる。刺激開始直後，この動きの程度は変化せず，エキソサイトーシスが起こる。刺激が30秒ぐらいに長くなると，顆粒の動きは低下し，細胞膜（近傍）に留まる時間が増える。そのような顆粒の中から確率的にエキソサイトーシス反応が起こっていく。数秒から10秒程度の接着時間があってから融合反応が起こるようである。細胞膜から遠くに離れたところの顆粒が刺激後急に膜に移動するということは無いことが分かる。

エキソサイトーシス反応に伴って，顆粒の微分干渉像の明るさは急激に変化する。この急激な変化の曲線には一つの成分しか含まれず，顆粒が膜に急接近することによって生じる成分は見あたらなかった。微小顆粒と対物レンズ間の距離と顆粒の明るさの変化の較正から決定される顆粒の動きは，４ミリ秒の時間分解能のもとで，あるとしても40nm以下であることが結論された。

【DIC 像と Ca 反応像の同時多重イメージング】

エキソサイトーシス反応は細胞外溶液の Ca イオンを取り除くと完全に抑えられるので，細胞膜を通しての Ca イオンの流入に依存したものである。Ca イオンの細胞内上昇がどの様に分子機構に転換され，顆粒膜と細胞膜の融合や，細胞膜の急速な突出を引き起こすのかという問題を解くには，細胞内 Ca イオン濃度の上昇と細胞の微小形態反応との関連，その間の分子的な反応鎖を明らかにする必要がある。例えば，隣接細胞への接着面におけるエキソサイトーシス頻度はきわめて高いが，これはこの部分の Ca 流入が多いからなのか，細胞膜が特別な分化をしているためなのか，を決める必要がある。このような関係を知るために，超高倍率におけるビデオマイクロスコピーと蛍光観察を同時に行える様に顕微鏡の改造を行った（方法の章を参照)。このような多重光顕法は低倍率では既に行われているが，エキソサイトーシスを観察できる様な高倍率に対しては世界的にも実現していなかった。

単離クロマフィン細胞を接着培養して長い神経突起や，その終末部が隣接細胞と接着したシナプス類似構造を作らせ，節前側を電気刺激した。節前側神経終末の微分干渉 (DIC) 観察によって伝達物質放出のためのエキソサイトーシス反応が直接とらえられた。Fura2 を細胞にロードし 380nm 励起による Ca イメージングを DIC 像観察と同一標本で同時に行った。Ca 波は刺激部位から接合部へ向かって伝播し，節前側から節後側へと伝達した。Ca 波の立ち上がりは約30ミリ秒で，立ち下がりは 1 秒ぐらいの遅いものであった（図 2 参照)。節前から節後への伝達には数百ミリ秒の明瞭な遅れがあり，シナプスにおける遅延時間に対応していた。節前終末でのエキソサイトーシスはこの遅延時間内には 5 個程度観察され，その後10数個以上観察された。これらのことから，シナプス（類似）構造において実際に信号伝達が示され，シナプス類似構造におけるエキソサイトーシスの可視化が初めて成功したことが証明された。節前終末でのエキソサイトーシスは細胞間接合面近傍でその頻度が高くなり（図 3 参照)，自由終末での均一な頻度分布と対照的であった。しかし，この反応の現れた部位の蛍光強度変化は刺激部位におけるより特に大きなものではなかった。終末における顆粒分布等に特別な偏りが無いことは DIC 観察から明らかであり，エキソサイトーシスの頻度は細胞内 Ca イオン濃度だけでなく細胞膜の膜融合特性も重要な制御因子であることが分かった。

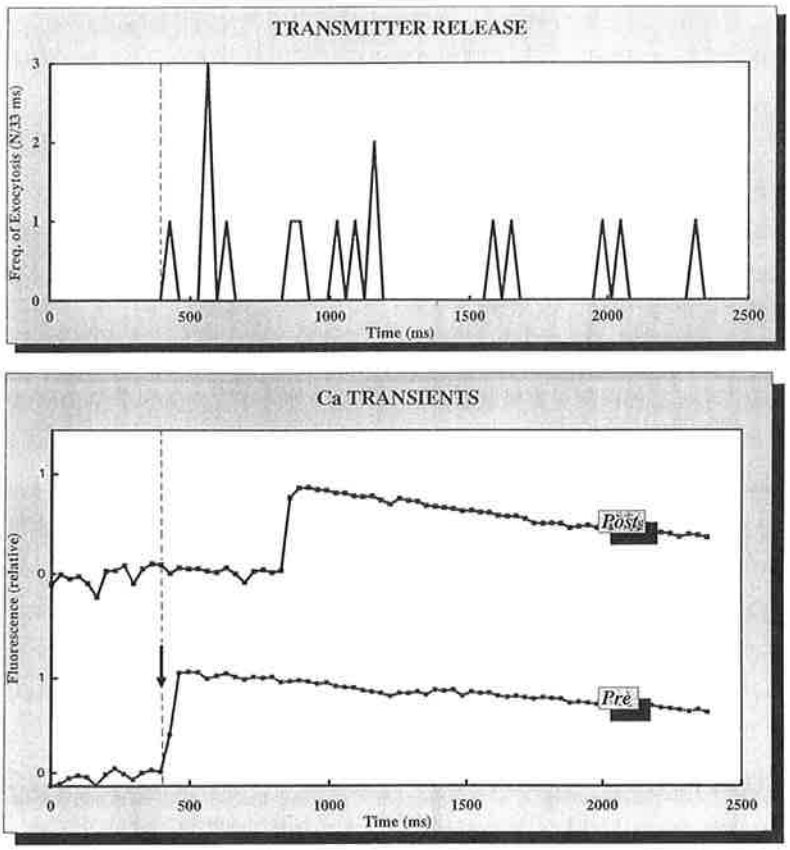


図2．多重光顕法によるシナプス類似構造でのエキソサイトーシス反応（上）とCa反応（下）の同時測定。ビデオの各駒当りの顆粒の明るさの急激な変化を数えてエキソサイトーシス数とした。波長380nmの光を励起側に使用し，500nmの干渉フィルターを用いて蛍光をビデオ記録したものから，終末(Pre)とそれが接着した節後細胞(Post)での蛍光強度の時間変化をプロットした。矢印の時点で1ミリ秒の電気刺激を節前側の終末に与えた。

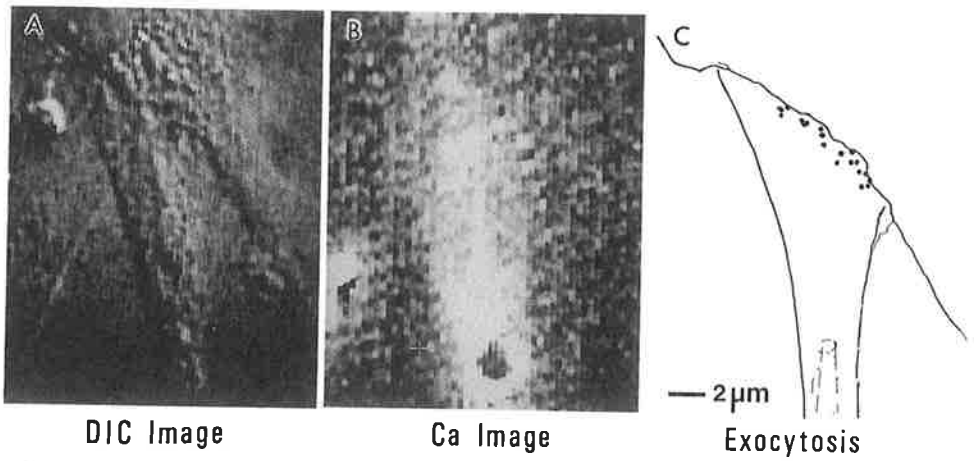


図3．クロマフィン細胞がつくったシナプス様構造に多重光顕法を応用して得た，DIC像（左），Ca反応像（中央の図の白い部分），およびDIC像から求めたエキソサイトーシス反応（右図の黒点）。Ca像は380nmの励起光によるfura-2の蛍光像を刺激直前と刺激後100ミリ秒にとりそれらの画像間の差分を表示したもの。エキソサイトーシス反応は刺激後7秒以内に起こったものをプロットした。各図の上部が節後細胞で，中央に節前終末がある。刺激電極の位置は右図の点線で示した。

【長期増強の節前側のメカニズムとしてのリクルート膜形成】

クロマフィン細胞にできる疑似的なシナプスの接合面近傍では，膜表面から時に大きな陥没腔が形成されることがあった。このような陥没腔ができるときにはその膜に向かってエキソサイトーシスが頻繁に起こった。顕微鏡像での単位面積あたりの頻度を比べると陥没腔ができるときはできないときの10倍に達した（図4参照）。このような陥没腔の形成はシナプスのように反応部位面積が限られている場合にエキソサイトーシス頻度を増大させるメカニズムとなっていると考えられる。陥没腔ができる機構としては，エキソサイトーシスした顆粒の浸透圧上昇のために顆粒が膨大化するのと，エキソサイトーシス反応をした顆粒の膜の回収過程が遅れることによるものとがある。繰り返し刺激で膜の回収に携わる分子が消費されると，複合型エキソサイトーシスが起きて陥没腔ができ，その結果頻度が増大するという長期増強の分子機構が考えられる。陥没腔は細胞質の中に広がって，本来ならばブラウン運動で細胞膜に達しなければエキソサイトーシス反応に至らないものが，細胞質のその場でエキソサイトーシス反応に与るようになるので反応頻度が増大する。このような意味で，陥没腔を形成する膜は細胞内部の顆粒をかき集める役を果たすのでリクルート膜と命名した。

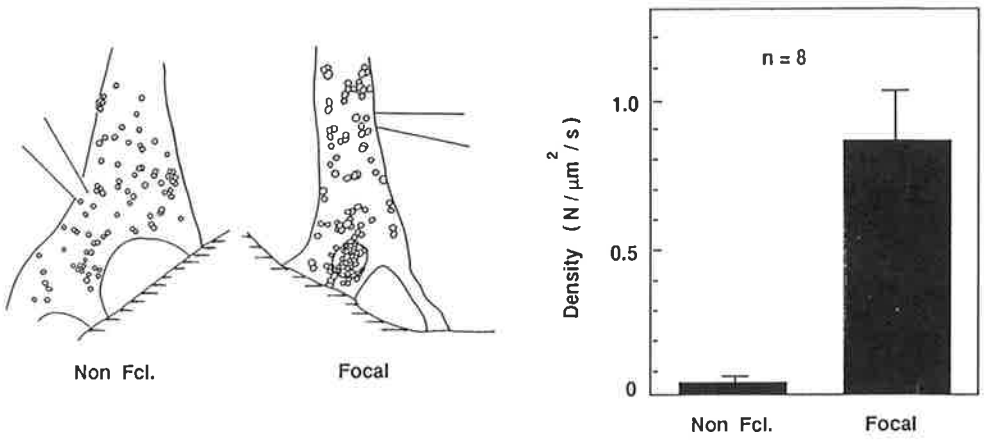


図４．終末構造にて陥没腔が形成されない時（左）とされたとき（中央）のエキソサイトーシスの頻度の違い（右）。中央の図の下部にあるように陥没腔ができた部位に隣接して起きたエキソサイトーシスの数を数え，陥没腔の面積当たり，１秒当たりの頻度 (Density) とした。陥没腔ができなかったときは終末全体の面積当たり頻度とした。陥没腔を focus としてエキソサイトーシス反応が起きるのがわかる。

【展望】

これまでのところ，ビデオマイクロスコピーによって微小な細胞反応が色々観察できるようになったが，これだけではなかなか分子レベルのメカニズムの解明は困難である。これまで考えられてきたエキソサイトーシスのメカニズムに関するいくつかの仮説が殆どすべて当てはまらないということは分かったが，それでは，どの様なメカニズムが働いているかについて，現在のところ結論は出ていない。今後さらに，蛍光法を取入れて細胞の微細形態変化との同時観察をし，細胞内分子の特異的な信号や，標識化分子の位置，分布，濃度変化などを同時に観察する必要が有る。カルシウムイオン濃度だけでなく，cAMP 濃度や，IP3, プロテインキナーゼＣなどのような細胞内における信号伝達物質の濃度変化を，蛍光法によって可視化することも次第に可能になりつつあり，また，終末特有の蛋白が明らかになり，それらに対する抗体が作られて各種免疫的手法も開発されてきているので，これらの方法を組み合わせて，神経終末の活動に際する分子機構を解明していくべきであろう。

網膜基底膜の細胞外マトリックスに対する抗体の作製

中山　孝（機能協関）
古家園子（生理機能）

鶏胚網膜の基底膜を取りだしてプラスチック・シャーレ上にコーティングし培養基質とした場合，著しい神経突起の伸展促進作用をもたらす事を既に報告した。この促進作用は神経の種類に関係なく機能しており，従来知られている細胞外マトリックスであるラミニンやコラーゲンに対する抗体では中和されることがなかった。そこで基底膜成分に対する特異的なモノクローナル抗体を作製するため，in vitro でマウスのリンパ球を基底膜成分で感作し，ミエローマ細胞と細胞融合をおこなってハイブリドーマを得た。モノクローナル抗体のスクリーニングとしては孵卵7～10日目までの鶏胚眼の凍結切片をもちいた免疫蛍光法によった。その結果，基底膜を強く染めるクローンをいくつか得ることができた。現在，高感度ビデオカメラ，画像処理装置，タイムラップスビデオレコーダーを組み合わせて，実際に伸展していく成長円錐に対しこれらの抗体がどのように作用していくか検討を加えている。

能動輸送研究部門

【概要】

本研究部門では，細胞内小胞輸送の分子メカニズムの解明を目的として研究を行っている。従来より，細胞内小胞輸送とその制御機構の異常は，種々の内分泌，神経，免疫疾患の病因と密接に関係していると考えられており，細胞内小胞輸送の分子メカニズムを解明することは，生物系のみならず医学においても極めて重要である。

最近，細胞内小胞輸送の制御に *ras* p21 類似低分子量 GTP 結合蛋白質（G蛋白質）が関与していることが明らかになりつつある。私共は，この低分子量G蛋白質とその活性制御蛋白質および標的蛋白質を見出し，低分子量G蛋白質が細胞内小胞輸送に果たす機能と作用機構について解析を進めている。

低分子量G蛋白質は分子量2～3万でサブユニット構造を有していない一群のG蛋白質であり，その代表はがん遺伝子として発見されている *ras* p21 である。現在，50種類以上のメンバーが見出されており，スーパーファミリーを作っているが，このスーパーファミリーのサブファミリーである Rab ファミリーが細胞内小胞輸送の制御に関与している。Rab 蛋白質には GDP が結合した不活性型と GTP が結合した活性型が存在し，GTP 結合型がその標的蛋白質に作用してその機能を遂行する。静止時の細胞では，Rab 蛋白質は GDP と結合した不活性型として細胞質に存在し，何らかの機序で GTP 結合型に転換されると細胞膜あるいは小胞膜に存在していると考

えられている標的蛋白質と結合し，その結果，この細胞膜から小胞が出芽するか，あるいは小胞がアクセプター膜に輸送されて融合する。これらの反応後に，Rab 蛋白質はその GTPase 活性により GDP 結合型に転換され，再び細胞質に戻る。このように，Rab 蛋白質は方向性をもってサイクリカルに小胞の出芽と輸送を制御していると考えられている。私共は Rab ファミリーのメンバーである Rab3 を発見しているが，この中の Rab3A が特に神経伝達物質の放出の制御に関与していることを明らかにしつつある。また，私共は，この Rab3A の GDP と GTP の交換反応を抑制し，Rab3A の細胞質と細胞膜との間の移動を制御する蛋白質である Rab GDI を発見している。この Rab GDI は，昨年度ヨーロッパ EMBL のグループとの共同研究において，Rab3A のみならずほとんどの Rab ファミリーのメンバーの制御蛋白質であることも解明している。さらに，私共は，Rab3A の標的蛋白質を精製し，その cDNA をクローニングして一次構造を決定し，Rabphilin と命名している。この Rabphilin は，従来から知られているシナプトタグミンと類似した構造を有している。このシテプトタグミンは Rab3A 蛋白質とは直接結合していないが，Ca^{2+} 依存性に細胞膜リン脂質と結合する一方，Ca^{2+} チャンネルに連結しているシンタキシンやニューレキシンなどの蛋白質と結合することによって，シナプス小胞を前シナプス膜に融合させると考えられている。Rabphilin もまた Ca^{2+} 依存性に細胞膜リン脂質と結合する活性を有しており，私共は，この Rabphilin がシナプトタグミンと共同して Ca^{2+} 依存性に小胞とシナプス膜との融合を制御していると考えている。

今後，神経伝達物質の放出機構を分子レベルで解明すると共に，その成果を各種「細胞内小胞輸送病」の病因の解明に応用したいと考えている。

smg p25/*rab*3A p25 の標的蛋白質 (Rabphilin) の同定と構造決定

白瀧博通，貝淵弘三，高井義美

smg p25/*rab*3A p25 は *ras* p21 類似低分子量 GTP 結合蛋白質（G 蛋白質）のサブファミリーの一つである *rab* ファミリーに属している。*rab* ファミリーは酵母を用いた遺伝学的解析から細胞内小胞輸送の制御に関与していることが明らかになっている。*rab*3A p25 はシナプスや唾液腺，膵臓の内，外分泌腺などの regulated secretion を行う組織に特異的に分布している。このことから私共は *rab*3A p25 が regulated secretion における細胞内小胞輸送を制御していると考えている。特に，シナプスでは，*rab*3A p25 は前シナプス膜の active zone 近傍の膜上とその直上のシナプス小胞に多く分布しており，シナプス小胞の前シナプス膜への docking や fusion に関与していると考えている。

低分子量 G 蛋白質には，GDP 結合型の不活性型と GTP 結合型の活性型が存在する。GDP 結合型から GTP 結合型への変換は GDP/GTP 交換反応によって，GTP 結合型から GDP 結合型への

変換はGTPase反応によって行われる。GDP/GDP交換反応とGTPase反応は，活性制御蛋白質であるGDP/GTP exchange proteins (GEPs) とGTPase activating protein (GAP) によって制御されている。また，蛋白合成に関与するG蛋白質である延長因子や開始因子とのアナロジーから，小胞輸送に関与する低分子量G蛋白質の作用機構については図1のようなモデルが提唱されている。すなわち（1）非刺激時では低分子量G蛋白質はGDP結合型の不活性型で細胞質に存在している。（2）何らかの機序でGDP結合型低分子量G蛋白質がGTP結合型の活性型に変換されると，（3）ドナー側の膜からbuddingした小胞に存在する標的蛋白質に結合する。（4）低分子量G蛋白質の結合した小胞は，アクセプター側に向かって移動し，アクセプター蛋白質にdockingした後，（5）小胞は膜とfusionする。（6）その後，GTPase活性によりGTPがGDPに変換されてGDP結合型低分子量G蛋白質となり，（7）GDP結合型低分子量G蛋白質は細胞質に戻り次の小胞輸送に備える。このように，小胞輸送において低分子量G蛋白質がサイクリカルに作用すると考えられている。

昨年度までに，私共は*rab*3A p25のGDP/GTP交換反応に抑制的に作用する活性制御蛋白質として*rab* GDIを見いだし，そのcDNAをクローニングして一次構造を決定している。さらに，*rab* GDIがGDP結合型*rab*3A p25の細胞膜への結合を阻害し，*rab*3A p25の細胞質と細胞膜との間のトランスロケーションをも制御していることを明らかにしている。このことから，私共は，*rab* GDIが図2に示すように，*rab*3A p25の活性及び細胞質と細胞膜との間のトランスロケーションを制御することにより小胞輸送を制御していると考えている。ところで，私共は，GTP結合型*rab*3A p25が小胞上の標的蛋白質に結合することを想定しているが，未だこの標的蛋白質は同定されていなかった。そこで，本年度は，この*rab*3A p25の標的蛋白質 (Rabphilin) を同定し，そのcDNAをクローニングして一次構造を決定した。

RabphilinはSDS電気泳動上分子量約85Kで，サブユニット構造をもたない単一のポリペプチドである。RabphilinはGTP結合型*rab*3A p25には結合するが，GDP結合型*rab*3A p25には結合しない。また，同じ*rab*ファミリーに属する*rab11* p24にはGTP結合型，GDP結合型ともに結合しない。Rabphilinはその構造上，大部分が親水性で膜貫通領域を有しない。さらに，図3に示すように，Rabphilinには，CキナーゼやsynaptotagminのC_2領域と相同性の高い配列がC末端側に2回繰り返して存在する。CキナーゼやsynaptotagminのC_2領域はCa^{2+}依存性にリン脂質と結合することが知られている。このことから，RabphilinがCa^{2+}依存性にリン脂質と結合する可能性が示唆される。また，synaptotagminはシナプス小胞膜に局在し，神経伝達物質の放出に関与すると考えられている。したがって，*rab*3A p25はRabphilinを介して神経伝達物質の放出反応の制御に関与している可能性が高い。

Itoh, T., Kaibuchi, K., Masuda, T., Yamamoto, T., Matsuura, Y., Maeda, A., Shimizu, K., & Takai, Y. (1993) The post-translational processing of *ras* p21 is critical for its stimulation of mitogenactivated protein kinase. J. Biol. Chem., 268 : 3025-3028

Shirataki, H., Kaibuchi,K., Sakoda, T., Kishida, S., Yamaguchi,T., Wada, K., Miyazaki, M., & Takai,

Y. (1993) Rabphilin-3A, a putative target protein for *smg* p25A/*rab*3A p25 small GTP-binding protein related to synaptotagmin. Mol. Cell. Biol., 13 : 2061-2068

Kishi, K., Sasaki, T., Kuroda, S., Itoh,T., & Takai, Y. (1993) Regulation of cytoplasmic division of *Xenopus* embryo by *rho* p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (*rho* GDI). J. Cell Biol., 120 : 1187-1195

Itoh, T., Kaibuchi, K., Masuda, T., Yamamoto, T., Matsuura, Y., Maeda, A., Shimizu, K., & Takai, Y. (1993) A protein factor fot *ras* p21-dependent activation of MAP kinase through MAP kinase-kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 975-979

Kawamura, M., Kaibuchi, K., Kishi, K., & Takai, T. (1993) Translocation of Ki-*ras* p21 between membrane and cytoplasm by *smg* GDS. Biochem. Biophys. Res. Commun., 190 : 832-841

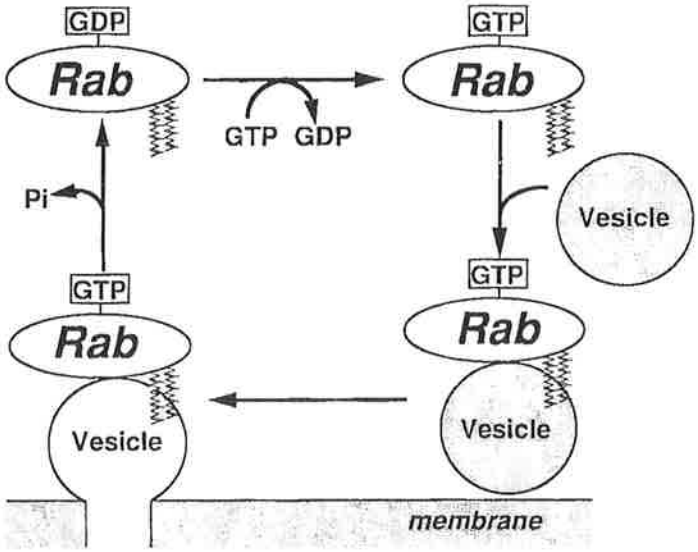


図１　小胞輸送における低分子量Ｇ蛋白質の作用機構のモデル

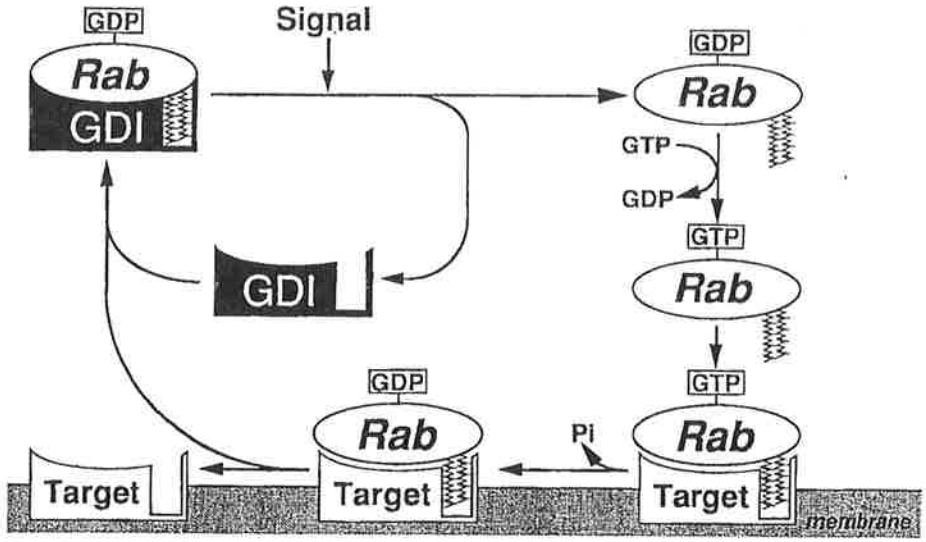


図2　*rab* GDI による *rab* 蛋白質の活性制御機構

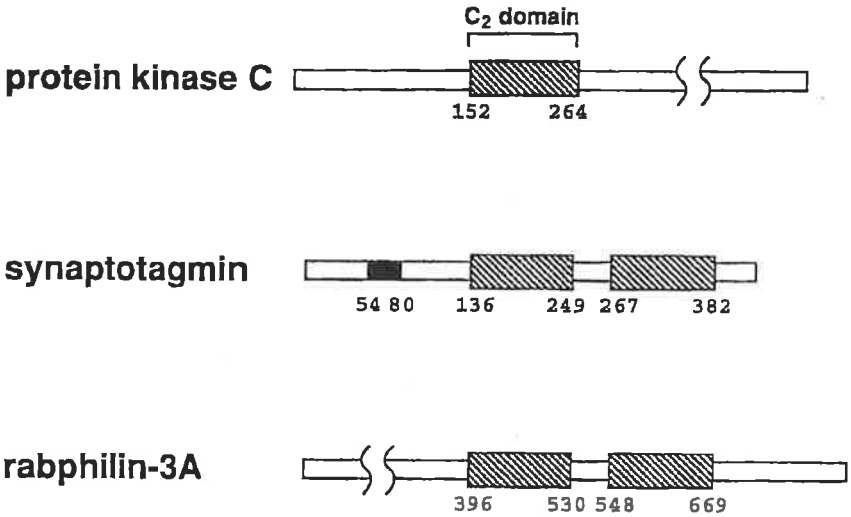


図3　Cキナーゼ，synaptotagmin, rabphilin-3A の構造

生体情報研究系

神経情報研究部門

【概要】

神経情報部門では1992年11月に池中一裕が，引き続き中平健祐，鹿川哲史，藤本一朗が1993年1月に着任し，従来行ってきた視覚神経系における情報抽出の神経機構の解明と並行して，新たに神経系の発生と分化の分子機構の解明を目的とした研究を開始した。

神経系では多種多様な細胞が存在し，それらが複雑な三次元ネットワークを形成することによって高次機能の営みが可能となっている。その発生過程において，神経系を構成する多くの細胞は共通の前駆細胞である神経上皮細胞から発生・分化してくるので，脳神経系構築の分子機構解明の第一歩として，神経上皮細胞からどのようにして種々の細胞種への分化決定がなされるのか分子・細胞生物学的に研究している。当部門では多くの脳特異的遺伝子をクローニングしており，その発現調節機構を明らかにすることにより分化機構解明にアプローチする（中平，池中)。また，遺伝的に神経系の分化に異常を示す突然変異マウスの解析によって分化に関連する遺伝子の同定も行っている（鹿川，池中)。

脳神経系の構築は決して終了するということなく，絶えず記憶や学習といった現象に対応して可塑的に変化している。この可塑性の代表としてシナプス伝達効率の長期増強 (LTP) 誘導が挙げられる。当部門においてはある種のハチ毒によりLTPが誘導されることを見いだし，生化学的にLTP誘導機構を研究している（藤本，池中)。

大塚は前年度に引続き，網膜視細胞の視物質（オプシン）に対する抗体の作製を行い，これまで困難であった赤及び緑錐体を識別する抗体の作製に成功した。そこで大塚と平野は，カナダ・カルガリー大学医学部においてW. K. Stell教授と共同研究を行った。キンギョ網膜の3種類の錐体にシナプス結合する2次ニューロンの伝達物質を免疫組織化学的に解明した結果，赤及び緑錐体終足に侵入する2次ニューロンの樹状突起には，グルタメート受容体 (GluR4) が有ることを確認した。さらに青錐体のシナプス部位にも，GluR4の抗体に陽性突起を見いだした。

初代培養細胞を用いたグリア細胞特異的遺伝子プロモーターの解析

中平健祐，池中一裕

脳神経系の細胞の分化や，機能発現は，それらの細胞に特異的に発現する遺伝子が重要な働きをしている。我々は脳神経系を構成する細胞の内，主要な細胞としてニューロン，アストロサイ

ト，オリゴデンドロサイトを選び，それぞれに特異的に発現している遺伝子を解析してきた。すなわち，ニューロンのマーカー遺伝子としてニューロフィランメン(NF)遺伝子，アストロサイトはグリア線維性酸性蛋白質(GFAP)遺伝子，オリゴデンドロサイトはミエリン塩基性蛋白質(MBP)遺伝子である。そのような遺伝子のプロモーター活性調節を明らかにするために，プロモーター領域をクローニングし，株化細胞や無細胞転写系などを用いて解析を行ってきた。しかし，脳神経系の細胞は，多くの種類の細胞が互いに影響を与えながら分化するため，よりin vivoに近いヘテロな細胞集団を用いての解析が望ましいと考え，初代培養系を用いたプロモーター活性測定系の開発を行った。

通常，細胞への遺伝子の導入方法としては，リン酸カルシウム法や，エレクトロポーレーション法などの方法が用いられるが，これは株化した培養細胞や一部の初代培養系においてのみ有効であり，脳細胞の初代培養系では細胞に対して障害が強く実用的ではなかった。そこで，より穏やかな条件で遺伝子を導入できる系としてレトロウイルスをベクターとして用いることを試みた。この方法はウイルスの感染によって細胞内に遺伝子を導入するため，細胞に対する障害性が無く，また，目的の遺伝子が染色体DNAに組み込まれるため，細胞の分裂を経ても細胞内に遺伝子が保持される。レトロウイルスが持つこれらの特性は，分化に伴うプロモーター活性を観察する目的に非常に適したものである。

作製したレトロウイルスベクターpIP200は，モロニー白血病ウイルスLTR間にG418耐性を与えるneo遺伝子とレポーター遺伝子としてlacZ遺伝子を持ち，その間に外来性のプロモーター挿入部位を有する（図1）。このベクターにアストロサイト特異的に発現するGFAP遺伝子プロモーターの内256bpという短いプロモーター領域を組み込んでウイルスを作製し，胎生17日からの脳初代培養細胞に感染させた。脳内でGFAP陽性細胞が多く出現してくる時期に対応した時点で細胞を固定染色すると，GFAP抗体陽性細胞とX-Gal陽性細胞は一致し，256bpの領域に組織特異性を決める因子が存在していることが示された。

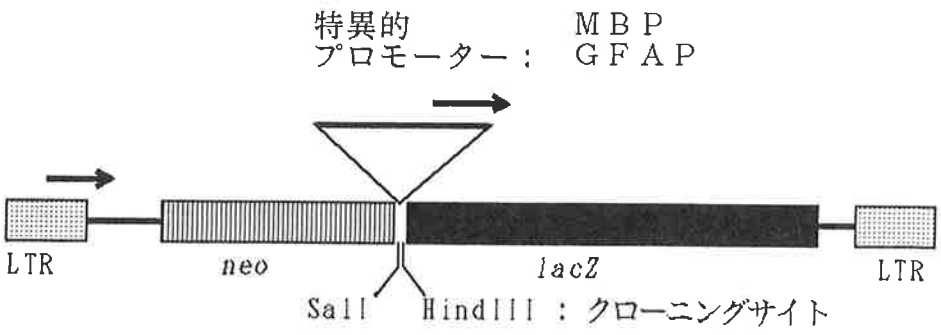


図1　レトロウイルスベクターpIP200の構造

本年度は，細胞分化に伴うプロモーターの活性化の時期について検討をおこなった。胎生13日のマウスの脳初代培養細胞に，翌日 GFAP プロモーターを組み込んだレトロウイルスを感染させ，時間をおいて細胞を固定，染色することによりプロモーターがどの時点で活性化するのか検討した。この培養系においては，培養開始時点では GFAP 抗体に陽性の細胞は極めてまれである。胎生18日相当頃までは少数の細胞が GFAP 抗体に陽性反応を示す。生後相当になると GFAP 陽性細胞数は急激に増えはじめる。実験の結果，β－ガラクトシダーゼ陽性の細胞数は大体同様の変化を示した。しかし，興味深いことに胎生期相当の時期においてはβ－ガラクトシダーゼ陽性細胞と GFAP 抗体陽性細胞が一致しなかったのに対し，生後相当になると両者は一致するようになった。これは，GFAP 遺伝子が転写されて蛋白質に翻訳され，さらに線維状に重合した後に初めて抗体によって検出されることによる時間差によってひきおこされた可能性が考えられる。すなわち，アストロサイトの分化が遺伝子の活性化の点では従来考えられていたよりもかなり早い時期に起こっている可能性を示唆している。しかし，遺伝子の今回用いたプロモーター以外の領域に抑制的な因子が存在している可能性もあるので，現在，さらに検討中である。

次に，発現量を増大する因子の定量的解析を行うために，ベクターの改良をおこなった。pIP200 は，組み込んだプロモーターの組織特異的な発現は妨げないが，5'LTR からの mRNA の転写のために転写干渉がおこり，定量的発現解析に用いるには問題があることが明らかとなった。そこで，3'LTR の TATA box に in vitro mutagenesis により変異を導入し 3'LTR のプロモーターを壊した変異体を作製した。この変異体 (pIP300) は，感染後には 5'LTR のプロモーター活性が失われ転写干渉が起こらなくなった。しかも，LTR に変異を導入した場合に起こりがちな，感染効率の低下はなかった。さらにウイルスの感染効率を上げるために，ψ 領域を広くとってψ$^+$とした（pIP321$^+$）。現在，定量的にも信頼性の高いこれらのベクターを用いて再度，GFAP プロモーターの定量的解析を行っている。

神経発生に異常を示す遺伝子突然変異マウスの解析

鹿川哲史，池中一裕

ミエリンプロテオリピド蛋白質 (PLP) は中枢神経系ミエリンに特異的に産生され，その主要な構造蛋白質の一つと考えられてきた。しかし，この PLP 遺伝子に突然変異を持つジンピーマウスは，ミエリン形成以前から中枢神経系グリア細胞の分化異常を示す。この現象は従来考えられているように PLP 遺伝子が成熟後のミエリン形成細胞オリゴデンドログリア細胞に特異的に発現しているとすると説明できない。我々は PLP 遺伝子産物がグリア分化因子としての機能を有し，未熟なグリア細胞や他の細胞に発現している可能性を考え，研究を進めた。

近年，我々はPolymerase Chain Reaction (PCR) 法を導入した高感度な検出系を開発し，グリア細胞の発生時期以前の胎生11日のマウス胎仔脳で既にPLP遺伝子が活性化し，選択的スプライス産物であるDM-20が産生されていることを報告した。この発現はグリア細胞の発生時期に相当する胎生14日から16日に増加していた。また幼弱期のジンピーマウスでは，異常なジンピー型DM-20のみが発現しており，正常なDM-20の欠落がグリア細胞の分化異常を引き起こしたことが考えられた。

更に，我々はPLP遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し，PLP遺伝子の機能解析に用いた。正常なPLP遺伝子を過剰に保持する（通常の5倍）PLPトランスジェニックホモ接合体マウス (plp/plp) は企図振戦，硬直性痙攣などジンピーマウスと全く同様の表現型を示し，約1ケ月で死に至った。免疫組織化学的解析よりPLP－トランスジェニックマウス (plp/plp) では中枢ミエリンの構成蛋白質が著減しており，ミエリン形成異常が起きていることが示唆された。生後20日齢の小脳白質部分は正常マウスでは軸索のほとんどが有髄であるが，PLP－トランスジェニックホモ接合体マウス (plp/plp) の殆どはミエリンが観察されず，希に存在する有髄線維も非常に薄いミエリンが形成されているに過ぎない。オリゴデンドロサイトの細胞体にはゴルジ小体から変化したと考えられる異常な液胞が多数存在しており，細胞自身が変性していることが明らかとなった。ジンピーマウスとよく似たこれらの所見は，PLP遺伝子が過剰発現し，その影響でオリゴデンドロサイトが分化異常を起こした結果，ミエリン形成障害が生じたことを示唆している。

一方，トランスジェニックヘテロ接合体マウス（plp/－，コピー数は通常の3倍）も生後数カ月までに下肢の硬直などの症状を発症し，その後数カ月以内に死に至った。生後2～3カ月までは行動も正常で，ミエリン構成成分もほぼ正常レベルに産生されていた。しかし生後20日齢のヘテロマウス (plp/－) のオリゴデンドロサイトの細胞体には既に異常な液胞が出現しており，細胞の変性が開始していることが示唆された。このマウスは数カ月後に下肢の振戦などを呈し始めるが，行動異常を生じた生後8ケ月齢マウスにはすべての中枢神経系においてミエリンの変性像や脱髄を起こした軸索が観察された。

PLP－トランスジェニックマウスにおけるオリゴデンドロサイトの異常が正常PLP遺伝子の過剰発現により生じたと考えられたが，次にその時期の影響について検討した。まず中枢神経系グリア細胞の発生分化が最も盛んと考えられる胎生16日のトランスジェニックマウスの脳の全RNAをRT-PCR解析した。PLP遺伝子のコピー数にほぼ比例して，ヘテロマウス (plp/－) は同腹の正常マウス（－/－）に比べ約3倍の，ホモマウス (plp/plp) は数倍のDM-20の産生がみられた。しかし，ミエリン形成の最も盛んな生後18日には遺伝子のコピー数とPLP及びDM20-mRNA量が比例しておらず，既にオリゴデンドロサイトの変性による二次的な影響でPLP遺伝子発現が低下したことが考えられた。RNAレベルの解析により胎生期における正常なDM-20の過剰産生が後のオリゴデンドロサイト異常の一次的原因である可能性が示された。今回のPLP－トランスジェニックマウスの解析で，PLP遺伝子は過剰に発現させてもオリゴデンドロサイ

トの分化異常が観察されたため，このDM20はグリア細胞の分化及び生存維持に厳密な制御を受けながら機能する重要な分子であることが示唆された。

又，ある特定の遺伝子に変異を有する場合と，その遺伝子が過剰に発現した場合とがほぼ同様な症状を呈するという例には，最近話題のpmp-22遺伝子変異マウス，トレンブラー(Tr)とpmp-22遺伝子重複によるシャルコマリーツース病(CMT1A)がある。しかし，CMT1Aの遺伝子重複は1.5Mbにも及ぶものであるため，この疾患が真にpmp-22遺伝子の過剰発現のみによって引き起こされたかどうかは確認されていない。遺伝子変異と遺伝子過剰発現が同様の症状を呈するという報告は殆ど無く，今回のPLP－トランスジェニックマウスは遺伝子疾患モデルとしても非常に興味深い。

シナプス伝達効率長期増強を誘導するMCDペプチドの作用機序に関する研究

藤本一朗，池中一裕

ハチ毒Mast Cell Degranulating (MCD)ペプチドは22残基のアミノ酸からなる非常に塩基性の高いペプチドであり，２つのジスルフィド結合を持ち，それがC端部のαヘリックスを保持するように存在している。我々はMCDペプチドの全合成に成功し，脳の海馬領域においてシナプス伝達効率の長期増強(long-term potentiation : LTP)をこのMCDペプチドが誘導することも確認した。MCDペプチドはハチ毒であり，脳血管関門を通りにくいと言われているが，脳内には内在的にMCDペプチドと免疫学的に交差する物質の存在することが明らかとなっており，この内在性物質がLTP誘導と深く関連している可能性がある。そこでこのMCDペプチドの作用機序の解明を目指して研究を開始した。

海馬体におけるシナプス伝達効率の長期増強現象は，Blissらにより約20年前に発見され，記憶の基本素子ではないかと考えられている。LTPは一般に入力線維の高頻度電気刺激（テタヌス刺激）により誘導され，シナプスの伝達効率が長期にわたって増強される現象である。これに対し，MCDペプチドによるLTP誘導は海馬切片をMCDペプチドを含む灌流液につけるだけで引き起こされるので，LTPの誘発された切片を容易に調達できる。このため電気刺激や高カルシウム刺激でLTPを誘導するよりも受容体などLTPに直結した物質を同定し易く，生化学的，分子生物学的アプローチに適していると考えられた。実際MCDペプチドには脳内に強く結合する（解離定数150pM）高親和性結合作用が認められている。近年，この高親和性受容体がある種の電位依存性のカリウムチャンネルであることが明らかにされた。そのほかMCDペプチドには，人工脂質二重膜に自ら陽イオン選択性の電位依存性チャンネルを形成する作用や，ラット肥満細胞のGTP結合蛋白質を活性化する作用の存在することも明らかになった。さらに，種々のMCD誘導体および類似物質を調整し，どの作用がLTPの誘導に重要であるのかを調べたところ，

MCDペプチドが脳内高親和性結合部位に結合する作用と，GTP結合蛋白質を活性化する作用がLTPを誘導するのに重要であることが分かった。

本年度は，MCDペプチドの結合する受容体構造を明らかにすることによって，MCDペプチドからの情報伝達経路を検討した。MCDペプチドと同じ結合部位を有するデンドロトキシンIをブラックマンバ毒から精製し，このものをアフィニティーリガンドとしてマウスの脳の膜可溶化画分からMCDペプチドの脳内標的物質を精製した。この標品を人工脂質二重膜に組み込ませたところ，K^+チャンネルを再構成させることができた。この系にMCDペプチドを添加すると50pMでK^+電流の開口確率が減少し，150pMで完全に阻害した。さらに，添加した精製標品中にはGTP結合蛋白質が含まれていることをGi, Goのαサブユニットの抗体，百日咳毒素でのADPリボシル化によって明らかとした。しかも，このK^+チャンネルはGTP結合蛋白質をGTP-γ-Sで活性化するだけでそのK^+電流をブロックすることも明らかとなった（図1）。これらのことから，MCDペプチドはGTP結合蛋白質を活性化することによってLTP誘導に関与しているK^+チャンネルを阻害していることが示された。

今後は，このK^+チャンネルと，従来よりMCDペプチドの脳内高親和性結合部位として考えられているfast-inactivating K^+チャンネルとの関係やサブユニット構造を解析して行きたい。

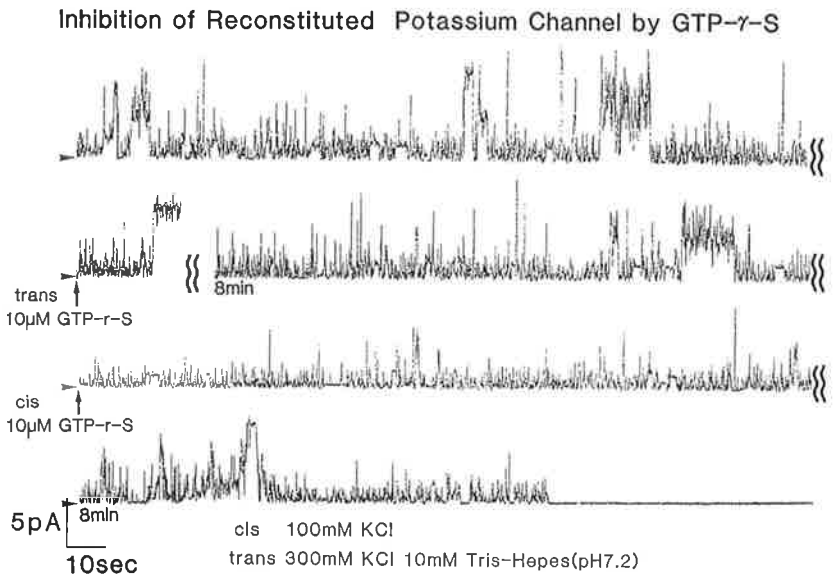


図2　平面脂質二重膜に再構成させたK^+チャンネルに，GTPの非水解物GTPγSを膜の両側から加えたときのGTP結合蛋白質の影響

MCDペプチド脳内標的物質の精製標品をcis側から加えてK^+チャンネルを再構成させた。GTPγSを10μMになる様にtrans側に添加したが，8分後もK電流は変化しなかった。しかし，精製標品を加えた側と同じ側にGTPγSを添加すると，GTP結合蛋白質が活性化され，徐々にK^+チャンネルの開口確率が減少し，8分過ぎには完全にK電流を阻害した。

錐体視細胞の伝達物質の免疫組織化学的解析

大塚輝彌，平野　穣

網膜の視細胞からグルタメート様物質が放出され，さらに視細胞から入力を受ける２次ニューロンにグルタメートに対する感受性があることなどから，視細胞の伝達物質がグルタメートであろうと考えられている。ところが青感受性錐体は赤・緑感受性錐体とは異なる神経伝達物質を有していることを示唆する所見が得られているため，色感受性の異なる錐体が異なる神経伝達物質を放出する可能性も考えられる。そこで３種の錐体にシナプス結合する２次ニューロンにグルタメート受容体があるかどうかを，直接調べることにした。さらにグルタメート受容体には数種類のサブタイプがあることから，これらの２次ニューロンの受容体のサブタイプを明らかにするため，カルガリ大学医学部の W. K. Stell 教授と共同研究を行った。

先ず，３種類の錐体を識別する抗体を作製した。Nathans と Hogness (1986) によって解読されたヒトの赤と緑錐体オプシンはほぼ相同の構造を有しているため，今回は硬骨魚の錐体オプシン (Johnson et al., 1993) のアミノ酸配列を参考にして，３種の錐体オプシンを特徴付ける10種類のペプチドを合成した。これらを BSA と架橋し抗原として，マウス及びウサギに免役してポリクロナル抗体を得た。得られた抗体は ELISA 及び免疫組織化学的な検索を行い，赤，緑，及び青錐体の外節を特異的に認識する抗体（Gf-R20, Gf-GN, Gf-BN など）のみ選択して，以下の実験に用いた。

AMPA 型グルタメート受容体には，GluR1 から GluR4 までの４種類のサブタイプが明らかにされている。さらに，これらのサブタイプを識別する抗体も得られている（Wenthold ら，1992)。最近，Stell らはキンギョ網膜の錐体視細胞の終足陥入部が，GluR4 の抗体に陽性反応を示すことを見つけた。そこでこの GluR4 の抗体と３種類の錐体オプシンに対する抗体とを組合せ，２重蛍光標識法を用いて，キンギョ網膜の３種類の錐体のシナプス部位におけるグルタメート受容体の存在を解析した。さらに複合錐体のみを認識するモノクローナル抗体 (FRet 43) を用いて，複合錐体のシナプス部位における GluR4 の存在も解析した。

この結果，単一錐体及び複合錐体を構成する赤及び緑錐体のシナプス部位である終足陥入部には，GluR4 の抗体に陽性の神経突起が見られた。これはこれまでの知見を支持する結果であり，水平細胞の樹状突起のシナプス後膜に GluR4 型グルタメート受容体の存在を示すものである。ところが今回我々の開発した青錐体オプシンに対する抗体を用いて，青錐体のシナプス部位を調べた結果，やはり終足陥入部に GluR4 陽性の突起が見られた。この陽性突起はおそらく水平細胞の樹状突起と考えられるが，少なくとも２つの可能性を示唆している。１）これまでの知見に反して，青錐体からもグルタメート様の神経伝達物質が放出されている，２）赤または緑錐体の終足から伸びる神経突起 (telodendron) が，青錐体のリボン・シナプスと２次ニューロンの樹状突起の間に存在し，この telodendron からグルタメートが放出される。この２つの作業仮説を明

らかにするため，今後は免疫電顕法を用いて青錐体のシナプス部位の微細構造を明らかにする予定である。

今回の免疫組織化学的なアプローチは，これまで細胞内記録と電顕解析で得られた網膜の色情報抽出の神経回路を伝達物質のレベルで解明し，その色信号伝達機構を明らかにする有効な研究手法である。

液性情報研究部門

【概要】

本研究部門では，細胞間の接着の情報が如何にして細胞膜を横切って核へ伝達され，そして伝達された情報が如何にして細胞の増殖や分化を制御しているかという問題に焦点を絞り研究を行っている。このような問題を解析することは，多細胞動物の形づくりの分子機構の理解のためだけでなく，細胞の癌化や癌細胞の転移の分子機構を理解するためにも重要であると考えられる。

隣合う細胞が接着する場として，細胞間接着装置が多くの細胞で形成される。ヒトなどの哺乳動物では tight junction, gap junction, adherens junction (AJ), desmosome などが知られている。なかでも AJ は，動物の形づくりに重要な役割を果たしているとされている接着分子カドヘリンが機能している接着装置で，その構造と機能は多くの研究者により解析が進められてきた。数年前に我々はこの AJ をラットの肝臓から大量に単離する方法を開発することに成功し，AJ の分子構築を系統的に調べる道を開いた。

本年度は，昨年度に引続き，単離 AJ を用いた AJ の構成タンパク質の解析をさらに進めるとともに，AJ における接着情報の伝達機構についての解析を行なった。特に昨年得ることに成功したいくつかの重要な AJ 構成タンパク質の cDNA を用い，遺伝子工学的手法を駆使して詳細な解析を行なった。このような成果から，AJ における接着情報の伝達機構についての我々の理解はかなり深まってきたように思える。今後，単離 AJ を用いた同様の解析を続けて行くことにより，細胞接着による細胞増殖・分化機構の解明を目指したいと考えている。

本年度の特筆すべき点は，我々の同定してきた蛋白質の異常を，実際のヒトの癌組織を用いて検索する計画を実行に移した点である。国立がんセンターの病理部の広橋部長のグループとの共同研究として発足したプロジェクトであるが，初年度の本年に，すでにきわめて興味深い結果が得られた。細胞の癌化機構と転移機構の理解を目指してこのプロジェクトをさらに推進していく方針である。

カドヘリン結合タンパク質αカテニンの異常と癌転移機構

永渕昭良，月田承一郎

細胞間AJの主要接着分子はカドヘリンである。カドヘリン分子はその細胞質ドメインで少なくとも2種類の蛋白質と強く結合しており，この蛋白質との結合がカドヘリンの接着能の発現に必須であることが知られている。これらの分子はαカテニンとβカテニンと呼ばれている。

我々は，単離AJをうまく利用することにより，αカテニンのcDNAを単離することに一昨年はじめて成功した。一方，ヒトの癌の90％は上皮由来であり，癌細胞も最初はＥ－カドヘリンによってお互いに強く結合している筈である。したがって，癌細胞が原発巣を離れて浸潤を開始するにはまずＥ－カドヘリンの束縛から逃れなくてはならない。αカテニンがカドヘリンの機能に必須の蛋白質であることから，この蛋白質の異常が癌の浸潤開始にとって重要な意味を持つのではないかと我々は考えた。そこで，ヒトの癌組織におけるαカテニンの異常を調べるために，ヒトαカテニンを認識するモノクローナル抗体の作製をまず試みた。そのために，我々のマウスαカテニンcDNAを用いて大腸菌にリコンビナント蛋白質を作らせ，それを抗原として多くのモノクローナル抗体を作製し，その中からヒトαカテニンに反応するクローンを得た。この抗体を用いて，まず，胃癌の組織を調べてみたところ，細胞がバラバラになって間質に浸潤していくタイプであるスキルス胃癌の大部分でαカテニンの発現が見られないことが分かった。これらの細胞ではＥ－カドヘリンが発現していてもαカテニンの発現がなくなっているために細胞間接着が弱まり，高い浸潤性が得られるようになったと考えられる。現在，さら多くの組織の癌について検索を進めている。

スペクトリンと結合する220kDAJ裏打ちタンパク質の解析

伊藤雅彦，米村重信，永渕昭良
木谷（安田）宝子，月田早智子，月田承一郎

我々は，単離AJの主要構成蛋白質として分子量220kDの裏打ち蛋白質を昨年同定することに成功し，その性質を蛋白質レベルで詳細に調べた。その結果，この蛋白質はカドヘリンが濃縮している場所に特異的に濃縮していること，αスペクトリンと結合する球状蛋白質であること，きわめて細胞膜に近く存在することなどが明らかになった。そこで本年度は，この蛋白質の構造と機能をさらに詳細に調べるため，cDNAのクローニングを試みた。すでに得られていた複数の抗220kD蛋白質モノクローナル抗体を用いて発現ライブラリーをスクリーニングした結果，全長のcDNAを得ることに成功し，その構造を決定した。

得られたアミノ酸配列を用いてホモロジー検索を行なったところ，驚いたことにこれまでタイトジャンクション(TJ)の裏打ち蛋白質として報告されていたZO-1と呼ばれる蛋白質と同一のものであることが分かった。ZO-1は，そのごく一部のアミノ酸配列が決定されていたのみであったが，その部分が完全に一致したのである。しかし，我々の220kD蛋白質は，TJの存在しない心筋細胞や線維芽細胞でもカドヘリンと共に接着部位に濃縮しているように見えるので，220kD蛋白質とZO-1が同一の蛋白質であるとすると大きな矛盾がある。そこで，我々の抗体と種々のカドヘリン抗体を用いて，これらの蛋白質の分布を電子顕微鏡レベルで詳細に再検討した。その結果，220kD蛋白質（すなわちZO-1）はもともとカドヘリンと挙動をともにする蛋白質で，上皮に分化するとAJからTJに移行するという奇妙な行動をとることが分かった。この成果はAJとTJの強い関係を分子レベルで示唆しており興味深い。

ラディキシンと結合する膜蛋白質の同定

月田早智子，大石久美子，関口直美，月田承一郎

ラディキシンは，我々が単離AJから同定した分子量82kDの細胞膜裏打ち蛋白質で，アクチンフィラメントのbarbed endに特異的に結合し，アクチンフィラメントを細胞膜に結合させる機能を有すると考えられている。昨年，我々は，ラディキシンをコードするcDNAを単離し，構造を決定することに成功した。その結果，ラディキシンはエズリン，モエシンとともにERMファミリーを形成し，さらにバンド4.1スーパーファミリーに含まれることが明らかになった。バンド4.1は赤血球膜の裏打ち蛋白質で，そのN末半分で，膜蛋白質グリコフォリンと直接結合していることが知られている。そしてこのドメインがラディキシンにも保存されていたのである。したがって，ラディキシンもこのドメインを介して何からの膜蛋白質に結合してその機能を発現しているものと推測できてる。本年度は，この膜蛋白質の同定を試みた。

まず，培養BHK細胞の表面をビオチンでラベルし，適当に溶かしてから，抗ラディキシン抗体で免疫沈降した。その結果，分子量約130kDの糖化した蛋白質がラディキシンと共に免疫沈降されてくることが分かった。次に，BHK細胞を生きたままラットに注射することにより，表面抗原に対するモノクローナル抗体ライブラリーを作製し，その中からラディキシンとともに共沈してくる膜蛋白質を認識するものを取り上げることに成功した。この抗体を用いるとラディキシンも共沈すること，および蛍光抗体法によりこの抗原がラディキシンと同じ分布を示すことなども明らかになった。したがって，我々はラディキシンに結合する膜蛋白質の同定に成功したと言える。今後，この抗体を用いてこの膜蛋白質をコードするcDNAを単離し，その構造と機能を明らかにしていきたいと考えている。

PCR 法によるバンド4.1スーパーファミリーの解析

武内恒成，月田承一郎

前述のようなバンド4.1蛋白質のN末半分によく似たドメインを持つ蛋白質がいくつか報告されるようになった。ERM の 3 種のメンバーの他，ある種のチロシンフォスファターゼやタリンと呼ばれる高分子量蛋白質などである。これらの蛋白質は，細胞膜の直下に存在し，種々の重要な役割を果たしていると考えられる。このスーパーファミリーの全容を明らかにするために，mixed primer を用いた PCR 法により解析を始めた。その結果，このスーパーファミリーの中には ERM ファミリーやフォスファターゼファミリーの他にもいくつかの新しいファミリーが存在することが分かり，そのうちのいくつかについては，全長の cDNA をクローニングして，全構造を決定しつつある。

ラディキシン，モエシン，エズリンのバキュロウイルスを用いた大量産生とそれを用いた各蛋白質の性状の解析

佐藤成樹，船山典子，月田承一郎

ラディキシンの性質は，蛋白質レベルで調べられており，アクチンの barbed end に結合することが知られている。しかし，精製出来る量が少なく，詳細な解析は難しい。モエシンやエズリンに関しては，蛋白質レベルの解析が遅れている。我々は昨年，これら 3 種類の cDNA をマウスから単離することに成功した。本年度は，これらの cDNA を組み込んだバキュロウイルスを作製し，蛾の細胞を用いてそれぞれの蛋白質を大量産生し，精製することを試み，成功した。現在，このような方法で精製されたラディキシン，エズリン，モエシンの試験管内での性質を詳細に検討中である。特に，アクチンフィラメントとの相互作用について詳しく調べつつある。

分裂溝の形成機構に関する分子生物学的解析

米村重信，永渕昭良，月田承一郎

ラディキシンの分布でも分かるように，分裂溝の裏打ち構造と細胞間 AJ の裏打ち構造の間には，共通点があるようである。細胞分裂時にどのようにして分裂溝が形成されるかは，これまで多くの研究がなされてきたが不明な点が多い。我々は，我々の研究室で先行しつつある AJ の裏

打ち分子構築の解析を参考にしながら，分裂溝の裏打ち構造の解析を進め，分裂溝の形成機構に迫ろうと考えている。本年度は，分裂溝に濃縮する細胞膜内在性タンパク質の検索を試み，そのようなタンパク質の一つとしてリューコシアリン (CD43) と呼ばれる蛋白質を同定した。この蛋白質は白血球に多く発現しており，分裂溝にラディキシンと共に濃縮する。そこで，もともとリューコシアリンを発現していないマウス線維芽細胞（L細胞）にこの蛋白質を強制発現させたところ，やはりラディキシンと共に分裂溝に濃縮した。このような手法を用い，この蛋白質が分裂溝に濃縮するために必要なドメインが絞りこまれ，そのドメインが細胞質領域に存在することが分かった。以上のことは，リューコシアリンがラディキシンと何らかの相互作用をして，分裂溝形成に重要な役割を果していることを示している。

タイトジャンクションの構成蛋白質の同定

古瀬幹夫，平瀬徹明，伊藤雅彦
永渕昭良，米村重信，月田早智子，月田承一郎

前述の 220kD 蛋白質の解析から，我々の AJ 分画にタイトシャンクション (TJ) が含まれていることが明らかになった。これは，AJ と TJ が混然一体として存在することを考えれば当然のことのように思える。そこで，AJ 分画を用いて，TJ に局在する膜蛋白質の同定を始めることにした。TJ の膜蛋白質は，上皮細胞や内皮細胞において細胞間をシールする重要な接着分子と考えられ，これまで多くの研究者が同定を試みてきたが，誰も成功することができなかったものである。我々は，AJ 分画から調製した膜分画をラットに注射してモノクローナル抗体を多数作製し，その中から TJ の膜蛋白質を認識すると思われる抗体を選び出すことに成功した。この抗体を用いて，現在，cDNA クローニングを行っている。

自己免疫による心筋炎の病態解析

笠原英子，伊藤雅彦，月田承一郎

マウスに適当なアジュバントとともに心筋のホモジェネートを注射すると，自己免疫による急性の心筋炎を引き起こすことができることが知られている。そこで，我々は，この抗原が何であるかを生化学的手法，免疫学的手法，形態学的手法などを駆使して追求した結果，c-protein と呼ばれる蛋白質であることを明らかにすることができた。精製した心筋型 c-protein を注射するとやはり心筋炎を高率に引き起こすことが出来る。そこで，この蛋白質に対する cDNA を単離し，

リコンビナント蛋白質を大量に作製した。この蛋白質でも高率に心筋炎を引き起こすことができた。現在，この蛋白質のうちで，どこのエピトープが心筋炎を引き起こすのに必要であるかを解析することにより，心筋炎の発症機序に迫ろうと考えている。

高次神経機構研究部門

【概要】

当部門においては、視覚野神経回路を伝わる興奮を電位感受性色素を用いた光学的計測法により時空間パターンとして捉え，これによって感覚情報処理の神経機構の解明を試みている。平成４年においては，128x128 素子の光ダイオードアレイを受光素子とする高速カメラ（時間分解能 0.6ms）を用いた計測法を導入し，これまで得られた知見を確認するとともに，さらに，視覚野脳切片における神経興奮パターンの時間経過の詳細な解析を行った。

大脳皮質視覚野における興奮性神経回路の光学的計測法による解析

外山敬介，谷藤　学

皮質における神経回路の解析は，これまで解剖学的な手法と電気生理学的な手法を用いて研究が進められてきた。これらの手法によって，視覚野の中に存在する神経結合の様式がかなり明らかにされている。しかしながら，それらの神経結合により，細胞から細胞へ神経興奮がどのように伝えられるかについては必ずしも解明されているわけではない。そのひとつの原因は，従来の解剖学的及び生理学的では，神経興奮を時間と空間の両面から同時に捉えることができなかったことにある。我々は，電位感受性色素を用いたイメージング法を用いることにより，神経興奮を光学的信号として時空間パターンとして捉え，これによって，興奮の伝搬様式を明らかにする試みを行った。

成熟ラットより視覚野の前額断脳切片を切り出し，電位感受性色素 RH482 によって組織全体を染色した。(0.1mg/ml RH482, 20分染色)。脳切片を倒立顕微鏡下にマウントし，白質に電気刺激を与えたときの神経興奮を 700nm の光の波長における色素の呼吸の変化として捉えた。すでに，電位感受性色素 RH155 による色素の吸収変化が視覚野の神経細胞のシナプス電位とよく一致することを示している（生理学研究所年報11巻）が，染色してから数時間経過するとグリア細胞の脱分極と思われる信号が重量される傾向がみられた。そこで本研究では，染色後の経過時間によらず，シナプス電位とよく一致した応答を示す色素として，RH482 を用いた。また，時空間パターンの記録には，128x128 素子のフォトファイオードアレイを受光素子とする高速カ

メラ（富士フィルムマイクロデバイス，SD1001）を用いた。これまで用いてきた冷却型CCDカメラでは，1msの分解能で光学的応答の時空間パターンを記録するのに数時間を要していたのに対し，この高速カメラによって数分間の計測によって光学的応答を0.6msの高い時間分解能で得ることができた。

このようにして得られた白質刺激による神経興奮の伝搬の様子は，ほぼ従来の記録と一致している。まず，6層に（刺激後2.4ms），ついで4層に興奮が引き起こされ（刺激後4.8ms），さらに4層の興奮に続いて2，3層に興奮が見られた（刺激後7.2ms）。すでにCCDカメラによる記録においてこのような興奮の時間的な順序関係が示されているが,高速カメラによる計測により，これらの3つの成分が6層，4層と2－3層に空間的に分離して見られることが明らかになった。また，その分布のパターンは外側膝状体からの線維の終末の分布（6層と4層）と4層から2－3層への投射の分布と一致している。神経線維を伝わる神経興奮が光学的応答にあまり反映されず，主にシナプス応答を反映していることを考えると，これらの空間的に分離した興奮の領域は前線維終末の形成するシナプスの分布を示していると考えられる。このような光学的応答の時間及び空間的な関係から，光学的応答は，6層と4層の単シナプス性の応答と4層の入力を受ける2，3層の2シナプス性の応答より成ることが示唆される。

このような白質刺激直後に見られる興奮の伝搬は，白質から皮質表面に向って伸びており，水平方向の広がりはあまり見られない。しかし，このような垂直方向の伝搬に引き続いて，2－3層と5－6層に持続して見られる興奮は1㎜を越える水平方向への広がりを示した。また，このような2－3層と5－6層の興奮は約50msの間持続し，5－6層の興奮の減衰と一致して2－3層の興奮の減衰がみられた。これまでの電気生理学的及び解剖学的な研究から，2－3層から5－6層への投射，及び，6層から4層に戻る投射があると考えられることから，白質刺激後遅れて2－3層と5－6層にみられる興奮は，このような2－3層と5－6層の間の相互の神経結合を介した反響を反映しているのではないかと考えられる。このことを明らかにするためには，4層におけるシナプス伝達を局所的にブロックしたときに遅れた応答にどのような変化が生じるかを明らかにする必要がある。

情報記憶研究部門

【概要】

本部門の研究は運動神経細胞と感覚神経細胞を対象として，その生存と正常機能の発現に参与する神経栄養因子効果の解析を主眼とする。これまで神経成長因子(nervegrowth factor；NGF)とカルシトニン遺伝子関連ペプチド(calcitonin gene-related peptide；CGRP)の栄養因子的効果の検討を行ってきた。発生初期においては，NGFは感覚神経細胞と交感神経細胞に対してその生存維持効果を発揮するが，成熟後は生存維持効果が消失し，これらの細胞の機能維持にのみ参与

する。我々は，成熟ラットの感覚神経細胞 CGRP の合成が NGF によって up-regulate されること，さらに運動神経線維の変性に伴って感覚神経細胞の CGRP 含有量が亢進することを見いだした。この結果は，運動神経と感覚神経の間において神経栄養因子効果の相互作用の存在することを示唆する。発生初期においても NGF は運動神経細胞に対して生存維持効果を示さない。したがって，運動神経細胞は細胞に特異的な因子によって生存が維持されていると考えられる。我々は，この因子の検索を試みている。その結果，胎生期のチックの下肢筋から抽出した mRNA はその運動神経細胞の生存維持効果を持つ因子を合成することが見いだされ，これを用いて cDNA ライブラリーを作成した。

自然細胞死期における運動神経細胞　生存維持因子 mRNA の発現

久野　宗，樫原康博

胎生期のチックの腰随運動ニューロンは，最近，過剰に産生されているが，その運動ニューロンが下肢筋を支配する時期（胎生６～９日）に一致してその半数が自然死滅する。一側の下肢を神経支配の前に切除しておくと，胎生期10日には術側の全ての腰随運動ニューロンが死滅する。さらに，培養条件下のチック運動ニューロンの生存は下肢筋からの抽出物資によって延長する。したがって，運動ニューロンの生存を維持する因子はその支配筋に存在することが示唆される。しかし，筋に存在するこの因子はきわめて微量であるから，この因子を蛋白のレベルで同定することは困難である。もし，この因子を合成する mRNA を抽出できれば，そのクローニングが可能であるから，mRNA のレベルでこの因子を探索することを試みた。

約100匹の胎生期９日のチックから両側の下肢を摘出しし，mRNA を抽出した。この mRNA を蔗糖密度勾配法による遠心を用いて３分画に分け，各分画の mRNA をアフリカツメガエル (xenopsu laevis) の卵母細胞に注入した。卵母細胞が外来性 mRNA によって合成し細胞外に侵出した，拡散性蛋白の中に生存維持因子が存在すると云う仮定のもとに，その侵出液を回収した。回収した侵出液の効果のバイオアッセイはチック腰随運動ニューロンの自然細胞死によって実施した。この目的のために，自然細胞死が開始する胎生期６日の前日から９日まで毎日侵出液をチックに投与し，胎生期10日に腰随運動ニューロンの組織標本を作製しその全数を測定した。

正常のチックの胎生期５日の一側の腰随運動ニューロンの総数は約２万で，自然細胞死により胎生期10日には約１万３千に減少するが，この結果は，Oppenheim らの結果とほぼ同様であった。Oppenheim らは，ラット骨格筋から choline acetyltransferase の活性を促進する物質 (ChAT-DF) を抽出し，ChAT-DF も，ciliary neurotrophic factor (CNTF) もチック運動ニューロンの自然細胞死を有意に阻止することを報告した。我々が筋の mRNA から翻訳した蛋白もほぼ同程度に細胞死を阻止した。この効果は，ラットの筋由来の mRNA を用いても，チックの筋由来の mRNA を

用いても同程度であった。また，チックの筋由来の mRNA では，沈降係数20～26 S の範囲（塩基数，2,400～4,000）の分画から翻訳した蛋白は細胞しに有効であったが，他の分画の mRNA は向こうであった。したがって，細胞死の阻止は卵母細胞が外来性 mRNA によって新たに合成した蛋白によると結論される。現在，この mRNA より cDNA を作成し，栄養因子 cDNA をクローニングしているところである。

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門

【概要】

随意運動（とくに眼球運動）の中枢神経機構を大脳基底核とそれに関連する脳領域の機能との関連で研究している。これまでの研究の結果，大脳基底核の役割は次のようにまとめることができる。第一は，反射的な，あるいは感覚刺激によってひきおこされる運動をさしあたり抑制することである。第二の機能は，この持続的抑制を一時的に解除して脳の内的活動にもとづいて運動を開始させることである。しかし随意運動のメカニズムをシステムとして理解するためには未解決の問題が多く残されている。そのなかでももっとも重要と思われるテーマー選択的注意と学習のメカニズムーが我々の新しい研究の方向となっている。

選択的注意に関して：ある環境のなかで適切な運動を行うためには感覚情報を選択し，運動のプログラムを選択しなければならない。脳のどこがそれを担っているのか。そのメカニズムは何か。これらの疑問にたいして行動学的な手法をつかって調べている。

学習に関して：随意運動は学習された行動である。基本的な運動情報を感覚情報と結合させることによって，また他の運動情報と結合させることによってより複雑な運動のレパートリーが獲得されていく。このプロセスとメカニズムを明らかにするために新しい行動課題を開発して研究している。

サルの手続き的記憶学習の成立
—新しい行動課題を使って—

加藤美弥，彦坂興秀

【目的】

随意運動は学習によって獲得される。学習の初期には動作のひとつひとつを意識的に行なうが，反復練習によりほとんど自動的に動作を行うことができるようになる。このことは随意運動の学習過程で記憶を形成している段階と，形成された記憶を保持しそれを利用して運動を行なう段階では異なる神経機構が関与することを示唆している。我々は，記憶の形成とその保持の神経機構を調べるため，順序だてて一連の動作が完了するボタン押し課題（手続き記憶課題）を作成した。

今回は，手続き的記憶学習の成立過程と学習を通じて形成された記憶の性質を行動学的に調べた。

【方法】

実験には2頭のニホンザルを用い，次のようなボタン押し課題を訓練した。サルが手元のホームキーを押すと16個のLEDボタン（4×4）のうち2個のLEDが同時に光る。サルはこれらを一定の順序で押さなければならない。正しい順序はtry & errorでみつける。正しい順序で押すと，次の新たな2つが同時につく。このような2組のLEDのセットを順次5セットまで記憶し反応していく（これら5セットをhypersetと呼ぶ）。セット5まで完了するとこの試行は終了し，ホームキーに戻って次の試行を始める。途中で間違えるとまたホームキーに戻り，次の試行としてやり直す。正しい反応にたいし各セット後報酬を与えるが，セットを追う毎にその量を増やし，サルが最後まで完了すると最も効率良く報酬が得られるようにした。hypersetはコンピューターでランダムにセットの組み合わせを決めることにより無数に近く作ることができる。この課題を用い，2頭のサルで合計約300個のhypersetについて調べ，そのうち約30個は長期間継続して学習経過を記録した。

学習したと判断する基準は，10試行成功するまでとした。基準達成までの試行数を数え，成功した試行の動作時間を10試行分合計した。

【結果】

同じhypersetを長期学習させると，基準達成までの試行数が減少し動作時間も短縮した。学習初期にはこれらの傾向が顕著であった。

セット毎の順序とhyperset全体の順序のどちらを記憶しているのか調べるため，各セット内の順序は変えず5セット全体の順序をreverseした。その結果，充分学習したhypersetにおいても1日だけ学習したhypersetにおいても，基準達成までの試行数が全く新しく学習したhypersetと同じレベルまで増大した。動作時間も同様に延長した。これらのことは5セット全体の順序のみが記憶されており，セット内の順序の記憶は無いか，あったとしても使われていないことを示している。

さらに，反応する手に選択的な記憶があるかどうかを調べるため，片方の手だけで学習したhypersetを反対の手で行なわせた。充分学習したhypersetについては，基準達成試行数，動作時間ともに全く新しいものよりよく，充分学習したものよりわるい結果を示した。1日だけ学習したhypersetについては，反応する手を変えずに行なった場合と比べ学習結果に差がなかった。これらのことは学習の初期では手に選択的な記憶はないが，充分学習した後ではそれが形成されることを示している。

【考察】

この手続き記憶課題を用いて，随意運動の学習過程と蓄えられた記憶の性質について調べることができた。この課題の特徴として，必要に応じて新しいhypersetを作成し記憶の成立の機構を繰り返し調べられる点，学習段階の異なるhyperset間で比較できる点，記憶すべき内容が部分的な要素（セット内の順序）と全体（5セット全体の順序）として階層的に構成されており，自然な行動と比較的類似している点，サルばかりでなくヒトにも応用できる点などがあげられる。

今回の行動学的研究より得られた結果は，手続き記憶が脳のどの部位で形成されるのか，また形成された記憶がどこに蓄えられるのかについて，今後電気生理学的に検証するための基礎となった。

誘発電位による CROSSMODAL ATTENTION の研究

宮内　哲，岡村宏樹，彦坂興秀

視覚的注意と他の感覚モダリティの注意との相互作用 (CROSSMODAL ATTENTION) を研究するために，ヒトを被験者にして視覚誘発電位・体性感覚誘発電位を測定した。

実験 1

被験者は眼前の固視点の左右にある LED の直下に電気刺激用の電極を装着した人差し指を両腕を伸ばした状態 (UNCROSSED CONDITION), あるいは両腕を交差させた状態 (CROSSED CONDITION) で置いた。左右どちらかの人差し指を電気刺激した後，一定の間隔 (CUE LEAD TIME, 0, 50, 100, 200, 400ms) をおいて左右どちらかの LED が点灯した。体性感覚刺激と視覚刺激の空間的位置が一致した場合と，一致していない場合とで視覚誘発電位の振幅を比較した。その結果，体性感覚刺激と視覚刺激の時間感覚が 100－200ms では，両腕の交差・非交差にかかわらず，体性感覚刺激と視覚刺激の空間的位置が一致していた場合の方が視覚誘発電位の振幅が高かった（図 1）。0, 50, 400ms ではこのような効果はなかった。視空間の特定の部位に自発的に注意を向け，その部位に視覚刺激が出現した場合，視覚誘発電位は増強する。また，視覚誘発電位の起源は primary あるいは secondary visual cortex と推定されている。これらの事から，この効果は体性感覚刺激によって喚起された空間的注意が皮質間の reciprocal connection を経由して視覚皮質を逆方向性に activate した事によるものと考えられる。

実験 2

次に体性感覚刺激と視覚刺激の呈示順序を逆にして，実験 1 と同様の実験を行なって，体性感覚誘発電位を測定し，視覚刺激が体性感覚の注意に及ぼす影響を調べた。その結果，実験 1 と同様，両腕の交差・非交差にかかわらず，視覚刺激と体性感覚刺激の空間的位置が一致している時の方が，一致していない時に比べて，体性感覚誘発電位の中・長期成分が増強した。体性感覚誘発電位の中・長期成分の起源は S1 及び S2 にあると考えられており，視覚刺激によって喚起された空間的注意が，皮質間の reciprocal connection を経由して体性感覚皮質を逆方向性に activate したと考えられる。

以上の結果から，視覚と体性感覚との間で空間的注意の相互作用が確認された。

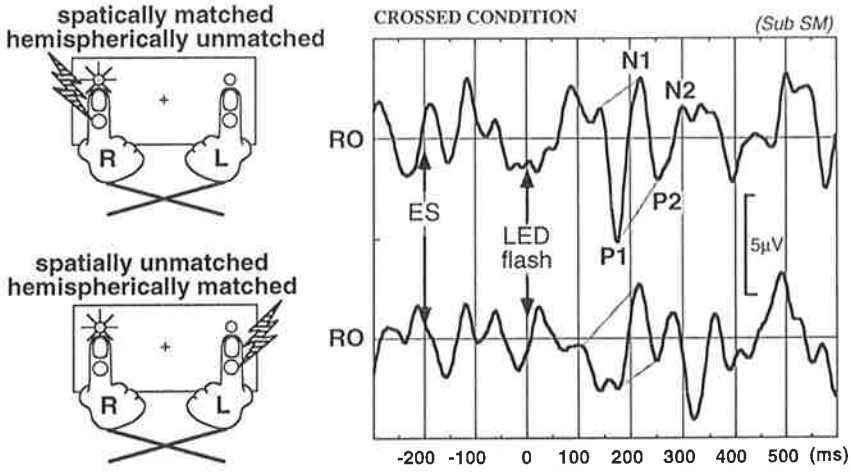


図1　両腕を交差させた状態で，先行する体性感覚刺激と視覚刺激の空間的位置が一致している場合（上段）と　一致しない場合（下段）の視覚誘発電位の一例。空間的位置が一致している場合，潜時 150－200ms の P1, N1 成分が増強する。

サルの淡蒼球外節神経細胞の視覚刺激と眼球運動に伴う活動

加藤　誠，彦坂興秀

【研究目的】

急速眼球運動（サッケード）は，上丘の神経細胞がバースト活動することによって起こる。大脳基底核の尾状核－黒質網様部系は上丘の活動を抑制的に制御する。大脳基底核には尾状核－黒質網様部の経路に加え，尾状核－淡蒼球外節－視床下核－黒質網様部という経路があることが知られている。これらの経路に含まれる神経核は，視床下核が興奮性である以外はすべて抑制性である。前者は尾状核から黒質網様部に直接つながるため「直接路」と呼ばれ，後者は，尾状核が淡蒼球外節－視床下核を経由して黒質網様部につながるため「間接路」と呼ばれている。直接路では，尾状核への興奮性入力は黒質網様部を抑制し，黒質網様部のターゲットである上丘・視床に脱抑制を起こす。それに対して間接路では，尾状核への興奮性入力は淡蒼球外節を抑制し，その結果，視床下核は脱抑制を起こして黒質網様部の活動を高め，直接路とは逆に上丘・視床を抑制する。このように二つの経路は基底核の出力に対して相反する効果を持つので，それらを通る神経情報は大きく異なると考えられる。しかし，これまでの研究では，間接路である淡蒼球外節の神経細胞の活動と基底核の出力である黒質網様部（淡蒼球内節）の活動には違いが見出されていない。そこで本研究では，淡蒼球外節の神経細胞の眼球運動に関連する活動を記録し，尾状核，黒質網様部の活動と比較した。

【方法】

動物は2頭のニホンザルの淡蒼球外節から，エルジロイ電極を用いて細胞外神経活動電位の記録を行った。眼位はサーチコイルを用いて測定した。

サッケード課題は，visually-guided saccade を誘発する課題と memory guided saccade を誘発する課題を用いた。visually-guided saccade task では，固視している center が消えると同時に target の LED であるこれらの中のどれか一つがつき，サルはこの target に向かって saccade する。memory-guided saccade task では，center を固視している間に次の target がつくべき位置に予告として LED が flash し，サルは center が消えたときに記憶したその位置に saccade する。LED の flash は visual response を調べるのにも使った。

眼球運動，神経活動の変化は記録，データの解析ともにコンピューターで行った。全ての記録実験終了後，サルを灌流固定して凍結切片作製後，ニッスル染色し，記録部位の正確な同定，確認をした。

【結果】

淡蒼球外節から記録した410個の細胞の内，79個は視覚刺激または眼球運動に関連して活動が変化した。この中で，64個は，サッケードに関連して一過性に活動が減少（39個），増加（22個），または増減（3個）した。サッケードに関連した細胞の多くは方向選択性がなく（31個），選択性がある場合でも視野の半側を含むような広いものであった。サッケードに対する活動の変化の onset latency は－150ms から＋200ms であった。また半数（33個）の細胞が報酬，レバー押しにも関連して活動が変化した。視覚刺激に対する一過性の応答は，活動が減少するもの（18個）と増加するもの（16個）があり，受容野は広く，onset latency は 80－200ms であった。多くの細胞（72個）は，眼球運動課題の event 間（たとえば，サッケードから報酬をもらうまでの間）に，活動が，持続的に増加または減少したり，漸増または漸減した。さらに，これらの応答（サッケード，視覚，持続的応答）が，一つの細胞において複雑に組合わさって活動が変化することがしばしば見られた。

【考察】

淡蒼球外節の眼球運動関連の活動は，尾状核，黒質網様部の活動に比べて，方向選択性や時間的選択性が低かった。これは，淡蒼球外節の細胞が，尾状核や視床下核の様々な選択性を持つ細胞から収束性の入力を受けているためであると考えられる。淡蒼球外節のこのような非選択的な神経情報は視床下核を介して大脳基底核の出力を広汎に変化させる働きを持つであろう。特に淡蒼球外節の減少性の活動は，直接路を通る神経情報に対して側抑制の働きをして，最終的な出力の選択性を高めていると考えられる。

生体システム研究部門

【概要】

本研究部門では中枢神経系シナプス可塑性の基礎過程を解明することを目指し，神経細胞培養法，パッチクランプ法，Ca 蛍光定量法および分子生物学的手法等を用いて，哺乳類神経細胞神経突起先端部に存在するイオンチャネルの性質及び神経突起伸長と細胞内 Ca イオン濃度の関係等について解析している。中枢シナプスの可塑性のメカニズムに関しては，①シナプス後膜におけるイオンチャネル，化学受容体の化学修飾，②シナプス前終末部からの神経伝達物質放出の調節，③形態変化をともなうシナプス伝達の変化，④遺伝子発現の変化，というそれぞれの過程について分子論的に理解する必要があると思われる。本年度は②伝達物質放出調節，および③軸索終末部の形態変化，のそれぞれに関する基礎的過程の理解を進めることに焦点をあてて研究を行った。

神経伝達物質放出調節の基礎過程を探る一歩として，まず神経突起先端部膜に存在するイオンチャネルの性質について調べた。哺乳類神経細胞神経突起先端部に存在するイオンチャネルの性質については従来不明であったが，培養法を改良することによって得られた大きな（直径 10 μm）神経突起末端部にパッチクランプ法を適用し，末端部のイオン電流を直接記録し，Na チャネル，Ca チャネル，K チャネルの存在を見いだした。そして，これらのイオンチャネルに対する逆行性神経伝達物質候補，アラキドン酸の作用について調べた。

また，神経突起先端部の形態変化の基礎過程を探るため，神経突起伸長に及ぼす Ca チャネル阻害剤の影響，fura-2 を用いた神経突起末端部における細胞内 Ca イオンの分布等について解析した。また，神経突起細胞膜に存在している蛋白質 HPC-1 について，この蛋白質の mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオタイドを培養神経細胞に適用して合成を抑制し，この蛋白質の神経突起伸長や分枝形成における生理的役割について検討を加え，この HPC-1 が神経突起の分枝形成を抑制していることを見いだした。

培養神経細胞成長突起先端部のＫチャネルに及ぼすアラキドン酸の作用

山口和彦

中枢神経系シナプスにおけるヘッブ型可塑性シナプスでは逆行性神経伝達物質の存在が推定されており，候補物質として一酸化窒素，アラキドン酸等が挙げられている。しかし，これらの物質のシナプス前末端部に対する作用は脊椎動物ではまだ不明な点が多い。特に哺乳類軸索末端部のイオンチャネルに対する作用についてはほとんど何も解っていない。これは第一に哺乳類の神経軸索突起末端部の直径が 1 μm 前後と細く，電気生理学的研究が困難であったためと思われる。

最近，本部門では培養方法を改良することにより成体ラットの脊髄後根神経節(DRG)細胞の単離培養標本において比較的大きな直径(5－10μm)の神経突起末端部を得ることができるようになり，この部位に存在するイオンチャネルの性質についてパッチクランプ法を用いて調べている。その結果，電位依存性Naチャネル，L型，N型Caチャネル及びKチャネル等の存在を確認できた。神経突起末端部は培養系においても運動ニューロン等とシナプスを形成し伝達物質の放出をおこなうこと，及び単独の成長円錐部からも伝達物質が自発的に放出されていることが報告されているので，培養神経細胞の神経突起末端部はシナプス前膜のモデル系と見なすことができると考えられる。そこで脊椎動物シナプス前末端部に対する逆行性情報伝達物質の作用を解析する基礎として，培養DRG細胞の神経突起末端部膜に対するアラキドン酸作用について検討を加えた。

成熟ラットのDRG細胞を酵素処理によって単離し無血清培地中で1－2日培養し，直径5－10μmの太い神経突起末端部のイオン電流をホールセルクランプの状態で記録した。Kチャンネルに対するアラキドン酸の効果を見るため，細胞外液にはTTX (1μM), La^{3+} (5μM) を加えNa, Caチャネルを阻害した。K-Aspを主にしたピペット内液にはATP, GTPを加え，pCaは7，pHは7.2に調整した。アラキドン酸の開封，希釈は純窒素雰囲気中で行い，500μMに希釈した溶液を純窒素パフで神経突起末端部に与えた。

アラキドン酸はNa電流には影響を示さなかったが，多くの細胞（22／35）で数秒から数10秒の経過で，外向きK電流を約20％抑制した。脱分極ステップにより生じた外向き電流をアラキドン酸投与前と投与中，および回復後記録し，電流トレースの差を求めることからアラキドン酸によって抑制された電流の時間経過について調べた。その結果，抑制された外向き電流は持続性のものが主であったが，一過性成分も抑制されることがあった。持続性成分のみからなる場合，脱分極ステップによるチャネルの開口時間経過はn^3のHodgkin-Huxleyモデルで近似できた。このイオンチャネルは遅延性Kチャネルである可能性が高いと思われる。一方，少数（6／35）では外向き電流が増加する例も見られたが，活性化されるチャネルの性質についてはまだ不明である。以上の結果から哺乳類神経突起末端部に存在するイオンチャネルがアラキドン酸で修飾され得ることが示された。

神経突起形態調節におけるCaイオン及び神経細胞膜特異的蛋白質HPC-1の役割

山口和彦
古家喜四夫（生体膜）
赤川公朗（神経化学）

神経軸索は発生過程において遺伝情報に基づいて回路網形成を行う際に相手の認識等，重要な働きをしている。また，生後も環境刺激により出芽や退化をしてシナプス結合の可塑的組み替え

を行う。そしてこれらの形態変化が長期記憶や学習の基礎過程にあると考えられている。しかし神経突起末端部の伸長や分枝等のメカニズムはよく解っていない。そこで本研究ではこのメカニズムを分子レベルで明かにすることを目指し，特に（1）Caイオンの役割，（2）神経細胞膜特異的蛋白質HPC-1の役割に注目して培養神経細胞を用いて解析を行った。

成体ラットの脊髄後根神経節(DRG)を用いて太い直径の神経突起末端部（成長円錐部）を持つ神経細胞を培養し，この神経突起末端部膜にパッチクランプ法を適用し，ニフェディピン感受性L型チャネルとωコノトキシン感受性N型チャネルを見いだした。Caチャネルが突起伸長の調節に重要か否かは脊椎動物では一致した結論が得られていない。そこでそれぞれのCaチャネルの活動を阻害する濃度のニフェディピン(5μM)，ωコノトキシン(5μM)の中で2日間培養したところ，ωコノトキシンは全く突起伸長に影響を及ぼさず，一方ニフェディピンは神経突起の伸長を強く抑制することが示され，L型Caチャネルの活動が神経突起伸長調節に関与している可能性が示唆された。次に細胞内Ca濃度をfura-2蛍光測光法により測定したところ，細胞体では対照群，ニフェディピン群，ωコノトキシン群の間で細胞内Ca濃度に差がなかった。そこで画像解析法を用いて細胞内Ca濃度の空間的分布を検討した。あらかじめωコノトキシンでN型チャネルを阻害した成長円錐部でCa濃度を画像解析しながら高K^+(20mM)外液で灌流すると，成長円錐中のいくつかのホットスポットでのみCa濃度が上昇することが観察され，L型チャネルが一様には分布していないことが示唆された。また，このようなホットスポットはしばしば細いフィロポディアの根元に見られ，フィロポディア出芽とL型Caチャネルの活動の関連が示唆された。

一方，神経細胞膜特異的蛋白質HPC-1はこの培養系でも強く発現していたが，HPC-1のアミノ酸配列は上皮組織形態形成促進因子エピモルフィンと強いホモロジーを持つため，神経系でも形態形成への関与が推定された。そこでHPC-1に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを単離直後の細胞に取り込ませ，新たな生合成を抑制したところ，アンチセンスオリゴヌクレオチド投与群では対照群に較べ，神経突起が細かく分枝する傾向がみられた。またHPC-1に対する抗血清を用いた免疫細胞化学的観察の結果，アンチセンス投与群における細く分枝した神経突起中にはHPC-1の発現が見られず，HPC-1の合成阻害は神経突起の分枝を促進する傾向にあることを見いだした。分子機構の詳細について検討している。

高次液性調節研究部門

【概要】

本研究部門では，随意運動の高次調節機構を研究対象としている。すなわち，大脳皮質の運動関連諸領野をはじめ，大脳基底核系・小脳系などが，それぞれどのような局面でどのように運動発現・調節に関与するかを調べている。各部位の機能を考える上で，その入出力様式を調べるこ

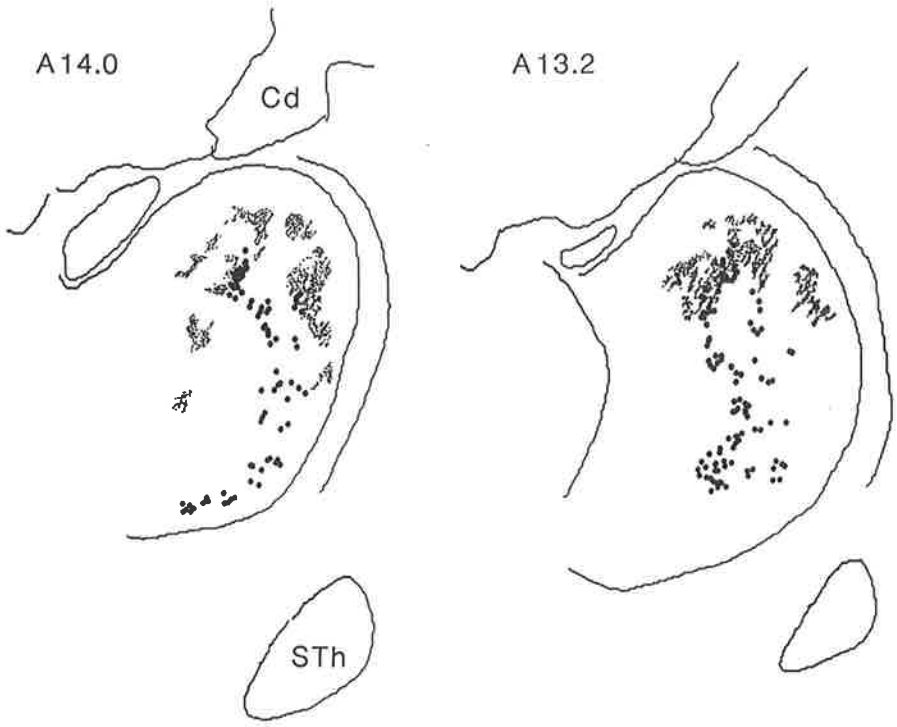
とは極めて重要である。そこで，本年度は，1）大脳皮質一次運動野が視床を介して直接大脳基底核系からの入力を受けているかどうか，2）第一次運動野及び補足運動野が視床を介して共通の入力を受けているかどうか（共同研究）を検討した。また，神経細胞の活動特性と入出力様式の関係，さらにその活動に関与する物質的背景を明らかにすることが高次制御機構を解明する上で必須である。そこで，3）補足運動野あるいは第一次体性感覚野から第一次運動野への入力伝達における NMDA および non-NMDA 受容体の関与について解析した（共同研究）。

視床における一次運動野への投射ニューロンと淡蒼球内節からの神経終末の分布の比較

稲瀬正彦，瀬尾　道，丹治　順

大脳皮質第一次運動野 (MI) が大脳基底核系の出力部位である淡蒼球内節 (GPi) から視床 (Th) を介して直接入力をうけるかどうかという問題は，運動野と基底核系双方の機能を考える上で極めて重要である。近年，電気生理学的にあるいは transneuronal tracer を用いて，GPi-Th-MI の経路の存在は確認されたが，視床の MI 投射細胞のうち，どの程度が GPi の入力をうけるかは明らかではない。

そこで，逆行性と順行性の標識物質による二重標識法を用いて，同一切片の視床で GPi からの神経終末と MI 投射細胞とを同時に観察し，それぞれの分布を比較した。特に MI 投射細胞については，近位部と遠位部上肢領域に投射する細胞を分けて検討した。まず，一次運動野の近位部および遠位部上肢領域を皮質内微小電流刺激法により同定し，近位部と遠位部のそれぞれに異なる逆行性標識物質 Fast Blue あるいは Diamidino Yellow を注入した。3 週間後，GPi を細胞外神経細胞活動記録により同定し，順行性標識物質の WGA-HRP を注入した。さらに 4 日後，深麻酔下で灌流固定した。50 μm の凍結切片を作製し Tetramethylbenzidine を用いて HRP を可視化した後，透過照明および落射蛍光照明により，標識された神経終末と投射細胞とを観察した。



図：視床における淡蒼球内節からの神経終末（小点）と一次運動野への投射細胞（黒丸）の分布を示す。Cd, 尾状核；STh, 視床下核

その結果，GPi からの神経終末の分布と MI への投射細胞の分布とは，一部では重なるものの，大部分は一致しないことが明らかとなった（図）。MI 投射細胞は，GPi 終末領域に比べ，より尾側に存在し，同一切片上では，より腹外側に存在する傾向が見られた。ただし，MI 投射細胞中，吻背側に存在する細胞の一部は，GPi 終末領域に存在した。以上の結果は，近位部および遠位部上肢領域への MI 投射細胞の双方に共通した。定量解析を行った一例では，近位部 MI 投射細胞中，5.6％が GPi 終末領域内に，15.2％が終末領域から 200 μm 以内に，79.2％がそれ以外に存在した。同じく遠位部 MI 投射細胞では，4.6％が GPi 終末領域内に，7.9％が終末領域から 200 μm 以内に，87.5％がそれ以外に見られた。

以上の結果から，MI は，GPi から視床を介して弱い入力を受けるものの，主たる皮質下入力はそれ以外に由来することが明らかになった。これまでの他の研究より，これは小脳核からの入力と考えられる。一方，GPi から視床へ送られた情報は，これまでの当部門の研究で明らかにされた通り，主に補足運動野に送られると考えられる。

統合生理学研究施設

【概要】

この10年間，イオンチャンネルや単一ニューロンの研究が急速に進み，脳について膨大な知識が集積されてきた。また脳全体がシステムとしていかに働くかについても，動物実験等によりニューロン回路網の解析が行われ，多くの知見が得られつつある。これらの知識を統合して，ヒトの脳機能，特に言語，判断，認知，記憶などの高次脳機能を解明することが本施設の目的である。また，これらの研究はヒトの精神・神経疾患の病態解明，更には治療にもつながるものと期待される。

現在，本研究施設には，脳磁場計 (MEG), 脳波計 (EEG) および 3 次元脳再構成装置が装備されている。なかでも脳磁場計は，SQUID と呼ばれる超伝導素子を利用して，脳が発生する微弱な磁場を頭部の37箇所から同時に観測する装置で，全く非侵襲であり，脳波や PET, MRI と比較して時間・空間分解能の点で優れており，画期的なものである。これらの装置を駆使してヒトの脳から記録を行うことにより，次のような研究が計画・進行中である。

（1）随意運動とそれを統御している意志決定のメカニズム

（2）音声，視覚，体性感覚等の認知のプロセス

また，ヒトでの実験は動物実験による基礎づけが必須であり，動物実験も平行して行う。

NO-GO 電位の電気生理学的および磁気生理学的研究

佐々木和夫，玄番央恵，南部　篤，松崎竜一（生理研・京都大・医・認知行動脳科学）

【要旨】

色光を手がかり刺激とした go/no-go 運動課題遂行中のヒトの前頭前野から，no-go 試行に特異的な脳波，脳磁場が記録された。これはサル前頭前野で既に報告されている no-go 電位に相当するものであり，運動抑制の判断に関わっていると考えられる。

【目的】

昨年に引き続き，脳磁場計測により，ヒトでの no-go 電位の検索を行った。

ヒトに色光を手がかり刺激として，ボタンを押すという go/no-go 弁別課題を与え，脳波 (EEG) の記録を行うと，no-go 試行の際に潜時 100－160ms の陰性波が頭蓋正中部を中心に両側前頭部と頭頂部で記録される[1]。脳波の実験からでは，その意味づけは不明であるが，大脳皮質の種々の領野の表面と深層（表面から2.0－3.0㎜）に慢性記録電極を埋め込んだサルに，同様の go/no-go 弁別課題を行わせると，no-go 試行に限り両側の前頭前野主溝背側部に限局して，潜時

85－150msで表面陰性－深部陽性電位が記録された[2]。この電位は(a) go試行の運動に先立って両側の同部位を電気刺激すると，運動が抑制される，(b)色光を逆転させて再学習させる過程において，電位の出現と行動とがよく一致することなどから，運動の可，不可の判断を行い，運動を抑制していると考えられ，no-go電位と名付けられた[3]。

このように，ヒトでの電位は，サルのno-go電位に相当すると考えられるが，その分布は広範囲な部位に広がり，脳での局在を同定することは困難であった[1]。脳磁図(MEG)は，脳波と違って脳脊髄液，頭蓋骨の影響を受けにくく，脳活動の部位を局在するのに適した方法と考えられる。同様のgo/no-go課題をヒトに与え，37チャンネルの脳磁場計でno-go電位の局在を検討した。

【方法】

ベッドに横臥した被験者の眼前に設置された光ファイバーの先端が，ランダムに緑色あるいは赤色に0.5秒間だけ点灯する。何れかの色光がgoあるいはno-goを意味しており，goの場合は点灯中に手でボタンを押し，no-goの場合はボタンを押さないように指示する。ボタン押しは光ファイバーで検知し，go試行で成功した場合はビープ音で知らせる。このようなgo/no-go弁別課題遂行中の被験者の前頭部を中心に，37チャンネルSQUID磁束計(Magnes, BTi, CA)を用い脳磁場の計測を行い，go, no-go試行別にそれぞれ100回加算平均した。また，同時にあるいは別の機会に，go/no-go弁別課題遂行中の同一被験者から10－20法に従って脳波記録を行い，脳磁図と比較した。

【結果】

図に，赤をgo,緑をno-goの手がかり刺激として，右手でボタン押しを行っている被験者の左前頭部から記録した脳磁図の代表的な例を示す。no-go試行の場合はピーク潜時約140msで反応が見られ（図左上，縦破線），その極性は前後のセンサーコイル（A26とA33）で逆転している。go試行の場合は，そのような反応は見られなかった（図左下）。等磁場曲線を描くと，左半球では尾背側に吹き出し口が，吻腹側に吸い込み口がある（図右上）。被験者がボタン押しの手を左手に変えても，go/no-goの色光を逆転させても同様の反応が見られた。また，右前頭部から記録を行うと同様の反応が見られるが，その極性は逆であった。この反応の電流双極子を推定すると，記録側の前頭前野ないしは運動前野と思われるところに存在した（図右下）。また，同一被験者から脳波記録を行うとno-go電位が観測されるが，その潜時は脳磁図での反応とよく一致していた。これらのことから，no-go試行に特異的に観測される磁場は，脳波のno-go電位に相当するものであり，また，脳磁図から推定した電流双極子が左右両半球に存在することから，脳波でno-go電位が頭蓋正中部に大きく記録されたのは，両半球に存在する電流双極子のベクトル和によるものと考えられる。

同一被験者について数回にわたり測定を繰り返しても，同様の場所に電流双極子が推定された。また，８人の被験者について同様な測定を行ったところ，電流双極子の方向には個体差があるものの，いずれも前頭前野ないしは運動前野と思われるところに電流双極子が推定された。

これらの観察は，ヒトにおいてもno-go試行に際して両側の前頭前野ないしは運動前野が活動

して，運動の可，不可の判断と不可の場合の運動の抑制を行っていることを示唆する。

【考察】

脳内フィールド電位は，主に大脳皮質の錐体細胞に起る興奮性シナプス後電位 (EPSP) による細胞外電流の総和であり，起電力のほとんど見られない抑制性シナプス後電位 (IPSP) や閉電場しか作らない星状細胞の寄与は少ないと考えられる。脳波もフィールド電位を頭皮上から記録しているものであり，主に頭部表面に平行な大脳皮質に存在する錐体細胞に起る興奮性シナプス後電位による細胞外電流の総和である。一方，脳磁図は主に頭部表面に対して垂直な，すなわち脳溝壁に存在する大脳皮質錐体細胞に起る興奮性シナプス後電位による細胞内電流に由来すると考えられる。これら三者は，いずれも大脳皮質の錐体細胞に起る興奮性シナプス後電位によるもので，相互に補完しあうものである。特にヒトの場合，脳内に電極を刺入して直接，脳活動を記録できるのは特別な場合だけであり，本報告のように動物実験の知見からの援用により，ヒトで観測された脳波や脳磁図の解釈が可能となる。

動物の大脳皮質の表面と深層からフィールド電位の記録を行う方法は，真に働いている領野を検知するのに適した方法であり，電位の極性などにより入力部位（小脳由来か，他の皮質からのものかなど）の推測が可能である[4]。それに対して頭皮上からの脳波の記録は，途中に存在する脳脊髄液，頭蓋骨のため歪み拡散してしまい，その解釈には多くの仮定が必要となる。一方，脳磁場はその性質上，脳脊髄液，頭蓋骨の影響を受けにくく，局在を決定するのに適していると考えられる。実際，今回の報告でも，no-go 電位が脳波で正中部に大きく記録されるのは，両半球に存在する電気活動のベクトル和にすぎないことが示された。

要約すると，動物からの慢性記録とヒトでの脳磁図，脳波の三者を併用する方法は，ヒトの随意運動，更には判断，運動抑制など高次脳機能の検索に強力な手段を提供する。

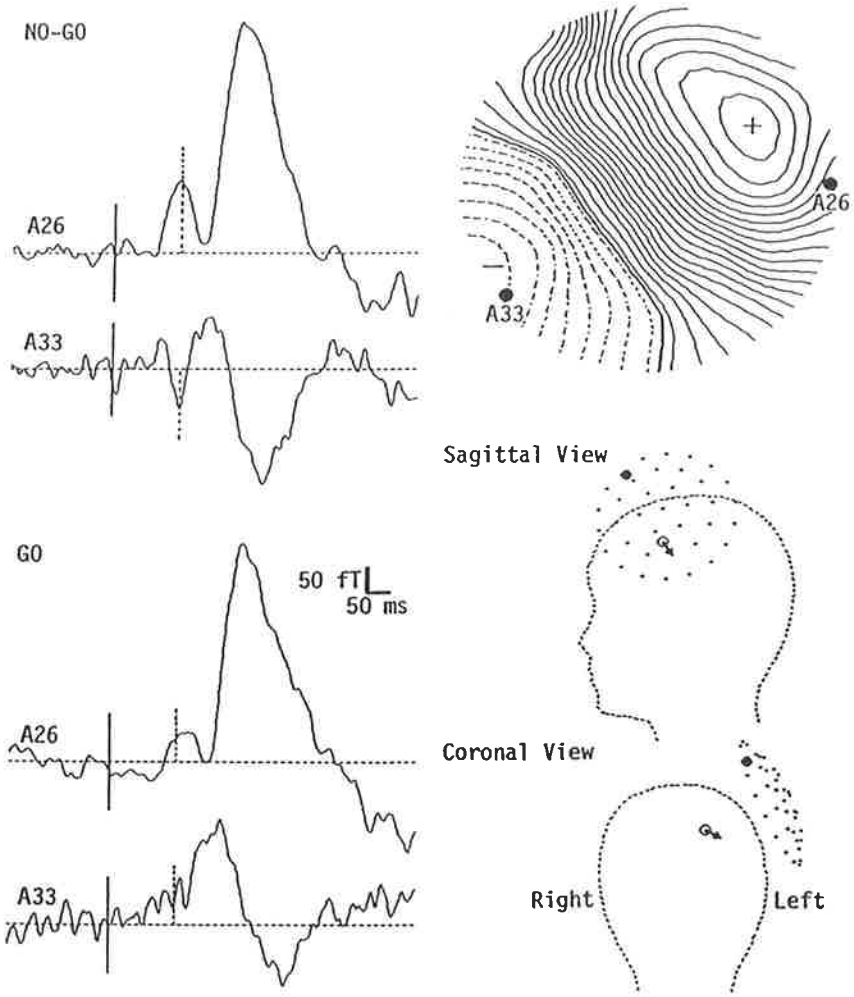
【文献】

1）Gemba H, Sasaki K : Neurosci Lett 101, 263-268, 1989

2）Sasaki K, Gemba H : Exp Brain Res 64, 603-606, 1986

3）Sasaki K, Gemba H, Tsujimoto T : Brain Res 495, 100-107, 1989

4）Sasaki K, Gemba H : Event-Related Brain Research, EEG J Suppl 42, 80-96, 1991



図： no-go 磁場の例。左上：37チャンネルのうち代表的な 2 チャンネルを示す。no-go 試行を100回加算平均した。縦実線が光の点灯時点を，縦破線が no-go に特異的な磁場の頂点の時点を示す。左下： go 試行を示す。縦破線の時点には，有意な磁場変化は見られない。右上： no-go 磁場の破線の時点での等磁場曲線。左側が前方を，上側が頭頂を示す。右下：推定された no-go 磁場の電流双極子（矢印)。点は37個のセンサーコイルの位置を示す。

聴覚および視覚皮質神経活動の2ダイポール解析

栗城真也（生理研・北海道大・電子科学研）
大城　理（生理研・住友金属未来研）
竹内文也，小林哲生（北海道大・電子科学研）

SQUID 磁束計により計測した脳磁界は大脳皮質の神経活動を反映している。一般に皮質の領野は機能別の subfield に分かれており，例えばシルビウス溝内部の聴覚皮質では，(数cm)^{2}の面積の中で分離した局所神経群が時間的に重なって活動することが想定される。従来，脳磁界活動源としては単一ダイポール解析が主であるが，測定データのなかには2つ以上のダイポールが適当と思われるものも見られる。この研究は，2ダイポールを仮定した活動源解析の方法について検討し，それを音声誘発脳磁界と視覚誘発脳磁界に適用したものである。

【シミュレーション実験】

37チャネル SQUID で計測した，単音節 /a/, /ka/, /ha/, /na/ により誘発される脳磁界波形には，N1m ピークの振幅が最小となるはずのゼロライン上で2相性の波形が観測される。また，N1m ピークを中心とした潜時の磁界分布について主成分分析すると双極性の第1主成分に加え，単極性の第2主成分が現れる。そこで，時間的に空間内を移動する単一ダイポールを仮定して計算機シミュレーションを行うと，2相性の波形と単極性の第2主成分が再現される[1)]。

聴覚皮質内の神経活動が lateral connection を通じて移動すると考えられるが，ある程度離れた2つの場所の神経群が時間遅れ（位相ずれ）をもって活動することも有り得る。そこて4cm離れた2ダイポールを仮定し，種々の位相遅れをもって神経活動が生成して衰退するモデルを想定してシミュレーションを行った。その結果，単一ダイポールが移動するとした場合とほとんど相似な時間波形と主成分磁界分布が得られた（図1）。ここで2つのダイポールは頭皮からの深さ一定の面内に4cm間隔で平行に位置している。2相性波形と単極性の第2主成分が現れることがわかる。

以上の結果は，平行な2ダイポールとその方向に移動する1ダイポールは時間波形と主成分磁界分布上からは区別できないことを示唆している。しかし，ダイポールの位置関係（ないし移動方向）は，波形や磁界分布の形から推定できることがわかった。

【聴覚反応の解析】

各潜時の測定磁界からダイポールモーメント，方向，位置のパラメータを推定する計算では，測定値と仮想ダイポールのつくる理論磁界との一致を図っている。したがってパラメータ推定においては，時空間的特徴に基づいた上の方法とは異なり1ダイポールと2ダイポールの微細な磁界強度の違いが反映される可能性がある。

単音節音声誘発脳磁界の N1m 成分に対して2ダイポール解析を試み，1ダイポール計算の結果と比較した。2ダイポール解析においては，まず N1m を中心とする区間の主成分分析より第

1成分を求め，それより推定した単一ダイポールの位置を初期値として同じ位置に2ダイポールをおいて推定計算を行った。

図2に結果の典型例を示す。左脳半球で測定した潜時約90msecのN1mピークに対する計算結果で，X，Y，Z軸はそれぞれ鼻根点，左の耳孔前点，頭頂に向かう方向である。また原点は左右の耳孔前点の中点である。2ダイポールの1個は，空間的に局在した場所で潜時に対して安定した動きを示しているが，他の1個は大きな分散と不安定な動きを示す。ここで，安定なダイポール位置は，最初に単一ダイポールを仮定して推定したものとほぼ一致している。このことは，N1m成分が単一ダイポール性の強いものであることを示唆している。

【視覚反応の解析】

視覚制御運動や空間認知に関わる高次機能を司ると考えられる頭頂連合野からの視覚反応をSQUIDにより計測している[2)]。2個のLEDを使い，1個を固視用とし，他のひとつをON-OFFさせて半視野刺激を行った。SQUIDは刺激光の反対側の頭頂葉下部に設置した。その結果，刺激のonset後100－120msec, 150－180msec, 220－240msecに生じる3成分が観測された。第2成分がもっとも振幅が大きく被験者間で安定して観測されたが，ピークを中心とする時間領域の磁界分布を見ると，前後の時間に分かれて互いに異なる方向の電流軸をもつ2つのダイポールが推察された。

この2つのダイポールは時間的に一部重なる活動をするため，2ダイポールモデルを仮定した推定計算が適当と考えられる。ピークを含む時間領域での主成分分析から求めた第1，第2主成分は2つのダイポールによる空間分布に良く近似しているので，それぞれの主成分による推定位置を初期値として推定計算を行った。その結果，後半のダイポールについては磁界振幅に対応したピークを示すモーメントを持ち，時間的にはほぼ一定の位置に推定された。前半のダイポールについてはモーメントが低く，そのピークが明瞭ではない。

以上から，後半のダイポールが150－180msec成分を代表する神経活動源を表すものであり，2ダイポール解析はオーバーラップした他の神経活動を弁別するのに有効であると考えられる。

【参考文献】

1） Kuriki S, Takeuchi F & Kobayashi T (1992) Proc. Satel. Symp. Neurosci. Technol. Lyon : 99-103

2） Murakami S, Kuriki S, Fukatsu R & Takahata N (1993) Neurosci. Res. 16 : 225-228

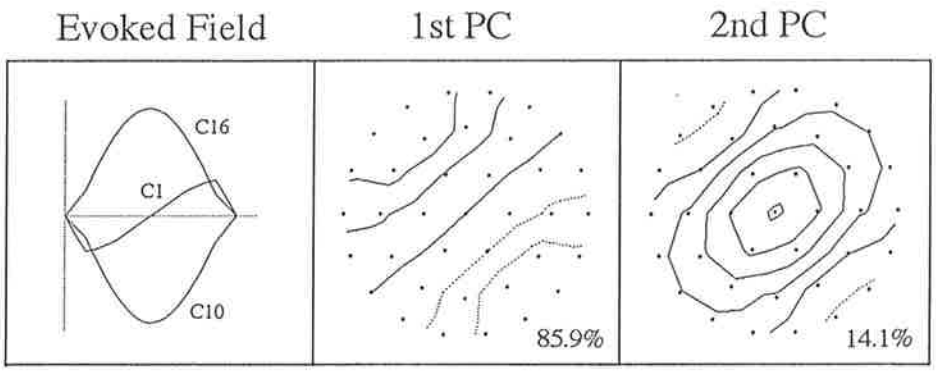


図1．空間的に離れた2つのダイポールがつくる磁界の時間波形と，波形を含む時間領域における第1，2主成分の空間分布

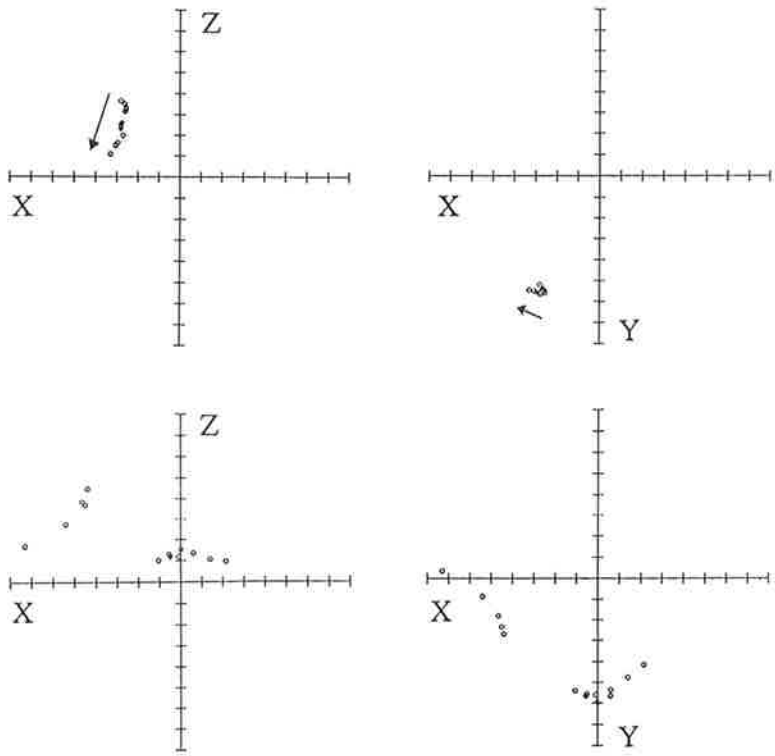


図2．単音節音声 /a/ に誘発される脳磁界の N1m ピークに対する2ダイポール解析の結果。(a), (b) が2つのダイポールであり，左右は矢状面，水平面位置である。

ヒトの高次脳機能の臨床神経生理学的検索

柿木隆介（生理研）

1．痛覚機能の生理学的検索

ヒトの痛覚機能の生理学的検索を CO_2 laser 光線を用いた体性感覚誘発電位（痛覚 SEP）を用いて検索した。CO_2 laser 光線は，痛覚のみを純粋に刺激できることと，刺激時点と皮膚への照射時点との間の時間差が無いため反応時間の測定が正確にできるという大きな長所がある。本年度は，Melzack & Wall が提唱した gate control theory を痛覚 SEP を用いて詳細に分析した。また，臨床応用に力を注ぎ，HTLV-I-associated myelopathy (HAM), 多発性硬化症，末梢神経障害において，痛覚 SEP が痛覚機能障害の程度とよく一致し，しかも潜在的異常の発見にも有用であることを証明した。

2．痴呆，加齢に伴う高次脳機能障害の生理学的検索

"P300" という大脳誘発電位および SEP を用いて，ヒトの高次脳機能の検索をおこなった。P300 は記憶，認知，予測といった機能と相関し，加齢および知能低下にともない潜時が延長する。本年度は，正常者において SEP が加齢に伴い急激に変化することを報告した。また臨床例では，早老症の代表的疾患である Werner 症候群の 1 例の P300 と SEP を数年来にわたり観察し，中枢神経系にも急激な老化現象がおこっていることを報告した。

3．ダウン症候群患者での誘発電位異常

ダウン症候群患者は，その脳病理所見がアルツハイマー病に酷似していること，成人後に急激な老化現象がおこることが知られており，痴呆と老化のモデルとして注目を浴びている。これまで主として SEP の所見について検討を重ね，その波形変化が70才以上の高齢者に見られるものと良く似ていることより，急激な老化現象によるものと推測した。本年度は脳幹の生理学的機能を良く反映するといわれている聴性脳幹誘発電位を検索した。すると，各電位の潜時は正常者よりも有意に短い，すなわち伝導速度が有意に速いことがわかった。アルツハイマー病や正常高齢者ではこのような所見はみられないため，ダウン症候群に特異的な所見と思われるが，その原因は現時点では不明である。

Ryusuke Kakigi

Key words: Pain Perception, Higher brain functions, Down's syndorme
痛覚認知，高次脳機能，ダウン症候群

視覚始動性反応時間運動に伴うヒト大脳皮質活動の磁場計測

南部　篤，松崎竜一，玄番央恵，佐々木和夫（生理研・京都大・医・認知行動脳科学）

【要旨】

光を手がかり刺激として指の屈曲を行う「視覚始動性反応時間運動」を遂行中のヒトから，大脳皮質の磁場活動を記録した。運動開始前および運動開始後それぞれに，磁場の変化が観察され，両者とも電流源は中心溝に推定された。サルを用いた実験結果より，これらは，それぞれ小脳－視床－大脳皮質投射による大脳皮質運動野の活動，および体性感覚野の活動を反映すると考えられる。

【目的】

あらかじめ，大脳皮質の種々の領野の表面と深層に，慢性記録電極を埋め込んだサルに，光に応じてレバーを上げるという視覚始動性の反応時間運動を行わせ，フィールド電位を記録する方法は，随意運動の神経機構を明らかにするために，有効な方法である[1]。これは，各領野における細胞外電流によって生ずる電位を，計測していると考えられる。同様の課題をヒトに行わせ，頭皮上の電極により電位を記録してみると，運動に関連した電位は殆ど記録されない。これは，ヒトでは脳溝内の活動が，より多くを占めるほか，脳脊髄液の電気伝導度が脳組織よりも高く，さらに，それを被う頭蓋骨，皮膚の電気伝導度が低いため，局所の電気活動が拡散，歪曲されるためと考えられる。一方，脳磁場は，主に細胞内電流に起因する磁場を計測するもので[2,3]，上記のフィールド電位と表裏の関係にあり，また，その性質上，脳脊髄液，頭蓋骨，皮膚の影響を受けにくく，上記の動物実験ほどの分解能は無理としても，ヒトでの非侵襲計測において，それに近い分解能が期待されるので，視覚始動性反応時間運動を遂行中のヒトより，脳磁場の記録を試みた。

【方法】

被験者の眼前に設置した光ファイバーの先端が，６から11秒のランダムな間隔で，0.5秒間点灯する。点灯したら速やかに片側の示指を屈曲するように，被験者に指示しておく。運動は，光ファイバーで検知し，成功した場合はビープ音で知らせる。磁気シールドルーム内で，このような課題遂行中の被験者の頭部より，37チャンネル一次 SQUID 磁束計 (Magnes, BTi, CA) を用い，脳磁場を記録し，光刺激あるいは運動開始の時点で100回加算平均した。脳波，筋電図も同時に記録した。また，比較のため，光に応じて足関節の運動，あるいは舌の引っ込め運動をした場合の脳磁場も計測し，同様に処理した。

【結果】

脳磁場を運動の開始時点で加算平均すると，運動した示指とは反対側の頭蓋上に，２つの成分からなる磁場変化が検出された（図）。第一の成分は運動の開始に先行しており，頭蓋上の内外側で，極性が逆転していた。この成分は，筋電図の開始の直前に，100－200fT のピークに達し

た。第二の成分は運動の開始より遅れ，第一の成分とは逆の方向に，頭蓋上の内外側で極性が逆転した。光刺激の開始時点で加算平均を行っても，同様の二つの成分が観測されるが，その立ちあがりは，運動開始時点での加算より鈍く，これらの成分が，より運動に同期していることを示唆する。電流源推定により，第一の成分は，中心溝周辺から前向きの電流双極子に由来すると考えられた（図）。第二の成分の電流源は後ろ向きで，第一のものより，やや後外側に推定された。このような電流源の分布には，体部位局在性が認められた。即ち，被験者が光に応じて舌の引っ込め運動をするような場合は，電流源は，指の場合より腹側に推定され，足関節の運動の場合は，電流源は正中に推定された。

【考察】

サルに光に応じてレバーを上げるという反応時間運動を行わせると，運動の開始に先立って，運動野の上肢領野に表面陰性－深部陽性の電位が観察される[4]。この電位の起源は，主に，小脳の外側核から視床を介して，大脳皮質運動野の表層に終わる浅層性視床大脳皮質投射によって，錐体細胞の尖樹状突起先端部（表層部）に，惹起された興奮性シナプス後電位 (EPSP) によると考えられる。このようなシナプス活動は，運動野錐体細胞の尖樹状突起内に，表面から深層に向かう細胞内電流を生じさせる。この細胞内電流が，脳磁場の主な発生源と考えられている[2,3]。中心溝前壁に存在する細胞内電流は，頭蓋表面に対して平行なため，頭外より検知されうる磁場の発生源になりうるのに対し，脳回表面に存在する電流は，有効な磁場の発生源とはならないので，全体としては，中心溝から前へ向かう電流双極子として近似される。従って，本実験で観測された第一の成分は，このような小脳－視床－大脳皮質投射によって活性化された，運動野の活動を反映していると考えられる。

運動後には，サルの大脳皮質体性感覚野に表面陰性－深部陽性電位が記録される[4]。これは中枢あるいは末梢を経由した，感覚性のフィードバックによると考えられる。表面陰性－深部陽性という極性から体性感覚野の浅層での EPSP の存在が示唆され，全体としては，中心溝から後ろ向きの電流双極子として近似される。本研究での第二の成分は，体性感覚野の活動を反映していると考えられる。

また，このような電流源の分布が，大脳皮質運動野，体性感覚野の古典的な機能地図に従った体部位局在を示すことも，本研究での磁場変化が，これらの皮質の活動を反映しているという考えを支持する証拠である。

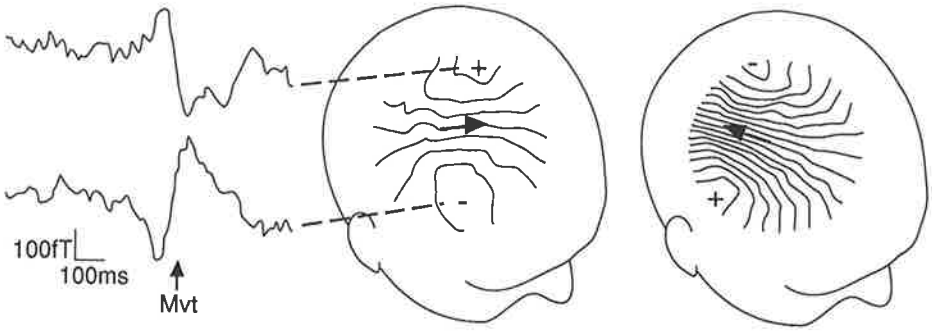
本研究で推定された電流源のうち，第一の電流双極子が第二のものより前内側に推定されることは，第一の成分が，他の皮質の活動（例えば大脳皮質運動野の中心溝以外の部分，補足運動野 (SMA)，運動前野，前頭前野など）をも含む可能性を示唆する。

【文献】

1）Sasaki K, Gemba H : Event-Related Brain Research, EEG Suppl 42, 80-96, 1991

2）Okada Y : In : Williamson SJ et al. (eds) Biomagnetism, an Interdisciplinary Approach. Plenum, pp 399-408, 1983

3）佐々木和夫，玄番央恵，南部篤，松崎竜一：第7回生体磁気学会大会論文集，36-39, 1992
4）Sasaki K, Gemba H, Mizuno N : Exp Brain Res 46, 29-36, 1982



図：運動する示指と対側の頭蓋より記録した脳磁場を，運動の開始時点 (Mvt) で100回加算平均した（左)。上向きは，頭蓋から吹き出す極性を示す。運動開始前（中央）と運動開始後（右）の等磁場曲線。矢印は，推定された電流双極子を示す。

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。1992年度は，血圧のテレメトリーシステムを導入した。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８件，人工気候室は20件，計測機器等の短期利用は149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）全身運動の消化器能に及ぼす影響，（４）脈管作動性ペプチドの生合成と生理作用等の共同研究を行った。

Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide の血管拡張作用

成瀬　達
軒原清史（島津製作所）
V. Wray (GBF)

ヒツジの視床下部より単離された pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) は，VIP と類似の一次構造を有する神経ペプチドである。PACAP には38アミノ酸残基よりなる PACAP38 とそのＣ端の11アミノ酸残基を欠く PACAP27 の二つの分子型が存在する。免疫組織化学的研究から PACAP は中枢神経系に於て，神経伝達物質もしくは脳下垂体刺激ホルモンとして作用している可能性が示唆されている。PACAP の結合部位は中枢神経系のみならず末梢の臓器にも存在することが知られており，PACAP は VIP と同様に，末梢血流の調節に関与している可能性がある。本研究では，PACAP を化学合成し，その血管拡張作用を VIP と比較検討した。

【方法】

10頭のビーグル犬を用いた。ペントバルビタール麻酔下で，大腿動脈を剝離し，電磁血流計のプローブを装着した。大腿動脈の分枝よりポリエチレンチューブを挿入固定し，ヘパリン添加生理食塩水を 1ml/分で注入した。また，反対側の大腿動脈を圧トランスデューサーに接続し，動脈圧を記録した。ペプチド合成機を用いて化学合成した PACAP38, PACAP27 および VIP (0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25pmol/kg) を生理食塩水に溶解後，大腿動脈内投与（1ml/分）し，血流の変

化を記録した。統計学的検定は分散分析を行なった後，Dunnett および対の t 検定により比較し，有意水準を $P<0.05$ とした。

【成績】

PACAP38 および PACAP27 は，VIP と同様に，用量依存性に大腿動脈血流を増加させた（図1）。PACAP38 の血流増加作用は PACAP27 および VIP と異なり，持続性が認められた（図2）。PACAP38 の持続作用は，用量が大きくなると失われた。PACAP38, PACAP27 及び VIP の動脈圧降下作用ならびに心拍数増加作用には有意な差がなかった。PACAP38 (COOH) の血流作用は PACAP38 と同じであった。PACAP 誘導体，(1－15)，(10－20)，(27－38) および (27－38) NH_2 は 1nmol/kg まで大腿動脈血流にほとんど影響を及ぼさなかった。

【結論】

イヌの大腿動脈において，PACAP は VIP 様の強力な血管拡張作用を持つ。PACAP38 の血流作用には PACAP27 ならびに VIP に比べ持続性があり，PACAP38 のC端28－38がこの持続性に関係があると推定される。PACAP38 と PACAP38 (COOH) の作用に差がなかったことから，血管拡張作用にはC端のアミドは重要でない。

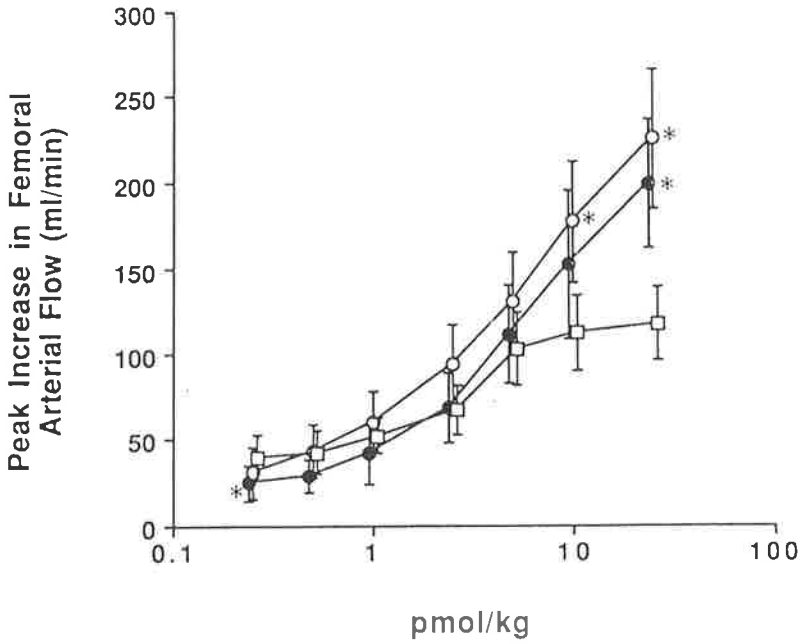


図1　PACAP38 (■)，PACAP27 (○) および VIP (●) 動脈内投与の大腿動脈血流におよぼす作用。平均値±SE (n＝5頭)，＊$P<0.05$を示す。

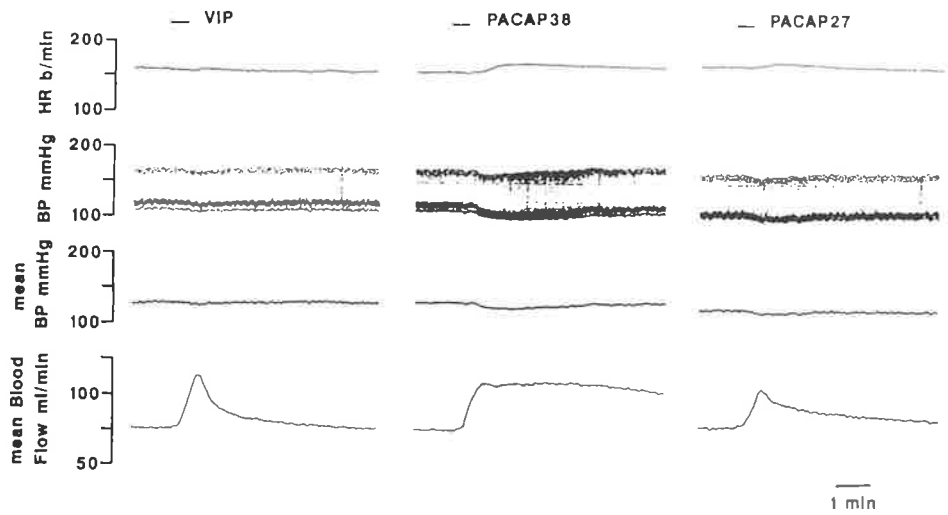


図2　VIP, PACAP38, および PACAP27 (2.5pmol/kg) 動脈内投与の心拍数 (HR), 血圧 (BP), 平均血圧ならびに大腿動脈血流に対する作用。

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。1992年度は組織標本室の充実をはかり，免疫組織化学用の凍結切片作製の為，クライオスタットを導入した。又，明視野のみならず蛍光ラベルした培養細胞の長時間タイムラプセビデオ録画が出来るよう装置を整備し，利用の便を計った。本年度の利用者は所内17名，所外15名の計32名であった。

小腸絨毛下筋線維芽細胞，筋層介在細胞，グリア細胞を認識するモノクローナル抗体の作製

古家園子，永田理恵子，中山　孝（機能協関）

小腸絨毛上皮細胞の下でネットワークを形成している筋線維芽細胞は，エンドセリン受容体に富み，各種の神経伝達物質や血管作働物質に反応し，dBcAMP により形態がフラットから星状に変化することを昨年度までに明らかにしてきた。この性質は脳のアストロサイトと類似しており，本年度は両者を認識する抗体の作製を試みた。

【方法】

培養筋線維芽細胞を0.25％のグルタルアルデヒドで30分間固定し，PBS（－）で４回洗浄した。これにマウスの脾臓細胞を加え，in vitro で３－４日間，免疫し，後，ミエローマ細胞と融合させた。小腸の筋線維芽細胞，脳のアストロサイトを染めるモノクローナル抗体をラットの小腸，脳の凍結切片を用いた蛍光免疫組織化学法にてスクリーニングした。

【結果】

脳のアストロサイトのみを染める抗体，アストロサイトと筋線維芽細胞を染めるもの，筋線維芽細胞などの線維芽細胞を染めるものなど，各種の抗体が得られた。なかでも，8E1 クローンはアストロサイト（図１），培養筋線維芽細胞（図２），小腸筋層の介在細胞（図３）を共に染めた。現在，この抗体が認識している物質の同定中である。

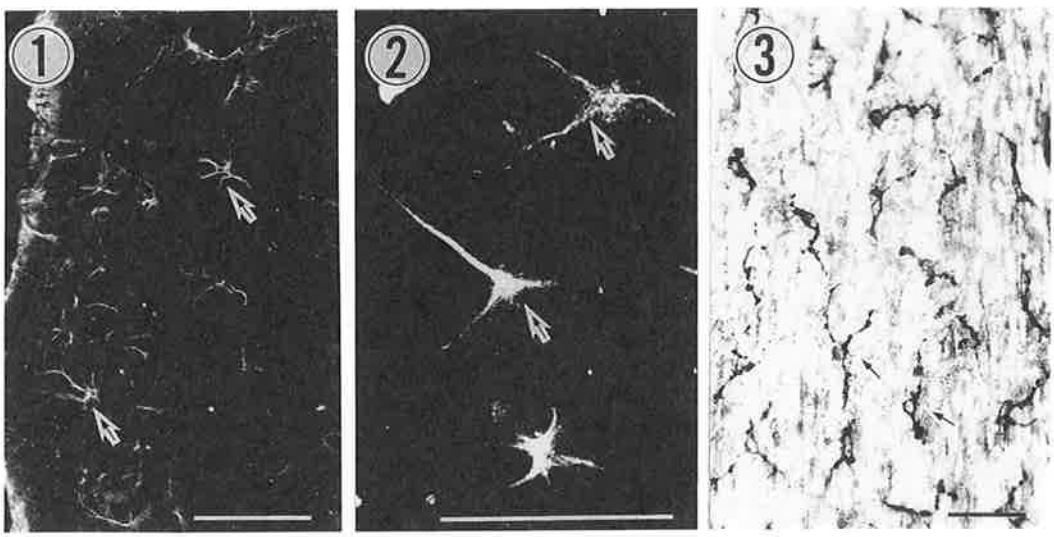


図１：8E1 抗体で染めたラット脳の凍結切片。アストロサイト（矢印）が染まっている。

図２：8E1 抗体で染めた培養筋線維芽細胞。細胞質がドット状に染まっている（矢印）。

図３：8E1 抗体で染めたラット小腸筋層の全載標本。deep muscular layer の interstitial cell（介在細胞：矢印）の細胞質が染まっている。Bars：50 μm

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４年度は共同利用実験計画が11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４年度は最終的に17課題が採択され，実施された。これらは，主に①厚い生物試料の立体観察と三次元解析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169日，修理調整等63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7,566枚，フィラメント点灯時間は736.6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。

平成４年11月に，照射系および結像系部の真空度の向上を目標に，電子線通路のライナーチューブを改造型に変更した。現在（Ｈ５.04.19），試料室真空度は$\leq 6 \times 10^{-6}$Paである。また液体窒素型クライオトランスファーホルダーを導入したので凍結切片や氷包埋法への応用が期待される。パーキンエルマー社のマイクロデンシトメーター(PDS1010M)を，これまでのミニコン(PDP11/34)制御から，パソコン(DELL 466/ME：OS DOS/V)制御に変更した。これにより画像データの取り込み時間が短縮され，フロッピーディスク等やネットワークを利用することが出来るようになったので画像データ取扱の効率が向上している。

超高圧電顕TV像の感度と分解能
多結晶蛍光体ーオルシコン撮像管の場合について

有井達夫，吉村伸明

加速電圧1,000kVにおいてもTV用蛍光板にYAG単結晶を用いると(YAG；Gatan-622H3)高感度で高分解能の観察ができるが，点像分布関数によるひろがり効果により，構造が10画素程度よりも細かくなるに従ってコントラストが減少することを昨年の年報で報告した。

今回，カメラ室下部に多結晶蛍光体(P22)を塗布した蛍光板を設置して得られる像をタンデムレンズ方式でイメージオルシコン撮像管（３インチ）を用いて撮影する従来のテレビシステムについて，前回と同様の方法を用いて実験した。

画像処理装置イメージΣⅡに画像を取り込みTV画像をデジタル量に変換した。１画素の大きさは蛍光板上で53μm×53μmである。これは電顕フィルムの44μm×44μmの領域に相当する。図１は一様に電子線照射したときの照射電流に対するディジタル化されたTV像の平均の強度とそのバリアンス（標準偏差の２乗）の値である。全体として照射量にほぼ比例して平均の強

度が増加していることが分かる。バリアンスの値も電子線照射量の増大とともに増加している領域がある。このとき電子に対する実効的な検出量子効率をオリジナルの画素サイズに対して求めると約4である。これはYAG；Gatan-622H3での値約11と比較してより1に近い値であるが1よりも大きい。このことはオリジナルの隣接する画素間に強度の相関があることを示唆している。

オルシコン用蛍光板の上部約100㎜に10μmφの絞りを置いてオルシコン用蛍光板上で約0.8nA/cm^{2}となる電流密度（絞りなしのとき）で一様に照射し，得られるTV像を256画面平均してノイズを減少させ点像分布関数を求めると，図2を得る。これより半値幅は約2画素と得られる。この値はYAG；Gatan-622H3での加速電圧1,000kVにおける3画素という値の2/3でありモニターテレビ上における像のぼけまたはコントラストの減少は少ないことがわかる。しかし実際に撮影している蛍光板の領域で半値幅を比較すると多結晶蛍光板では約100μmでありYAG；Gatan 622-H3での値60μmよりも大きくなり目的とする電顕フィルムに対しての空間分解能は悪いことになる。しかし多結晶蛍光体ーオルシコンのシステムは，通常のTV像視野観察においては画素サイズが大きいので画素単位でのぼけは少なくTV像の解像度は高くなり，YAG単結晶の大きさによる制限無しに広い領域（現在の条件ではフィルム上の面積にして×7.8倍）を観察できるので実際上有利となる場合があることが分かる。

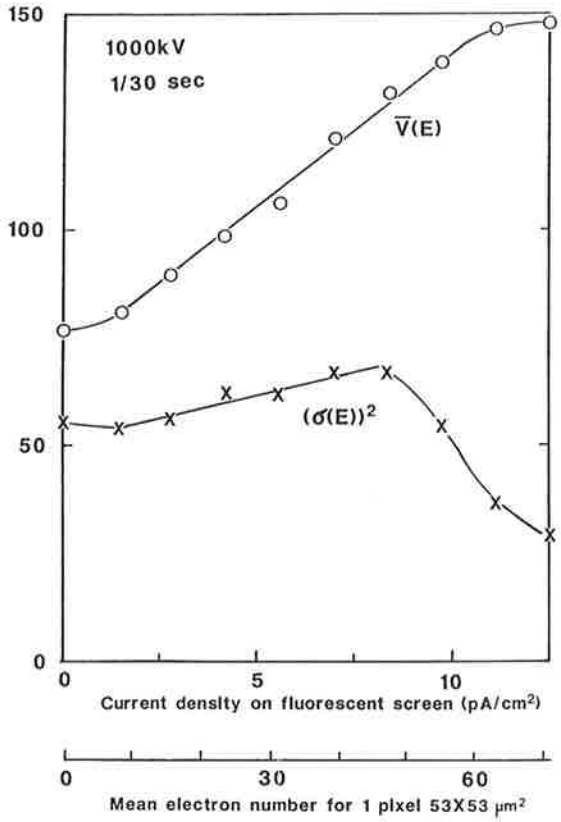


図1　オルシコン撮像管中央部近くでのTV像の平均強度とそのバリアンスの電子線照射量依存性
1,000kV, (1/30) sec.　画素サイズ：蛍光板上で53μm×53μm。

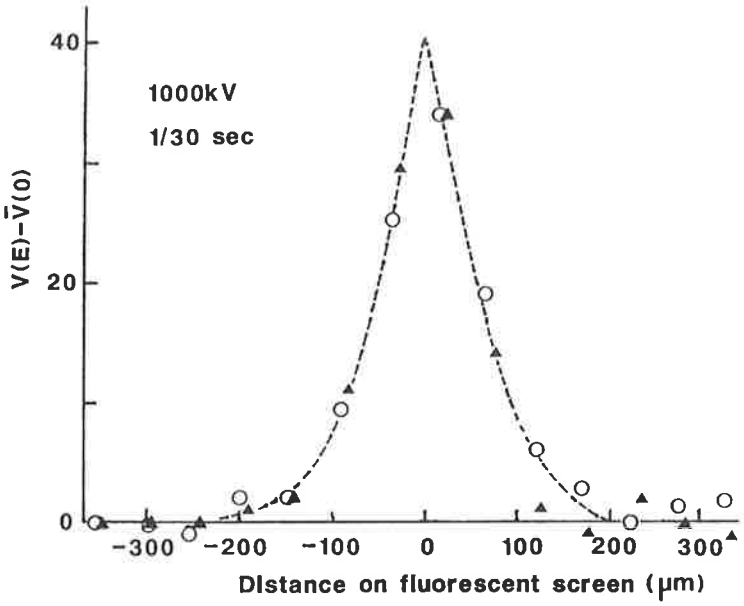


図2　開口部10μm直径の絞りによる撮像（点像分布関数に相当する）。
1,000kV, TV像((1/30) sec)256画面積算して平均処理後。
▲；TV走査線方向。○；TV走査線方向に垂直

動物実験施設

【概要】

生命科学における目ざましい発展を反映して，動物実験施設では様々な動物実験が活発に行われている。遺伝子工学的手法を用いた分子生物学は医学，生物学に新分野を切り開きつつあり，所内でもトランスジェニック動物や，遺伝子ノックダウン動物の作出や飼育が開始された。また，モノクローナル抗体による生理活性物質の検出や定量が植物学領域にまで応用されるようになり，陸生動物室においては使用動物の種類，数量ともに増え，陸生動物飼育室の利用は飽和状態となっている。一方，動物実験をめぐる社会的環境は一層厳しくなっており，実験動物の福祉に対して慎重な配慮が求められている。愛知県においても，研究用イヌ，ネコの払い下げにきびしい規制が始まったほか，ニホンザルの入手も一層困難になってきている。医学・生物学の研究を進めていく上で，実験動物の安定供給は不可欠の要素であり，深刻な事態であると言わねばならない。動物実験施設では，このような状況をふまえて，適切な実験環境を保証するため，動物の入手から，死体の処理に至るまで実験室や飼育管理体制を含めた動物実験のあり方について全般的な見直しを行い，飼育条件の改善や実験室の整備などに取り組んできたが，平成4年度におい

ては，新たにトランスジェニック動物(TGA)の飼育のための「取扱い要領」を策定すると共に，SPF飼育室を改修してTGA実験区域を設け，トランスジェニック動物実験の開始に対応した。また，飽和状態に近い飼育室の飼育面積を拡充するため飼育室の改装を行ったほか，イヌ，ニワトリ用飼育ケージの改良等を行なった。この他，週休二日制の施行にともない手薄になっていた休日の飼育体制を補完するため，外注による飼育作業員の増員を行い，勤務者の負担の軽減と休日における飼育体制の強化をはかった。なお，飼育室，実験室の不足を解消するために要求してきた陸生動物室の増築は，「陸生動物室検討委員会」を設け実設計にむけて作業が進められている。

水生動物室においては，懸案であった飼育室の照明設備を改修し，照度を上げると共に点消灯の自動化を行い飼育環境条件の改善をはかった。また，50基に上る水槽設備及び水質の連続監視方法についてもひき続き検討を進めている。このほか，飼育設備の老朽化により，様々な故障が頻発するようになってきたが，とりわけ海水による水槽架台の腐食が著しい。飼育設備の更新に備えて，これまでに7トン，1トン，0.5トンの各水槽について試験的改良を行い，水質の維持や機器のメンテナンス法について検討してきたが，早急に改修計画を策定し予算化する必要がある。

ペプチドの生物学的検定のためのマグヌス法の改良

佐治俊章，尾崎　毅

近年，生化学的手法の発達により，生体に由来する新しいペプチドがつぎつぎと見つかり，それらの生理的活性や器官に対する作用の特異性を調べる簡便な方法が様々な分野で求められている。

ホルモンや神経伝達物質などの活性を調べる方法としては，生体に固有の生理作用を利用した生物学的検定法がよく用いられる。生物学的検定法は比較的感度は高いが，再現性や精度が劣り，また動物種や臓器によって特異性が異なるため実験系は実験成績に大きく影響する。今回我々は，血管作動性ペプチド（PACAP及びVIP）のin vitroでの生物学的検定を行うためのマグヌスチャンバーの改良を試みるとともにその有用性について検討を行った。

1．チャンバーの改良

in vitroでの薬物の生理活性を調べるために用いられるマグヌス法は，平滑筋の機械的活動を計測する目的で広く用いられるが，従来の方法はチャンバーが垂直方向になるため，同時に多数の標本をセットしたり，標本に電気刺激を加える等の操作が行いにくく能率が悪い。そこで我々はアクリル樹脂を用いて標本を水平方向に取り付けられる図1のようなチャンバーを制作した。このチャンバーは，O_2CO_2ガスの通気を利用して，上下二段の流路によって一方向の循環流をつくるよう立体的につくられているので，死腔が少なく，エアレーションの効率もよい。標本は，上段の流路中にもうけられたシリコンゴムのベッドに片端をピンで固定し，もう一方の自由端は絹糸を用いて「Lアーム」と呼ぶ方向変換用レバーに結び，トランスデューサーを介して変位ま

たは張力の変化を記録できるようにした。ベッドの幅は10㎜で，一度に４本まで標本を乗せることができ，必要に応じて経壁電気刺激ができるように銀盤電極を埋設した。チャンバーの容量は４～5mlで，吸引ノズルの高さを変えることにより調節できるようにした。このチャンバーの特徴は，標本の取り付けがやさしく，しかも取り付けた標本から筋電図を導出したり電気刺激を加える等の操作が容易で，実体顕微鏡の下で行えば，長さ数ミリの標本さえも扱うことができることである。

微細な変位や張力の変換を行うために制作した「Ｌアーム」と呼ぶ方向変換レバーの軸保持部とディスクは，摩擦を小さくするためテフロン樹脂を加工して使用し，軸には18Gのスパイナル注射針を加工して用いた。各ディスク間の干渉を抑えるため，各々のディスクには中心部に２㎜，高さ0.5㎜の凸部を作り，隣接のディスクとの接触面の減少をはかった。

２．PZT振動装置

「Ｌアーム」の方向変換レバーの摩擦は十分小さいとはいえ，微少な張力を記録する際には，軸とディスクの隙間や，ディスクに付着した溶液の表面張力等の影響が無視できない。このため，圧電素子の一種のPZT（トーキン製NLA-5X5X18）を用いてアームの支柱に100Hzの微小振動を与え，レバーの動きがスムースになるようにした。図２は，振動を与えた場合と振動なしの場合の「Ｌアーム」の動作を比較したものである。測定は，「Ｌアーム」の垂直レバーに弱いバネを介して電動マニピュレーターを接続して，三角波で「Ｌアーム」を駆動し，その動きを変位トランスデューサーを用いて計測した。バネの弾性率から，摩擦力が求められるので，４個のレバーについて測定したところ，PZTを用いて振動を与えることにより，「Ｌアーム」のレバーの摩擦を負荷100mgにおいて約40％程度減少させることができた。

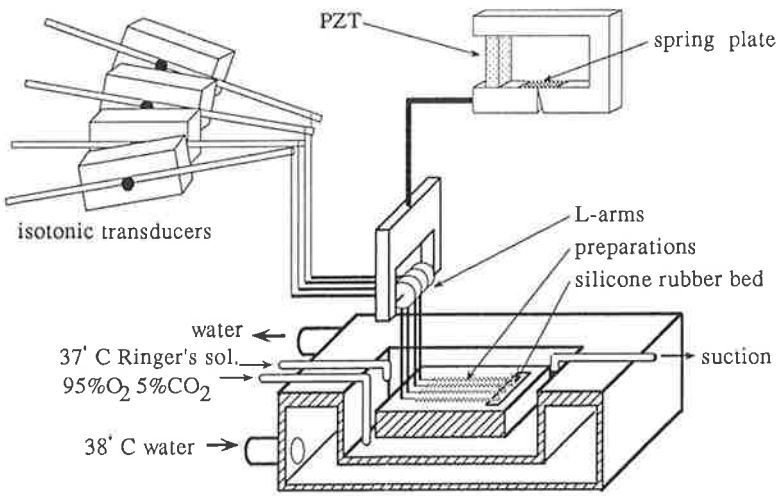


図１．改良型マグヌスチャンバー

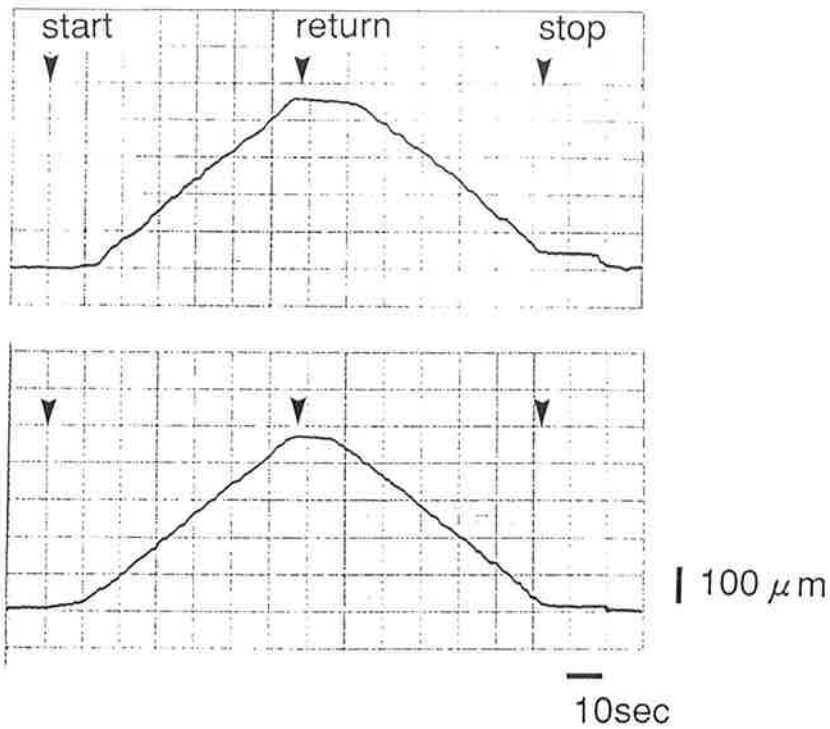


図２．上図は振動を与えない場合，下図は PZT にて振動を与えた場合のＬアームの動き

技　術　課

南　定雄

平成４年度は前年の退職者に代わって阿部ゆかり，山本友美の２名（共に農学Ⅱ種）が平成４年４月１日付けで技官として採用され，約１ヶ月の新任者研修の後，所属研究系へ出向した。内部の異動では，９月１日付けで細胞器官研究系技術係小原正裕主任が同係長に，電子顕微鏡技術係前橋　寛主任が同係長に昇任し，生体調節研究系技術係瀬尾　道技官は同係主任を命ぜられた。

一方，退職並びに転任では，小川良齋研究施設技術班長が平成５年３月31日付けをもって定年退官した。小川班長は昭和58年３月名古屋大学農学部より生理学研究所技術課に転任して，動物実験施設の業務に従事し，マウスの運動量の長期的変化の測定，突然変異動物の繁殖並びに実験動物の利用者への安定な供給に尽力してきた。これら永年にわたる精励に対し岡崎国立共同研究機構長より永年勤続表彰状および記念品が，また，国立大学動物実験施設協議会会長より感謝状が贈られた。永田理恵子技官（生理機能技術係）並びに鍋田弥生技官（分子生理研究系技術係）は平成５年３月31日付けで退職した。両技官は組織培養，生化学の技術をもって研究施設，研究部門の技術支援，後輩の指導に当たると共に，プロジェクト活動や技術研究会などの技術課活動では常に指導的役割を果たしてきた。また，生化学技術の小島美香技官（細胞器官研究系技術係）は平成５年４月１日付けで東京農工大学工学部技官として転任した。

技術課独自の技術研修，研究会は今年度も活発に行われた。９月には所外研修として２班に分かれ，近郊のオークマ株式会社（工作機械開発製造）並びに敷島製パン株式会社中央研究所へ出張した。例年の研修とはやや異った分野であったが製造行程，品質管理の解説，見学では生物を扱う技術とは異なる先端技術の一部を知ることができた。

11月には技術課内報告会を行い，全技官が出向先の業務内容並びに技術支援上の開発，工夫，改良，経験を発表し，業務内容の理解を深めると共に技術交流，協力関係の充実を図った。

生理学技術研究会（第15回）は1993年２月に生理学研究所において開催し，国内生理科学関係技術者100名の参加をいただいた。分科会別に４会場を設置し，技術交流の場として活発に意見の交換を行った。今回はパネル展示による発表を試行し，専門外の分科会の状況を知る機会をつくった。共通の研修講演は，当技術課大河原浩技官が「海外技術支援報告」と題して，ドイツ，フラウンフォッファー研究所での核磁気共鳴装置プローブの開発等の支援について報告した。名古屋大学医学部青木自由治氏には「生物組織染色の史的展望」を文化的背景をも踏まえて解説いただいた。当技術課小川良齋技官は「この道ひとすじ」と題して40年にわたる実験動物との関わりを講演した。

さらに，３月12日には所内技術研修会として専門部会（第15回）を実施した。内容は遺伝子クローニングの基礎と応用，生理科学における電子技術，最近の顕微鏡写真技術，実験動物（サル）

に関する実験手技および飼育管理技術について生理学研究所内外の教官並びに技術者から理論，実習の指導を受けた。これは技術支援体制を整えていくうえで理論や技術面の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，技術課内の自主的な技術研修の一環としてプロジェクト活動を行ってきた。この活動は，出向部門，技官の専門とは直接関係なく，関連技術の習得，技術的視野の拡大，専門技術の向上等を目指すものである。本年度は，前年度より継続のものを含め，コンピュータネットワーク，エレクトロポレーション，クランプアンプ製作，機能構造物質検索，ペプチド合成，形態技術，動物飼育支援機材製作，画像通信，NMR 計測の 9 課題を設定した。この活動は，新任者の技術習得あるいは高度な専門知識の習得など技術の継承・蓄積・開発として課の技術水準の向上ならびに技術支援に大きく寄与している。

第15回生理学技術研究会（1993年 2 月）および1992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15号）および生理学研究所技術課報告（第 8 号）に掲載の予定である。

なお，技術課の業務，課活動を紹介するための冊子「生理学研究所　技術課」を 8 月に編集・発行した。



第15回生理学技術研究会（1993. 2. 18～19）

研究系技術班

大庭明生

研究系技術班は，４系，13部門，総数21名の技官で構成されている。研究系技術班技官は，各研究部門に出向し，実験研究の技術支援に当たっている。

研究技術班は，研究者との実験を通じての支援の場である。研究の最前線では多種多様な技術が持ちいられ，技術者に高度な技術習得が要求される研究環境にある。また同時に，境界的研究に対しては，専門技術を異にする多方面の技術者の総合的な技術支援が求められる。そうした研究支援を円滑に進めるため，系では毎週ミーティングを開き，技術者の連帯を試みている。

本年は，特に専任部門と客員部門に複数の新研究者の着任があり，研究室の改築や実験機器の整備など研究環境の整備にあたった部門が，専任で２部門，客員で１部門あった。

現在，研究技術班には，班長，係長，主任が各１名，係員18名が配置され，班長は班の統括，係長，主任は系の統括の役割があるが，まだ係長不在の部門が複数あり，施設技術班ほど整備に至らず，今後の課の課題となっている。

研究施設技術班

小川良齋

生理学研究所に所属する次の４研究施設には，技術課から技官が出向し，各施設で設備の運転および維持管理，利用者への技術支援，利用技術の開発等を行っている。

1．統合生理研究施設　生理学研究所直属の施設で高次脳機能，感覚・運動機能，自律機能の各研究プロジェクトからなっている。

2．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。

3．動物実験施設　省令による生理学研究所と基礎生物学研究所の共通施設として運営されている。陸生動物室および水生動物室からなっており，陸生，水生動物の搬入，実験動物の飼育管理のほか各室設備，機器の維持管理等を行っている。

4．共通施設　生理学研究所および基礎生物学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．統合生理研究施設

(1) 生体磁気計測室

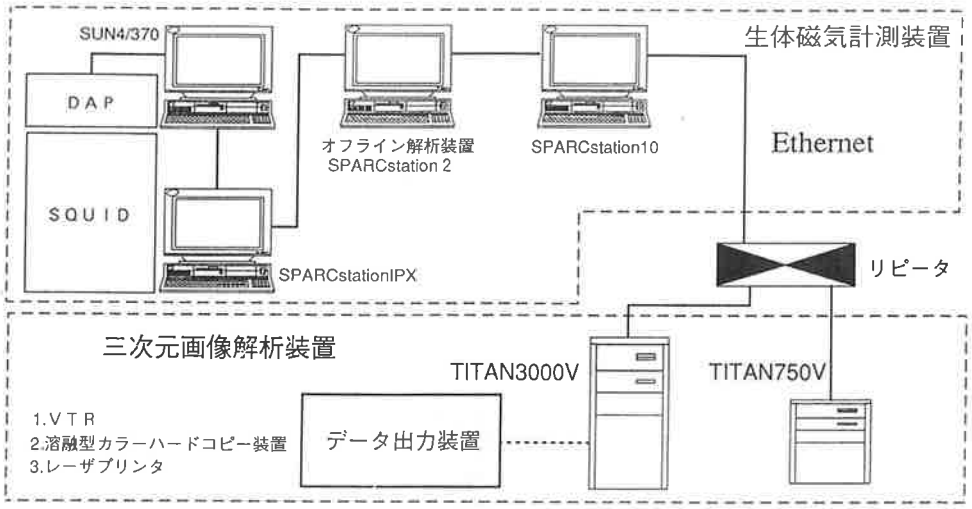
永田　治，竹島康行

本年度は主に利用されている3プロジェクトにおける実験形態の多様化に伴い，最大のネックとなるデータ解析効率の向上を検討した。実際には，従来サーバーとして使用されていたSUN4/370の処理能力の限界及びデータ収集から解析までを統括しているシステムのデータベースがネットワークをサポートしていないことによるスループットの低下を改善するため，サーバーとして新規にSPARC station 10を導入し処理効率の引き上げをおこなった。

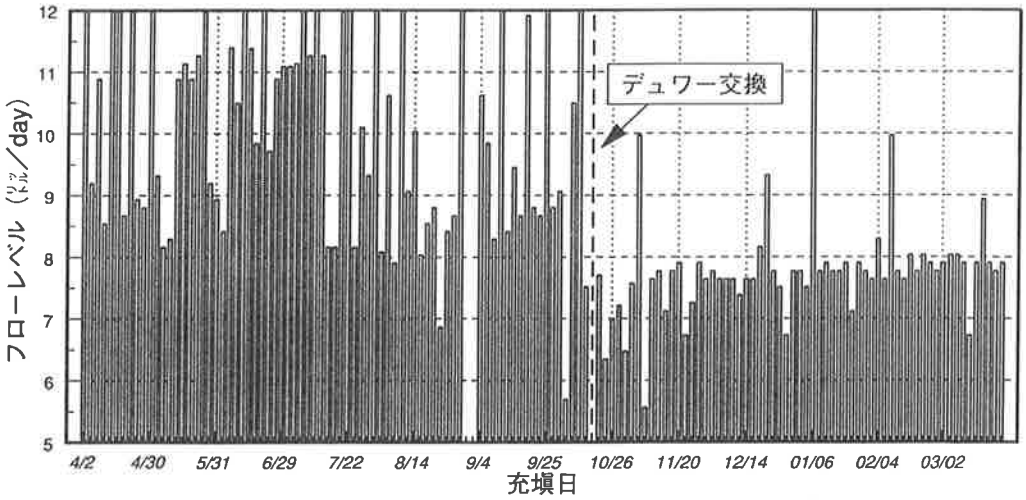
さらにソフトウェアの面ではEEGにおける解析処理環境の整備がおこなわれ，MEGに準ずる解析機能が追加された。

今後の検討課題としは，今後需要の増加が見込まれる画像処理における高品位出力装置及び各種入出力環境の整備を考えている。

また，前年度から調査中であったSQUIDデュワー本体からのLHeフローレベルの変動については，電気回路系および周辺配管類を点検した結果異常は発見されたかったため，デュワー本体の交換作業を実施した。その結果下図に示すように正常値に復帰しており，現在はコンスタントに推移しているためLHe充填におけるコストパフォーマンスも極めて良好である。



システム構成概略図



ＬＨｅフローレベル記録（平成４年４月～平成５年３月）

２．生理機能研究施設

(1) 生体機能検査室

永田理恵子

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，生化学測定室を備えている。今年度は音響実験室に落射蛍光実体顕微鏡システムを，人工気候室に無麻酔状態で長期間にわたり実験動物の血圧を測定することができる慢性実験テレメトリー自動計測システムを導入した。また，生化学測定室では全自動ペプチド合成装置の導入に伴う実験室の整備を行った。

(2) 組織培養標本室

永田理恵子

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ーなどの機器が完備されており，各種顕微鏡システム及びタイムラプセビデオ装置一式が整備されている。今年度はクリオスタット装置を設置し，凍結切片製作に供した。

(3) 超高圧電子顕微鏡室

吉村伸明

今年度における共同利用実験は合計17課題が採択され，実施された。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。稼働率は，利用日数と使用可能日数より求めている。

1992年度　超高圧電顕月別稼働率

年　月	総日数	休　日	調整日	使用可能日数	所内利用	所外利用	計	稼働率	備　考
1992年 4月	30	9	7	14	15	1	16	114%	改造 4 日
1992年 5月	31	12	3	16	7	3	10	63%	
1992年 6月	30	8	6	16	4	8	12	75%	修理 1 日
1992年 7月	31	8	6	17	7	1	8	47%	
1992年 8月	31	10	5	16	16	0	16	100%	
1992年 9月	30	10	4	16	6	4	10	63%	
1992年10月	31	9	4	18	9	5	14	78%	
1992年11月	30	11	8	11	6	5	11	100%	改造 5 日
1992年12月	31	12	6	13	12	5	17	131%	修理 2 日
1993年 1月	31	12	5	14	5	8	13	93%	
1993年 2月	28	9	4	15	5	13	18	120%	
1993年 3月	31	9	5	17	5	19	24	141%	
計	365	119	63	183	97	72	169	92%	

フィラメント点灯時間　　736.6時間
使用フィルム枚数　　7,566枚

(4)　電子計算機室

伊藤昭光，水谷文保

今年度は，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前年度と同様に作業を進めた。また，今までの懸案であった基礎生物学研究所で行っている BITNET に代わる所外ネットワークへの接続，インターネットが実現できた。

中央コンピュータシステム (HP9000/835SRX) においては，前年度に購入した高画質フルカラーデジタルプリンタと光磁気ディスク・オートチェンジャの整備を行った。フルカラーデジタルプリンタにおいて，プリンタ導入時に購入したドライバソフトでは，RGB の決められた書式の画像ファイルをプリンタへ出力する機能しか持っておらず，画像処理の多くはユーザ側が処理し画像ファイルを準備しなくてはならない。そのため，中央側で簡単なレイアウト等が出来るプ

ログラムを準備する必要があった。この簡易編集を行うプログラムの作製にあたっては，生理学研究所技術課が行っているプロジェクトの一つとして，開発を行った。また，このプリンターの主な利用形態としては，PC や MAC 等のパソコンで処理または作成された画像データを出力する利用が多く，所内 LAN を利用して画像データが中央に転送される。現在の中央システムでは，多量な画像を処理する能力がないため，所内 LAN に及ぼす影響は少ないが，次期システムでは考慮する必要がある。光磁気ディスク・オートチェンジャにおいては，短時間でのファイル・バックアップが可能となり，システムメンテナンスの時間短縮に役立っている。

今年度の環境整備のために購入した備品として，ブルータ，リピータ，無停電電源などがある。ブルータの設置は，生理研 LAN と所外 LAN との無用な情報の出入りを遮断でき，トラフィックの軽減と LAN 管理に役立っている。また，今回のリピータの購入により，研究棟の各階にリピータの設置が終わり，研究室の形態に合わせた端末の設置が行えるようになった。無停電電源は，中央のいくつかの機器に設置し，瞬時停電等によりシステムダウンしないよう配慮した。また，メールシステムにおいては，システムの自動停止，自動立上げのユニットも増設し，24時間の無人運転が可能となった。最近の生理学研究所におけるコンピュータの導入には，IBM-PC 互換機，MAC 等の台数が多く，LAN への接続希望も多くなってきている。当施設においてもこれらの LAN 接続の要求に，迅速に対応できるよう IBM-PC 互換機，MAC を LAN 環境のテスト用として 1 台ずつ導入した。

1992年 6 月より生理学研究所もインターネットワークに参加することができ，研究所のコンピュータから電子メールや電子ニュースのサービスを直接利用できるようになった。インターネットの主な利用としては，国内・国外への電子メールであるが，インターネットに参加している機関であれば，コンピュータへの直接アクセスも可能であるため，様々な形態での利用の可能性が開けたといえる。しかしながら，研究所内での電子メールの利用者はまだまだ少なく，全ての研究室が LAN を利用できる環境にはまだなっていない。当施設では，生理学研究所技術課のプロジェクトで開発したネットワーク用の各種ネットワーク・ユーティリティの普及に努め，研究所内の LAN 環境整備も平行して進めている。

(5) 磁気共鳴装置室

市川　修

平成 4 年度における磁気共鳴装置室共同利用実験は，13研究テーマが採択され実施された。

MRI では，昨年度 MRS 装置が EX90A （日本電子（株）製）に更新されたため，この運転に必要な基本操作の習得を行った。利用者には簡便に測定が行えるよう，簡易測定プログラムを導入した。また，実験データをイーサネットにより外部のコンピュータへ転送できる環境を実現し便宜を計った。

装置稼働状況

平成4年度　磁気共鳴装置月別稼働率

年　月	総日数	保　守	使用可能日　数	所内利用	所外利用	計	稼働率	備　考
1992年　4	30	3	27	9	12	21	78	調整3
5	31	6	25	4	7	11	44	修理2
6	30	2	28	0	20	20	71	修理2
7	31	3	28	0	18	18	64	調整2
8	31	0	31	2	21	23	74	
9	30	1	29	0	21	21	72	停電1
10	31	4	27	2	22	24	89	停電1
11	30	0	30	7	19	26	87	
12	31	4	27	4	16	20	74	調整1
1993年　1	31	7	24	6	6	12	50	調整7
2	28	5	23	5	13	18	78	修理3
3	31	1	30	10	22	22	73	停電1
計	365	36	329	49	187	236	72	

＊保守以外の日祝祭日は，使用可能日数に含めた。

3．動物実験施設

佐治俊幸，小木曽昇

施設利用

【陸生動物室】

本年度，陸生動物室の飼育室利用は，生理研18部門，基生研10部門の合計28研究部門，利用件数は，生理研，基生研ともに一部の研究部門でスタッフの移動で増減が見られたが，昨年度と同様，月平均56件（延べ670件）と殆ど変動はなかった。搬入動物数は，11種，延べ8,461匹と昨年度の２倍に増加したが，その内訳は細胞接着の分子構築解析のための材料採取を目的としたヒヨコの搬入数が過半数を占めた。また，脳や神経節の機能に関する実験，各種臓器のイオン輸送やエネルギー代謝に関する実験等，マウス，ラット，ハムスターを使用した急性実験が多く，搬入数は昨年度より増加傾向を示したが，これらは大部分が短期飼育であるため，のべ飼育数はほぼ例年通りであった。その他，飼育室の利用形態は，マウス・ウサギを用いた抗体作成を目的とした飼育の長期化が見られた。今年度から遺伝子操作を行ったトランスジェニックマウスが導入され，SPF 飼育室を用いて現在飼育中である。

搬入動物に関するトラブルは，モルモット・ネコ・サルで輸送や飼育環境のストレスと思われる食欲不振や下痢の症状を示すものがみられ，ネコでは搬入後数日で死亡する例が１例あった。モルモットについては，糞便内に寄生虫卵が発見されたため，実験への影響を考慮し，クリーンおよびSPF 動物に変更した。ウサギでは，バリアーシステムで育成された動物を導入して以来，感染症・寄生虫症による飼育中の死亡例は見られなくなった。しかし，長期飼育における動物の成長から蹠の外傷が数例認められたため床敷の改良を行い，これまでのところ順調である。

長期飼育動物については抗体作成中のウサギで老齢または感染症のために死亡する例が増加傾向を示すとともに，屋上イヌ運動ケージ飼育において原因不明の死亡が２例続いた。サルでは，飼育ケージの破損が頻繁した。

検疫は，イヌ１件，ネコ２件，サル17件について行った。発注時期と動物生産場の都合で搬入された動物の中には，体重のばらつき，外傷，手足の指欠損など様々な例があり，今後の動物搬入に関する検討課題である。ネコについては急性実験に使用するため，臨床状態の観察のみ行ったが，いずれも実験不適な動物はいなかった。

実験室の利用状況は，昨年度と同様であるが，手術室，レントゲン室などは複数の部門で長期利用されている。特に，手術室ではラットの急性実験，ウサギの抗体作成，イヌの慢性実験等に利用され，実験日が重なることもしばしばあり，手術台を追加導入し，また手術実験室の無影燈設置など準備をすすめているところである。

設備・機器関係のトラブルとして，クーリングタワーの凍結による空調用チラーの停止，蒸気ボイラーの圧力異常による停止，焼却炉のガス漏れ，膨張タンクの水位センサー不良などが発生

した。飼育設備については腐食による減圧弁のつまり，電磁弁動作不良など老朽化による故障が散発した。

【水生動物室】

平成４年度の水生動物室の利用状況は，生理研・基生研両研究所あわせて７部門のべ243件の利用があった。54基の水槽は，年間を通して利用率100％常時20種を越す水生動物の飼育を行っている。淡水産に比べて海産動物の割合が減少する傾向は，昨年と同様であるが，主に伊根実験室を利用してきた部門が水生動物室も利用したために７ｔ円形水槽の利用頻度は上昇した。

主な機器のトラブルは，淡水飼育水の塩素除去用活性炭濾過塔の経年劣化による動作不良。加熱冷却ユニットのガス抜けやコンプレッサー過熱等計５件があり，それぞれ修理を行った。なお加熱冷却ユニットは，現在冷媒にフロンを使用しており，オゾン層破壊の問題から近い将来に代替フロン使用の加熱冷却ユニットへの置き換えを考慮する必要がある。また，以前より報告されている，水槽架台の腐食は一段と進行しており応急的な対応として，腐食の原因の１つである結露を減少させるように梅雨から夏期にかけて水槽室内の換気を行った。換気により結露は減少したが，電力消費量の増大も無視できないため，次年度では，換気量の適正化を考慮したい。しかし，既に進行している腐食に対しては，架台の交換しか方法がないため何らかの予算措置の必要がある。

懸案となっていた水槽室の照明設備については，蛍光灯を増設し，順次点灯による自動点灯方式を採用した。このため，夜間の入室時や非常時には，懐中電灯を使用することとした。なお，この照明設備は，常用電源回路に接続されているので，将来は非常用電力回路への接続替えを考慮すべきと考える。

【伊根実験室】

平成４年度の利用は，ヤリイカを用いた神経生理学実験を中心として，延べ83日，30名の利用があった。本年度末には，第１水槽室に設置されていた１ｔ角水槽を改修し新たに２基の水槽と濾過槽を設置した。また，実験者の増加に対応して第２水槽室の改修も計画されている。

手術・実験室　月別利用件数（平成４年度）

月 / 室名	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
手術室＊	10	10	13	8	11	15	20	13	10	14	8	9	141
生理実験室＊	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	36
生化学実験室＊	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
飼育実験室＊	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
解剖室	5	3	2	4	2	2	3	1	0	1	0	3	26
レントゲン室＊	1	4	3	2	3	1	3	2	3	3	1	0	26
計	21	22	23	19	21	23	31	21	18	23	14	17	253

＊は長期使用

陸生動物　部門別・動物種別　搬入動物数（平成４年度）

動物種 / 部門	ラット	マウス	トランスジェニックマウス	ハムスター	ウサギ	モルモット	イヌ	ネコ	サル	ニワトリ	カエル	ウズラ	ハト
神経化学	849				8	19							
超微小形態生理	384												
細胞内代謝	243	16				58					5		
生体膜	14	1				48							
機能協関	36	11			11	8							
神経情報	4	167	60		8								35
液性情報	44	420		142	1					4,530			
情報記憶	132												
高次神経性調節								2	9				
高次液性調節	13								6				
生体システム		12											
生体機能		14			6	10	1						
組織培養標本室	36	47			8								
統合生理									2				
動物実験施設						169							
江橋研					2								
生理研技術課		10											
生理研所長	3												
細胞機構		7			16								
細胞分化	10	80			6								
細胞融合		16	43										
生殖		147			3								
形態形成		102			12					3		163	
情報制御					3								
感覚情報	10	11											
計時機構		6											
細胞器官培養室		54			4								
大型スペクトル		110											

水生動物室　部門別・動物種別　搬入動物数（平成４年度）

	メダカ	キンギョ	ウナギ	ザリガニ	ウミウシ	コイ	ハギ	ウグイ	フナ	ヤツメウナギ	ナマズ	イモリ	ウシガエル	アホロートル	イカ	ホタテ	サザエ	タコ
生殖	7,000	2,200	40	40	40	2												
神経情報						70	32	10	2	6	2							
生体膜															166	77	20	12
形態形成														29				
細胞内代謝													5					
機能協関												2						
動物実験施設				400		20												

陸生動物　月別・動物種別搬入動物数（平成４年度）

動物種＼月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
ラット	68	129	85	234	140	144	273	140	163	221	131	50	1,778
トランスジェニックマウス						43				60			103
マウス	118	45	123	258	55	67	252	40	53	227	85	6	1,329
ハムスター			5	2				15	102	18			142
ウサギ	4	8	3	11	25		9	3	8	8	12	8	99
モルモット	25	22	50	28	16	20	40	25	29	29	25	23	332
サル	1	3	3		2		1	2		4		1	17
イヌ				1									1
ネコ				2									2
ニワトリ	3		1,530	3,000									4,533
ハト			35										35
ウズラ	67					17				79			163
合計	286	207	1,834	3,536	238	291	575	225	355	646	253	88	8,534

水生動物　月別・動物種別搬入動物数（平成４年度）

動物種＼月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
ワキン	900			1,000	500			400				300	3,100
ウナギ	10	36											46
ヤリイカ												65	65
コイ	70											20	90
フナ		5											5
メダカ				3,000	1,000			1,000				500	5,500
ナマズ		2											2
アメリカザリガニ				40			300						340
ホタテガイ	10	10			20	17	20	10				20	107
カエル						5							5
ウミウシ		2			30								32
ウマズラハギ				32									32
ウグイ		5											5
タコ											8		8
アホロートル						29							29
ティラピア					40								40
合計	990	60	0	4,072	1,590	51	320	1,410	0	0	8	905	9,406

4．共通施設

(1) 電子顕微鏡室

前橋　寛，大庭明生

(a) 電顕室の状況

本年度は汎用型透過電子顕微鏡の利用が増加し，一部の装置に集中したので，分析型120kV透過電子顕微鏡（日本電子，JEM-1200EX）のレンズ変更を行い，汎用型として利用できるようにした。

写真作画分野では，昨年度設置された作図用パーソナルコンピュータの周辺装置としてフィルムレコーダ（レーザーグラフィックス社，LFR）と35㎜フィルムスキャナー（ニコン，LS-3510AF）を新たに設置し，版下作製しないでコンピュータグラフィックスを利用したスライド作製ができるようにした。さらに，この作図用コンピュータをネットワークに接続することにより，レーザー顕微鏡の画像データや各研究室からの画像データを転送して作図できるようにした。

また，昨年度設置されたネガのムラを補正できる電子制御露光引伸機やスライドを4枚まで合成できるスライド複写装置の講習会を催し利用の促進を図った。

(b) 研究内容一覧表

本年度，室を利用してなされた研究の総件数は29件であった。機構内では20件あり，機構外は，国内で6件，国外ではフィンランド，フランス，イギリスの研究者による利用が3件あった。

利用内容一覧表(1)

三研究所

研究所	部門・施設	研究内容
生理研	神経情報	・網膜神経細胞の形態学的解析
	細胞内代謝	・腸管上皮細胞，ハダー腺の形態観察 ・パラニューロンの形態学的観察
	液生情報	・温度感受性培養細胞の形態学的変化の観察
	神経化学	・刺激応答した血小板，PC12 細胞の微細構造の観察 ・ラット脳の観察
	組織培養標本室	・血管内皮細胞の微細構造観察
	高次神経機構	・培養神経細胞の走査像観察
	生体システム	・哺乳類中枢神経系における可塑性シナプス形成に関する形態学的研究
	技術課	・血管樹脂鋳型の走査像観察 ・超薄切片表面の走査像観察
基生研	形態形成	・ニワトリ胚細胞の胚内及び細胞培養下における超微形態観察 ・モンシロチョウ翅の形成過程の観察
	生殖	・生殖細胞の形態観察 ・酵素の観察
	細胞内エネルギー変換	・ラン藻・微細藻の微細構造観察
	細胞機構	・カボチャ種子子葉組織の登熟及び発芽期におけるオルガネラの変動の解析
	細胞分化	・カイコ胚子における突然変異組織の走査像形態観察
分子研	機器センター	・超微粒子の粒径分布測定及び結晶構造の同定
	分子集団動力学	・有機薄膜の構造観察

利用内容一覧表(2)

所外（国内）

大学・研究所	研究代表者名	研究内容
鶴見大学	尾口仁志	骨とインプラント体境界面の観察
旭川医科大学	大森行雄	副腎髄質細胞他パラニューロンの形態観察
名城大学	新居直祐	葉緑体の観察
京都大学原子エネルギー研究所	東野達	金属超微粒子の観察および電子線回折
名古屋市立大学	山本嘉通	血管内皮細胞の走査像観察
東海大学	大城香	微細藻類の構造解析，細胞学的研究

所外（国外）

国名，大学，研究所	研究者名	研究内容
フィンランド トルク大学	T. Nevalainen	膵腺房細胞等の分泌細胞の超微形態観察
フランス ピエール・マリーキュリー大学	S. Tuji	大腸の神経支配に関する研究
イギリス インペリアルカレッジ	J. Downing	網膜の神経節細胞の構造解析

(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，サル用・犬用などの各種動物実験用器具，上皮膜イオン電流計測用，脳切片用などの各種チェンバー，十二指腸用・胃用などの各種カニューラ，倒立顕微鏡用保温装置，生物発光自動測定装置などがある。設備としては，大型高速切断機（三栄鉄工所　SKM16）とショットブラスト(HOZAN SG-106)の２台の機器を新たに導入した。高速切断機は，従来のタイプに比べ，大型で切断能力，精度に優れステンレスなど難加工材料の切断が可能である。一方ショットブラストは，圧縮エアーを利用して研磨材を加工物に吹き付けることにより，ガラスのエッチング加工，金属部品のショット加工（なし地状），サビ取り，バリ

取りなどの加工が可能である。また付属機器として，金工室の旋盤２台と一般工作室のフライス盤１台の計３台の工作機器に，加工物固定用テーブルあるいは刃物固定用テーブルの移動距離が，デジタル表示で確認できるデジタル位置表示装置（SONY　マグネスケール）を取り付けた。

機器研究試作室委員会は，本年度は１回開催され，以下のようなことが話し合われた。また委員長は，本年度より彦坂教授が担当されることになった。

６月24日（水）

○委員長及び副委員長の選出

○平成３年度の機器の利用状況報告

○平成３年度の予算執行

○予算振替の方法について

○平成４年度の運営計画，及び購入希望機器について

○技官の補充について

○一般工作室時間外利用について（安全対策など）

なお，機器研究試作室の平成４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４年度）

月	フライス盤	ボール盤	横切盤	帯鋸盤	旋盤	切断機	ベルトグラインダー	NCフライス	その他	合計
4	24	25	23	10	12	5	6	7	24	136
5	16	13	15	8	11	3	2		17	85
6	30	22	22	10	7	9	5	2	17	124
7	33	26	19	16	15	5	8	5	20	147
8	12	14	8	14	5	8	2	4	14	81
9	25	15	5	11	9	10			14	89
10	20	11	8	6	6	4		4	13	72
11	14	12	8	6	3	5	2	1	10	61
12	10	13	13	11	6	4	4	1	16	78
1	10	7	7	3	1	5			6	39
2	12	20	8	11	10	8	3		14	86
3	4	12	10	1	5	11			8	51
合計	210	190	146	107	90	77	32	24	173	1049

機器研究試作室利用人数表　　（平成 4 年度）

月	生理研（人）	基生研（人）	その他（人）	合　　計	延べ時間（h）
4	71	7		78	170
5	40	5	2	47	86
6	55	9		64	107
7	67	8		75	177
8	38	4	1	43	57
9	42	3		45	85
10	45	4		49	109
11	27	10		37	64
12	35	8		43	86
1	24	3		27	26
2	36	10		46	71
3	27	7	1	35	32
合計	507	78	4	589	1076

機器研究試作室部門別利用状況　　（平成 4 年度）

超微小形態生理	84	高次神経性調節	74	統合生理研究施設	56
生体膜	54	動物実験施設	51	高次液性調節	30
生体システム	27	高次神経機構	23	技術課	21
機能協関	20	磁気共鳴装置室	19	超高圧電顕室	15
神経化学	11	神経情報	7	情報記憶	6
細胞内代謝	4	電子顕微鏡室	4	生体機能検査室	1
大型スペクトロ	29	エネルギー変換	16	RI 実験施設	8
計時機構	5	情報制御	5	分析室	4
洗浄室	3	形態形成	2	人工気象室	2
電子計算機室	1	培養育成研究機器室	1	細胞情報	1
生殖	1				
分子研その他	4				

(3) 低温・冷凍実験室

小川良齋

低温環境を必要とする実験および各種臓器の摘出，タンパク質やペプチド等生理活性物質の抽出，分離，精製等一連の操作に使用するほか，変質しやすい実験材料，試料，試薬等の長期保存等に多く使用されている。

【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 …… 118
超微小形態生理研究部門 …… 120
細胞内代謝研究部門 …… 124
生体膜研究部門 …… 125
機能協関研究部門 …… 127
神経情報研究部門 …… 128
液性情報研究部門 …… 130
情報記憶研究部門 …… 131
高次神経性調節研究部門 …… 131
生体システム研究部門 …… 133
高次液性調節研究部門 …… 133
統合生理研究施設 …… 135
生体機能検査室 …… 139
組織培養標本室 …… 141
磁気共鳴装置室 …… 142
超高圧電子顕微鏡室 …… 143
動物実験施設 …… 143
江橋研究室 …… 143

発　表　論　文

《神経化学研究部門》

1. Shirao, T., Kojima, N. & Obata, K. (1992) Cloning of drebrin A and induction neurite-like processes in drebrin-transfeceted cells. NeuroReport 3 : 109-112

2. Miyazawa, T., Nishiye, H., Sato, K., Kobayashi, R., Hattori, S., Shirai, T. & Obata, K. (1992) Cortical synaptogenesis in congenitally hydrocephalic HTX-rats using monoclonal anti-synaptic vesicle protein antibody. Brain Develop. 14 : 75-79

3. Wakabayashi, K., Takahashi, H., Obata, K. & Ikuta, F. (1992) Immunocytochemical localization of synaptic vesicle-specific protein in Lewy body-containing neurons in Parkinson's disease. Neurosci. Lett. 138 : 237-240

4. Inoue, A., Obata, K. & Akagawa, K. (1992) Cloning and sequence analysis of cDNA for a neuronal cell membrane antigen, HPC-1. J. Biol. Chem. 267 : 10613-10619

5. Sekino, Y., Hashimoto, T. & Obata, K. (1992) Stimulus transcription coupling can be studied by in situ hybridization of brain slice preparation-selective c-fos expression in hippocampul CA3 pyramidal cells. Proc. Japan Acad. 68SerB : 191-195

6. Akagawa, K., Aoki, N., Saji, M. & Kanno, T. (1992) Muscimol suppresses the increase in 2dg uptake in the substantia after destruciton of the caudate nucleus. Jpn. J. Physiol. 42 : S213

7. Hashitani, T., Kojima, N., Obata, K. & Nishino, H. (1992) Gene expression in the dopamine-depleted striatum in the rats. Jpn. J. Physiol. 42 : S224

8. Yamaguchi, K., Furuya, K. & Akagawa, K. (1992) Neurite-outgrowth and calcium channel. Neurosci. Res. Suppl. 17 : S49

9. Yamagata, Y., Obata, K., Greengard, P. & Czernick, A. J. (1992) Septal kindling increases the in situ phosphorylation state of synapcin I. Neurosci. Res. Suppl. 17 : S145

10. Suzuki, E., Kojima, N. & Akagawa, K. (1992) Molecular cloning of a nuclear protein E5E

localized in a subpopulation of the neurons. Neurosci. Res. Suppl. 17 : S147

11. Hashimoto, T., Yoshikawa, T. & Obata, K. (1992) NGFI-A mRNA induction after methamphetamine treatment in rat brain. Neurosci. Res. Suppl. 17 : S148

12. Stork, O., Hashimoto, T. & Obata, K. (1992) Transcriptional activation of tyrosine hydroxylase in the rat substantia nigra pars reticulata during picrotoxin induced generalized motor seizure. Neurosci. Res. Suppl. 17 : S149

13. Akagawa, K., Yamaguchi, K. & Nakayama, T. (1992) Studies on the function of the neuronal membrane protein, HPC-1. Neurosci. Res. Suppl. 17. S198

14. 白尾智明，小幡邦彦 (1992) 神経発生における神経細胞骨格関連タンパク質の役割。日薬理誌 100 : 465-473

15. 若林孝一，柿田明美，高橋　均，小幡邦彦，生田房弘 (1992) シナプス小胞特異蛋白抗体を用いた Creutzfeldt-Jakob 病脳の免疫組織化学的研究。神経研究の進歩 36 : 503-510

16. 宮澤隆仁，佐藤　潔，西江　弘，服部　進，白井俊一，小林　了，小幡邦彦 (1992) パラフィン切片によるシナプス前終末の蛍光免疫組織化学的定量法。BRAIN and NERVE 44 : 841-848

17. 小幡邦彦 (1992) DNA 結合因子型がん遺伝子と神経系の分化。細胞工学 11 : 337-342

18. 小幡邦彦 (1992) ニューロン活動による遺伝子発現。Cell Science 8 : 461-469

19. 児島伸彦，小幡邦彦 (1992) キンドリングラット海馬における遺伝子発現の長期変化。神経化学 31 : 280-281

20. 小幡邦彦 (1992) 神経系の形態形成。松本　元，大津展之編　神経細胞の細胞生物学的特性 (脳とコンピュータ 4)。東京：培風館 pp. 149-195

21. Obaka, K., Hashimoto, T. & Sekino, Y. (1992) Neural activity and gene expression in the hippocampus. All Living Thinges on the Earth Seek Harmony. BioJapan '92 13-18

22. 小幡邦彦 (1993) Neuro 2a。瀬野悍二，小山秀機，黒木登志夫編　動物培養細胞マニュアル。東京：共立出版 pp. 309-310

23. 橋本隆紀，小幡邦彦（訳）(1992) 脳と心。G. D. フィッシュバック（著）日経サイエンス11月号 12-24

《超微小形態生理研究部門》

1. Cook D I, Wegman E A, Ishikawa T, Poronnik P, Allen D G & Young J A (1992) Tetraethylammonium blocks muscarinically evoked secretion in the sheep parotid gland by a mechanism additional to its blockade of BK channels. Pflueger Arch. 420 : 167-171

2. Wegman E A, Ishikawa T, Young J A & Cook D I (1992) Cation channels in basolateral membrane of sheep parotid secretory cells. Am J Physiol 263 : G786-G794

3. Ishikawa T, Wegman E A & Cook D I (1992) An Inwardly rectifying potassium channel in the basolateral membrane of sheep parotid secretory cell. J Member Biol 131 : 193-202

4. Ishikawa T & Kanno T (1992) Dissociation of CCK-8-induced fluid secretion from protein secretion by ion transport blockers in rat pancreas. International J Pancreatology 11 (2) : 75-85

5. Ishikawa T & Cook D I (1993) Effect of K^+ channel blockers on inwardly and outwardly rectifying whole-cell K^+ currents in sheep parotid secretory cells. J Membr Biol 133 : 29-41

6. Ammer U, Natochin Y & Ullich K J (1993) Tissue concentration and urynary excretion excretion pattern of sulfofluororescein by the rat kidney. J Am Soc Nephrol 3 : 1474-1487

7. Iwama T, Yamada H, Era S, Sogami M, Andou T, Sakai N, Kato K, Kuwata K & Watari H (1992) Proton nuclear magnetic resonance studies on water structure in peritumoral edematous brain tissue. Magn Reson Med 24 : 53-63

8. Iwama T, Yamada H, Andou T, Sakai N, Era S, Sogami M, Kuwata K & Watari H (1992) Proton NMR studies on ischemic rat brain tissue. Magn Reson Med 25 : 78-84

9．村上政隆，瀬尾芳輝，Steward, M. C. (1992) 多核種 NMR 法による水電解質輸送機構の検討。病態生理 11 (2) : 101-110 ＊＊＊

10. Nakahari T, Yoshida H, Imai Y, Murakami M & Seo Y (1992) Osmotically inactive space during hyperosmotic stress in the perfused submandibular gland of the rat. Jpn J Physiol 42 : 977-985

11. 瀬尾芳輝，村上政隆，大河原浩，Lee, J. H. (1992) パルス磁場勾配法による細胞内 Na の自己拡散係数の測定。日磁医誌 12 (S-1) : pp 325 ＊＊＊

12. 桑田一夫，恵良聖一，曽我美勝，加藤一夫，岩間　亨，今井　一，中上　寧，亘　　弘，恵良田知樹，田崎　明 (1992) ウシ血漿アルブミン・ゲル (BPA*-gel) 内における分子間交差緩和現象の研究。日磁医誌 12 (S-1) : pp 199 ＊＊＊

13. Seo Y & Murakami M (1992) Na-23 NMR relaxation characteristics of intra- and extracellular Na. Jpn J Physiol 42 : S105 ＊＊＊

14. Murakami M, Lundberg P, Seo Y & Yong J A (1992) Energy metabolism of isolated salivary gland cells : a P-31 NMR study. Jpn J Physiol 42 : S105 ＊＊＊

15. Terakawa S & Murakami M (1992) Exocytosis and water secretion in the tupai sublingual gland. Jpn J Physiol 42 : S105 ＊＊＊

16. Watari H (1992) Analysis on optical spectra of biomolecular systems using both time- and frequency domain. Jpn J Physiol 42 : S46 ＊＊＊

17. Era S, Kuwata K, Sogami M, Amano H, Imai H & Watari H (1992) Comparative ^{1}H-NMR studies on water structrue in soft contact lenses and the mouse lens. Jpn J Physiol 42 : S33 ＊＊＊

18. Sogami M, Era S, Kuwata K, Kato K, Nakagami Y, Imai H & Watari H (1992) ^{1}H-NMR studies on intermolecular cross-relaxation phenomena in bovine plasma albumin gels (BPA *-gel) and solution. Jpn J Physiol 42 : S88 ＊＊＊

19. Era S, Kuwata K, Sogami M, Nakagami Y, Imai H & Watari H (1992) ^{1}H-NMR and circular

dichroic studie on molten-globule state of bovine mercaptalbumin Jpn J Physiol 42 : S88 * * *

20. Lee J H, Seo Y, Labadie C & Springer C S Jr (1992) SR-free discrimination of compartmental ^{23}Na resonances by relaxographic analysis : Elythrocyte suspension. In : Works in Progress : Society on Magnetic Resonance in Medicine 11th Annual Scientific Meeting, pp 2222 * * *

21. Seo Y, Lee J H & Murakami M (1992) The ^{23}Na relaxation mechanism of the Na ion in agar gel analyzed by ^{23}Na double-quantum filter NMR and ^{23}Na pulsed field gradient NMR. In : Book of Abstracts : Society of Magnatic Resonance in Medicine 11th Annual Scientific Meeting, pp 2217 * * *

22. Iwama T, Era S, Kuwata K, Sogami M, Sato S, Kato K, Matsunaga T & Watari, H. (1992) ^{1}H-NMR studies on water structure in normal and biochemically induced osteoarthritic rabbit knee cartilages. Book of Abstracts : Soc Magn Reson Med, 11th Annual Meeting, pp 1337 * * *

23. Steward M C, Larcombe-McDouall J B, Nakahari T & Case R M (1992) Salt-water coupling in salivary secretion. In : Salivary Secretion : Control and Mechanisms (edited by M. Murakami, Y. Seo & T. Ishikawa), Kenbun Printing, pp 77-80 * * *

24. Nakahari T, Nakamura A & Steward M C (1992) Paracellular fluid transportin salivary secretion? In : Salivary Secretion : Control and Mechanisms (edited by M. Murakami, Y. Seo & T. Ishikawa), Kenbun Printing, pp 81-84 * * *

25. Seo Y & Murakami M (1992) Dynamic behavior of intracellular electrolytes in the salivary gland. In : Salivary Secretion : Control and Mechanisms (edited by M. Murakami, Y. Seo & T. Ishikawa), Kenbun Printing, pp 53-56 * * *

26. Murakami M & Seo Y (1992) Cation handling by mandibular salivary gland as measured by NMR. In : Salivary Secretion : Control and Mechanisms (edited by M. Murakami, Y. Seo & T. Ishikawa), Kenbun Printing, pp 69-72 * * *

27. Ishikawa T & Cook D I (1992) K^{+} and Cl^{-} currents in sheep parotid secretory cells. In : Salivary Secretion : Control and Mechanisms (edited by M. Murakami, Y. Seo & T. Ishikawa),

Kenbun Printing, pp 61-64 ＊＊＊

28. 村上政隆，石川　透，瀬尾芳輝 (1992) アンモニウムーパルス実験中のK^+輸送。生物物理 32 Suppl, S186 ＊＊＊

29. Ishikawa T & Cook D I (1992) An inwardly rectifying potassium channel in the basolateral membrane of sheep parotid secretory cells. 生物物理 32 Suppl, S186 ＊＊＊

30. Seo Y, Roony R D & Murakami M (1992) An analysis of ^{23}Na relaxation of the intracellular Na in the perfused rat salivary gland using double-quantum filter NMR. 生物物理 32 Suppl, S186 ＊＊＊

31. 桑田一夫，恵良聖一，曽我美勝，亘　弘 (1992) CD 及び 500MHz 1H-NMR によるウシ血漿アルブミン・ドデシル硫酸ナトリウム複合体 (ADm) の構造研究。生物物理 32 Suppl, S46 ＊＊＊

32. 曽我美勝，恵良聖一，桑田一夫，加藤一夫，恵良田知樹，田崎　明，中上　寧，松本元一，高崎昭彦，亘　弘 (1992) ウシ血漿アルブミン (BPA) の溶液→ゲル (BPA*-gel) 変換における水構造変化の研究。生物物理 32 Suppl, S109 ＊＊＊

33. 曽我美勝，恵良聖一，桑田一夫，恵良田知樹，田崎　明，松本元一，中上　寧，高崎昭彦，亘　弘 (1992) ウシ血漿アルブミンの溶液→ゲル変換における水構造変化の研究。藤田医学誌 16 Suppl, 217

34. 恵良聖一，曽我美勝，中村浩二，桑田一夫，江尻和隆，梶原孝彦，中上　寧，高崎昭彦，亘　弘 (1992) 分子間交差緩和時間測定による合成高分子ゲル内水構造の研究。藤田医学誌 16 Suppl, 218

35. Shimoyama Y, Rink J W & Watari H (1992) Vector epr of natural quartz. 第31回 ESR 討論会講演要旨集，pp 22 ＊＊＊

36. Seo Y, Lee J H, Ishikawa T & Murakami M (1992) Relaxation process of Na ion in agar gel analysed by 23Na DQf and PFGENMR. 日磁医誌 12 (S-2) pp 441＊＊＊

37. 恵良聖一，中村浩二，桑田一夫，曽我美勝，亘　弘 (1992) 交差緩和時間測定による合成

高分子ゲル内の水構造の研究。日磁医誌 12 (S-2) pp 236＊＊＊

38. 曽我美勝，恵良聖一，桑田一夫，松本元一，恵良田知樹，田崎　明，中上　寧，高崎昭彦，亘　　弘 (1992) ウシ血漿アルブミン・ゲル (BPA*-gel) の分子間交差緩和現象の研究。日磁医誌 12 (S-2) pp 237＊＊＊

39. 瀬尾芳輝，村上政隆 (1992) 二量子フィルター NMR 法による細胞内 Na, K の動的パラメータの測定。平成 3 年度科研費重点領域（2）溶液の非平衡過程の分子論的アプローチ，研究成果報告書 PP 43-46, pp 202-205

40. 東　晃史 (1992) An Approach to Theoretical Physiology （＝アインシュタインの悩みとファインマンの悩みの解消へ向けて＝宇宙と意識）東京，技術出版

41. 東　晃史 (1992) 日本の科学（＝ポスト「不確定性」文明の曙）東京，技術出版

42. Murakami, M., Seo, Y. & Ishikawa, T. (1992) 編集 :Salivary Secretion-Control and Mechanicms, 岡崎 Kenbun Printing, 総ページ数 122

43. 曽我美勝，恵良聖一，桑田一夫，亘　　弘 (1992) ^{1}H-NMR でみた水の構造と生体内の水。In : 水の科学とおいしい水。東京，工業技術会，pp 30-40

《細胞内代謝研究部門》

1. Ohno, H., Yamashita, H., Sato, N., Habara, Y., Gasa, S., Nagasawa, J., Sato, Y., Ishikawa, M., Segawa, M. & Yamamoto, M. (1992) Interaction between heat acclimation and exogenous insulin in brown adipose tissue of rats. Int J Biometeorol 36 : 155-158

2. Yamashita, H., Sato, N., Yamamoto, M., Sato, Y., Nakanishi, K., Suzuki, M., Habara, Y. & Ohno, H. (1992) Insulin administration induces capillary growth in brown adipose tissue of heat-exposed rats. Comp Biochem Physiol 103A : 673-678

3. Habara, Y., Kanno, T., Mochizuki, T. & Yanaihara, N. (1992) Effects of synthetic VIP of guinea pig on carbachol-induced $[Ca^{2+}]_c$ dynamics and amylase output in pancreatic acini of guinea pig. Biomed Res 13 : suppl. 2 Vasoactive Intestinal Polypeptide and Related Peptides

205-211

4. Yanaihara, N., Mochizuki, T., Ohshima, K., Iguchi, K., Takatsuka, N., Sato, K., Hoshino, M., Yanaihara, C. & Kuwahara, A. (1992) Structure-function studies of galanin. Foria Endocrinol 68 : 637-657 (Reveiw) * *

《生体膜研究部門》

1. Enomoto, K., Furuya, K., Yamagishi, S. & Maeno, T. (1992) Mechanically induced electrical and intracellular calcium responses in normal and cancerous mammary cells. Cell Calcium 13 : 501-511

2. Kato, K., Tsutsui, I. & Yamagishi, S. (1992) Ca^{2+}-dependent K^{+} of guinea pig vas deferens. Jap J Pharm Suppl. II 58 : 399

3. Tsutsui, I., Kato, K. & Yamagishi, S. (1992) Essential role of extracelluar Ca^{2+} for the maintenance of the Ca^{2+} activated K^{+} channel activity in guinea pig vas deferens Proc Japan Acad 68B : 90-93

4. 山岸俊一(1992)神経や筋細胞の電気的活動の基礎と良導絡法との関連。日本良導絡自律神経学会雑誌 37 : 31-36

5. Furuya, K., Furuya, S. & Yamagishi, S. (1992) Morphological changes and effects of endothelin in cultured subepithelial fibroblasts of rat small intestinal villi. Jpn J Physiol 42 : s23

6. Enomoto, K., Furuya, K., Yamagishi, S. & Maeno, T. (1992) Signal transduction in intracellular calcium increase and effects of ATP in normal and cancerous mammary cells. Jpn J Physiol 42 : s43

7. Yamagishi, S., Tsutsui, I., Furuya, K. & Kukita, F. (1992) Changes in membrane conductance of squid giant axons by various species of internal anions. Jpn J Physiol 42 : s134

8. Kukita, F. & Mitaku, S. (1992) Alcohl binding sites in Na channel of nerve fiber. Jpn J Physiol 42 : s135

9. Yamagishi, S., Kukita, F. & Furuya, K. (1992) Regulatory effects of intracellularly applied calcium and magnesium ions on ion channel activities in the giant axon of the squid *Dorytheutis bleekeri*. J Physiol 446 : 168

10. Kato, K., Tsutsui, I. & Yamagishi, S. (1992) Properties of the Ca^{2+}-regulated K^{+} current of guinea pig vas deferens. Jpn J Physiol 42 : s262

11. Yamaguchi, K., Furuya, K. & Akagawa, K. (1992) Neurite-outgrowth and calcium channel. Neuroscience Res. s17 : s49

12. 加藤健一，筒井泉雄，山岸俊一 (1992) モルモット精管単離平滑筋細胞の自発的外向き電流。生物物理 30 : s60

13. 筒井泉雄，山岸俊一 (1992) ヤリイカ巨大神経 Cl チャネルの細胞内アニオンによる制御。生物物理 30 : s62

14. 古家喜四夫，古家園子，山岸俊一 (1992) エンドセリンによる小腸絨毛下の筋繊維芽細胞の細胞内カルシウム反応と形態変化。生物物理 32 : s66

15. 久木田文夫，Brown, E. (1992) ヤリイカ巨大軸索のシュワン細胞の性質。生物物理 32 : s174

16. 榎本浩一，古家喜四夫，前野　巍 (1992) 乳腺細胞の分化，増殖と IP_3 感受性。日本生理学雑誌 54 : 46

17. 筒井泉雄，古家喜四夫，佐藤茂基，榎本浩一 (1992) Lab Master AD/DA ボードを用いたパッチクランプ用インターフェースボックスの製作。日本生理学雑誌 54 : 199

18. 佐藤茂基，筒井泉雄 (1992) MSX パソコンを用いた Pulse generator の試作。日本生理学雑誌 54 : 199

19. 山岸俊一，筒井泉雄，古家喜四夫，久木田文夫 (1992) 多種の細胞膜の Cl チャネルの機能発現の特性の研究。平成 3 年度科学研究費補助金（総合研究A）研究成果報告書　研究代表者久場健司。イオン透過のモジュレーター 73-79

「生理学研究所 年報 第14巻」正誤表

頁	誤	正
1 (主な職員)	狭間章博	挟間章博
1 (主な職員)	細胞内代謝部門	細胞内代謝研究部門
2 (主な職員)	記載漏れ	液性情報研究部門 大学院学生　伊藤雅彦
3 (主な職員)	細胞機関研究系	細胞器官研究系
6 (研究活動報告) 目　次	記載漏れ	研究系技術班 研究施設技術班 1，総合生理研究施設 生体磁気計測室
261	図5の誤り	図5の差し替え

図5

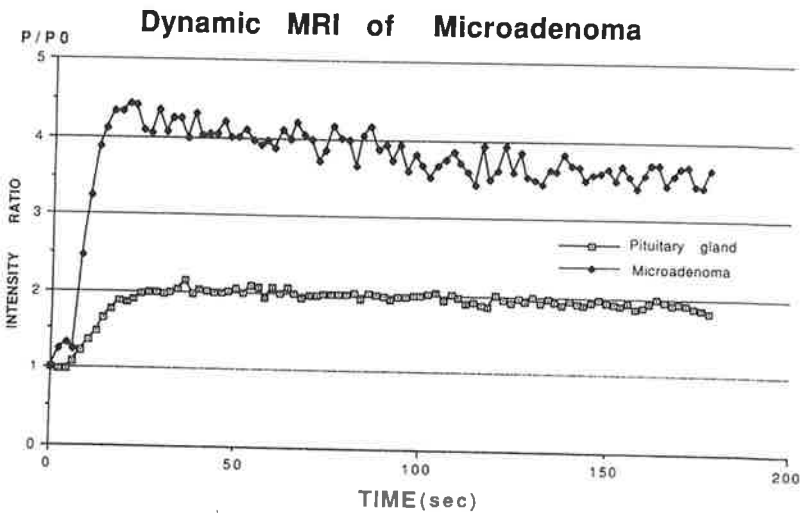


図5：下垂体腺腫(microadenoma)症例のdynamic-MRI Dy-MRIによりmicroadenomaの局在を明瞭に抽出できた。

20. Enomoto, K., Furuya, K. & Yamagishi, S. (1992) Mechanically-induced calcium wave and release of stimulants in mammary epithelial cells. In : "Salivary secretion-Control and mechanisms-", Ed : Murakami, M., Seo, Y., & Ishikawa, T., pp 437-40 NIPS (Okazaki).

《機能協関研究部門》

1. Sakai, H., Okada, Y., Morii, M. & Takeguchi, N. (1992) Arachidonic acid and prostaglandin E_2 activate small-conductance Cl^- channels in the basolateral membrane of rabbit parietal cell. J Physiol 448 : 293-306

2. Kubo, M. & Okada, Y. (1992) Volume-regulatory Cl^- channel currents in human epithelial cells. J Physiol 456 : 351-371

3. Tsuura, Y., Ishida, H., Okamoto, Y., Tsuji, K., Kurose, T., Horie, M., Imura, H., Okada, Y. & Seino, Y. (1992) Impaired glucose sensitivity of ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic B cells in streptozotocin-induced NIDDM rats. Diabetes 41 : 861-865

4. Okada, Y., Hazama, A., Hashimoto, A., Maruyama, Y. & Kubo, M. (1992) Exocytosis upon osmotic swelling in human epithelial cells. Biochim Biophys Acta 1107 : 201-205

5. Hashimoto, A., Hazama, A, Kotera, T., Ueda, S. & Okada, Y. (1992) Membrane capacitance increases induced by histamine and cyclic AMP in single gastric acid-secreting cells of guinea pig. Pflugers Arch 422 : 84-86

6. Furuya, S., Naruse, S., Nakayama, T. & Nokihara, K. (1992) Effect and distribution of intravenously injected ^{125}I-endothelin-1 in rat kidney and lung examined by electron microscopic radioautography. Anat Embryol 185 : 87-96

7. Furuya, S., Naruse, S., Nakayama, T. & Nokihara, K. (1992) Binding of ^{125}I-endothelin-1 to fat-storing cells in rat liver revealed by electron microscopic radioautography. Anat Embryol 185 : 97-100

8. 岡田泰伸(1992)小腸上皮細胞。ヒト：Intestine 407. 生体の科学（増大特集　研究室で役に立つ細胞株）43 : 378

9. Furuya, S., Naruse, S., Nakayama, T., Furuse, K. & Nokihara, K. (1992) Localization of intravenously injected ^{125}I-endothelin-1 in rat tissues observed by electron microscopic radioautography. 文部省国際シンポジュウム，京都

10. 赤川公朗，山口和彦，中山　孝，井上明宏 (1992) 神経細胞形質膜蛋白質 HPC-1 の機能解析。神経化学 31 (1) : 150-151

11. 中山　孝 (1992) 培養下での視神経成長の動態。神経組織の成長・再生・移植 4 (1) : 40-41

12. 寺川　進 (1992) エキソサイトーシス。In : 新生化学講座 6　生体膜と膜輸送（日本生化学会編）pp 837-846 東京化学同人，東京

13. Disser, K., Krick, W., Hazama, A. & Froemter, E. (1992) Properties and regulation of chloride channels involved in transepithelial chloride secretion. Molecular Mechanisms of Transport pp 291-297, Elsevier

14. 寺川　進 (1992) 渡辺昭退官記念シンポジウム　生体の科学 43, pp 340-342 医学書院，東京

15. Terakawa, S., Murakami, M. & Xu, K. (1992) Exocytosis and water secretion in the Tupai sablingual gland. In : Salivary Secretion, Control and Mechanism (ed. Murakami, M. & Seo, Y.) pp 49-51 Int Workshop on Salivary Secretion. Nat Inst Physiol Sci. Okazaki

《神経情報研究部門》

1. Ikenaka, K., Nakahira, K., Nakajima, K., Fujimoto, I., Kagawa, T., Ogawa, M. & Mikoshiba, K. (1992) Detection of brain-specific gene expression in brain cells in primary culture : A novel promoter assay based on the use of a retrovirus vector. New Biologist., 4 : 53-60

2. Ikenaka, K., Kagawa, T. & Mikoshiba, K. (1992) Selective expression of DM-20, an alternatively spliced myelin proteolipid protein gene product, in developing nervous system and in non-glial cells. J. Neurochem., 58 : 2248-2253

3. Kondo, T., Ikenaka, K., Fujimoto, I., Aimoto, S., Kato, H., Ito, K., Taguchi, T., Morita, T., Kasai, M. & Mikoshiba, K. (1992) K^+-channel involvement of synaptic enhancement by mast cell de-

granulating (MCD) paptide. Neurosci. Res., 13 : 207-216

4. Yamada, M., Shimizu, K., Miyao, Y., Hayakawa, T., Ikenaka, K., Nakahira, K., Nakajimai, K., Kagawa, T. & Katsuhiko, M. (1992) Retrovirus-mediated gene transfer targeted to malignant glioma cells in murine brain. Jpn. J. Cancer Res., 83 : 1244-1247

5. 近藤哲朗，池中一裕，御子柴克彦 (1992) K^+チャネル毒。Dimentia 6 : 14-26

6. 池中一裕，近藤哲朗，藤本一朗，御子柴克彦 (1992) 長期増強誘導物質。Clinical Neuroscience 10 : 1255-1257

7. 栗山茂樹，山田正信，鹿川哲史，吉川正英，仲嶋一範，宮尾泰慶，清水恵司，辻井　正，早川　徹，御子柴克彦，池仲一裕 (1992) 癌の遺伝子治療に関する研究。白坂哲彦　編集「第2回飯能医化学シンポジウム」癌と化学療法社，21-25

8. Ikenaka, K. (1992) A novel promoter assay using a retrovirus vector. *In* : Molecular basis of neuronal connectivity. Ed : M. Satake, K. Obata, H. Hatanaka, E. Miyamoto, and T. Okuyama pp 5-7, Kohko-Do

9. 池仲一裕，鹿川哲史，山村　隆，山田正信，清水恵司，御子柴克彦 (1992) 脳髄疾患に対する脳内移植。高倉公朋，最上平太郎，早川　徹　監修「脳腫瘍の免疫と分子生物学」金芳堂，327-332

10. Hidaka, S., Hashimoto, Y. & Ohtsuka, T. (1992) Functional Arrangement of chromatic subtypes of cone photoreceptors. Jpn. J. Physiol. 42 : S184

11. Hiramo, J., Ohtsuka, T. & Nomoto, S. (1992) Target cells for the centrifugal fibers in the pigeon retina. Jpn. Comp. Physiol. Biochem. 9 : 229

12. 大塚輝彌 (1992) 霊長類における色情報抽出の神経機構。京大霊長研年報22巻86頁

13. 大塚輝彌 (1993) 網膜における色信号変換の神経回路。眼紀　44 : 505-511

《液性情報研究部門》

1. Sato, N., Funayama, N., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, Sa. & Tsukita, Sh. (1992) A gene family consisting of ezrin, radixin, and moesin. Its localization at actin/plasma membrane association sites. J. Cell Sci. 103 : 131-143

2. Matsuyoshi, N., Hamaguchi, M., Taniguchi, S., Nagafuchi, A., Tsukita, Sh. & Takeichi, M. (1992) Cadherin-mediated cell-cell adhesion is perturbed by v-src tyrosine phosphorylation in metastatic fibroblats. J. Cell Biol. 118 : 703-714

3. Shimoyama, Y., Nagafuchi, A., Fujita, S., Gotoh, M., Takeichi, M., Tsukita, Sh. & Hirohashi, S. (1992) Cadherin dysfunction in a human cancer cell line : Possible involvement of loss of alpha-catenin expression in reduced cell-cell adhesiveness. Cancer Res. 52 : 5770-5774

4. Tsukita, Sh., Tsukita, Sa., Nagafuchi, A. & Yonemura, Sh. (1992) Molecular linkage between cadherins and actin filaments in cell-cell adherens junctions. Curr. Opin. Cell Biol. 4 : 834-839

5. Hosoya, H., Kobayashi, R., Tsukita, Sh. & Matsumura, F. (1992) Caregulated actin and phospholipid binding protein (68kD-protein) from bovine liver. Identification as a homologue for annexin VI and intracellular localization. Cell Motil. & Cytoskeleton 22 : 200-210

6. Fujiwara, S., Shinkai, H., Takayasu, S., Owaribe, K., Tsukita, Sh. & Kageshita, T. (1992) A case of subepidermal blister disease associated with autoantibody against 450kD protein. J. Dermatol. 19 : 610-613

7. 永渕昭良 (1992) カドヘリンの機能を制御する蛋白質群。実験医学　創刊号『細胞接着の分子機構　――形態形成・免疫・丸への展開』26-31

8. 月田早智子 (1992) アクチンフィラメントと接着分子の相互作用。実験医学　創刊号『細胞接着の分子機構　――形態形成・免疫・癌への展開』38-44

9. 月田承一郎 (1992) 細胞接着と細胞増殖・分化。第9回関東肝臓集談会講演集『細胞間相互作用』51-61

10. 月田早智子(1992)細胞膜裏打ち蛋白質。メディカル　イムノロジー 23 : 529-532

11. 永渕昭良(1992)カドヘリンを介した細胞接着とその制御機構。メディカル　イムノロジー 23 : 497-504

12. Hertzberg, E. L., Stevenson, B. R., Green, K. J. & Tsukita, Sh. (1992) Isolation of intercellular junctions "Cell-Cell Interactions. A Practical Approach" (Stevenson, B. R., Gallin, W. J. and Paul, D. L. eds.) 111-142 Oxford University Press

13. 月田承一郎(1992)細胞認識『神経細胞の細胞生物学的特性』(シリーズ脳とコンピューター)(松本　元, 大津展之　編) 培風館

《情報記憶研究部門》

1. Inaishi, Y., Kashihara, Y., Sakaguchi, M., Nawa, H. & M. Kuno, Co-operative regulation of calcitonin gene-related peptide levels in rat sensory neurons via their central and peripheral processes. *J. Neurosci.* 12 : 518-524, 1992

2. Sakaguchi, M., Inaishi, Y., Kashihara, Y. & M. Kuno, Degeneration of motor nerve fibers enhances the expression of calcitonin gene-related peptide in rat sensory neurons.

《高次神経性調節研究部門》

1. Matsumura, M., Kojima, J., Gardiner, T. W. & Hikosaka, O. (1992) Visualand oculomotor functions of monkey subthalamic nucleus. J Neurophysiol 67 : 1615-1632

2. Kato, M. & Kimura, M. (1992) Effects of reversible blockade of basal ganglia on a voluntary arm movement. J Neurophysiol 68 : 1516-1534

3. Hikosaka, O., Imai, H. & Segawa, M. (1992) Saccadic eye movements in parkinsonism. In : Vestibular and Brain Stem Control of Eye, Head and Body Movements, Ed : H. Shimazu & Y. Shinoda, Tokyo : Japan Scientific Society Press pp 405-411

4. Hikosaka, O., Yamagishi, S. & Ebashi, S. (eds) (1992) Prospects of the Non-invasive Approach to Higher Functions of the Living Organisms, Biomedical Research Suppl 1

5. 下條信輔，彦坂興秀 (1992) 注意の心理学—視空間的注意を中心に— 生体の科学 43 : 30-36

6. 宮内 哲，多喜乃亮介 (1992) 夢の精神生理学的研究 —REM 睡眠中の視覚活動と眼球運動関連電位—，VISION 4 : 91-97

7. Kato, M. & Hikosaka, O. (1992) Saccade-related responses of external pallidal neurons in monkey. Neurosci Res Suppl 17 : S218

8. Miyauchi, S., Hikosaka, O., Nakamura, K. & Shimojo, S. (1992) Somatosensory stimulation induces visual attention — an evoked potential study. Neurosci Res Suppl 17 : S309

9. Fukuda, H. & Hikosaka, O. (1992) Rapid eye movements during sleep in monkeys-comparison with saccades. Neurosci Res Suppl 17 : S281

10. Miyauchi, S., Hikosaka, O. & Shimojo, S. (1992) Visual attention field can be assessed by illusory line motion sensation. Annual meeting of the association for research in vision and ophthalmology 1262

11. Shimojo, S., Miyauchi, S. & Hikosaka, O. (1992) Visual motion sensation yielded by non-visually driven attention. Annual meeting of the association for research in vision and ophthalmology 1354

12. Shimojo, S., Miyauchi, S. & Hikosaka, O. (1992) Voluntary and involuntary attention detected by the line motion effect. 15th European Conference on Visual Perception

13. Hikosaka, O. (1992) Function of the basal ganglia. Jpn J Physiol Suppl 42 : S6

14. Miyashita, N. & Hikosaka, O. (1992) Stimulation of the monkey caudate nucleus induces a shortlatency contraversive change in saccadic velocity. Jpn J Physiol Suppl 42 : S209

15. Hikosaka, O. (1992) Role of basal ganglia in control of innate movements, learned behavior

and cognition — a hypothesis, International Basal Ganglia Society Fourth Triennial Meeting Abstracts : 39

《生体システム研究部門》

1. Yamaguchi, K. (1992) Electrophysiological properties of the growth cone membrane of the cultured rat dorsal root ganglion neuron. Jpn J Physiol 42 Suppl : S119

2. Yamaguchi, K., Furuya, K. & Akagawa, K. (1992) Neurite-outgrowth and Ca channel. Neurosci Res Suppl 17 : S49

3. Yamaguchi, K. (1992) Effect of arachidonic acid on the growth cone membrane currents of the cultured rat dorsal root ganglion neuron. Neurosci Res Suppl 17 : S59

4. Akagawa, K., Yamaguchi, K. & Nakayama, T. (1992) Studies on the function of the neuronal membrane protein, HPC-1. Neurosci Res Suppl 17 : S198

5. 赤川公朗，山口和彦，中山　孝，井上明宏 (1992) 神経細胞形質膜蛋白質 HPC-1 の機能解析 神経化学 31 : 150-151

《高次液性調節研究部門》

1. Matuzaka, Y., Aizawa, H. & Tanji, J. (1992) A Motor Area Rostral to the Supplementary Motor Area (Presupplementary Motor Area) in the Monkey : Neuronal Activity During a Learned Moter Task. J. Neurophysiol. 68 : 653-662

2. Tokuno, H., Kimura, M. & Tanji, J. (1992) Pallidal inputs to thalamocortical neurons projecting to the supplementary motor area : an anterograde and retrograde double labeling study in the macaque monkey. Exp Brain Res. 90 : 635-638

3. Laihinen, A., Rinne, J. O., Rinne, U. K., Ruottinen, H., Tanji, J., Shima, K., Itoh, M., Fujiyama, T., Bergman, J., Haaparanta, M., Solin, O., Takahasi, T., Iwata, R., Ruotsalainen, U. & Ido, T. (1992) 18F-6-Fluorodopa PET scanning after selective COMT inhibition with entacapone (or-

611) : Studies in human and primate brains. ANN. UNIV. TURK. 88 : 85-86

4. Ulrike Halsband (1992) Left hemisphere preponderance in trajectorial learning. NeuroReport 3 : 397-400

5. Tanji, J. (1992) Cortical area-specific activity not yet found? Behavioral Brain Sci. 15 : 800-801

6. 丹治　順 (1992) 運動機能。Clinical Neuroscience, 中外医学社 vol : 10 No. 1 : 43-48

7. 丹治　順, 嶋　啓節 (1992) 高次脳機能の解明に向けて。医学のあゆみ Vol. 161 No. 11 : 855-858

8. Aizawa, H. & Tanji, J. (1992) The relationship between afferent inputs and discharge properties of neurons in the monkey primary motor cortex. Jpn. J. Physiol. 42 : S209

9. Shima, K., Shindo, K. & Tanji, J. (1992) The effects of glutamate antagonists on the neuronal activity in the primary motor cortex, premotor cortex and supplementary motor area of the monkey during motor performance. Jpn. J. Physiol. 42 : S209

10. Tokuno, H. & Tanji, J. (1992) A double lebeling study on inputs to the forelimb region of the primary motor cortex in the monkey. Neurosci. Res. Suppl. 17 : S228

11. Inase, M., Buford, J. A. & Anderson, M. (1992) Changes in thalamic cell discharge after injection of muscimol into the globus pallidus. Soc. Nuerosci. Abstr. 18 : 692

12. Buford, J. A., Inase, M. & Anderson, M. (1992) Microexcitable zones in the thalamus are separate from pallidal-receiving neurons. Soc. Neurosci. Abstr. 18 : 692

13. Laihinen, A., Rinne, J. O., Rinne, U. K., Ruottinen, H., Tanji, J., Shima, K., Itoh, M., Fujiyama, T., Bergman, J., Haaparanta, M., Solin, O.,Takahasi, T., Iwata, R., Ruotsalainen, U. & Ido, T. (1992) 18F-6-fluorodopa PET imaging of the brain after selective COMT inhibition. Proc. Scand. Congr. Neurol. Suppl. 138 : 76

14. Shima, K. & Tanji, J. (1992) NMDA as well as non-NMDA receptors are involved in motor

task-related neuronal activity in the motor cortex of awake monkeys. Soc. Neurosci. Abstr. 18 : 216

《統合生理研究施設》

1. Nakano, K., Tokushige, A., Kohno, M., Hasegawa, Y., Kayahara, T. & Sasaki, K. (1992) An autoradiographic study of cortical projections from motor thalamic nuclei in the macaque monkey. Neurosci Res 13 : 119-137

2. Sasaki, K., Gemba, H., Nambu, A., Jinnai, K., Yamamoto, T. & Llinas, R. (1992) Cortical activity specific to no-go reaction in go/no-go reaction time movement with colour discrimination in monkeys and human subjects. Biomed Res 13 Suppl 1 : 5-9

3. 佐々木和夫，玄番央恵，南部　篤，松崎竜一 (1992) NO-GO 電位の電気生理学的および磁気生理学的研究。第 7 回生体磁気学会大会論文集 vol. 5 No. 1 : 36-39

4. 佐々木和夫 (1992) 随意運動に伴う大脳皮質活動と無侵襲計測への期待。計測と制御 Vol 31 No 2 : 280-287

5. 佐々木和夫 (1992) 脳波と脳磁気。Newton No 10 : 58-59

6. 南部　篤，松崎竜一，玄番央恵，佐々木和夫 (1992) 随意運動に伴う脳活動の磁気計測。医用電子と生体工学　第30巻　特別号 : 128

7. 佐々木和夫 (1992) 随意運動の中枢神経機構の研究。厚生省特定疾患運動失調症調査研究班平成 3 年度研究報告書 : 80-83

8. 佐々木和夫，玄番央恵，南部　篤，松崎竜一 (1992) 随意運動の発現と制御。重点領域研究「脳の高次機能」報告書 (2) : 99-100

9. Sasaki, K., Gemba, H., Nambu, A. & Matsuzaki, R. (1992) Localization of no-go activity in human frontal cortex by MEG study. Jpn J Physiol 42 Suppl : S176

10. Sasaki, K. (1992) Cerebro-cerebellar interaction in voluntary movement. Abstract of VIIIth

TMIN International Symposium : Role of the Cerebellum and Basal Ganglia in Voluntary Movement : 1

11. Nambu, A. & Llinas, R. R. (1992) Electrophysiology of globus pallidus neurons : oscillatory properties and synaptic input. Jpn J Physiol 42. Suppl : S208

12. Nambu, A., Matsuzaki, R., Gemba, H. & Sasaki, K. (1992) Magnetic fields in the cerebral cortex during visually-initiated finger movements in human. Neurosci Res Suppl 17 : S219

13. Nambu, A., Matsuzaki, R., Gemba, H. & Sasaki, K. (1992) Magnetic fields in the cerebral cortex during visually-initiated finger movements in human. Abstract of VIIIth TMIN International Symposium : Role of the Cerebellum and Basal Ganglia in Voluntary Movement : 77

14. Jinnai, K., Nambu, A. & Tanibuchi, I. (1992) Pallidal and cerebellar output through the thalamus to the primary and supplementary motor areas of the monkey. Abstract of VIIIth TMIN International Symposium : Role of the Cerebellum and Basal Ganglia in Voluntary Movement : 37

15. 南部　篤 (1992) 淡蒼球—視床—皮質路。第 7 回日本基底核研究会予稿集 : 22-23

16. 佐々木和夫 (1992) 高次脳活動　—随意運動の発動・制御と脳—。ブレインサイエンス Vol 3 No 4 : 439-456

17. 佐々木和夫 (1992) 大脳—小脳連関。第95回日本医学会シンポジウム記録集 : 50-58

18. 栗城真也 (1992) 音声刺激による聴覚誘発脳磁界計測。計測自動制御学会誌 31 : 294-299

19. 栗城真也 (1992) 聴覚誘発脳磁波の特性と活動源の推定。下地恒毅編　誘発電位，新潟：西村書店，249-261

20. 栗城真也 (1992) 多チャンネル SQUID 磁束計による聴覚誘発脳磁界の観測。日本音響学会誌 48 : 320-327

21. 竹内文也，栗城真也 (1992) 誘発脳磁図の計測と電源推定。日本 ME 学会誌 6 : 28-43

22. 鎌田恭輔，大城　理，竹内文也，栗城真也，宝金清博，阿部　弘(1992) 3次元MRIを用いた体性感覚誘発脳磁界源の検討。脳と神経 44 : 265-270

23. Oshiro, O., Mukai, M., Takeuchi, F. & Kuriki, S. (1992) Analysis of errors on neuromagnetic localization of multiple current dipole sources. Phys. Med. Biol. 37 : 845-852

24. Kuriki, S. (1992) Localization of cortical neuromagnetic sources of the auditory evoked responses to short speech sounds. Biomed. Res. 13 Suppl. 1 : 39-43

25. Kobayashi, T., Ii, M. & Kuriki, S. (1992) Analysis of neuromagnetic fields generated by a current dipole source. Honma, T. & Sebestyen, I. eds. Applied Electromagnetics in Materials and Computational Technology. Sapporo : Hokkaido University Press, 13-16

26. Takeuchi, F., Mukai, M., Kuriki, S., Hayasi, M. & Imada, T. (1992) Spatio-temporal source localization of neuromagnetic fields evoked by pure tones. Hoke, M., Erne, S., Okada, Y. C. & Romani, G. L. eds. Biomagnetism : Clinical aspects. Amsterdam : Excerpta Medica, 181-184

27. Oshiro, O., Mukai, M., Takeuchi, F. & Kuriki, S. (1992) Multiple dipole estimation by parameter search method. Hoke, M., Erne, S., Okada, Y. C. & Romani, G. L. eds. Biomagnetism : Clinical aspects. Amsterdam : Excerpta Medica, 693-697

28. 竹内文也，栗城真也(1992)聴覚誘発脳磁界応答の時空間解析法の検討。電気学会研究会資料 MAG92-77 : 11-16

29. 伊井雅一，小林哲生，栗城真也(1992)脳磁界における分布電流の寄与に関する検討。電気学会研究会資料 MAG92-78 : 17-25

30. 竹内文也，栗城真也(1992)誘発脳磁界計測と解析。電気学会研究会資料 MAG93-88 : 11-17

31. Kobayashi, T., Morita, M. & Kuriki, S. (1992) Analysis of alpha attenuation distribution related to binocular rivalry. Proc. 14th Ann. Int. Conf. IEEE EMB Soc. Paris, 14 : 2742-2743

32. Kuriki, S., Takeuchi, F. & Kobayashi, T. (1992) Dynamic characteristics of neuromagnetic fields evoked by vowel speech gound. Proc. Sat. Symp. Neurosci, Tech., 14th Ann. Int. Conf.

IEEE EMB Soc, Lyon : 99-103

33. Murakami, S., Kuriki, S., Miyazawa, J., Fujii, M., Fukatsu, R. & Takahata N. (1992) Visual evoked magnetic field responses in parietal cortex in man. Soc. Meet, Neurosci. Anaheim ; 2 : 1420

34. 竹内文也，栗城真也 (1992) 37チャンネル SQUID による CV 刺激誘発脳磁界の動的特性。第7回生理生体工学シンポジウム論文集 : 423-428

35. Kakigi, R., Kuroda, Y., Neshige, R., Endo, C. & Shibasaki, H. (1992) Physiological study of the spinothalamic tract conduction in multiple sclerosis. J Neurol Sci 107 : 205-209

36. Kakigi, R., Kuroda, Y., Takashima, H., Endo, C., Neshige, R. & Shibasaki, H. (1992) Physiological functions of the ascending spinal tracts in HTLV-I-associated myelopathy. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 84 : 110-114

37. Kakigi, R. & Shibasaki, H. (1992) Mechanisms of pain relief by vibration and movements in man. J Neurol Neurosurg Psychiatry 55 : 282-286

38. Kakigi, R., Endo, C., Neshige, R., Kohno, H. & Kuroda, Y. (1992) Accelerated aging of the brain in Werner's syndrome. Neurology 42 : 922-924

39. Kakigi, R., Shibasaki, H., Ikeda, T., Neshige, R. & Kuroda, Y. (1992) Pain-related somatosensory evoked potentials in peripheral neuropathies. Acta Neurol Scand 85 : 347-354

40. Kakigi, R. & Kuroda, Y. (1992) Brainstem auditory evoked potentials in Down's syndrome. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 84 : 293-295

41. Kakigi, R. & Shibasaki, H. (1992) Effects of age, gender and stimulus side on the scalp topography of somatosensory evoked potentials following posterior tibial nerve stimulation in man. J Clin Neurophysiol 9 : 431-440

42. 柿木隆介 (1992)「入門講座」体性感覚誘発電位のための新しい刺激法1．触覚，AIR-PUFF，アキレス腱および磁気刺激。臨床脳波 34 : 125-130

43. 柿木隆介 (1992) 日本人における SEP の正常値。脳波と筋電図 20 : 112-113

44. 柿木隆介 (1992)「入門講座」体性感覚誘発電位のための新しい刺激法 2．痛覚刺激。臨床脳波 34 : 119-205

45. 柿木隆介 (1992) 正中神経刺激による体性感覚誘発電位 (SEP) の発生起源 2．中潜時成分。臨床脳波 34 : 239-244

46. 柿木隆介，柴崎　浩 (1992) 誘発電位。老年期痴呆 6 : 67-75

47. 柿木隆介 (1992) 痛みの度合のめやす。ブレインナーシング 8 : 16-21

48. 柿木隆介，河野　宏，遠藤智代子，音成龍司，黒田康夫 (1992) WERNER 症候群における神経生理学的検索。Therap Res 13 : 191-194

49. 柿木隆介，柴崎　浩 (1992) 正中神経刺激 SEP の脳電位分布に対する，年齢，性，刺激側の影響。脳波と筋電図 20 (12) 171

50. 柿木隆介 (1992) 誘発電位を用いたヒトの高次脳機能の検索。文部省新プログラム［生体における動的機構］創成的基礎研究［生体機能の統合的研究］平成 3 年度研究成果報告及び発表論文 : 6-7

51. 柿木隆介，黒田康夫，柴崎　浩 (1992) 振動覚および運動による疼痛軽減の作用機序。臨床神経学 32 (12) : 1456

52. 柿木隆介 (1992) 体性感覚誘発電位—種類別感覚刺激。In : 誘発電位シンポジウム。下地恒毅　編，西村出版，新潟，pp21-23

《生体機能検査室》

1．Furuya, S., Naruse, S., Nakayama, T. & Nokihara, K. (1992) Effect and distribution of intravenously injected 125I-endothelin-1 in rat kidney and lung examined by electron microscopic radioautography. Anat. Embryol. 185 : 87-96

2. Furuya, S., Naruse, S., Nakayama, T. & Nokihara, K. (1992) Bindig of 125I-endothelin-1 to fat-storing cells in rat liver revealed by electron microscopic radioautography. Anat. Embryol. 185 : 97-100

3. Hayakawa, S., Hayakawa, T., Kondo, T., Shibata T. & Naruse, S. (1992) Molecular form of pancreatic elastase 1 in human plasma. Int. J. Pancreatology 11 : 1-7

4. Hayakawa, T., Kondo, T., Shibata, T. & Naruse, S. (1992) Peritoneal absorption of pancreatic enzyme in dogs. Gastroenterol. Japonica 2 : 230-233

5. Hayakawa, T., Kondo, T., Shibata, T., Kitagawa, M. & Naruse, S. (1992) Plasma disappearance of homologous and heterologous pancreatic enzyme in dogs. J. Gastroenterol. Hepatol. 7 : 527-532

6. Naruse, S., Suzuki, T. & Ozaki, T. (1992) The effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on exocrine pancreatic secretion in dogs. Pancreas 7 : 543-547

7. Naruse, S., Takagi, T., Kato, M. & Ozaki, T. (1992) Interdigestive gastric blood flow : the relation to motor and secretory activities in conscious dogs. Exp. Physiol. 77 : 701-708

8. Naruse, S., Inoue, T., Mochizuki, T. & Yanaihara, N. (1992) Vasodilator action of guinea pig vasoactive intestinal polypeptide (VIP) : comparison with common mammalian VIP. Regul. Peptide 42 : 163-171

9. Katsuzaki, T., Tatemichi, N., Takeichi, C., Hayakawa, S., Hayakawa, T., Nakae, Y. & Naruse, S. (1992) Enzyme immunoassay and immunochemical characterization of pancreatic stone protein in human serum. J. Clin. Lab. Analy. 6 : 143-147

10. Nokihara, K., Naruse, S. & Wray, V. (1992) Continuous flow synthesis of PACAP- and VIP-related peptides and characteristics of polymer supports. Peptide Chemistry 1991, ed. Suzuki, A. Protein Research Foundation, Osaka, pp.13-18

11. Naruse, S., Takagi, T., Suzuki, T. & Ozaki, T. (1992) Cholinergic control of interdigestive gastric blood flow in conscious dogs. J. Physiol. 446 : 193P

12. Naruse, S., Suzuki, T. & Ozaki, T. (1992) Postprandial gastric hyperemia. Jpn. J. Physiol. 42 (suppl) : S61

13. Suzuki, T., Naruse, S. & Yanaihara, N. (1992) Effects of PACAP on exocrine pancreatic secretion in dogs. Jpn. J. Physiol. 42 (suppl) : S98

14. 鈴木貴祐，成瀬　達，矢内原昇 (1992) オクトレオチド (SMS201-995) の膵外分泌抑制作用：皮下投与の効果。消化管ホルモン XI, 医学図書出版（東京）pp 275-280

15. 成瀬　達 (1992) 食後の一過性胃血流増加。日本消化器病学会誌 89 : 366

16. 成瀬　達 (1992) 神経ペプチドによる血流調節。日本内分泌学会雑誌 68 : 221

17. 成瀬　達 (1992) エルカトニンの食餌刺激胃酸分泌抑制作用。日本消化器病学会誌 88 : 616

《組織培養標本室》

1. Furuya, S., Naruse, S., Nakayama, T. & Nokihara, K. (1992) Effect and distribution of intravenously injected ^{125}I-endothelin-1 in rat kidney and lung examined by electron microscopic radioautography. Anat & Embryol 185 : 87-96

2. Furuya, S., Nakayama, T. & Nokihara, K. (1992) Binding of ^{125}I-endothelin-1 to fat-storing cells in rat liver revealed by electron microscopic radioautography. Anat & Embryol 185 : 97-100

3. 古家園子，中山　孝 (1992) マッシュルーム・レクチンの視細胞における結合部位。解剖学雑誌 67 : 558

4. Furuya, S., Furuya, K. & Nakayama, T. (1993) The structure and function of cultured subepithelial fibroblasts of rat intestinal villi. Anatomical Record Suppl 1 : 53

《磁気共鳴装置室》

1. Yoshida T & Watari H (1992) Noninvasi and continuous determination of energy metabolism during musclar contraction and recovery. Med Sport Sci 37 : 364-373

2. Yoshida T & Watari H (1992) Muscle metabolism during repeated exercise studied by ^{31}P-MRS. Physiol Anthropol 11 : 241-250

3. Yoshida T & Watari H (1992) Muscle metabolites in long distance runner during interval exercise. Jpn J Physiol 42 : S247 ＊＊＊

4. Hirakawa K, Yoshizaki K, Morimoto & Watari H (1992) The transition from aerobic to anaerobic metabolism during exercise in human skeletal muscle studied by ^{31}P-MRS and electromyography. Book of Abstracts, Soc Magn Reson Med, 11th Annual Meeting, pp 2724 ＊＊＊

5. Yoshizaki K, Arizono N & Watari H (1992) Histamine secretion associated with lactate production in mast cells detected by ^{1}H-NMR. Book of Abstracts, Soc Magn Reson Med, 11th Annual Meeting, pp 3410 ＊＊＊

6. Sogami M, Era S, Kuwata K, Erata T, Tasaki A, Kato K, Matsumoto G, Nakagami Y. & Watari H (1992) Intermolecular cross-relaxation in bovine plasma albumin gel (BPA*-gel)-basic studies on cross-relaxation imaging. Book of Abstracts, Soc Magn Reson Med, 11th Annual Meeting, pp 1338 ＊＊＊

7. 惠良聖一，中村浩二，桑田一夫，曽我美勝，亘　弘 (1992)MR イメージング用ファントム開発への基礎研究—合成高分子ゲル内の水構造の研究。生物物理 32 Suppl, S109

8. 桑田一夫，惠良聖一，曽我美勝，加藤一夫，岩間　亨，亘　弘 (1992) 交差緩和時間 (TIS) による新しいイメージング法。岐阜大医紀 40 (2) : 373-374

9. 亘　弘，吉田敬義 (1992) ヒト骨格筋の運動・回復時における無機燐・ pH 変化。生化学，64 (8) : pp 1019 ＊＊＊

《超高圧電子顕微鏡室》

1．Arii, T., Yoshimura, N. & Kamiya, Y. (1992) Intensity and resolution by YAG-screen of HVTEM image II. J. Electro. Microsc. 41, 318

2．有井達夫，吉村伸明，神谷芳弘(1992) YAG 蛍光板による超高圧電顕像の強度と分解能Ⅱ。日本電子顕微鏡学会第48回学術講演会予稿集 p248

3．小野俊朗，中山睿一，有井達夫，粟井通康(1991) マラリア感染ラット白脾髄 Marginal metallophil に出現する鉄顆粒と免疫応答。第16回鉄代謝研究会抄録集 p20-p21

《動物実験施設》

1．Tsuji, S., Anglade, P., Ozaki, T., Sazi, T. & Yokoyama, S. (1992) Peristaltic movement evoked in Intestinal tube devoid of mucosa and submucosa. Jpn. J. Physiol. 42 : 363-375

2．Kuwahara, A., Kimura, K., Ozaki, T., Suzuki, T. & Yanaihara, N. (1992) Galanin as an inhibitory neurotransmitter in the regulation of muscle activities in the gastrointestinal tract. Gastrointestinal Function. Regulation and Disturbances. 10 : 29-40

3．Naruse, S., Takagi, T., Kato, M. & Ozaki, T. (1992) Interdigestive gastric blood flow : The relation to moter and secretory activities in conscious dogs. Experimental Physiology 77 : 701-708

4．Naruse, S. Suzuki, T. & Ozaki, T. (1992) The effect of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) on exocrine pancreatic secretion in dogs. Pancreas 7 : 543-547

《江橋研究室》

1．江橋節郎　情報伝達と細胞応答（上）序　続生化学実験講座　日本生化学会編 335-340 (1986)

2．江橋節郎　無機イオンと生命　岡崎文化シリーズ **13** 129-169 (1987)

3．江橋節郎　薬理学研究の回顧と展望　日薬理誌 **93,** 1-5 (1989)

4．江橋節郎　心臓血管研究の現状と将来―我が国の課題―心臓と血管の科学，生命と健康を守る為に　第4回「大学と科学」公開シンポジウム組織委員会編 8-18 (1990)

5．江橋節郎編　血管研究法の進歩　学会出版センター (1990)

6．江橋節郎　無機イオンと蛋白質と生命　薬学雑誌 **111** 3, 182-187 (1991)

7．江橋節郎　Dimethyl sulfoxide (DMSO) によるタンパク質分画法　生化学 **63,** 5 371-373 (1991)

8．江橋節郎　医科学を語る―研究する楽しみ　実験医学 9 14, 1778-1786 (1991)

9．江橋節郎　Citation Classic と私　生物物理 **31,** 5, 48-50 (1991)

10. 江橋節郎　脳研究はいかにあるべきか　第32回日本医学会総会会誌［Ⅰ］226-227 (1991)

11. 江橋節郎　カルシウム物語（Ⅰ）リンゲルとアネクドート　最新医学 **47,** 1560-1562 (1992)

12. 江橋節郎　カルシウム物語（Ⅱ）ハイルブランの夢と真実　最新医学 **47,** 2018-2020 (1992)

13. 江橋節郎　カルシウム物語（Ⅲ）弛緩因子からカルシウムへ　最新医学 **47,** 2224-2226 (1992)

14. 江橋節郎　カルシウム物語（Ⅳ）EGTA の奇跡　最新医学 **47,** 2352-2354 (1992)

15. 江橋節郎，日沼頼夫　医学逍遥　生理学・薬理学　最新医学 **47,** 2338-2351 (1992)

16. 江橋節郎　カルシウム物語（Ⅴ）リップマン先生と私　最新医学 **48,** 138-140 (1993)

17. 江橋節郎　カルシウム物語（Ⅵ）トロポミオシンを巡って　最新医学 **48,** 294-296 (1993)

18. 江橋節郎，岸本泰延，西沢潤一，福井謙一，司会　土田英俊　座談会“化学にたくす新しい世紀”化学と工業 **46,** 28-44 (1993)

19. Ebashi, S. (1987) Contractile and regulatory proteins in cardiovascular system, In Heart Function and Metabolism (N. S. Dhalla, G. N. Pierce, R. E. Beamish, eds.), Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 279-291

20. Ebashi, S. (1987) Ca^{2+} in the heart, J. Mol. Cell. Cardiol. **19,** 1-18

21. Ebashi, S., Mikawa, T., Kuwayama, H., Suzuki, M., Ikemoto, H., Ishizaki, Y., Koga, R. (1987) Ca^{2+} regulation in smooth muscle; Dissociation of myosim light chain kinase activity from activation of actin-myosin interaction, In Regulation and Contraction of Smooth Muscle, (M. J. Siegman, A. P. Somlyo, N. L. Stephens, eds.), Alan R. Liss, Inc., pp. 109-117

22. Ebashi, S. (1987) Actomyosin ATPase and superprecipitation: Their modification by rutin, Acta Biochem. Biophys. Hung. **22,** 295-306

23. Ebashi, S. (1987) Influences of physical and biological thoughts on the development of biological sciences. In Medical science and health care in the coming century. (eds by Mori, W. and Homma, S.) Elsevier 7, Amsterdam, pp. 212-214

24. Ebashi, S., Ogawa, Y. (1988) Troponin C and calmodulin as calcium receptors: Mode of actin and sensitivity to drugs. In Handbook of experimental Pharmacology, Vol. 83, (ed. Baker, P. F.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 31-56

25. Ebashi, S., Ogawa, Y. (1988) Ca^{2+} in contractile processes. Biophys. Chemi. **29,** 137-143

26. Ebashi, S. (1988) Dawn of Ca research: Regulation of muscle contraction. In The Roots of Modern Biochemistry (eds. Kleinkauf, von Döhren, Jaenicke) Walter de Gruyter & Co., Berlin New York, pp. 737-746

27. Ebashi, S., Koga, R. (1988) Desensitization of smooth muscle natural actomyosin, Proc, Japan Academy, 64B (4), 98-101

28. Ebashi, S. (1988) Cellular calcium: Muscle. In Calcium in Human Biology. (ed. Nordin, B. E. C.)

Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 317-338

29. Ebashi, S. (1988) Historical overview, Calcium ion and contractile proteins. In Calcium Antagonists Pharmacology and Clinical Research (eds. Vanhoutte, P. M., Paoletti, R. and Govoni, S.) The New York Academy of sciences, New York, pp. 51-59

30. Ebashi, S. and Kuwayama, H. (1988) Calcium regulation of smooth muscle contraction. In Calcium Signal and Cell Response (eds. by Yagi, K. and Miyazaki, T.) Japan Sci. Soc. Press, Tokyo, Springer-Verlag, Berlin, pp. 143-150

31. Kuwayama, H. and Ebashi, S. (1988) Isolation from bovine brain of 155 kDa component exhibiting myosin light chain kinase activity, J. Biochem., **104,** 858-861

32. Kuwayama, H., Suzuki, M., Koga, R. and Ebashi, S. (1988) Preparation of protein components exhibiting myosin light chain kinase activities from bovine aorta: Discrepancies between its enzyme activity and actomyosin activating effect, J. Biochem., **104,** 862-866

33. Ishizaki, Y., Mikawa, T., Ebashi, S., Yokota, E., Hosoya, H. and Kuroda, K. (1988) Preparation of tubulin from caulerpa, a marine green alga, using casein as a protective agent against proteolytic degradation, J. Biochem., **104,** 329-332

34. Ebashi, S., Koga, R. (1988) The use of dimethyl sulfoxide (DMSO) for protein fractionation, Proc. Japan Academy, 64 (B) 10, 323-326

35. Ebashi, S. (1989) Calcium Regulation of Smooth Muscle Contraction. In Muscle Energetics (eds. by Paul, R. J., Elzinga, G. and Yamada, K.) Alan R. Liss, New York, pp. 239-251

36. Ebashi, S. (1990) Development of Ca^{2+} concept in smooth muscle research. In Frontiers in smooth muscle research (eds. by N. Sperelakis and J. D. Wood) Alan R. Liss, Inc. New York, pp. 159-165

37. Suzuki, M., Sugiura, M. and Ebashi, S. (1990) Sea Urchin Protease Specific to the SPKK Motif in Histone, J. Biochem, **108,** 347-355

38. Suzuki, M., Sohma, H., Yazawa, M., Yagi, K. and Ebashi, S. (1990) Histone H1 Kinase to the

SPKK Motif, J. Biochem, **108,** 356-364

39. Kuwayama, H., Sugiura, M., Sugita, H. and Ebashi, S. (1990) Porcine Skeletal Muscle Dystrophin, Proc. Japan Acad., **66** (B), 145-150

40. Ebashi, S. (1991) Studies on Ca^{2+} Regulation of Muscle Contraction: Past and Present. In New Trends in Biological Chemistry (ed. by Ozawa, T.) Japan Sci. Soc. Presss. Tokyo/Springer-Verlag, Berlin, pp 269-277

41. Ebashi, S. (1991) Excitation-Contraction Coupling and the Mechanism of Muscle Contraction, Annu. Rev. Physiol., **53,** 1-16

42. Ebashi, S. (1991) Tropomyosin as the Spearhead of Regulatory Proteins, World Scientific, in Retrospect and Prospect of Protein Research (eds. Li, Z., Lu, Z., Zhang, Y.) pp 21-25

43. Ebashi S. (1991) Brief Overview of Studies on the Regulatory Proteins of Muscle (eds Ozawa E., Masaki T., Nabeshima Y.) Frontiers in Muscle Research, Elsevier Science B. V. pp 267-274

44. Ebashi, S. (1992) Muscle Research: A Cornerstone of Life Science (eds Sato Y., Poortmans J., Hashimoto I., Oshida Y.) Integration of Medical and Sports Sciences, Karger, Basel, **37,** pp 1-7

45. Kobayasi H., Inoue, A., Mikawa, T., Kawayama, H., Hotta, Y., Masaki, T. and Ebashi, S. (1992) Iaolation of cDNA for Bovine Stomach 155 kDa Protein Exhibiting Myosin Light Chain Kinase Activity, J. Biochem. **112,** 786-791

46. Ebashi, S. (1992) Development of the Ca^{2+} Concept, Calcium Inhibition, (ed. Kohama, K.) Japan Sci. Soc. Press, Tokyo and CRC Press, Boca Raton, pp 1-6

47. Tanokura M. and Ebashi, S. (1993) Complexes of Myosin Subfragment 1 with Pyrophosphate and with Adenosine Diphosphate as Studied by Phosphorus-31 Nuclear Magnetic Responce, J. biochem. **113,** 19-21

b．学会発表

〔目　　次〕

神経化学研究部門 …… 149
超微小形態生理研究部門 …… 149
細胞内代謝研究部門 …… 153
生体膜研究部門 …… 157
機能協関研究部門 …… 158
神経情報研究部門 …… 161
液性情報研究部門 …… 163
高次神経性調節研究部門 …… 167
生体システム研究部門 …… 169
高次液性調節研究部門 …… 169
統合生理研究施設 …… 170
生体機能検査室 …… 174
組織培養標本室 …… 174
磁気共鳴装置室 …… 175
超高圧電子顕微鏡室 …… 175
動物実験施設 …… 176
江橋研究室 …… 176

学　会　発　表

《神経化学研究部門》

1．赤川公朗，青木則久，佐治真理，神野哲夫 (1992. 4) 遅発性黒質過剰興奮の GABA アゴニスト慢性投与による抑制。第69回日本生理学会大会（秋田）

2．端谷　毅，児島伸彦，小幡邦彦，西野仁雄 (1992. 4) ドパミン入力を欠如した線条件に増量する mRNA のクローニング。第69回日本生理学会大会（秋田）

3．山肩葉子，小幡邦彦，Greengard, P., Czernik, A. J. (1992. 12) 中隔キンドリングにおけるリン酸化シナプシンⅠの増加。第16回日本神経科学学会大会（大阪）

4．鈴木恵理香，児島伸彦，赤川公朗 (1992. 12) 神経細胞特異的核タンパク質 5E5 のクローニング。第16回日本神経科学学会大会（大阪）

5．橋本隆紀，吉川武男，小幡邦彦 (1992. 12) メタンフェタミン投与後のラット脳内に於ける NGFI-A mRNA の発現。第16回日本神経科学学会大会（大阪）

6．Stork, O., 橋本隆紀，吉川武男，小幡邦彦 (1992. 12) 黒質網様部チロシン水酸化酵素のピクロトキシン誘発けいれんによる転写活性化。第16回日本神経科学学会大会（大阪）

7．児島伸彦，小幡邦彦 (1992. 10) キンドリングラット海馬における遺伝子発現の長期変化。第34回日本神経化学会（名古屋）

《超微小形態生理研究部門》

1．瀬尾芳輝，村上政隆，大河原浩，Lee J H. (1992. 3) パルス磁場勾配法による細胞内 Na の自己拡散係数の測定。第19回日本磁気共鳴医学会（東京）

2．桑田一夫，恵良聖一，曽我美勝，加藤一夫，岩間　亨，今井　一，中上　寧，亘　弘，恵良田知樹，田崎　明 (1992. 3) ウシ血漿アルブミン・ゲル (BPA* -gel) 内における分子間交差緩和現象の研究。第19回日本磁気共鳴医学会（東京）

3．亘　　弘(1992. 4)時間及び周波数領域スペクトル測定による生体分子の動態解析。第69回日本生理学会大会（秋田）

4．村上政隆，Lundberg P, 瀬尾芳輝，& Young J A. (1992. 4) P-31NMR による単離唾液腺細胞のエネルギー代謝測定。第69回日本生理学会大会（秋田）

5．瀬尾芳輝，村上政隆(1992. 4) NMR 法による細胞内外 Na イオンの動的挙動の測定。第69回日本生理学会大会（秋田）

6．寺川　進，村上政隆(1992. 4)ツバイ唾液腺の水と粘液分泌。第69回日本生理学会大会（秋田）

7．曽我美勝，恵良聖一，桑田一夫，加藤一夫，中上　寧，今井　一，亘　　弘(1992. 4)タンパク質の溶液，ゲル状態における分子間交差緩和現象の研究。第69回日本生理学会大会（秋田）

8．恵良聖一，桑田一夫，曽我美勝，中上　寧，今井　一，亘　　弘(1992. 4)ウシ・メルカプトアルブミン(BMA)の moltoen-globule state。第69回日本生理学会大会（秋田）

9．恵良聖一，桑田一夫，曽我美勝，天野　肇，今井　一，亘　　弘(1992. 4) ^{1}H-NMR によるマウス水晶体類似水構造をもつ合成高分子ゲルの研究。第69回日本生理学会大会（秋田）

10. 村上政隆(1992. 9)核磁気共鳴法による細胞内電解質の測定。電子情報通信学会秋季大会（東京）

11. Lee J H, Seo Y, Labadie C & Springer C S Jr (1992. 8) SR-free discrimination of compartmental ^{23}Na resonances by relaxographic analysis : Elythrocyte suspension. In : Works in Progress : Society of Magnetic Resonance in Medicine 11th Annual Scientific Meeting (Berlin)

12. Seo Y, Lee J H & Murakami M (1992. 8) The ^{23}Na relaxation mechanism of the Na ion in agar gel analyzed by ^{23}Na double-quantum filter NAR and ^{23}Na pulsed field gradient NMR. In : Book of Abstracts : Society of Magnetic Resonance in Medicine 11th Annual Scientific Meeting (Berlin)

13. Iwama T, Era S, Kuwata K, Sogami M, Sato S, Kato K, Matsunaga T & Watari H (1992. 8) ^{1}H-NMR studies on water structure in normal and biochemically induced osteoarthritic rabbit knee cartilages. Book of Abstracts, Soc, Magn Reson Med, 11th Annual Meeting (Berlin)

14. Era S, Kuwata K, Amano H, Sogami M, Matsumoto G, Kato K, Takahashi K, Nakagami Y, Imai H & Watari H (1992. 8) Comparative ^{1}H-NMR studies on water structure in soft contact lens and mouse lens. Int Conf Magn Reson Biol Syst (Jerusalem, Israel)

15. Sogami M, Era S, Kuwata K, Matsumoto G, Kato K, Nakagami Y, Imai H, Erata T, Tasaki A & Watari H (1992. 8) ^{1}H-NMR studies on the staturation transfer from protein to water protons. Int Conf Magn Reson Biol Syst (Jerusalem, Israel)

16. Era S, Kuwata K, Amano H, Sogami M, Kato K & Watari H (1992. 9) Comparative ^{1}H-NMR studies on water structure in soft contact lens and mouse lens. Exp Eye Res (Stresa, Italy)

17. Shimoyama Y, Kato M, Crepeau R H, Freed J H & Watari H (1992. 9) Two dimensional Fourier transform EPR studies of melanin. Abstract of 11th International Congress of Photobiology （京都）

18. Watari H & Shimoyama Y (1992. 9) Classical optics of biomolecular spectrum : absorption versus emmission. Abstract of 11th International Congress of Photobiology （京都）

19. Steward M C, Larcombe-McDouall J B, Nakahari T & Case R M (1992. 9) Salt-water coupling in salivary secretion. 国際ワークショップ“唾液分泌，その制御と機構”（岡崎）

20. Nakahari T, Nakamura A & Steward M C (1992. 9) Paracellular fluid transprotin salivary secretion? 国際ワークショップ“唾液分泌，その制御と機構”（岡崎）

21. Seo Y & Murakami M (1992. 9) Dynamic behavior of intracellular electrolytes in the salivary gland. 国際ワークショップ“唾液分泌，その制御と機構”（岡崎）

22. Murakami M & Seo Y (1992. 9) Cation handling by mandibular salivary gland as measured by NMR. 国際ワークショップ“唾液分泌，その制御と機構”（岡崎）

23. Ishikawa T & Cook D I (1992. 9) K^{+} and Cl^{-} currents in sheep parotid secretory cells. 国際ワークショップ“唾液分泌，その制御と機構”（岡崎）

24. 村上政隆，石川　透，瀬尾芳輝 (1992. 11) アンモニウムーパルス実験中のK^{+}輸送。第30回生物物理学会年会（大阪）

25. Ishikawa T & Cook D I (1992. 11) An inwardly rectifying potassium channel in the basolateral membrane of sheep parotid secretory cells. 第30回生物物理学会年会（大阪）

26. Seo Y, Roony R D & Murakami M (1992. 11) An analysis of ^{23}Na relaxation of the intracellular Na in the perfused rat salivary gland using double-quantum filter NMR. 第30回生物物理学会年会（大阪）

27. 桑田一夫，恵良聖一，曽我美勝，亘　弘 (1992. 11) CD 及び 500MHz 1H-NMR によるウシ血漿アルブミン・ドデシル硫酸ナトリウム複合体 (ADm) の構造研究。第30回生物物理学会年会（大阪）

28. 曽我美勝，恵良聖一，桑田一夫，加藤一夫，恵良田知樹，田崎　明，中上　寧，松本元一，高崎昭彦，亘　弘 (1992. 11) ウシ血漿アルブミン (BPA) の溶液→ゲル (BPA*-gel) 変換における水構造変化の研究。第30回生物物理学会年会（大阪）

29. Shimoyama Y, Rink J W & Watari H (1992. 9) Vector epr of natural quartz. 第31回 ESR 討論会（広島）

30. Seo Y, Lee J H, Ishikawa T & Murakami M (1992. 10) Relaxation process of Na ion in agar gel analysed by 23Na DQf and PFGENMR. 第20回日本磁気共鳴医学会（札幌）

31. 恵良聖一，中村浩二，桑田一夫，曽我美勝，亘　弘 (1992. 10) 交差緩和時間測定による合成高分子ゲル内の水構造の研究。第20回日本磁気共鳴医学会（札幌）

32. 曽我美勝，恵良聖一，桑田一夫，松本元一，恵良田知樹，田崎　明，中上　寧，高崎昭彦，亘　弘 (1992. 10) ウシ血漿アルブミン・ゲル (BPA*-gel) の分子間交差緩和現象の研究。第20回日本磁気共鳴医学会（札幌）

33. 曽我美勝，恵良聖一，桑田一夫，恵良田知樹，田崎　明，松本元一，中上　寧，高崎昭彦，江尻和隆，梶原孝彦，亘　弘 (1992. 10) ウシ血漿アルブミンの溶液→ゲル変換における水構造変化の研究。第39回生理学会中部談話会（松本）

34. Seo Y & Murakami M (1992. 11) Relaxation of intracellular 23Na :relaxation mechanism of Na ion in agar gel analysed by pulsed field gradient NMR. 第31回 NMR 討論会（姫路）

35. 曽我美勝，惠良聖一，桑田一夫，加藤一夫，恵良田知樹，田崎　明，中上　寧，松本元一，高崎昭彦，亘　　弘 (1992. 11) タンパク質溶液→ゲル変換における水構造変化の研究。第31回 NMR 討論会（姫路）

36. 惠良聖一，桑田一夫，中村浩二，今井　一，曽我美勝，中上　寧，亘　　弘 (1992. 11) ^{1}N-NMR によるソフトコンタクトレンズ内の水構造の研究。第31回 NMR 討論会（姫路）

《細胞内代謝研究部門》

1. Kanno, T. & Habara, Y. (1992) Spatial dynamics of $[Ca^{2+}]_c$ during continuous stimulation with carbachol at different concentrations in adrenal chromaffin cells isolated from guinea-pig. J. Physiol 446 : 206p, Cambridge ＊＊＊

2. Habara, Y., Asada, N. & Kanno, T. (1992) Influence of pH on spatial dynamics of $[Ca^{2+}]_c$ during continuous stimulation with CCK-8 in rat pancreatic acinar cells in vivo. J Physiol 446 : 311p, Cambridge ＊＊＊

3. Kanno, T., Habara, Y. & Warashina, A. (1992) Discrimination of receptors on chromaffin cells by a Ca^{2+} image analyzing technique using fura-2. Jpn J Physiol 42 : suppl. S20, 秋田＊＊＊

4. Habara, Y. & Kanno, T. (1992) Intra- and intercellular propagation of Ca^{2+} tide in pancreatic acinus of the rat. Jpn J Physiol 42 : suppl. S24, 秋田＊＊＊

5. Saito, T. & Kanno, T. (1992) Influence of electrolyte transport inhibitors on $[Ca^{2+}]_c$ dynamcis induced by CCK-8 in rat pancreatic acini. Jpn J Physiol 42 : suppl. S44, 秋田＊＊＊

6. Asada, N., Habara, Y. & Kanno, T. (1992) Influence of extracellular pH changes on CCK-8 induced Ca^{2+} entry into pancreatic acinar cells. Jpn J Physiol 42 : suppl. S44, 秋田＊＊＊

7. Ohmori, T., Kuwahara, A., Ozaki, T. & Nokihara, K. (1992) Structure-Function relationships of substance K in the guinea-pig ileum. Gastroenterology 102 (4) : A938, San Francisco ＊＊＊

8. Kuwahara, A. & Kuwahara, Y. (1992) 5-hydroxytryptamine (5-HT) induced anion secretion in

guinea-pig distal colo. J Physiol (Lond.) 446 : 197, Cambridge ＊＊＊

9. Kadowaki, M., Nagakura, Y., Tokoro, K., Tomoi, M., Mori, J., Kohsaka, M. & Kuwahara, A. (1992) Effect of FK1052, A potent5-HT3 and 5-HT4 receptor antagonist, on gastrointestinal function. Gastroenterology 102 (4) : A739, San Francisco ＊＊＊

10. Kuwahara, A. & Kuwahara, Y., Tsutsui, I., Mochizuki, T. & Yanaihara, N. (1992) PACAP evokes chloride secretion in guinea-pig distal colon : Comparison with VIP. Regulatory Peptides 40 (2) : 189, Leuven ＊＊＊

11. Yanaihara, N., Mochizuki, T., Takatsuka, N., Iguchi, K., Hoshino, M., Yanaihara, C., G. Greeley Jr., Kuwahara, A. & Otsuka, M. (1992) Species variation of biological activities of galanin. Regulatory Peptides 40 (2) : 284, 静岡＊＊＊

12. Kuwahara, A., Sugiya, H. & Yanaihara, N. (1992) Synergistic epithelial chloride secretion via substance P and VIP. Regulatory Peptides : Suppl. 1 S95, 静岡＊＊＊

13. Ohmori, T., Kuwahara, A., Ozaki, T., Yanaihara, N., Takeda, Y. & Takeda, R. (1992) Substance P-evoked circular muscle contractions have a close connection with serotonergic neurons in guinea-pig ileum. Regulatry Peptides : Suppl, 1 S130, 静岡＊＊＊

14. Tsutsui, I., Kato, K., Furuya, K., Suzuki, T., Kuwahara, A. & Yanaihara, N. (1992) Intracellular Ca^{2+} dynamics and membrane electrical Properties of intestinal smooth muscle cells induced by substance P. Regulatory Peptides : Suppl. 1 S156, 静岡＊＊＊

15. Mochizuki, T., Ohshima, K., Kuwahara, A., Otsuka, M. & Yanaihara, N. (1992) Substance P analogues inhibit circular muscle contraction of guinea pig ileum and depolarization of new born rat spinal cord induced by substance P. Regulatory Peptides : Suppl. 1 S109, 静岡＊＊＊

16. Kuwahara, A. (1992) Effects of serotonin (5-HT) on ion transport of guinea-pig distal colon. Jpn J Physiol 42 : Suppl. S103, 秋田＊＊＊

17. Ohmori, T., Kuwahara, A., Ozaki, T. & Nokihara, K. (1992) Effects of Substance K and its derivatives on muscle activity in the guinea-pig ileum. Jpn J Physiol 42 : Suppl. S104, 秋田＊

＊＊

18. 佐藤洋一，石川一志，井内裕満，小野一幸，菅野富夫，葉原芳昭(1992)モルモットのハーダー腺の分泌機構について。解剖学雑誌 67：547，松山＊＊＊

19. 山口賢一，藁科　彬，葉原芳昭，菅野富夫(1992)ラット副腎皮質球状層細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼす電解質及び糖質コルチコイドの影響。第10回脳腸ホルモン学会抄録 p25，新潟＊＊＊

20. 藁科　彬，山口賢一，葉原芳昭，菅野富夫(1992)モルモット副腎髄質細胞の受容体刺激による Ca^{2+} 動員と分泌応答。第10回脳腸ホルモン学会抄録 p26，新潟＊＊＊

21. 葉原芳昭，菅野富夫(1992)分泌反応と細胞内 Ca^{2+} ―画像解析法による検討。第114回日本獣医学会ワークショップ“細胞膜を介するイオンの動きと細胞内情報伝達”第114回日本獣医学会要旨集 p94，札幌＊＊＊

22. 近藤　隆，葉原芳昭，菅野富夫，加納永一(1992) Ca^{2+} 代謝阻害剤による温熱増感と細胞内 Ca^{2+} 濃度変化。日本医学放射線学会雑誌 52：p1055，横浜＊＊＊

23. 近藤　隆，加納永一，葉原芳昭，菅野富夫(1992)ハイパーサーミア処理後のマウス乳癌細胞内 Ca^{2+} 濃度変化に関する画像解析法を用いた検討。第114回日本獣医学会ワークショップ“細胞膜を介するイオンの動きと細胞内情報伝達”第114回日本獣医学会要旨集 p94，札幌＊＊＊

24. 近藤　隆，葉原芳昭，菅野富夫，加納永一(1992)温熱による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化に関する画像解析法を用いた検討。第35回日本放射線影響学会講演要旨集 p273，大津＊＊＊

25. 桑原厚和(1992)末梢神経系における脳腸ペプチドの神経生理学的研究。第6回（平成2年度）サッポロ生物科学振興財団助成研究報告書 29-32

26. 葉原芳昭，菅野富夫(1992)ラット遊離膵腺房における細胞内カルシウムイオン濃度の時間的・空間的変動。生理学研究所年報 13：21-23

27. 熊倉鴻之助，菅野富夫(1992)マストパランによるクロマフィン細胞からのカテコールアミン放出と細胞内カルシウム変動。生理学研究所年報 13：24

28. 佐藤洋一，菅野富夫，葉原芳昭 (1992) ハーダー腺の分泌機構について。生理学研究所年報 13 : 197-200

29. 斎藤敏之，佐藤洋一，菅野富夫 (1992) 膵腺房細胞内 Ca^{2+} 濃度調節における電解質輸送系の役割。生理学研究所年報 13 : 202-204

30. 藁科　彬，山口賢一，葉原芳昭，菅野富夫 (1992) 分泌応答と細胞内遊離 Ca^{2+}。生理学研究所年報 13 : 204-205

31. 近藤　隆，加納永一，葉原芳昭，菅野富夫 (1992) 温熱による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化と細胞致死効果に関する研究。生理学研究所年報 13 : 205-206

32. 桑原厚和，尾崎　毅，山口正人，木村　幹 (1992) 神経ペプチドによる消化管運動制御機構に関する研究。生理学研究所年報 13 : 207

33. 小林　繁，菅野富夫，桑原厚和，葉原芳昭 (1992) 腸管運動の“ペースメーカー細胞”とその神経支配の形態学的同定。生理学研究所年報 13 : 249-250

34. 菅野富夫，葉原芳昭 (1992) 刺激—放出連関：新しい概念の展開。生理学研究所年報 13 : 369

35. 菅野富夫，葉原芳昭 (1992) CCK と膵外分泌反応：カルシウムシグナルの細胞内・細胞間伝播を中心に。生理学研究所年報 13 : 378-379

36. 浅田尚登，葉原芳昭，菅野富夫 (1992) 膵外分泌反応に及ぼす外液 pH の影響。生理学研究所年報 13 : 379

37. 菅野富夫，葉原芳昭 (1992) 副腎髄質細胞内カルシウム変動。生理学研究所年報 13 : 379-380

38. 斎藤敏之，菅野富夫 (1992) ラット脳スライス標本の呼吸代謝に及ぼす VIP の影響。生理学研究所年報 13 : 380

39. 丹羽光一，菅野富夫，葉原芳昭 (1992) 膵消化酵素放出と膵液イオン輸送機構 : CCK-8 の生理的濃度と薬理的濃度との作用機序との相違。生理学研究所年報 13 : 429

40. Yamashita, H., Sato, N., Yamamoto, M., Gasa, S., Nagasawa, J., Sato, Y., Habara, Y., Ishikawa, M., Segawa, M. & Ohno, H. (1992) Is there an intimate interplay between temperature-acclimation and exogenous insulin? — with special reference to the participation of brown adipose tissue. Integration of medical and sports sciences. Ed : Y. Sato, J. Poortmans, I. Hashimoto and Y. Oshida pp 237-242 Karger

41. Kuwahara, A., Kimura, K., Ozaki, T., Suzuki, T. & Yanaihara, N. (1992) Galanin as an inhibitory neurotransmitter in the regulation of muscle activities in the gastrointestinal tract. Gastrointestinal Function : Regulation and Disturbances. Excerpta Medica International Congress Series 986 Vol. 129-40 Excerpta Maedica Ltd Tokyo

《生体膜研究部門》

1．Kato, K., Tsutsui, I. & Yamagishi, S. (1992. 1) Ca^{2+}-dependent K^{+} current of guinea pig vas deferens. International Symposium "Smooth Muscle" (福岡)

2．Furuya, K., Enomoto, K., Maeno, T. & Yamagishi, S. (1992. 3) Mechanically-induced calcium signal in mammary epithelial cells. The 17th Seiriken Conference "Frontiers in Optical Neuroscience" (岡崎)

3．古家喜四夫，古家園子，山岸俊一 (1992. 4) 小腸絨毛下の筋繊維芽細胞における血管作動性及び神経伝達物質の作用。第69回日本生理学会大会（秋田）

4．榎本浩一，古家喜四夫，山岸俊一，前野　巍 (1992. 4) 乳腺，乳癌細胞の ATP 反応，細胞内カルシウムと IP_3。第69回日本生理学会大会（秋田）

5．山岸俊一，筒井泉雄，古家喜四夫，久木田文夫 (1992. 4) 細胞内アニオン条件による神経膜イオンコンダクタンス変化。第69回日本生理学会大会（秋田）

6．久木田文夫，美宅成樹 (1992. 4) 神経線維 Na チャネルに対するアルコールの結合部位。第69回日本生理学会大会（秋田）

7．筒井泉雄，古家喜四夫，佐藤茂基，榎本浩一 (1992. 4) Lab Master AD/DA ボードを用いたパッチクランプ用インターフェースボックスの製作。第69回日本生理学会大会（秋田）

8．加藤健一，筒井泉雄，山岸俊一 (1992. 4) モルモット精管単離平滑筋の Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネル。第69回日本生理学会大会（秋田）

9．Enomoto, K., Furuya, K. & Yamagishi, S. (1992. 9) Mechanically-induced calcium wave and release of stimulatnts in mammary epithelial cells. International Workshop on Salivary Secretion （岡崎）

10. 古家喜四夫，古家園子，山岸俊一 (1992. 10) 小腸絨毛下の筋繊維芽細胞の形態変化と細胞内カルシウム反応。第39回中部生理学談話会（松本）

11. 古家喜四夫，古家園子，山岸俊一 (1992. 10) エンドセリンによる小腸絨毛下の筋繊維芽細胞の細胞内カルシウム反応と形態変化。日本生物物理学会第30回年会（大阪）

12. 久木田文夫，Brown, E. (1992. 10) ヤリイカ巨大軸索のシュワン細胞の性質。日本生物物理学会第30回年会（大阪）

13. 加藤健一，筒井泉雄，山岸俊一 (1992. 10) モルモット精管単離平滑筋細胞の自発的外向き電流。日本生物物理学会第30回年会（大阪）

14. 筒井泉雄，山岸俊一 (1992. 10) ヤリイカ巨大神経 Cl チャネルの細胞内アニオンによる制御。日本生物物理学会第30回年会（大阪）

15. 山口和彦，古家喜四夫，赤川公夫 (1992. 12) 神経突起伸長とカルシウムチャネル。第16回日本神経科学会（大阪）

《機能協関研究部門》

1．Kubo, M., Oiki, S., Horie, M., Morishima, S. & Okada, Y. (1992) Fatty acid-sensitivity of volume-regulatory Cl^- currents in an intestinal epithelial cell line. Jpn J Physiol 42 (Supplement) : S22 （第69回日本生理学会大会）（秋田）

2．Tatsuta, H., Ueda, S. & Okada, Y. (1992) Arachidonic acid accelerates inactivation of the voltage-gated K^+ currents in villus enterocytes isolated from guinea pig small intestine. Jpn J Physiol 42 (Supplement) : S22 （第69回日本生理学会大会）（秋田）

3. Tsuura, Y., Ishida, H., Horie, M., Okada, Y., Seino, Y. & Imura, H. (1992) Properties of ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic B cells of rats with streptozotocin-induced NIDDM. Jpn J Physiol 42 (Supplement) : S27 (第69回日本生理学会大会) (秋田)

4. Tominaga, M., Matsumori, A., Horie, M. & Okada, Y. (1992) Activation of Ca^{2+}-permeable cation channels by anti-heart antibody. Jpn J Physiol 42 (Supplement) : S52 (第69回日本生理学会大会) (秋田)

5. Sakai, H., Okada, Y. & Takeguchi, N. (1992) Activation of Cl^- channels in parietal cells by arachidonic acid and prostaglandin E_2. Jpn J Physiol 42 (Supplement) : S92 (第69回日本生理学会大会) (秋田)

6. Oiki, S., Takumi, T., Okada, Y. & Nakanishi, S. (1992) Alterations of slow potassium channel gating by a neutral amino acid substitution within the transmembrane domain. Jpn J Physiol 42 (Supplement) : S93 (第69回日本生理学会大会) (秋田)

7. Kitano, T., Hazama, A., Sugiyama, H. & Okada, Y. (1992) Volume-sensitivity of ion channel currents in B-lineage cells. Cell Struct Funct 17 : 489 (第45回日本細胞生物学会大会) (徳島)

8. Hazama, A., Rabe, A. & Froemter, E. (1992) Involvement of large conductance Cl^- channels in outwardly rectifying Ca-mediated Cl^- conductance of HT29 cells. Pflugers Arch 420, Suppl. 1 R6

9. Terakawa, S. & Kumakura, K. (1992) Exocytosis of a synapse visualized by simultaneous microscopy of Ca-imaging and DIC imaging. Neurosci Res Suppl. 17 p78

10. Terakawa, S., Manivannan, S. & Kumakura, K. (1992) Exocytosis in the growth cone of differentiated chromaffin cells induced by electrical stimulation. 17th Seiriken Conference "Part I : Frontiers in Optical Neuroscience" (Okazaki)

11. Manivannan, S. & Terakawa, S. (1992) Rapid filopodial sprouting induced by electrical stimulation in nerve terminals. 17th Seiriken Conference "Part I : Frontiers in Optical Neuroscience" (Okazaki)

12. Kumakura, K., Ohara-Imaizumi, M., Muramatsu, S., Terakawa, S. & Kanno, T. (1992) Masto-

paran evokes exocytosis without Ca^{2+} movement in adrenal chromaffin cells. 17th Seiriken Conference "Part I : Frontiers in Optical Neuroscience" (Okazaki)

13. Xu, K. & Terakawa, S. (1992) Saltatory conduction and a novel type of excitable fenestra in shrimp myelinated nerve fibers. 17th Seiriken Conference "Part II : Comparative Neurophysiology" (Okazaki)

14. 寺川　進，村上政隆 (1992) ツバイ唾液腺の水と粘液分泌。第69回日本生理学会大会（秋田）

15. 寺川　進 (1992) 唾液分泌に際する導管の脈動運動：ビデオマイクロスコピー観察。第69回日本生理学会大会（秋田）

16. シャンティ・マニバナン，寺川　進 (1992) 培養神経細胞の成長端フィロポディアに対する電気刺激の効果。第69回日本生理学会大会（秋田）

17. 寺川　進 (1992) 細胞生理学の先祖帰り：VEC-DIC による細胞生理反応の解析。メディカルフォトニクスワークショップ（浜松）

18. 寺川　進 (1992) シナプス可塑性のビデオマイクロスコピーによる研究。重点領域研究「中枢シナプスの分子生物学」班会議（東京）

19. 寺川　進 (1992) エキソサイトーシス反応の定量的解析。第1回日本バイオイメージング学会学術集会講演要旨集 pp 10-11 （東京）

20. 寺川　進 (1992) 超高倍率における微分干渉像と Ca 信号像の同時観察。第1回日本バイオイメージング学会学術集会講演要旨集 pp 36-37 （東京）

21. 寺川　進，熊倉鴻之助 (1992) 神経終末のエキソサイトーシス効率を変化させる因子。第30回日本生物物理学会年会講演予稿集 S172 （大阪）

22. 寺川　進 (1992) 超高倍微分干渉法と蛍光法によるエキソサイトーシスと Ca シグナルの同時イメージング。第30回日本生物物理学会年会講演予稿集 S199 （大阪）

23. 寺川　進，村上政隆，徐　　科 (1992) ツバイ唾液腺の水分泌とエキソサイトーシス　—アゴニスト依存性—。生理学研究所年報 13 : 39-43

24. 寺川　進，徐　　科 (1992) ツバイ唾液腺の水分泌とエキソサイトーシス　—舌下腺における粘液と水の脈動的分析—。生理学研究所年報 13 : 43-46

25. 寺川　進，シャンティ・マニバナン (1992) 成長円錐に見られるフィロポディアの電気刺激による変化。生理学研究所年報 13 : 46-49

26. 上條　篤，寺川　進 (1992) エキソサイトーシス反応の可視化によるラット鼻腺及び鼻上皮杯細胞のアゴニスト決定と分泌様式の確定。生理学研究所年報 13 : 49-53

27. 寺川　進，熊倉鴻之助 (1992) Ca 像と微分干渉像の同時観察法によって可視化したシナプスのエキソサイトーシス。第16回日本神経科学学会（大阪）

28. Terakawa, S. & Kumakuta, K. (1992) How transmitters are released : video-microscopic elucidation in the chromaffin cell and its nerve terminals. Gifu Neuorbiology Symposium : Mechanism and regulation of neurotransmitter release. No. 22 Paris (Gif-sur-Yveet)

29. Terakawa, S., Manivannan, S. & Kumakuta, K. (1992) Exocytosis in nerve terminals of the cultured bovine chromaffin cell studied at a single granule level. J Physiol 446 : 205P (Cambridge)

30. Nakayama, T. & Furuya, S. (1992) Photoreceptor cell polarity — Lectin binding study. Neurochem Res 17 : 628

31. 古家園子，中山　孝 (1992) マッシュルーム・レクチンの視細胞における結合部位。日本解剖学会誌 67 (4) : 558

《神経情報研究部門》

1．宮村　毅，池中一裕，長谷純宏，加藤郁之進，御子柴克彦 (1992. 5) マウス胎仔大脳皮質細胞表面の糖転移酵素の研究。第25回発生生物学会（横浜）

2．池中一裕 (1992. 6) 脳神経発生過程の遺伝的制御。名古屋大学農学部生化学制御研究施設セミナー（名古屋）

3．近藤哲朗，池中一裕，藤本一朗，田口隆久，川崎隆史，葛西道雄，御子柴克彦 (1992. 10) 第65回日本生化学会大会（福岡）

4．宮村　毅，池中一裕，長谷純宏，辻　崇一，加藤郁之進，御子柴克彦 (1992. 10) マウス胎仔大脳皮質細胞表面の糖転移酵素の研究。第65回日本生化学会大会（福岡）

5．鹿川哲史，池中一裕，栗山茂樹，岡野栄之，有賀　純，中尾純治，御子柴克彦 (1992. 10) トランスジェニックマウスを用いたミエリンプロテオリピド蛋白質遺伝子産物のグリア分化因子としての機能。第35回日本神経化学会大会（名古屋）

6．中尾純治，池中一裕，鹿川哲史，Seung U. Kim, 御子柴克彦 (1992. 10) PLP 遺伝子産物のオリゴデンドロサイト分化促進因子としての機能解析。第35回日本神経化学会大会（名古屋）

7．仲嶋一範，池中一裕，鹿川哲史，有賀　純，中尾純治，中平健祐，塩田千代，Seung U. Kim, 御子柴克彦 (1992. 10) 胎生期に発現するミエリン塩基性蛋白質の新しいアイソフォームの発見。第35回日本神経化学会大会（名古屋）

8．鹿川哲史，池中一裕，栗山茂樹，岡野栄之，有賀　純，中尾純治，御子柴克彦 (1992. 10) グリア分化因子としてのミエリンプロテオリピド蛋白質遺伝子産物の機能。第45回日本細胞生物学会大会（徳島）

9．中平健祐，池中一裕，仲嶋一範，森田規之，御子柴克彦 (1992. 10) レトロウイルスベクターを用いた脳神経系に特異的なプロモーターの解析。第45回日本細胞生物学会大会（徳島）

10. Nakajima, K., Ikenaka, K., Kagawa, T., Aruga, J., Nakao, J., Nakahira, K., Shiota, C., Kim, S. U. & Mikoshiba, K. (1992. 10) Novel isoforms of mouse myelin basic protein predominantly expressed in embryonic stage. 22nd Annual Meeting. Society for Neuroscience. (Anaheim)

11. Kondo, T., Ikenaka, K., Fujimoto, I., Aimoto, S., Kato, H., Ito, K., Taguchi, T., Morita, T., Kasai, M. & Mikoshiba, K. (1992. 10) K^+ Channel involvement in induction of synaptic enhancement by mast cell degranulating (MCD) peptide. 22nd Annual Meeting. Society for Neuroscience. (Anaheim)

12. 鹿川哲史 (1992. 11) PLP 遺伝子導入マウス。1992年度遺伝性脳神経疾患動物研究会例会（大阪）

13. 池中一裕，鹿川哲史，中尾純治，有賀　純，岡野栄之，御子柴克彦 (1992. 11) 遺伝性脱髄性疾患発病の分子機構。平成4年度厚生省精神・神経疾患研究遺伝子関連合同シンポジウム（東京）

14. 中平健祐 (1992. 12) 脳神経系における遺伝子発現。霊長類研究所共同利用研究ミニ研究会（犬山）

15. Ikenaka, K. (1992. 11) Tissue-specific expression of foreing genes using retrovirus vectors. 第5回日本動物細胞工学会大会（大宮）

16. Fujimoto, I., Ikenaka, K., Kondo, T., Kato, H., Ito, K. & Mikoshiba, K. (1992. 12) Molecular mechanism underlying LTP-induction by MCD. 第16回日本神経科学会大会（大阪）

17. 大塚輝彌 (1992. 3) 動物実験のライセンス。シンポジュウム「生命科学における動物実験の現状と将来像」日本比較生理生化学会第4回研究会（東京）

18. 日高　聡，橋本葉子，大塚輝彌 (1992. 4) 錐体視細胞の機能的配列。第69回日本生理学会大会（秋田）

19. 平野　穣，大塚輝彌，野本茂樹 (1992. 7) ハト網膜の遠心性神経の標的細胞の同定。第3回日本比較生理生化学会大会（鹿児島）

20. 大塚輝彌 (1992. 9) 免疫組織化学による錐体視細胞の同定。第40回日本臨床視覚電気生理学会大会（大山）

《液性情報研究部門》

1．Tsukita, Sh. (1992. 1) Signal transduction in cell-to-cell adherens junctions. 日米癌研究協力事業　セミナー「リンパ球の分化および活性化とその修飾」(San Diego)

2．月田承一郎 (1992. 1) 細胞間接着の制御と情報伝達。京都大学胸分泌結核研シンポジウム（京都）

3．Tsukita, Sh., Tsukita, Sa., Nagafuchi, A. (1992. 2) Regulation and signal transduction in cell-

to-cell adherens junctions. 第2回日米癌学会合同会議（ホノルル）

4．月田承一郎 (1992. 4) アクチンフィラメントと細胞膜の結合様式。日本解剖学会シンポジウム（松山）

5．月田承一郎 (1992. 4) 細胞間接着装置の構造と機能。日本電顕皮膚科学会特別講演（奈良）

6．永渕昭良 (1992. 5) カドヘリンの構造・機能及びその調節機構。日本発生生物学会第25回大会　シンポジウム（横浜）

7．小田広樹，上村　匡，塩見健輔，永渕昭良，月田承一郎，竹市雅俊 (1992. 5) カドヘリン結合蛋白質αカテニンのショウジョウバエ相同分子。日本発生生物学会第25回大会（横浜）

8．Tsukita, Sh. (1992. 1) Signal transduction in cell-to-cell adherens junctions. Presented at 2nd Hiroshima Cancer Seminar "Carcinogenesis and Metastasis" (Hiroshima)

9．Tsukita, Sh., Tsukita, Sa., Nagafuchi, A. & Yonemura, S. (1992. 6) Cell-cell adhesion and protein-tyrosine kinase. Presented at 1st IUBMB Conference : Symposium "Protein Kinase and Phosphatase" (Nagoya)

10. 月田承一郎 (1992. 7) カドヘリンを介した細胞間接着の制御と情報伝達。Cell Biology of the Liver 御殿場コロキアム（御殿場）

11. 月田承一郎 (1992. 7) カドヘリン分子の情報伝達と接着制御をつかさどる分子群。日本癌学会シンポジウム「癌転移の分子機構とその制御」（東京）

12. Tsukita, Sh., Tsukita, Sa., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Funayama, N., Itoh, M. & Sato, N. (1992. 7) Molecular architecture and signal transduction in cell-to-cell adherens junctions. Presented at 5th International Congress on Cell Biology. Symposium "Adhering Junctions" (Madrid)

13. Tsukita, Sa., Sato, N., Funayama, N., Nagafuchi, A., Yonemura, S. & Tsukita, Sh. (1992. 7) Identification and characterization of radixin. A band 4.1-like actin-modulating protein. Presented at 5th International Congress on Cell Biology. Workshop "Membrane-Cytoskeleton Interaction" (Madrid)

14. Sato, N., Funayama, N., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, Sa. & Tsukita, Sh. (1992. 7) A gene family consisting of ezrin, radixin, and moesin. Presented at 5th International Congress on Cell Biology. (Madrid)

15. 月田承一郎 (1992. 8) 細胞間接着の制御と情報伝達。7th Biomedicine Symposium "Vascular Biology" (御殿場)

16. 月田承一郎 (1992. 8) カドヘリンを介した細胞間接着の制御機構。第3回高遠シンポジウム (高遠)

17. 月田早智子 (1992. 8) 細胞間接着の制御とシグナル伝達。ビタミンK機能セミナー (東京)

18. Tsukita, Sh. (1992. 9) Regulation and signal transduction of cadherin-based cell-cell adhesion. Presented at Tsumagoi Conference '92. (Tsumagoi)

19. 月田承一郎 (1992. 9) カドヘリンを介した細胞間接着の制御とシグナル伝達。日本癌学会第51回総会　シンポジウム「細胞周期と増殖のシグナルパスウェイ」(大阪)

20. 伊藤雅彦，木谷宝子，永渕昭良，月田承一郎 (1992. 10) カドヘリンを介した接着部位に濃縮する 220kD 裏打ち蛋白質の解析。第45回日本細胞生物学会大会 (徳島)

21. 月田承一郎，竹田　寛，伊藤雅彦，永渕昭良，月田早智子 (1992. 10) 温度感受性 v-src を強制発現させた上皮細胞の細胞間接着装置の動態。第45回日本細胞生物学会大会 (徳島)

22. 船山典子，永渕昭良，笠原英子，月田早智子，月田承一郎 (1992. 10) 発現系を用いたラディキシンの機能解析。第45回日本細胞生物学会大会 (徳島)

23. 竹内恒成，永渕昭良，月田承一郎 (1992. 10) Band 4. スーパーファミリーの新しい分子群の検索。第45回日本細胞生物学会大会 (徳島)

24. 相良淳二，河合明彦，月田早智子，米村重信，月田承一郎 (1992. 10) 狂犬病ウイルスと Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) ファミリー蛋白質。第45回日本細胞生物学会大会 (徳島)

25. 月田早智子，大石久美子，佐藤成樹，月田承一郎 (1992. 10) 狂犬病ウイルスを利用した ERM 結合膜蛋白質の同定。第45回日本細胞生物学会大会 (徳島)

26. 永渕昭良，石原　悟，伊藤雅彦，月田早智子，月田承一郎 (1992. 10) 細胞骨格を介したカドヘリンの機能調節機構。第45回日本細胞生物学会大会　シンポジウム「シグナル伝達と細胞骨格」（徳島）

27. 米村重信，佐藤成樹，永渕昭良，船山典子，月田早智子，月田承一郎 (1992. 10) 分裂溝における細胞膜―アクチン線維相互作用：分裂溝に濃縮するアクチン調節蛋白質と膜蛋白質。第45回日本細胞生物学会大会　シンポジウム「細胞質分裂の分子機構：最近の展開」（徳島）

28. 月田承一郎，月田早智子，永渕昭良，米村重信 (1992. 10) 細胞接着の情報伝達機構と細胞骨格。第65回日本生化学介大会　シンポジウム「細胞増殖制御の生化学」（福岡）

29. Tsukita, Sh., Tsukita, Sa., Nagafuchi, A. & Yonemura, S. (1992. 10) Signal transduction and regulation of cadherin-based cell adhesion. Presented at 7th Rinshoken International Conference "Mechanisms of Intercellular Signaling — Adhesion molecules and cytokine receptors" (Tokyo)

30. 月田承一郎 (1992. 11) カドヘリン分子を裏打ちする蛋白質群と細胞のがん化および転移機構。Japanese Cancer Research Resources Bank Symposium 特別講演（東京）

31. 月田承一郎 (1992. 11) カドヘリンを介した細胞間接着の制御機構。文部省重点領域研究公開シンポジウム「血管内平平滑筋」（東京）

32. 永渕昭良，月田承一郎 (1992. 12) カドヘリン機能制御の役割。第15回日本分子生物学会年会（京都）

33. Tsukita, Sh. (1992. 12) Signal transduction in cell-to-cell adherens junctions. Presented at 7th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience (Kyoto)

《高次神経性調節研究部門》

1. Hikosaka, O. (1992. 4) Function of the basal ganglia. 第69回日本生理学会大会（秋田）

2. Miyashita, N. & Hikosaka, O. (1992. 4) Stimulation of the monkey caudate nucleus induces a short-latency contraversive change in saccadic velocity. 第69回日本生理学会大会（秋田）

3. Miyauchi, S., Hikosaka, O. & Shimojo, S. (1992. 5) Visual attention field can be assessed by illusory line motion sensation. Association for research in vision and ophthalmology Annual Spring Meeting (Florida, USA)

4. Shimojo, S., Miyauchi, S. & Hikosaka, O. (1992. 5) Visual motion sensation yielded by non-visually driven attention. Association for research in vision and ophthalmology, Annual Spring meeting (Florida, USA)

5. 彦坂興秀 (1992. 7) 大脳基底は何のためにあるのか？— 〈仮説〉。第 7 回日本大脳基底核研究会（岡崎）

6. 加藤　誠 (1992. 7) 淡蒼球における眼球運動関連ニューロンの活動。第 7 回日本大脳基底核研究会（岡崎）

7. 宮下暢夫 (1992. 7) 尾状核—黒質網様部—上丘系による眼球運動の制御。第 7 回日本大脳基底核研究会（岡崎）

8. Shimojo, S., Miyauchi, S. & Hikosaka, O. (1992. 8) Voluntary and involuntary attention detected by the line motion effect. 15th European Conference on Visual Perception (Pisa, Italy)

9. Hikosaka, O. (1992. 10) Role of basal ganglia in control of innate movements, learned behavior and congnition — a hypothesis. International Basal Ganglia Society Fourth Triennial Meeting (Giens, France)

10. Kato, M. & Hikosaka, O. (1992. 10) Saccadic responses of external pallidal neurons in monkey. International Basal Ganglia Society Fourth Triennial Meeting (Giens, France)

11. Miyashita, N. & Hikosaka, O. (1992. 10) Neural mechanism of saccades controlled by monkey caudate nucleus. International Basal Ganglia Society Fourth Triennial Meeting (Giens, France)

12. Segawa, M., Hikosaka, O., Fukuda, H., Uetake, K. & Nomura, Y. (1992. 10) Deficits in saccadic eye movements in basal ganglia disorders. International Basal Ganglia Society Fourth Triennial Meeting (Giens, France)

13. Kato, M. & Hikosaka, O. (1992. 12) Saccade-related responses of external pallidal neurons in

monkey. 第16回日本神経科学学会（大阪）

14. Miyauchi, S., Hikosaka, O., Nakamura, K. & Shimojo, S. (1992. 12) Somatosensory stimulation induces visual attention — an evoked potential study. 第16回日本神経科学学会（大阪）

15. Fukuda, H. & Hikosaka, O. (1992. 12) Rapid eye movements during sleep in monkeys — comparison with saccades. 第16回日本神経科学学会（大阪）

16. Kato, M. & Hikosaka, O. (1992) Saccadic responses of external pallidal neurons in monkey. International Basal Ganglia Society Fourth Triennial Meeting Abstracts : 44

17. Miyashita, N. & Hikosaka, O. (1992) Neural mechanism of saccades controlled by monkey caudate nucleus. International Basal Ganglia Society Fourth Triennial Meeting Abstracts : 57

18. Segawa, M., Hikosaka, O., Fukuda, H., Uetake, K. & Nomura, Y. (1992) Deficits in saccadic eye movements in basal ganglia disorders. International Basal Ganglia Society Fourth Triennial Meeting Abstracts : 71

19. 彦坂興秀 (1992) 大脳基底核は何のためにあるのか？—〈仮説〉。第 7 回日本大脳基底核研究会抄録集

20. 加藤　誠 (1992) 淡蒼球における眼球運動関連ニューロンの活動。第 7 回日本大脳基底核研究会抄録集

21. 宮下暢夫 (1992) 尾状核—黒質網様部—上丘系による眼球運動の制御。第 7 回日本大脳基底核研究会抄録集

《生体システム研究部門》

1．山口和彦 (1992. 4) 哺乳動物神経細胞の成長円錐におけるイオンチャネル。第69回日本生理学会大会（秋田）

2．赤川公朗，山口和彦，中山　孝，井上明宏 (1992. 10) 神経細胞形質膜蛋白質 HPC-1 の機能解析。第35回日本神経化学会大会（名古屋）

3．山口和彦，古家喜四夫，赤川公朗 (1992. 12) 神経突起伸長と Ca^{2+} チャネル。第16回日本神経科学学会　ワークショップ（大阪）

4．山口和彦　培養したラット後根神経節細胞成長円錐部膜電流に対するアラキドン酸の効果。第16回日本神経科学学会（大阪）

5．赤川公朗，山口和彦，中山　孝 (1992. 12) 神経細胞膜蛋白質 HPC-1 の機能。第16回日本神経科学学会（大阪）

《高次液性調節研究部門》

1．相沢　寛，丹治　順 (1992. 4) 一次運動野の個々の神経細胞の活動特性と入力との相関。第69回日本生理学会大会（秋田）

2．嶋　啓節，進藤克博，丹治　順 (1992. 4) 運動課題遂行時のサル大脳皮質運動関連領野のニューロン活動に対するグルタミン酸受容体拮抗薬の効果。第69回日本生理学会大会（秋田）

3．Inase, M., Buford, J. A. & Anderson, M. E. (1992. 10) Changes in the thalamic cell discharge after injection of muscimol into the globus pallidus. Society for Neuroscience, 22nd Annual Meeting (Anaheim, USA)

4．Buford, J. A., Inase, M. & Anderson, M. E. (1992. 10) Microexcitable zones in the thalamus are separate from pallidal-receiving neurons. Society for Neuroscience, 22nd Annual Meeting (Anaheim, USA)

5．徳野博信，丹治　順 (1992. 12) 二重標識法によるサル一次運動野上肢領域入力の解析。第16回日本神経科学学会（大阪）

《統合生理研究施設》

1．Sasaki, K. (1992. 6) Electrophysiological and biomagnetic studies on the frontal association cortex in relation to voluntary movement. Lectures on Dynamic Approaches to Higher Brain Function.（岡崎）

2. Sasaki, K. (1992. 11) Cerebro-cerebellar interaction in voluntary movement. VIIIth TMIN International Symposium : Role of the Cerebellum and Basal Ganglia in Voluntary Movement. (東京)

3. Sasaki, K. (1992. 11) Activity of the prefrontal cortex on no-go decision and motor suppression. Colloques Medicine et Recherche : Motor and Cognitive Functions of the Prefrontal Cortex. (Paris)

4. 佐々木和夫 (1992. 2) 動物の局所脳電場とヒトの脳磁場。第1回脳磁図研究会（東京）

5. 佐々木和夫 (1992. 3) 随意運動の発現・制御と脳。千里ライフサイエンスセミナー，ブレインサイエンスシリーズ第3回：高次脳活動（豊中）

6. 佐々木和夫，玄番央恵，南部　篤，松崎竜一 (1992. 4) No-go 電位の局在について。第69回日本生理学大会（秋田）

7. 佐々木和夫，玄番央恵，南部　篤，松崎竜一 (1992. 6) No-go 電位の電気生理学的および磁気生理学的研究。第7回日本生体磁気学会（福岡）

8. 佐々木和夫 (1992. 8) 大脳—小脳連関。第95回日本医学会シンポジウム：小脳—新しい治療法をめざして—（箱根）

9. 佐々木和夫 (1992. 10) 脳と随意運動。加藤記念財団シンポジウム（東京）

10. Nambu, A. (1992. 1) Movement-related activity in pallido-thalamo-cortical loop. International Symposium : Voluntary Motor Control by the Brain. (岡崎)

11. Nambu, A., Matsuzaki, R., Gemba, H. & Sasaki, K. (1992. 11) Magnetic fields in the cerebral cortex during visually-initiated finger movements in human. VIIIth TMIN International Symposium : Role of the Cerebellum and Basal Ganglia in Voluntary Movement. (東京)

12. 南部　篤，Llinas, R. R. (1992. 4) モルモット淡蒼球の電気生理学的，形態学的研究。第69回日本生理学大会（秋田）

13. 南部　篤，松崎竜一，玄番央恵，佐々木和夫 (1992. 5) 随意運動に伴う脳活動の磁気計測。

第31回日本エム・イー学会大会（東京）

14. 南部　篤 (1992. 7) 淡蒼球―視床―皮質路。第７回日本大脳基底核研究会（幸田町）

15. 南部　篤，松崎竜一，玄番央恵，佐々木和夫 (1992. 12) 視覚始動性反応時間運動に伴うヒト大脳皮質の磁場活動。第16回日本神経科学学会（大阪）

16. Jinnai, K., Nambu, A. & Tanibuchi, I. (1992. 11) Pallidal and cerebellar output through the thalamus to the primary and supplementary motor areas of the monkey. VIIIth TMIN International Symposium : Role of the Cerebellum and Basal Ganglia in Voluntary Movement. （東京）

17. Okada, Y., Kyuhou, S. & Xu, C. (1992. 3) Tissue current associated with spreading depression inferred from magnetic field recordings. (Münster)

18. 栗城真也 (1992. 2) 聴覚誘発 MEG の多チャンネル計測。第１回脳磁図研究会（東京）

19. 栗城真也 (1992. 3) 脳磁図を応用した脳機能の解析。脳神経外科手術・機器研究会（札幌）

20. 竹内文也，大城　理，栗城真也 (1992. 5) 脳磁図計測がめざすもの―聴性誘発脳磁図の計測と脳内電源推定―。日本 ME 学会大会（東京）

21. 竹内文也，栗城真也，松島純一，伊福部達 (1992. 5) 耳鳴治療による聴覚誘発脳磁界応答の変化。日本 ME 学会大会（東京）

22. 大城　理，鎌田恭輔，竹内文也，栗城真也 (1992. 5) 脳磁界と３次元 MRI による脳の機能的および解剖学的表示。日本 ME 学会大会（東京）

23. 小林哲生，栗城真也 (1992. 5) 視野闘争モデル解析による統計的性質説明の試み。日本 ME 学会大会（東京）

24. 盛田　稔，小林哲生，栗城真也 (1992. 5) 視野闘争における脳波 α 波の減衰率分布の解析。日本 ME 学会大会（東京）

25. Kuriki, S. (1992. 6) MEG stuties on central processes of visual and auditory information. Lecture on Dynamic Approaches to Higher Brain Function. Research Group of Integrative Studies

on Physiological Functions (Okazaki)

26. 栗城真也，竹内文也 (1992. 6) 脳磁図イメージングと逆問題—聴性誘発脳磁図の計測と脳内電源推定—。日本生体磁気学会大会（福岡）

27. 鎌田恭輔，竹内文也，宝金清博，会田敏光，阿部　弘，栗城真也，小岩光行，柏葉　武 (1992. 6) SEF と 3 次元 MRI による脳外科手術 navigation の試み。日本生体磁気学会大会（福岡）

28. 大城　理，竹内文也，栗城真也 (1992. 6) 母音刺激による聴覚誘発脳磁界の計測と信号源推定。日本生体磁気学会大会（福岡）

29. 小林哲生，竹内文也，栗城真也 (1992. 6) 母音刺激誘発脳磁界の動的シミュレーション。日本生体磁気学会大会（福岡）

30. 竹内文也，栗城真也 (1992. 7) 単音節音声刺激による誘発脳磁界源位置の動的変化。非侵襲脳機能局在研究会（東京）

31. 村上新治，宮沢仁朗，藤井　充，深津　亮，高畑直彦，栗城真也 (1992. 7) 頭頂連合野における視覚誘発脳磁界反応。非侵襲脳機能局在研究会（東京）

32. 栗城真也 (1992. 9) ヒト聴覚中枢の機能と脳磁界。無侵襲計測会議シンポジウム（大阪）

33. 栗城真也 (1992. 10) 脳電位発生源の非侵襲的検査法—脳磁図による脳電位発生源の推定—。日本脳波・筋電図学会大会（東京）

34. 小林哲生，竹内文也，栗城真也 (1992. 10) 主成分分析を用いた母音刺激誘発脳磁界の時空間的解析。電気関係学会北海道支部連合大会（北見）

35. 竹内文也，栗城真也 (1992. 10) 多チャンネル SQUID 磁束計による単音節母音誘発脳磁界の計測と解析。電気関係学会北海道支部連合大会（北見）

36. 盛田　稔，小林哲生，栗城真也，松本伍良 (1992. 10) 競合図形間で生ずる視野闘争時における α 波の減衰率分布の解析。電気関係学会北海道支部連合大会（北見）

37. 藤巻則夫，竹内文也，小林哲生，栗城真也，蓮尾信也 (1992. 10) Silent speech における事象関連脳波。電気関係学会北海道支部連合大会（北見）

38. 伊井雅一，小林哲生，栗城真也 (1992. 10) 脳磁界計測を目的とした 3 次元形状計測表示システムの構築。電気関係学会北海道支部連合大会（北見）

39. 小林哲生，竹内文也，栗城真也 (1992. 10) 母音刺激誘発脳磁界の動的シミュレーション（第 2 報)。日本 ME 学会北海道支部大会（旭川）

40. 竹内文也，栗城真也 (1992. 10) 多チャンネル SQUID 磁束計による純音誘発脳磁界の計測。日本 ME 学会北海道支部大会（旭川）

41. 柿木隆介，河野　宏，遠藤智代子，音成龍司，黒田康夫 (1992. 1) Werner 症候群における神経生理学的検索。第 1 回痴呆と脳波研究会（東京）

42. 柿木隆介，柴崎　浩 (1992. 5) 振動および運動による疼痛軽減の作用機序。第33回日本神経学会総会（鹿児島）

43. Kakigi, R., Kuroda, Y. & Shibasaki, H. (1992. 6) Pain-related somatosensory evoked potentials following CO_2 laser stimulation in myelopathy. Fifth International Symposium on Spinal Cord Monitoring (London, U. K.)

44. 柿木隆介 (1992. 10) Down 症候群における誘発電位（シンポジウム　痴呆患者における誘発電位)。第22回日本脳波・筋電図学会（東京）

《生体機能検査室》

1．成瀬　達，鈴木貴祐，尾崎　毅 (1992. 4) 食後の胃血流増加。第69回日本生理学会大会（秋田）

2．鈴木貴祐，成瀬　達，矢内原昇 (1992. 4) PACAP の膵外分泌刺激作用。第69回日本生理学会大会（秋田）

3．成瀬　達 (1992. 4) 食後の一過性胃血流増加。第78回日本消化器病学会総会（東京）

4．成瀬　達(1992. 5) 神経ペプチドによる血流調節。第65回日本内分泌学会学術総会（徳島）

5．Naruse, S. & Ozaki, T. (1992. 7) Postprandial gastric hyperemia. Third FASEB Summer Research Conference (Copper Mountain)

6．Naruse, S., Ozaki, T. & Nokihara, K. (1992. 9) Vasodilatory effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its related peptides. Ninth International Symposium on Gastrointestinal Hormones (Leuven)

7．成瀬　達(1992. 10) エルカトニンの食餌刺激胃酸分泌抑制作用。第34回日本消化器病学会大会（宇都宮）

《組織培養標本室》

1．古家園子，中山　孝(1992. 4) マッシュルーム・レクチンの視細胞における結合部位。第97回日本解剖学会総会（愛媛）

2．Furuya, S., Furuya, K. & Nakayama, T. (1993. 3) The structure and function of cultured subepithelial fibroblasts of rat intestinal villi: Conference on Biological Structure (San Diego)

3．Furuya, S., Naruse, S., Nakayama, T., Furuya, K. & Nokihara, K. (1992. 11) Localization of intravenously injected ^{125}I-endothelin-1 in rat tissues observed by electron microscopic radioautography. Monbusho International Scientific Research Program 1990-1992, "Biosynthesis and Physiological Actions of Vasoactive Peptides" (Kyoto)

《磁気共鳴装置室》

1．吉田敬義，亘　　弘(1992. 4) 長距離選手と健常者のインターバル運動中における筋エネルギー代謝の比較。第69回日本生理学会大会（秋田）

2．Hirakawa K, Yoshizaki K, Morimoto & Watari H (1992. 8) The transition from aerobic to anaerobic metabolism during exercise in human skeletal muscle studied by ^{31}P-MRS and electromyography. Book of Abstracts, Soc Magn Reson Med, 11th Annual Meeting (Berlin)

3．Yoshizaki K, Arizono N & Watari H (1992. 8) Histamine secretion associated with lactate production in mast cells detected by ^{1}H-NMR. Book of Abstracts, Soc Magn Reson Med, 11th Annual Meeting (Berlin)

4．Sogami M, Era S, Kuwata K, Erata T, Tasaki A, Kato K, Matsumoto G, Nakagami Y & Watari H (1992. 8) Intermolecular cross-relaxation in bovine plasma albumin gel (BPA *-gel)-basic studies on cross-relaxation imaging. Book of Abstracts, Soc Magn Reson Med, 11th Annual Meeting (Berlin)

5．惠良聖一，中村浩二，桑田一夫，曽我美勝，亘　　弘 (1992. 11) MR イメージング用ファントム開発への基礎研究—合成高分子ゲル内の水構造の研究。第30回生物物理学会年会（大阪）

6．亘　　弘，吉田敬義 (1992. 10) ヒト骨格筋の運動・回復時における無機燐・ pH 変化。第60回日本生化学会大会（福岡）

7．亘　　弘，吉田敬義，市川　修 (1992. 10) ヒト大腿二頭筋運動時の燐化合物変化。第20回日本磁気共鳴医学会（札幌）

8．惠良聖一，中村浩二，桑田一夫，曽我美勝，亘　　弘 (1992. 11) MR イメージング用ファントム開発への基礎研究—合成高分子ゲル内の水構造の研究。第39回生理学会中部談話会（松本）

《超高圧電子顕微鏡室》

1．有井達夫，吉村伸明，神谷芳弘 (1992. 6) YAG 蛍光板による超高圧電顕像の強度と分解能Ⅱ。日本電子顕微鏡学会第48回学術講演会（千葉）

2．小野俊朗，中山睿一，有井達夫，粟井通泰 (1992. 9) マラリア感染ラット白脾髄 Marginal metallophil に出現する鉄顆粒と免疫応答。第16回鉄代謝研究会（名古屋）

《動物実験施設》

1．Ohmori, T., Kuwahara, A., Ozaki, T. & Nokihara, K. (1992. 4) Effects of Substance K and its derivatives on muscle activity in the guinea-pig ileum. 69th Annual Meeting of the Physiolo-

gical Society of Japan (Akita)

2. Naruse, S., Suzuki, T. & Ozaki, T. (1992. 4) Postprandial gastric hyperemia. 69th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan (Akita)

3. Sazi, S. & Ozaki, T. (1992. 11) An improved horizontal type organ bath with PZT for the in vitro study of vasoactive peptides. 文部省国際学術研究集会 "Biosynthesis and Physiological actions of vasoactive peptides" (京都)

4. Naruse, S., Ozaki, T. & Nokihara, K. (1992. 11) Vascular and gastrointestinal actions of PACAP : comparison with VIP. 文部省国際学術研究集会 "Biosynthesis and Physiological actions of vasoactive peptides" (京都)

5. Ozaki, T., Naruse, S. & Nokihara, K. (1992. 11) The effect of bioactive peptides on blood vessels in vitro. 文部省国際学術研究集会 "Biosynthesis and Physiological actions of vasoactive peptides" (京都)

6. Kuwahara, A., Ohmori, T., Ozaki, T. & Nokihara, K. (1992. 11) Biological effects of substance K and its analogues in the guinea-pig ileum. 文部省国際学術研究集会 "Biosynthesis and Physiological actions of vasoactive peptides" (京都)

《江橋研究室》

1. 江橋節郎 (1991. 4) 筋・神経・脳—相似と相違と相同。第183回東京都精神精神研究所セミナー (東京)

2. Ebashi S. (1992. 9) Plenary Lecture XI Congress of the Polish Pharmaological Society of the German Soc. of Pharmacology and Toxicology (Poland)

3. 江橋節郎 (1992. 10) 特別講演「カルシウムをめぐって」第84回日本産婦人科学会関東連合地方部会総会 (甲府)

4. 桑山秀人, 杉浦全代, 杉田秀夫, 江橋節郎 (1992. 11) ジストロフィンの抽出とその不均一性。日本生物物理学会第30回年会 (大阪)

5．江橋節郎(1992. 11)「無機イオンと生命」～もう一つの生命～電力館ゼミナール（創立８周年記念講演）（東京）

6．江橋節郎(1992. 12)「無機イオンと生命」東京学習院大学生命分子科学研究所開設記念講演（東京）

7．江橋節郎(1993. 1) Molecular Basis of Ion Channels and Receptors Involved in Nerve Excitation. Synaptic Transmission and Muscle Contraction. Introduction (The New York Academy of Science)(Tokyo)

【共同研究報告】

共同研究報告

〔目　　次〕

1．骨格筋ジストロフィンの単離とその機能（桑山秀人他）…… 184
2．平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼ活性とレオトニン活性の識別
（小浜一弘他）…… 185
3．ドレブリン蛋白のリン酸化の研究（白尾智明他）…… 185
4．生体膜の動的構造（下山雄平他）…… 186
5．^{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（恵良聖一他）…… 187
6．フラビン蛋白質からヘム蛋白質への電子移動（三浦　洌他）…… 189
7．唾液腺細胞分泌システムの回路網熱力学的研究（今井雄介他）…… 190
8．水電解質分泌持続における細胞内情報伝達機構（村上政隆他）…… 191
9．海馬スライスの電気活動と遺伝子発現（小幡邦彦他）…… 193
10．生後発育中のラット副腎髄質（クロマフィン）細胞の分泌機構について
（大森行雄他）…… 194
11．膵腺房細胞のエネルギー供給系と細胞内 Ca イオン濃度動態
（浅田尚登他）…… 197
12．カテコルアミン分泌応答と細胞内遊離 Ca^{2+}（藁科　彬他）…… 199
13．アルドステロンによる副腎皮質細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の変化
（山口賢一他）…… 200
14．セルレイン，PACAP の膵腺房細胞における細胞内 Ca 動態に関する研究
（田尻久雄他）…… 202
15．副腎髄質細胞からのカテコールアミン放出の細胞内調節機構
（熊倉鴻之助他）…… 202
16．視交叉上核培養細胞での $[Ca^{2+}]_c$ を指標とした振動機構の解明
（磯部芳明他）…… 203
17．細胞内 Ca^{2+} 濃度変化におよぼす温熱および Ca 代謝阻害剤の影響
（近藤　隆他）…… 204
18．腸管運動“ペースメーカー細胞”とその支配神経の形態学的同定
（小林　繁他）…… 205

19. 分子動力学的手法を用いた神経ペプチドの構造解析
（桑原厚和他） …… 206
20. 培養神経細胞の各種イオンチャネルに対する麻酔薬の作用
（土肥修司他） …… 207
21. 音声および蝸牛直接電気刺激による脳内電気活動の解析（伊福部達他） 209
22. 視覚中枢電気活動の光学的測定（橋本　亨他） …… 210
23. チャネルタンパク質の物性に関する生物物理学的研究（美宅成樹他） … 211
24. 乳腺，乳癌の分化，増殖と細胞内情報伝達系（榎本浩一他） …… 212
25. モルモット輸精管平滑筋のKチャネルの研究（森本克士他） …… 213
26. 大腸上皮機能の光学的方法による研究（鈴木裕一他） …… 213
27. 低浸透圧ショックによる内皮細胞形態変化の観察（福内靖男他） …… 215
28. 個々の下垂体細胞におけるエキソサイトーシスによるホルモン放出量の解析
（飯郷雅之他） …… 218
29. 分泌装置における分子動態の画像解析（升島　努他） …… 219
30. 内分泌顆粒の細胞膜への融合および開口放出の分子機構（宮本茂昭他） 223
31. 海産軟体類における視覚機能の発現（島崎健二他） …… 224
32. 網膜における色情報抽出の神経機構（橋本葉子他） …… 224
33. 加齢に伴う網膜神経細胞の形態と機能変化（野本茂樹他） …… 226
34. パーフォレイテッドパッチ記録法による網膜細胞の膜特性の計測
（八木哲也他） …… 227
35. 網膜色素上皮細胞の外節認識機構の研究（大塚輝彌他） …… 229
36. 免疫応答における細胞間接着分子の重要性とそのシグナル伝達機構の解明
（西村孝司他） …… 230
37. ミオシンATPase反応中間体の構造（田之倉優他） …… 231
38. 線虫C．エレガンス発生期にみられる細胞間接着の分子生物学的解析
（Shahid Saeed, Siddiqui 他） …… 232
39. 外側膝状体軸索の大脳皮質での成長と分枝の形成（小松由紀夫他） …… 233
40. 恐怖表情と vocalization に共通する脳内機構の研究（有田秀穂他） …… 234
41. 視床を中心とする神経回路網（丹治　順他） …… 235
42. 大脳基底核と大脳皮質の機能関連（丹治　順他） …… 235
43. 身体運動が消化管諸機能におよぼす影響（近藤孝晴他） …… 236
44. モルモット大腸粘膜筋板の収縮制御に関する研究（石川一志他） …… 237
45. 血管内皮細胞の微細構造とその機能（山本善通他） …… 239
46. 視覚的注意・眼球運動と運動視知覚－心理物理学的・電気生理学的研究－
（下條信輔他） …… 242

47. 生理学実験法の開発（小幡邦彦他） …… 244

1．骨格筋ジストロフィンの単離とその機能

桑山秀人（帯畜大・教養課程）
小幡邦彦，杉浦全代，江橋節郎（生理研）

ジストロフィンの抽出において重要な条件は低イオン強度と弱アルカリ性（＞pH8.5）であり，高イオン強度においてはTriton X-100を加えてもジストロフィンは抽出されなかった。以前報告したようにTriton X-100存在下では抽出されやすくなるが，その理由は細胞膜が溶解するためではなく，細胞膜骨格における関連蛋白質との疎水性相互作用を弱めるためと思われる。温度は抽出性を変えるような大きな効果は無いが，得られる試料の純度は低温よりも37℃のほうが良かった。ジストロフィンの不均一性についてはヒト・ジストロフィンの一部分，アミノ酸一次配列440-489（N端側領域）または配列3495-6544（C端側領域）に相当する合成ペプチドを抗原にして作成したウサギ抗血清との反応を指標にして調べた。ブタ骨格筋の粗ジストロフィン分画をSDS存在下の調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ，免疫抗体と特異的に反応する成分として分子量400kDaおよび380kDaの2種の蛋白質を得た。N端側領域の抗血清は豚より単離した両成分に対して同じ程度に反応するのに対しC端側領域の抗血清は400kDa成分と特異的な反応を示し380kDaとは弱く反応した。mdxマウスからの抽出物には弱い400kDa成分のみが認められた。380kDaは400kDa成分とともにアイソフォームとして組織内に存在している可能性が高い。

牛胃平滑筋の粗抽出物試料のSDS-PAGEによる推定では豚骨格筋のものに比較するとジストロフィン含量が多いという結果が得られた。デタージェントをもちいない精製法を確立するのに好都合と考えられたので，牛胃平滑筋のジストロフィンについても研究をおこなった。牛胃ひき肉を，ウェーバー・エドサル液（10倍容量，ATP存在下）で2度抽出した。残渣を冷水で良く洗浄して，沈澱を2容量の水に懸濁しNaOHをもちいてpH8.6（室温）に合わせ，ジストロフィンを室温で1時間抽出した。懸濁液のイオン強度が10mM以上ではジストロフィンは溶出しにくいが，5mMでは部分的に，またそれ以下（～1mM）ではよく抽出できた。また，抽出溶解性におよぼす重要な因子，弱塩基性と低イオン強度については，抽出物の超遠心の上清の分析を行った結果，低イオン強度のほうが決定的に重要であることがわかった。この性質については，ジストロフィンそのものの性質によるのか，それとも，粗抽出物中に混在するジストロフィン結合蛋白質の性質に由来するのかは不明である。いずれにしろ，室温（pH6.8）でデタージェントなし，～1mMのイオン強度条件において400,000xgで30分の超遠心分離，ジストロフィンは上澄に残ることが示された。10mM以上では粗抽出物中のジストロフィンは超遠心により沈澱することから，粗抽出試料を，カラムクロマトグラフィーなどで精製することは困難と予想された。

2．平滑筋ミオシン軽鎖キナーゼ活性とレオトニン活性の識別

小浜一弘（群馬大・医・薬理）
江橋節郎，小幡邦彦（生理研）

ミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)は本来ミオシンと結合して軽鎖をリン酸化するものであるが，同時にアクチンと結合する性質もあることが知られていて，この性質をさらに検討する目的で我々はF－アクチンにMLCKを混合する実験を行なった。確かに従来言われている通り超遠心法によりMLCKのアクチンへの結合能を検出することが出来た。さらにアクチンとMLCKの混合物を位相差顕微鏡でみるとアクチンが束となって凝集する像が見られた。この混合物を作った条件下ではMLCKにはモノマーである。従って，MLCKにはアクチン結合部位が複数あって，アクチン（F型）を架橋していると解釈される。この架橋する性質がMLCKのどの部位に局在しているか現在蛋白質の限定分析によって検討しているところである。

MLCKの架橋する性質は平滑筋ではカルデスモン・カルポニンに知られていることである。従って，MLCKにはこれらの蛋白質の性質を具有することを結論される。そして昨年度に報告したMLCKによるアクチン活性化ミオシンATPase活性の阻害効果はカルデスモン・カルポニンと同様のメカニズムでなされているのではないかと推定した。

3．ドレブリン蛋白のリン酸化の研究

白尾智明（群馬大・医・行動分析）
浅田英穂（慶應大・医・生理）
小幡邦彦，山肩葉子，児島伸彦（生理研）
井上　洋（群馬大・医・脳神経外科）
矢崎貴仁（慶應大・医・生理）

ドレブリン蛋白質は発生過程の脳に特徴的に出現してくるアクチン結合蛋白質である。細胞膜の裏側に局在し，神経細胞の移動及び細胞突起の伸展に深く関与していると考えられている。ドレブリン蛋白質はヒト神経芽細胞腫培養細胞SH-SY5Y細胞において，分化にともないその細胞内局在が変化することがわかっている。われわれはこの変化が蛋白の燐酸化状態を変化させることにより起きるのではないかと考え，ドレブリン蛋白質の燐酸化についての実験を行なった。孵卵7日のニワトリ胚脳より視蓋を取りだし，^{32}Pを含む培養液中で3時間，37℃培養した。この組織をPBSで洗浄後，O'Farrellの系を用いて二次元電気泳動を行ないオートラジオグラフィーによりドレブリンと同じ等電点と分子量を持つ燐酸化蛋白質を検出した。次にこの蛋白がドレブ

リンそのものであることを確かめるためにドレブリン蛋白特異的モノクローナル抗体 M2F6 を用いて免疫沈降を行なったところ，ドレブリンと同じ分子量を持つ燐酸化蛋白が検出できた。以上よりドレブリン蛋白が燐蛋白質であることがわかった。次にドレブリンの燐酸化状態とドレブリンの細胞内局在の変化がどのような関係にあるかを探るために，ヒト神経芽細胞腫培養細胞 SH-SY5Y 細胞にレチノイン酸 (RA) あるいは protein kinase C と c-AMP-dependent protein kinase, c-GMP-dependent protein kinase を阻害する燐酸化酵素阻害薬 k252a を投与しその効果を観察した。SH-SY5Y 細胞においては，protein kinase C, c-AMP-dependent protein kinase, c-GMP-dependent protein kinase の三酵素を阻害する H7 を培地中に投与すると，細胞突起を伸展することが知られている。また SH-SY5Y 細胞の親細胞である SK-N-SH のうち神経細胞への分化を示す細胞は，RA によって protein kinase C が低下し，突起を伸展すると報告している。本研究ではまず k252a の SH-SY5Y 細胞への効果と分化誘導物質である RA による効果を比較した。20nM 以上で見られる k252a による突起伸展効果は，protein kinase C の阻害が関与すると考えられ，RA による突起伸展効果と k252a は相乗効果を示さないことから，RA と k252a による分岐の少ない突起伸展は同じ機序によるものと推察された。したがって，本研究で分化誘導に用いた RA とリン酸化の阻害に用いられ k252a は，ともに protein kinase C を低下することによって神経突起を伸展したものと考えられる。神経突起伸展と並行してドレブリン膜近傍に局在するようになる。これは k252a による protein kinase C などの阻害による結果であると考えられた。

4．生体膜の動的構造

下山雄平，松木貴司，高橋伸幸（北海道教育大・函館分校）
亘　　弘（生理研）

従来行われているような vesicle は packing や異方性が生体膜のものとは異なり，異方的な生体膜の解明には適当なモデル系とはみなしがたい。そこで配向膜を用い，膜間相互作用や異方性を考慮した動的構造の解明がなされねばならない。我々は従来，飽和移動 ESR やベクトル ESR を測定手段として，積層脂質配向膜を用い，異方的な動的構造を研究してきた。しかし飽和移動 ESR 法は間接的測定法なので，複雑な系の飽和現象の解析が難しい。近年パルス測定法が可能となり，直接的な緩和現象の測定がなされるようになり，中でも電子スピンエコー法は実験と理論両面での進歩が目ざましい。

合成燐脂質の Dipalmitoyl phosphatidyl choline や Dimyristoyl phosphatidyl choline にスピンラベル 3-spiro-doxyl-5a-cholestane を 0.5mol% の比率で混合し，適当な水和条件下で積層配向膜を調整した。配向性の巨視的な評価は偏光顕微鏡法を用い，conoscopy にて光軸の次元と符号を決定することにより行った。作成された試料は厚さ 200～300 μm で光学的に二軸異性を持つ。

動的構造を解析するべく，フーリエ変換・電子スピンエコー法を用いて，緩和現象の直接測定を行った。変形 Hahn スピンエコー系列を用い，エコーを観測した。次にフーリエ変換を行い，横軸が磁場に対応するパワースペクトルを得た。この操作を時間 τ を変化させる事により，二次元情報を得ることができた。パルス幅の最小値に制限があるので1パルスにて照射できる磁場は狭いため，共鳴磁場は 30 Gauss ごとに測定した。時間 τ 軸上に展開された情報はフーリエ変換，又は最大エントロピー法によって周波数領域の情報に変換した。これによって phase memory 時間，あるいは振幅と磁場の二次元の情報が可視化された。これによって二次元 echo envelope 表示と phase memory 時間，又は振幅について zero-frequency を基底とした conter plot を得た。膜面が磁場に垂直な場合は大きな曲率を持つ。これは $\theta - 0^\circ$ で見られる首ふり運動が高い異方性を持つことを示差する。他方，膜面が磁場に平行なとき（$\theta = 90^\circ$）の conter は二つの弧の集合となり，遅い運動が示されている。Stochastic Liouviile formalism による Simulation の結果より，この異方的な運動が jump type ではなく Brownian type の拡散であることがわかった。

パルス測定の有利さは回転座標系のモデルにのっとって緩和時間を間接測定できることにある。積層配向膜の phase memory 時間あるいは dephasing 時間を各温度について測定すると phase memory 時間が温度によって変化し相転移挙動が検出できた。Gel 相では特に少なくとも3～4の相が存在することがわかった。

5．^{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

惠良聖一，桑田一夫，今井　一（岐阜大・医・第2生理）
加藤一夫（同・第1病理）
佐藤真司，松永隆信（同・整外）
岡　伸光（同・口外）
曽我美勝（藤田保衛大・総医研・分子生理）
亘　　弘（生理研）

ウシ血漿アルブミン (BPA) は，酸性 pH 域で，N→F 転移（pH4.40 → 3.75, 0.10M KCl 中），F→E 転移を起こすことが知られている。また，この BPA（分子量，66K）は市販製品中に微量のタンパク質分解酵素を含み，pH3.8 の F 型状態で，BPA 分子内の Gln-392 と Cys-435 の間で1～2カ所加水分解を受け，BPA* （分子量，66K），BPA** （分子量，63K）を生成する。この BPA* BPA** は重水中では6％以上で容易にゲル化する (BPA*-gel) が，良く精製された，このタンパク質分解酵素を含まないウシメルカプトアクブミン (BMA) は，同様の条件で，12％でもゲル化しない。360MHz ^{1}H-NMR を用いたこれまでの研究により，BPA のこのような溶液

→ゲル変換により，T_1(HDO), T_2 (HDO), 特にタンパク質より水分子への交差緩和時間 (T_{1S} (HDO)) が大幅に短縮することが判った。そこで，T_{1S} を用いた交差緩和時間イメージングの機構解明のための基礎研究として，T_{1S} (HDO), タンパク質より水への飽和移動の作用スペクトル，動的光散乱測定（粒径分布）などを用いて研究した。

動的光散乱を用いて粒径分布を測定すると，BPA*-gel (13.8%, pD4.0, 0.10M Cl^-) 中には高分子量の集合体が存在したが，BPA 溶液 (13.8%, pD7.2, 0.10M Cl^-) には分子集合体は認められなかった。また，f_2照射位置の関数として HDO シグナルの飽和度を示す作用スペクトルを，f_2照射時間が10秒，f_2照射強度が$\gamma H_2/2\pi$＝10～69Hz を用いて測定した。BMA 溶液 (9.6%, pD4.0) での作用スペクトルは，図1に示すように，BMA の通常の ^{1}H-NMR スペクトルに対応した作用スペクトルが得られた。一方，図2に示すように，BPA*-gel (8.9%, pD4.0) の作用スペクトルは，f_2照射強度が弱いときは ($\gamma H_2/2\pi$＝10～20Hz, ほぼ通常の ^{1}H-NMR スペクトル（溶液のスペクトル）に一致し，39～69Hz の f_2照射では，BPA*-gel がもつ線幅の大きい成分の寄与が強調されたような作用スペクトルであった。

以上のことより，タンパク質より水分子への交差緩和現象（飽和移動）における BPA*-gel と BMA 溶液の差は，BPA*-gel 内の高分子量集合体の存在と結合水量の増加によるものと考えられる。

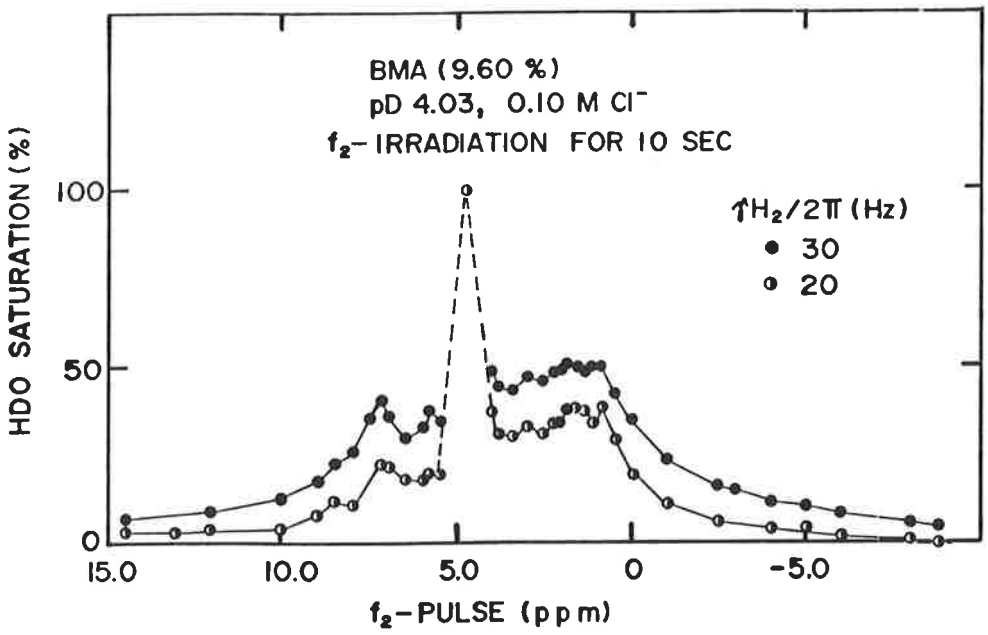


図1

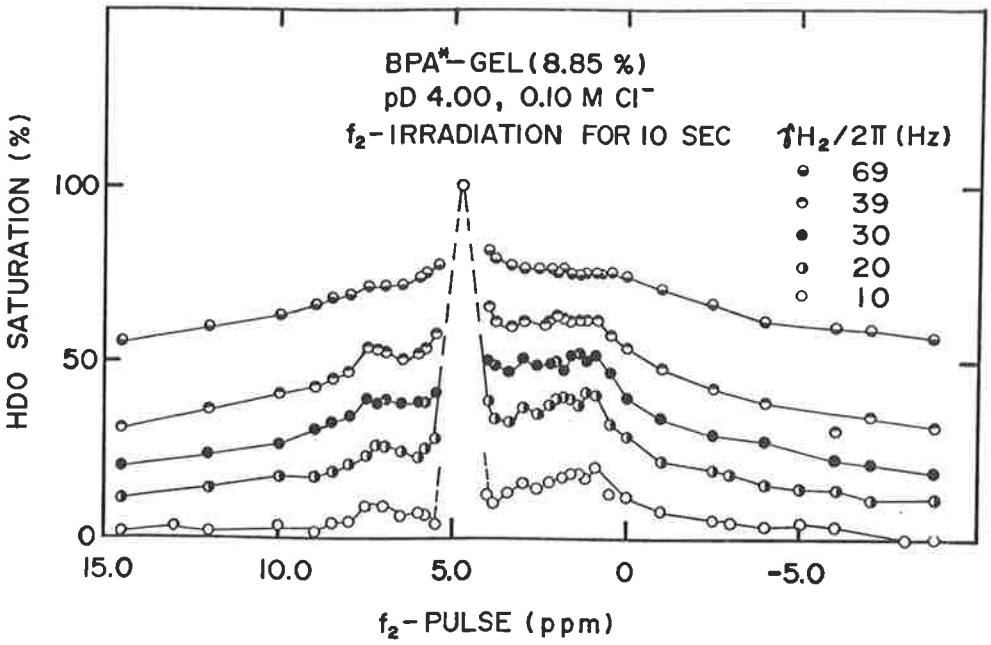


図2　BPA*-gel (8.9%, pD4.0, 0.10M Cl^-) における f_2照射位置の関数として HDO シグナルの飽和度を示す作用スペクトル。f_2照射時間，10秒。

6．フラビン蛋白質からヘム蛋白質への電子移動

三浦　洌（関西医大・医学部）（現　熊本大・医）
藤井　茂（関西医大・医）
志賀　潔，二科安三（熊本大・医）
堀池喜八郎（滋賀医大・医）
東城博雅（大阪大・医）
亘　　弘（生理研）

1）旧黄色酵素とシトクロムｃとの相互作用

旧黄色酵素（old yellow enzyme, OYE と略）の蛋白化学的研究から，OYE のフラビン (FMN) に近接して，酸性アミノ酸残基がクラスターをつくっていることがわかった。このクラスター部分は，フラボドキシンのアミノ酸配列に相同性を示すこと，このフラボドキシンの領域はシトクロムｃと複合体を形成する部位であることなどから，OYE はシトクロムｃと複合体を形成し，この複合体形成に，酸性アミノ酸残基のクラスターとシトクロムｃの塩基性アミノ酸残基との間

の静電相互作用が重要な役割を果たすことが予想された。そこで，OYE の FMN を 8－フルオロ－8－デメチル－FMN (8F-FMN) で再構成し，OYE 結合 8F-FMN 由来の ^{19}F-NMR 信号を指標にして，シトクロム c との相互作用を調べた。

8F-FMN-再構成 OYE の ^{19}F-NMR スペクトルでは，結合 8F-FMN による ^{19}F-NMR 信号が幅広いピークとして観測された。これに，シトクロム c を添加して，滴定を行うとピークは高磁場シフトし，シトクロム c 添加量と高磁場シフト値の滴定曲線は飽和曲線を描いた。この飽和曲線から，シトクロム c と OYE は 1 ： 1 の複合体を形成し，その時の解離定数は 0.3mM と求められた。また，8F-FMN再構成 OYE とシトクロム c との複合体形成によって，^{19}F-NMR 信号が高磁場シフトすることから，OYE-シトクロム c 複合体では，OYE の FMN のキシレン部分の電子密度が高くなっていることがわかり，OYE からシトクロム c への電子伝達を促進する機構が存在することが示唆された。このことは，われわれの蛋白質化学的研究からあきらかになっていた，OYE の FMN はキシレン部分が蛋白質表面につきでているということと矛盾しない。

2）旧黄色酵素と NADP$^+$との相互作用

8F-FMN で再構成した OYE の ^{19}F-NMR 信号を指標として，OYE と NADP$^+$との相互作用を調べた。8F-FMN-再構成 OYE に NADP$^+$を添加すると，その添加量にともない，遊離の OYE による ^{19}F-NMR 信号が減少し，新たな ^{19}F-NMR 信号が出現した。この結果は，この新たな信号は，OYE と NADP$^+$と複合体に由来することを示唆しており，この時の滴定曲線から，複合体の解離定数は，7mM と求められた。さらに，[4, 10a-$^{13}C_2$] FMN で再構成した OYE に NADP$^+$を添加したところ，4-^{13}C の NMR 信号には変化は見られなかったが，10a-^{13}C の NMR 信号は NADP$^+$添加に伴い減少した。このことは，OYE とシトクロム c との複合体形成によって，OYE に結合した FMN の 10a-位の電子状態が変化することを示している。

7．唾液腺細胞分泌システムの回路網熱力学的研究

今井雄介，中張隆司，吉田秀世，宮本　学，相馬義郎（大阪医大・生理Ⅰ）
村上政隆，瀬尾芳輝（生理研）

複雑な生体システムを統合的に理解するための道具として回路理論と熱力学とを統合した回路網熱力学が創始された。回路理論は合成を目標とする技術の科学であり，合成手段を提供する。回路理論によれば，変数としてその積がパワーの単位となるような流れ変数とその共役力変数を選んだ場合，回路のパワーは常に釣り合うという“テレゲン定理”が成立する。一方熱力学は分析を目標とする科学で，熱力学システムを分析して熱力学的要素過程に細分することができる。

生体システムを概念的に分析した場合，局所の各パワーは流入，蓄積，消費散逸といった熱力学過程とパワー変換過程の 4 種に分解できる。それらパワー過程について有効パワー過程と消費

される散逸パワー過程が釣り合う。この熱力学的システムのパワー釣合を根拠として，諸過程を回路理論の回路モデルとして記述できる。実験観察成果を用いて対象とする生体システムの要素過程にまで細分し，それらを熱力学素子で表現し，回路理論にしたがって紙上にモデルとして最合成する。回路法として結合枝グラフ法を用いると，相互作用をもった多種混合のパワーシステムをモデルとして表現できる。また構造側面と制御情報を記入でき，シミュレーションを可能となる。

唾液腺は複雑な生体輸送システムの典型例である。まず細胞膜や溶液区画といった局所を考え，つぎに局所における各種のパワー過程を考える。水，Na, K, H, Cl, HCO_3 の5種の輸送がある複合膜で，体積流，イオン拡散，能動輸送 (ATP), 共輸送 (Na-K-2Cl), 交換輸送 (Na-H & Cl-HCO_3), さらに体積流に伴う対流がある場合を考えた。これらは局所各種各様の諸パワー過程を最小の要素として，これら素子の組み合せを行うことでグラフモデルとして最合成できた。

今年度の研究で膜輸送を機能とする唾液腺モデルの合成とシミュレーションが可能となった。具体的には腺房を組織液をソース側とし，腺腔側をシンク側とする開放的な上皮膜輸送システムとして考え，概念的に三つの抵抗的モジュールと，三つの容量的モジュールで表現した。抵抗的モジュールは基底側方膜，腺腔側膜，および細胞間隙を表現するものである。三つの容量的モジュールは細胞外組織液，細胞内液および腺腔内液の各区画を表現するものである。各モジュールを散逸，蓄積，変換，流入の各素子と並列，直列の接続素子を用いた結合枝グラフで構築した。上皮膜輸送モデルのシミュレーションは正しい解釈に近付くための新しい思考実験であり，複合的な分泌現象の理解に役立つ手段になった。

8．水電解質分泌持続における細胞内情報伝達機構

杉谷博士，古山俊介（日本大松戸・歯）
村上政隆，瀬尾芳輝，石川　透，桑原厚和（生理研）
Benedict Ng （シドニー大・医）

唾液腺は上皮膜水電解質輸送のモデル臓器として用いられ，近年，細胞膜の各種輸送体，受容体－細胞内メッセンジャー及びその作用部位が分子レベルで解析され始め，分泌開始時の刺激－分泌連関の一部が明らかにされた。一方，分泌を持続的に保持する機構は今だ明かでない。唾液腺はムスカリニックな刺激に対して大量の水分分泌を誘発する。しかし，アセチルコリン刺激中に分泌は経時的に減少し，初期の大量の分泌は維持されない。また用量を増すとこの傾向は強まり，分泌抑制が顕著になる。従来，細胞内Caイオン測定等により，この機構の解明が目指されたが，何等有意な情報は得られていない。本研究は，受容体刺激から分泌に至るどの段階に水分分泌を持続的に保持する機構が存在するのかを明かにするために，計画された。

【方法】

0）顎下唾液腺を，麻酔下にウイスター系雄性ラットより摘出し，灌流標本を作製する。また，コラゲネース処理により腺房細胞の標本を作製する（杉谷，石川，村上）。1）持続分泌を誘発するコリン刺激の分泌時間経過 (Murakami et al., 1986, AJP251, G84-89) を追試し，アセチルコリンでの水分分泌と比較する（石川，Ng）。ムスカリニック受容体サブタイプの阻害剤を用い，受容体の違いが水分泌モードを変えるのか否かを検討する（石川，桑原）。2）アセチルコリン刺激により起こされるK放出が刺激中に変化するか否かをウアバイン添加による静脈への正味のK流出より検討する（村上）。3）単離腺房標本細胞内 Ca の変化を Fura-2 を用い測定する。アセチルコリン及びコリンに対する反応が異るか否かを探索する（瀬尾，村上，杉谷）。4）顎下唾液腺からの単離腺房標本細胞内 IP3, cyclicAMP を測定する。アセチルコリン及びコリンに対する反応が異るか否かを探索する（杉谷，古山）。

【結果と考察】

1）アセチルコリン 1 μM 刺激では初期に 250－300 μl/min. g 湿重量の大量分泌を起こした後，減少し，60分で 100 μl/min. g,120分で 80－60 μl/min. g に低下した。コリン 40mM の刺激では，90分まで 200－250 μl/min. g のレベルに分泌速度が保たれた。この結果，同じムスカリニック受容体を刺激しながら水分泌の時間経過が異ることが追試された。コリンとアセチルコリンで受容するムスカリニック受容体サブタイプに差があるか否かを検討する目的で阻害剤実験を準備している。2）アセチルコリン刺激中に細胞内 Ca 濃度上昇によりチャネルを介してK放出増加するが，持続刺激中は Na/K ATPase の活性化，Na/K/2Cl cotransport によるK取込みによりバランスし，正味K流入流出はない。血液側より取込まれるKは唾液中に放出されるK量とバランスしている。(Murakami et al., 1990, JP, 426 : 127-143)。ウアバインをアセチルコリンに重畳し添加すると，唾液分泌は停止し，静脈への正味のK流出が観察され，この時点で起こっているK流出に大部分対応すると考えられる（Na/K/2Cl cotransport によるK取込み分があるので，低目に見積もられる）。ウアバインの投与時点を，アセチルコリン投与時より15, 30, 45, 60分と変え，静脈へのK流出を測定したが，正味のK流出ピーク値はほぼ一定であった。このことはアセチルコリンによる持続的な分泌減少反応は，K流出機構と並行して進行する別の過程が問題になると考察された。3）単離腺房標本の反応性は，寺川（当時生理研機能協関）の協力でカルバコールに対する exocytosis 及び細胞容積減少を観察し確認した。細胞系は高分子ゲル (Biogel) 上に固定しパスツールピペット先端に充填し，周囲に灌流液を perifusion する系を確立し，二波長蛍光光度計に設置した。Fura-2 を用い，アセチルコリン及びコリンに対する細胞内 Ca の変化を preliminary に測定した結果，コリンに対する細胞内 Ca 上昇は少なく，刺激中一定レベルを保った。アセチルコリンでの反応は大きく，刺激中に減少した。4）顎下唾液腺からの単離腺房標本細胞内 IP3, cyclicAMP の測定は現在準備中である。今年度は共同研究の初年度であり，装置の設置，並びに試行実験を主に行った。

9．海馬スライスの電気活動と遺伝子発現

小幡邦彦，橋本隆紀（生理研）
関野祐子（東京都神経研）
谷藤　学（福井大・工）

神経細胞の電気活動に続いて遺伝子発現が変化することがさまざまの場合に見いだされ（刺激・転写連関），神経機能の長期的変化（可塑性）に関連する機構と考えられる。これまでの研究はけいれんを起こしたり，感覚刺激を加えた動物の脳で調べられており，遺伝子発現が変化した細胞にどれだけの電気活動があったかという関係は明かでない。そこでラット海馬のスライス標本において，電場電位を記録した後，in situ ハイブリダイゼーションを行うことにした。まず通常の電気生理学的実験で行われるスライスの作成，維持では電気的活動は十分に保たれるわけであるが，作成操作で immediate early gene である c-fos と Zif268 の初期発現が強く起こり，3，4時間の実験中にニューロフィラメントなどの常時存在するはずの mRNA が減少することがわかった。これらの変化は動物をネンブタールで深麻酔し，還流液にアミノ酸とビタミンの混合物を加えることにより実質上抑えられた。つぎにカイニン酸投与の影響をしらべた。投与中は脱分極による過剰興奮が短時間起こり，続いて抑制に移行して苔状線維刺激による反応が消失する。1 μM では投与後も抑制が長時間続いた。0.1 μM では反応が回復するとともにこれがバースト状になり，このようなバースト発射は自発的にも出現するようになった（1秒2，3回の頻度）。このバーストは CA3 錐体細胞で発生していることが判明した。このようなスライスから凍結切片をつくって c-fos mRNA をみたところ，高濃度では全神経細胞に，低濃度で CA3 錐体細胞でのみ発現がみられた。バースト発射は伝達されて CA1 錐体細胞にも同数の活動電位は発生しているが c-fos 発現はないことから，活動電位発生は直接的には c-fos 発現を起こさないと考えられる。

ひきつづき海馬スライスの全面またはこれに準じた広い範囲から電気活動を同時記録するために，膜電位感受性色素を利用した光学測定を企てた。このため富士フィルムマイクロデバイス社で製作された光学計測システム (SD1001) を導入した。このシステムは MOS 型エリアセンサ（受光面積 9 × 9 ㎜，128×128画素）を撮像素子とし，10－4までの光量変化を高速（1フレーム当たり 0.6msec）で記録し各種の解析を行うことができる。光学系の設営，色素の染色技術，実際の測定には，これまでフォトダイオードアレイや冷却 CCD カメラにより大脳皮質スライスの光学測定を行ってきた谷藤の技術・経験が全面的に生かされた。また富士フィルムマイクロデバイス社設計部の協力によりソフトウエアの改良が行われた。

海馬スライスにおいて苔状線維を電気刺激した場合の活動伝播をこのシステムで記録した。よくしらべられている苔状線維・CA3 錐体細胞・シャファー側枝・CA1 錐体細胞の伝導の他に，1）苔状線維の反回経路によると考えられる歯状回分子層での伝播と 2）CA2 領域で興奮が蓄

積した後，CA1 領域を stratum radiatum と stratum moleculare に分かれて伝播することが見いだされた。後者は玉巻が形態学的に示した CA2 錐体細胞の軸索が二分して CA1 の二層を走ることに対応するが，CA2 細胞への興奮が漸次蓄積する現象は興味深い。これらの結果は第70回日本生理学大会で報告した。今後，この方法で見いだされた興奮伝播の様相を解析するとともに，長期増強などをおこしたスライスでの遺伝子発現をしらべる。

10. 生後発育中のラット副腎髄質（クロマフィン）細胞の分泌機構について

大森行雄（旭川医大）
菅野富夫，葉原芳昭（生理研）

副腎髄質にはノルアドレナリン (NA) 細胞とアドレナリン (A) 細胞の二種類のクロマフィン細胞が存在し，さらにこれらの細胞は，ニコチンおよびムスカリン受容体を持ちコリン作動性薬物の刺激によってカテコールアミンを分泌することはすでに良く知られている。細胞内カルシウム濃度の変動はそのカテコールアミン放出に際し重要なメカニズムの一つであると考えられている。しかしながら，NA, A 細胞がどの受容体を持っているのか，また発育中のどの時期にそれぞれの受容体が発現するのかについては良く解っていない。今回の共同研究では，発育中のラット副腎を用いてコリン作動性物質による刺激後の細胞内カルシウムの変動を指標として，各クロマフィン細胞の受容体の存否を検索した。

実験には，生後０日，１日，３日，５日齢のラットを用い，副腎クロマフィン細胞をコラゲナーゼ処理により分離した。分離クロマフィン細胞に低濃度 (10 μM) および高濃度 (100 μM) のニコチンおよびムスカリン様物質（ベネタコール）をそれぞれ作用させ，細胞内カルシウムの動態について調べた。カルシウム測光には蛍光微分干渉顕微鏡 (Nikon TMD-2) と Argus 50 （浜松フォトニクス）を用いた。また各クロマフィン細胞を同定するためにカルシウム測光後の細胞を，同定し電顕観察した。

その結果，低濃度および高濃度のニコチン刺激 (Nic) に対しては，生後０日齢以降のクロマフィン細胞ですでに明確な細胞内カルシウム濃度の変動が観察された（図１．A，B，C，D)。低濃度および高濃度のベネタコール刺激 (BCh) に対しては，クロマフィン細胞の細胞内カルシウム濃度の変動は明確ではなかった（図１．B，D)。副腎皮質細胞においては，ベネタコール，ニコチンともに細胞内カルシウム濃度の変動を示さなかった（図１．Dの上の実線)。またカルシウム測光後のクロマフィン細胞を電顕観察した結果，細胞内小器官の形態はほぼ正常細胞の状態を示していた。生後０－３日齢のクロマフィン細胞では，大きなハローをもつ高電子密度の顆粒と，狭いハローをもつ中電子密度の顆粒が混在していた。その顆粒形態からは NA と A 細胞の区別はできなかった（図２．K)。生後５日齢のクロマフィン細胞では，狭いハローをもつ中電子

密度の顆粒を有するA細胞（図2．L）と大きなハローをもち高電子密度の顆粒を有するNA細胞（図2．M）の2種類の細胞が区別できた。また，開口放出像がどの時期の細胞においても観察された。

今回の研究により，生後0－5日齢の副腎クロマフィン細胞では，ニコチン受容体がすでに発現していたが，明確なムスカリン受容体の発現は確認できなかった。また，生後0－3日齢のクロマフィン細胞では，形態学的にNAとA細胞の区別はできなかったが，生後5日齢で明確にNAとA細胞の分化が確認された。さらに今後は，各クロマフィン細胞と受容体の相関を明らかにする予定である。

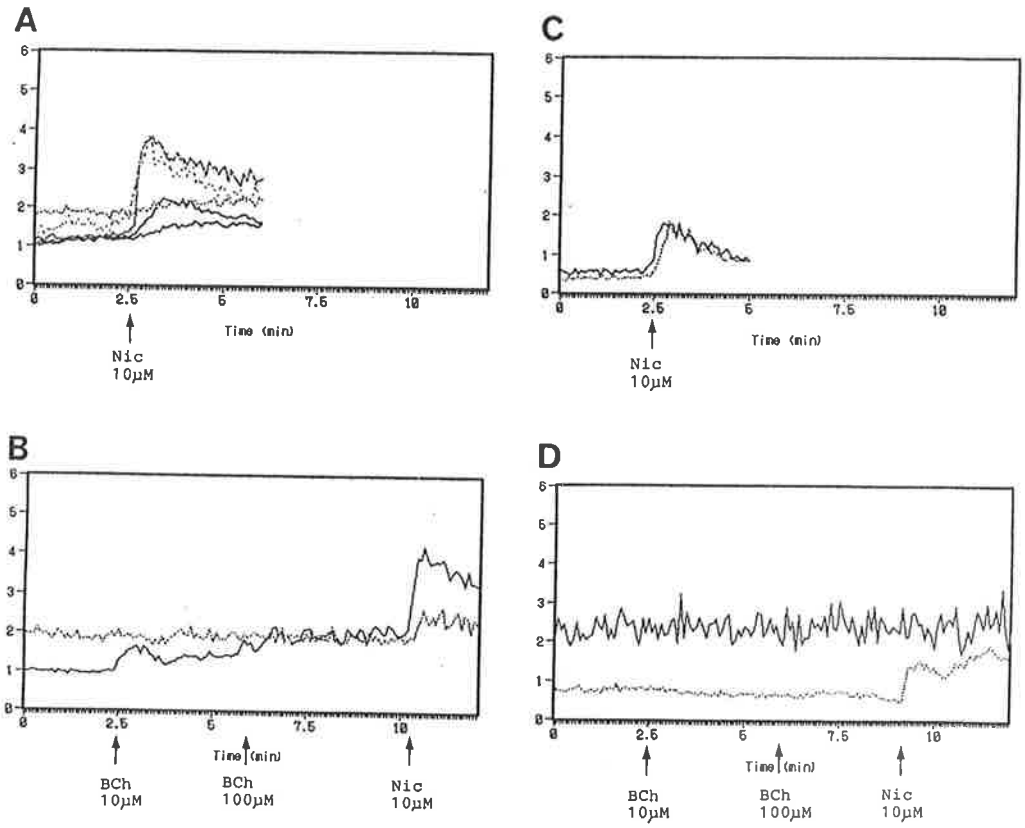


図1．細胞内カルシウム濃度の変化。
A，B：生後0日齢ラット副腎クロマフィン細胞，C，D：生後5日齢ラット副腎クロマフィン細胞，Nic：ニコチン刺激，BCh：ベネタコール刺激

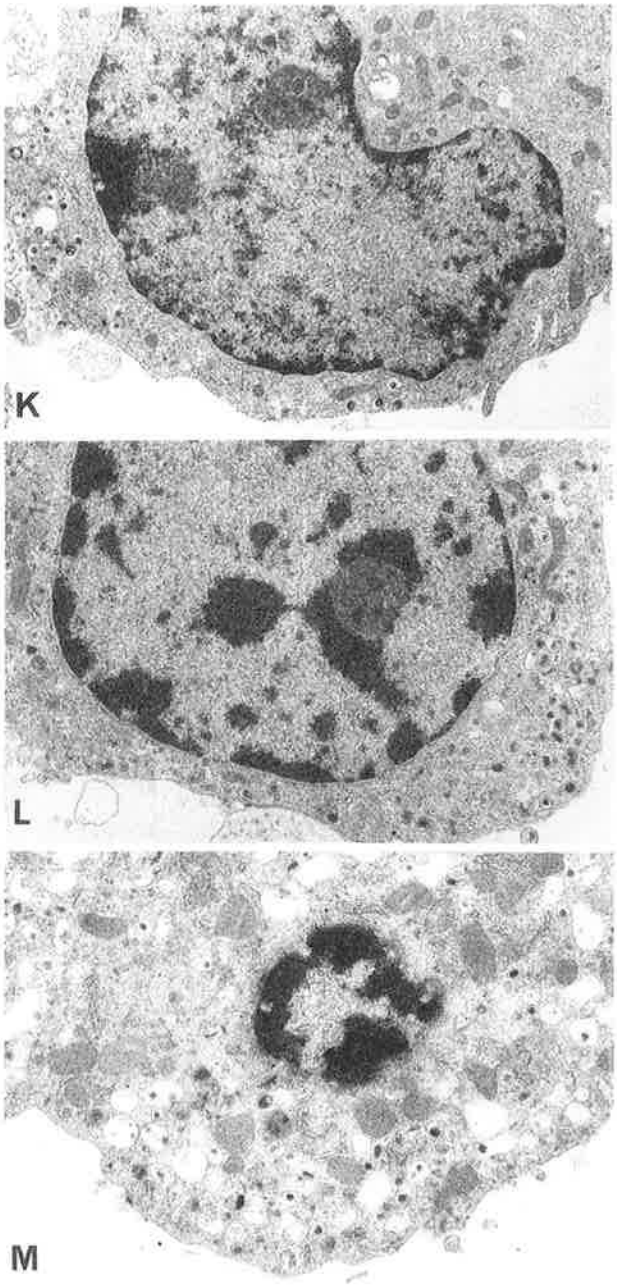


図２．分離されたラット副腎クロマフィン細胞の電顕写真。
K：生後０日齢の副腎クロマフィン細胞の形態，×10,000　L，M：生後５日齢の副腎クロマフィン細胞の形態，A細胞（L），NA 細胞（M）×10,000

11. 膵腺房細胞のエネルギー供給系と細胞内 Ca イオン濃度動態

浅田尚登（北海道教育大）
葉原芳昭，菅野富夫（生理研）

膵臓腺房細胞は分泌刺激物質の刺激に応じて水や消化酵素原を分泌する。CCK や ACh 刺激により引き起こされる酵素原放出の細胞内メッセンジャーの主要なものは Ca イオンであり，生理的用量の刺激によっては細胞外からの流入が細胞内 Ca イオン濃度上昇の主な源と考えられている。一方，細胞内には小胞体，ミトコンドリア等の Ca 貯蔵部位があり，これらの小器官はエネルギー依存性に細胞内 Ca イオン濃度調節をしていると考えられる。そこで今回，分離膵腺房標本を用いて，Ca イオン動員性の分泌刺激物質である CCK-8 刺激に応じた酵素放出反応，および細胞内 Ca イオン濃度上昇反応にたいする ATP 供給系の関与を検討するため，ミトコンドリア酸化的りん酸化の脱共役剤または解糖系阻害の効果を調べた。

ラット膵臓よりコラゲナーゼ処理によって膵腺房を分離し，Hepes 緩衝 Ringer 液にて分速 1.2ml/min で表面灌流して腺房細胞からのアミラーゼ放出経過を調べた。0.2mM または 0.5mM の 2, 4-dinitrophenol (DNP) の灌流液への添加は，CCK-8 持続刺激開始前および開始後のいずれでも，刺激に応じた酵素放出反応を抑制した（図１）。一方，解糖系阻害のために CCK-8 刺激開始20分前より灌流液からブドウ糖を除くか，またはブドウ糖の代わりに 2-deoxy-glucose (2DG) を加えたところ，CCK-8 刺激に応じたアミラーゼ放出反応は経過の後半部分になって抑制された（図２）。また，ブドウ糖除去によっては静止時のアミラーゼ放出も抑制されたが，2DG 処置によっては静止時アミラーゼ放出は一時的に増大した。

$[Ca^{2+}]$ プローブである fura-2-AM を 5 μM の濃度で負荷した分離腺房標本で，CCK-8 持続刺激による細胞内 Ca イオン濃度上昇反応にたいする 0.2mM DNP 添加の効果を確かめたところ，10pM, 100pM いずれの濃度の CCK-8 刺激による細胞内 Ca イオン濃度変化においても明らかな変化は認められなかった。このことから，DNP 処置による酵素放出抑制は細胞内での Ca イオン濃度上昇過程以外の過程にたいする効果であることが示唆されたが，0.2mM DNP 処置の酵素放出抑制効果が弱いこと，抑制効果が現われるまでに時間を要することから，短時間の Ca イオン濃度上昇反応に及ぼす効果からだけでは DNP による脱共役処置の細胞内 Ca イオン濃度動態にたいする作用を判断することは困難で，さらに検討が必要であると思われた。

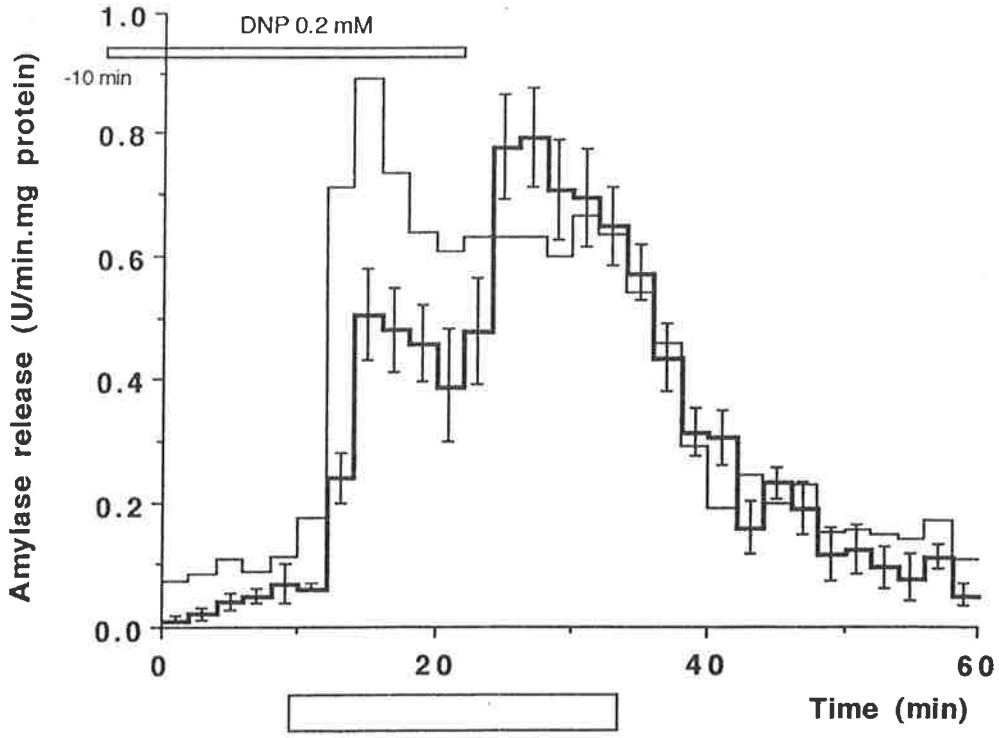


図1　Time course of amylase release during continuous stimulation with 10pM CCK-8 in a solution containing 2, 4-dinitrophenol. Responses induced by CCK-8 in the standard solution are indicated by thin line for reference. Each value represents the mean of four experiments. The open horizontal bar indicates the period of CCK-8 perifusion.

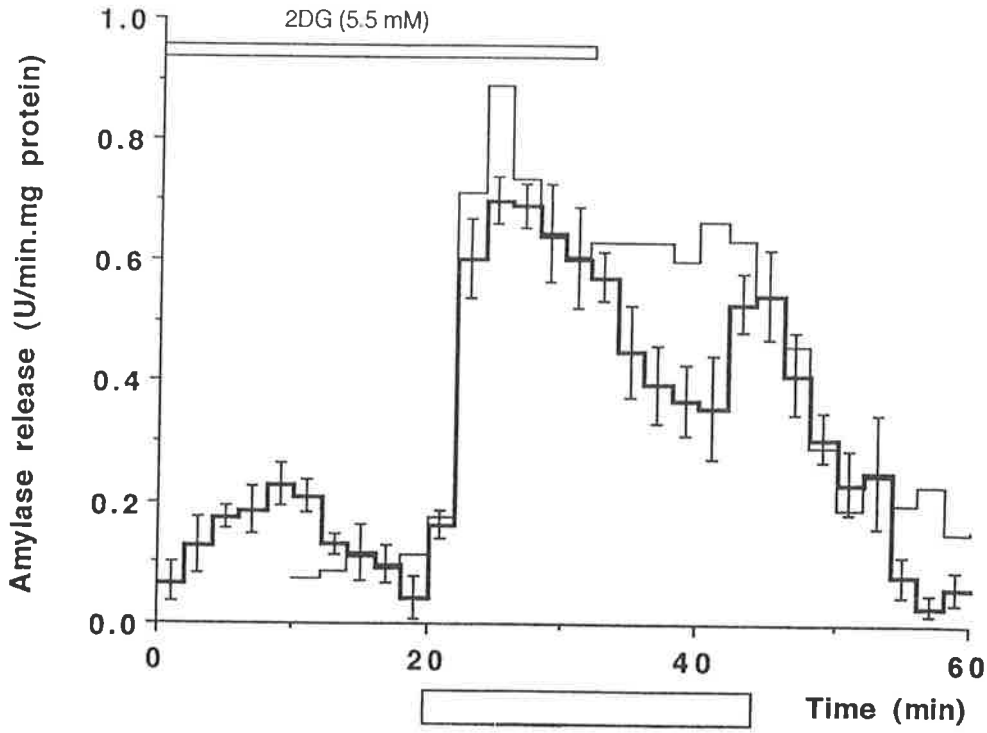


図2　Time course of amylase release during continuous stimulation with 10pM CCK-8 in a solution in which glucose was replaced by 2-deoxyglucose. Responses induced by CCK-8 in the standard solution are indicated by thin line for reference. Each value represents the mean of three (2DG) of four (control) experiments. The open horizontal bar indicates the period of CCK-8 perifusion.

12. カテコルアミン分泌応答と細胞内遊離 Ca^{2+}

藁科　彬，山口賢一（新潟大）
葉原芳昭，菅野富夫（生理研）

ラット副腎の collagenase 処理により得た分離細胞に fura-2 を負荷し，デジタル画像解析法により，細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度（$[Ca^{2+}]_i$）を計測すると，大多数の細胞で $[Ca^{2+}]_i$ レベルの自発的振動が観測された。本年度研究では，この振動の性状を調査し，振動の発生要因と副腎髄質細胞に備わる Ca^{2+} 動員経路との関係を明かにする試みを行い，以下の結果を得た。

【$[Ca^{2+}]_i$ 振動の性状】

振動は刺激物質無添加時に，$[Ca^{2+}]_i$ が 150－200nM の基底レベルと数 100－1000nM の高レベルを自発的に往き来する形態をとる。その平均周期，高レベルに滞在する持続時間は，細胞集団を形成する試料であっても，個々の細胞で異なり，互いに相関はみられなかった。これら細胞を nicotine や high-K^+ により刺激すると，振動レベルを凌駕する持続的 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が発生し，その間振動は生じなかった。

【$[Ca^{2+}]_i$ 振動の抑制】

この $[Ca^{2+}]_i$ 振動が副腎髄質組織中の細胞でも発生しているかどうかの情報は現在得られていないが，細胞の分離により，増強あるいは誘発された可能性も大きい。組織中にある髄質細胞は，副腎皮質からステロイド，神経終末から分泌される GABA, 自らが分泌する catecholamines, ATP, enkephalin などに常時曝されており，これらのどれかが細胞内 Ca^{2+} 平衡に安定的に作用していることも考えられる。そこで，細胞外液にこれら薬剤を含ませ，振動に対する影響を検索したが，現在のところ効果は認められていない。他方，報告者らは，chlorobutanol (ClBu) という比較的単純な化学物質により，この $[Ca^{2+}]_i$ 振動が強力に抑制されることを見い出した。また，ClBu は nicotine や high-K^+ による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇をも抑制した。

【$[Ca^{2+}]_i$ 振動の抑制と Ca^{2+} 動員経路】

ClBu がどのように $[Ca^{2+}]_i$ 振動を止めるかを検討するには，この物質が副腎髄質細胞の Ca^{2+} 動員経路に与える影響を調査する必要がある。この目的で，ラット副腎髄質の灌流標本における分泌応答，髄質の細胞集団における総和としての $[Ca^{2+}]_i$ 応答に対する ClBu の効果を調べる実験を行った。ClBu の存在により high-K^+ 刺激による分泌は顕著に抑制された。これは，細胞レベルでの high-K^+ 刺激時の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の ClBu による抑制と一致し，電位依存性 Ca^{2+} channel が ClBu により遮断されることを示唆している。一方，bradykinin 等の receptor 刺激により産生される second messenger により誘発される細胞内ストアからの Ca^{2+} 遊離に関係すると考えられる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇および分泌の成分は，電位依存性 Ca^{2+} channel がほとんど完全に遮断される濃度の ClBu (5.6mM) 存在下でも消失しなかった。これらの結果より，分離細胞にみられる $[Ca^{2+}]_i$ 振動は，電位依存性 Ca^{2+} channel からの外液 Ca^{2+} の 1）間欠的，大量流入，2）持続的流入による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇傾向のため，Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release が生ずるか，ストアの過度の Ca^{2+} 負荷による Ca^{2+} の自発放出が生ずる，等の原因で発生すると推察された。

13. アルドステロンによる副腎皮質細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の変化

山口賢一，藁科　彬（新潟大）
葉原芳昭（生理研）
菅野富夫（生理研・北海道大）

【目的】

副腎皮質球状層細胞からのアルドステロン分泌が，レニンーアンギオテンシン系の活性や K^+ 等の，このホルモンの調節を受ける環境因子によって，長環フィードバック的に制御されることは良く知られている。しかし，アルドステロンがそれ自体の分泌制御に携わるのか否かと言う問題は不明である。この問題を，アルドステロンの測定という一般的な内分泌学的手法を用いて追求することは，実験系に加えた外因性アルドステロンと球状層細胞から放出される内因性アルドステロンの識別の困難等から，難しい。しかし近年の細胞生理学的研究は，アルドステロン分泌の促進が，球状層細胞の細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度（$[Ca^{2+}]_i$）の上昇によって媒介されることを明らかにしている。従って，アルドステロン分泌に対するアルドステロンの役割は，球状層細胞の $[Ca^{2+}]_i$ に与える影響から推察することが可能である。我々は上記問題を検討する目的で，球状層細胞の $[Ca^{2+}]_i$ が，アルドステロン分泌の代表的促進因子であるアンギオテンシン II (AII) や K^+ 刺激の存在下・非存在下において，アルドステロンとその関連ステロイドによってどの様に変化するのかを調べた。

【方法】

ラット副腎皮質から capsular tissue を剥離した。細断後 collagenase 処理し，球状層細胞を遊離させた。Ca^{2+} 指示薬 (Fura-2 AM) を取り込ませた後，細胞を chamber (2ml) 底のガラス板上に cell-tak で付着させた。種々の薬物を含むクレブス液を灌流しつつ，$[Ca^{2+}]_i$ の変化を顕微鏡下の蛍光測光 (F340/F380) で求めた。また，画像処理法で，細胞質各領域の Ca^{2+} 濃度の変化をもモニターした。球状層細胞の同定は，Tait らの基準 (Proc. R. Soc. Lond. B., 185 : 375-407, 1974) により行った。

【結果】

1．灌流液に加えた AII (500pM) は，約 1 分の潜時で $[Ca^{2+}]_i$ を急峻に増加させた。この増加は AII の灌流中，30分以上にわたって振動的に持続した。2．灌流液の K^+ 濃度を高める (10mM) と，$[Ca^{2+}]_i$ は約30秒後にピークとなり，以後，安定したプラトー状態の増加が30分以上続いた。3．AII 或は K^+ 刺激によって増大した $[Ca^{2+}]_i$ は，どちらも，灌流液に添加したアルドステロン，デオキシコルチコステロン，デキサメタゾン (10 μ－1mM) によって用量依存性に減少した。これらのステロイド (1mM) による $[Ca^{2+}]_i$ の最低値は 5 － 7 分後に生じた。灌流液からステロイドを除いても，限られた観察時間（約10分）では，$[Ca^{2+}]_i$ は上昇しなかった。4．AII 又は K^+ 刺激非存在下の $[Ca^{2+}]_i$ は，以上のステロイドによって，変わらないか，または，

僅かに減少した。

【考察】

1．AIIとK^+濃度の上昇はアルドステロン分泌の代表的促進因子であり，それらの作用は，球状層細胞の細胞内Ca^{2+}をセカンド・メッセンジャーとすることが知られている。さらに，最近，AIIのアルドステロン放出刺激作用は$[Ca^{2+}]_i$の振動的増加の頻度に，K^+刺激のそれは，$[Ca^{2+}]_i$の持続的上昇の振幅に相関すると言われている。アルドステロンはこれらの$[Ca^{2+}]_i$反応のいずれをも著しく減衰させたので，アルドステロン分泌はアルドステロン自身によって抑制されることが示唆される。2．$[Ca^{2+}]_i$の低下作用は，アルドステロンのみならず，その前駆体であるデオキシコルチコステロンと，合成の糖質コルチコイドであるデキサメタゾンによっても発現した。従って，アルドステロン分泌は電解質コルチコイドによると同様に，糖質コルチコイドによっても抑えられると考えられる。3．以上のステロイドの作用は数分以内という短時間で出現した。従ってそれらは，ステロイド・ホルモンによく知られた，遺伝子を介する効果とは考え難い。膜に対する作用が推測されるが，その機構と生理的意義については今後の検討が必要である。

14. セルレイン，PACAPの膵腺房細胞における細胞内Ca^{2+}濃度の変化

鈴木考治，田尻久雄，大野秀樹（防衛医大）
葉原芳昭（生理研）
菅野富夫（生理研・北海道大）

1989年，Arimuraらにより羊視床下部より単離されたPituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP)を用いてin vivoにおけるPACAP-38の膵組織に及ぼす影響を検討した。雄性SDラットを用いて，PACAP-38を20 μg/kg, 40 μg/kg体重濃度で，セルレインを40 μg/kg体重濃度で1時間間隔で計2回投与した。対照には生理食塩水を用いた。それぞれ投与2，6時間後に屠殺解剖し，病理組織学的検討及び血清アミラーゼの測定を行った。その結果，PACAP投与群ではセルレイン投与群に比し軽度ではあるが膵腺房細胞の空胞化，融解像が認められた。血清アミラーゼは投与6時間まで上昇が認められた。PACAPの膵組織障害機序は未だ十分に解明されておらず今後さらに検討を加えていく予定である。

15. 副腎髄質細胞からのカテコールアミン放出の細胞内調節機構

熊倉鴻之助（上智大）
菅野富夫（生理研・北海道大）

副腎髄質クロム親和細胞からの開口放出によるカテコールアミン放出は，細胞内Ca^{2+}濃度の上昇がトリガーとなる。Ca^{2+}が最終的に開口を引き起こす効率，即ち「開口放出機構のCa^{2+}親和性」は細胞内調節の標的の一つである可能性があり，熊倉らは最近これがGoによって抑制的に調節されることを明らかにした。この研究では，クロム親和細胞における開口放出の細胞内調節機構の解明を目的として，マストパランを用いてG蛋白質の調節作用について解析を行った。

マストパランは，肥満細胞からの顆粒放出作用，副腎髄質クロマフィン細胞からのカテコールアミン放出作用をはじめとして，異なった分泌細胞系で分泌惹起作用が知られている。また，マストパランはG蛋白質を直接活性化することが知られている。熊倉はこれまでに，マストパランによるカテコールアミン放出が外液カルシウムに依存せず，BAPTA（細胞内カルシウム・キレーター）によっても阻害されないことを明らかにしている。また，光学顕微鏡による放出過程の観察により，低濃度マストパランによるカテコールアミン放出は開口放出によることを明らかにしてきた。今回，Fura-2を用いた顕微蛍光測定によりマストパラン刺激時の細胞内カルシウム変動を解析した結果，外液カルシウム存在下，非存在下のいずれにおいても，20μMマストパラン刺激は細胞内遊離カルシウムの変動を全く引き起こさなかった。この濃度のマストパランは，外液カルシウム存在下，非存在下のいずれにおいても有意なカテコールアミン放出を引き起こすことから，マストパランの作用機序として，なんらかのG蛋白質を介する以下の二つの機序が推察された。

1）開口放出の分子機構のカルシウム感受性がマストパランによって著しく亢進された結果，細胞内遊離カルシウムが静止時濃度で開口放出の引金となり得る。

2）マストパランは，いずれかの素反応を直接活性化して，全くカルシウム非依存的に開口放出をもたらす。

一方，クロマフィン細胞をジギトニン処理によって高透過性細胞とした後にマストパランを添加して細胞内に直接作用させると，高透過性細胞からのCa^{2+}依存性カテコールアミン放出は顕著に抑制された。これは，Ca^{2+}親和性を抑制的に調節するGoがマストパランによって直接活性化された結果と考えられ，クロマフィン細胞では開口放出の細胞内調節に少なくとも二種類の異なるGTP結合蛋白質が関与していることが示唆された。

16. 視交叉上核培養細胞での $[Ca^{2+}]c$ を指標とした振動機構の解明

磯部芳明（名市大）
葉原芳昭（生理研）
菅野富夫（生理研・北海道大）

視床下部にある視交叉上核(SCN)は哺乳動物では概日リズムの発現に重要な役割を果たしていることが知られている。このSCNでは位相（時刻）の判定と周期の決定という大きな2つの機能があり，その背外側野に局在するVIP (vasoactive intestinal polypeptide) とGRP (Gastrin releasing peptide) は明暗の周期に同調した位相の判定に役立っている。位相決定から周期の決定にいたる過程が細胞間でどの様に行われているのかが最近注目されている。これを解明する手段として，SCNの培養細胞を材料として，その興奮性と，興奮の伝播の様相をそのキレート試薬Fura-2を用いて，細胞内Caの増減を指標として調べた。

実験材料には生後1日令のラットのSCNの培養細胞を用いた。直径30㎜のあらかじめ，poly-l-リジンがコーティングしてあるカバーグラスの上で培養を行った。

培養ディシュ（カバーグラス）を燐酸緩衝液，HEPES緩衝液で洗浄後1ディシュあたり20μMのFura-2AMを30分間37℃でロードし，HEPES緩衝液で洗浄後観察した。培養開始後8日目の細胞では高K (300mM) 液に応答し神経細胞の興奮性が振動現象を示した。そこでvitroにおいて位相反応に関係するVIPを刺激剤として観察チャンバー内に与えた。終濃度が生理的濃度である100fmolでは何等興奮性を示さなかった。濃度を10^{-4}Mまであげても神経細胞の興奮性には変化が認められなかった。VIPはvivoではlight-pulse型の位相反応をすることからVIP応答性の細胞があることが確かめられているが，vitroの系では反応せず培養細胞の実験系としての限界を考慮に入れる必要性を感じた。そこで，生体において明暗の視覚入力をSCNに伝える伝達物質としてのglutamateを与えた。10^{-8}－10^{-5}の濃度において神経細胞とその周囲のグリア細胞においてCaの振動が15－50秒の周期で認められた。実験の途上においてvan den Polらのグループ がSCN細胞につき共焦点レーザーを用いた細胞内Caの測定の報告がでた。彼らも神経細胞だけでなくグリア細胞もSCNにおいて重要な働きをしている可能性を示唆している。そこで新たな実験系をいま構築中である。この培養細胞を用いた系は時間生物学としての作用薬のアッセイシステムとして有用であるばかりでなく，振動機構の解明にも役立つと考えられる。

今後，この細胞内Caの増減の1分前後の振動現象の概日周期の構成要素との関係を追求していきたい。また培養細胞での実験系には反応性に実際の生体とは異なる点があり，この点を打破する一つの方法としてGöbilerらが開発した「Organotipic slice culture」を用いて，ある程度の組織を保った形で興奮の伝播の様子を調べることも一つの指針と考えている。

細胞内Caを指標とする実験とは別に，培養液中に分泌される，AVP (Arginine Vasopressin) に概日リズムがあることが認められた。今後このAVPのリズムと神経細胞の興奮性との関連を

観ることも，一つの解明の手段となると考えた。

17. 細胞内 Ca^{2+} 濃度変化におよぼす温熱および Ca 代謝阻害剤の影響

近藤　隆（神戸大）
加納永一（福井医大）
葉原芳昭（生理研）
菅野富夫（生理研・北海道大）

がん温熱療法が臨床にも応用され，その効果が期待されている。温熱療法の効果を高める一つの方法として温熱増感剤との併用が考えられる。Ca 代謝阻害剤の中に温熱増感作用を有するものがあり，その作用機序には興味がもたれる。我々は昨年度，細胞内 Ca 遊離阻害剤として知られている TMB-8 (8-(N, N-diethylamino) octyl 3, 4, 5-trimethoxy-benzoate) が，細胞外液に Ca^{2+} を含まない HEPES 緩衝液（1mM EGTA を含む）を用いた時，温熱処理によるマウス乳癌 FM3A 細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を抑制したことを報告した。本年度，TMB-8 を含む増殖培養液中でマウス乳癌細胞を温熱処理した時，細胞内 Ca^{2+} 濃度の顕著な増加と温熱細胞致死効果の増強を認めた。

マウス乳癌細胞 FM3A 株を恒温水槽により42℃あるいは44℃で 1 時間，TMB-8 存在あるいは非存在下で温熱処理した。温熱による細胞致死効果の判定を軟寒天コロニー法により行った。細胞内 Ca^{2+} 濃度に関しては fura-2 を負荷した細胞について温熱処理後 Argus-100/CA 画像解析システムを用いて測定した。細胞内への Ca^{2+} の流入については温熱処理後の37℃ 1 時間に取り込まれた $^{45}Ca^{2+}$ の放射活性を測定することで調べた。

温熱処理後の細胞生存率は指数関数的に減少した。平均致死温熱処理時間（T_0：分）を求めると，44℃処理で6.4分，42℃処理で73.2分となった。TMB-8 存在下では44℃処理の T_0 は4.5分，42℃処理の T_0 は33.2分となり，温熱増感比は44℃処理で1.4，42℃処理で2.2となった。画像解析により両条件下の細胞内 Ca^{2+} 濃度を比較すると，TMB-8 を含まない44℃あるいは42℃処理では認められない 500nM 以上の Ca^{2+} 濃度を有する細胞が発現し，その割合は44℃ 1 時間処理で74%，42℃ 1 時間処理で59%に達した。Ca^{2+} の流入は加温時に TMB-8 が存在すると42℃処理および44℃処理共に非存在下に比べ約1.5倍増加した。TMB-8 は増殖培養液中温熱処理で，細胞内への Ca^{2+} 流入を増やし，温熱細胞致死効果を増強した。TMB-8 の 100 μM,37℃ 1 時間処理では細胞増殖への影響はなく，また細胞内 Ca^{2+} 濃度を変えなかった。TMB-8 は将来の温熱増感剤の一つになり得る可能性が示唆された。(Kondo et al. Cell Calcium 14 : 621-629, 1993)

18. 腸管運動“ペースメーカー細胞”とその支配神経の形態学的同定

小林　繁，鳥橋茂子，飯野　哲（名古屋大・医・解剖）
菅野富夫，桑原厚和，葉原芳昭（生理研）

腸管運動のペースメーカー細胞を同定し，その支配神経の特徴を解明することを目的とした。モルモットの胃，小腸，近位結腸およびイヌの小腸と近位結腸をZIO法で処理した標本の光学顕微鏡観察や，透過型電子顕微鏡，走査型電子顕微鏡等を用いて研究し，緩徐波の発生源と思われる細胞を発見しようとした。

イヌの小腸の深筋層神経叢 (deep muscular plexus : DMP) に，ペースメーカー細胞と思われる特殊平滑筋細胞を発見し，さらにイヌの近位結腸の内輪筋層粘膜下表面で従来「カハールの間質細胞 (interstitial cells of Cajal : ICCs)」とされていたのはやはり特殊平滑筋細胞であることを明らかにした (Torihashi, ed al : Amer. J. Physiol., 266 : G638-G645, 1993)。

モルモットの胃，小腸，近位結腸にもイヌの特殊平滑筋細胞に似た細胞を見いだせた。これは一般平滑筋はもとより従来カハールの間質細胞と見做されていた所謂ICCsとも異なる（小林繁：細胞，25 : 311-315, 1993)。消化管の筋層の平滑筋細胞は多様であり新しい形態学的分類が必要である。

19. 分子動力学的手法を用いた神経ペプチドの構造解析

桑原厚和（生理研）
軒原清史（島津製作所バイオ機器部）
尾崎　毅（生理研）

消化管の壁内神経及脳には多数の神経ペプチドが存在する。これら神経ペプチドは神経伝達物質あるいは，修飾物質として機能していると考えられている。最近の研究により，これらの神経ペプチドの受容体には，臓器及部位により多数の亜型が存在することが示唆されている。このような亜型の存在は生体内に存在する神経ペプチドの機能の多様性を示すものであり，神経ペプチドと受容体との相互作用の理解は，生体の各種調節機構を知る上で極めて重要であると考えられる。本研究では神経ペプチドとその受容体の相互認識機構の解明を行うために，distance geometry法を用いて，神経ペプチドの構造解析を行った。

本研究では，我々の以前からの研究成果に基ずき10個のアミノ酸残基より成るSubstance K (SK) を用い，そのアナログ及フラグメントを合成し，それらのモルモット回腸平滑筋に対する作用を検討した。その後，これらペプチドの平滑筋収縮活動に対する作用を基に，SKのactive

core を計算により推定した。

図1に，本研究の結果と用いた各種SKのフラグメントおよびアナログを示した。モルモット回腸を用いた実験の結果からSKの活性部位はC－端の6－10位に存在することがあきらかとなった。さらに，6位のフェニルアラニンの芳香環が受容体認識にきわめて重要であることが明らかとなった。図2に，実験より得られたデータを基にコンピュータにより計算したSKの構造モデルを示した。

SK(1-10): 1 His 2 Lys 3 Thr 4 Asp 5 Ser 6 Phe 7 Val 8 Gly 9 Leu 10 Met $-NH_2$

SK(1-10)	+	SK(5-10)-OH	-	des Ser^5SK(1-10)	+
SK(2-10)	+	Gly^5SK(5-10)	+	des Phe^6SK(1-10)	-
SK(3-10)	+	Pro^6SK(5-10)	-	des Val^7SK(5-10)	-
SK(4-10)	+	Trp^6SK(5-10)	-	des 7,8 SK(5-10)	-
SK(5-10)	+	Tyr^6SK(5-10)	-	$^D Phe^6$ SK(5-10)	-
SK(6-10)	(+)	Lys^7SK(5-10)	+	$^D Trp^6$ SK(5-10)	-
SK(7-10)	-	Nle^{10}SK(5-10)	(+)	$^D Leu^9$ SK(5-10)	-
Pro^6SK(1-10)	-	SK[*D*(5-10)]	-	$^D Met^{10}$ SK(5-10)	-
Trp^6SK(1-10)	-	SK(1-10)-OH	-	$^D Val^7$SK(6-10)	-

図1．Synthetic peptides and summary of the effects of peptides on muscle activity in the guinea-pig ileum

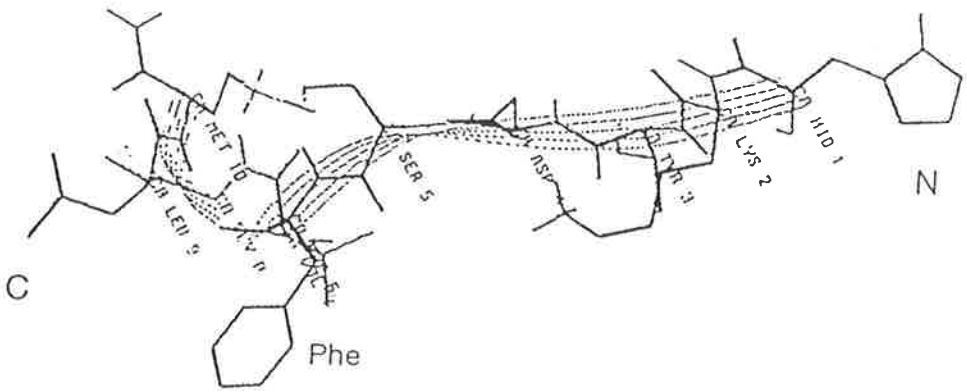


図2．Molecular modeling of SK (1-10)

20. 培養神経細胞の各種イオンチャネルに対する麻酔薬の作用
1　ベンゾジアゼピン系薬物の非 GABA 作動性電気生理学的作用について

石沢由美子，小野清典，土肥修司（岐阜大・医）
古家喜四夫，山岸俊一（生理研）

ベンゾジアゼピン系薬物は，中枢神経系において γ-aminobutyric acid (GABA) 受容体を介して作用を発揮し，その機序については数多くの知見が得られている[1]。しかしながら，非 GABA 作動性の作用については明らかでない。そこで，ベンゾジアゼピン系薬物であるミダゾラム，ジアゼパム，およびそれらの拮抗約であるフルマゼニルの非 GABA 作動性電気生理学的作用について検討した。

培養神経細胞 (NG108-15) を用いて，パッチクランプ法にて膜電流を測定した[2]。Na^+電流およびK^+電流測定には，電極内は高K^+溶液 (KCl 150mM, NaCl 10, $MgCl_2$ 0.8, EGTA 0.5, ATP 1, GTP 0.1, Hepes 10, pH7.2) とし，細胞外灌流液は，NaCl 152mM, KCl 5.4, $CaCl_2$ 1.8, $MgCl_2$ 0.8, Hepes 10, グルコース5.6，pH7.2 とした。また，Ca^{2+}電流測定には電極内に CsCl を用い，細胞外灌流液は Na^+ フリーとし tetraethylammonium chloride (TEA) を加えた。ミダゾラム，ジアゼパムは各々 10nM から 100 μM の濃度で灌流液に加え，各イオン電流を記録した。また，フルマゼニルを 100 μM 用いて同様の方法で測定した。

ミダゾラム，ジアゼパムは濃度依存性に Na^+電流を抑制した。また，K^+電流に対してミダゾラムは 10 μM 以上で，ジアゼパムは 100 μM 以上で抑制した（図１）。Ca^{2+}電流に対しては，ミダゾラムに比べジアゼパムは低濃度で抑制した（図２）。フルマゼニル 100 μM は，各イオン電流に影響を与えなかった。

ミダゾラムは，麻酔および集中治療において鎮静薬として頻用されている薬であるが，そのような場合の血中濃度は，今回測定した各イオンチャネルを抑制する濃度と同程度である[3]。ベンゾジアゼピンの中枢神経作用の中でフルマゼニルで拮抗されない作用も報告されており[4]，今回検討した非 GABA 作動性電気生理学的作用が関係している可能性がある。

【参考文献】

1）Prog Neurobiol 31 : 349-423, 1988
2）Pflugers Arch 391 : 85-100, 1981
3）Crit Care Med 18 : 1039-1041, 1990
4）Anesthesiology 77 : A788, 1992

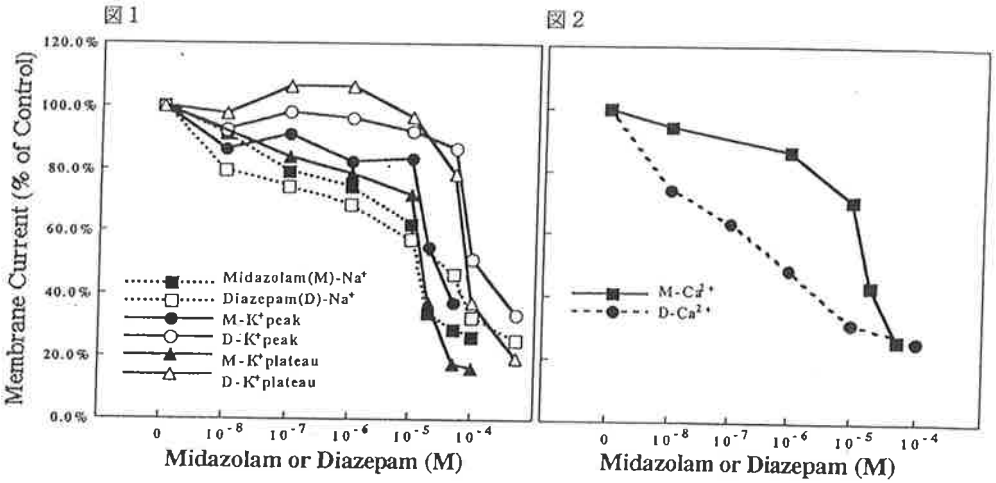


図1　ミダゾラムおよびジアゼパムの Na^{+}電流および K^{+}電流に対する影響

図2　ミダゾラムおよびジアゼパムの Ca^{2+}電流に対する影響

21. 音声および蝸牛直接電気刺激による脳内電気活動の解析

伊福部達（北海道大・電子科学研）
松島純一（北海道大・医・耳鼻咽喉）

人工内耳は内耳の有毛細胞に障害を起こした重度聴覚障害者のための補綴手段の１つであり，何らかの情報処理により音声信号を電気刺激に変換し，電極を介して直接末梢の聴神経を刺激するものである。これまで様々な方式の人工内耳が開発されているが，最も普及しているのはCochlear 社の製品で，日本国内でもその移植手術が行われている。しかしこの方式では電極を内耳の蝸牛内に挿入する方法をとっているため，繰り返しの移植は困難であり，幼児・小児に対する適用についても問題がある。そこで我々は蝸牛外電気刺激型人工内耳の開発を行ってきた。これは刺激電極を蝸牛内に挿入せず，正円窓膜に置いてシングルチャンネルで刺激するものであるが，音声のピッチと第２フォルマント周波数を時系列信号に変換したパルス列によって刺激することにより音声情報の伝達を可能とするものである。今回さらにこれを小型化し，埋め込むことができるように信号伝送方式を新たに設計し，この方式によって音声情報が内耳に伝達されることを確認するための実験を試みた。新しい方式では送信用一次コイルをイヤーモールト内に設置し，刺激電極に接続された受信用二次コイルを外耳道後壁皮下に埋め込むようにし，幼児・小児にも適用できるように工夫した。

本方式による伝送を評価するためモルモットを用いてネンブタール麻酔下に次のような実験を行った。刺激電極はテフロンコート白金イリジウム線の先端に200μmのボールを作り高含水ゴムで被覆したものを使用した。これを正円窓膜表面に接触させ，他端は二次コイルに接続した。一次コイルに三角波を送り二次コイルに生ずる2相性方形波によって刺激し，聴神経から複合活動電位(CAP)を記録した。本方式によって刺激した場合と，通常のアイソレータを使用して刺激した場合について，生じたCAPの大きさを比較したところ，本方式による場合の方がCAPは小さかったが，250～400μAの範囲で，刺激電流の増加とともにCAPも上昇することが確認された。二次コイルに300μAの電流を流すためには一次コイルに0.8Aの電流を流す必要があった。

以上の実験により本方式による外部からの刺激によって生体内に埋め込んだコイルから聴神経を刺激できることが確認できた。今後2つのコイルの配置，一次コイルの発熱を防ぐための線材の検討などを行い，本方式をできるだけ小型化する方法を検討し，実用に供する開発を行う予定である。

22. 聴覚中枢電気活動の光学的測定

橋本　享（東京医歯大・医用研）
山岸俊一（生理研）
柳沢慧二（鶴見大・歯）
堀川順生（東京医歯大・難治研）

膜電位感受性色素を用いて，聴覚中枢全体の活動状況を可視画像化し，聴覚中枢の機能的構造を解明することを目的とした。中枢活動の空間的・時間的分布を実験的に研究したいとき，膜電位感受性色素による光学的測定法は有力な研究方法である。

ネンブタール麻酔，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，皮質表面に膜電位感受性色素溶液(RH795 :0.5～1×10^{-3})を与えて，聴ニューロンを染色する。麻酔剤，筋弛緩剤，鎮痛剤を適宜与えて，光学的測定を始める。ハロゲンランプを光源として，干渉フィルタ(520±20nm)によって得た光を聴覚領に照射し，この励起光により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），CCDカメラ（浜松フォトニクス，フジマイクロデバイス）により観測する。画像メモリの画像記憶機能と画像減算機能を活用して，音刺激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た。聴覚刺激に対する誘発応答の時間経過と，画像メモリに収録した応答画像とを時系列的に対比して，聴覚中枢電気活動の空間的局在とその時間的推移とを調べた。

聴覚刺激として動物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観察された。しかし鳴き声に含まれる情報要素の所在を探るために，その周波数スペクトルの特定成分を模擬した合成音声信号を用いて，刺激パラメータと聴覚領の活動パターンとの対応関係を調べた。その結果，聴覚領において縞状の応答画像が見られることがあった。このとき刺激音にはホルマント類似のスペクトル成分が含まれていることが判った。これは聴覚中枢においても刺激パラメータに対応した柱状構造が存在する可能性を示唆するものであるが，聴覚領の活動パターンは個体差が大きく，種固有の応答パターンとして刺激音との対応関係を特定するのは容易ではない。動物がその鳴き声を媒介として個体間の情報連絡を行うとすると，種固有の鳴き声パターンの存在と，それに対する種固有の応答パターンの存在が前提条件となるので，この方向へ研究を進めたい。また現状では，応答画像の S/N が，微弱な中枢電気活動の可視画像化の隘路となっているので，雑音の低減と信号成分の増大を図り，さらに CCD カメラ・システムの低雑音性，ダイナミック・レンジ，高速応答性を活用して，局所的な活動の可視画像化すなわち画像観測の空間分解能の向上と時間分解能の改善を図りたいと考えている。

23. チャネルタンパク質の物性に関する生物物理学的研究

美宅成樹（東京農工大）
金久　實（京都大）
久木田文夫，山岸俊一（生理研）

チャネルタンパク質は典型的な膜タンパク質の一つで，生理的機能の非常に高いタンパク質である。実験的にはイカ巨大神経のイオンチャネルを初めとした電気生理学的な膨大な研究がある一方，遺伝子工学的研究によるアミノ酸配列が報告されている。ここでは，チャネルタンパク質の変性実験を詳細に行ない，立体構造形成に対する分子間力の役割を明らかにすると同時に，その結果に基づいてチャネルタンパク質の立体構造予測を行なう。

膜タンパク質は膜内に埋もれた領域と水に突き出したループの領域とに分けられる。従って，膜タンパク質の変性実験についても，主として膜内で働く変性剤の効果と水の中から働く変性剤の効果を調べる必要がある。今回の実験で，主として膜内で働く変性剤の効果について一応の結論を得ることができた[1)]。要点をまとめると，以下のとおりである。

（1）方法としては，イカの巨大軸索を細胞内灌し，内外に高濃度のアルコールを加え，神経の変性挙動を調べた。

（2）変性剤としては，エタノール，1－プロパノール，1－ブタノール，1－ペンタノールを用い，不可逆的な変性と麻酔現象の両方を調べた。

（3）アルコールによる神経の不可逆的な変性は，ナトリウムチャネルが潰れていくことから起こることがわかった。不可逆的な変性が起こっても，電流－電圧曲線の形が変化しないからである。（4）神経にアルコールを晒した時間に対して，ナトリウムコンダクタンスは指数関数的に減少した。そして，変性を特長づける変性時間はアルコールの濃度に対して非常に強く依存した（5）変性時間はアルコール濃度のN乗に依存する。Nの値はアルコールによって若干異なり，エタノールでは4.3，1－プロパノールでは4.5，1－ブタノールでは5.8，1－ペンタノールでは7.6であった。この数のアルコールが結合するとチャネルが壊れるということを示唆している。（6）水の中のアルコール濃度から膜内のアルコール濃度を分配係数から評価することができる。それを利用して，一定の時間後に変性を起こす膜内のアルコール濃度を評価してみると，アルコールの種類によらず，膜内のアルコール濃度が約0.5Mになるとチャネルタンパク質が変性することがわかった。

以上のような実験結果から，チャネルの膜内領域におけるタンパク質としての安定性は水素結合性の相互作用によっているということが分かった。（このことはチャネルタンパク質だけではなく，他の膜タンパク質でも共通の性質であることが実験的にはっきりしてきている）

立体構造を作る相互作用についての情報が得られてきたので，チャネルタンパク質の立体構造の予測も可能性が出てきた。今回はイカのナトリウムチャネルのアミノ酸配列について立体構造の予測を行なった。考え方としては，（1）相互作用は極性の相互作用を重視する。（2）ヘリックス間の結合は，ある程度の大きさの領域における相互作用の強さで決まる。（3）ヘリックスの間の特異的な結合の問題は一種のジグソーパズルの問題である。この考え方でチャネルタンパク質の立体構造を予測することができたが，その妥当性については今後の検討課題である。

【参考文献】

1）Fumio Kukita and Shigeki Mitaki : J. Physiol. (1993) 463, 523-543. "Kinetic Analysis of the Denaturation Process by Alcohols of Sodium Channels in Squid Giant Axon".

24. 乳腺，乳癌の分化，増殖と細胞内情報伝達系

榎本浩一（島根医大・生理）
古家喜四夫，山岸俊一（生理研）

乳腺等の上皮細胞を機械的に刺激すると細胞内カルシウムの増大が起こり，この反応は隣接する細胞に波のように伝搬していく。最近，いろいろな上皮細胞で機械的刺激によるカルシウム波がみられることがわかってきた。昨年の共同研究で，われわれはカルシウム波伝搬が細胞間のギャップ結合を介しているのではなく，機械的刺激により細胞から何らかの物質が放出され，それが細胞外液を拡散し，隣接する細胞の細胞内カルシウムを増加させることを証明した。

乳腺細胞にATPを投与するとプリン受容体を介した細胞内カルシウムの増大が起こる。プリン受容体の用量－反応曲線はATP＝UTP＞UDP＞ADP＞＞AMP＝UMPであるため，受容体はP2型であるが，x，y，z，tのいずれにも該当しない新型である。機械刺激によるカルシウム波とATPによるカルシウム増大はスラミンとLa^{3+}により抑制された。機械刺激によるカルシウム波もP2受容体を介するものと結論できる。乳癌細胞はブラディキニンによっても細胞内カルシウム増大が起こったが，スラミンやLa^{3+}で抑制されないので，異なる反応経路をとると考えられる。

乳腺細胞をピペッティングした上清には細胞内カルシウムを増大させる物質が含まれる。機械的刺激により細胞から放出される物質と同じものと考え，精製，同定を行った。活性物質の紫外スペクトルは260nmに極大もち，蛇毒のホスホジエステラーゼ，ピロホスファターゼ処理により失活したので，燐酸化したヌクレオチドであると予想した。ルシフェリン，ルシフェラーゼで測定した上清分画中のATPの濃度は反応を惹起ずるには不十分であり，他の物質もあると考えられた。HPLCにより，ATP, UTP, UDPの存在が確認できた。濃度はいずれも1μmM程度であった。ATP, UTP, UDP（各1μM）混合物の投与で上清分画と同様の反応が観察できた。他の物質についても検討中である。

乳腺細胞はEGF存在下で培養すると増殖し，インシュリン＋コルチゾール＋プロラクチンで分化する。乳癌細胞はホルモンなしで増殖する。乳腺細胞の増殖と分化におけるイノシトール1，4，5－3リン酸(IP3)の作用を検討した。IP3を入れたパッチピペットを使ってホールセルクランプをかけると，セルアタッチからホールセルになった時に外向き電流と細胞内カルシウム増大が観察できた。電極より流入したIP3により，細胞内カルシウムストアよりのカルシウム放出が起こったものと解釈した。IP3による細胞内カルシウム増加を比較すると，増殖している乳腺細胞は分化した場合より大きな反応が得られた。細胞内カルシウムストアへのカルシウムとりこみを阻害すると考えられるThapsigarginはゆっくりした細胞内カルシウムの増加を起こしたが，その大きさは分化，増殖で変わらなかった。したがって，増殖期にある乳腺細胞は細胞内IP3受容体の数が増えているか，感受性が増加していると考えられる。

25. モルモット輸精管平滑筋のKチャネルの研究

森本克士（尚絅短大）
久木田文夫，山岸俊一（生理研）

モルモット輸精管平滑筋細胞のCa依存性K電流の性質をinside-outのパッチ膜電位固定法で調べた。

細胞膜の内側のCaとNaの濃度を変化させ，Ca依存性Kチャネルのコンダクタンス，開確率

や開閉時間を調べた。Ca も Na も Ca 依存性Kチャネルのコンダクタンスには影響を与えず，その開確率を増大させる。開閉時間は速い成分と遅い成分とからなり，開時間の速い成分を長くし，閉時間の遅い成分を短くすることにより開確率を増大させている。

又，Ca や Na の濃度変化に対して，開確率は非常に大きな Hill 定数を持つように変化する。この現象の分子的な機構を解析中である。

【参照文献】

Morimoto, K, Kukita, F., Yamagishi, S. Ann. N. Y Acad. Sci. (962 : 514-519, 1993)

26. 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）

我々はこれまで，大腸粘膜粘液細胞からの粘液分泌過程に関して，ノマルスキー顕微鏡と画像処理装置の組み合せで，検討してきた。今回はおなじ方法を用いて，胃幽門腺の粘液細胞からの粘液分泌につき検討を加えた。

【方法】

モルモット胃幽門部を切出し，筋層を剥離した粘膜＋粘膜下組織片を，かみそりで１㎜×２㎜程度の細片にした。スライドグラス上に深さ 200－300 μm 巾５㎜ほどの溝をつくり，その中に粘膜細片を横たえ，カバーグラスを被せた。標本の挟み込まれたスリットに HEPES －緩衝液を流し，標本を表面灌流し，粘液細胞を生きたままリアルタイムに顕微鏡下で観察した。観察は，ノマルスキー型の顕微鏡を用いた。対物レンズは×100を用い，リレーレンズで×４と拡大した像を CCD カメラで取込み，画像処理装置によりコントラストの増強をはかった後，モニター画面上に観察した。同時にビデオテープで記録し，後日の解析に供した。

【結果】

幽門腺を観察すると，直径 0.5－１μm の顆粒を多数含む粘液分泌細胞が多数観察された（図）。顆粒は，主として幽門腺管腔側に偏っているように見えた。ムスカリン作動薬のカルバコールを含む灌流液を流すと，exocytosis を示すと思われる粘液顆粒の急激な明るさと形の変化が観察された。一定面積の画面上に観察される exocytosis の数は，カルバコール刺激後30秒前後でピークに達し，その後次第に脱感作した。カルバコール刺激による反応は，灌流液中のカルシウムイオンを除くと低下した。また，カルシウムイオノフォアの A23187 では，exocytosis を起こすことはできなかった。これらのことより，ムスカリン刺激による反応はカルシウムに依存するが，細胞内カルシウム上昇のみでは反応が起きないように思われた。プロスタグランジン E2 やアデニルシクラーゼを活性化するフォルスコリンでも，カルバコールよりやや弱いながら反応が見られ



図　モルモット幽門腺細胞。多数の粘液顆粒が観察される。

たことから，cAMP も粘液分泌に重要な役割を果たしていることが判った。

27. 低浸透圧ショックによる内皮細胞形態変化の観察

冨田　稔，福内靖男（慶應大・医・神経内科）
寺川　進（生理研）

【目的】

一昨年の本研究では虚血性脳浮腫に関連し，培養神経細胞，グリア細胞の低浸透圧ショックによる膨化を観察してきた[1]。虚血性脳浮腫において内皮の膨化もまた重要な役割を果たしているとされる。本年度は同様の実験を培養内皮細胞について行なったので報告する。

【方法】

内皮細胞は市販されているヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC：von Willebrand 因子の免疫的染色と low-density lipoproteins (LDL) の摂取から内皮細胞と検定済：倉敷紡績，大阪）のものを用いた。細胞はカバーグラス上にて培養し，その形態を倒立型微分干渉顕微鏡下に観察，ビデオ装置により画像処理後録画した。細胞の立体的な構造は，寺川の考案した顕微鏡の焦点を利用した

手法を用いて大まかな等高線を描いた。つぎに細胞を低浸透圧の条件下におき，その際の形態変化，細胞内微小器官の変化を観察した。すなわち前回と同様，細胞をE-GMUV培養液にて灌流し，コントロールの所見を得てから，灌流液を蒸留水に切り替えて細胞の膨化の状態を観察，細胞の破裂までの時間を測定した。

【結果】

培養内皮細胞はカバーグラスに平たく密着した多形の細胞像を示し，そのほぼ中央部には盛り上がった核を有した（図1）。核の高さは3.3－15.1 μmで平均8.1±3.3 μmであった。その頂点にはいぼ状の小隆起が点在した。核は厚い核膜で覆われ，所々nuclear poreとおもわれる小孔が貫いていた。核は一個以上の核小体を入れ，内部は比較的均質で運動性の顆粒に乏しかった。細胞周辺部は薄層のシート状でその厚さは2.3±1.0 μmであり，未同定の微小器官，動き回る顆粒がみられ，特に核周囲において密であった。すなわち0.5から2 μmにも達する円形のpinocytotic vesicle, phagosome, lysosomeとおぼしき顆粒，0.50－0.1 μmのneurotransmitterその他を含む小顆粒，また蛇状にのたうち回って動き，かつ分断，連結を繰り返している太さ0.5 μm前後，長さは10 μm以上におよぶWeibel Palade[2]またはミトコンドリアとおぼしき索状体などであった。細胞辺縁部はfilopodia, lamellipodia[3]を密に持ち，ときにblebsを突出し，また部分的に波状の運動を繰り返すrufflingが観察された。

低浸透圧の液を灌流すると，まずfilopodiaが球形のビーズを形成し始め，徐々に大きくなり，かつ細胞体の方へと広がり水泡状に融合した。同時に細胞体はカバーグラスから剝離し始め，ゆっくりと厚みをましつつ膨化し，満月状になった（図2）。細胞内微小器官はほぼ同様の速さで膨化した。これは侵入した水が迅速に細胞すべてに撹拌されて広がったことを示す。特異なことは膜表面に毛羽立って“糸引き納豆”様の粘着糸が出現したことである。これは近傍の細胞あるいは床面に接着し容易に剝がれず，しばしば球形となった細胞体を床面に錨状に支え，細胞がその糸を中心にくるくる回転する現象が観察された。細胞は5例中3例に破裂（約10分後に破裂）したが，その後も細胞膜は蜘蛛糸様に残存した。2例では15分経過しても破裂せず実験を終えた。

これらの所見は既に報告した神経細胞(N18)，グリア細胞(C6)の膨化とは全く異なるものであった。すなわち内皮細胞の細胞膜は非常に粘着性が強く，容易に破裂せず，時に細胞同志が融合して“縫目のない”巨大細胞状を呈した。低浸透圧による破裂までの時間はいづれも600s以上であり，グリア細胞のC6の410.6±45.7s，神経細胞N18細胞69.3±10.4sと比べて推計学的に有意差があった（$p<0.01$）。内皮細胞の細胞膜，グリア細胞，神経細胞の膜はそれぞれ物理的な特性において大きく差異があると言える。

【文献】

1）冨田稔，後藤文男，寺川進：培養astroglioma (C6) とneuroblastoma (N18) のhypoosmotic shockへの耐性の差について－。生理学研究所年報13巻：216-219, 1992

2）Weibel, E. R., Palade, G. E. : J. Cell Biol. 23 : 101-112, 1964

3）Bruce A., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. : Molecular Biology of the Cell

(2nd ed). Garland Publ., New York and London, 1989

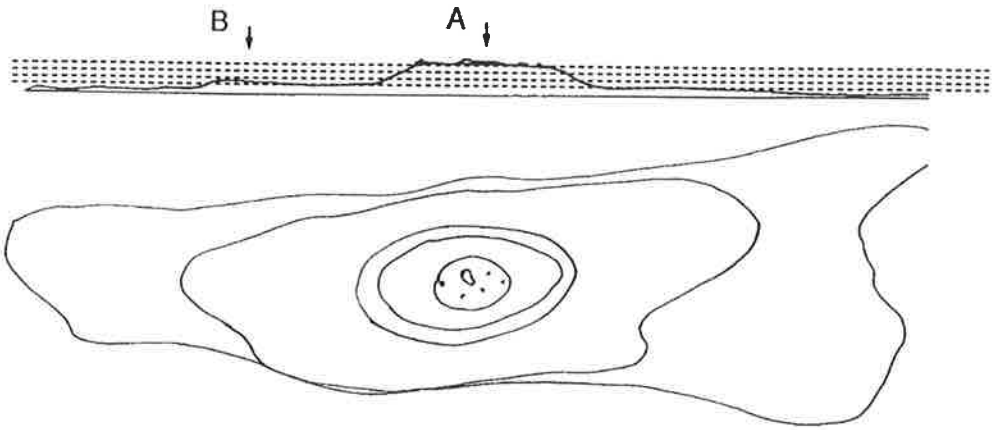


図１．confluent の内皮細胞の等高線図。核の高さＡ点は平均 8.1±3.3 μm であり，周辺部Ｂ点は平均 2.3±1.0 μm であった。

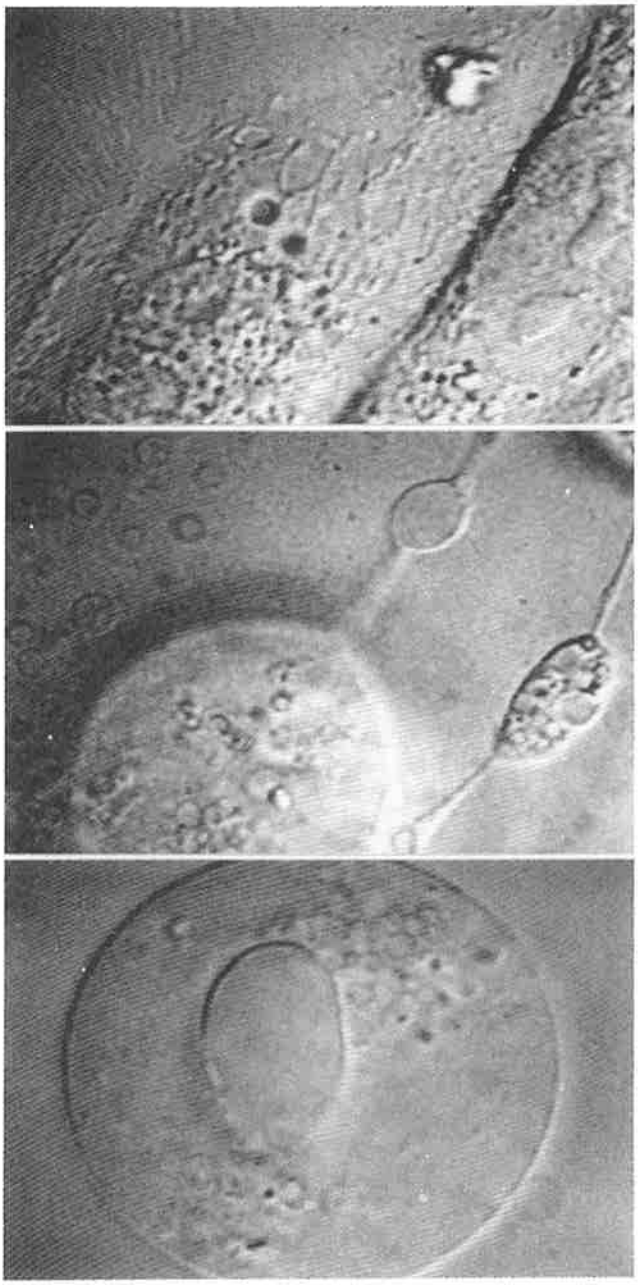


図２．内皮細胞 (HUVEC) の低浸透圧ショックによる膨化。上は control 時の写真で，２個の細胞が並列している。２個の nucleoles を含む核，その周囲の密な顆粒，２μm にも達する巨大 vesicle (phagosome), 蛇状索状体などがみられる。中央は低浸透圧液灌流５分後の写真で細胞表面には粘着性の物質が毛羽だって生じ，他の細胞，床面とは粘着性の紐によりつながっている。filopodia はビーズ状となり，床面に取り残されている。下は満月状破裂寸前の細胞を示す。

28. 個々の下垂体細胞におけるエキソサイトーシスによるホルモン放出量の解析

飯郷雅之，服部淳彦（聖マリアンナ医大・1解）
寺川　進（生理研）

下垂体前葉からのホルモン放出は，主にエキソサイトーシスによってなされていると考えられてきたが，その直接的な証明はいまだ成されていないのが現状である。そこで本研究においては，ビデオ強化型ノマルスキー顕微鏡によるエキソサイトーシス可視化システムと，個々の細胞からのホルモン放出量を測定できるリバースヘモリィティックプラークアッセイ(RHPA)を組み合わせることにより，エキソサイトーシスとホルモン放出の連関についての検討を行った。

成熟雄ラットより摘出した下垂体前葉を細切の後，コラーゲナーゼ処理により分散した下垂体前葉細胞を，コラーゲンあるいはポリーL－リジンでコートしたカバーグラス上で培養し，実験に用いた。抗ラットPRL血清，補体（モルモット血清），プロテインA結合赤血球をオープンチャンバーに加えることによりRHPAを行った。また同時に，ビデオ強化型ノマルスキー顕微鏡を用いてエキソサイトーシスのリアルタイム観察も行った。これまでの予備的な検討において，TRHによる刺激ではPRL細胞におけるエキソサイトーシス像を観察することが困難であったため，本研究においては分泌刺激として微小ガラス管電極による電気刺激を用いた。

電気刺激を用いた本研究においてもエキソサイトーシス像を観察することは容易ではなかったが，培養液の灌流下において十数例のエキソサイトーシス像を観察することができた。細胞分散後，長時間を経過した細胞の方が反応性が良いように思われた。また，数例ではあるが，電気刺激の直後にエキソサイトーシス像を示した後，数分後にRHPAの溶血斑を形成し始める細胞も見いだされた。（次頁の図を参照）

以上本研究の結果より，少なくともラット下垂体のPRL細胞は，エキソサイトーシスと連関したホルモン放出も行っていることが明らかとなった。今後は例数を増やすとともに，エキソサイトーシスの頻度とホルモン放出量の相関について検討する必要がある。また，PRL細胞のみならず，GH, LH産生細胞などにおいても同様なエキソサイトーシスとホルモン放出の連関が見られるかどうかについても検討していきたいと考えている。

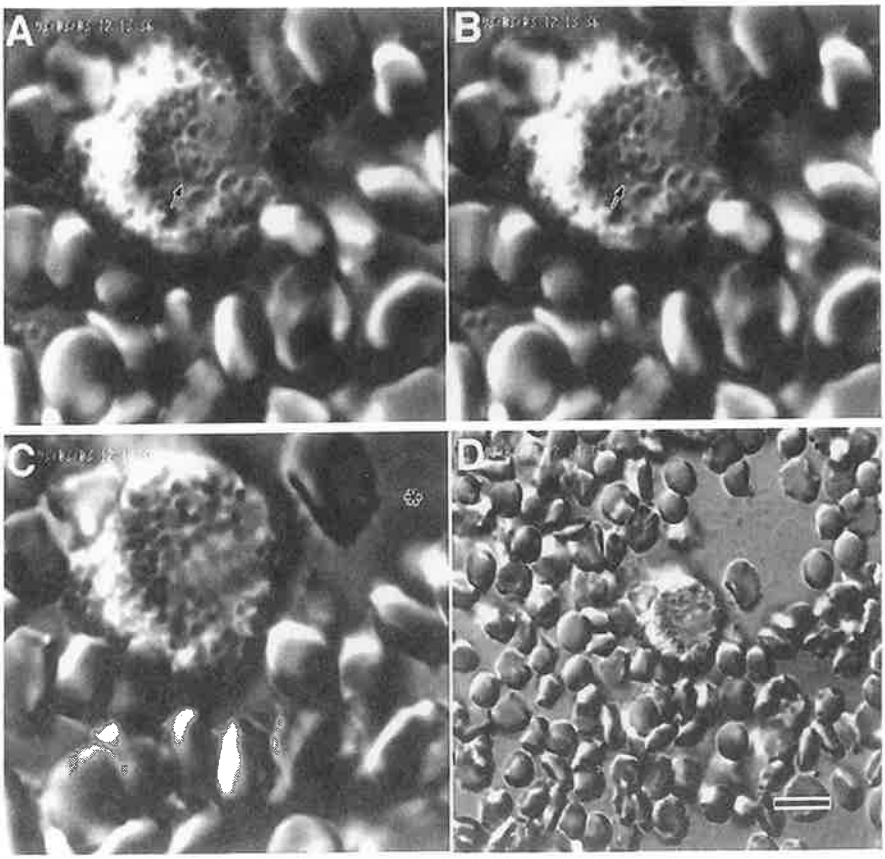


図　エキソサイトーシス（矢印）に引き続いて生じた溶血（星印）。AB 間は 240ms, BC 間は16分の時間間隔。D は C の低倍像。棒は5 μm (ABC) と12.5 μm (D) を示す。

29. 分泌装置における分子動態の画像解析

升島　努，洲崎悦子，池田佳代，小林秀行（広島大・医）
寺川　進（生理研）

分泌装置の構成要素として重要なゴルジ装置の膜動態を探る目的で予備的実験を行ったところ，リアルタイムでの詳細なゴルジ膜動態解析には，用いる細胞系・蛍光色素・装置のさらなる慎重な検討が必要であることがわかり今後の課題となった。

そこで，細胞内での分泌装置の動態を直接追跡する前段階として，分泌現象の最後のステップであり機能的最小単位ともいえる「開口放出」現象に着目し，分泌顆粒を高密度に有する好中球での開口放出の解析を試みた。好中球は異物を認識・貪食し，これを無毒化することによって生体防御の第一線で活躍する細胞であることが知られているが，この異物貪食に際して起こる活発な開口放出像をとらえることに成功した。さらに，リアルタイムでの差像処理解析を行い開口放出像のみを抽出することにより，好中球が異物を貪食する際の活発かつ高速な開口放出についての詳細な解析結果を得ることができた。まず図１に示す様に，非常に高速な開口放出であることが明かとなった。また，開口放出の起こる局在も解析することができた（図２）。開口放出の頻度はパッチクランプ法によっても計測可能であるが，このシステムでは局在解析も可能であり，顆粒の開口放出は細胞膜にではなく食胞膜に向かって起こることをより直接的に示すことができた。その他，食胞周囲でランダムに起こる訳ではなく，好中球が最初に異物に接触した辺りで１個目の開口放出が発生し，偽足の伸展に沿って広がっていくことも明かとなった。さらに，好中球が１個の異物を貪食する際に起こる開口放出の頻度は，平均38秒間に36回 (n＝30) であった (図３)。以上の結果は，好中球が迅速かつ効率的な無毒化を行いうる能力を持つことを示しており，この細胞が Fast Defense に関与するという事実を納得させるものである。

「では，開口放出を引き起こす最も重要な因子は何なのだろうか？」この疑問を解明する第１段階として，分泌制御分子として挙げられる Ca イオンについて，好中球貪食過程での関与を探ってみた。このため高倍率・高分解能に開口放出を観察しながら蛍光像として Ca イオン動態も同時にとらえられるイメージングシステムを作った。その結果，異物の認識後偽足の伸び始めるタイミングに相当する急激な細胞内 Ca イオン濃度の上昇が細胞全体に起こり（図４），食胞の閉鎖後ほどなく急速に下降し静止時のレベルにもどることが明らかとなった（図５)。以上より，好中球貪食過程において Ca イオンは偽足伸長と最も強く相関することが示唆され，開口放出を引き起こすタイミング・局在を直接的に説明する要因ではなく，逆に Ca イオン以外に開口放出に強く関与する必須分子が存在することが明かであり，また開口放出の機構として Ca イオンが直接的に膜融合を引き起こすという説もこの場合にはあてはまらないことが明らかとなった。

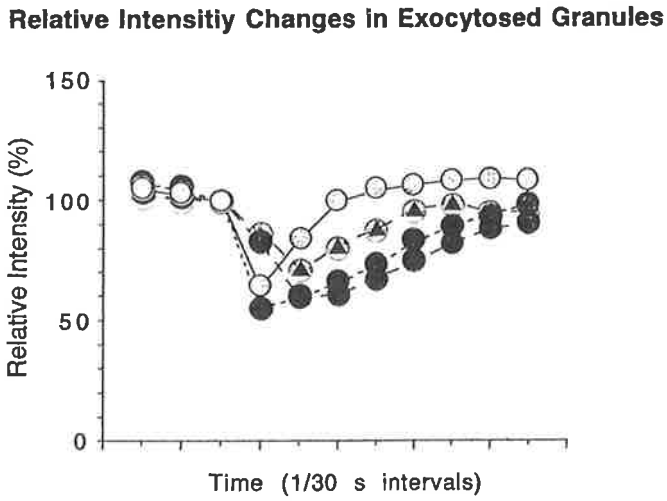


図1　好中球での開口放出時にみられる一個の顆粒の明るさの相対的強度変化

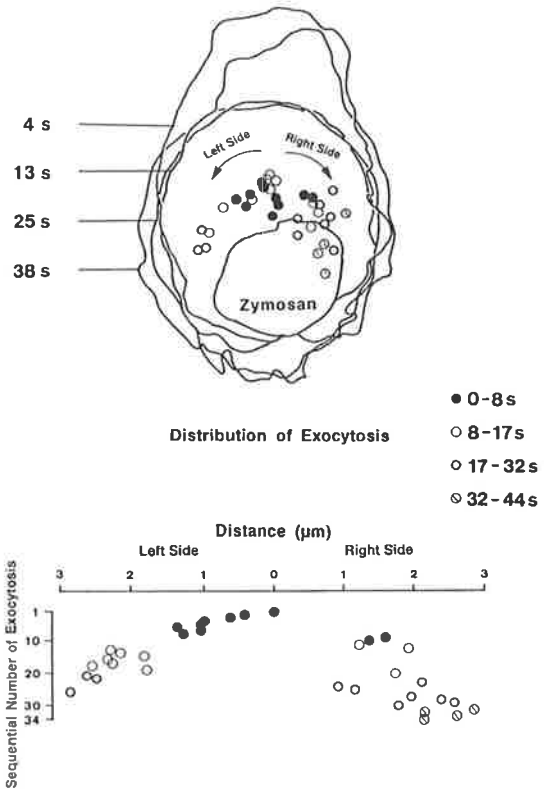


図2　好中球の異物 (Zymosan) 貪食に際して起こる開口放出の位置の時間的変化

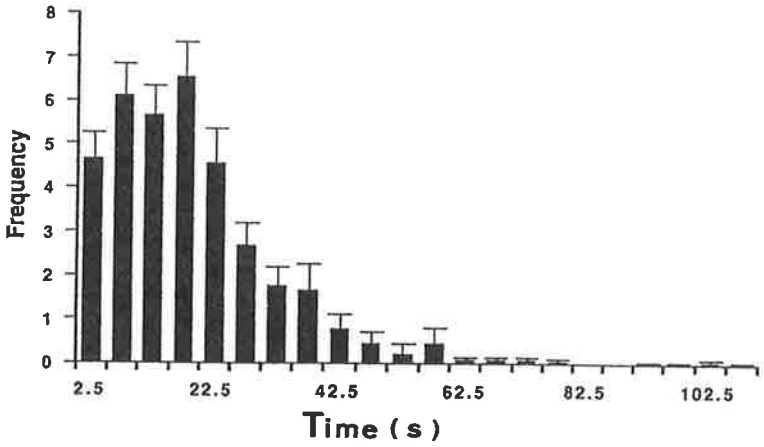


図３　好中球貪食時における開口放出頻度の時間的変化

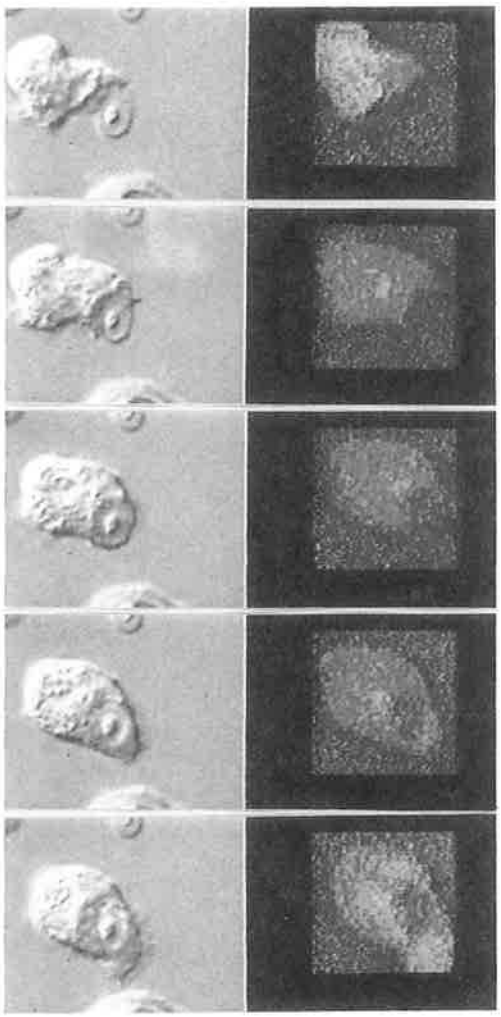


図4　開口放出像（左）と Ca^{2+} 依存蛍光像（右）との同時イメージングシステムでとらえた好中球貪食過程

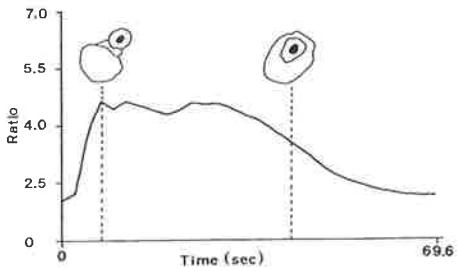


図5　好中球貪食時における Ca^{2+} 濃度の時間的変化

30. 内分泌顆粒の細胞膜への融合および開口放出の分子機構

宮本茂昭（九州工大・情報工・生化システム）
寺川　進（生理研）

内分泌細胞では，外部信号を受容後，細胞内で起きる様々な second messenger 分子を介した情報伝達系を経て細胞内 Ca^{2+} 濃度が μM level へ上昇する。この信号伝達の最終段階で exocytosis によりホルモンが細胞外に放出される。これに先立ち分泌顆粒が細胞膜へ融合する。このメカニズムおよびその制御の分子機構はほとんど未解明である。小胞と細胞膜との融合には融合促進タンパク質が関与している可能性が報告されている。これらは類似のアミノ酸組成の部分を持つことが知られている。最も代表的な融合促進タンパク質として influenza virus 膜に存在する hemagglutinin が知られている。膜融合促進の機能を担うのはN末端の α-helix の部分であると考えられている。この部分と類似の20アミノ酸残基よりなる7種類の polypeptide が合成された[1]。Type-1 (HA-1) はリン脂質の liposome を融合させることが確かめられている。この融合促進 peptide が内分泌顆粒と細胞膜および内分泌顆粒間の融合を促進するか否かを解析した。融合は微分干渉顕微鏡像を image processor によりビデオ強調画像処理することにより観察した。顆粒間の融合と会合を形態的に区別するのは現段階では困難である。しかし融合が生じるためには会合の段階が必要なことから，会合形成を1次的目安として採用した。

【結果】

内分泌顆粒として牛の副腎髄質の chromaffin 細胞より調整した chromaffin 顆粒を使用した。Plasma membrane としてはこの細胞膜より調整した vesicle を使用した。等張液で調整した後，既に会合した顆粒および残存する細胞内構造体を除去するため，顆粒および細胞膜 vesicle の溶液は pore size＝0.45 μm の filter で濾過して使用した。

（1）Sucrose または KCl を主成分とする等張液中で，Ca^{2+} 非存在下 (pCa＞7.0), HA-1 非存在下においては，水素イオン濃度を pH＝7.0 から pH＝6.0 にあげても顆粒の会合体は生じなかった。顆粒濃度はタンパク質濃度で表して 0.5mg/ml で測定した。

（2）HA-1 存在下 (0.25mg/ml) では pH＝7.0 において，Ca^{2+} ion が 10 μM 以上存在すれば顆粒間融合（会合）が生じた。

（3）Ca^{2+} 非存在下においては（2）の系で pH＝6.0 にして会合体が形成されることはなかった。

（4）細胞膜より調整した vesicle と内分泌顆粒の等量存在下に，HA-1 が共存すれば Ca^{2+} が存在しなくても pH＝6.0 に下げれば会合体が生じた。

（5）HA-1 が存在しなければ Ca^{2+} 濃度を 100 μM にあげても顆粒間の会合体は生じなかった。

（6）顆粒と細胞膜の融合を促進すると考えられる phospholipase A_2（100unit 存在下）のみでは顆粒間および顆粒と細胞膜の融合は促進されなかった。HA-1 と共存し，Ca^{2+} 存在下 (pCa＞5) では強力な会合体が形成された。

結論

生理的条件下における顆粒間および顆粒と細胞膜との融合は，peptide HA-1 存在下で，μM level 以上の Ca^{2+} により促進された。Ca^{2+} 非存在下 (pCa＞7.0) では融合は生じなかった。この peptide は合成 vesicle のみならず生細胞顆粒の融合促進作用を有することが判明した。

【謝辞】

Polypeptide (HA-1) を提供して頂いた京都大学化学研究所，高橋教授に感謝致します。

【参考】

1） S. Takahashi, Biochemistry, Vol. 29, pp6257-6264 (1990).

31. 海産軟体類における視覚機能の発現

桜井泰憲，島崎健二（北海道大・水産）
平野　穣（生理研）

海産軟体類は色覚や形状視などの高度な視覚機能を有することが知られている。本研究は主にイカを用いて，視覚機能の機能形態学的な解析を行なっている。昨年の形態学および電気生理学的な研究成果をもとに，本年は視細胞外節の免疫組織化学的な解析を行なった。実験には北大臼尻実験所で捕獲したスルメイカを用いた。イカの網膜は約 450 μm あり，その内 200－270 μm は視細胞の外節が占めている。視細胞外節の長さは部位によって異り，背側網膜で約 240 μm，腹側網膜で 270 μm あった。さらに暗順応したイカの単色光刺激に対する ERG の色光応答曲線は，吸収極大 480nm の視物質の吸収分光曲線（Dartnall の nomogram）と良く一致したことから，イカ網膜の視細胞には 480nm に吸収極大を有する視物質を含むことが明らかになった（本年報第12巻)。本年はこれらの所見をもとに，脊椎動物の視物質を認識する抗体を用いて軟体類の視細胞外節を免疫組織化学的に解析した。イカの眼球は Zamboni 液で固定した後，全眼の凍結切片を作製し，脊椎動物のオプシンに対するポリクロナル抗体を数種類用いて免疫反応を調べた。しかしながらこれまでのところ，明確な陽性反応は得られていない。これはイカの視細胞オプシンの構造が脊椎動物とは著しく異なっているためか，または用いたポリクロナル抗体が適当でなかったかは不明である。引き続き研究を継続し，この問題を明らかにする。

32. 網膜における色情報抽出の神経機構

日高　聡，橋本葉子（東女医大・第一生理）
大塚輝彌（生理研）

脊椎動物網膜における色弁別の神経機構を解析する上で，特定の色光を受容する色感受性錐体の配列分布を知る必要がある。色弁別能を有している硬骨魚類の中には，錐体視細胞が幾何学的な配列を示す種類があり，その中でコイ科ウグイの網膜では複合錐体と単錐体が畝状に交互に配列している。Harosi と Hashimoto ('83)はこの網膜から単離した錐体外節の吸収分光を測定して，複合錐体は赤と緑感受性錐体から成り，単一錐体には赤・緑・青・紫外感受性の 4 種類の錐体の存在を報告した。これらの色感受性錐体の網膜組織上での配列様式を，錐体オプシンを選択的に認識する抗体を用いてこれまでに調べた。ウシロドプシンのアミノ酸配列を認識するモクローナル抗体 MAb 15-18 を用いて調べた結果，ウグイ網膜では複合錐体の短錐体と単一錐体の一部の外節に陽性反応があった。ヒトロドプシンの一部を抗原として作製したポリクロナール抗体 PAb Ph188 を用いた結果では，複合錐体の短錐体の外節にのみ免疫陽性像が観察された。複合錐体の短錐体は顕微分光学的測定によって緑錐体であることが確認されているので，両抗体はウグイ網膜の複合錐体の緑錐体を標識することが明らかになった。一方，MAb 15-18 に陽性反応を示した単一錐体に対して，PAb Ph188 は陰性反応を示した結果については検討する必要が生じた。そこで今回，単一錐体を調べる試みで，微小電極による細胞内記録・染色法を用いて錐体のスペクトル応答を記録すると共にその細胞形態を解析した。

実験には暗順応して剝離したウグイ網膜を用いた。記録電極内には 0.5MLiCl と 0.05MTris 緩衝液，pH7.6 に溶解した 6% Lucifer yellow と 6% biocytin を充填した。剝離網膜標本を Ringer 液中に浸し，視細胞側から記録電極を刺入し，細胞内記録を達成した錐体視細胞から，20nm ステップでスキャンした 400nm から 720nm までの各波長の単色光に対する応答電位を記録した。錐体が示した過分極応答の最大電位応答を引き起こした波長を確認後，電気泳動的に両マーカーを同時に細胞内に注入した。網膜組織をパラホルムアルデヒド固定した後，まず錐体の Lucifer 標識を蛍光顕微鏡下で観察し，次に biocytin の標識を ABC 法を用いて可視化した。視細胞が示す幾何学配列上での，標識錐体の配列位置を確認した後，組織処理を経て網膜縦断切片を作製して，標識錐体の細胞形態を同定した。今回の結果，最大電位応答を引き起こした波長は，複合錐体の長錐体は 600nm にあり，短錐体は 520nm にあった。これらの結果はこれまでの顕微分光学的な測定結果に対応した。また，600nm に最大応答を示した単一錐体が同定され，その軸索終末部から数本の発達した telodendria が伸びていた。それらの telodendria は複合錐体の軸索終末部には観察されなかった。解析した 8 例中，単一錐体で 500－520nm の緑色光及び 400－440nm 付近の青色光に最大応答を示したものは同定できなかった。MAb 15-18 に対しては陽性反応を示すが，PAb Ph188 に対しては陰性反応を示す単一錐体について，今回の解析からは緑

感受性であることを示す証拠は得られなかった。視細胞間には相互の作用の存在が知られており，視細胞間の作用部位はその telodendria を介して軸索終末部位である可能性が示唆されている。単一錐体については現在のところ不明な点が多く残されている，今後はさらに，異なる背景光照射下で錐体視細胞の分光特性の解析を進める必要がある。

33. 加齢に伴う網膜神経細胞の形態と機能変化

野本茂樹（老人研）
平野　稴，大塚輝彌（生理研）

加齢に伴う網膜神経細胞の機能変化に関する研究はきわめて少ないが，ハト網膜では加齢に伴なう ERG の高周波成分の減少が報告されている (Hodos et al., 1990)。この現象を解明する手がかりとして，高周波成分に関与すると考えられるアマクリン細胞に注目した。昨年はハト網膜に投射する遠心性神経を DiI で標識し，神経終末が取り囲む内顆粒層の細胞体には，Lucifer yellow を細胞内注入する 2 重染色法を開発した（第13巻232－233頁）。本年はさらに解析数を増やしアマクリン細胞の形態を詳しく調べて，サブタイプを同定した。

ハトの網膜には Isthmo-optic nucleus (ION) から投射する遠心線神経がある。そこで，ION に DiI を注入して 2 週間後に眼球を摘出し，0.2％グルタールアルデヒドと 4 ％パラフォルムアルデヒドの混合液で同定して，網膜の全載標本を作製した。

標識された遠心性神経の神経終末は螢光顕微鏡下で観察した。DiI で標識された神経線維は，視神経乳頭から網膜の全域に放射状に広がり，視神経節細胞層から内網状層を上行し，内顆粒層に 2 種類の神経終末を形成していた。1 つは直径約 100 μm の範囲に広がるタイプであり，もう 1 つは直径約 20 μm の篭状構造を形成していた。後者は 1 個の細胞体を取り囲んでいる形状のため，その中心部にガラス微小電極に詰めた Lucifer yellow を電気泳動的に注入した。この結果，篭状の神経終末は 1 個の細胞体を取り囲む構造であることが明らかになった。細胞内注入に成功した12個の内，10個の細胞は内網状層第 1 層に 1 本の突起が網膜辺縁部に向かって延びていた。これは association アマクリン細胞 (Cajal, 1911) に類似しているが，突起先端のブラッシ様の分岐は今回観察されなかった。残りの 2 個は第 3 層に放射状の突起を伸ばす単層性アマクリン細胞であった。これまで報告されている傘状アマクリン細胞 (Maturana & Frenk, 1965) ときめて類似した形態を示した。

さらに遠心性神経の標的細胞の候補として考えられる，内顆粒層に細胞体を有する異所性視神経節細胞との関係を明らかにするため，ION には DiI を注入し，さらに異所性視神経節細胞は nBOR (nucleus of the basal optic root) に核酸染色剤 (DAPI) を注入して 2 重染色した結果，DAPI で標識された異所性視神経節細胞の細胞体には，遠心性神経の篭状構造が見られなかった。これ

らの所見から，ハトの遠心性神経線維は association アマクリン細胞と傘状アマクリン細胞の2種に投射していることが明らかになった。

34. パーフォレイテッドパッチ記録法による網膜神経細胞の膜特性の計測

岩橋茂雄，林田祐樹，八木哲也（九州工大・情報工学）

脊椎動物網膜の双極細胞の膜特性は，既に単離細胞を試料とし，パッチ電極を用いたホールセルクランプ法による計測されている[1]。しかしこの方法によると，電極につめたリンガー液で細胞内液を置換してしまうため，細胞内伝達機構を介した膜の電気的活動を阻害している恐れがある。そこで今回，ニスタチンを用いたホールセルクランプ法を適応し，双極細胞の膜計測を行った。この方法によれば細胞内液と電極の間の電気的導通は，電極液に溶かしたニスタチンが膜に形成したイオノフォアにより得られる。このイオノフォアは，一価イオンのみに透過性があり，カルシウム等の細胞内伝達物質を電極側に流出させることなく膜電位固定法が適応できるといわれている。ただし形成された電極と細胞内との導通抵抗の挙動は，細胞の種類等により異なるなど，不明確な点が多い。そこでまずこの方法により安定した計測が可能かを確認する目的で，ギガオームシール後の電極の導通抵抗の時間変化を調べた。その結果シール後，導通抵抗はほぼ指数関数的（時定数3から15分）に減少し安定した値に向かうことを確認した。

図1に上記の方法で計測されたコイ網膜から単離した双極細胞の膜特性を示す。双極細胞は網膜神経回路内では，暗時に－30mV 程度の静止電位を保ち，光刺激に対しアナログ的電位変化で応答する。そこでここでは，細胞内電位を－30mV に保持し，持続時間3秒の電位パルスにより様々なレベルに電位固定することにより，膜コンダクタンスを計測した。膜電位を－60mV 以下に過分極させた場合，時間依存性のイオン電流が活性化された。この電流は，従来のホールセルクランプ法により同定された非選択性陽イオン電流と見られる[1]。過分極パルスをオフした時に，ゆっくりとした一過性の電流が現れる。上記の非選択性陽イオン電流の脱活性化に加え一過性の外向き電流が存在すると考えられた[1]。－60mV から－10mV の双極細胞の生理学的な動作範囲では，膜抵抗は約 2.4GΩと非常に高い（図2）。以上の結果から双極細胞の膜特性は定性的にはホールセルクランプ法により計測されたものと一致することが分かった。今後の目的は，視細胞から双極細胞へ信号伝達の際の伝達物質とみられているグルタミン酸の効果を，同様の方法で調べることである。

【参考文献】

［1］ Kaneko, A. and Tachibana, M. (1985). Journal of Physiology, 358, 131-152.

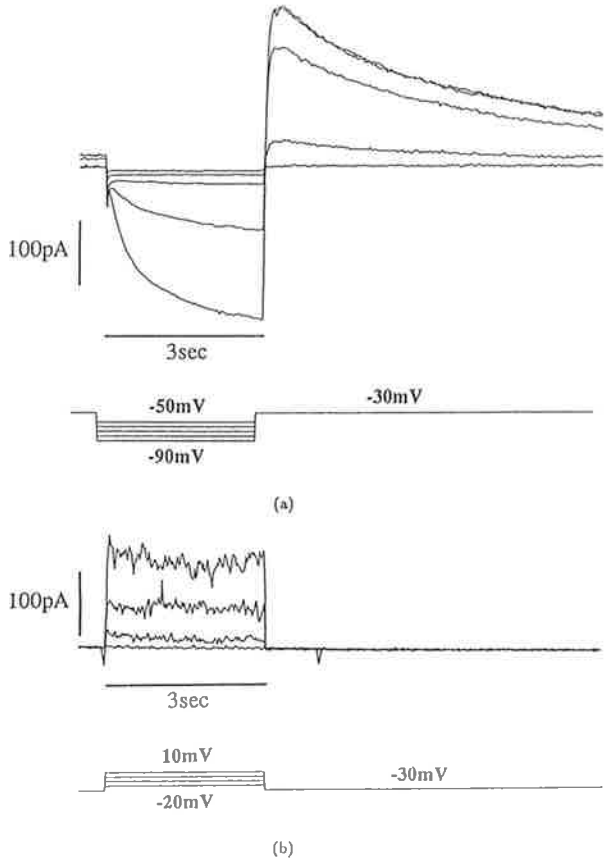


図１．電圧固定法による膜電流の計測
(a)過分極に対する応答　(b)脱分極に対する応答。(a), (b)とも上が記録電流，下が制御電圧。

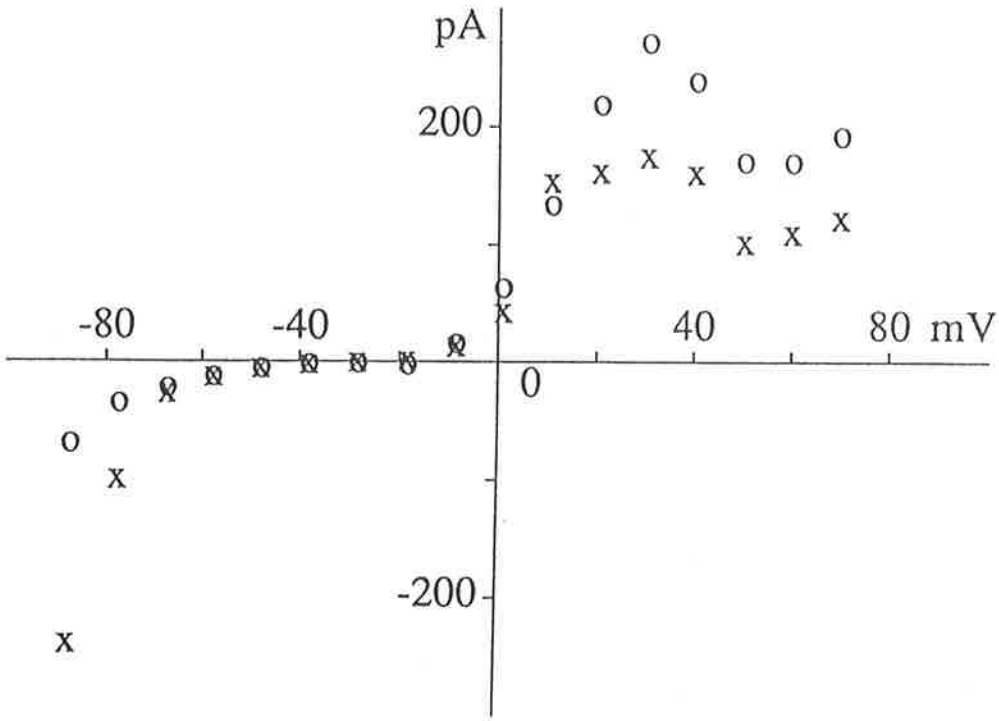


図２．双極細胞の電流－電圧特性
o, x はそれぞれ電圧パルスを与えてから0.1秒後と３秒後の値をプロット。

35. 網膜色素上皮細胞の外節認識機構の研究

鈴木龍夫（兵庫医大・薬理）
鬼頭勇次（大阪大・理）
大塚輝彌（生理研）

ヒトのオプシンが解読されて以来，これまで多くの脊椎動物のオプシンの構造が明らかにされている。最近，キンギョの錐体オプシンが解明され (Johnson et al., 1993), ヒトとは大きく異なっていることなどが明らかになった。魚類の視細胞は細胞内記録を始めとして，多くの形態学的な知見が蓄積されていることから，錐体外節と色素上皮細胞との関係を明らかにする実験系として最適であると考えられる。そこで，錐体外節を形態学的に識別する手段の一つとして，杆体および３種類の錐体オプシンを認識する抗体を作製した。

金魚の杆体および錐体オプシンの一部をFmoc法(431A, Applide Biosystems)で合成し，HPLCで分取した。高速アミノ酸分析計を使って分析を行なった後，BSAと架橋し，Freund complete adjuvantと等量混同して，マウス及びウサギに免疫した。得られた血清を分離した後，DEAE columm, affinity columnなどを用いてポリクローナル抗体を精製した。得られた抗体の免疫反応性はELISA法で確認した。

キンギョおよび数種の硬骨魚類の網膜を用いて，得られた抗体を免疫組織化学的に解析した結果，杆体および3種の錐体外節を特異的に認識する数種類の抗体を得た。これらの抗体を用いた研究の成果は本年報に報告した。

36. 免疫応答における細胞間接着分子の重要性とそのシグナル伝達機構の解明

西村孝司（東海大・医・免疫学）

【目的】

免疫応答においては，リンフォカインと共に細胞－細胞あるいは細胞－細胞間基質相互作用が重要である。たとえば，抗腫瘍免疫において重要なキラー細胞が腫瘍を破壊するためには，まず第一段階としてキラー細胞と腫瘍細胞との接着が重要である。筆者らは本研究において，これまでまだ研究が進んでいないγδT細胞をモデルとして，本キラー細胞がいかなる認識分子，接着分子あるいはシグナル伝達を介して腫瘍を破壊しうるかについて検討をおこなった。

【結果】

ヒトγδT細胞がEB virus誘発ヒトDaudi B imphomaに対して特異的な強い（90%）細胞傷害活性を示すことを明かにした。そこで，このγδT細胞によるDaudi細胞にたいする活性発現に重要なT細胞レセプター並びに細胞間接着分子の解析を行った。活性化したヒト末梢血γδT細胞はVδ1とVδ2をほぼ1：1の割合で発現していた。そこで，Vδ1とVδ2陽性のγδT細胞をFACStarにて分離して，それらのDaudiに対するcytotoxicityを比較検討した。その結果，Daudiにたいする強い細胞傷害活性は，Vδ2陽性γδT細胞にのみ認められ，Vδ1のγδT細胞には認められなかった。また，Vδ2＋の細胞のほとんどはVδ9を発現していた。以上のことから，γδT細胞はVδ9Vδ2レパートリーを用いてDaudi上の抗原を認識してcytotoxicityを発現すると考えられる。次に，各種の細胞間接着分子に対するモノクローナル抗体をcytotoxicity assay中に添加し，それらのγδT活性発現に対する阻害活性を検討した。その結果，抗Vδ9抗体，抗CD3抗体，抗LFA-1抗体並びに抗CD2抗体によって，γδT細胞のDaudiに対するcytotoxicityが著しく阻害された。次に，各種の酵素阻害剤を用いて検討したところ，チロシンキナーゼ阻害剤であるHerbimycinの添加によって，γδT細胞のDaudiに対するcytotoxicityが強く抑制された。従って，γδT細胞はDaudi細胞との結合後にチロシンキ

ナーゼ依存的なシグナル伝達を介して，細胞傷害性因子の放出を行うものと考えられる。さらに，γδT細胞によるDaudi細胞の破壊は，DNAの断片化なしに起こることも示された。

【結語】

ヒトγδT細胞はVδ9Vδ2の特定のTCRレセプターならびにLFA-1, CD2等の接着分子を介してDaudi細胞に特異的結合をし，チロシンキナーゼ依存的なシグナル伝達によって，細胞傷害性因子を放出することが示唆された。また，本反応においては，通常のキラー反応と異なって，DNA断片化が起こらないことも明らかにされた。

37. ミオシンATPase反応中間体の構造

田之倉優，村松知成，高橋健治（東京大・理）
江橋節郎，月田承一郎（生理研）

ミオシンはアクチンとともに筋肉の収縮装置を構成し，そのATPase活性はATPの化学的エネルギーを収縮の力学的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明らかにするためには，ATPase反応の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ならびにヌクレオチドとの相互作用を明らかにすることを目指して，平滑筋ミオシンおよびミオシンサブフラグメント1 (S1) とADPとの複合体について，ミクロ環境および相互作用のよいプローブである燐核磁気共鳴法 (^{31}P NMR) による測定を行った。

ミオシンはトリ砂のう平滑筋から抽出し (Ebashi, 1979), 一部はそのままNMR測定に用い，一部は *Staphylococcus aureus* V8プロテアーゼで処理してS1を得た。得られたトリ砂のう平滑筋ミオシンS1は，20kおよび17kの軽鎖，ならびに重鎖由来の68kおよび26kのペプチドを含む。現在までに検索したS1の調製条件では，重鎖が切断されていないS1は得られていない。25℃，pH7.0において，S1に対してモル比2倍のADPが存在する条件（約0.5mM S1, 50mM Imidazole/HCl, 0.3M KCl, 10mM $MgCl_2$, 2mM DTT）における162MHz ^{31}P NMRスペクトルを，Bruker AM400 NMR分光計を用いて，85%無機リン酸を外部標準として測定した。スペクトルには遊離のADPのシグナルだけが観測され，S1-ADP複合体のシグナルは観測されなかった。何回か162MHzでの測定を試みたが，複合体のシグナルは観測されなかった。一方昨年の本年報に報告したように，202MHzのスペクトルでは強度は弱いが－2ppmにS1-ADP複合体のADPβリン酸のシグナルが観測されている。S1-ADP複合体シグナルの磁場依存性により162MHzではシグナルが観測されないという可能性があるので，現在200MHzあるいは240MHzで測定する準備を進めている。また，スペクトルの温度依存性を調べることにより，S1-ADP複合体のシグナルが観測されやすい条件が見つけられる可能性もあるので，温度依存性についても検討する。

また，ミオシンに対してモル比2倍のADPが存在する条件で162MHz ^{31}P NMRスペクトルを測定したが，S1-ADP複合体の場合と同様複合体のシグナルは観測されなかった。ミオシン-ADP複合体における複合体シグナルが観測可能であるかどうかを判断するためにも，S1-ADP複合体シグナルが観測される条件を確立する必要がある。今後平滑筋ミオシンS1-ADP複合体の^{31}P NMRスペクトルの温度依存性と磁場依存性を測定して，再現性良く複合体シグナルが観測される条件を確立する。

38. 線虫C．エレガンス発生期にみられる細胞間接着の分子生物学的解析

Shahid Saeed Siddiqui，安田八郎（豊橋技科大・体育保健センター）
月田承一郎（生理研）

細胞間接着の研究はこれまで主として高等動物で行なわれてきたが，本共同研究では単純なモデル実験動物である線虫C．エレガンスにおいて行なうことを目的とする。これまでに作製された細胞間接着に関わるタンパク質に対する種々の抗体を利用し，C．エレガンスの各発生ステージごとに調製したホモジェネートに対するウェスタンブロット解析，あるいは各発生ステージのC．エレガンスWholemound試料に対する免疫組織化学的染色法による解析を行なった。しかしながら，いずれの抗体においてもC．エレガンスに対する明確な反応性は認められず，進化的に大きく異なる種間におけるエピトープの違いが問題となっている可能性が示唆された。現在，C．エレガンス独自の細胞間接着関連遺伝子の取得およびそのcDNAを用いた抗体の作製を検討中である。

したがって，当初の目的とは若干異なるが，C．エレガンスの感覚受容神経細胞の形態形成に影響を及ぼすosm-3遺伝子のクローニングおよび構造解析を行なった。osm-3変異は，高浸透圧回避不能変異(osmotic avoidance mutations)として分離され（Culottiら，1978），cAMP等に対する走化性やdauer形成にも異常が認められている。形態学的な解析から，osm-3変異は頭部のsensory ciliaが収縮して外界との接触が遮断されていること，sheath cell内のある種のvesicleの輸送が行なわれないこと等が判っている（Perkinsら，1986)。また，野生株ではFITCを含む培地で飼育することにより6対のamphid neuronが蛍光染色されるが，osm-3変異ではこのようなFITCの取込みが起こらなくなる。

クローニングに先立ち，osm-3の遺伝マッピングを詳細に行ない，コスミッド整列ゲノムクローンによるフィジカルマップ（英国，MRC）との対応ずけを行なった。候補となるコスミッドを約10種類に絞り，それぞれのDNAをosm-3変異株の卵巣に微小注入して形質転換を試みた。その結果，FITCによるamphid neuronの蛍光染色が野生株同様に回復するコスミッドが一つ(K09B3)得られた。コスミッドK09B3の制限断片による形質転換実験を同様に行ない，最終的

に 4.3kb の SacI フラグメントが osm-3 の形質転換能を保持していることを明らかにした。このフラグメントをプローブとしてノザーンハイブリダイゼーションを行なったところ，約 3kb の転写物のみが認められた。この転写物の発現レベルは非常に低く，極めて限られた細胞における発現が予想される。

4.3kb SacI フラグメントの塩基配列を決定し，そのオープンリーディングフレームの解析から，osm-3 遺伝子産物は新規なタンパク質であり，kinesin 重鎖と相同性を有することが明らかになった。両者の相同性が ATPase 部位や微小管結合ドメイン等機能的に重要と思われる部位において最も高いことから，osm-3 が kinesin スーパーファミリーに属すると考えて間違いないと思われる。また，kinesin は微小管関連モータータンパク質であり，軸索輸送に関与していることが知られているが，osm-3 変異株で観察されるある種の軸索輸送の欠損は，osm-3 産物が kinesin 様タンパク質であると考えることでうまく説明できる。C．エレガンスにおいては運動異常突然変異 und-104 の産物が kinesin 様タンパク質であることが示され，シナプス小胞の輸送に関与していると考えられた（Otsuka ら，1991）。軸索輸送に関わる kinesin 様モータータンパク質が，感覚神経と運動神経で個別に存在していることは神経系の発生を考える上においても興味深い。

39. 外側膝状体軸索の大脳皮質での成長と分枝の形成

小松由紀夫，山本亘彦，黒谷　亨，東　秀二，外山敬介
（京都府医大・第 2 生理）

大脳皮質への入力線維は特定の層で神経結合を形成することが知られている。例えば，大脳皮質視覚野 (visual cortex, VC) では，網膜からの中継核である外側膝状体 (lateral geniculate nucleus, LGN) からの軸索は主として第 4 層で枝分かれしてシナプス結合を形成し，一方対側の皮質からの入力線維は 4 層を避け2/3層や 5，6 層で分枝してシナプス結合を形成している。この皮質求心性線維の層特異的な神経結合を作り出す細胞間相互作用の特性を明らかにするために，LGN-VC の co-culture 標本で，LGN 軸索を蛍光色素で標識しその成長，分枝を経時的に観察した。

LGN, VC 切片を各々 ED16-17, P1-3 ラットから取り出し，コラーゲン塗布の膜上で無血清培地下で培養した。LGN 組織片から成長する軸索を標識するために，培養 4 － 6 日後，蛍光色素 DiI の小片を LGN 組織片上に置いた。2 － 3 日後，標識された LGN 軸索を共焦点レーザー走査型顕微鏡で約 1 日，0.5－ 2 時間間隔で観察した。

培養後 1 週間の時期では多くの LGN 軸索は VC 組織片内で成長円錐を有し VC 組織片内を伸長していた。観察した LGN 軸索の半数（6 /12）は比較的一定した速度（約 50 μ /h）で深層を通り抜け 4 層付近で枝分かれを開始し，残りの LGN 軸索は分枝を形成せずに表層まで到達した。枝分かれした軸索のほとんどは，枝分かれする前に 4 層で成長を突然停止，あるいは縮退した。

1層まで達した軸索は比較的一定した速度でVC組織片内を伸展したが，一部には4層で一時的に停止するものが見られた。また枝分かれしたLGN線維はすべて先端部より後方で分枝を開始した。1層まで到達した線維では，途中side branchが一時的に出現することもあった。

これらの結果は，LGN軸索の標的である皮質4層にLGN軸索の枝分かれあるいは成長の停止を指示する局所的な手がかり分子（細胞表面分子あるいは細胞外マトリクス分子）が存在することを示唆している。

40. 恐怖表情とvocalizationに共通する脳内機構の研究

有田秀穂，坂本正裕（東邦大・医・第一生理）
彦坂興秀（生理研）

本研究では，頭部に慢性的にシリンダーを埋め込んだサルを用いて刺激実験を行い，次ぎの成果を得た。中脳水道周囲灰白質(PAG)の背外側部を微少電流刺激（1ミリ秒の方形波を頻度50Hz, 50－100μAで3－5秒間刺激）することにより，顔面表情の変化，発声および自律系の反応を同時に誘発することができた。これらの変化をビデオに記録，検討した。表情反応の特徴は，刺激の対側性に現れ，口を開き，顔全体が後ろに偏位するものであった。一方，発声はヒィヒィヒィという断続音として観察された。また，自律系の変化としては，瞳孔の散大と顔面皮膚の発赤が認められた。これら一連の反応は情動反応に対応するものと推察された。なお，刺激終了後にシャックリ様の発声（ヒック）が数秒間隔で持続するようになり注目された。反応誘発部位は，上丘の尾側部，正中から外側に4㎜，背側表面から10㎜（サッケード誘発部位から約3㎜深部）で比較的狭い範囲に限局した。しかし，化学的刺激は実施せず，同部位の細胞を刺激したのか通過線維を刺激したのかを判定することはできなかった。

免疫組織学的検索はネコを用いて実施した。発声と自律系（交感神経系）の最終出力系として延髄腹外側野（C1：ノルアドレナリン含有細胞群）が知られているので，同部位に逆行性標識物質であるコレラ毒Bを注入し，48時間後に還流固定した。逆行性標識細胞が中脳水道周囲灰白質(PAG)に散在性に観察されたが，標識細胞がまとまって限局する部位をみいだせなかった。また，5-HTやSP抗体を用いて，逆行性標識細胞との二重染色を実施したが，一定の傾向はなかった。

以上の結果より，サルの中脳水道周囲灰白質(PAG)に，顔面表情，発声，自律系の変化など情動反応を特徴づける反応を誘発する部位が見いだされた。しかし，その部位の組織学的特性については十分に検討できず，今後の課題として残された。

41. 視床を中心とする神経回路網

丹治　順，進藤克博，嶋　啓節（東北大・医・第2生理）
徳野博信（京都大・医・高次脳形態）
稲瀬正彦（生理研）

大脳皮質運動関連諸領野は，視床を介して，大脳基底核系や小脳系などの皮質下入力を受ける。各皮質領野が視床を介して共通の入力を受けるかどうかを明らかにすることは，その機能的差異を考える上で極めて重要である。そこで今回は，第一次運動野 (MI) の近位部および遠位部上肢領域への投射ニューロンと補足運動野 (SMA) への投射ニューロンの分布を視床で比較した。サルの各領野を皮質内微小電流刺激法や運動遂行時の細胞活動記録などで電気生理学的に同定した後，MI の近位部あるいは遠位部上肢領域にそれぞれ異なる逆行性標識物質 Diamidino Yellow または Fast Blue を，SMA の上肢領域に WGA-HRP を注入した。その結果，視床における標識細胞の分布には，部位特異性がみられた。すなわち，SMA 投射ニューロンは内側に，近位部上肢領域への MI 投射ニューロンは外側に，遠位部上肢領域への投射ニューロンはその中間に存在した。また SMA 投射ニューロンは吻側に，MI 投射細胞は尾側に存在する傾向があり，VPLo 核では，MI の近位部および遠位部上肢領域への投射ニューロンが密に分布していたが，SMA 投射ニューロンは見られなかった。以上のように，全体的には，SMA 投射ニューロンと MI 投射ニューロンの分布は一致しなかった。ただし，VLo 核の背側部では，SMA 投射ニューロンと MI 投射ニューロンの分布が一部重なっていた。

以上の結果，SMA と MI は，基本的に視床を介して異なる皮質下入力を受けることが明らかとなった。これらの入力は，他の研究より，それぞれ大脳基底核および小脳に由来すると考えられる。ただし，VLo 核の一部を介する双方に共通な入力も存在する。

42. 大脳基底核と大脳皮質の機能関連

丹治　順，嶋　啓節，蔵田　潔（東北大・医・第2生理）
稲瀬正彦（生理研）

随意運動の高次調節機構を解明する上で，大脳基底核と大脳皮質の機能関連を明らかにすることは極めて重要である。その初段階として，大脳皮質一次運動野の細胞活動特性と皮質入力との関係，およびその入力伝達に関与するグルタミン酸受容体のサブタイプについて検討した。

運動課題遂行中のサル第一次運動野 (MI) では，運動準備関連活動を示すニューロン (set-related neuron) と運動遂行関連活動を示すニューロン (movement-related neuron) とがみられる。各

ニューロンの皮質性入力を調べてみると，大部分の set-related neuron は，補足運動野 (SMA) から入力を受けるが，movement-related neuron では，SMA から入力を受ける細胞と第一次体性感覚野 (SI) から入力を受ける細胞がほぼ同数であった。皮質性入力に対するグルタミン酸受容体拮抗薬の作用を検討してみると，SMA 刺激による MI ニューロンの反応は，NMDA 受容体拮抗薬の APV のみに，あるいは APV と non-NMDA 受容体拮抗約の CNQX の両方に抑制性応答を示した。一方，SI 刺激による反応は，CNQX のみに応答した。多くの場合，課題に関連した活動も，刺激による反応と同様の応答を示した。すなわち，SMA の入力を受けるニューロンの課題関連活動は，APV のみ，あるいは APV と CNQX の両方に応答し，SI の入力を受けるニューロンの活動は，CNQX のみに応答する傾向がみられた。

以上の結果，SMA から MI へのシナプス伝達には，NMDA 受容体のみ，あるいは NMDA と non-NMDA 受容体の両方が主にはたらき，SI から MI への伝達では non-NMDA 受容体が主であると考えられる。

43. 身体運動が消化管諸機能におよぼす影響

近藤孝晴，劉　　鳳，戸田安士（名古屋大・総合保健体育科学センター）
山岸俊一，尾崎　毅，成瀬　達（生理研）

【目的】

我々は，身体運動が消化管機能に及ぼす急性効果について報告してきたが，今回は慢性効果について検討した。従来，歩行などの軽運動は慢性便秘を改善させるといわれてきたが，科学的根拠に乏しい。そこで，歩行が消化管運動機能改善させるかどうかを知るため，消化管機能が低下していると考えられる高齢者を対象として，毎日１万歩以上の歩行を２週間続けさせ，その前後で，食物の消化管通過時間を測定した。

【対象・方法】

平均年齢70歳の健常男性９名を対象とした。２週間安静の後，２週間積極的に歩行（１日１万歩以上）させ，安静期間後および運動期間後に，小腸通過時間（呼気中水素を測定する方法），大腸通過時間（レントゲン非透過性のマーカーを用いる方法），全消化管通過時間（カルミンの服用）を測定した。食事の影響を最少にするため，実施期間中の献立を統一し，各自家庭で調理させた。

【結果・考案】

歩数は安静期間中１日3,700±440歩，運動期間中平均12,800±900歩であった。また，消費熱量はそれぞれ1600±34／日，1790±43／日であった。排便回数は安静期間1.2±0.1回／日，運動期間で1.1±0.1回／日と変化がなかった。小腸通過時間は安静期間，運動期間とも約60分と差が

なかった。大腸通過時間は安静期間19.5±2.9時間，運動期間11±2.7時間と有意に短縮した（p＜0.01）。部位別では右側結腸で5.7±1.1時間が2.7±0.7時間に（p＜0.05），左側結腸で10±2.5時間が4±1.8時間に短縮した（p＜0.01）が，S状結腸では変化がなかった。全消化管通過時間は26±2.6時間から22±1.3時間に短縮した。

【まとめ】毎日1万歩以上の歩行を2週間続けると，高齢者の大腸通過時間が短縮した。すなわち，歩行は大腸輸送機能を改善させると考えられた。その理由については明かでないが，hyperphagiaで消化管通過時間が短縮するとの報告もあるため，運動による食事の摂取量増加も否定できず，さらに厳密な食事のコントロールのもとで検討する必要があると考えられる。

44. モルモット大腸粘膜筋板の収縮抑制に関する研究

石川一志（旭川医大）
尾崎　毅（生理研）
斎藤俊之（鳥取大・農）

粘膜筋板は消化管に普遍的に存在するにもかかわらず，その基本的な形態学的，生理学的性質には不明の点が多い。筆者等は，モルモット近位結腸の比較的発達の良い粘膜筋板を実験材料として形態学及び生理学の両面から基礎的実験を行ってきた。これまでの研究で，本組織の収縮にはコリン作動性神経に加えて非コリン作動性・非アドレナリン作動性神経が関与する事，後者はタキキニン含有神経である可能性が高い事，などを明らかにした。粘膜筋板内のタキキニン含有神経の存在は，免疫組織化学的研究によっても確認した。今年度は，本組織の収縮抑制機構を解明する目的で研究を行った。

粘膜筋板の条片標本を，アトロピン5×10^{-6}Mを加えたKrebs液で灌流し，frequencyを変えながら電気刺激を行うと，0.2－2Hzの低周波で自発収縮の抑制がみられた。pulse width, voltage等も段階的に変えて刺激した結果，frequency：2Hz, pulse width 0.5msec, voltage：20Vで最大の抑制効果が得られた（図1B）。3×10^{-6}Mのノルアドレナリンは本組織の自発収縮をほぼ完全に抑制した。この抑制効果は5×10^{-6}Mプロプラノロールと5×10^{-6}Mフェントーラミンを同時に作用させることによって完全に消失したが，電気刺激による収縮抑制効果は消失しなかった（図1C）。この電気刺激による抑制効果は10^{-6}Mテトロドトキシンによって完全に遮断された（図1D）。したがって，本組織の収縮抑制にはアドレナリン作動性神経の他に非コリン作動性・非アドレナリン作動性神経が関与しているものと考えられた。

そこで，腸管の外側筋層で抑制効果を示すとされている数種のペプチドを含む神経の存在を免疫組織化学的に検討した。その結果，粘膜筋板あるいはその周囲には，VIP, Galanin, CGRP, Somatostatin等を含有する神経が分布することが明らかとなった。灌流標本にこれらのペプチド

を加えてその効果を調べると，CGRP が強い抑制効果を有していた（図 2A)。この効果はテトロドトキシンで遮断されなかったので（図 2 B)，粘膜筋板に対する直接効果であると思われる。

さらに，他の平滑筋で研究された結果から，serotonergic あるいは purinergic neurons の関与が想定された。10^{-5}M serotonin や 10^{-4}M ATP 等を本標本に適用した結果，これらも強い粘膜筋板の収縮抑制効果を有していた。

以上の結果から，モルモット近位結腸の粘膜筋板の収縮抑制因子として，アドレナリン作動性神経の他，CGRP, セロトニン，ATP 等を含む神経が考えられる。このうちどれが主要な抑制物質として実際に収縮抑制に関与しているのか，今後の研究で明らかにしていきたいと考えている。

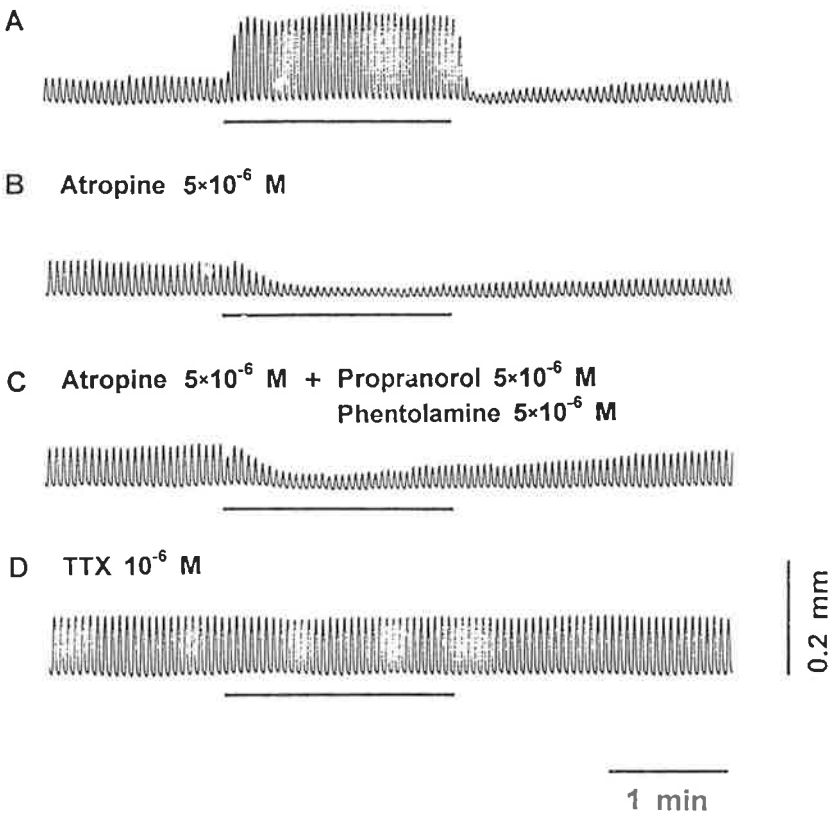


図 1．モルモット近位結腸粘膜筋板の電気刺激による収縮抑制反応。
A：正常 Krebs 液，B：5×10^{-6}Mアトロピン添加，C：5×10^{-6}Mアトロピン，5×10^{-6}Mプロプラノロールおよび 5×10^{-6}Mフェントーラミン添加，D：10^{-6}Mテトロドトキシン添加。pulse width : 0.5msec, frequency : 2Hz, voltage : 20V.
各図の下の実線は電気刺激の時間を示している。

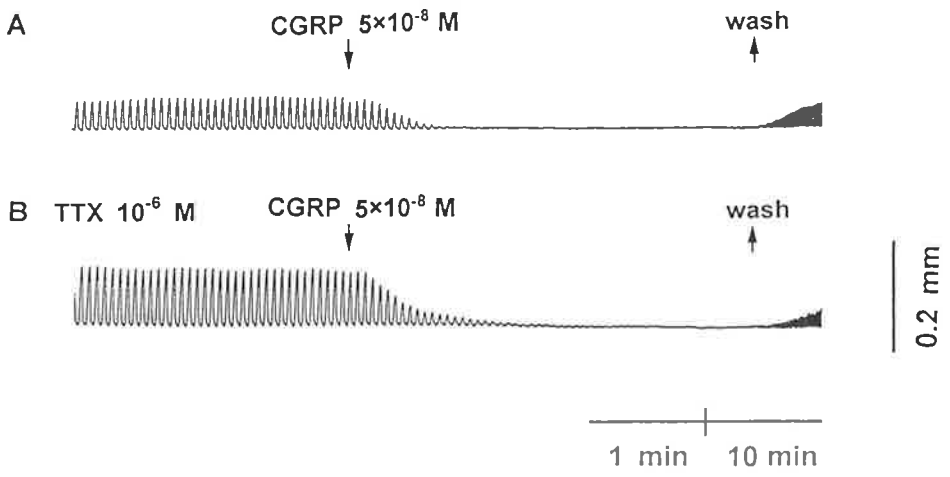


図２．モルモット近位結腸粘膜筋板の CGRP による収縮抑制反応。
Ａ：正常 Krebs 液，Ｂ：10^{-6}Mテトロドトキシン添加。ＡとＢは別々の標本で得られた反応である。

45. 血管内皮細胞の微細構造とその機能

山本喜通（名市大・医）
尾崎　毅（生理研）
古家園子（生理研）

ラット肺葉内動脈を摘出して切り開き，細胞接着剤 (Cell-Tak) を塗布したカバーグラスに内膜面を密着させてしばらくおいた後にカバーグラスを持ち上げると，カバーグラス上に内皮細胞が残る。この標本にパッチクランプ法を適用すると，管腔側膜にあるものと類似の cation channel と，管腔側膜には余り見られない anion channel が観察された（図１）。問題は細胞を剝がす際にどこから剝がれて採れているかが不明な点である。考えられるのは，①基底膜の下から剝がれている，②側底膜と基底膜の間で剝がれている，③側底膜は血管本体に残り，小胞体や核などの細胞内膜系が露出している，④以上のものがモザイク状になっている，である。実際どの部分の膜，つまり基底膜，側底膜，内部膜のいずれにパッチを作っているかを知るため，次のような実験を行なった。

まず走査電子顕微鏡 (SEM) を使用して標本表面の形状を観察した。SEM 試料を作る際には臨界点乾燥を行なったが，それでも標本が極めて薄いため縮小による亀裂などの artifact がかなり見られた。図２に実際の SEM 像を示す。いくつか見られる楕円形の部分には核が存在すると考

えられ，そのまわりにちぎれたような複雑な構造物が存在した。これは初めに内皮細胞を剝離したときに側底膜が一部引きちぎられてこのようになったのか，あるいは固定乾燥の際に縮小のためにクレバス様に亀裂が入ったのかは不明であるが，どうも細胞は上記②の側底膜と基底膜の間で剝がれて，採れた標本は，特に核のある部分については側底膜で覆われていると考えられる。ただし，所々には裸核のような像も存在したので，一部はモザイク状になっていたものと思われる。

標本の表面に細胞膜（側底膜）が存在することを確かめるため，さらに透過型電子顕微鏡(TEM)での観察を試みた。しかし，標本があまりに薄いためうまく切片が切れず，TEMでの観察は断念せざるを得なかった。

そこで組織細胞化学的方法で標本表面の側底膜存在を確かめることにした。細胞膜表面にある糖鎖と結合する，蛍光標識したlectinのRCAおよびRPAで標本を染めてみたところ，この両者は標本と結合した。また，抗コラーゲンtype I抗体およびtype IV抗体で多くの細胞が染まったことから，この標本が上記②の状態にあり，側底膜を含んでいることがわかった。

以上の結果より，この標本で観察された2種類のイオンチャネルは側底膜に存在すると考えるのが妥当であるとの結論に至った。

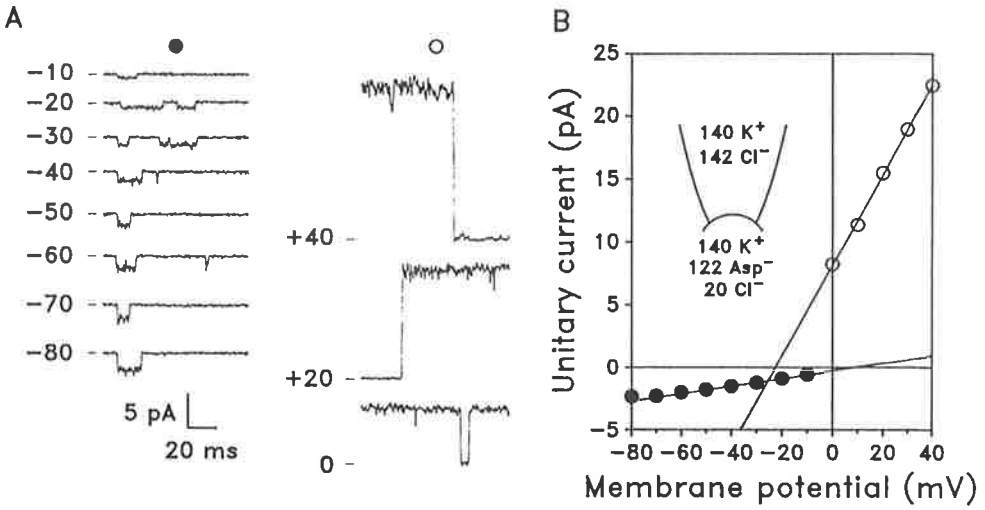


図1．剝離血管内皮細胞で見られた2種類のイオンチャネル。Inside-out patchで，Bに示すような条件にて同一パッチから記録した。A：各トレース左端に示す電位に保持した際に見られた単一チャネル電流。短いバーはチャネルが閉じたレベルを示す。●はcation channel, ○はanion channelによる電流。B：夫々のチャネルのI－V関係を示す。Cation channelのslope conductanceは30.2pS, anion channelのそれは359pSであった。

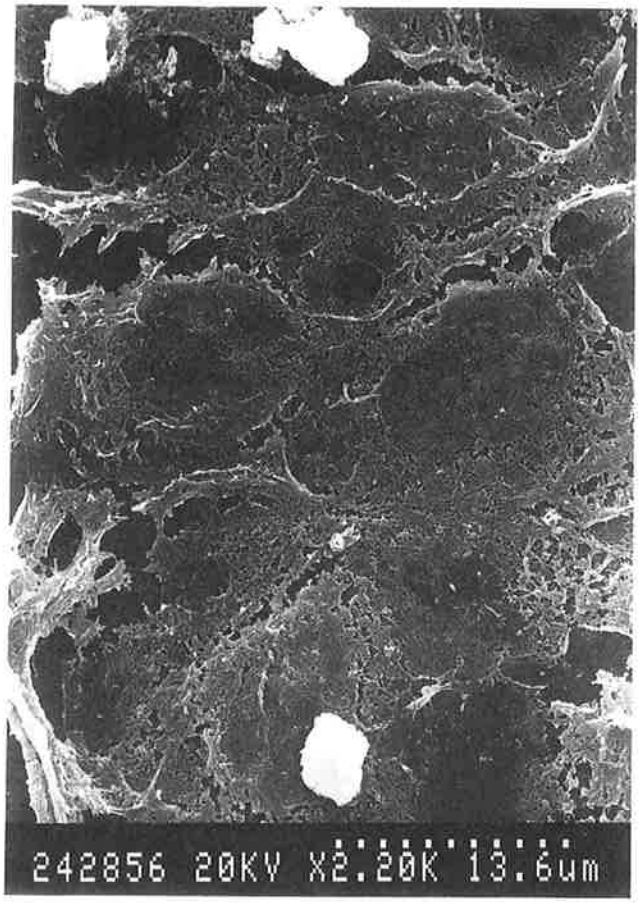


図２．剝離血管内皮細胞標本の SEM 像。倍率2,200倍。

46. 視覚的注意・眼球運動と運動視知覚
—心理物理学的・電気生理学的研究—

下條信輔，竹市博臣（東京大・教養）
藤田昌彦，町澤朗彦，青木三奈，皆川双葉（郵政省通信総合研究所）
彦坂興秀，宮内　哲（生理研）
福田秀樹（労働省産業医学研究所）

【研究成果】

視覚的注意と他の感覚モダリティの注意との相互作用を研究スルタメニ，ヒトを被験者にして誘発電位を測定した。

【実験１】

被験者は眼前の固視点の左右にあるLEDの直下に電気刺激用の電極を装着した人差し指を両腕を伸ばした状態(UNCROSSED CONDITION, 図1A), あるいは両腕を交差させた状態(CROSSED CONDITION, 図1B)で置いた。左右どちらかの人差し指が電気刺激した後，一定の間隔(CUE LEAD TIME, 0, 50, 100, 200, 400ms)をおいて左右どちらかのLEDが点灯した。体性感覚刺激と視覚刺激の空間的位置が一致した場合と，一致していない場合とで視覚誘発電位の振幅を比較した。その結果，体性感覚刺激と視覚刺激の時間感覚が100－200msでは，両腕の交差・非交差にかかわらず，体性感覚刺激と視覚刺激の空間的位置が一致していた場合の方が視覚誘発電位の振幅が高かった（図2A)。0, 50, 400msではこのような効果はなかった（図2B)。視空間の特定の部位に自発的に注意を向け，その部位に視覚刺激が出現した場合，視覚誘発電位は増強する。また，視覚誘発電位の起源はprimaryあるいはsecondary visual cortexと推定されている。これらの事から，この効果は体性感覚刺激によって喚起された空間的注意が皮質間のreciprocal connectionを経由して視覚皮質を逆方向性にactivateした事によるものと考えられる。

【実験２】

次に体性感覚刺激と視覚刺激の呈示順序を逆にして，実験１と同様の実験を行なって，体性感覚誘発電位を測定し，視覚刺激が体性感覚の注意に及ぼす影響を調べた。その結果，実験１と同様，両腕の交差・非交差にかかわらず，視覚刺激と体性感覚刺激の空間的位置が一致している時の方が，一致していない時に比べて，体性感覚誘発電位の中・長期成分が増強した。体性感覚誘発電位の中・長期成分の起源はS1及びS2にあると考えられており，視覚刺激によって喚起された空間的注意が，皮質間のreciprocal connectionを経由して体性感覚皮質を逆方向性にactivateしたと考えられる。

以上の結果から，視覚と体性感覚との間で空間的注意の相互作用が確認された。

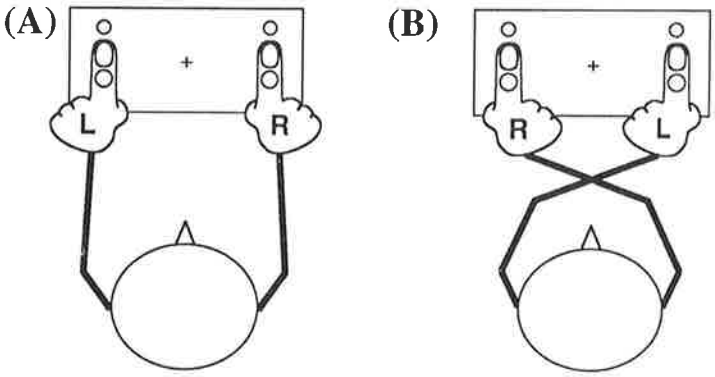
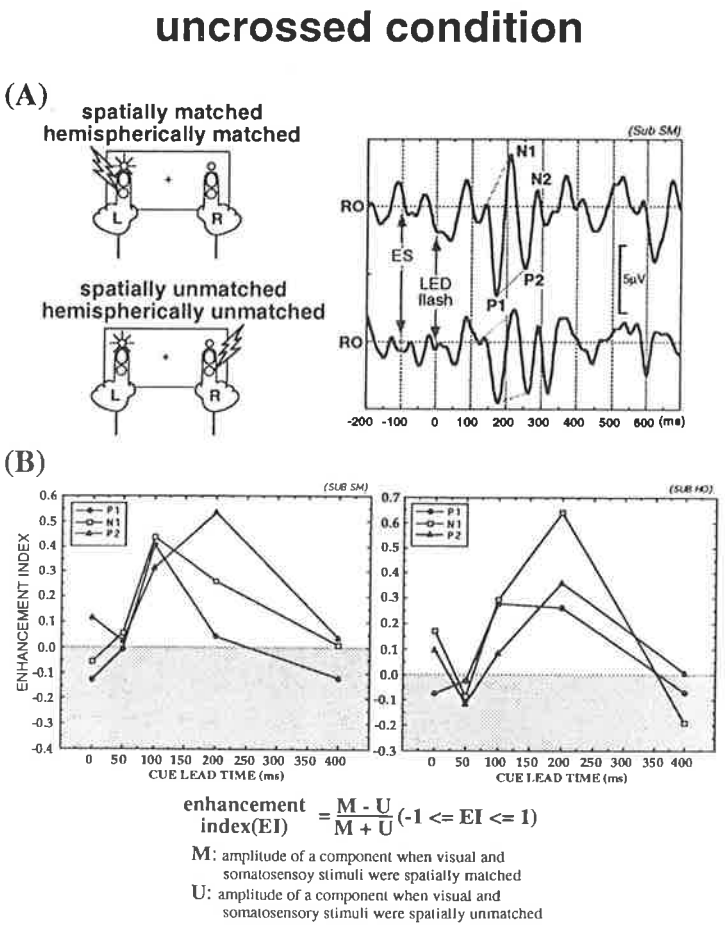


図 1



$$\text{enhancement index(EI)} = \frac{M - U}{M + U} \quad (-1 <= EI <= 1)$$

M: amplitude of a component when visual and somatosensoy stimuli were spatially matched

U: amplitude of a component when visual and somatosensory stimuli were spatially unmatched

図 2

47. 生理学実験法の開発

小幡邦彦，亘　　弘，山岸俊一，月田承一郎，彦坂興秀（生理研）
小濱一弘（群馬大・医）
高田明和（浜松医大）
大地陸男（順天堂大・医）
加藤正道（北海道大・医）
恵良聖一（岐阜大・医）

生理学における先端的研究の技術及び成果を積極的に医学部生理学実習や大学院生理学実験にとり入れていくことは学生の生理学に対する興味を惹起し，生理学的思考法を習得させるために重要である。本共同研究では所内の研究者が医学部教官と共同し，さらに医学部学生の協力を得て，分子・細胞レベルから個体レベルまでの生理学的研究につき装置のシステム化，簡易化，標本保持技術の改良，データ処理における画像化・高速化等を試みる。

本年度は5大学から16名の医学生が参加して，6月から9月上旬に亘って以下の項目について実施した。

1　ラット線条体内のドーパミンレセプター
2　サルにおける大脳皮質・基底膜・視床の相互関係
3　サルの眼球運動における大脳基底核の役割
4　脳磁図によるヒト脳機能の研究
5　核磁気共鳴によるヒト筋のエネルギー代謝の解析
6　細胞接着の細胞生物学
7　神経・筋細胞の培養

多くの部門，研究者の協力が得られ，参加者からも実験項目の内容だけでなく研究の進め方，生理科学の現状が理解できたとの評価を得た。

【 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〕

磁気共鳴装置室概要
1．生体組織内の水構造及びエネルギー代謝の研究（恵良聖一他）…… 251
2．核磁気共鳴法による小腸虚血・再灌流時のエネルギー代謝の検討
（正岡　昭他）…… 253
3．MRI によるラット脊髄圧迫の研究（松井宣夫他）…… 253
4．骨格筋のエネルギー代謝に対するトレーニング効果の NMR による研究
（森本武利他）…… 254
5．遷移金属イオンを用いた MRI における変性関節軟骨の contrast enhancement
（日下義章）…… 256
6．核磁気共鳴法を用いた multi-modality の生体情報の観察
（成瀬昭二他）…… 257
7．MRI による内耳病変の検出（肥塚　泉他）…… 262
8．筋エネルギー代謝に及ぼすウォーミングアップの影響（吉田敬義他）… 264
9．HDT 動物の NMR による脳血流の測定の試み（松波謙一他）…… 267
10．多核種核磁気共鳴法による水・電解質輸送の解析（村上政隆他）…… 269
11．磁気共鳴法による細胞内電解質の解析―糖質ゲル中の水の拡散（1）
（瀬尾芳輝他）…… 270
12．サル大脳皮質の非破壊的観察と脳定位的記録への応用（酒田英夫他）… 271
13．ラット脳虚血障害の定量的解析（西野仁雄他）…… 274
14．生理研研究会及び磁気共鳴装置室ワークショップ合同国際ワークショップ
（代表者　村上政隆）…… 275
15．第 9 回磁気共鳴装置共同利用実験ワークショップ
（代表者　亘　　弘）…… 278

磁気共鳴装置室

【概要】

磁気共鳴画像装置(MRI & MRS)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きた状態で，組織構築を破壊することなく，多種多様の情報を観測するために導入された。1988年度は装置の立ち上げ，1989年度には公募共同利用研究を開始した。1992年度は(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，の研究テーマのもとに11課題が採択され実施された。

1992年度の磁気共鳴画像装置の利用状況の内訳は，使用者のグループは13組，共同利用実験等236日，修理調整等36日であった。また，磁気共鳴装置のスペクトロスコピー機能を拡張するためEX-90 (JEOL)を導入した。

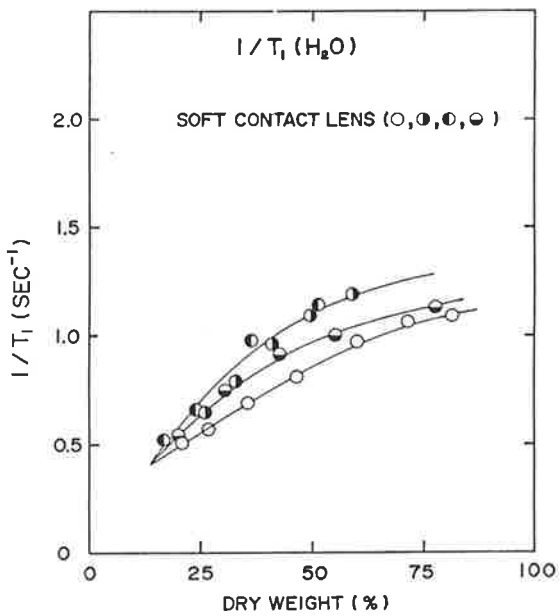
磁気共鳴装置室では共同利用実験計画の援助の一環として2回の磁気共鳴装置共同利用ワークショップを行った。第八回ワークショップは，生理研研究会と合同で，1992年9月2－5日，“唾液分泌－その制御と輸送機構”のテーマで，生理研グループの多核種核磁気共鳴法を用いた唾液腺の水電解質輸送の成果と，生理学，生化学，解剖学，遺伝子工学などの方法論により得られた最新のデータとすり合わせ，唾液腺細胞のイオン輸送機構を新しい観点から捉えなおすことを目的に，唾液腺研究分野の若手研究者を中心に，7ヶ国より15名，国内26名の研究者の参加を得て4日間の日程で行われた。

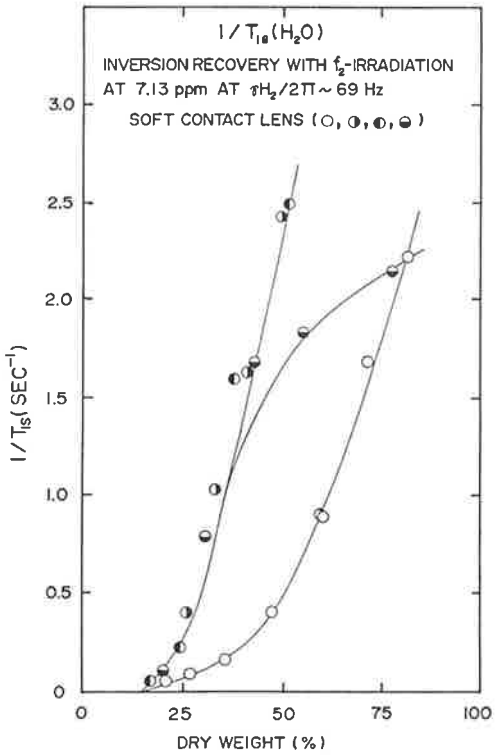
第九回ワークショップは1993年3月8－9日に行われ，1991年度の共同利用実験の成果が報告され，1993年度共同利用実験研究者（所外37名，所内7名）を対象として共同利用のガイダンス，装置性能／操作についての改良点，今度の装置改善等について打ち合せが行われた。本ワークショップでは，Drs M. C. Malet-Martino, R. Martino (University of Toulose, IMRCP laboratory), Ute Ammer （生理研，分子生理），楠岡英雄（大阪大学，医学部，バイオメディカル部門），金沢洋子（九州大学，薬学部）を招聘し，F-19 NMRの医学生物学への応用について講演していただいた。

1．生体組織内の水構造及びエネルギー代謝の研究

恵良聖一，桑田一夫，今井　一（岐阜大・医・第2生理）
加藤一夫（同・第1病理）
松永隆信（同・整外）
山田　弘（同・脳外）
玉舎輝彦（同・産婦）
曽我美勝（藤田保衛大・総医研・分子生理）
村上政隆，亘　　弘（生理研）

Damadian, Hazlewood らは，種々の腫瘍組織内の水の T_1，T_2が正常組織内の水の T_1，T_2よりも長いことを見いだし，このことは単に生体組織の含水量の差のみによるものではなく，水構造に差のあることを示唆した。このような生体組織内の水構造の系統的研究として，我々は今までにタンパク質のゾル・ゲル変換，ラット正常・腫瘍肝組織，ラット正常・浮腫脳組織，ラビット正常・炎症関節軟骨組織などの水構造を，360MHz ^{1}H-NMR により，主として T_1，タンパク質より水分子への分子間交差緩和時間 (T_{IS}) を測定し，特に T_{IS} が生体組織内における水構造変化を鋭敏に反映し得ることを見いだした。この T_{IS} を用いた交差緩和時間イメージングの機構解明のための基礎研究として，合成鎖状高分子ゲル（ソフトコンタクトレンズ，SCL_S）を用いて，その組成を種々に変化させることによって含水量の異なった SCL_S 内の水構造について検討した。





合成鎖状高分子ゲルとして，N-vinyl-2-pyrrolidone (N-VP) と methyl methacrylate (MMA) とのコポリマー（含水量，18.4%～79.2%；○），2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) と methacrylate (GMA) とのコポリマー（含水量，50.6～74.2%；◑），HEMA と N-VP とのコポリマー（含水量，51.3～83.1%；◑），GMA, N-VP と MMA とのコポリマー（含水量，22.6～80.1%；◒）を合成した。^{1}H-NMR は Bruker 社製 AM 500 ^{1}H-NMR スペクトロメーターを用い，T_{IS} (H_2O) は 7.13または－4.00 p. p. m. を $\gamma H_2/2\pi$ ～69Hz で f_2 照射して求めた。図1に T_1 (H_2O) の逆数を乾燥重量（W(%)）に対してプロットしたもの，図2に 7.13 p. p. m. を 69Hz で f_2 照射したときの T_{IS} (H_2O) の逆数をW（%）に対して，プロットしたものを示す。

図1より，いずれの組成をもつ SCL_S の場合も，W（%）の増加とともに $1/T_1$ 値がゆるやかに増加する上に凸の曲線を示したが，図2では，HEMA-GMA コポマリー（◑）及び HEMA-N・VP 系コポリマー（◐）はほぼ同様の傾向を示したが，GMA-N・VP 系コポリマー（◒），N・VP-MMA 系コポリマー（○）は前二者とは違った挙動を示した。これらのことより，合成鎖状高分子ゲル内の水分子の挙動に関する情報は，T_1測定からはもはや得ることができず，T_{IS} 測定は鋭敏に反映していることが判る。さらに，このように，これらの合成高分子は，その組成の組合せを種々に変えることによって含水量及び水構造を自由に変化させることができるので，MRI 用ファントムとしての有用性が示唆された。

2．核磁気共鳴法による小腸虚血・再灌流時のエネルギー代謝の検討

佐藤篤司，桑原義之，片岡　誠，正岡　昭（名市大・医・第２外科）
亘　　弘（生理研）

現在も尚救命困難な急性腹症の１つに急性上腸間膜動脈閉塞(SMAO)症があるが，本症は発症早期に腸管，特に小腸の広範な壊死を来す。

その病態解明のために様々なアプローチがなされているが，SMAO・再灌流時の小腸のエネルギー代謝についての検討は未だ充分になされていない。また，^{31}P-MRS 法は非侵襲的・連続的に測定できるという利点があり，現在まで何等の手段も開発されていない。虚血腸管の体外的モニタリングが可能ではないかと考えられる。以上の目的から，実験的に SMAO・再灌流モデルを作製し，HPLC 法および^{31}P-MRS 法にて比較検討し，エネルギー代謝の測定が小腸虚血障害の指標として有用であるか否か，^{31}P-MRS 法が小腸虚血障害の体外的モニタリング法となり得るか否かについての基礎的検討を行った。

ウィスター系雄性ラット（６週齢）を用い，ネンブタール麻酔下に開腹し，前腸間膜動脈の閉塞・再灌流を行った。閉塞前の体温を約37℃とし，ラット固定台内を温水灌流し，尾静脈ルートより輸液を行うことで，安定した全身状態を確保した。小腸のみのスペクトルを得るために，前腹壁を除去し，更に後腹膜との間にアルミ箔を入れた。^{31}P-MR スペクトル測定用表面コイルは直径20㎜のものを用いた。パルス幅 25 μs, 繰り返し時間１秒，積算回数600回にて小腸のコントロールスペクトルを得ることができた。

その結果，ATP および TAN (total adenine nucleotides) が，小腸虚血障害の有用な指標であること，HPLC 法で観察された ATP の変動と^{31}P-MRS 法で観察されたβ－ATP の変動とが，極めて高い正の相関を示すことが判明した。従って，^{31}P-MRS 法によるβ－ATP の変動の観察は，有用な小腸虚血障害の体外的モニタリング法となり得る可能性が示唆された。

3．MRI によるラット脊髄圧迫の研究

福岡宗良，松井宣夫，大塚隆信，藤吉文規，泉田　誠（名市大・医・整形外）
加藤泰治（同・分子研）
亘　　弘，村上政隆，瀬尾芳輝（生理研）

【目的】

脊髄慢性圧迫疾患の脊髄病変を知るために，ラット脊髄圧迫モデルを用いて，圧迫の形態と麻痺について調べてきたが，さらに，①MRI により脊髄内部の変化の摘出を試み，病理組織との

関連を明らかにする。②脊髄圧迫部の除圧を試みる。

【方法】

7週齢の Wistar 系雄ラットの下位胸椎を顕微鏡下に椎弓切除し，一辺約1.0㎜の細片とした354A 腫瘍塊を硬膜外へ移植し，脊髄慢性圧迫モデルとした。φ60 surface coil を用いて，MRI により経時的に脊髄を観察し，腫瘍による脊髄の圧迫が確認された10匹を対象とした。MRI による撮影は，SE 法で，主に T1 強調像として TR500msec/TE30msec, T2 強調像として TR2000msec/TE 80msec を用いた。後肢の麻痺を grade0 から5の6段階に評価した後，脊髄の HE 標本を作製し MRI 画像と比較検討した。また，10匹のうち3匹については，圧迫除去後の脊髄を観察するために，麻痺が生じた時点で腫瘍の摘出を試みた。

【結果】

後肢の麻痺は，grade 1 から grade 4 が各1匹ずつで，grade 5 の完全麻痺が6匹であった。病理組織は，grade 1 や 2 では圧迫部の脊髄前索や後索の一部に海綿状変化や少数の空胞を認めた。麻痺の grade が進むにつれて白質全体に空胞が著明となり，前角細胞の変性萎縮，脱落も徐々に増加し，灰白質に点状出血を認めるものもあった。圧迫部上位では，空胞，前角細胞の変性とも軽度で，圧迫部下位では，上位に比べ変性は強いが，1例を除いて圧迫部より軽度であった。

MRI T2 強調矢状断像で輝度変化を認めたものが3匹あり，それぞれの麻痺の程度は grade 1, 2 および5であった。このうち1匹は圧迫部より下位の脊髄全体が高輝度を呈し，2匹は圧迫部のすぐ下位の小範囲の脊髄が高輝度を呈した。病理組織では，下位の脊髄全体が高輝度を呈したものは，圧迫部の上位と下位であまり差異を認めなかったが，圧迫部の下位小範囲が高輝度を呈したものでは，圧迫部上位に比べ，高輝度領域の白質の海綿状変化が強く認められた。また，経過観察途中に T2 強調像で圧迫部に高輝度領域を認め，最終観察時に同部が等輝度に変化したものが2匹あった。T1 強調像で脊髄の輝度変化を認めたものはなかった。

麻痺の出現後，腫瘍の摘出を試みた3匹のうち，2匹は摘出術中および術後まもなく死亡した。残りの1匹は，摘出術後も生存するが，4週後に腫瘍の再発をきたし，除圧はできなかった。

4．骨格筋のエネルギー代謝に対するトレーニング効果の NMR による研究

森本武利，吉崎和男，能勢　博，早野尚志（京都府医大・第一生理）
平川和文（神戸大・発達化学）
亘　　弘（生理研）

【目的】

ヒト骨格筋のエネルギー代謝に対する筋持久性トレーニングの影響を ^{31}P-NMR スペクトルをもちいて検討した。

【研究方法】

被験者は健康な成人男性７名（29±６歳）で，筋持久性トレーニングを15週間実施した。非利き手によるハンドグリップ運動を最大握力の1/3の強度で疲労困憊まで繰り返した。平均40±10回のハンドグリップを４日／週の頻度で，１日に４セット実施した。

^{31}P-NMR スペクトルは，生理研・磁気共鳴室の日立製 MRI/MRS 装置 (2.1T, ^{31}P の共鳴周波数：36MHz) を用い，表面コイル（直径40㎜）を前腕長掌筋付近に置き，ラジオ波パルスを２秒の繰り返して32回積算した。ハンドグリップ運動を１秒ごとに繰り返し，負荷を漸増（0.5㎏／75秒）させて ^{31}P-NMR スペクトルを測定した。

【結果および考察】

最大握力は15週間のトレーニングにより46±５㎏（平均±標準偏差）から51±４㎏へと有意に増加した。しかし，前腕の最大周囲径は有意に増加せず，^{31}P-NMR スペクトルから得た安静時のリン化合物の濃度にも有意な変化をみとめなかった。

ハンドグリップ運動をくりかえすと，負荷の増加とともにクレアチンリン酸が減少したが，トレーニングによる差異はみとめられなかった。しかし，負荷漸増運動の継続可能な時間は15週間のトレーニングにより22±２分から29±３分へと有意に延長した。また，疲労困憊時のリン化合物の濃度ならびに筋細胞内 pH にはトレーニングによる有意な差異を認めなかった。

有意な変化がみとめられたのは筋運動中の細胞内 pH である。ハンドグリップ運動を繰り返すと，負荷の増加とともに急速に細胞内 pH が酸性化した。その時点において細胞内 pH はトレーニング群において有意に高い値を示した。すなわち，筋細胞の酸性化の少ないトレーニング群では負荷漸増時の運動が長期に継続できた。酸化的筋線維は低い負荷で働き，負荷が増加すると解糖的筋線維が働く。持久的トレーニングはこの酸化的筋線維から解糖的筋線維への切り替えを遅らせることを示唆する。今回の結果は，筋持久性トレーニングが筋細胞内ミトコンドリアの増加など，筋の酸化能力を改善させることを示唆している。

【研究報告】

1）K. Hirakawa, K. Yoshizaki, T. Morimoto, and H. Watari. The transition from aerobic to anaerobic metabolism during exercise in human skeletal muscle studied by ^{31}P-NMR and electromyography. Society of Magnetic Resonance in Medicine, Eleventh Annual Scientific Meeting, Berlin, Germany, Aug. 10-14, 1992, Abstract pp. 2724.

2）K. Yoshizaki, K. Hirakawa, T. Hayano, T. Morimoto, and H. Watari. Regulation of glycolysis and energy metabolism in human skeletal muscle studied by ^{31}P-NMR. The 4th International Workshop on Muscle Energetics, Siena, Italy, Sept. 13-19, 1992.

【謝辞】

御助言・御協力いただいた生理研・村上政隆助教授，瀬尾芳輝博士，市川修氏，ならびに大河原浩氏に感謝します。

5．遷移金属イオンを用いたMRIにおける変性関節軟骨のcontrast enhancement

日下義章（京都府医大・整形外科）

【目的】

正常軟骨に多量に含まれる水分子は基質中に含まれるproteoglycan (PG)の持つ陰性荷電により保持される。軟骨変性に伴うPGの軟骨からの脱失は水分含有率の低下とこれによる軟骨の機能不全をもたらす。われわれは，PGの陰性荷電と相互作用を持つマンガンイオン(Mn^{2+})を関節軟骨のconntrast agentとして使用することを考案した。本研究では本法を用いた変性関節軟骨の診断の可能性を明らかにする。

【方法】

1）ファントムを使用した実験

0.5，2，8％のコンドロイチン硫酸(Ch-S), 0.5，1，2％のヒアルロン酸(HA)を含有する寒天ファントムを作成し，これと0.5mMの硫酸マンガンを接触させた。このファントムのMRI T1強調像を経時的に観察してMn^{2+}がファントム内に拡散する様子とファントム内に移行するMn^{2+}の量を計測した。Mn^{2+}の濃度の測定には既知濃度のMn^{2+}を含有する一連のファントムを別に作成し，これと試験用ファントムの緩和時間を比較して行った。

2）ニワトリの膝関節の大腿骨顆部より関節軟骨を採取して試料とした。得られた関節軟骨をキモパパインにて処理して変性関節軟骨のモデルとし，非処理軟骨との比較を行った。両試料を硫酸マンガンの溶液に一定時間浸漬し，その前後でMRI T1強調像を得た。一方，Mn^{2+}溶液に浸漬前後の軟骨のT1, T2緩和時間を測定した。

【結果と考察】

1）寒天ファントムに含まれるCh-s, HAの濃度に依存してファントム内に拡散するMn^{2+}は増加した。その結果，これらの高分子の濃度と得られるMR画像における信号強度の間には正に相関が認められた。Ch-SはHAに比して単位重量あたり約1.7倍の陰性荷電を有している。本実験結果でCh-SとHAを比較すると前者は後者の約1.5倍のMn^{2+}をファントム内に集め，理論値とほぼ一致していた。以上より，軟骨内の陰性荷電の密度，すなわちPGの濃度に依存してMn^{2+}は軟骨内に集積することが明らかになった。その結果，関節軟骨にMn^{2+}を与えることによりMRI T1強調像で軟骨内のPGの濃度に依存した信号強調が得られることが明らかになった。

2）キモパパイン処理群と非処理群のT1, T2値，およびMRI T1強調像をMn^{2+}への浸漬前に比較すると両群間に有意な差は認めなかった。Mn^{2+}に浸漬後は非処理群の関節軟骨のT1, T2値は処理群の約1/2と著明に短縮し，MRIでは処理群の関節軟骨の信号は明瞭に低下していた。

【結語】

関節内に注入されたMn^{2+}は軟骨基質内に拡散してPGの濃度に依存して分布するため，PGの軟骨内における分布をMIR T1強調像にて観察可能であることが明らかとなった。関節軟骨の

変性に関して最も早期にかつ鋭敏に変化するものは基質内のPG濃度であるため，この方法は関節軟骨の変性における早期診断に有用であることが期待される。

6．核磁気共鳴法を用いたmulti-modalityの生体情報の観察

成瀬昭二，堀川義治（京都府医大・脳神経外科）
田中忠蔵，樋口敏宏，恵飛須俊彦（明治鍼灸大・脳神経外科）

【はじめに】

核磁気共鳴法の臨床領域への導入はめざましいものがあり，従来から基本的に用いられていたSpin echo法による1H-MRIのほか，様々な生体情報が得られるようになりつつある。実際に臨床領域で用いられている高磁場装置で，何ら特別な変更を加えずに，これら様々な生体情報をヒト脳神経疾患から得て，その有用性を検討した。

【方法】

我々が用いた装置は，Magnetom H15 (Siemens, 1.5 tesla), SMT-150X (Shimadzu, 1.5 Tesla), Gyroscan S15 (Philips, 1.5 Tesla)である。これらの装置を用いて以下の種々の撮影を行った。

1）代謝画像(chemical shift imaging)：3D-FT法より，核磁気共鳴法で得られる化学シフト情報を画像化したもので，我々は1H-CSIと31P-CSIとを実用化し，臨床応用を行った。

2）分子拡散強画像(diffusion weighted imaging)：Spin echo法とGradient echo法を用いた高速撮影法を用い，motion proving gradientを印可して，生体組織に含まれている水分子の動きの内，微細で方向，速度のrandamな動き(intravoxel incoherent motion (IVIM))を強調した画像を測定したもので，局所の水分子の自己拡散定数の値も算出可能である。

3）magnetization transfer contrast (MTC)：Gradient echo法を用いて水の信号より$3KH_2$離れた周波数にexitation pulseとdephasing gradientを加え，極端に緩和時間の短い成分の信号を抑制する。この方法により，生体高分子の周囲の結合水と，それと離れた自由水との水分子の交換の割合を強調した画像を測定したもので，生体組織の特性の解析に用い，またTime of Flight法MRAへの応用も図った。

4）機能画像(functional imaging)：脳の局所の機能状態にともなう局所脳血流の増加と，その部位での酸素消費の結果生じる，oxy-Hbとdeoxy-Hbとの相対的な割合の変化を来たし，信号強度に対するT2 susceptibilityの影響を画像上に描出したものである。手の開閉運動負荷と光刺激負荷時の局所の変化をとらえた。

5）高速ダイナミックMRI (Dynamic-MRI)：MR造影剤投与，Inversion recovery Turbo-FLASH法の高速撮影法を用いる事により秒単位の信号強度の変化を測定するものである。組織の血管床に比例して信号増加が速くなり，組織血管床に関する情報を得る事が出来る。

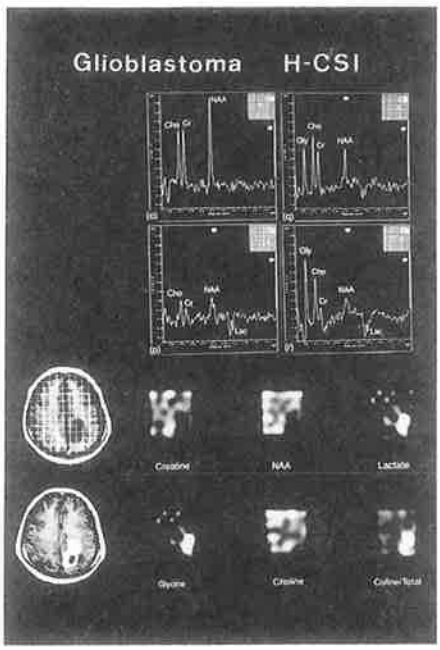


図1：脳腫瘍 (glioblastoma) 症例の 1H-CSI (MRS)
1H-CSI (MRS) で腫瘍部に一致した NAA の低下と Cho の相対的増高が確認され，腫瘍部および周辺浮腫部で Lac が検出された。また，本腫瘍で特異的と思われるピークが検出された。

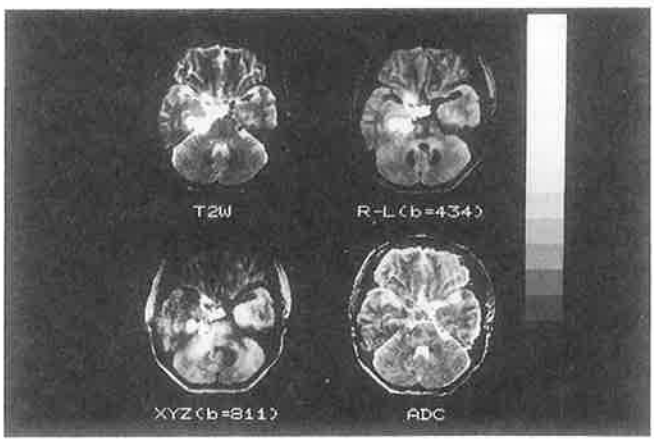


図2：類上皮腫症例の水の分子拡散強調画像
通常の撮影法では髄液腔との鑑別が不可能であった類上皮腫症例で，拡散強調の為の MPG pulse を印可する事により，腫瘍の局在を高信号領域として明瞭に描出する事が出来た。

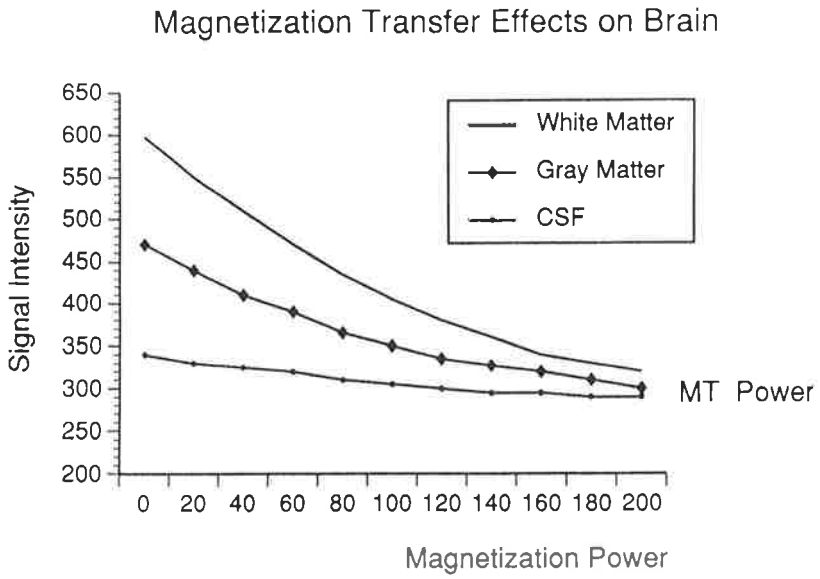


図3：MTC法を用いた場合の脳白質と灰白質の信号強度の変化
白質と灰白質の組織の差をMTC法を用いる事により表現出来た。

【結果】

1）1H-CSIでは，約1-2mlの領域(voxel) 256個から分解能の良いspectrumが測定された。すなわち，N-acetylaspartate, creatine, choline, lactate等の代謝物質の画像化が出来，腫瘍，梗塞，変性疾患，diffuse brain damage等の病態で特徴的な所見が得られた。また，mallgnant astrocytoma症例では本腫瘍に特異的と思われる物質のピークが認められ，鑑別診断，病態生化学的な解析に大きな情報を提供してくれた。そのほか，種々の脳神経疾患において，特徴あるspectrum patternを示した。特に，Alzhelmer病の早期症例の側頭葉皮質でNAAの低下がみられ，本疾患の早期診断上の有用性が示唆された。31P-CSI (MRS)では，phosphomonoseters (PME), inorganic phosphate (Pi), phosphodiesters (PDE), creatine phosphate (PCr), ATP等の物質の画像化が出来，脳腫瘍ではPME, Piの増高とATP, PCrの低下が認められ，代謝画像でこれらの変化の視覚化が可能であった。(図1)

2）diffusion weighted image (DWI)では，正常脳組織での部位別の拡散の異方性が描出され，脳梁，視放線，錐体路等の走行が，拡散係数の違いから描出された。また，脳腫瘍，脳浮腫，脳梗塞等の各種病態において拡散係数の違いから，それらの診断上極めて有用な情報が得られた。特に，類上皮腫の臨床診断上極めて有用な方法であった。高速撮影法を用いる事により，更に臨床応用が広がる事が予想される。(図2)

3）MTC法を通常の撮影法に活用する事により，(a) 組織構成の違いによる画像コントラストを

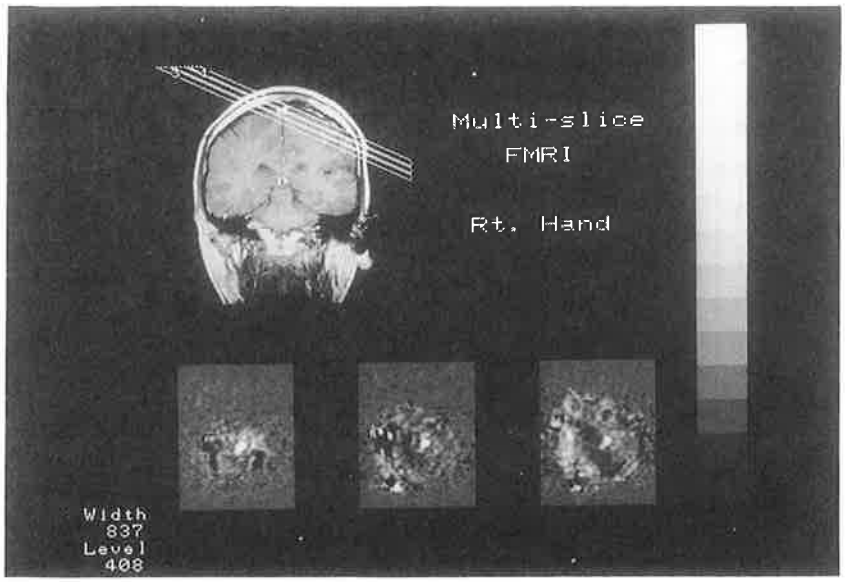


図4：右手運動刺激による左運動領の functional imaging
右上肢（手）運動刺激 (pinching) により左中心前回を中心とした運動領の信号強度が上昇した。

増強する事が可能で，病態における鑑別診断上極めて有用であった。特に，高速撮影法である gradient echo 法での画像コントラストを増強し，通常の T2 強調 spin echo での画質により類似したコントラストが得られた。(b) 造影剤を使用する場合，その投与量を少なくしても良好な画像コントラストが得られた。(c) MR angiography に本法を応用する事により，より末梢部の血管の描出を良好にし，この画質の向上に有用であった。（図3）

4）手指運動負荷による運動領の，視覚刺激による視覚領の信号強度の変化が画像上に描出され，脳の機能の局在が非侵襲的に画像上に同定された。（図4）

【まとめ】

磁気共鳴法には本来数多くの技法があり，近年それら技法の生体系への適応が進められてきている。特に単なる形態を中心とした画像診断だけでなく，脳の機能，代謝の解析に有用となる方法を多く持っている。しかし，臨床領域においては未だその能力は充分に発揮されているとは言い難い。今回はその一部について臨床応用，実用化を図った。その結果，multi-modality MR 法の実用化により，代謝，循環，機能等の解析が非侵襲的に可能となり，脳神経疾患の病態解析に有用である結果が得られ，今後の更なる改良，発展が期待される。

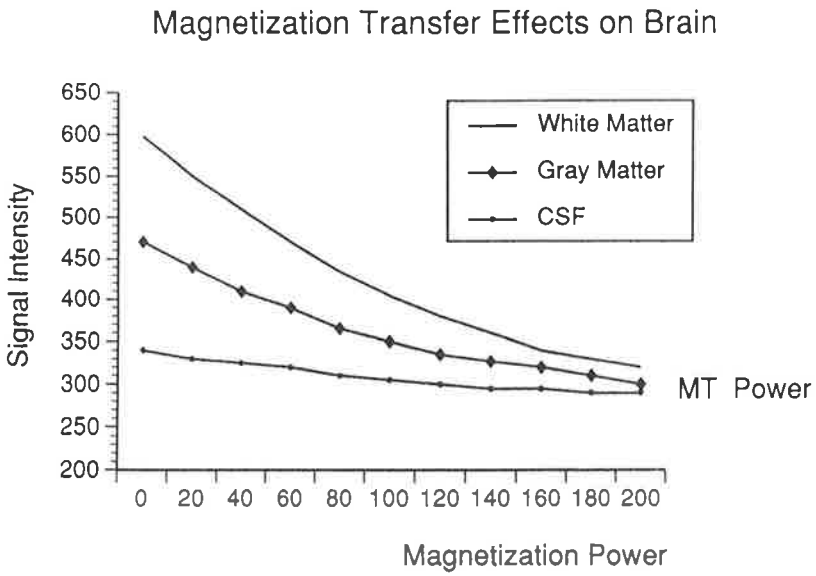


図5：下垂体腺腫 (microadenoma) 症例の dynamic-MRI
Dy-MRI により microadenoma の局在を明瞭に描出できた。

【参考文献】

1）成瀬昭二：核磁気共鳴スペクトロスコピー (MRS) 法のヒト脳への適用。神経科学レビュー 6 : 190-204, 1992

2）成瀬昭二他：1H 化学シフト画像 (CSI) の臨床応用と脳神経疾患への適用。CI 研究 14 : 161-171, 1992

3）成瀬昭二他：脳の代謝物質の映像化。センサー技術 12 : 9-86, 1992

4）堀川義治他：1H-NMR による癌の水緩和時間。病態生理 11 : 117-122, 1992

5）古谷誠一他：1H-magnetic resonance spectroscopic imaging (MRSI) 法の開発と脳腫瘍を中心とした脳神経疾患への応用。日磁医誌 12 : 77-88, 1992

6）成瀬昭二他：1H-chemical shift imaging (CSI) 法の臨床応用。Pharma Medica 10 : 165-172, 1992

7）成瀬昭二他：MRS と MRSI。臨床画像特集—基礎から学ぶ MRI 9 (2) : 84-98, 1993

8）恵飛須俊彦他：分子拡散強調 MRI 画像の脳神経疾患への応用。脳と神経 43 : 677-684, 1991

9）恵飛須俊彦他：拡散強調画像の基礎的研究および臨床応用。日磁医誌 11 : 20-28, 1991

10）堀川義治他：水の分子拡散強調 MR 画像。Med. Imag. Tech. 11 : 12-21, 1993

7．MRIによる内耳病変の検出

肥塚　泉，瀬尾　律，松永　亨（大阪大・医・耳鼻咽喉科）
瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘（生理研）

【緒言】

我々は人側頭骨標本およびボランティアを対象として，MRIによる内耳内部構造の撮影を行っている。昨年度はボランティアを対象とした撮影において蝸牛基底板，膜迷路等の描出に成功した。今回はさらに例数を増やし，主にボランティアを対象とした内耳微細構造の撮影を行った。

【対象および方法】

正常成人5名を対象とした。パルスシーケンスはSpin Echo (TR ＝ 2000msec, TE ＝ 70msec)を用いた。スライス厚は4㎜とした。マトリックスは256x256, スキャン回数は2回とした。

【結果】

ボランティアを対象とした撮影においても，側頭骨標本を用いた場合に比して若干S/Nは劣るものの，蝸牛の基底回転，第2回転，頂回転およびそれぞれの基底板の描出に成功した（図1）。蝸牛前庭階と鼓室階を明瞭に区別することが可能であった。また現時点では再現性に問題はあるもののライスネル膜についても撮影に成功した。

【考察】

眩暈，耳鳴，難聴を来すメニエール病の本態は内耳の内リンパ水腫である事が知られている。しかしながら，内耳は人体を構成する骨の中で最も堅い骨の1つである側頭骨に囲まれていること，またその大きさ自体も微小であることより，X線CT, MRI等の画像診断による診断を行う事は現時点では不可能であり，もっぱらその診断は，蝸電図における-SP/AP比の増大，グリセオール，ラシックス等の利尿剤投与後の聴覚域値の改善等の間接的な方法に頼っている。我々はこれまでに側頭骨標本を用いた撮影，ボランティアを対象とした撮影の両者について蝸牛基底回転，第2回転，頂回転およびそれぞれの，基底板の描出に成功している[1)2)]。しかしながら内リンパ水腫を画像を用いて直接診断するには，さらに薄いライスネル膜の描出が必須である。今回我々は，ライスネル膜を描出すべく被験者の固定について工夫を加えた。その結果，5人中1人においてライスネル膜の撮影に成功した。今後さらに被験者の固定方法について改良を加え，ライスネル膜についても確実に撮影が可能となるよう検討を加える。

【参考文献】

1）肥塚　泉，佐野光仁，久保　武，松永　亨，瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘，市川　修，大河原浩：MRIによる側頭骨標本を用いた内耳の撮影。耳鼻咽喉科臨床 83 : 549-555, 1990

2）I. Koizuka, R. Seo, M. Sano, M. Murakami, Y. Seo, H. Watari : High resolution MRI of the human temporal hone. ORL 53 : 357-361, 1991

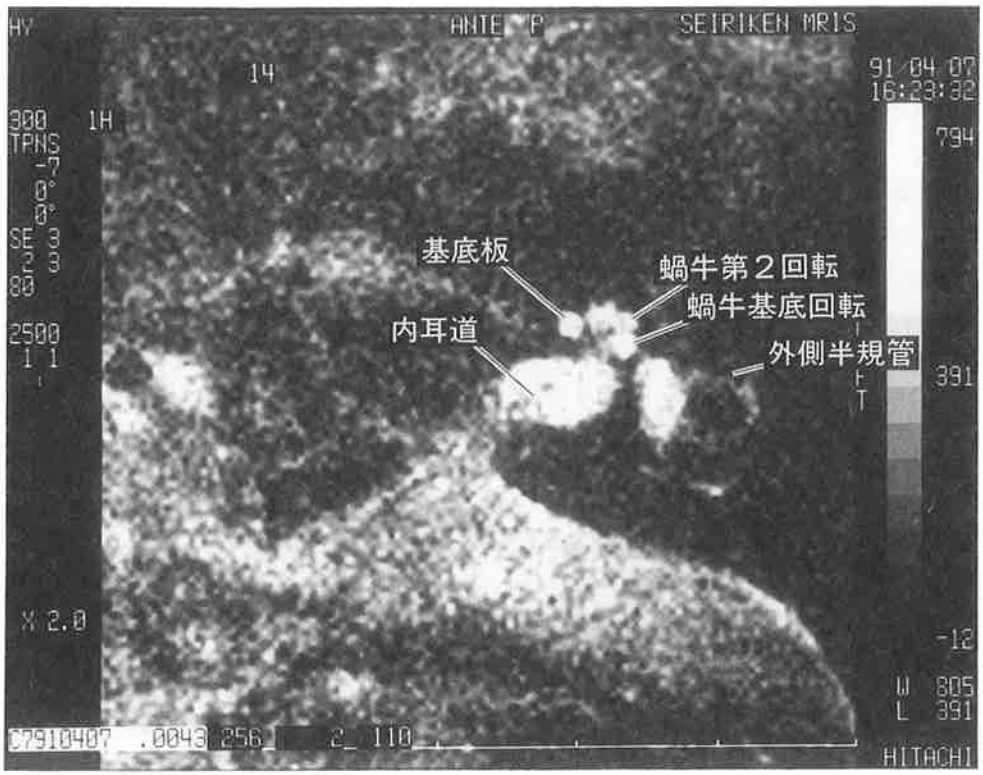


図１　ボランティアより得られた正常内耳 MRI。

8．筋エネルギー代謝に及ぼすウォーミングアップの影響

吉田敬義（大阪大・健康体育部運動生理）
亘　　弘（生理研）

【目的】

運動に必要な筋エネルギー源は筋細胞中に存在するアデノシン３燐酸(ATP)やクレアチン燐酸(PCr)の分解に依っている。そこで，運動を継続させるためにはPCrからのATPの合成を持続的に行うことが必要である。PCrの分解はミオシンATPaseとサルコメアのクレアチンキナーゼ酵素活性に依存しており，PCr合成は有気的代謝能力とミトコンドリアのクレアチンキナーゼ酵素活性に依存している。一般にウォーミングアップを行うことによって有気的代謝能力が活性

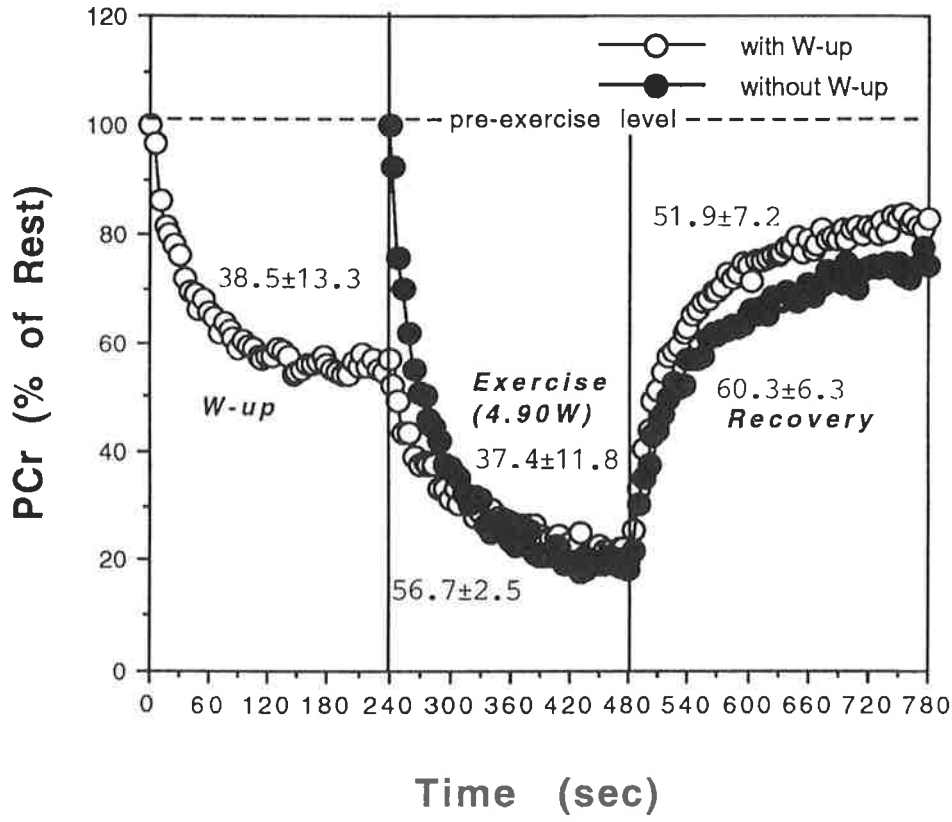


図１　運動中のPCrの変化と時定数（秒）

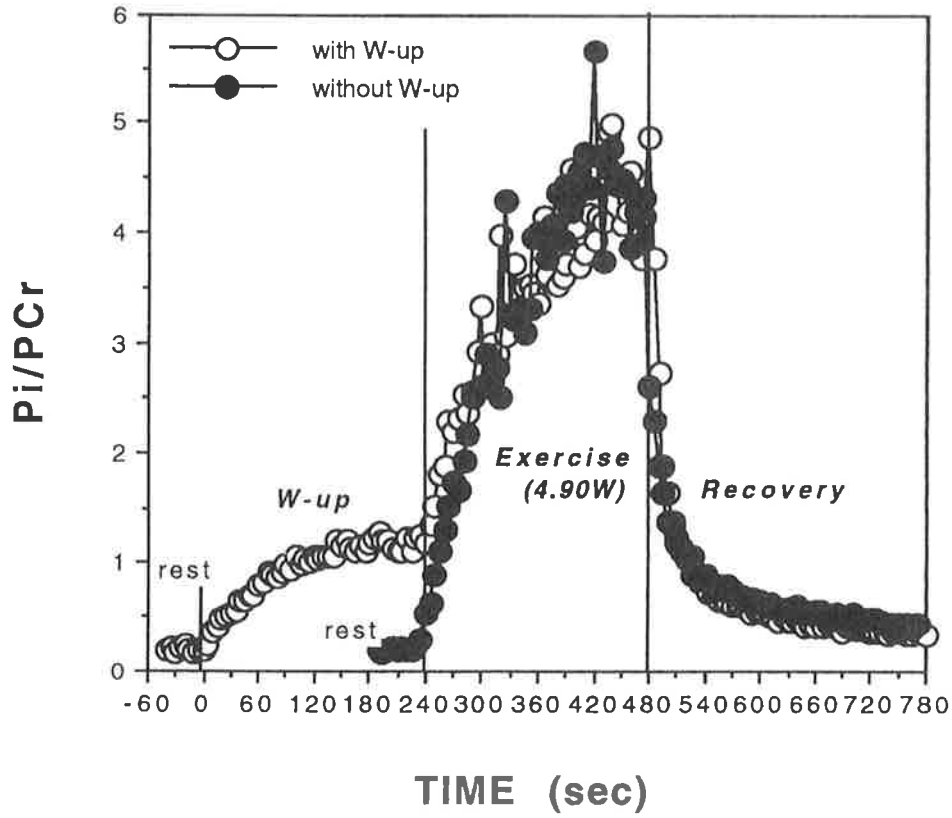


図2　運動中の Pi/PCr の変化

化されるが，筋エネルギー代謝に及ぼすウォーミングアップの影響を検討した研究は少ない。そこで，本研究は PCr の分解や PCr 合成のスピード (kinetics) に及ぼすウォーミングアップの影響を検討した。

【方法】

被験者：6 名の健康な男子大学生を被験者として用いた。^{31}P-NMR の測定には日立製 MRI/MRS 核磁気共鳴装置（直径67㎝，2.1T）を用いた。被験者はこの核磁気共鳴装置内でうつ伏せとなり，大腿屈曲運動を行った。運動強度は 30kgm/min とし，安静状態から急激にこの運動強度を 4 分間行う方法 (without W-up) と安静後無負荷状態で 4 分間のウォーミングアップを行った後に急激に 30kgm/min の運動強度を 4 分間行う方法 (with W-up) を実施した。大腿二頭筋部の中央に置いた直径80㎜の表面コイルからの RF パルスを調整して 5 秒毎に ^{31}P-MRS データを得た。そして，安静時，運動中及び回復時共に連続的に ^{31}P-MRS データを得て，運動に伴う PCr の変化から

$$Y(t) = G(0) + G(1)(1 - e^{(t \pm TD/\tau)}) \quad \cdots\cdots (1)$$

または，$$Y(t) = G(0) + G(1)(e^{(t \pm TD/\tau)}) \quad \cdots\cdots\cdots (2)$$

の式を用いて時定数を算出した。

【結果と考察】

運動に伴いPCrは指数的に減少した。W-upによってPCrレベルは56.7±14.3%に減少した。W-upの有無に関わらずに運動中に達したPCrレベルは19.7±6.7% (with W-up),18.3±3.7% (without W-up)となり有意な差はなかった（図1）。運動開始時のPCr減少の速さを時定数（τ）で求めると，安静時から運動を行った場合には(without W-up),37.4±11.8秒であった。W-up運動を行うことによって減少したPCrのスピードは38.5±13.3秒であった。そして，W-upを行った後に主運動を実施したときのPCr減少のスピードは56.7±2.5秒となり，W-upを行うことでPCrの減少は有意に遅くなった。一方，運動後のPCr合成のスピードはW-upを行ったほうが速い傾向にあった。W-up運動とW-upなしの主運動で見られたように，運動を安静状態から開始した場合にはPCr減少の速さが運動強度の大きさに関わらずにほぼ同じであったことは注目すべき事項である（without W-up,37.4±11.8秒；at W-up,38.5±13.3秒)。一方，W-upを行うことによって主運動に至るPCr減少の速さは遅くなった（56.7±2.5秒)。これらのことはW-upによって循環動態や有気的代謝能力が活性化されたとは考えにくい。このことはW-upの有無に関わらず運動中に達したPi/PCrレベルには有意な差がなかったことからも支持できる（図2)。むしろ，W-up運動とW-upなしの主運動で見られたように，安静時から運動を開始した場合にはPCr減少の速さがほぼ同じであったことは運動開始時のPiピークの分裂に依存したPCr-kinetics を示しているかも知れないことが示唆された。

9．HDT 動物の NMR による脳血流の測定の試み

松波謙一，川島　卓，佐竹裕孝，小西朝隆（岐阜大・医・反射研）
彦坂興秀，宮下暢夫（生理研）
市川　修（生理研）

NMR イメージングはパラメータを変えることにより，プロトン密度画像，T1 強調画像，T2 強調画像が従来より得られ用いられている。この他に NMR の使い方の一つに流速計測がある。今回の実験の目的は，NMR イメージングにより動物又はヒトの脳内血管の流速計測がどの程度可能であるかを検討した。

脳内血流計測の方法としては，大別して，侵襲的な方法と非侵襲的な方法がある。侵襲的な方法は Fick の原理を使った熱稀釈法，色素又は放射性アイソトープ注入法などがあり，古くから広く使用されてきた。我々の最終的な目的は，ヒトの脳血流の測定にあるので，非侵襲的測定が必須の条件になる。この観点からみると，非侵襲的脳血流の測定方法としては，次の三つが考えられる。ドプラー法に基づく超音波を使った測定法（ドプラー法）；極超短期アイソトープを使用した PET 又は SPECT による方法；及び NMR による方法である。これら三方法はそれぞれに一長一短がある。ドプラー法の場合は実時間の計測ができるのは強みであるが流速値であり，正確には相対値でしかものが言えない。又，どの血管のどの部位の流速かも，正確には決定できない。血管の走行方向と測定プローベの位置関係により値が左右されるのも一つの弱点である。PET 又は SPECT による方法は，脳内の領域別に血流量の増減を見ることはできるが，あくまで相対変化である。又，５分間 (SPECT) ないしは30～45分間 (PET) の積分した結果であるので時間分解能が悪い。これに比べると NMR イメージングの場合には，アンギオグラフにより測定すべき血管の決定を行うので血管の同定が可能であり，同時に数本の血管についての流速を求めることも場所をうまく選べば出来る。しかし，この場合も流速はロイにより合わせなければならないので正確な意味では相対値である。時間分解能はドプラー法にはるかに劣るが，新手法の導入により，測定時間は非常に短縮されてきている。将来的には機能との相関が関連づけられるのも一つの有利な点である。こうしたことから，今回は NMR イメージングにより，血流測定をネコとヒトで試みた。

【方法】

生理学研究所にある磁気共鳴 (NMR) 装置（日立；2-1 Tesla）を使用した。実際に計測してみると，流速の測定は困難であり，予備実験に止まった。以下その概略を述べる。

（a）ネコでの実験： HDT の実験を動物を使用して行う予定であったので，ネコを使うことにした。しかし，それに先立ち，まず細いビニール管（内径２，３，４，６，８㎜）を血管のモデルと見立てて，生理食塩水を流して，流速を求めることを試みた。この結果，径が５㎜以上ないと測定がかなり困難であることが予想された。

次いでネコで行った。まず，MRI 画像により内頚動脈で直線部分の長い所を探し，直径を求めたが，3㎜に満たなかった。この内頚動脈を使い流速を求めようとしたが，予想通り，ノイズが多く，流速の測定はほぼ不可能と解った。

次ぎに，弗素（F）を含んだ人口血液，フルオロカーボン（FC-43, ミドリ十字）を使い，プローベを ^{19}F に切り変えて測定を試みた。背景のノイズは若干改良されたが，流速を確実に測定できるほどには改良されず，この時点で，ネコによる血流測定は断念した。

（b）ヒトでの実験：次いで，ヒトを被験者にして，同様に流速の測定を行った。ヒトでは FC-43 は使用しないので，^{1}H のプローベによる水素の NMR のみを行った。まず，NMR-アンギオグラフで長い直線部分を持つ内頚動脈の部位が求めた。直径は約 5 ㎜弱あり，なんとか流速を求め得る径に達していた。次いで，流速測定に切り変え，ロイを合わせると，約40～50㎝／秒の値が得られた。この値は，矢島等（日大）がドプラー法で求めた70㎝／秒に比べると，かなり小さい。両者の差が何によって生じるのか，現段階では定かでない。

今，仮に50㎝／秒の流速として 2 本の内頚動脈を流れる血液量は以下のようになる。

$2 \times 50 \times (1/4)^2 \times 3.14 = 19.6$（㎠／秒）

※$19.6 \times 60 = 1176$（㎤／分）≒1.1リットル／分

心臓の心拍出量は成人では約 5 リットル／分であるので，その10％が頭部にいくとして0.5リットル／分となる。今回得られた値は，50㎝／秒という，遅いと思われる値を使って大きめに出ている。こうした点は，流速（ロイ）の値を含めて，今後の検討の対象になると思われる。

（c）今後の展望： ^{19}F を積極的に使用することを考えている。自然に存在する弗素のほとんどは ^{19}F でこれは常磁性体であるので，^{19}F でラベルされた物質を使い，NMR イメージングが可能である。今回，ミドリ十字社の人口血液 FC-43 は弗素化合物であるので，これを使用してみた。ネコに静注し，NMR の画像化を試みたが，うまく行かなかった。パラメータの取り方などに問題があったと思われる。幸い来年度は九大・薬学部の金沢教授が ^{19}F 化合物の共同利用実験を始めるので，色々と教示を受けながら再度，試みたい。

10. 多核種核磁気共鳴法による水・電解質輸送の解析

村上政隆，瀬尾芳輝，石川　透（生理研）
斎藤禎隆（国立療養所岩手病院）
窪田隆裕（大阪医大）

細胞内 pH を人工的に変化させる方法として従来よりアンモニウムーパルス法が，細胞の緩衝能を調べる方法として用いられてきた。しかし，唾液腺においては，アンモニウム投与中に細胞内 pH が元のレベルに低下し，或はさらに低い値になることが Fura-2 を用いた蛍光法や ^{31}P NMR 法にて観察されていた。Martinez (1990) や Turner (1992) らはこの pH 減少は細胞内にアンモニウムイオン (NH_4^+) が流入する可能性とその経路が Na/K/2Cl cotransport らしいことを示唆していた。

前年，N-14 NMR 法に化学シフト試薬 Dy (TTHA) 10mM を適用し，細胞内の NH_4^+ の測定を行った (Seo & Murakami (1991) Proc R Soc Lond 193 : 347)。20mMNH_4Cl を灌流すると，細胞内 NH_4^+ は急速に 50mmol/l ICF まで増加した後緩やかに 70mmol/l ICF に達した。細胞内 pH は P-31 NMR により無機燐の化学シフトを計測し求めたが，NH_4^+ 添加時にすぐに 0.5pH 単位上昇し，その後細胞内 NH_4^+ が高値にもかかわらず減少した。NMR で測定した初期細胞内 NH_4^+ 量は，pH より推定した NH_4^+ 量より多いことが明らかになった。この結果は，NH_4Cl 添加中に，NH_4^+ が細胞内にイオン性に流入する部分もあることを示唆した。

本来，このアンモニウム流入経路が Na/K/2Cl cotransport であるのか否か，他の経路の可能性はあるのかについて N-14 NMR 法により細胞内 NH_4^+ の測定を行い，Na, Cl 置換の影響，Bumetanide などの輸送ブロッカーの効果を調べた。その結果，bumetanide 100 μM で細胞内アンモニウムの増加量は約30％抑制された。NMGA＝81mM で灌流液の Na を置換し 65mM に減少させても，細胞内アンモニウム増加量は変化しなかった。gluconate＝81mM で Cl を置換して 33mM にすると，細胞内アンモニウムの増加量は30－40％減少した。このことは，アンモニウムの流入経路として Na/K/2Cl cotransport が強く示唆される。

アンモニウムイオンの水和半径はKイオンの水和半径に非常に近い（Rb イオンよりも）ため，Kの輸送経路を通過する可能性は十分ある。Kチャネルブロッカーとして用いられる Charybudotoxin 100nM は効果が見られなかった。non-specific cation チャネルブロッカー fulfenamic acid 100 μM, DPC 100 μM も有意な効果はなかった。従って，細胞内アンモニウムの増加に寄与するのは，70％以上がアンモニアの非イオン性の細胞内への拡散であり pH を上昇させるが，イオン性のアンモニウム輸送経路として Na/K/2Cl cotransport が細胞内にアンモニウムを Cl 依存性に取込み細胞内 pH を低下させることが結論された。今回の実験は，また，Na/K/2Cl cotransport を有する他の細胞系でも，同様の現象が観察されることを示唆しており，アンモニウムーパルス法の適用は慎重に行う必要があると考察された。

11. 磁気共鳴法による細胞内電解質の解析
—糖質ゲル中の水の拡散（1）—

渡部徳子，大塚章宏（東京水産大・水産学部）
瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘（生理研）

澱粉ゲルの物性は，澱粉ゲルの構造に影響される。しかし，澱粉ゲルは半透明であるので，顕微鏡等によって比較的マクロな構造を in situ に観察することは困難である。本研究では，澱粉ゲルのネットワークが水の拡散に与える影響から，澱粉ゲルのネットワーク構造を非破壊的に調べることを目的とした。

【方法】

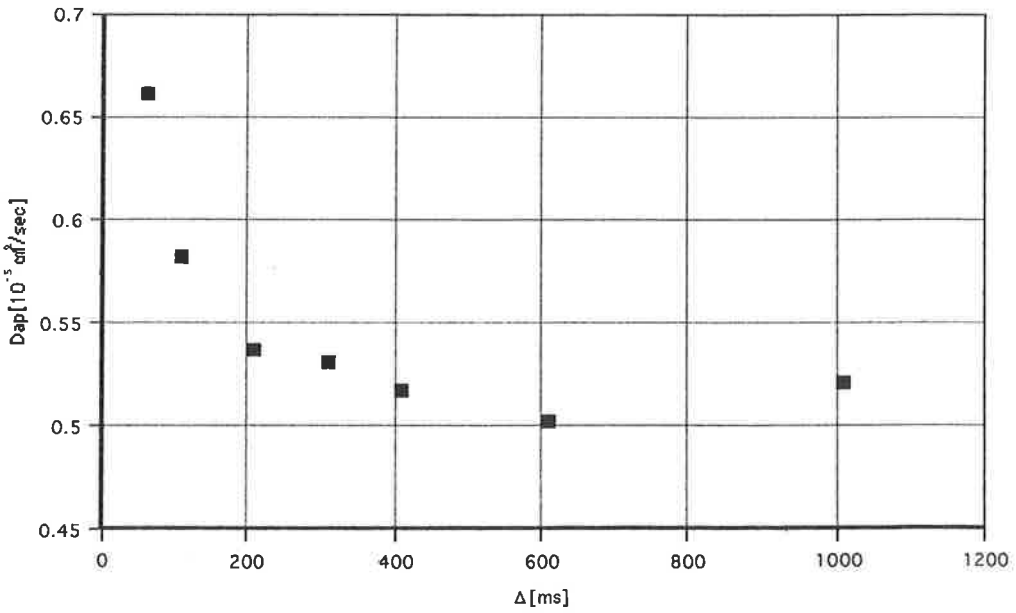
外径5㎜のNMR用サンプル管に，馬鈴薯澱粉と水を懸濁させ，3日間放置し，よく撹拌しながら98.7±0.4℃で1時間加熱し，その後10分間室温に放置して種々の濃度(17.1～42.0w/w%)の馬鈴薯澱粉ゲルサンプルを調製した。また，同様の要領で，濃度1.7～17.9w/w%のアミロペクチン溶液も調製した。拡散係数の測定は，1H共鳴周波数100MHzのNMR装置(Bruker MSL 100)を用い，パルス磁場勾配法（Stimulated Echo Pulse Sequence使用）によって行った。また，上記のサンプルを5℃で一定時間保存し，老化を進行させたサンプルについても同様の測定を行った。

【結果と考察】

①澱粉ゲル中の水プロトンのエコーシグナルの減衰から，見かけの水の拡散係数の値が求められる。澱粉濃度42%の澱粉ゲルにおける見かけの拡散係数と拡散時間との関係を図に示す。見かけの拡散係数の値は拡散時間の増加に伴って減少しており，馬鈴薯澱粉ゲル中の水について制限拡散が観察された。従来，希薄澱粉糊からのゲルにおいては澱粉は水の拡散の障壁にはならず，ゲル中の水は制限拡散はしないと報告されていた。本実験では，従来の実験よりも拡散時間および磁場勾配を大きくとることにより，制限拡散を検出できた。

②澱粉の構成要素であるアミロースとアミロペクチンのうち，澱粉の老化と密接な関連があると考えられているアミロペクチン水溶液についても水の拡散係数を求めた。高濃度溶液においては，ゾル状態であってもわずかな制限拡散が認められた。

③測定された見かけの拡散係数から，澱粉ゲルおよび老化澱粉ゲルのミクロ構造を推定するために理論的取り扱いを進めている。水の拡散ばかりでなく，澱粉鎖の拡散（または揺らぎ）からの検討も必要であり，今後の課題としたい。



12. サル大脳皮質の非破壊的観察と脳定位的記録への応用

酒田英夫，楠　真琴，田中裕二，村田　哲（日本大・医・第一生理）
彦坂興秀，宮下暢夫（生理研）

我々はこれまでに行動中のニホンザルの大脳皮質頭頂連合野から単一ニューロン活動を記録し，視覚的空間知覚の神経機構を調べてきた。従来，このような実験では，記録期間中はニューロンの記録部位を知ることはできず，すべての記録実験が終了した後に脳の組織標本を作り記録部位を確認していた。しかし，この方法では記録してから記録部位を確認するまでに数か月かかってしまう。そこで，本研究では記録実験を行う前に核磁気共鳴装置を用いてサルの脳地図を作成し，これを頭頂連合野の奥行運動感受性ニューロンの定位的な記録実験に応用した。

まず，全身麻酔下でサルの頭骨にデルリン製の頭部固定用支柱と定位的位置計測用のマーカーを取り付けた。数日後，全身麻酔下でサルの頭部を核磁気共鳴装置のコイルに固定し，水平，矢状，前額断層像を撮影した。断層像に映し出されたマーカーの位置を基準として3方向から見た脳地図を作成した。この脳地図に従い，上側頭溝 (STS) の前壁の MST 野周辺をねらってマニピュレーターを取り付けるシリンダーを定位的に頭骨に固定した（図 1A)。この脳地図上で記録実

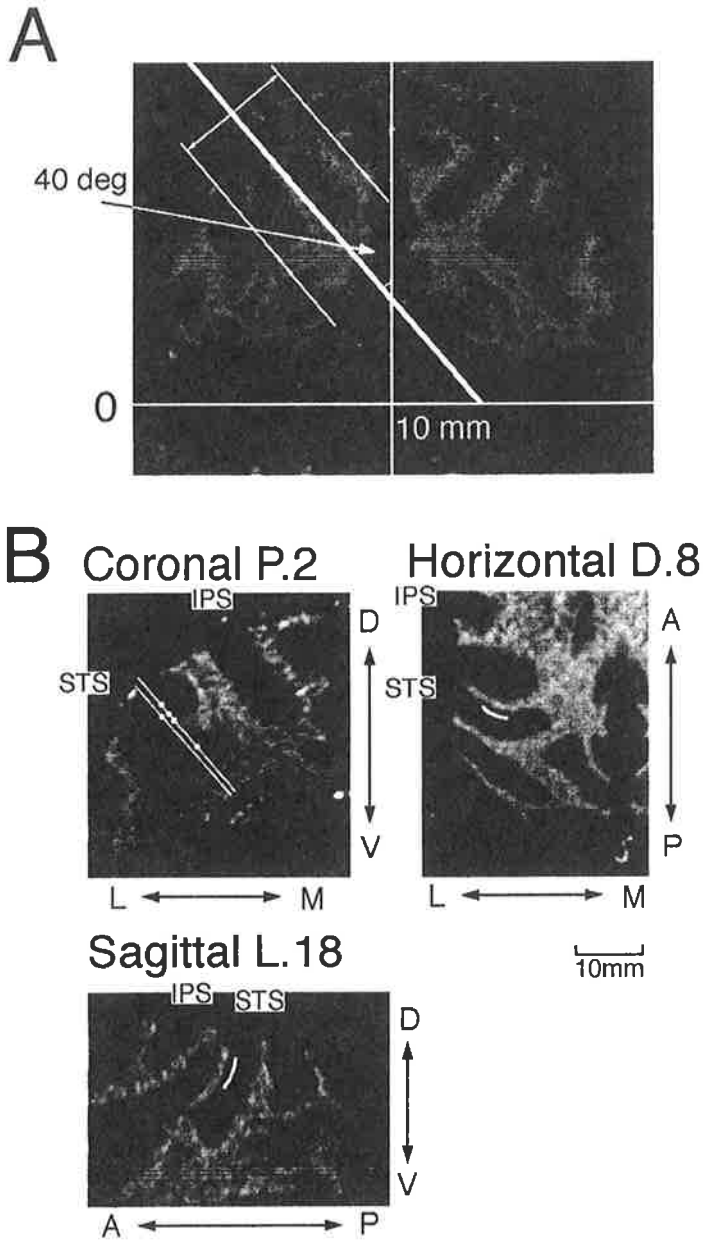


図1　ニホンザルの頭部核磁気共鳴像。A．前額断層像をもとにして上側頭溝および頭頂間溝が記録できるように脳定位的に記録用のシリンダーを取り付ける。（側方へ40°傾け，原点から10㎜対側をねらっている。）B．前額 (Coronal), 水平 (Horizontal), 矢状断 (Sagittal) で確認されたニューロンの記録部位。前額断層像中の白線は記録電極の刺入路を示し，白丸がニューロンの記録部位を示す。水平，矢状断層像中の白い部分は対応する部位を示す。STS：上側頭溝，IPS：頭頂間溝

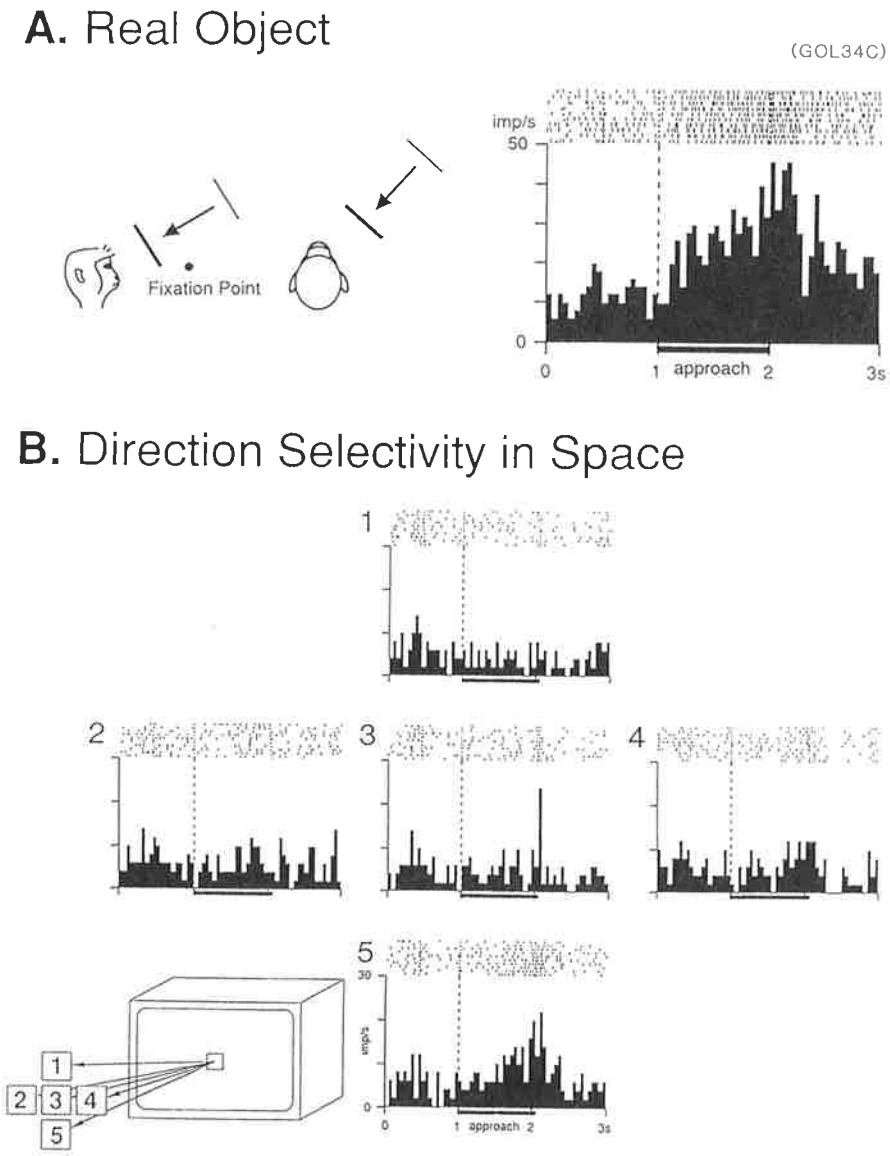


図2　三次元的方向選択性を示す奥行運動感受性ニューロンの例。このニューロンは実物の斜め右上からの接近運動に対して反応した(A)。立体視コンピュータグラフィクスを用いて三次元的方向選択性を調べると，斜め下への接近運動で興奮が見られたが(B5)，正面や斜め左右，斜め上への接近運動にはほとんど反応しなかった(B1-4)。

験中に電極の刺入部位を確認することができ，奥行運動感受性ニューロンがMST野周辺で記録されていることが三方向からの断層像上で確認できた（図1B）。

前方においた小さな光スポットを注視するようにサルを訓練し，サルがスポットを注視している間に視覚刺激を行った。物体の奥行運動に反応するニューロンがみつかったらスクリーン上で奥行運動知覚の主な手掛刺激である大きさの変化と両眼視差の変化の視覚刺激を行なった。その結果，頭頂連合野の奥行運動感受性ニューロンには，主に両眼視差変化または大きさ変化に反応するもの，両方に反応するもの，両者の組み合わせにのみ反応するものがあった。頭頂連合野の奥行運動感受性ニューロンの多くは正面方向の接近又は離反運動に反応したが，中には斜め上下，斜め左右方向への動きによく反応するものがあった。そこで，これらのニューロンの三次元空間内での方向選択性を調べるため，両眼立体視ディスプレイを用いて刺激を行った。図２に三次元的方向選択性を示した接近ニューロンの例を示す。このニューロンは実物の斜め上から下向きの接近に対して反応した。コンピュータグラフィクスで調べると，実物の場合と同じように下向きの動きによく反応し，他の４つの方向に対してはほとんど反応しなかった。このように頭頂連合野の奥行運動感受性ニューロンの中には鋭い三次元的方向選択性を示すものがあることが明らかになった。以上の結果から，頭頂連合野が空間内での物体の三次元な動きの検出に関与していることが示された。

このように，サル大脳皮質の核磁気共鳴断層像は脳定位的記録に利用できることがわかった。今後，撮影時の頭部固定方法を工夫するなどしてさらに正確な脳地図を作成する予定である。

13. ラット脳虚血障害の定量的解析

西野仁雄，端谷　毅（名市大・医）
亘　　弘（生理研）

中大脳動脈(MCA)閉塞モデルラットでは線条体外側部及び外側の大脳皮質が梗塞に陥り，受動回避学習課題の獲得と保持が障害される。一方，本ラットの梗塞巣に胎仔ラット線条体細胞を移植すると障害された機能が改善される。しかし梗塞巣の存在部位，広がりを前もって定量化し，それに見合って神経移植を行えば，よりよい機能修復がえられると考えられる。本研究ではMRIによる画像処理により梗塞巣の大きさ及びその存在部位を定量的に解析した。

ハロセン麻酔下でウイスター系ラット(200-250g)の外頚動脈から塞栓子を挿入し，Will is環のMCA起始部に達した。麻酔を切り，同部位に塞栓子を留置し，MCA領域に虚血を起こした。１時間後に再度麻酔下で塞栓子を抜去し血流の再開通を行った。虚血1.5－２ヵ月後に，MRIによる画像解析を行った。ペントバルビタール麻酔下でラット頭部を静磁場(2.1T)の中心においた直径５㎝の自家製コイル内に固定した。その後15－17分間にわたりスピンを発生させ，ラジオ波を記録し画像を作製した(200μm x 200μm 256 x 256)。

虚血ラットでは，虚血した側の側脳室の拡大が認められ，線条体外側部から腹外側大脳皮質に

かけて画像の脱落が認められた。これらの所見は，実験終了後に行った組織検索においても確認できた。

今回行った実験では，梗塞巣が約 0.75mm x 0.75mm 以上であれば画像的に検出可能であることがわかり，MRI 法は脳梗塞部位の同定に有用であることがわかった。しかしラットの脳は小さいためヒト，サルにおけるようなシャープな画像をえるためには，コイルの形状，スピン発生条件，時間等今後さらに検討を加えねばならないと考えられる。

14. 生理研研究会及び磁気共鳴装置室ワークショップ合同国際ワークショップ

代表者　菅野義信（広島大歯），村上政隆（生理研）

世話人　市川　修，大河原浩，高木正浩，寺川　進，石川　透，古家喜四夫，瀬尾芳輝

1992年 9 月 2 － 5 日

(1) Forty years of exocrine secretion (1953-1993) - A perspective from Sydney

J. A. Young, & D. I. Cook

(2) Functional characterization of Ca^{2+} transport mechanisms in acinar cells from rat and mouse pancreas

I. Schulz, T. Ozawa, A. Schmid, & F. Thevenod

(3) The inositol phosphate-calcium signalling system in exocrine gland cells

J. W. Putney Jr.

(4) The mechanism of stimulated entry of Ca^{2+} in the rat mandibular gland acinar cells studied with measuring Ca^{2+} -activated ionic membrane currents

M. Wakui, E. Sawada, Y. Fukushi, H. Hayashi, & A. Nishiyama

(5) Effects of caffeine on calcium mobilizaiton in rat parotid acini

J. T. Seo, S. I. Kim, K. H. Kim, & S. I. Lee

(6) Receptor coupling mechanisms which regulate salivary fluid secretion

B. J. Baum, Y. Dai, Y. Hiramatsu, & I. S. Ambudkar

(7) Role of cyclic AMP-dependent protein kinase in amylase exocytosis from parotid acinar cells

T. Takuma

(8) Agonist-stimulated covalent modification in parotid

H. Sugiya, & M. Yokoyama

(9) Agonist-induced patterned Ca rise facilitates exocytotic fusion and fluid secretion in pancreatic acinar cells

Y. Maruyama, & H. Kasai

(10) Mechanically-induced calcium wave and release of stimulants in mammary epithelial cells

K. Enomoto, K. Furuya, & S. Yamagishi

(11) Salivary secretion and gap junction permeability in the rat submandibular gland

Y. Shiba , M. Sugita, C. Hirono, Y. Sasaki, & Y. Kanno

(12) Enzyme and fluid secretion in living salivary glands : direct observation by video-enhanced microscopy and confocal laser microscopy

A. Segawa

(13) Exocytosis and water secretion in the tupai sublingual gland

S. Terakawa, M. Murakami, & K. Xu

(14) Dynamic behavior of intracellular electrolytes in the salivary gland

Y. Seo, & M. Murakami

(15) Secretory phenomena on the artificial acinus

Y. Imai, H. Yoshida, M. Miyamoto, T. Nakahari, & Y. Sohma

(16) K^+ and Cl^- currents in sheep parotid secretory cells

T. Ishikawa, & D. I. Cook

(17) Mechanisms of fluid secretion in salivary glands-energetics and regulation

R. J. Turner

(18) Cation handling by mandibular salivary gland as measured by NMR

M. Murakami, & Y. Seo

(19) Imaging ion and fluid secretion in single salivary acinar cells

J. K. Foskett, M. M. Y. Wong, & M. Robertson

(20) Salt-water coupling in salivary secretion

M. C. Steward, J. B, Larcombe-McDouall, T. Nakahari, & R. M. Case

(21) Paracellular fluid transport in salivary acinar cells?

T. Nakahari, A. Nakamura, & M. C. Steward

(22) In vitro cultures of normal and neoplastic human salivary gland cells

M. Azuma, & M. Sato

(23) Muscarinic signalling in submandibular cells of young and adult rats

JC. Seagrave, S. Barker, A. M. Martinez, & J. R. Martinez

(24) Spatio-temporal aspects of the stimulation-induced Ca^{2+} rise in pancreatic and parotid acinar cells

S. Dissing, J. L. Gromada, N. K. Jorgensen, B. Nauntofte

(25) Rabbit mandibular ducts : Ion transport and regulation

K. R. Lau, R. L. Evans, & R. M. Case

(26) Patch-clamp studies on granular intralobular ducts of mouse mandibular glands

A. Dinudom, J. A. Young, & D. I. Cook

(27) Agonist-induced increase and oscillation in the intracellular free calcium concentration in cultured human sweat duct cells

J. H. Poulsen, & P. S. Pedersen

(28) Salivary secretion : Future prospects

R. M. Case, R. L. Evans, K. R. Lau, & M. C. Steward

【討論参加者】

Schulz I (Homburg Univ), Case RM, Steward MC, Lau K, Seo JT (Manchester Univ), Putney JW (NIEH, Research Triangle), Turner RJ, Baum BJ (NIH, Bethesda), Poulsen JH, Dissing S (Copenhagen Univ), Foskett K (Toronto Univ), Martinez JR (Lovelace Med Cent Inst, Albuquerque), Young JA, Cook DI (Sydney Univ), Ammer U (Max-Planck-Inst, Frankfurt), 菅野義信，柴　芳樹，杉田　誠（広島大歯），瀬川彰久（北里大歯），丸山芳夫（自治医大），福士靖江，泉井　亮，（東北大医），田隈泰信（東日園大），東　雅之（徳大歯），榎本浩一（島根医大），杉谷博士（日大松戸歯），今井雄介，中張隆司，中村明宏（阪医大），斎藤禎隆（国療岩手病院），藤田尚男（シオノギ製薬研），石黒　洋（名大医），寺川　進，古家喜四夫，村上正隆，瀬尾芳輝，石川　透，上篠　篤（生理研）

【概要】

人間をはじめとする高等動物の栄養摂取，老廃物の排出機構は全て上皮性の細胞の物質輸送を介して行われる。唾液腺は本研究のモデル臓器として用いられ，近年，細胞膜の各種輸送体（ポンプ，キャリア，チャネル），受容体細胞内メッセンジャーが分子レベルで解析され，膜の物質輸送の分子機構が見えはじめた。今回のワークショップは，対象を唾液腺に限定し，生理学のみならず，生化学，解剖学，遺伝子工学などの多角的な視点から唾液分泌機構を捉えなおすことを目的に，若手研究者中心に７ヶ国より15名と国内研究者23名の研究者の参加を得て４日間の日程で行われた。組織委員会として，所外より D. I. Cook (Sydney), M. C. Steward (Manchester), 菅野義信（広島），杉谷博士（日大松戸）に参加いただき，招待講演者を選定した。

ワークショップでは，１）腺房細胞におけるレセプター／G蛋白／PLC連関，２）腺房細胞細胞内メッセンジャーの動態と分布，３）水輸送機構と経路，４）分泌諸相と形態変化，５）チャネル分子の特性と機能，６）輸送体間の共役とエネルギー連関，のテーマで28講演が発表された。今回の討論を通じて１）細胞内 cyclicAMP は燐酸化だけでなく ADP リボシレションを介し amylase 放出を起こすことが報告された。２）細胞内 Ca 調節機構として細胞外よりの流入と細胞内

Caストアの連関を討論した。3）水分泌を優位に起こすムスカリニック刺激は，細胞容積減少，空砲増大，管腔拡張等大きな形態変化を起こす，一方蛋白分泌を主に誘発するβアドレナージック刺激では開口分泌像は見られるものの管腔拡張，エンドサイトーシス等の大きな変化は観察されなかった。4）細胞容積減少，細胞内Na, K, Clの経時変化について検討され，細胞内ClとKの急速な脱出の後にNa流入が起こることが示された。5）唾液腺細胞の新たにクローン化された培養系についてその形態と機能が報告された，6）共輸送体の活性調節の解析戦術上，アンモニウムーパルス法の有用性が示された。

講演28題の発表抄録は本（120ページ）としてまとめられ，会議当日に配布された。大部になるため本年報には演題のみを掲載する。関連研究室にはできるかぎり送付したが，必要であれば連絡いただきたい。財政的には，生理研研究会及び磁気共鳴室ワークショップ開催費を中心に，文部省科研費，ブリテッシュカウンシルの援助，また，杏林薬品，鳥居薬品の協力を得て開催することができた。ここにあらためて深謝します。

15. 第9回磁気共鳴装置共同利用実験ワークショップ

1993年3月8日午後1時より3月9日午後4時30分まで

3月8日（月曜日）

13時00分：開会

13時10分：**教育講演： F-19 NMRの医学生物学への応用**

1．金沢洋子（九州大学，薬理学部）

Metabolism of FDG

2．楠岡秀雄（大阪大学，医学部，バイオメディカル部門）

F-19 NMRによる心筋細胞内カルシウムイオン濃度の測定とその応用

3．Dr. Ute Ammer (Visiting researcher from Max-Planck Institute in Frankfurt)

^{19}F NMR spectroscopy in the study of organic acid excretion by rat kidney.

4．Dr. C. Malet-Martino (Fac. of Science, Univ. of Paul Sabatier, Toulose)

Metabolish of Fluoropyriuidines Moivifored by ^{19}F NMR

3月9日（火曜日）

9時00分：1992年度共同利用実験研究報告および1993年度計画

2-1. 恵良聖一（岐阜大学・医学部・生理）

生体組織の水構造及びエネルギー代謝の研究

2-2. 曽我美勝（藤田保健衛生大・衛生学部・生理）
生体組織の水構造：交差緩和時間イメージングの基礎的研究
2-3. 松波謙一（岐阜大学・医学部・反射研）
磁気共鳴装置使用（日立，2.1T）によるネコ，ヒトでの脳血管での血流測定
3．福岡宗良（名古屋市立大学・医学部・整形外科）
MRI によるラット脊髄圧迫の研究
11. 肥塚　泉（大阪大学・医学部・耳鼻科）
ヒト内耳の MRI
1．楠　真琴（日本大学・医学部・生理）
サル大脳皮質の非破壊的観察と脳定位記録への応用
8．三上章允（京都大学・霊長類研）
サル大脳皮質連合野の機能地図作製のための基礎研究
4．佐藤篤司（名古屋市立大学・医学部・外科）
急性上腸間膜動脈閉塞再灌流時の小腸エネルギー代謝の検討
7．平川和文（神戸大学・教養部）
骨格筋のエネルギー代謝に対するトレーニング効果の NMR による研究
12. 吉田敬義（大阪大学・健康体育部）
筋エネルギー代謝の長距離走者と短距離走者の比較
9．成瀬昭二（京都府立医科大学・放射線科）
MRS および MRSI による脳神経疾患解析のための基礎的研究
10. 日下義章（京都府立医科大学・整形外科）
椎間板圧迫時の粘弾性変化に伴う水分子の動態の NMR による解析
13. 金沢洋子（九州大学，薬学部）
NMR による含フッソ薬品体内動態の無侵襲追跡
5．村上正隆（生理研）
多核種核磁気共鳴法による水，電解質輸送の解析
6．瀬尾芳輝（生理研）
核磁気共鳴法による細胞内水，電解質の動的挙動の解析

13時00分：1993年度共同利用実験打ち合せ
14時30分：実機測定実習

第 9 回磁気共鳴装置共同利用実験ワークショップ

【概要】

1992年度の磁気共鳴装置共同利用実験研究成果を検討し，1993年度の実験研究計画を打ち合せ

るために，1993年３月８日，９日の両日第９回磁気共鳴装置共同利用実験ワークショップを行なった。また，新規に共同利用実験に参加される研究者を対象に，安全教育，MRI 及び MRS 測定等の基本実習を行なった。

今回は，最近，発展めざましい，F-19 NMR の医学生物学への応用について，金沢洋子（九州大学・薬学部），楠岡英雄（大阪大学・医学部），Dr. M. C. Malet-Martino (Univ. Toulose, IMRCP Lab.) の３人の研究者が，それぞれの専門分野から，教育講演を行ない，弗素化化合物を用いた薬物代謝研究，弗素化プローブを用いた細胞内 Ca 動態の研究について討議を行なった。

【討論参加者】

Ammer U (Max-Planck-Inst, Frankfurt), 惠良聖一，松波謙一，桑田一夫，中村浩二，川島　卓（岐阜大・医），楠岡英雄，肥塚　泉（大阪大・医），吉田敬義（大阪大・健康体育），曽我美勝，中上　寧，高崎昭彦，江尻和隆，梶原孝彦（藤田保衛大），富田寿人（静岡理工大），安田好文（豊橋技科大），横野　諭（香川医大），高石鉄雄，福岡宗良，桑原義之，佐藤篤司，木村昌弘（名古屋市立大），金沢洋子，馬屋原慶子（九州大・薬），渡部徳子（東京水産大），楠　真琴（日本大・医），吉崎和男，日下義章，早野尚志，藤岡幹浩，植村　理（京都府立医大），加藤一夫（稲沢市民病院），三上章充（京都大・霊長研），平川和文（神戸大・発達科学），塚田秀夫，安藤一郎（浜松ホトニクス），伊島理枝子（日本電子），入口紀尾（シーメンス朝日メディテック），村上政隆，瀬尾芳輝，石川　透（生理研）

【 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〕

1．三次元培養法を用いた糸球体細胞の機能と形態（追手　巍他）…… 284
2．血管内皮細胞の vesicle の発達に及ぼす血流ずり応力の影響
（吉田洋二他）…… 285
3．培養細胞全載固定組織化学的染色標本における細胞小器官の立体観察と
雰囲気試料室による新鮮培養細胞の生体観察（永田哲士他）…… 286
4．YAG-TV 撮像系による電子線強度測定精度に関する研究
（神谷芳弘他）…… 288
5．小腸上皮における細胞極性とゴルジ装置の局在との関係
（野田　亨）…… 289
6．培養グリオーマ細胞の細胞骨格に及ぼす各種成長因子の影響に関する
免疫電顕立体観察（垰本勝司他）…… 290
7．LPS 抗原投与後のラット白脾髄に出現する鉄含有 Macrophage の
形態的研究（栗井通泰他）…… 292
8．超高圧電子顕微鏡による Trypanosoma evansi の研究
（比留木武雄他）…… 293
9．肥満細胞からの脱顆粒機構の解明（赤木正明他）…… 294
10．肝細胞ネマトライソゾームの立体分布（荒木伸一他）…… 295
11．網膜外網状層における色弁別に関わる細胞構築（橋本葉子他）…… 296
12．ウマズラハギ網膜における水平細胞―視細胞間結合（河又邦彦他）…… 298
13．騒音によって生ずる蝸牛有毛細胞の障害の観察（鎌田　勉他）…… 299
14．分泌細胞及び肝細胞の細胞骨格系の超高圧電子顕微鏡観察
（佐々木貞雄他）…… 300
15．細胞内へのリガンド取り込み過程に関する細胞化学的検討
（平野　寛他）…… 302
16．胞子形成における細胞質の立体構造の解析（石川依久子他）…… 303
17．植物培養細胞中のアクチン線維の超高圧電子顕微鏡観察
（谷口美恵子他）…… 304

1．三次元培養法を用いた糸球体細胞の機能と形態

追手　巍，清水不二雄（新潟大・医・腎研・免疫病態）
有井達夫（生理研）

私どもは腎糸球体培養細胞を電顕メッシュ上で培養し，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。本年度は前年度からの継続で，糸球体メサンギウム細胞と血管内皮細胞の平面上での混合培養を行い，両細胞の接着部位について検索してきた。特に，in vivo に投与すると，ラット糸球体メサンギウム細胞表面で，糸球体内皮細胞との接着部位に特異性を示す単クローン抗体を用いてその対応エピトープの局在を検討した。また細胞外基質ゲル（コラーゲン・タイプⅠゲル，マトリゲル）内でメサンギウム細胞と血管内皮細胞を三次元培養し，その増殖能を調べた。超高圧電子顕微鏡による両細胞の超微形態所見を観察する前段階として，光顕，免疫組織学的に検討した。

【方法】

ラット・メサンギウム細胞の培養：既報（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：既報（生理学研究所年報 11：274, 1990）のごとく，臍帯静脈よりトリプシンを用いて採取した。三次元培養法：コラーゲン・タイプ1ゲル，あるいはマトリゲル上にメサンギウム細胞，血管内皮細胞をそれぞれ単独，あるいは混合して培養すると，ゲル内に浸入して3次元的に培養される。この材料を2％パラホルムアルデヒド液で固定し，しょ糖含有 PBS で洗浄した後，急速凍結した。10μm の凍結切片を免疫染色し，光顕レベルで反応の特異性，両細胞の形態像を観察した。一部はエポン包埋し，1μm の切片を作製し，超高圧電子顕微鏡で観察した。使用した抗血清は，ウサギ抗－第8因子，エンドセリン抗体，抗－平滑筋αアクチン，ビメンチンマウス単クローン抗体，上述の1－22－3マウス単クローン抗体である。

【結論および考察】

1）メサンギウム細胞はコラーゲン・タイプⅠゲル内では，細長い両極性の細胞像，マトリゲル内では一旦，細胞凝集塊（コロニー）を形成後，細胞突起を伸展させ連結する所見を呈した。2）血管内皮細胞はゲル内で索状構造物（微小血管様）を形成後，細胞突起を伸展させ連結する所見を呈した。2）血管内皮細胞はゲル内で索状構造物（微小血管様）を形成した。3）血管内皮細胞をゲルに播種し，1－2日後にメサンギウム細胞を播種，混合培養すると，メサンギウム細胞が血管内皮細胞の索状構造物にまとわりつく所見が得られた。4）三次元培養細胞の電顕観察は細胞採取，細胞構造の保持に問題があり未だ満足する結果をえていないが，光顕レベルでは，上述の抗体で免疫染色可能であり，両細胞の識別もできる。5）メサンギウム細胞は内皮細胞との混合培養，マトリゲル内での培養でその増殖が抑制された。一方コラーゲン・タイプⅠゲル内では増殖抑制は認められなかった。生体内ではメサンギウム細胞は血管内皮細胞，細胞外基質（基底模様物質）と常に接触し，増殖率の低い静的な状態にある。このことは三次元培養法はより

in vivo に近似した細胞動態を示していると考えられる。

2．血管内皮細胞の vesicle の発達に及ぼす血流ずり応力の影響

吉田洋二，王　　速，岡野光志（山梨医大・第一病理）
有井達夫（生理研）

粥状硬化は動脈の分岐部や湾曲部など血流の底ずり応力領域に好発する。この部位の内皮細胞の透過性は高ずり応力領域に比較して高いが，その物質透過の機構は十分明らかにされていなかった。そこで本研究を行なった。

【材料と方法】

白色ウサギ（雄，体重2.0－3.0kg）4羽に固形食（RC-4, オリエンタル酵母），2羽に高脂肪食 (1%cholesterol と 5%lard を含む RC-4) をそれぞれ 100g/羽/日を2週間ずつ与え，飼育期間終了後，深麻酔下に 2.5% glutaraldehyde/0.1M phosphate buffer (pH7.4, PB) を灌流し（約 110mmHg），大動脈を固定した。大動脈を摘出し，腕頭動脈と左鎖骨下動脈分岐部を切り出し，1%osmium-1%tannin acid-1%osmium/0.1M PB (OTO 法) の順に浸漬，後固定した。内皮細胞 channel を調べるために，上述灌流固定法で固定した大動脈内に HRP (TypeII, 6mg/ml, 0.01MPBS, pH7.2) を4分間，15分間灌流し，DAB で発色した後，1%osmium で後固定した。Epon812 に包理した試料を0.2，0.5，1μm 厚に薄切し，U-Pb 染色を施し，H-1250M 型超高圧電子顕微鏡 (HITACHI) で観察した。

【結果】

健常大動脈弓の上記分岐部分流部の内皮細胞を観察すると，leading edge（動脈硬化が発生しにくい高ずり応力領域）の内皮細胞は扁平で細長く，vesicle は内腔面と基底面に集まり，細胞間接合部には，tight junction が内腔面から基底面にかけて長い範囲にわたり形成されていた。HRP を注射し，15分間灌流した動脈においても HRP で標識された vesicle や channel, 細胞間接合部は認められなかった。

一方，分流部の shoulder（動脈硬化を発生しやすい低ずり応力領域）の内皮細胞は内腔にやや隆起し，vesicle は細胞質周辺部に集中する傾向がある。tight junction の長さは高ずり応力領域のそれよりも短く，gap junction が増加した。HRP で標識された vesicle や細胞間接合部は増加していた。しかし明らかな channel は確認できなかった。

高脂肪食を投与して2週後，低ずり応力領域の内皮細胞の vesicle は癒合する傾向に有り，数個の vesicle は互いに相接していた。細胞間接合部は拡大していた。高ずり応力領域の内皮細胞は健常動物のそれとほぼ同様であった。

【まとめ】

低ずり応力領域の内皮細胞は vesicle の分布と密度，細胞間接合部の構造が高ずり応力のそれと異なり，vesicle, 細胞間接合部を介して透過性が亢進していることが示唆された。

3．培養細胞全載固定組織化学的染色標本における細胞小器官の立体観察と雰囲気試料室による新鮮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）

培養液の中に沈めた電顕メッシュの上に細胞培養を行い，培養細胞が電顕メッシュの上に単層培養された後に，固定，組織化学的反応，臨界点乾燥して，培養細胞全載固定組織化学的染色標本を作製し，超高圧電顕で観察すると，細胞小器官の三次元構造を立体的に観察することができる。我々はこの方法により培養線維芽細胞の飲作用小胞[1)]，培養肝細胞のペルオキシゾーム[2)]，

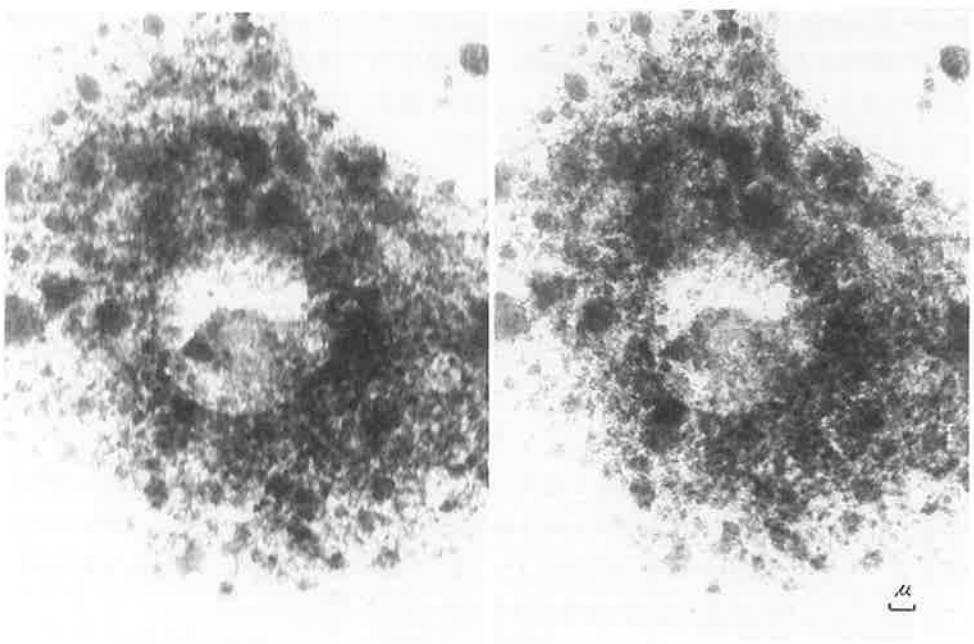


図１．ラット肝細胞培養全載標本。L15 培養液で48時間培養。G-6-Pase 反応，DAB 反応，臨界点乾燥，ステレオペア。中央に核が位置し，その周辺に高電子密度の小胞体が取り囲み，さらに DAB 陽性のペルオキシゾームが細胞質に散在する。

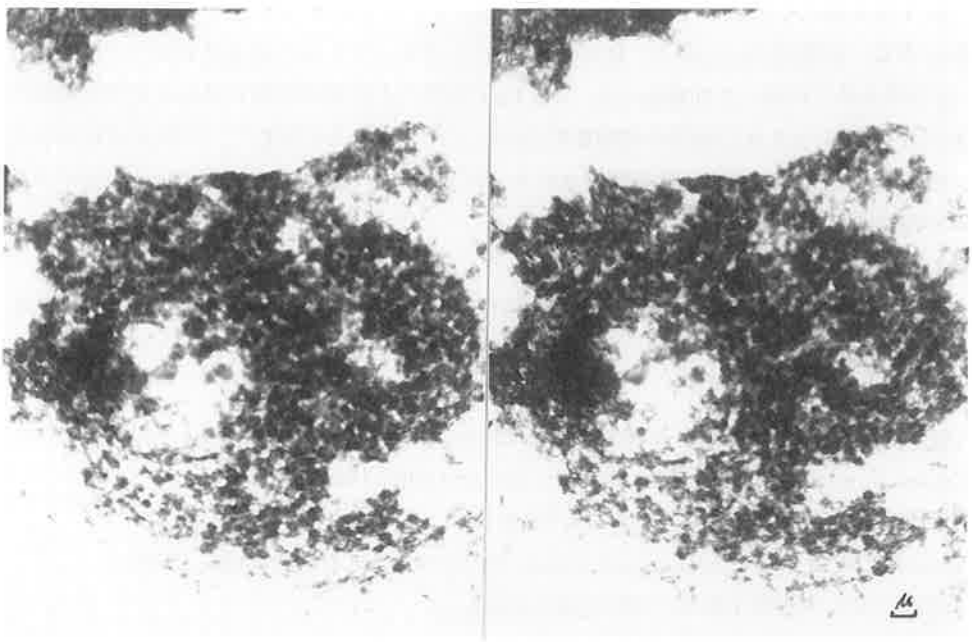


図２．ラット肝細胞培養全載標本。Bezafibrate 添加培養液で48時間培養。G-6-Pase 反応，DAB 反応，臨界点乾燥，ステレオペア。小胞体が核の周辺を取り巻き，その周囲には DAB 陽性の多数のペルオキシゾームが散在する。

ゴルジ装置[3]，水解小体[4]，糸粒体[5]等について報告した。今回は培養細胞の小胞体を酵素組織化学的に glucose-6-phosphatase 活性 (G-6-Pase) を染色し立体的観察を行った結果について報告する。

【材料及び方法】

培養肝細胞は，成熟雄 Sprague-Dawley ラットの肝臓をコラゲナーゼ灌流法で分離し，Leibowits L-15 培養液に分散して，初代培養を行って得られた。超高圧電顕観察用には，フォルムバール支持膜を張り，コラーゲン被覆した金メッシュを Petri dish の底に沈めて，その上に分離肝細胞を載せて静置し，単層培養を行った。培養48時間後に培養液を交換し，0.5mM pezafibrate を加えさらに48時間培養した。対照としては無添加正常培養液で同時間培養した。両群共にグルタルアルデヒド前固定，G-6-Pase (Wachstein Meisel) 反応，DAB 反応 (Angermuller-Fahimi) を行い，四酸化オスミウム後固定，脱水臨界点乾燥して試料を作製した。これらの試料は日立 H-1250M（生理研，1000kV）で観察し，同一視野を±8°傾斜して写真撮影し，ステレオペアを作成して立体観察した。

【結果及び考察】

G-6-Pase 反応は，ラット初代培養肝細胞の細胞質中に，電子密度高い回転楕円体または不規

則な扁平嚢状の小器官として認められ，核の周囲を取り巻いて散在し，形態及び局在性から小胞体に一致すると考えられる（図１）。小胞体の周辺には，G-6-Pase より電子密度のやや低い微細な顆粒が多数，細胞質内に分散し，DAB 陽性のペルオキシゾームと同定された。一方，bezafibrate 添加培養液で培養した肝細胞では，G-6-Pase 陽性の小胞体の形態と局在は正常培養液の場合と変化ないが，DAB 反応陽性の微細顆粒のペルオキシゾームが増数し，小胞体の周囲を取り巻き，細胞質中に充満している像が観察された（図２）。これは bezafibrate により，ペルオキシゾームが増数した結果である。

【結論】

培養ラット肝細胞を G-6-Pase 反応により小胞体，DAB 反応によりペルオキシゾームの染色を行い，超高圧電顕で立体観察して，三次元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, XIth Inernat. Cong. Electr. Microsc., II : 1183-1184, 1986.

２）Nagata, T. et al. : J. Clin. Electr. Microsc., 20 : 681-682, 1997.

３）永田哲士他：生理研年報 9 : 473-474, 1988.

４）Nagata, T. et al. : Proc. XIII Inernat. Congr. Electr. Microsc. II : 184-185, 1990.

５）永田哲士他：生理研年報 13 : 283-2285, 1992.

４．YAG-TV 撮像系による電子線強度測定精度に関する研究

神谷芳弘（豊田工大）

有井達夫（生理研）

GATAN 製の YAG-TV の動作特性については昨年度すでにかなり詳細に報告した。まず空間分解能については直径 10μm の絞りを YAG 結晶の上に置きその TV 像から決定した。その結果は加速電圧に多少依存するが大体 60μm になり，分解能を決める要因は YAG 結晶の厚さによることが分かった。結晶が薄いとシンチレーションによる光量が弱く，厚いと分解能が劣化すると相矛盾する性質をもっている。次いで入射電子流に対する線形性，検出効率について測定し，ダイナミックレンジはそれほど広くないが動作パラメータを適当に選ぶことで実際上広範囲に使用でき，検出効率 DQE もかなり高い事が分かった。

これらの実験結果を理解するため電子の YAG 結晶中での散乱を電子計算機によるモンテカルロ法によるシミュレーションを大阪工業大学小寺正敏助教授の協力を得て行った。計算結果で YAG 結晶中での電子散乱の様子が一目で分かるようになり，加速電圧が 200kV 以下では電子は YAG 結晶（厚さ 100μm）中で止まり，電子の全エネルギーが吸収される。そのため発生する光量は入射電子のエネルギーに比例し，DQE も1.0に近い高い値になる。一方，200kV 以上の

エネルギーの電子では結晶を通過する電子が生じ，結晶中でのシンチレーション光の強度も減少し加速電圧 200kV で最大の光量を与える。この場合には，DQE も1.0より減少する。このシンチレーションの減少を補うために厚め結晶が用いられているが計算機の結果から判断するとそれほど得策ではないようにみえる。また，結晶中の電子の広がりも同様に分析の結果，加速電圧が200kV 以下であれば電子の散乱による広がりは加速電圧とともに大きくなるが 200kV 以上では逆に散乱による広がりが小さくなる。しかし実際の空間分解能が加速電圧にあまり依存せずほぼ一定になっているので，空間分解能には電子散乱のみならず結晶の厚さも重要な因子になる事も分かる。

シンチレーションの性質はまた YAG 結晶をシンチレーターとしたシンチレーション・カウンターの性能を調べることでも研究することが出来る。この方法で検出効率や光量などの性質が分析できる。この実験結果と計算機シミュレーションの結果とを総合して，撮像系の諸性質をほぼ完全に理解することに成功した。

5．小腸上皮における細胞極性とゴルジ装置の局在との関係

野田　亨（京都大・医・解剖第二）

小腸上皮は微絨毛をもつ頂上部，細胞間結合装置を有する側部，そして基底膜と接する基底部細胞と明確な細胞の極性をもった数種の細胞から構成されている。ddY 系正常マウスに 0.35-0.7mg/100g のコルヒチンを投与すると，１～２日後に上皮内に巨大な空胞状構造を持つ吸収上皮様細胞が出現する。電顕による超薄切片観察，および超高圧電顕による厚切り切片観察によって以下のことが明かとなった。この空胞は吸収上皮細胞の頂上膜に見られると同様の微絨毛により縁どられているが，その内腔に内容物が充満している点で通常の頂上膜と区別された。またこの空胞を構成している形質膜が連続しているもの（全く細胞間連合装置が観察されないもの）か，二つの細胞の形質膜によるもの（二ヶ所において細胞間結合装置が見られるもの）の二種類がより多く観察された。したがって，この空腔は通常の細胞頂上膜とは異なり，一つの細胞の内部であって，形質膜とは全く連絡を持たない細胞内空胞であるか，あるいは，隣り合った二つの細胞の側部に頂上膜に相当する構造が新しく形成され，かつその部位が他の側部形質膜から細胞間結合装置によって隔絶されているかのいずれかである可能性が考えられた。この様な空胞の微絨毛には ALPase 様酵素活性が他の細胞の微絨毛と同様に見られたが，この特異な空胞を持つ細胞の真の頂上膜は検出困難であり，細胞全体の形態の詳細を明らかにできなかった。Zinc-Iodide Osmium 染色によって可視化したゴルジ装置の局材は通常の吸収上皮細胞では核上部付近に観察されるが，このような細胞においては，むしろこの空胞の周囲の細胞質に集塊となり，その多くは渦巻き状に変形しているものが多く観察されたが細胞全体におけるその局性も今後の課

題として残った。

6．培養グリオーマ細胞の細胞骨格に及ぼす各種成長因子の影響に関する免疫電顕立体観察

埒本勝司（兵庫県立成人病センター・脳神経外科）
浜　　清，有井達夫（生理研）

【実験目的】

培養グリオーマ細胞にたいして TGF-α以外の成長因子が，細胞骨格特に中間系フィラメントの形態に及ぼす変化を免疫電顕で立体観察すること。

【実験方法】

株化された悪性グリオーマ細胞 U-251MG, U-87MG を用いて，無血清培地に移した後 FGF,

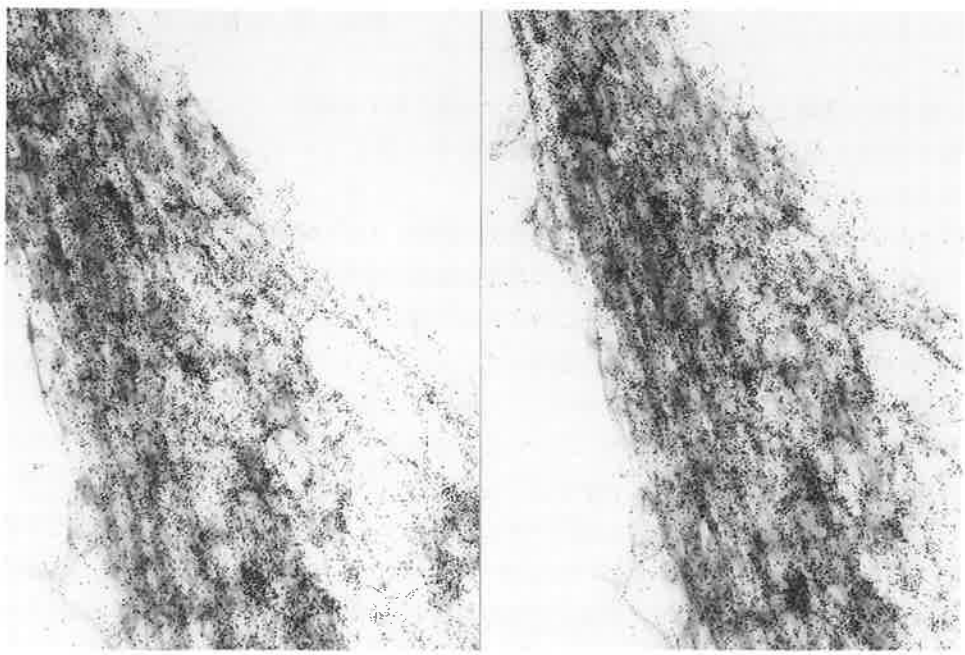


Figure 1 (X22,000)
Stereo-pair of high voltage electron micrograph of U-251 MG cell treated with FGF. Intermediate filaments of GFAP were labeled with gold colloid particles.

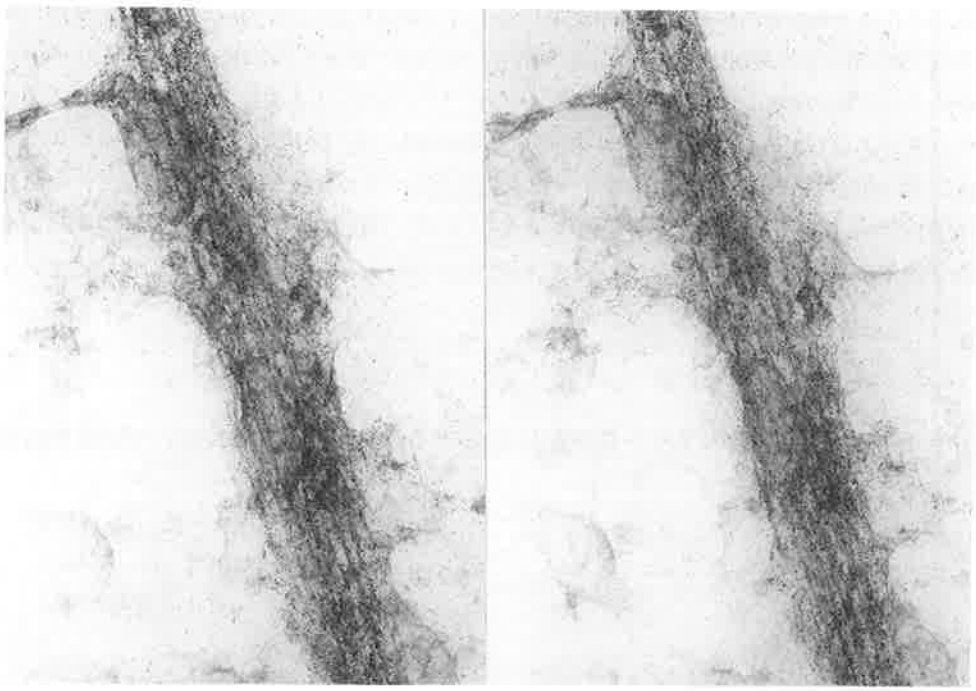


Figure 2 (X10,800)
Stereo-pair of high voltage electron micrograph of U-87 MG cell treated with PDGF. PDGFR, labeled with gold particle, were scattered throughout the cell surface.

PDGF （Oncogene 社）を 1 μg/ml, 10 μg/ml の濃度で24，48時間作用させた。その後，各細胞をサーモノックス板に培養した後，一つは抗 FGF receptor, PDGF receptor の monoclonal antibody を，もう一つは培養細胞を Triton-X 処理後中間系フィラメントである GFAP, Vimentin 抗体を作用させ，金コロイド標識二次抗体で処理し，免疫染色をおこなった。電顕二重固定したのちアセトン系列で脱水し，続いて臨界点乾燥した後カーボン蒸着し，岡崎国立生理学研究所の日立 H-1250M 型超高圧電子顕微鏡で立体観察をおこなった。コントロールとしては成長因子を添加しない無血清培地のみとした。

【結果および考察】

U-251, U-87MG 細胞は共に無血清培地では突起を長く延ばした状態になり，細胞増殖速度が低下するが，この時点で FGF を 1 μg/ml, 添加すると再び増殖能が高まり，核も小型で heterochromaitin に富み，細胞質はやや厚みを増したが 10 μg/ml の濃度ではむしろ増殖は抑制された。一方 PDGF では増殖は濃度依存性に高まる傾向が認められ特に S～G2M 期には FGFR, PDGFR の発現が強かった。この時点の細胞は厚さが 5 ミクロン以上となることが多く，細胞質の内部を十分観察することが困難なため，Triton-X で約25～35秒間処理し，細胞膜を部分的に

破ることにより細胞質内の細胞骨格が明瞭になりよく観察できた。U-251MG の細胞骨格に対する FGF の作用は前回検討した TGF-α より弱く，Ruffle の発現も少なかった。FGF10 μg/ml 添加時の U-251MG 細胞における抗 GFAP モノクローナル抗体による免疫電顕では反応する中間系フィラメントはむしろ部分的に少ない傾向を認めた (Fig. 1)。抗 PDGFR 抗体を用いた免疫電顕では U-87 細胞のＳ期において金コロイドは細胞膜表面にかなりびまん性に分布していたが (Fig. 2), 中間系フィラメントに明らかな変化は認めなかった。PDGF の中間系フィラメントに関する生物学的意義に関しては明確ではなくむしろ細胞膜上の Receptor を介しての作用が大きいと考えられた。

7．LPS 抗原投与後のラット白脾髄に出現する鉄含有 Macrophage の形態的研究

粟井通泰（岡山大・医・第一病理）
小野俊朗（岡山大・医・寄生虫）
有井達夫（生理研）

前回までに，私達はリポ多糖 (LPS) 投与によって惹起される免疫反応に伴って，脾臓白脾髄 marginal metallophil (MM) 内に出現する鉄顆粒，及び含鉄リソソームの特徴を超高圧電子顕微鏡を用いて立体観察した。本年度は，免疫成立に関与する鉄の意義を解明する目的で，MM 内の鉄顆粒の存在状態，及び細胞の超微形態変化について，詳細に検討を加えた。今回は，さらに，マラリア感染ラットを作成し，ここではさらに激しい感染免疫応答が惹起されるが，このときの MM についても同様に観察し，LPS 投与の場合と比較検討した。

【材料と方法】

雄性 Lewis 系ラット（６週齢，Pathogen free）に LPS (Salmonella minesota R595, Re) 250 μg を一回静注後，経時的に動物を屠殺した。脾臓を摘出し，２％グルタールアルデヒド－２％パラフォルムアルデヒドで固定，1%OsO_4 で後固定後，定法通り脱水し，Epon 樹脂に包埋した。またこれとは別に，*Plasmodium berghei (P. bergei)*(NK 65 strain) 感染赤血球 1 ×10^6個を腹腔内に注射して，マラリア感染ラットを作成し，同様に脾臓組織を固定，脱水，包埋した。また，定法通り超薄切片を作成し，通常の透過電顕観察も行なった。

【結果と考察】

LPS 投与６日後より MM 中には細管状の含鉄リソソームが出現し，これらは互いに複雑に連続していた。MM は紡錘状の胞体を放射状に伸ばし，周囲にはリンパ球の集簇が観察された。この所見は前回と同様であった。ところが *P. berghei* 感染ラットでは激しい感染免疫反応が惹起され，白脾髄の構造は著しく乱れていた。透過電顕観察によると MM は増殖し，細胞形態も著しく乱れ，細胞質中には多数の含鉄リソソームが観察された。MM の周囲にはリンパ球がロゼット

様の配列をして，すきまなく接しているのが特徴的であった。超高圧電子顕微鏡によると，MMとこれらリンパ球との間には密接な細胞間相互作用が存在することが確かめられた。しかし，白脾髄の構造が著しく乱れていることから，これらMMとリンパ球，あるいは片縁帯マクロファージとの詳細な相互関係については組織化学的，免疫組織化学的手法を行なったうえで，さらに検討することが必要であると考える。

8．超高圧電子顕微鏡による *Trypanosoma evansi* 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】

本研究は前年度に引き続いて，普及型透過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超高圧電子顕微鏡(H-1250M)を用い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】

今年もなお，目的とする三次元構造の解明に結び付く超高圧電顕の観察条件を首尾良く整えることが出来たとは言えず，従って，一般の電子顕微鏡での観察結果を凌駕する程の知見を得ることは出来なかった。ただ，これまで未発表ではあるが，一般の電顕である200CXで，長径0.6μ短径0.4μの楕円形の物体がこの原虫の細胞膜とその下のSubpellicular microtubules (SM)を圧迫して，それらを細胞内の方向に陥凹させる像が観察されていた。なお，同一の切片で，SMの直下の位置にも同様の物質が観察されていた。同様な所見が超高圧電顕でも観察された。その物質が何であるかによって，解釈と意義が異なるが，この原虫のEndocytosisおよびExocytosisの行われる部位は専ら，Flagellar pocket (FP)部分であると一般に考えられているので，明白に「FP以外の部位」で認められた，物質のtransportを示唆する上述の所見は，当該原虫では，きわめて意義のある所見と考えられる。この原虫にも，他のeukaryocytesと同様に，普通の細胞膜部位を介する物質の取り込みがあってもおかしくはない。

【文献】

1．Hiruki, T. Zentb. Bakt. Hyg. A., 264 : 392 (1987)

9．肥満細胞からの脱顆粒機構の解明

赤木正明（徳島文理大・薬）
有井達夫（生理研）

Ⅰ型アレルギー反応に重要な役割をはたしている肥満細胞は，種々な遊離刺激により chemical mediators を遊離するが，その遊離に細胞骨格系が関与していることを著者らはすでに報告している。肥満細胞の細胞膜裏打ち部分や顆粒間隙に多数のアクチンフィラメントや微小管や中間径フィラメントが存在し，それらのネットワークが細胞内顆粒の保持や放出に大きく関与していることを示唆する結果をすでに得ている。しかし，今まで用いた方法は，いずれも細胞膜を界面活性剤処理などの何らかの手段により除去することが不可欠であった。そこで，我々は細胞膜除去の必要のない超高圧電子顕微鏡を用いる方法により，種々な遊離刺激剤を作用させた後の肥満細胞の細胞内微細構造を，より生理的な状態で観察する目的で実験を行った。

【実験方法】

ラット腹腔より採取し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 medium 中で37℃，4時間培養した後に，compound 48/80 0.2 μg/ml あるいは KO_2 10mM 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分間固定し，飽和酢酸ウラニルで染色を行った。脱水，臨界点乾燥の後，日立 H-1250M（生理研，1000kV）超高圧電子顕微鏡で観察した。

【結果と考察】

肥満細胞内部には細胞骨格の複雑なネットワーク構造が観察され，顆粒間隙を埋めるように存在し，顆粒を保持していることが確認された。顆粒は顆粒膜により覆われ，内容物と顆粒膜との間には間隙が存在した。その間隙は，脱顆粒刺激を受けた後の細胞でより顕著であった。この間隙は，以前に報告されている脱顆粒刺激後の顆粒内への水の流入により拡大したものであることが推定される。さらに，細胞外に脱出した顆粒も同様に膜により包まれており，細胞外で膜から内容物が脱出する様子や顆粒が脱出した後の膜の断片も多数観察された。また，走査電顕で以前に観察していた脱出した顆粒の microvilli への接着が，超高圧電顕的にも確認された。このことは，microvilli の一つの役割を示唆している。これらの観察結果は，使用した遊離刺激剤が違っても同様であり，これらのことは，脱顆粒の最終段階はすべて同じであることを示唆している。また，脱顆粒反応が誘発された際に LDH 遊離がないことや，脱顆粒後に細胞内に顆粒膜が残っていることは超薄切片の透過電顕像で観察している。従って，以上の結果より，顆粒が2重の被膜で覆われていることは確実であると考えられる。

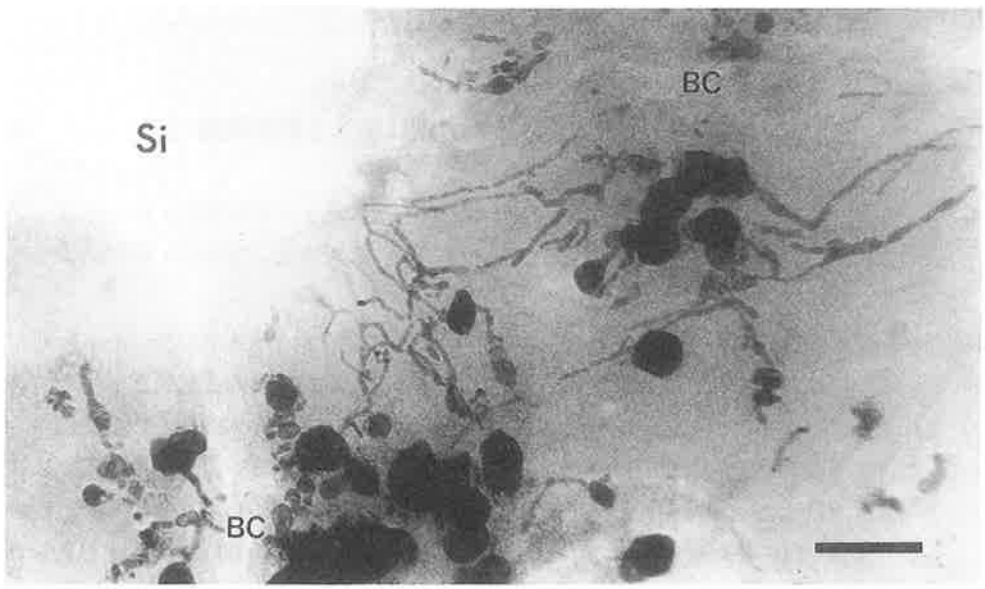
10. 肝細胞ネマトライソゾームの立体分布

荒木伸一，高島庸一郎（愛媛大・医・解剖第一）
有井達夫（生理研）

近年，マクロファージをはじめ種々の細胞において，酸性ホスファターゼ(ACPase)活性陽性の長桿状ライソゾーム（ネマトライソゾーム）が存在することが明らかとなった。今回の研究では，肝細胞ネマトライソゾームの機能と構造の解明を目的として，ネマトライソゾームの細胞内分布，立体構造，微小管依存性，細胞内輸送系としての役割について，超高圧電顕等を用い検索した。

【材料と方法】

ウイスター系ラットの肝を2%PFA, 0.25%GLA混液にて灌流固定，50μm未凍結切片を作成し，ACPase活性をGomori法により細胞化学的に検出した。樹脂包埋後，1-5μm厚の切片として超高圧電顕H-1250M等で，ステレオ立体観察を行った。また，微小管依存性を調べる目的で，コルヒチン（2mg/kg体重）をラット腹腔内に注入し，微小管の状態変化を免疫蛍光法で観察するとともに，ライソゾームの立体構造の変化を上述の方法で経時的に観察した。さらに，西洋わ



正常肝細胞におけるACPase活性陽性のライソゾームの分布。
ACPaseを検出した肝組織を4μm厚の切片として超高圧電顕で観察，撮影した。Si：類洞，BC：毛細胆管，スケールは1μm

さびペルオキシダーゼ(HPR)をトレーサーとして腸間膜静脈から注入し肝細胞による取り込み，輸送の過程をDAB反応を行って電顕観察した。

【結果と考察】

正常肝細胞におけるライソゾームの分布は，球状のものは毛細胆管周囲に限局しているのに対し，径50-100nm，長さ数ミクロンのネマトライソゾームは，類洞側細胞膜直下から毛細胆管周辺ゴルジ域に向かって伸びており，時折，分岐，吻合を行って，細胞内全体に拡がるネットワークを形成している(写真)。コルヒチンを投与すると，8－12時間後，微小管は脱重合され消失し，同時にネマトライソゾームも分散して球状ライソゾームに変化した。24時間後には，微小管が再生され，ネマトライソゾームも再び現れ，正常のネットワークを形成してゆく。このことは，ネマトライソゾームの存在，健全な細胞内分布には微小管が極めて重要な役割を果たしていることを示している。

HRPをトレーサーとして，肝細胞による取り込みを観察すると，HRPは類洞側よりエンドサイトーシスされ，ネマトライソゾーム様構造物の中に取り込まれた。HRPをもったネマトライソゾーム様構造物は，ゴルジ装置の近傍にも出現し，類洞側より取り込まれた物質がこのネマトライソゾーム様構造により輸送されていることが示唆された。

以上の観察により，肝細胞ネマトライソゾームは，類洞側細胞膜直下からゴルジ域に向かって，微小管に沿って伸展或いは移動する細胞小器官であり，類洞から取り込んだ高分子を分解しながら輸送する“細胞内輸送系”とし機能している可能性が考えられる。

11. 網膜外網状層における色弁別に関わる細胞構築

日高　聡，橋本葉子（東女医大・第一生理）
大塚輝彌（生理研・神経情報）

脊椎動物網膜では，外界の色情報を赤・緑・青の三原色に分解する錐体視細胞はある配列分布を呈している。色弁別能を有する硬骨魚類の網膜の中には視細胞が規則的な配列を示すものがあるが，これまでにウグイ網膜を用いて視細胞の規則的な配列様式と色弁別機構との関係について調べてきた。視細胞の規則的な配列は錐体の外節部と内節部に見られるが，ウグイ網膜では複合錐体と単一錐体が畝状に交互に配列している。複合錐体は長錐体と短錐体の二つが密着した錐体であり，単一錐体とは明瞭に区別できる。これまでの解析から，錐体視細胞の内節部で見られる配列上の位置関係はそれらの軸索終末部でもそのまま保存されており，複合錐体の軸索終末も内節部における相互の位置関係をそのまま保っており，単一錐体の終末とは区別できる。このことから錐体視細胞は軸索終末部の相互の配置から，錐体の種類を形態学的に同定することが可能になった。そこで，錐体と二次ニューロン・水平細胞間の色情報変換の神経回路を解析する目的で，

細胞内記録，染色法から標識した三相性 (trichromaticity) 水平細胞の接触突起の立体構造を調べた。三相性の光応答とは，応答電位の極性が短波長領域で過分極，中間波長で脱分極そして長波長領域で過分極応答を示すものである。今回は，ビオチン複合物注入法によって標識された細胞の樹状突起の三次元構造が超高圧電顕下でどの程度のコントラストで観察できるか，さらに複合錐体と単一錐体が畝状に交互に規則的に配列するウグイ網膜上で，三相性水平細胞が結合する錐体の軸索終末の種類を同定することであった。

実験には暗順応したウグイ *(Tribolodon hakonensis)* から剝離網膜標本を用いた。記録電極内には 0.5M LiCl と 0.05M Tri 緩衝液，pH 7.6 に溶解した 6% Lucifer yellow と 6% biocytin (Horikawa と Armstrong, '88) を充填した。剝離網膜標本を Ringer 液中に浸し，視細胞側から記録電極を刺入して細胞内記録を達成した細胞から，20nm ステップでスキャンした 400nm から 720nm までの各波長の単色光に対する応答電位を記録し，三相性水平細胞の応答を確認後，電気泳動的に両マーカーを同時に細胞内に注入した。網膜組織を paraformaldehyde 固定した後，まず細胞の Lucifer 標識を蛍光顕微鏡下で確認し，次に biocytin の局在を avidin-biotin-HRP 溶液と反応後，Ni^{2+} , Co^{2+} 存在下 (Adams, '81) で diaminoventizine によって可視化した。標識水平細胞の形態を調べた後，網膜標本を重クロム酸カリウム，酢酸ウランとリンタングステン酸による三重ブロック染色を施し，組織処理を経てエポキシ樹脂に包埋した。網膜の側状方向に沿って 60 μm の厚さの水平断切片を作製して，光顕下で錐体の軸索終末部と標識水平細胞との間の接触の存在を確認後，厚さ 2 μm の水平断切片を作製して，超高圧電顕下で 1000kV で標識水平細胞の樹状突起と錐体の軸索終末部との間の結合形態を解析した。

Biocytin によって標識され，組織化学反応を経て可視化された水平細胞は，同等な細胞形態を示した幾つかの細胞群から構成されていた。これは，水平細胞はお互いにギャップ結合 (gap junctions) によって連結しているので，分子量 372Da の biocytin は注入した細胞からギャップ結合チャネルを通って近傍の水平細胞に拡散したことを示している。水平細胞間のギャップ結合は同種との間にのみ存在することが確認されている。図 1 は厚さ 2 μm の切片上で観察された，外網状層における標識水平細胞の樹状突起の走行と錐体の軸索終末との間の結合を示している。単一錐体の軸索終末部に標識突起が貫入している。次に，厚切り切片に連続して同一標本から超薄切片を作成して，標識突起と錐体の軸索終末との間の結合位置を観察した。図 2 は標識水平細胞と単一錐体との間の結合像である。標識突起の一部（矢印）は，synaptic ridge に直面して ribbon synapse 部の triad の中心位置を占めている。この像は，図 1 に示した両者の間の結合の立体構造の一つの断面像に対応している。今回の解析から，ビオチン複合物を注入した細胞突起の立体構造は，ゴルジ鍍銀された標本 (Hidaka 等, '86) ほどのコントラストを呈さないものの，超高圧電顕下で同定できた。キンギョ網膜では三相性錐体水平細胞は青感受性錐体と選択的に結合すると報告されていた (Stell と Lightfoot, '75)。キンギョの錐体視細胞は幾何学的な配列を示すが，その配列様式には規則性はないことが分かっており，キンギョでの報告にある青感受性錐体の同定は不充分であった。錐体視細胞が規則的に配列するウグイ網膜上では，錐体と水平細胞と

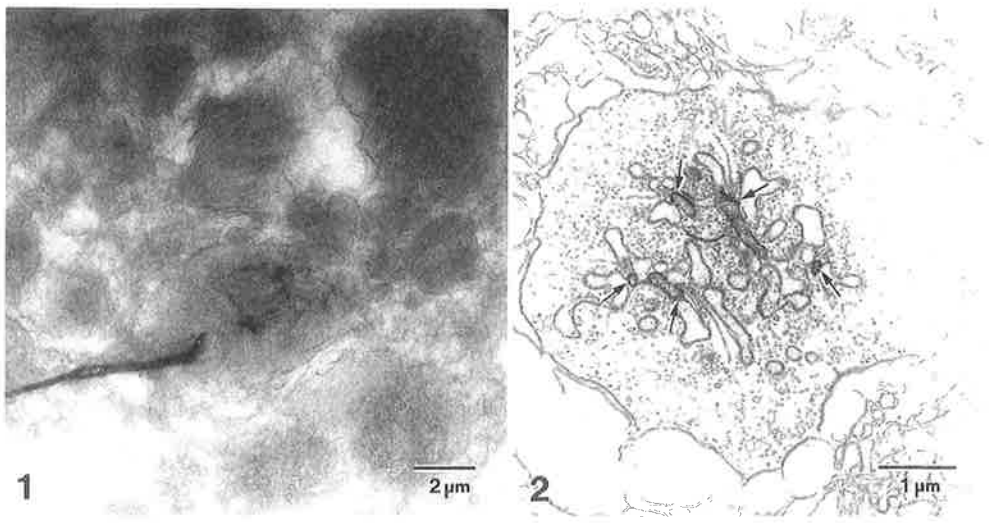


図１：Biocytin によって標識された三相性水平細胞と錐体視細胞間の結合。標識突起は配列した錐体の中で単一錐体の軸索終末に貫入している。厚さ２μｍの網膜水平断切片上での観察。

図２：単一錐体の軸索終末における三相性水平細胞の樹状突起の終末位置。標識突起は単一錐体の synaptic ridge に直面し，ribbon synapse の triad の中心位置を占める（矢印）。超薄切片上での観察。

の間の結合は一定の様式を呈していることが予想されるが，その様式の同定にはさらに解析を進める必要がある。

【引用文献】

Horikawa, K., and Armstorong, W. E. (1988) J. Neurosci. Meth. 25 : 1-11.

Adams, J. C. (1981) J. Histochem. Cytochem. 29 (6) : 775.

Hidaka, S., Christensen, B. N., and Naka, K. -I. (1986) J. Comp. Neurol. 247 : 181-199.

Stell, W. K., and Lightfoot, D. O. (1975) J. Comp. Neurol. 159 : 473-502.

12. ウマズラハギ網膜における水平細胞―視細胞間結合

河又邦彦（秋田大・教育）

脊椎動物網膜において，外界の光は錐体視細胞により赤・緑・青の三原色に分解され，さらに二次ニューロンにおいて赤－緑と黄－青の反対色的な色信号の対になる。この網膜における三原

色から反対色への色情報処理機構を解明するため多くの研究がなされてきた。現在最も有力な説は，キンギョ網膜の水平細胞－視細胞間結合を解析し，水平細胞から視細胞へのフィードバック信号によるとするフィードバック説である。

海産硬骨魚であるウマズラハギ網膜水平細胞の光応答と形態を調べたところ，ウマズラハギ網膜にはキンギョ網膜と同様に１種類のＬ型水平細胞と２種類のＣ型水平細胞があることがわかった。しかし，Ｃ型水平細胞の色光応答は，ほぼキンギョで観察されたものと同じであったが，Ｌ型水平細胞の色光応答はキンギョのそれと異なり青色光から緑色光にかけて極大を示した。このことは，ウマズラハギにはフィードバック説があてはまらないことを示す。そこでウマズラハギ網膜における三原色から反対色への変換のメカニズムを調べるため水平細胞を細胞内染色し，水平細胞－視細胞間の結合を超高圧電顕で観察することにした。ウマズラハギ視細胞は大変規則正しく配列しており，水平細胞－視細胞間の結合を調べるには大変よい材料である。しかしながら，ウマズラハギの状態がよくなかった事などもあり，水平細胞の細胞内染色は成功しなかった。このため今回は超高圧電顕で水平細胞－視細胞間の結合を立体観察するにはいたらなかった。

13. 騒音によって生ずる蝸牛有毛細胞の障害の観察

野田坂佳伸（北海道大・歯・中研）
東海林隆次郎，米澤　敏（愛知県コロニー発達障害研）
鎌田　勉，亀田和夫（北海道大・歯・生理）

騒音が蝸牛有毛細胞に与える影響について最近に至っても，モルモット，チンチラなどを材料として研究がなされている（例えば，Fredelius と Weisäll 1992, Cody 1992, Boettcher et al. 1992 など）。しかし，聴毛の脱落・有毛細胞の消失などの大きな変化は光顕あるいは走査電顕による観察で明らかであるが，有毛細胞に生ずる微細な変化については対照との比較において相異を見い出すことは必ずしも容易ではない。そこで本報告では騒音により正常動物に生ずる微細な変化の観察に先だって，遺伝的に聴毛の脱落・有毛細胞の退化消失が起ることが知られているマウスにおいて経時的にどのような微細な変化の後に聴毛の脱落などに至るのかを観察し，他方の対照とすることとした。

純系マウス CTA の中から行動異常を起すとして東海林によって分離されたマウス Bus は，この遺伝子をホモに有すると，生後10日前後より聴毛の脱落・有毛細胞の退化消失を起して，Apex にわずかの有毛細胞を残すだけとなる。また多動，回転の行動異常を伴う。そこで，観察材料として，Bus マウス成体のヘテロおよびホモ個体，全く聴覚異常のない KYF マウス成体，およびこれらの10－20日目の幼体を使用した。成体は灌流固定，幼体は再胞部位を切り出して，カルノフスキー固定液（グルタールアルデヒド・パラホルムアルデヒド）にて固定した後，同固

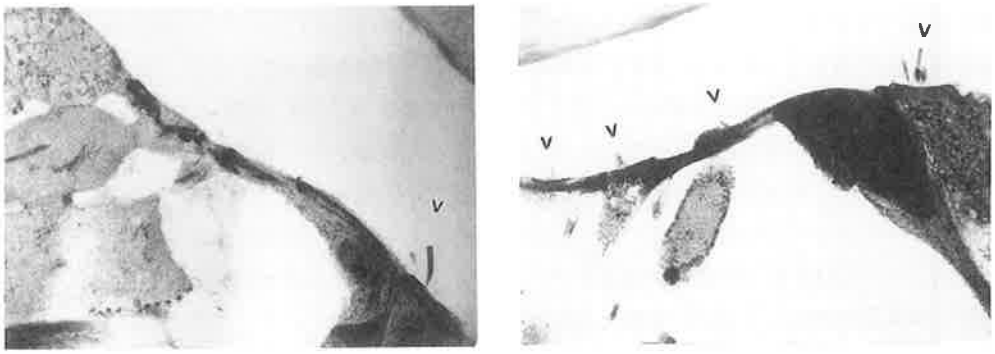


図１．マウス蝸牛有毛細胞。左：Bus ホモマウスのもので，内有毛細胞には聴毛があるが，外有毛細胞には聴毛がみられない。右：正常マウス(KYF)のもので，内有毛細胞・外有毛細胞ともに聴毛がみられる。(聴毛の部位にVマークをつけた)（1500倍）

定液に一昼夜保存した。走査電顕試料としてはエタノール系列脱水，臨界点乾燥，白金パラジウムコーティングを行い，透過電顕試料は 0.5M EDTA 脱灰，細切，エタノール系列脱水後，Quetol-812 に包埋した。切片をダイアモンドナイフにて１～２ミクロンに作成し，ウラン鉛二重染色後，1000kV 超高圧電子顕微鏡(H-1250M)にて観察した。

本報告書作成時点では，走査・透過電顕ともすべての観察を終っていないので，結論的なことは言えないが，Bus ホモマウス成体において，内有毛細胞の聴毛は残存しているが，外有毛細胞聴毛は見られないものがあった（図１）。Bus ホモマウスがすべて内有毛細胞の聴毛を残しているかについては，走査電顕での全蝸牛について検討を要する。さらに，発育過程を追って聴毛脱落に至る有毛細胞の微細構造を検討し，その原因を調べる予定である。

14. 分泌細胞及び肝細胞の細胞骨格系の超高圧電子顕微鏡観察

佐々木貞雄，堀　清記（兵庫医大）
中垣育子（大阪医大）
有井達夫（生理研）

哺乳類の生体にとって最も大きな，また活発な内分泌腺および外分泌腺である肝臓の実質細胞の細胞内小器官を細胞骨格との関連で立体的に観察しようとした。

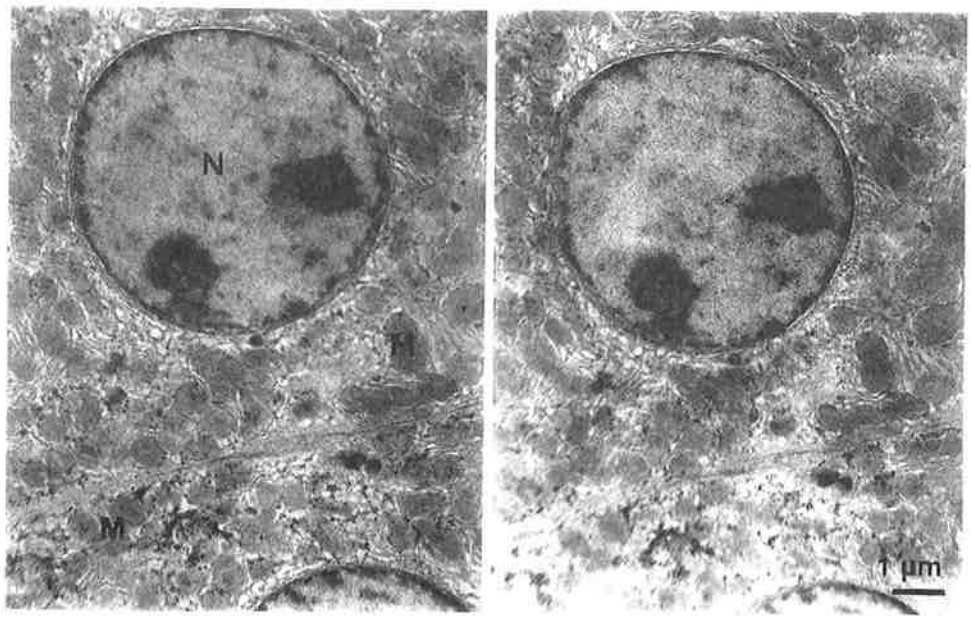


図１：正常ラット肝実質細胞。X6,000

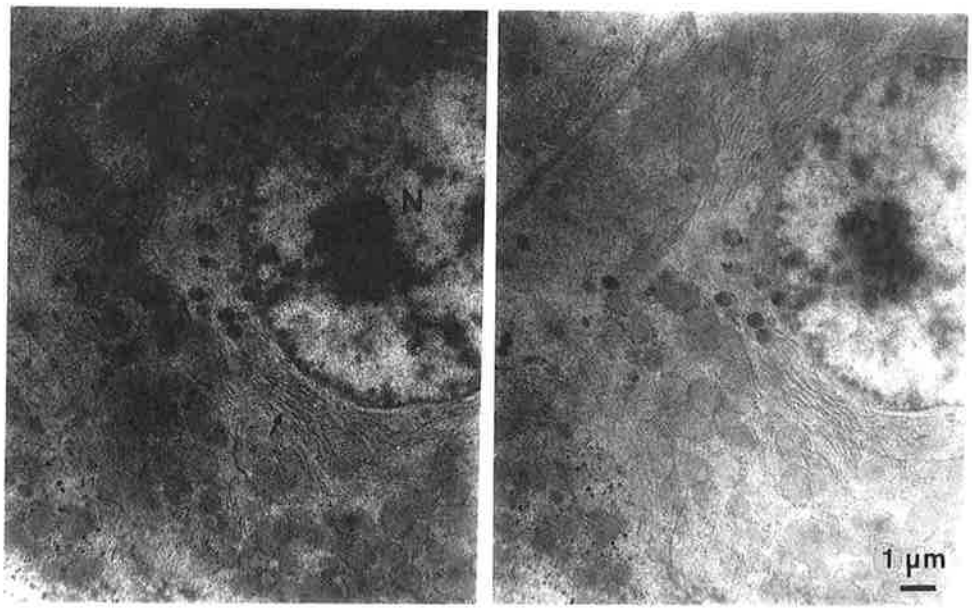


図２：肝硬変ラット肝実質細胞。X5,000
N，核　M，ミトコンドリア　矢印，繊維状構造物

【方法】

Wister 系雄ラットの肝臓の厚切切片を作成し，肝実質細胞を超高圧電子顕微鏡で立体的に観察し，肝実質細胞の細胞内膜系や毛細胆管腔の細胞骨格系を観察した。また四塩化炭素投与によって実験的肝硬変ラットを作成し，肝実質細胞のこれら超微構造の変化についても検討した。正常及び肝硬変ラットの肝臓を採取し，グルタールアルデハイド液で前固定を，オスミウム酸で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，樹脂包埋した。厚さ 1-3 μm 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。

【結果および考察】

図1には正常ラット肝実質細胞の立体写真が示されている。核の周囲にはよく発達した小胞体が存在し，その中に小型のミトコンドリアが多数観察される。クリステは整然としておりマトリックスの電子密度は細胞質のそれと比較して高く観察される。図2には肝硬変ラットの肝実質細胞の立体写真が示されている。核の周囲には発達した小胞体は見られず，殆ど繊維化した構造物が認められ，その中にライソゾームも観察される。ミトコンドリアも幾分膨化して観察され，クリステも判然としない。四塩化炭素投与時小胞体やミトコンドリアの膜に障害が起こりその結果膜関連の細胞骨格に変化が生じ繊維化が起こるのではないだろうか。

15. 細胞内へのリガンド取り込み過程に関する細胞化学的検討

秋元義弘，川上速人，平野　寛（杏林大・医）
山岸俊一（生理研）

従来より我々は，細胞表面に結合したリガンドの静的な結合パターンや結合に伴う再分布および再配置について，遊離細胞や組織細胞を材料に，HVEM 及び SEM (SEi, BSEi) 下で三次元的な全体像を追求してきた。反射電子 (BSEi) は，二次電子 (SEi) に比べてエネルギーが大きいので，細胞表面のみならず，細胞内部からの情報も含んでいる。昨年度に引続いて，細胞表面に結合して細胞内に取り込まれたリガンドの細胞内局在および配置を計数化することを目的とし，反射電子モードの観察に最適の標識物質であるコロイド金粒子を用い，その反射電子像と透過電顕像とを同一視野で相互に比較し，種々の条件下における反射電子の細胞内部への到達距離を具体的に検討した。

マウス・マクロファージを，コロイド金標識レクチン (ConA, RCA) と37℃で反応，whole-cell-mount 標本またはエポン包埋厚切切片（1 μm）を作製，同一視野を超高圧電子顕微鏡 (H-1250M, 加速電圧 1,000kV）及び走査電子顕微鏡（JSM-890，加速電圧10，15，20，30kV）によりステレオ対写真（傾斜角：±8°）を撮影して観察した。

細胞内部に取り込まれたコロイド金粒子は，切片標本や whole-cell-mount 標本（薄い辺縁部）では，超高圧透過電顕下で観察すると，粒子のほとんどが明瞭に観察されるのに対し，反射電子像では，細胞表面から深部になるにつれてコロイド金粒子のシグナルは弱くなり，且つ粒子の輪郭が不明瞭になった。さらに，反射電子モードでは高加速の場合ほど，より深部のコロイド金も明瞭に観察された。細胞表面からの最大到達距離は，whole-cell-mount 標本では，エポン包埋標本よりも大であった。

さらに現在，種々の固定および蒸着条件下における反射電子の細胞内部への到達距離を検討中である。

【参考文献】

1）Kawakami H and Hirano H: Rearrangement of the open-canalicular system of the human blood platelet after incorporation of surface-bound ligands. A high-voltage electron-microscopic study. Cell Tissue Res 245, 465-469, 1986

2）Takata K, Akimoto Y, Ogura K, Yamagishi S and Hirano H: Colloidal gold label observed with a high resolution backscattered electron imaging in mouse lymphocytes. J Electron Microsc 37, 346-350, 1988

3）高田邦昭，西山文朗，秋元義弘，平野　寛：走査電顕法による免疫組織化学の進歩。細胞 22 (1) 423-426, 1990

16. 胞子形成における細胞質の立体構造の解析

石川依久子，犀川政稔，黒沢健二（東京学芸大・生物）

前年度にひきつづき，巨大単細胞性緑藻バロニア (Valonia ventricosa と Valonia aegagropila) における全細胞質の胞子化について電顕レベルの立体解析をおこなってきた。バロニアは球体で内部は液胞でしめられ，原形質は細胞膜直下に薄く一層をなしている。この層の大部分は葉緑体で占められ，多数の核が葉緑体層と液胞の間に均等分布している。このような構造の原形質層が各々の核を中心とする多数の遊走子 (Zoospore) または不動胞子 (Aplanospore) に分割される仕組みを解析するために，その開始点としての通常細胞の細胞質構成を超高圧電顕によって三次元的に観察した。同時に，膨圧，浸透圧などの生理的性状の解析をおこない，それらの結果と併せて，基本的なバロニア細胞の構造を理解することができた。ことに細胞質基質が一般的概念と著しく異なり個々の葉緑体と核を包む薄層として存在し，細胞質基質と液胞との境界面（トノプラスト）が極端に大きいことを三次元解析によってあきらかにした。この知見に対し生理学的考察を行ない Jpn. J. Phycol. に掲載した。また，三次元解析によって得られた細胞質の基礎パターンから不動胞子形成が進行するメカニズムのあらましを形態的および生理的にあきらかにすることができ

た。この結果を論文とし，投稿中である。遊走子形成過程の三次元解析は，本年度に用いた試料の作製段階にいくつかの問題点があり，前年度以上の知見は得られなかった。平成５年度にそれらの問題点を改善し，三次元解析を完成させたい。本研究では，バロニアの観察の他に，センチュウ寄生性の接合菌 Euryancale phallospora の胞子の立体構造も解析した。その結果，ナス型をした胞子の先端にある高電子密度の「へた」の部分が14－15本に裂けていることなどが明かとなり Mycologia に掲載した。

17. 植物培養細胞中のアクチン線維の超高圧電子顕微鏡観察

谷口美恵子（名古屋大・理・物理）
谷口　武（名古屋大・農・資源生物）
有井達夫（生理研）

植物細胞にアクチンフィラメントが存在し，細胞分裂や細胞運動に深く関与していると思われるデータが最近出はじめている。我々はダイズ (*Glycine max* L. Merr) 細胞を培養し，プロトプラストを分離した。これをまずアクチンに特異的に結合するローダミンーファロイジンで染色し，アクチンフィラメントの局在を蛍光顕微鏡で調べ，次に細胞融合過程との関係を超高圧電子顕微

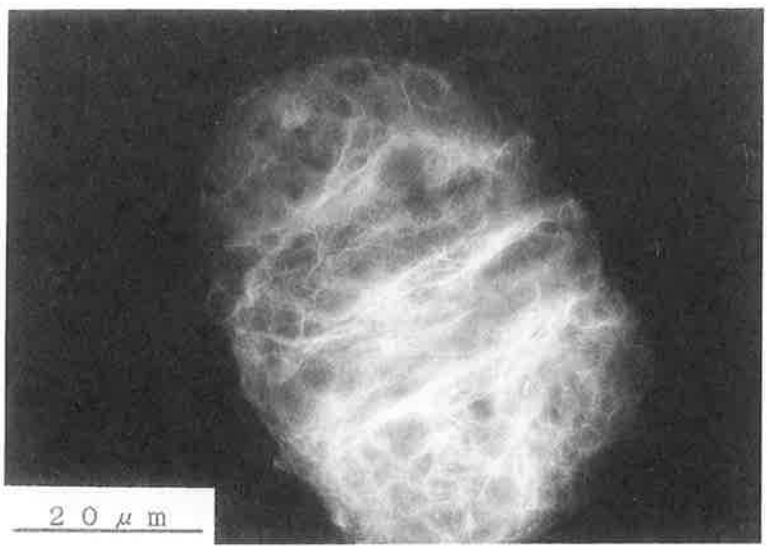


図１．プロトプラストの蛍光顕微鏡像
ローダミンーファロイジン染色されたアクチン線維が見える。

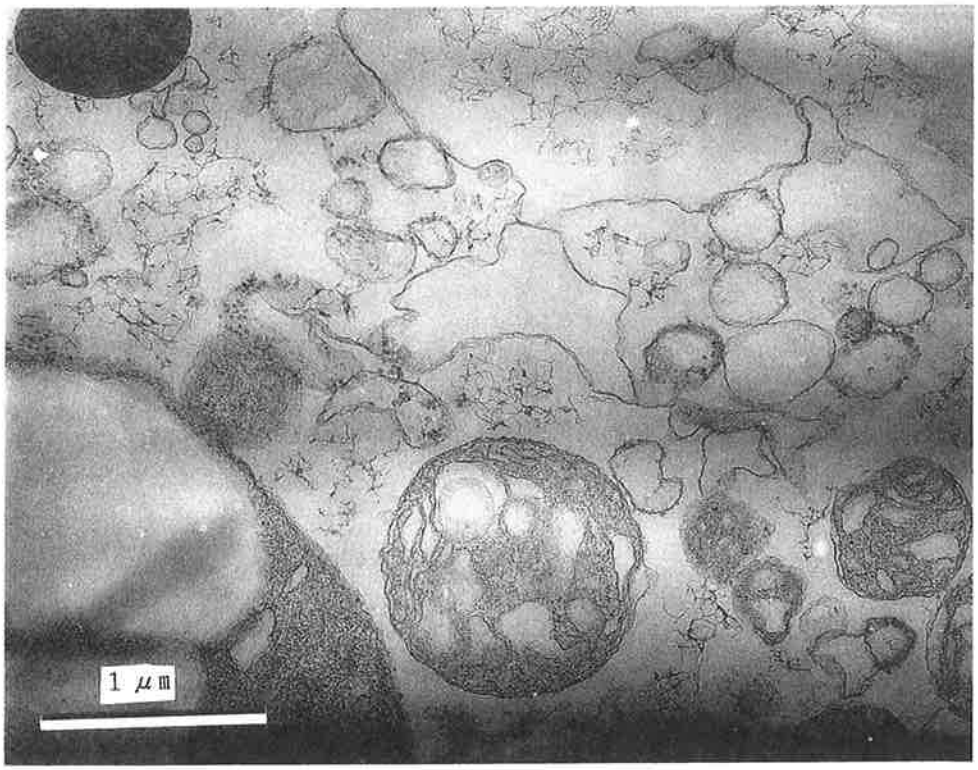


図２．プロトプラストの超高圧電子顕微鏡像

鏡で観察した。

A）試料調製－ダイズけん濁培養細胞から酵素処理（２％セルラーゼ YC,0.2％ペクトリラーゼ）を５時間し遠心により，プロトプラストを精製した。パルス電場下で細胞融合を誘起した。ローダミン－ファロイジン染色は，あらかじめ 0.5M マニトール，2.5mM $CaCl_2$, 2.5%DMSO 溶液にローダミン－ファロイジンを調製しておき，スライドガラス上で 20 μl の試料に加える。数分後，結合していないローダミン－ファロイジンを洗浄液で洗い出した。電子顕微鏡で観察する場合は２％グルタールアルデヒドで固定した切片 (0.1-1 μm) をサンプルとして用いた。

B）蛍光顕微画像計測－ニコン倒立顕微鏡を用いて，ローダミン－ファロイジン染色されたアクチンフィラメントは，落射蛍光像（励起Ｇフィルタ 510-560nm, DM580nm, EM フィルター 590nm）として，SIT カメラで受光し，他方，透過像は同時又は交互にカラービデオカメラで受像し，Avio の画像処理装置を通してコンピューターにとりこみ，画像解析した。図１は細胞融合を初めて２時間後の蛍光像である。数個のプロトプラストが融合して大きくなり，これから球

形になろうとしてアクチン線維がリング状に束ねられている。

C）超高圧電子顕微鏡観察―図2は，H-1250Mを使用して直接倍率2万倍で撮影した融合直後のプロトプラストの電顕像である。細胞内には，液胞やミトコンドリヤの周りに，線維状構造体が編み目状にみえる。

【 生体磁気計測装置
共同利用実験報告 】

生体磁気計測装置共同利用実験報告

〔目　　次〕

1．随意運動における脳磁図計測（柴崎　浩他）　…… 310
2．頭頂連合野における視覚誘発磁界反応（村上新治他）　…… 311

1．随意運動における脳磁図計測

柴崎　浩，長峯　隆，池田昭夫（京都大・医・脳病態生理）
南部　篤，松崎竜一，佐々木和夫（生理研・統合生理）
玄番央恵（京都大・医・認知行動脳科学）

随意運動の発動に関する脳の領野の解明を目的として我々は脳磁場計測を行っているが，昨年度に引続き本年度は，脳電場記録との比較，被験者間における比較検討を行った。

昨年度同様，右手中指伸展の急速な運動を５－10秒間に１回の自分のペースで行わせ，筋電図をトリガーとして脳磁場及び脳電場を逆行性に同時加算平均して記録した。５名の正常被験者において運動開始前約２秒より運動対側運動野近傍に大きさ200fTの外向き磁場，頭頂部でややこれより小さい内向き磁場を記録することができたが，試行間，被験者間での変動が大きかった。同時記録の脳電場記録では，この様な変動は殆どみられず，再現性よく記録されており，この変動は，脳磁場記録特有の現象と考えられた。運動開始前約２秒より500ミリ秒前近辺までの遅い成分に変動が最も顕著に現れており，運動直前の成分は比較的再現性よく記録出来た。このような遅い成分の変動が磁場記録のみで認められるのは，頭蓋外からの通常の電場記録では拾えない生理学的変動を拾っている可能性と，外界の磁場ノイズとの２つの可能性が考えられる。バックグラウンドノイズ測定より，外界磁場が少なからず影響していることが判明し，今後磁気シールドルームを含めた記録条件の改善が必要になってくるものと思われる。

今回の正常被験者の中に，脳磁場記録では他の被験者と同じパターンを示しているものの，脳電場記録にての陰性緩電位が認められない一例があった。運動開始前約２秒より緩徐な陽性電位が頭頂部，運動対側運動感覚野近傍に認められ，500ミリ秒前よりの陰性電位は，他の被験者と同じく運動対側運動感覚野にかなり限局して認められた。この被験者は，日常生活，巧緻運動に障害は認められないが，手の律動的運動の遂行が困難であった。

以上より，運動開始前２秒よりの陰性緩電位，緩磁場に関しては，脳磁場と脳電場との間にまだ不一致が認められる。これはひとつには，脳磁場が法線方向の電流双極子の同定が困難であることによっている。運動開始前約500ミリ秒よりの成分は比較的再現性よく記録できているのは，運動対側一次運動野の電流双極子が接線方向に走行している為と考えられる。

ヒトの随意運動の機序解明の為に脳磁場記録が用いられる様になってきているが，現時点では，空間解像度が充分とは言えず，これまでの脳電場の知見のみならず，硬膜下記録や動物実験との対比を行いながら検討を進めていくことが肝要と思われる。

2．頭頂連合野における視覚誘発磁界反応

村上新治（札幌医大・神経精神科）
栗城真也（生理研）

大脳頭頂葉の機能について視空間認知に関与していることが，知られているがその詳細については不明である。近年サル等の霊長類でその神経機能について，視覚情報と他の情報に応答する神経細胞が頭頂葉にて記録され解明が進んでいる。

一方，ヒトの頭頂葉については，その障害患者の示す構成障害や視空間の認知障害等の臨床症状の報告から，空間認知の視覚情報処理としての高次脳機能が推察されている。そこで頭頂葉における視覚刺激の反応を生体磁気測定装置を用いて記録しその反応源が頭頂連合野，頭頂間溝にあることを確認し[1]，さらに視空間の認知の神経機構解明を目的に眼球位置による視覚誘発反応への影響を研究した。

実験は健常成人を対象に磁気シールドルームにて注視指標のLEDを点燈し，誘発磁界記録部位に対し対側の視野に視覚刺激のLEDを不定期間隔（1－1.5秒）で点燈（0.5秒）させ注視指標と視覚刺激の組み合わせで網膜の同一部位刺激で眼窩内眼球位置を変えた場合 (eye position test) の誘発磁界反応を頭頂葉を中心に 37 channel SQUID（BTi 社）を用いて記録を行った。さらに電流双極子解析の結果から得られた活動源の位置を被験者のマーカーを付けた頭部 MRI 画像に重ね合わせ反応部位の同定をおこなった。

その結果，今回LEDを赤色から緑色に変更したが視覚誘発の反応磁界は，赤色と同様に頭頂葉に最大応答を示しその潜時には変化をみなかった。後頭葉や側頭葉の後上部において反応磁界は潜時約 60-80msec, 100-120msec に見られ，その amplitude は頭頂葉に比べると小さいが，これは SQUID の sensor に垂直な磁界応答が少ないだけで，視覚反応の存在については言及できない。また頭頂葉での反応磁界も被験者間にばらつきが見られるが，反応潜時 140-180msec で最大 peak を示し測定領域内のセンサ位置において磁界の方向が反転する双極子性の分布が観測され，さらに計算にて求められた反応の活動源は，頭頂葉の頭頂間溝とその周辺に位置することが頭部 MRI 画像との対比から明かになった。Eye position test の結果からは，眼球位置の変化が視覚誘発磁界反応におよぼす影響は，潜時に変化はみられず，反応磁界の amplitude に僅かの変化がみられた。さらに計算にて求められた反応の活動源は頭頂間溝とその周辺にあり，その活動源の電流方向は下向きではあるが内外及び吻尾方向には僅かではあるが変化が見られた。これらの変化に Eye position による系統的な秩序があるか否かはこれからの検討課題として引き続き研究中である。

1．S. Murakami, S. Kuriki et al, Magnetic field responses to visual stimulation in human parietal association cortex. Neuroscience Res. 16 (1993) : 225-228.

【研　究　会　報　告】

研究会報告

〔目　　次〕

1．神経組織構築の分子基盤（代表者：小幡邦彦）
（1992年６月５日－６日）…… 316
2．第３回海馬研究会―海馬の構造・機能・病態生理（代表者：小澤瀞司）
（1992年７月10日－11日）…… 324
3．第７回大脳基底核研究会（代表者：彦坂興秀）
（1992年７月16日－17日）…… 331
4．視覚機能分化と神経回路構築解明への学際的アプローチ（代表者：福田　淳）
（1992年７月30日－８月１日）…… 353
5．生理学実験手技研究会（代表者：富田忠雄）
（1992年８月24日－26日）…… 370
6．生体内における水構造，NMR-CT，水・電解質輸送の研究（代表者：曽我美勝）
（1992年８月27日－28日）…… 371
7．脳陽ホルモンの生理作用に関する研究会（代表者：菅野富夫）
（1992年10月８日－９日）…… 382
8．音声コミュニケーションのニューロエソロジー的研究（代表者：谷口郁雄）
（1992年11月25日－26日）…… 388
9．消化器の機能及びその調節機構（代表者：鈴木裕一）
（1992年12月３日－４日）…… 398
10．内外受容器のブドウ糖分識別ならびに反応発現機構（代表者：日地康武）
（1992年12月14日－15日）…… 413
11．細胞膜輸送機能と細胞システム（代表者：今井雄介）
（1993年１月21日－22日）…… 424
12．第12回睡眠促進物質研究会（代表者：井上昌次郎）
（1993年１月28日－29日）…… 438
13．ギャップ結合の構造及び生理機能調節機構（代表者：柴田洋三郎）
（1993年２月15日－16日）…… 447
14．分泌反応の細胞内シグナル（代表者：小林　繁）
（1992年９月24日－25日）…… 458

1．「神経組織構築の分子基盤」

1992年6月5日－6日
代表者：白尾智明（慶應大・医）
世話人：小幡邦彦，児島伸彦

(1) 脊髄一次求心性線維の投射路形成：細胞外基質分子と細胞接着分子の関与
志賀　隆（山形大・医）

(2) 神経回路網の形成：リーラーマウスから何を学ぶことができるか
寺島俊雄（東京都神経研）

(3) ミュータントマウスの解析から神経構築に必要な分子を探る
池中一裕（大阪大・蛋白質研）

(4) 大脳皮質の層特異的神経結合の決定
山本亘彦（京都府立医大）

(5) 成長円錐部膜に存在するイオンチャネル
山口和彦（生理研）

(6) 神経分化因子 (CDF/LIF)
山森哲雄（理研）

(7) PC12 細胞を用いた神経突起誘導機構に関する研究
佐野　護（愛知県コロニー）

(8) 培養系を用いた細胞移動の解析
永田　功（東京都神経研）

(9) 運動ニューロンの軸索成長
田中英明（熊本大・医）

(10) 神経細胞の細胞骨格とドレブリンの関係について
白尾智明（慶應大・医）

(11) 細胞接着分子 L1 の機能
阿相皓晃（慶應大・医）

(12) 嗅神経線維の糸球への機能的収束とその分子基盤
森　憲作（大阪バイオサイエンス研）

(13) 神経細胞形質膜蛋白 HPC-1 の解析
赤川公朗（生理研）

(14) 大脳新皮質の発生過程における subplate の動態と意義
湯浅茂樹（慶應大・医）

【討論参加者】

池田圭朗，Peter Kaub，川村光毅，仲嶋一範，鹿川哲史，中平健祐，岩永　操，小幡邦彦，吉川武男，児島伸彦，寺川　進，井上明宏，橋本隆紀，鈴木恵理香，山肩葉子，鍋田弥生，内藤知津江，村瀬覚哉，永淵昭良

【研究会概要】

この研究会では，解剖学的方面，生理学的方面，細胞生物学的方面，分子遺伝学的方面など種々の方面から神経組織構築の分子基盤を探る研究者を集め，発表，討論を行なった。従来一つの現象であると考えられていた神経細胞の移動あるいは神経突起の伸展なども詳しく観察するといくつかのことなった現象に分けることができると言うことが解剖学的にも，細胞生物学的にも提唱され，活発な討論が行なわれた。

(1)　脊髄一次求心性線維の投射路形成：細胞外基質分子と細胞接着分子の関与

志賀　隆（山形大・医）

神経細胞軸索の投射路形成機序を解明するために，ニワトリ胚脊髄一次求心性線維 (PAF) の投射路形成過程を調べ，さらにこの過程に細胞外基質分子と細胞接着分子がどのように関与するかを免疫組織化学的手法を用いて検索した。PAF の投射路形成は，脊髄神経節を形成中の神経堤細胞から PAF が脊髄背外側部に向かって，豊富な細胞間腔と神経堤細胞との間を伸びる過程（ステージ１），次いで脊髄に侵入後に束を形成しながら長軸方向に後索を走る過程（ステージ２），そしてやや遅れて束を形成せずに灰白質に入る過程（ステージ３）に分けられた。ステージ１の投射路に一致してラミニンの局在が見られた。脊髄神経節細胞に特異的な細胞表面分子 (SC2) はステージ２の束を形成して走る線維に見られた。従って SC2 は束形成に関与し，一方 SC2 の消失は，PAF の後索から灰白質への侵入を可能にする一つの要因と考えられる。Ng-CAM はステージ１－３の伸びつつある線維に見られたので，軸索の伸長に関与する可能性が考えられる。以上のように，投射路形成において投射路の位置に応じて複数の分子が関与する可能性が示唆された。

(2) 神経回路網の形成：リーラーマウスから何を学ぶことができるか

寺島俊雄（東京都神経研・解剖発生）

リーラー奇形マウスは常染色体劣性遺伝性の奇形マウスで，振戦，歩行失調などの運動障害を特徴とする。この奇形マウスの大脳皮質，海馬，小脳皮質，蝸牛神経背側核などの皮質構造（層構造）を特徴とする中枢神経系の領域の細胞構築は大きく崩れるが，その原因は，神経芽細胞の移動障害に求めることができる。リーラーの大脳皮質は，正常マウスの分子層（第１層）に相当する層がなく，正常マウスの細胞層（第２－６層）がほぼ逆転する。その結果，リーラーでは，正常マウスの第５層ニューロンが，大脳皮質の全層に広く存在する。この異所性の第５層ニューロンの皮質下中枢への投射とその発生を，バイオサイチン，ワサビ過酸化酵素，カルボシアニン蛍光色素を用いた逆行性と順行性軸索輸送方を用いて研究した。その結果，異所性皮質第５層ニューロンより起こる伝導路（錐体路，皮質上丘投射）は，正常であることがわかった。

(3) ミュータントマウスの解析から神経構築に必要な分子を探る

池中一裕（大阪大・蛋白質研）

脳神経系はニューロンとグリア細胞の全く性質の異なる細胞集団から構成されており，これらの間の緊密な細胞相関を保つことにより，高度な機能を有している。しかし，この性質の異なる細胞集団も発生学的には共通の前駆細胞である神経上皮細胞由来であり，しかもその分化過程も遺伝的にプログラムされている部分が多い。脳神経系の構築に異常を示すミュータントマウスは多数知られているが，これらを用いることによりプログラムされていた過程に関わる分子を同定することが可能である。今回は，神経芽細胞の移動に異常を示すリーラーマウスと，オリゴデンドログリア細胞の分化異常を示すジンピーマウスの解析から見えてきた分子について発表する。神経芽細胞の移動を in vitro で観察できる脳スライス培養系を作製し，リーラー変異と関係あると報告されたガラクトース転移酵素の活性を測定したところ UDP-Gal の取り込みはあったが，転移生成物はグルコースに変換していた。非還元末端末端にグルコースのついた糖蛋白や糖脂質は極めて珍しくその生理的意義に興味が持たれる。ジンピー変異はミエリンの主要な構成蛋白質であるプロテオリピド蛋白質遺伝子内に見いだされたが，トランスジェニックマウスの解析などによりグリア系の分化因子としても働いていることが示唆された。

(4) 大脳皮質の層特異的神経結合の決定機構

山本亘彦（京都府立医大・第2生理）

大脳皮質は特有の層状構造を有し，層ごとに特定の標的部位との間で神経結合を形成している。このような特異的な神経結合の形成機構を明らかにするために，我々は組織片培養法を開発し，これまでに外側膝状体－視覚野，視覚野－視覚野，視覚野－上丘の間に in vivo と同様な層特異性を持った求心性及び遠心性の神経結合が形成されることを示した。このことは層特異的な神経結合を決定する主たる要因は発生期の特別なタイミングや軸索の伸長経路ではなく，軸索と最終標的間の細胞間相互作用であることを示している。現在，これらの分子機構についてはほとんど明らかではないが，外側膝状体線維の視覚野組織片内での成長を連続的に観察した結果，少なくとも皮質求心性線維の標的層での神経結合には局所的な手がかり因子が関与していると考えられる。

(5) 成長円錐部膜に存在するイオンチャネル

山口和彦（生理研・生体システム）

無脊椎動物において神経突起伸長は成長円錐部の Ca イオン濃度に依存しているとする Ca 仮説が出されているが，脊椎動物ではこれに否定的な証拠も出されている。成熟ラットの脊椎後根神経節 (DRG) 細胞の培養系でこの仮説を検証し，あわせて成長円錐部膜に存在するイオンチャネルの性質についてパッチクランプ法を用いて調べた。成長円錐部膜にはテトロドトキシン感受性の Na チャネル，遅延性K チャネル及び Ca チャネルが見られた。Ca チャネルには nifedipine (2 μM) によって阻害される成分と ω コノトキシン (2 μM) によって阻害される成分があり，La^{3+} は両者を阻害した。細胞体部で見られたT型 Ca チャネルは成長円錐部では見られなかった。培地に Ca チャネル阻害剤を添加し培養したところ，nifedipine, nicardipine (5 μM) は神経突起形成を抑制したが，全ての型 Ca チャネルを阻害する La^{3+} (5 μM) は無効であり，単純な Ca 仮説は成り立たないように思われた。

(6) 神経分化因子 (CDF/LIF)

山森哲雄（理研・フロンティア思考ネットワーク）

LIF/D 因子は，マウスの白血病細胞株である M1 細胞や胚幹細胞である ES (embryonic stem)

細胞などの種々の細胞に多様な機能を持つサイトカインの一種である。我々は，この因子が，培養交感神経をアドレナリン作働性からコリン作働性に転換するコリン作働性分化因子 (CDF : cholinergic differentiation factor) と同一物であることが示した。CDF/LIF の交感神経の標的組織における分布と発生のタイミングは，この因子が，実際の神経発生に於いて，汗腺へ投射するアドレナリン作働性交感神経をコリン作働性交感神経と転換する役割を演じている可能性を示唆しており，神経系に於いて，LIF/D 因子の特異性を決めている要因として，その局在性と受け手の側の神経の細胞系列が重要であると考えられる。最近，神経分化因子活性をもつ CDF/LIF や CNTF (ciliary neurotrophic factor) の受容体が，サイトカイン受容体ファミリーに属することが，明らかになりつつある。これらの知見は，サイトカイン受容体が比較的小数の限られたモチーフから進化してきたことと，それが神経発生を含む体の発生の諸段階に異なる役割を持つようになったことを示唆している。

(7) PC12 細胞を用いた神経突起誘導機構に関する研究

佐野　護（愛知県コロニー）

PC12D 細胞は，NGF 或いは dbcAMP 処理すると数時間で突起が誘導され，新たな遺伝子発現を要しない，しかしキナーゼ阻害剤により特異的に抑制を受ける。細胞を NGF, bFGF 処理数分後に活性の上昇する MAP キナーゼの活性の変化と突起誘導との間に多くの相関が見られ，この酵素の活性化が突起誘導に関連する可能性を示唆して来た[1-3]。突起誘導因子処理数分後，アクチンを蛍光観察すると顕著な形態変化が認められ，それが突起形成へと続く。この初期変化も，キナーゼ阻害剤で阻害された。アクチンおよび微小管の脱重合剤，cytochalasin B, colchicine を同時に加えると突起形成は阻害されるが，前者のみの場合，filopodia の無い突起が，後者のみでは，大きな filopodia 様突起が形成された。完全な突起の誘導には，アクチン繊維と微小管の両者が必要と考えられる。[1-3] Sano et al. *J. Neurochem.*, 55 (1990) 427-435, 58 (1992) 837-844, 59 (1992) in press

(8) 培養系を用いた細胞移動の解析

永田　功（東京都神経研）

ニューロンの移動を培養系で解析するメリットは，複雑な組織構造や細胞外基質などの環境因子を一度断ち切って，より単純な条件下で研究できることにある。その培養系は 1）解離した一

個のニューロンを一種類の基質上で培養し，その運動性を調べる。最も単純な系で運動性の分子基盤を調べるには有効であるが，*in vivo* とは遠くなる。2）組織の一部を残しつつ，やや単純にした系で移動を調べる。一種類の細胞や神経線維を培養し，その上でのニューロンの動きを見たり，その分子的メカニズムを調べる。3）脳組織内での動きをスライスなどで直接的に観察したり，実験的に調べる。より生体に近いが結果の解釈は明解ではなくなる。いずれの培養系においても，現在は断片的で不十分な資料しか得られていない。本研究会では，中辻博士（現，国立遺伝研）と共同研究を行っているマウス小脳の顆粒細胞の移動を中心に，一般的なニューロンの移動についても言及する。

(9) 運動ニューロンの軸索成長

田中英明（熊本大・医・脳・免疫統合科学，神経分化学）

ニワトリ胚後肢における運動ニューロンの発生と軸索成長を概観し，期待される分子機構をまとめる。その様な分子の候補としてモノクローナル抗体法によって得られたSC1の解析を紹介し，今後の展望について述べる。

(10) 神経細胞の細胞骨格とドレブリンの関係について

白尾智明（慶應大・医・生理）

in situ におけるドレブリンの機能を解析するために，SH-SY5Y 細胞が未分化の状態，およびレチノイン酸 (RA) によって分化した際のドレブリンの細胞内局在の相違について検討し，初代培養系を用いた神経細胞におけるドレブリンの局在と比較した。また同時に細胞骨格蛋白質の一つであるアクチンとドレブリンの細胞内における局在を明かにし，細胞分化にともなうアクチンの配向の変化とアクチンの重合状態に関しても解析した。さらに metallothionein promoter を持つ誘導ベクターを用いてドレブリン A cDNA を培養非神経細胞に導入，ドレブリン発現細胞系を樹立し，カドミウム (Cd) を添加することによってドレブリンの発現が誘導された際の細胞の形態変化およびドレブリンおよびアクチンの細胞内局在の変化について検討した。

(11) 神経接着分子 L1 の多機能性について

阿相皓晃（慶應大・医・生理）

神経系の構築に必要な分子で，神経細胞で発現特異性の高い L1 分子の多機能性について，細胞工学，分子生物学的手法を用いて解析した。この分子は，細胞接着能，神経突起伸長作用，神経束化形成能，神経再生能や細胞移動に深く関与していることが明らかとなった。それ以外にも細胞内シグナル伝達系にも関与し，この抗体によりＬ－型カルシュムチャンネルが開き，細胞内の Ca^{++} 濃度が上昇することもわかった。このような多機能性を有する L1 分子のそれぞれの機能ドメインを調べるために，目的別ドメインを分けた L1 分子の発現を行ない，さらにその合成ペプチドを用いてどのドメインがどの機能を担当しているかについての機能ドメイン解析を行なっている。

(12) 神経組織構築の分子基盤
嗅神経線維の糸球への機能的収束とその分子基盤

森　憲作（大阪バイオサイエンス研・神経科学）

神経細胞の分化，軸索の伸長や退縮，軸索束の形成や分離，特異的シナプス形成等の，細胞間認識を伴った過程を経て神経組織の構築がなされていく。ところで「形成された神経系がどのような機能を有するようになるか」という知識は，これらの個々の過程の分子機構を理解する上で重要な指標となる。

最近の研究により「同じ匂い受容蛋白質を発現している嗅細胞は，嗅上皮では広く分散して分布しているが，その軸索は集合して，恐らく特定の糸球へと投射している」という糸球への軸索収束の機能的意義が理解され始めた。このことより，嗅神経システムが神経構築の分子機構を知る上での重要なモデルシステムになるのではないかと考えられる。嗅神経線維のサブセットに発現している膜蛋白質を中心に報告する。

(13) 神経細胞形質膜蛋白 HPC-1 の解析

赤川公朗（生理研・神経化学）

HPC-1 抗原はラット海馬の膜画分に対して作製されたモノクロン抗体 HPC-1 の認識する蛋白

である。抗原は成熟ラット神経系の至る所に存在している。我々はこの蛋白質をラット脳 cDNA ライブラリーからクローニングし，推定アミノ酸配列を決定した。その結果，HPC-1 はC末に強い疎水性部分を有する膜蛋白である事が判明した。その推定構造に基づいて mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを作製し，培養神経細胞に投与すると大量の細神経突起形成 (sprouting) を促す事を見出した。抗体の細胞内投与によっても同様の細突起形成が見られた。またホモロジー検索の結果，HPC-1 蛋白は上皮の分化促進因子 Epimorphin と強いホモロジーを有しており，両者は１つの蛋白ファミリーに属することが明かとなった。従って，これらの結果から HPC-1 蛋白は神経細胞形質膜に存在する新しい分化制御蛋白の１種であると推定された。

(14) 大脳新皮質の発生過程における subplate の動態と意義

湯浅茂樹（慶應大・医・解剖）

哺乳類の大脳新皮質発生過程において，神経上皮で最も早期に最終分裂した細胞群は皮質に preplate を形成し，その後に最終分裂した細胞は preplate の内部に皮質板を形成する。preplate は皮質板によって浅層と深層に分けられる。preplate の深層部分は subplate と呼ばれる層構造を形成するが，成体になると消失する。本研究においては，マウスの大脳新皮質発生過程における subplate の動態を調べ，新皮質形成過程におけるこの領域の意義を明らかにすることを試みた。Brdu で標識することにより，subplate の細胞群は胎生11日に最終分裂することが明らかになった。胎生16日には，subplate に分布する細胞体に限局した MAP-2 の発現が認められた。また，subplate の一部の細胞は，一過性に NGF 受容体免疫陽性となるとともに，大脳皮質原基の一部に神経栄養因子 NT-3 の遺伝子発現が認められた。さらに，視床原基に蛍光色素 DiI を導入して新皮質求心線維を標識し，その発達と subplate との相関を共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。胎生16日には標識された求心線維の先端は subplate に高密度に集積し，皮質板内へ進入する成長円錐はほとんど認められなかった。胎生19日になると，多数の標識された成長円錐が皮質板内へ進入する像が認められた。電顕的観察により，胎生後期の subplate に分布する細胞に幼若なシナプスが形成される像が認められた。以上の所見より，皮質原基に到達した求心線維は，本来の標的ニューロンが分化するのを待つ間，最も早期に分化した subplate 領域のニューロンに一時的にシナプスを形成し，これによって神経回路の形成過程が制御されていると考えられる。このような考え方が妥当かどうかを，リーラーマウスの新皮質原基やトカゲ大脳で検討した結果も併せて報告する。

2.「第3回海馬研究会―海馬の構造・機能・病態生理―」

1992年7月10日－11日
代表者：小澤瀞司（群馬大・医）
世話人：小幡邦彦

(1) 海馬皮質の神経結合と層構造
石塚典生（東京大・医・脳研究施設・解剖）

(2) 海馬神経回路の動的特性の光学的測定による解析
飯島敏夫（電子技術総合研究所）

(3) ラット海馬の場所ニューロンの特性
福田正治，小野武年（富山医薬大・医・第二生理）

(4) グルタミン酸受容体チャネルの分子生物学
三品昌美（新潟大・脳研究所・薬理）

(5) 代謝型およびNMDA型グルタミン酸受容体の分子生物学
桝　正幸（京都大・医・免疫研究施設・第二部門）

(6) AMPA／カイニン酸型グルタミン酸受容体の機能的特性
小澤瀞司，飯野昌枝，都筑馨介（群馬大・医・第二生理）

(7) キンドリングにおける遺伝子発現の変化
児島伸彦，小幡邦彦（生理研・神経化学）

(8) 海馬切片に対するアデノシンおよびその誘導体の作用
岡田安弘（神戸大・医・第一生理）

(9) 培養海馬神経細胞における細胞内 Ca^{2+} 動態
小倉明彦（三菱化成生命科学研究所）

(10) モルモット海馬CA1ニューロンの $[Ca^{2+}]_i$ の動態
加藤宏司，中村　厳，宮川博義，伊藤憲一（山形大・医・第二生理）

(11) 脳のエネルギー代謝障害と神経細胞死
桐野高明（帝京大・医・脳神経外科）

(12) 虚血海馬スライス標本におけるPI代謝系の動態
坪川　宏，川合述史（自治医大・第一生理）

(13) 海馬のニューロン死のメカニズム
片岡喜由（愛媛大・医・第一生理）

【討論参加者】
小幡邦彦，石塚典生，飯島敏夫，福田正治，三品昌美，桝　正幸，小澤瀞司，飯野昌枝，都筑馨

介，加藤宏司，伊藤憲一，岡田安弘，小倉明彦，桐野高明，茂野　卓，坪川　宏，片岡喜由，小山生子，金子周司，前田武彦，鈴木龍雄，関野祐子，佐藤　潔，新井　一，楠本雅之，宮嶋雅一，宮澤隆仁，望月　忍，丸　栄一，鈴木慎也，深井靖雄，芦田　廣，鍋谷まこと，斉藤　実，平井宏和，寺島　明，石川朗宏，山田裕弘，宮本高明，川村光毅，林　康紀，横井峰人，中村洋一，柳瀬直人，市川道教，Kira Belkin

【研究概要】

本研究会は平成２年度から継続して開催されており，今回が第３回にあたる。今回は海馬の構造・機能・病態生理について近年顕著な成果をあげている研究者を演者に選び，それぞれの研究成果を総説的に紹介していただいた。また海馬の機能と病態生理を論ずる上できわめて重要な関連をもつグルタミン酸受容体の分子生物学的研究についても最新の成果を発表していただいた。それぞれの研究成果について，活発な討論が行われ，充実した研究会となった。

(1)　海馬皮質の神経結合と層構造

石塚典生（東京大・医・脳研究施設・解剖）

海馬台の皮質下投射細胞の分布を WGA-HRP 逆行性標識法によって海馬長軸直交断面で調べた。視床腹側前核投射細胞は白質に接する最深層，乳頭体内側核投射細胞は海馬台の中央層，中隔側座核（腹側線条体）投射細胞は錐体細胞層の最表層に位置した。側頭葉側の断面ほど，表層の線条体投射細胞が CA1 側に集まり，しばしば CA1 錐体細胞層の下部へ滑り込むように分布する。これに対し，視床投射細胞は CA1 側に少なく前海馬台側に多い分布を示した。つまり海馬台の投射細胞の分布域は，中隔側から側頭葉側へ移行するに従い斜めにずれていく様相を呈したが，深層から浅層へ，視床投射細胞，乳頭体投射細胞，線条体投射細胞という配列順序は，中隔側から側頭葉側まで変わらない。この順序は運動野などのⅤ・Ⅵ層にみられる投射細胞の配列と同様である。他方，歯状回とアンモン角の細胞はもっぱら皮質内連合である。したがって，歯状回・アンモン角は皮質外層，海馬台は皮質内層に相当すると考えられる。

(3)　ラット海馬の場所ニューロンの特性

福田正治，小野武年（富山医薬大・医・第二生理）

ラット海馬体には，空間内の特定の場所を通過したときに強く発火する場所ニューロンが存在

する。しかし，場所ニューロンに対する場所学習の効果については不明な点が多い。本研究では，ラット海馬体から単一ニューロン活動を記録し，場所の学習課題に対するニューロン応答性を調べた。その結果，オープンフィールド内に報酬領域と非報酬領域を配置し，その間を往復させる学習課題と行なわせると，非報酬領域での応答は消失し報酬領域でだけ強く発火するようになる場所ニューロンが存在した。また，場所の学習に伴って場所フィールドが形成されるニューロンが存在した。以上の結果は，ラット海馬体の場所ニューロンが空間内の位置をコードするだけでなく，場所の学習に関与することを示唆している。

(4) グルタミン酸受容体チャネルの分子生物学

三品昌美（新潟大・脳研究所・薬理）

我々はグルタミン酸受容体チャネルの生理機能，特に脳の高次機能と形成ならびに病態を解明するにはトランスジェニック動物などの手法を用いて分子と個体を結んで研究をすすめることが必須であると考え，マウスのグルタミン酸受容体チャネルの研究を始めた。現在までにcDNAの単離と構造決定によってマウスのグルタミン酸受容体チャネルサブユニットには十数個を越える分子種が存在することを見いだした。一次構造の類似性からこれらのサブユニットを6つのサブファミリーに分類し，これらのサブファミリーをそれぞれα，β，γ，δ，ε，ζと呼ぶことにした。この分類は構造の類似性に基ずいたものであるが，サブユニットの薬理学的性質と良く対応していることが明らかとなってきた。αサブファミリーには，AMPAに高い親和性を有するがAMPAにもカイニン酸にも応答を示すグルタミン酸受容体チャネルを形成する。一方，βおよびγサブファミリーは，カイニン酸に高い親和性を示すカイニン酸型グルタミン酸受容体チャネルのサブユニットである。さらに，εやζサブファミリーはNMDA受容体チャネルを構成することを見い出した。本講演では，εサブファミリーの分子的多様性がNMDA受容体チャネルの機能的多様性の基盤となっていることなどNMDA受容体チャネルに関する最新の知見を紹介する。

シナプス可塑性の鍵を握るグルタミン酸受容体チャネルを構成するサブユニットが分子的実体として解明されたことにより，脳の高次機能を分子レベルで理解するための大きな基礎が築かれた。記憶・学習などの高次機能，ネットワーク形成，神経細胞壊死などグルタミン酸受容体チャネルが関与する高次の生理機能，病態を追求していくためには分子と個体を結んで，分子生物学，生理学，解剖学，行動学さらには心理学などの諸分野が一緒になって総合的に研究することが重要であろう。このためにはTransgenic動物が一つの有力な方法と考えられる。今後，分子を出発点として脳の高次機能にどのように迫っていくのかが重要な課題であろう。

(5) 代謝型及びNMDA型グルタミン酸受容体の分子生物学

榊　正幸（京都大・医・免疫研究施設・第二部門）

アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて代謝型及びNMDA型グルタミン酸受容体cDNAを単離し，その分子的多様性及び薬理学的・電気生理学的性質について解析した。

代謝型受容体は少なくとも5つのサブタイプから成り，mGluR1及び5は従来の報告通り，イノシトールリン酸・カルシウム情報伝達系に共役しているが，mGluR2, 3, 及び4はcAMP産生の抑制作用を有する事が明らかになった。各受容体サブタイプは，異なる薬理学的性質と脳内分布を示した。

NMDA受容体は，全ての基本的性質を有し全ての神経細胞に見られる機能的サブユニット(NMDAR1)の他に，脳内の発現パターンの異なる4種のサブユニット(NMDAR2A ～ 2D)が存在し，両者の組み合わせにより，性質の異なるヘテロオリゴマーが形成される事が明らかになった。

(6) AMPA／カイニン酸型グルタミン酸受容体の機能的特性

小澤瀞司，飯野昌枝，都筑馨介（群馬大・医・第二生理）

ラットの培養海馬ニューロンのAMPA／カイニン酸(KA)型受容体はそのチャネル機能により，外向き整流特性をもち，Ca^{2+}透過性を示さないⅠ型と，内向き整流特性と高いCa^{2+}透過性を示すⅡ型に分類される。このうちⅡ型反応は小型で楕円形の細胞体をもつニューロンで記録された。本研究では圧電素子を用いた細胞外液急速交換法により，AMPA, KA, グルタミン酸(Glu)をⅡ型反応を示す培養海馬ニューロンに投与し，膜電流応答を記録した。細胞外液のAMPA濃度を1μM ～ 2mMの範囲で変化させると，AMPA感受性電流は2μMより出現するが，反応の脱感作は濃度の増加とともに顕著になり，1mMでは定常状態の電流応答はピーク値の5％以下であり，脱感作による減衰の時定数は7.5 ± 0.5ms (n = 5)に達した。一方KA応答は，KA濃度1μM ～ 2mMの範囲で全く脱感作を示さなかった。またGlu 1mMに対する電流応答はAMPAの場合と同様に急速に脱感作された。従って，AMPA/KA受容体の生理学的・薬理学的研究を行う場合，この受容体がアゴニストの種類に依存して急速に脱感作されることを念頭におくことが必要である。

(7) キンドリングにおける遺伝子発現の変化

児島伸彦，小幡邦彦（生理研・神経化学）

キンドリングにおける長期けいれん準備状態の分子基盤を知る目的で，キンドリング最終刺激から2週間以上経過したラットと正常ラットと海馬の転写産物の質的あるいは量的差異を検索した。まず *in vitro* translation によってそれぞれの poly $(A)^+$ RNA の翻訳産物を二次元電気泳動法によって解析した結果，キンドリング海馬で増加しているものが数種類存在することがわかった。そこでキンドリング海馬の cDNA から正常海馬の poly $(A)^+$ RNA との共通成分をサブトラクション法によって除去し，残った cDNA でライブラリーを作成した。このライブラリーよりキンドリング海馬で発現の増加する cDNA クローンを5個単離した。これらの塩基配列から4個はチトクロム酸化酵素サブユニットⅡの，1個は同サブユニットⅢの cDNA であることがわかった。Northern ブロット解析の結果，キンドリング海馬でサブユニットⅡの mRNA は2.3倍増加していた。これらのことよりキンドリング脳内では長期にわたって遺伝子発現が変化していることが明らかとなった。またチトクロム酸化酵素 mRNA の増加はキンドリング動物の長期にわたるけいれん準備状態の維持機構に関与している可能性がある。

(9) 培養海馬神経細胞における細胞内 Ca^{2+} 動態

小倉明彦（三菱化成生命科学研究所・脳神経科学）

胎生ラットより単離して培養に移した海馬神経細胞について，演者らが開発した細胞内 Ca^{2+} イオン濃度の蛍光顕微鏡／画像処理定量法によって解析した。

培養海馬神経細胞は，互いにシナプスを形成し，細胞内 Ca^{2+} 濃度を自発的・周期的に変動させている。細胞には，Ca^{2+} を細胞外から流入させる要因として，受容体チャネル・電位感受性チャネル，細胞内貯蔵部位から離出させる要因としてイノシトール三燐酸感受性チャネル・カフェイン感受性チャネルが備わっており，それぞれの適正刺激によって活性化されるほか，燐酸化などの修飾によって調節を受ける。Ca^{2+} の排出効率は Ca^{2+} 結合蛋白カルビンディンの多寡とよい平行性を示す。

培養系は，神経細胞の分子装置の生物物理学的解析や，シナプス形成機構・シナプス可塑性発現機構・虚血にともなう神経壊死の誘発機構などを細胞学的に解析するためのよい実験モデル系となる。

(10) モルモット海馬 CA1 ニューロンの $[Ca^{2+}]_i$ の動態

加藤宏司，中村　厳，宮川博義，伊藤憲一（山形大・医・第二生理）

モルモット海馬薄切標本の CA1 錐体細胞に Ca^{2+} 感受性色素 fura-2 を入れたガラス微小電極を刺入し，細胞内電位の記録と $[Ca^{2+}]_i$ の動態とを同時記録した。細胞の脱分極刺激による発火と st. radiatum のテタヌス刺激 (100Hz, 100pul.) では，樹状突起の起始部（＜150 μm）と細胞体部で $[Ca^{2+}]_i$ の増大分が最大で樹状突起の末端では増大が少なかった。一方，st. lac-mol. のテタヌス刺激では細胞体が最大，樹状体突起の起始部で少なく，末端では殆ど $[Ca^{2+}]_i$ の増大はなかった。APV (50 μM) の灌流下のテタヌス刺激では細胞体及び樹状体の起始部の $[Ca^{2+}]_i$ の増大分はおよそ1/2ないし2/3に抑えられたが，樹状突起末端部ではテタヌス刺激中むしろ増大傾向を示し，さらに刺激終了後はゆっくり減少した。LTP 誘導の初期過程は NMDA チャンネルから Ca^{2+} が入ることが，APV がテタヌス刺激による LTP を阻止し，NMDA チャンネルが Ca^{2+} を通すことから確実視されているが慎重に検討する必要があると結論した。

(11) 脳のエネルギー代謝障害と神経細胞死

桐野高明（帝京大・医・脳神経外科）

無酸素症，虚血，低血糖症，てんかん重積状態などの脳エネルギー代謝障害は比較的類似した神経細胞死を起こすことがよく知られている。近年，このような疾患での神経細胞死の共通メカニズムとしてグルタミン酸毒性に注目が集っている。グルタミン酸による神経細胞死の仮説を支持する実験事実は豊富であり，脳のエネルギー代謝障害の初期に細胞外腔に放出されるグルタミン酸が神経細胞死の引き金を引くという仮説は広く支持されている。短時間の脳虚血では海馬の CA1 領域の神経細胞が特に脆弱であり，遅発性神経細胞死に陥る。この病変は初期のグルタミン酸の上昇からはるかに遅れて進行する。海馬 CA1 神経細胞のこのような脆弱性を規定する要素が何であるか（恐らく受容体の特性であろう）を知ることが重要である。われわれは，ごく短時間の脳虚血が海馬の神経細胞を殺さず，むしろ次の虚血に対して神経細胞を耐久性にする（虚血耐性）事実に注目し，虚血による細胞死における最も重要なステップに迫りたいと思っている。

(12) 虚血海馬スライス標本における PI 代謝系の動態

坪川　宏，川合述史（自治医大・第一生理）

海馬 CA1 の錐体細胞は，短時間の全脳虚血を施すと数日かかって選択的に死んでゆくことが知られている。このような細胞の機能的障害について調べるために，虚血後のスナネズミの海馬スライス標本を用いて CA1 野錐体細胞にホールセル・クランプ法を適用し，電気生理学的性質を解析した。その結果，虚血後の CA1 野錐体細胞は入力繊維の刺激により不可逆的な脱分極を起こすこと，その脱分極は細胞内 Ca^{2+} の増加に起因することがわかった。さらに，この場合の細胞内 Ca^{2+} の増加はイノシトール 3 リン酸 (IP_3) の作用のみでは説明できず，他のイノシトールリン酸 (PI) 代謝物も関与することが示唆された。正常及び虚血スナネズミへの抗フォスファチジルイノシトール 2 リン酸 (PIP_2) 抗体やイノシトール 4 リン酸 (IP_4) の細胞内投与により，虚血後の錐体細胞では PI 代謝系の異常により IP_4 が産生されやすいことが推測された。

3．「第７回大脳基底核研究会」

1992年７月15日－16日
代表者　彦坂興秀
世話人　彦坂興秀

(1)　大脳基底核は何のためにあるのか？―＜仮説＞
彦坂興秀（生理研・高次神経性調節）

(2)　サル黒質の層構造と尾状核―黒質―上丘投射について
徳野博信（京都大医・高次脳形態）

(3)　尾状核―黒質網様部―上丘系による眼球運動の制御
宮下暢夫（生理研・高次神経性調節）

(4)　中脳橋被蓋ニューロンへの黒質網様部からの抑制性入力
―細胞内記録・細胞内染色法による解析―
野田照実（福井医大・第一生理）

(5)　尾側 PPN 刺激により誘発される筋トーヌス抑制
神山　潤（東京医歯大・小児科）

(6)　大脳基底核と咀嚼
中村　智（自治医大・脳神経内科）

(7)　大脳基底核からの下行路
発声との関係 (periaqueductal gray)
坂本尚志（千葉大・医・第一生理）

(8)　淡蒼球―視床―皮質路
南部　篤（生理研・統合生理）

(9)　大脳皮質運動領野と基底核の機能連関
蔵田　潔（東北大・医・第二生理）

(10)　視床下核―淡蒼球投射と上肢運動の制御
浜田生馬（東京都神経研・神経生理）

(11)　サル視床下核における視覚刺激と眼球運動に関連する細胞活動
小島　淳（生理研・高次神経性調節）

(12)　条件付け学習に伴う線条体ニューロン活動の変化とドーパミン系の関与
木村　實（大阪大・健康体育部・身体分化学）

(13)　淡蒼球における眼球運動関連ニューロンの活動
加藤　誠（生理研・高次神経性調節）

【討論参加者】

徳野博信（京都大），野田照実（福井医大），神山　潤（東京医歯大），中村　智（自治医大），坂本尚志（千葉大），蔵田　潔（東北大），浜田生馬（東京都神経研・神経生理），木村　実（大阪大），彦坂興秀，宮下暢夫，加藤　誠，宮内　哲，小島　淳，稲瀬正彦，南部　篤，松崎竜一，加藤美弥，中村加枝（生理研），今井壽正，水野美邦，横地房子，三輪英人（順天堂大），内海裕也（東京医大），宇川義一，上坂義和，村田美穂，寺尾安生，坂井克之，市川弥生子，花島律子，大木紫，桜井正樹（東京大），吉田充男，藤本建一，山田　浩，村松慎一（自治医科大），田丸冬彦，丸山哲弘（鹿教湯病院神経内科），大江千廣，平戸政史，高橋章夫，渡辺克成（群馬大），長崎浩（東京都老人研・運動機能），高田昌彦（京都大），岡田明彦（鹿児島大），野本正弘，後藤孝史，岩田真一（鹿児島大），藤田正明（東北大），長谷川康夫（鈴鹿医療科学技術大），大野忠雄，杉野一行，福田光洋，中野渡詔子（筑波大），加知輝彦（国立療養所中部病院神経内科），玉城允之（関東逓信病院神経内科），有田秀穂，坂本正裕（東邦大），加藤元博，島　史雄，山口辰巳（九州大），中村利生（三郷順心病院脳神経内科），藤本定一（宇部興産中央病院神経内科），岩川善英，下平雅之，糀　敏彦，田沼直之（東京医歯大），福田秀樹（労働省産業医学総合研究所），林　明人，吉澤利弘，小國英一，石井亜紀子，望月昭英（筑波大），山本正彦（国立療養所中部病院），川崎仁志（昭和大），陣内晧之祐（滋賀医科大），植竹公明，瀬川昌也，野村芳子（瀬川小児神経学クリニック），豊島　至（秋田大），長谷川一子，三富哲郎，梁　正淵，糠沢達志，青戸和子，溝井令一（北里大），中野勝磨（三重大），岩崎愼一，高草木護（埼玉医科大），佐橋　功，中尾直樹（愛知医大），楢林博太郎（神経科クリニック），中島八十一（順天堂伊豆長岡病院脳神経内科），伊藤昌弘，苗木　昇（東京都神経研），長谷川毅（都立墨東病院小児科），山村安弘（広島大），小林　治，福水道郎，石川　充，遠藤千晶（国立精神神経センター武蔵病院），浜野晋一郎（埼玉県立小児医療センター），南谷幹之（慈恵医大），大築立志（奈良女子大），山下純正（神奈川県立こども医療センター），近藤　勢，花川　徹，牧慎一郎，松本近幸（大阪大），根岸俊文（群馬大），田森佳秀（理化学研究所思考ネットワーク），渋谷浩司（国立診療所北潟病院），横地正之（東京都神経研）

【研究会概要】

本研究会は大脳基底核の機能および大脳基底核疾患の発症原因について，日本の基礎医学と臨床医学の研究者が一堂に会して討論を行うものである。基礎と臨床の研究者が自由な雰囲気で討論し交流を深めるユニークな研究会である。7回目を数えた今回は，「大脳基底核による運動制御のメカニズム」をテーマに，1）大脳基底核からの下行路，2）大脳基底核からの上行路，および3）大脳基底核の内部回路がそれぞれどのような役割を担っているのかについて，主に基礎系の研究者の方々にその最新の知見を発表していただいた。参加者は約110名で，その多くは臨床系の方々であったが，臨床系，基礎系双方から活発な討論が行われ，お互いの関心が高まっていることが実感でき，有意義な研究会となった。

(1) 大脳基底核は何のためにあるのか？—＜仮説＞

彦坂興秀（生理研・高次神経性調節）

中枢神経系は階層的なメカニズムから成る。脊髄・下部脳幹には運動パターンの発生装置がある。たとえば，歩行運動は脊髄，そしゃくは延髄網様体，眼球運動は延髄・橋・中脳網様体にその基本的な発生機構が存在する。これらは生得的に備わった運動パターンである (Fig 1. Fixed Pattern Generator)。しかし，これらの運動は外的・内的環境によって誘導されることによってはじめて目的的なものとなる。そのような目的的行動はおおくの場合，いくつかの運動が複合したものとして現れる。このような統合的な機構は橋・中脳境界の被蓋部に集中して存在する (Fig 1. Fixed Action Generator)。上丘（眼球・頭の定位運動）・PPN (Pedunculo-pontine nucleus)（歩行・姿勢の制御）・中脳中心灰白質 PAG（発生・呼吸）・中脳網様体（そしゃく）などである。

しかしこれらの運動への内的・外的欲求はそのままでは収拾のつかないほど過大なものになるだろう。それを制御するためには強力な抑制機構が必要となる。大脳基底核はそのような抑制機構として出現したと考えられる。基底核の主要な出力部である黒質網様部 (SNr) と淡蒼球内節 (GPi) は，ともに高頻度に発火する GABA 作動性の抑制性ニューロンからなり，これらの橋・中脳運動領域に投射する (Fig 2)。眼球サッケードの制御にその典型がみられる。しかし基底核の作用は運動の抑制にはとどまらない。その持続的な抑制を取り除くことによって積極的に運動を発現させる力をもつ（脱抑制，Fig 2)。それは線条体（尾状核・被殻）からの抑制（やはり GABA 作動性）によって黒質・淡蒼球が一過性に抑制されることによっておこなわれる。それは運動を選択する機能である。

基底核のもうひとつの作用様式はその抑制をさらに強めることである (Fig 2)。視床下核は SNr と GPi に興奮性結合をもち，その活動によって結果的に運動を抑制する働きをもつ。したがって，視床下核の破壊や活動低下によって不随意運動がおこる。視床下核は大脳皮質から直接の興奮性入力と〈線条体—淡蒼球外節 (GPe)—視床下核〉（ともに GABA 作動性抑制性結合）の間接的入力（脱抑制）を受ける。運動の方向などに選択的な情報を運ぶ〈線条体— SNr 結合〉（直接経路）とは異なり，この間接経路によって運ばれる情報は非選択的であり，運動の発現を抑制的に補佐する役割をもつ。

系統進化にともなって脳は大脳皮質を獲得し，運動を学習することが可能となった (Fig 1. Learned Action/Pattern Generator)。大脳基底核の抑制的・選択的機能はここでも発揮される。視床を媒介として大脳皮質も同様に基底核のターゲットとなった。しかし，十分に計算された情報がなくては，基底核は適切な選択をおこなうことはできない。基底核は大脳皮質をそのターゲットとする一方で，大脳皮質からの精緻な情報を受けるようになった。このようにして大脳皮質と基底核の相互にはループ回路が形成される。

しかしこれだけでは脳は与えられた情報に応答する機械にすぎない。状況を先取りして行動す

Functions of the basal ganglia

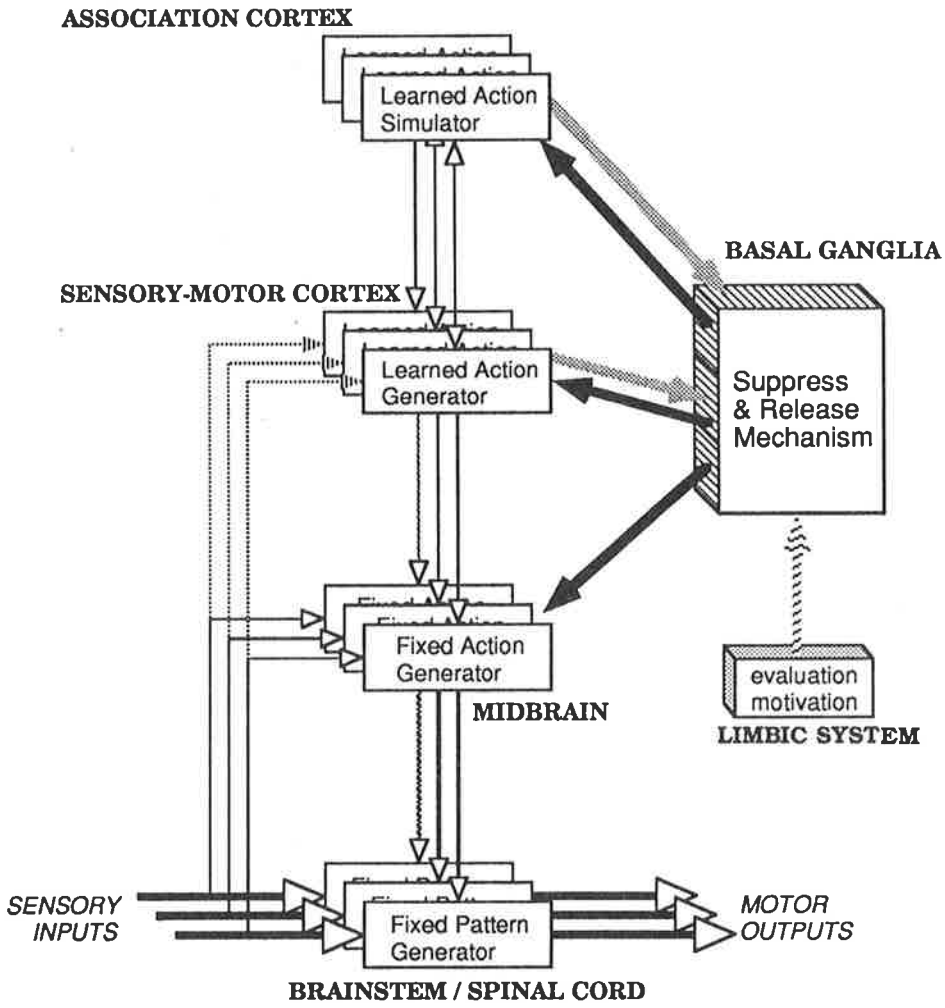


Figure 1

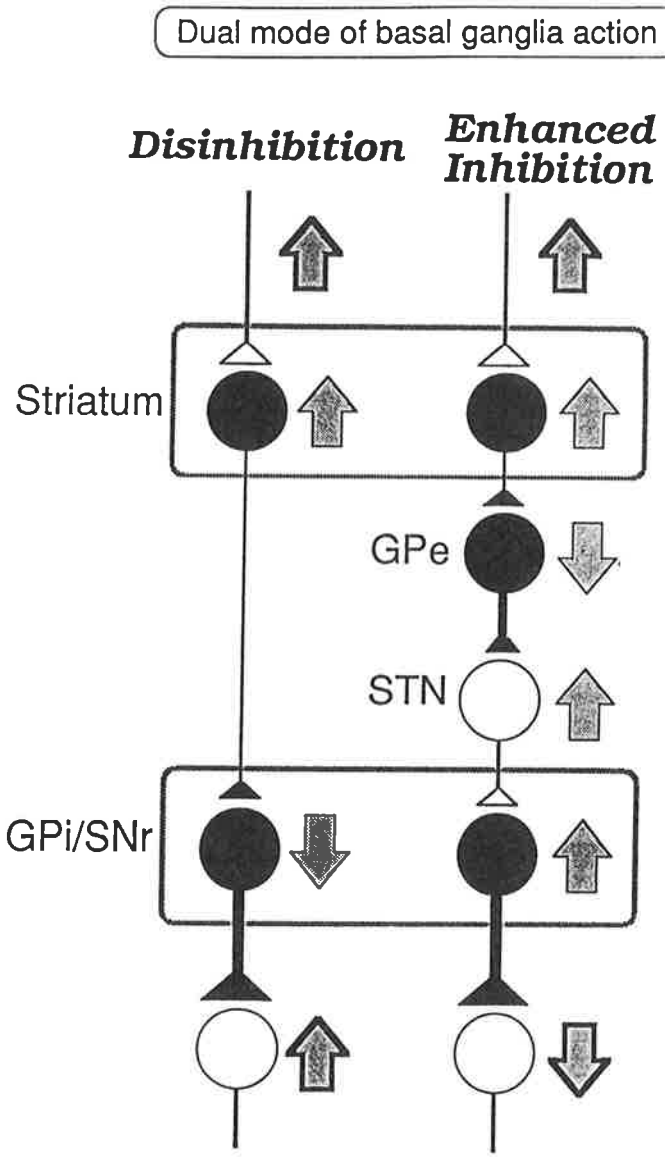


Figure 2

GPe	globus pallidus, external segment
GPi	globus pallidus, internal segment
STN	subthalamic nucleus
SNr	substantia nigra, pars reticulata

○ excitatory neurons
● inhibitory neurons

ることによってはじめて随意性が獲得される。それは大脳基底核と大脳皮質連合野との相互的結合によってもたらされた。連合野の情報は直接には運動出力となって現れない。情報を蓄え，行動をシミュレートする (Fig 1, Leaned Action Simulator)。そのような記憶依存性あるいは予測的な情報にもとづいて基底核は運動の選択をすることができる。そして同時に連合野の情報の選択もおこなう。大脳基底核はこのようにして大脳皮質における記憶の形成においても重要な役割をもつようになったのであろう。

(2) サル黒質の層構造と尾状核—黒質—上丘投射について

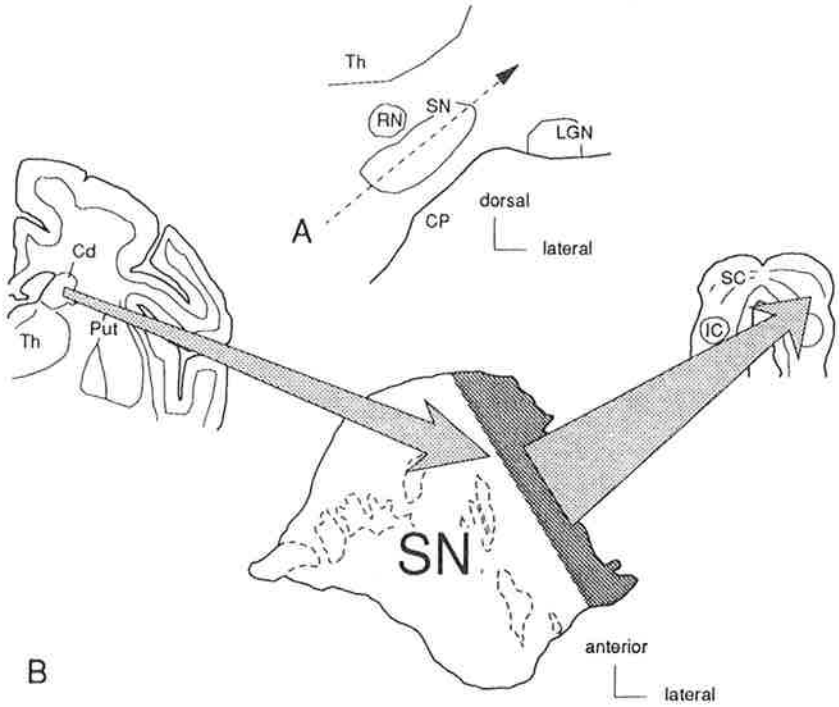
徳野博信（京都大・医・高次脳形態）

黒質網様部の入出力関係を把握するために，筆者は黒質の準水平断切片（図A参照）を作成し，軸索輸送を利用した順行性ならびに逆行性標識法により検討してきた。これまでの実験はネコについて行ない，黒質網様部に「ある種の層構造」が存在することを示すことができた。[Neuroscience (1990) 38:255-270]

最近，準水平断切片を用い，サルにおいてもネコと同じく黒質網様部に層構造が存在することを明らかにすることができた。すなわち，黒質における尾状核および被殻からの終末は前内側から後外側にむかう方向に帯状に終止し，また，上丘に投射する黒質細胞も前内側から後外側にむかう方向に帯状に分布することが明らかになった。これらの所見を比較検討することにより，特に尾状核の体部が黒質網様部の前外側縁領域を経由して上丘深層に連絡することが示唆された（図B）。さらに，尾状核の体部は皮質の前頭眼野の入力を受けていることも見いだされた。以上の結果は眼球運動制御における基底核の役割を示してきたこれまでの電気生理学的実験の結果，とりわけ眼球運動に関連するニューロンの基底核内の分布についての所見を支持するものであるだけでなく，それを担う黒質の領域を解剖学的に特定できたという点で意義のあるものと考えている。

A　黒質の準水平断切片の方向（破線）を示す。CP, 大脳脚； LGN, 外側膝状体； RN, 赤核； SN, 黒質； Th, 視床

B　尾状核—黒質—上丘投射と黒質内での中継領域。Cd, 尾状核； IC, 下丘； Put, 被殻； SC, 上丘； SN, 黒質； Th, 視床



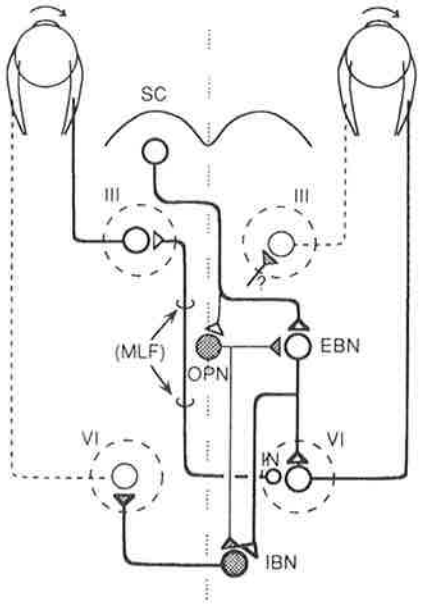
Caudato-nigro-tectal link

(3) 尾状核—黒質網様部—上丘系による眼球運動の制御

宮下暢夫（生理研・高次神経性調節）

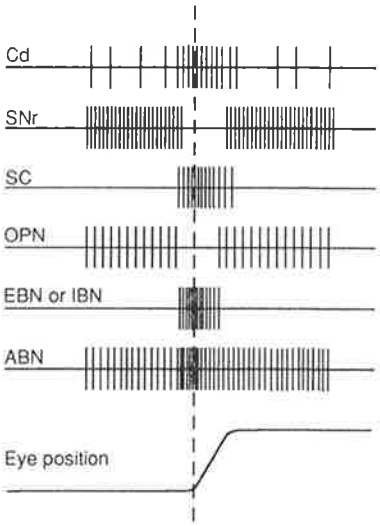
眼球運動は脳の指令によって筋肉が収縮して起こる点では，四肢の運動と同じである。しかし，手足の運動はたくさんの筋肉が一定の組み合わせで収縮し，その連続でさまざまなパターンの運動を実現するのに対して，眼球運動の目的はただひとつ，ターゲットに対して foveation することである。この foveation の方法にはサッケードとスムースパーシュート (smooth pursuit) の 2 種類がある。サッケードは上丘から脳幹網様体のサッケードジェネレータに信号が伝えられて引き起こされる。上丘（その中間層および深層）は感覚性入力（視覚，聴覚，体性感覚など），皮質性入力（運動野，運動前野，前頭眼野，連合野など），皮質下性入力（下丘，黒質網様部など），

Neural Organization of the horizontal saccade generator

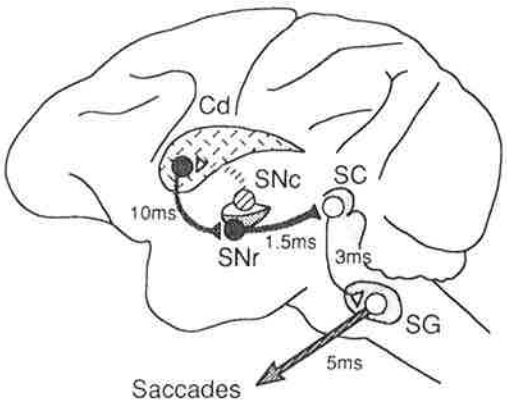


Excitatory neuron
Inhibitory neuron
Active pathway
Inactive pathway
Inhibited pathway

Typical discharge pattern of each neuron



Eye movements control by the basal ganglia



numbers indicate conduction time of the pathways

Excitatory neuron
Inhibitory neuron(GABAergic)
Modulatory neuron(Dopaminergic)

Abbreviations

ABN; abducens motoneuron
Cd; caudate nucleus
EBN; excitatory burst neuron
IBN; inhibitory burst neuron
IN; internuclear neuron
OPN; omnipause nueron
SC; superior colliculus
SG; saccade generator
SNc; substantia nigra pars compacta
SNr; substantia nigra pars reticulata

小脳核からの入力などさまざまな入力を受けており，これらを統合していると考えられるが，眼球運動に直接関係のある入力は前頭眼野，後頭頂野，黒質網様部などからである。このうち，黒質網様部からの入力だけが抑制性（GABA 作動性）である。黒質網様部のニューロンは50から100Hz という速い頻度で常時活動しており，上丘を強く抑制している。この抑制が一過性に休止する（脱抑制）ことによってサッケードが引き起こされる。さらに黒質網様部は尾状核からGABA 性の抑制性入力を受けている。尾状核のニューロンは普段はほとんど活動しておらず，何かの期待をもってサッケードを行ったときや，記憶にもとづいてサッケードをしたときなど，特殊な状況下で一過性に発火するものが多い。すなわち，このような状況下で尾状核は黒質網様部を一過性に抑制し，上丘の脱抑制を引き起こすトリガーとなると考えられる。

本研究会では，まず脳幹部のサッケードジェネレータについて概説し，次にサルの上丘および尾状核の刺激実験から，尾状核—黒質網様部—上丘系の神経回路網を電気生理学的に解析した結果を示す。最後にサルの片側尾状核に MPTP を注入したときの眼球運動の変化から大脳基底核におけるドーパミン系の役割と，尾状核の機能について考察したい。

(4) 中脳橋被蓋ニューロンへの黒質網様部からの抑制性入力
—細胞内記録・細胞内染色法による解析—

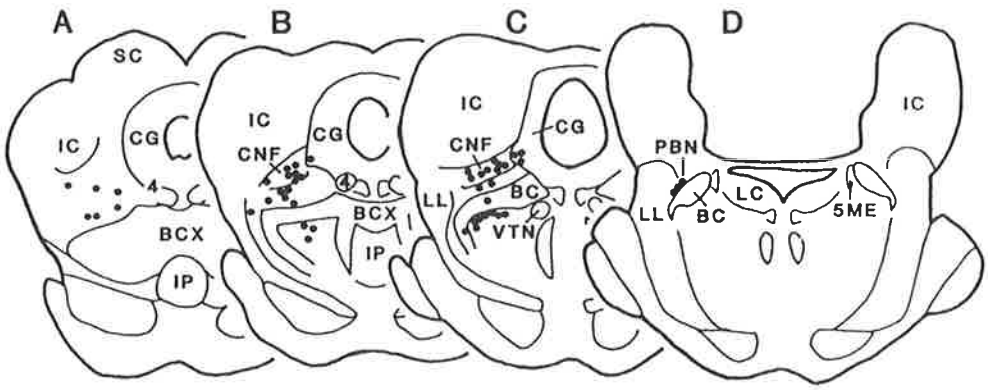
野田照実（福井医大・第一生理）

ネンブタール麻酔下のネコを用いて，大脳基底核出力部の一つの黒質網様部に電気刺激を加え，中脳橋被蓋ニューロンに生じるシナプス応答を細胞内記録法により解析した。その結果，中脳橋被蓋ニューロンに短い潜時（約２ミリ秒で抑制性シナプス後電位 (IPSP) が発生することが明らかとなった。また，このような黒質からの抑制を受ける被蓋ニューロンが，小脳核の電気刺激に対して反応することはきわめてまれであり，このことは中脳橋被蓋でも視床と同様，大脳基底核出力と小脳出力との間に収束が起こっていないことを示している。

つぎに，黒質の電気刺激に抑制性応答を示す中脳橋被蓋ニューロンの正確な局在分布を明らかにするため，細胞内 HRP 染色法を用いて，記録細胞の形態学的同定を試みた。合計48個のニューロンについて，細胞内記録，ならびに，形態学的な同定を行なった。それらのニューロンの解剖学的位置を下の図に黒丸で示す。すなわち，脚橋被蓋核 (PPTN)26個，楔状核 (CNF)13個，中心灰白質 (CG) ４個，結合腕傍核 (PBN) ３個，その他，２個であった。これらの被蓋ニューロンは細胞体の大小にかかわらず，きわめて広範な樹状突起の広がり（内外方向１～２ mm，背腹方向0.5～１ mm）を有していた。

本結果は黒質被蓋投射によって，中脳橋被蓋のさまざまな神経核の活動が抑制を受けることを示しているが，その機能的な意義付けについては，今後の研究に俟たねばならない。

［黒質網様部から抑制を受ける中脳橋被蓋ニューロンの分布］



(5) 尾側 PPN 刺激により誘発される筋トーヌス抑制

神山　潤（東京医歯大・小児科）

Pedunculopontine Nucleus （PPN ；脚橋核）についての最初の記載はヒトでなされ，赤核の尾側端から Parabrachial Nucleus のレベルにかけて，上小脳脚と密接に関連して存在する，大型の濃染されるニューロン群とされている。近年免疫組織化学染色法の開発とともに，Choline acetyletransferase 陽性のニューロン（コリン作動性ニューロン）を多数含むニューロン群として Ch5 が同定され，それは主として PPN 内に分布することが明らかとなってきた。ラットではかなり明瞭な境界を有するこの CH5 群のニューロン群も，ネコでは明確な細胞構築学的な境界を有しておらず，このためにネコの PPN の定義は，研究者により多少異なる。コリン作動性という観点を重視し，その尾側部 (pars compacta) では，Cuneiform Nucleus （CNF ；楔状核）や Brachium Conjunctivum （BC ；結合腕）の外側部も含める立場［1］がある一方，基底核からの入力，なかでも黒質網様質からの線維結合に重点をおいて，PPN に CNF は含めず，中脳歩行誘発野 (Mesencephlic Locomotor Region ; MLR) （機能的な呼称である MLR は，解剖学的には CNF とほぼ一致すると言われている）の吻側かつ腹側に PPN pars compacta は位置するとする立場もある［2］。さらに CNF, 中心被蓋野，橋被蓋野，及び上小脳脚周囲のコリン作動性ニューロンを含めて広く PPN area として扱う立場もある［3］。

PPN area から視床への上行性の投射は脳波の脱同期との関連で詳細に検討されているが，この他 PPN area は，基底核群および，青斑核，縫線核を含む脳幹網様体とも広く相互に線維結合

があり，基底核と脳幹網様体とを中継するという特異で重要な位置を占めている。そのうえ機能的にはとくにその尾側部が，先にも述べたMLR, さらにpontine taste area, 排尿中枢，呼吸調節中枢や血圧に変動を与える領域とも一部overlapするほか，睡眠要素の発現にも重要なことが知られている［4］。

1983年，Mori, Kawahara and Sakamotoは，除脳ネコのCNF辺縁部への微少連続電気刺激が，後肢筋の筋トーヌスを両側性に減弱させることを報告した［5］。一方Lai & Siegelは，除脳ネコのPPNへの電気刺激が，頚筋及び前肢伸筋の筋トーヌスを両側性に減弱させることを報告した［6］。ところで先にも述べたように，PPN, MLR, CNFの相互関係には未だ統一された見解はない。そこで本研究は，除脳ネコのMLR近傍部への微少連続電気刺激によりもたらされる両側性の筋トーヌスの減弱について，その至適刺激部位のMLRあるいはCNFとの関連，及びその発現に関わる神経機構の解明を目的として行なわれた。

【結果】

1．MLRの吻側部で外側部かつ腹側部への刺激が，除脳ネコの両側の頚部，前肢，および後肢の伸筋の筋トーヌスを減弱させた。

2．この至適刺激部位は，CNFの外腹側縁からBCの外側縁周囲に至る領域に一致し，PPNの尾側部に相当すると考えられた。

3．この刺激効果は，アトロピン（静脈内投与及び吻側橋網様核への微量注入）により一過性に消失した。

4．同様の部位への刺激は，後肢伸筋及び屈筋支配α運動細胞に，両側性に抑制性シナプス後電位を誘発した。

【結論】

1．尾側PPNへの電気刺激は，下行性に，両側性かつ非相反的にα運動細胞にシナプス後抑制をもたらす神経系を賦活する。

2．この神経系の活動には，ムスカリン性コリン受容性ニューロンの活動が関与している。

なお本研究は，旭川医科大学生理学第二講座（主任森茂美教授）において，森教授のご指導のもと，高草木薫講師，松山清治助手，小林吉史助手，さらに大学院生の岡哲夫医学士，岩切裕昌医学士の協力で行われた。付記して謝意を表す。

【参考文献】

1）Garcia-Rill, E. and Skinner, R. D..In M. Shimamura, S. Grillner and V. R. Edgerton (Eds.), Neurobiological Basis of Human Locomotion, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1991, pp. 137-158.

2）Moon-Edley, S. and Graybiel, A. M., J. Comp. Neurol., 217 (1983) 187-215.

3）Kang, Y. and Kitai, S. T., Brain Res., 535 (1990) 79-95.

4）Shouse, M. N. and Siegel, J. M., Brain Res., 571 (1992) 50-63.

5）Mori, S., Kawahara, K. and Sakamoto, T., In A. Roberts and B. Roberts (Eds.), Neural Origin of

Rhythmic Movements, Cambridge University Press, Cambridge, 1983, pp. 445-468.
6) Lai, Y. Y. and Siegel, J. M., J. Neurosci., 10 (1990) 2727-2734.

(6) 大脳基底核と咀嚼

中村　智，村松慎一，吉田充男（自治医大・神経内科）

【はじめに】

大脳基底核が咀嚼に関与することは，ドーパミン作動薬の全身投与によって，咀嚼と同様の下顎のリズミカルな運動 Rhythmical Jaw Movement (RJM) が生じることなどにより間接的に示されている。そこで我々は，RJM に対する基底核の関与を明らかにするため，線条体の薬理学的操作を行い，興味深い結果を得た。

【方法】

ウィスターアルビノラット50匹を用い，ペントバルビタール浅麻酔下に定位的に GABA 拮抗薬であるピクロトキシン (PTX) 1 μg/μl を線条体に注入した。注入部位は，前肢の不随意運動が誘発されやすい部位よりも吻側とした。一部の動物では，大脳皮質の関与を調べるため，前頭葉皮質の広範な吸引を行った。さらに一部のものでは，線条体への入出力を遮断するため，大脳皮質の広範な吸引に加え，視床，黒質との線維連絡の決断を行った。線条体及び黒質網様部の神経細胞活動の変化をエルジロイ電極で記録した。また，大脳皮質の電位及び咬筋の筋電図を記録した。記録部位は組織学的に同定した。

【結果】

PTX 注入後，約 5 分で線条体に sporadic spike が出現し始め，次第に振幅，持続時間及び頻度を増し，それに伴って顎の閉口運動が出現してきた。さらに約 9 分後には，2-11Hz の Rhythmical Potential Formation (RPF) が出現し，それに伴う RJM が認められた。前頭葉皮質を除去しても線条体に RPF が出現し，RJM が観察された。さらに，RPF は線条体への入出力を遮断してもみられ，それに対応した線条体神経細胞の発火が見られた。一方，黒質網様部では記録した神経細胞の大部分で，RPF と関連して抑制が認められた。

【考察】

咀嚼とは，口腔内の食物を切断粉砕し唾液を付加し，咽頭方向へ運搬して嚥下にいたるまでの，咀嚼筋，舌筋，顔面筋などの協調運動である。その基本的パターンは，閉口筋と開口筋の交互の収縮による下顎のリズミカルな運動から構成され，そのリズムは中枢性リズム機構により形成されると考えられている。咀嚼のモデルとして，大脳皮質咀嚼野の連続電気刺激により誘発される RJM があり，この RJM における中枢性リズム形成機構は，延髄内側部網様体を中心とする下位脳幹の網様体に存在することが示されている。生理的な咀嚼においても，延髄網様体において咀

嚼のリズムとお一致した発射頻度の変動を示すニューロンが観察されており，大脳皮質咀嚼野→錐体路→下位脳幹中枢性リズム形成機構→運動ニューロン→咀嚼筋の系によりリズミカルな下顎の運動が行われていると考えられている。しかし，一方では，除脳動物や無脳児においても咀嚼様の運動が認められることより，咀嚼の発現には大脳皮質は必ずしも必要でないと考えられ，大脳皮質より下位のレベルで咀嚼の発現が調節されている可能性がある。

従来より，基底核が咀嚼に関与することは，線条体や黒質，淡蒼球などの電気刺激によりRJMが生じること，ドーパミン作動薬の全身投与によりRJMが生じること，臨床的に，基底核との関連でラビット症候群や口舌下顎ジスキネジアなどの不随意運動が出現すること，などにより間接的に示されていた。今回，線条体の薬理学的操作により，線条体にリズミカルな細胞外電位の変動が出現し，それに伴い咀嚼様運動が誘発されたことは，基底核がRJMの発現に関与することを直接的に示すものである。さらに，この咀嚼様運動は，運動野を含む前頭葉皮質の吸引除去後も出現したことより，基底核から大脳皮質を介さない下降性の経路を経て，脳幹の中枢性リズム形成機構に影響を及ぼして，下顎のリズミカルな運動を誘発したものと考えられた。単一ニューロン活動の観察では，この運動の発現過程で，線条体細胞の周期的発火及び黒質細胞の抑制が認められ，脱抑制の機序により咀嚼様運動が出現したと考えられた。従って，基底核は咀嚼の発現に密接に関与していると考えられ，脳幹部へ直接下降していく経路により，脱抑制により中枢性リズム形成機構を賦活化し，咀嚼を発現させている可能性が考えられた。

【結論】

線条体の薬理学的操作により，咀嚼様運動が誘発された。この運動の発現過程で，線条体細胞の周期的発火及び黒質細胞の抑制が認められ，さらに大脳皮質が直接関与しない下降性の経路を経て，脳幹の中枢性リズム形成機構に影響を及ぼすものと考えられた。生理的な咀嚼においても，基底核の下降性の経路により，中枢性リズム形成機構に影響を与えている可能性が考えられた。

(7) 大脳基底核からの下行路 発声との関係 (periaqueductal gray)

坂本尚志（千葉大・医・第一生理）

ヒトと動物の大きな差は，いわゆる言語を持つか否かにある。しかし，動物も発声器官を持ち，音声をコミュニケーションの手段として用いていることは良く知られている。ヒトと動物の発声の大きな差は，ヒトは複数音を組み合わせて語音として発するが，動物は一種類のスペクトルを持つ音声を鳴き声として発する点である。複数音を組み合わせて，複雑な情報内容を持つ“ことば”を形成する言語機能に関しては，上位中枢である大脳皮質連合野が重要な役割を果たしていることは明かである。しかし，呼息時に声帯を閉鎖し，振動させ音声を発するという基本的運動

パターンは，ヒトにおいても動物においても共通している。

私どもは，言語機能を考える上で，動物モデルにおいては，１．下位運動中枢における基本的運動パターンの形成機構の解析，および２．上位中枢による基本的運動パターンの発現の制御機構の解析が可能と考え，研究を進めている。

１．下位運動中枢における基本的運動パターン形成機構について

はじめに，発声に関与する基本的運動パターンが下位脳幹において形成されていることを，除脳動物における発声誘発モデルを用いて解析した。

中脳前縁で脳幹を切断した除脳ネコに，タングステン微小電極を用い連続微小電気刺激を加え，発声を誘発した。発声誘発部位は，下丘レベルにおいては橋腹外側部で錐体路背側部および内側毛帯腹側部近傍の脳幹網様体内に，背腹側方向および内外側方向約 0.5-1.0mm の範囲に限局して存在した。吻尾側方向には，橋から延髄へと連続して分布し，延髄下部の内喉頭筋運動細胞の存在する疑核レベルまで分布していた。

音響音声学的解析により，誘発された発声と正常の鳴き声の基本振動数，スペクトル分布に有意の差は認められなかった。筋電図学的解析により，呼吸位相に伴った声門開大筋と声門閉鎖筋の相反的活動が，正常時と同様に誘発されることが明かとなった。

刺激開始後の呼吸リズムの解析から，刺激によって，発声に伴って新たな呼吸リズムが形成されていることが明かとなった。気管切開を行い，呼息相を短縮させると，呼吸リズムは変化するが，内喉頭筋の相反的活動パターンは維持されることから，肺からの求心性入力が発声において内喉頭筋と呼吸筋を統合する上で重要であることが明かとなった。

橋から延髄にかけて刺激の閾値は一定で，誘発される運動パターンも一定であることから，橋・延髄に加えた連続微小電気刺激は上位運動中枢からの下行性経路を刺激していること，また基本的運動パターンは上位中枢からの入力と末梢求心性入力との相互作用によって，下位脳幹において形成されていることが推測された。

２．基本的運動パターン発現における上位運動中枢による制御機構について

次に，発声に関与する上位運動中枢を解析するために，ケタミン麻酔下に正常な脳を持つネコにおいて発声誘発を試みた。

ケタミン麻酔下においても，除脳動物と同様な橋・延髄に連続した発声誘発部位が認められた。中脳レベルにおいては，発声誘発部位は次第に背側に分布し，中心灰白質の腹外側部およびその外側の脳幹網様体に認められた。音響音声学的解析および筋電図学的解析では，正常の鳴き声と有意の差は認められなかったが，電極位置が，橋腹外側の発声誘発部位から背側の中心灰白質周囲に移動するに連れ，閾値が上昇する傾向が認められた。

解剖学的分布は連続していながら，電気刺激の閾値の上昇が認められることから，中心灰白質およびその周囲の脳幹網様体に神経細胞体が存在し，そこからの下行性の軸索を刺激している可能性が示唆された。微小化学刺激法を用いた中心灰白質へのグルタミン酸 Na 注入実験から，橋・延髄発声誘発部位は中心灰白質の細胞体から発する神経線維を刺激していることが明かとなった。

次に，中心灰白質のさらに吻側に位置する構造の機能的役割を解析するために，切断実験（視床動物，中脳動物）を行った。

視床吻側で，黒質を残して大脳皮質および線条体を切断した場合，橋・延髄発声部位に加えた刺激は無効であった。しかし，中脳吻側で切断し，黒質を除去すると，同じ電極部位に加えた刺激によって発声誘発が可能であった。

このことは，視床吻側から中脳吻側までの間の構造が，中心灰白質から発する下位運動中枢への下行性経路の活動に抑制的な影響を与えている可能性を示唆する。

以上の結果をふまえて，下位運動中枢において形成される自動運動の発現機構に関与する大脳基底核からの下行路の機能的役割について考察を加える。

(8) 淡蒼球—視床—皮質路

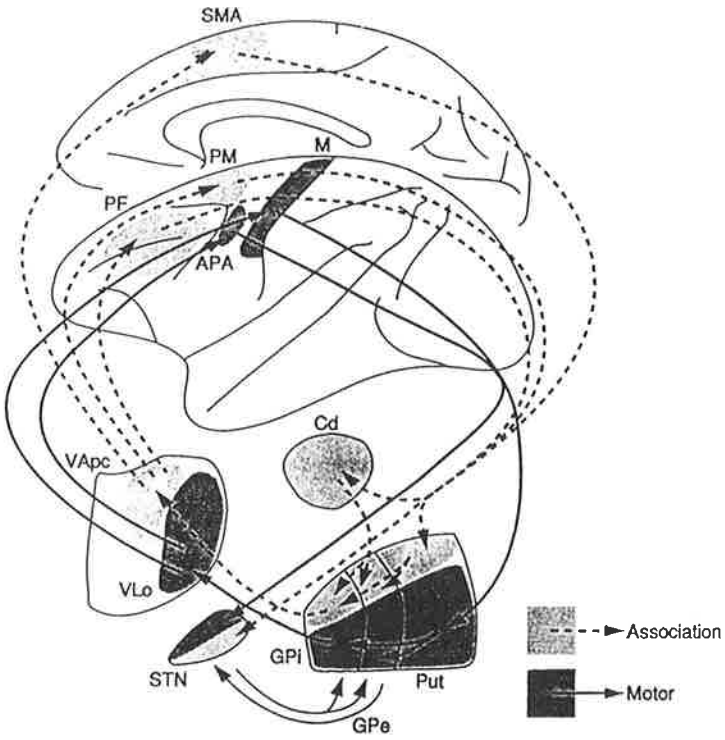
南部　篤（生理研・統合生理）

光に応じてレバー挙げをする様に訓練したサルの視床，淡蒼球から単一ニューロン活動を記録した。使用した課題は，反応時間運動，遅延 go/no-go 弁別課題，自己ペース運動などである。ニューロンの入出力を同定するため，あらかじめ刺激電極を慢性的に様々な大脳皮質領野，小脳核，淡蒼球，尾状核，被殻などに埋めこんでおいた。

淡蒼球内節から入力を受ける視床ニューロンは，大脳皮質の運動前野，補足運動野ばかりでなく運動野（4野）にも投射しており，運動野に投射する視床ニューロンは，VLo 核に存在した。淡蒼球入力を受け運動野上肢領野に投射する視床ニューロンの約2/3は，運動に関連して活動を変化させ，そのうちの約1/3が筋電図に先行していた。小脳核から入力を受け運動野上肢領野に投射する視床ニューロンと，発射活動の開始時間を比較したが，両者の間に差は見い出せなかった。このような運動に関連した活動は，淡蒼球の尾腹側に存在するニューロンにも認められる。これらの淡蒼球ニューロンは，運動野から被殻を経由して入力を受けており，その一部は視床 VLo 核に投射していた。また運動野上肢領野から入力を受ける淡蒼球ニューロンの1/3以上が，筋電図に先行して発射活動を変化させた。

一方，淡蒼球入力を受け，運動前野，補足運動野に投射する視床ニューロンは，主に VApc に存在した。補足運動野に投射する視床ニューロンの約2/3は，遅延 go/no-go 弁別課題の遅延期に持続的な発射活動の変化を示した。このような持続的な発射活動や光刺激に応答するような活動は，淡蒼球の吻背側に多く見つかる。これらのニューロンは，前頭前野，運動前野，補足運動野などから収束性の入力を受けていた。

これらの結果は，次のようなことを示唆する（下図参照）。大脳皮質—線条体—淡蒼球—視床—大脳皮質投射は，少なくとも2つのループに分類される。第一は，皮質運動野から被殻を経由



して淡蒼球の尾腹側に至り，視床 VLo 核を介して運動野に戻る系で，運動に関連した情報を運んでいると考えられる。これらの活動が，小脳核—視床—運動野の系と同じように運動に先行して発射することから，大脳基底核が運動の開始にも関わっている可能性がある。第二は，前頭前野，運動前野，補足運動野から尾状核あるいは被殻の一部を経由して淡蒼球の吻背側に収束し，視床 VApc 核を介して，前頭前野，運動前野，補足運動野に戻る系で，運動の準備や，認知などに関係すると考えられる。

(9) 大脳皮質運動領野と基底核の機能連関

蔵田　潔（東北大・医・第二生理）

大脳皮質には一次運動野以外にも運動関連領野が存在することは広く知られているが，それらの非一次運動野について，近年多くの知見が得られ，従来の概念は変更を迫られつつある。非一次運動野として補足運動野と運動前野が存在することが知られているが，これら運動関連領野には，運動の開始の直前から遂行中に変化するニューロン活動（運動関連活動，movement-related

activity）と，運動開始前の準備期間中に次に行うべき運動の指示をするとそれに応答して持続的に活動の変化するニューロン（予期的準備活動，set-related activity）とが存在し，それぞれ運動の遂行過程と準備状態の形成とに役割を果たしていると考えられいる。さらに，運動前野は著明な予期的準備活動の存在する背側部と，運動関連活動が選択的に存在する腹側部とに分けることができると思われる。また，これらとは別に，これまで運動に関連するとはみなされていなかった領域が運動領野として機能していることも示唆されている。すなわち，大脳皮質には運動関連領野が多数存在すると考えられるが，それのみならず，それぞれの領野が運動制御において特異的役割を果たす，あるいは高次機能を有すると考えられるようになってきた。このような運動制御における機能特性を形成する重要な要因として，大脳基底核と小脳から個々の皮質運動領野への投射様式とその機能的役割が注目されている。そこで今回の研究会では，基底核と皮質運動領野の機能的なつながりを考えるため，基底核と小脳から皮質運動領野への出力を中継する視床に関して，次のような点での新しい知見を報告したい。

（1）各運動領野において上肢の運動に関連する部位を生理学的手法で同定した後，神経標識物質を注入することにより，それらの領域が視床のどの核から入力を得ているのか？

（2）各運動領野に投射する視床ニューロンが運動の準備・実行段階にどのような活動をしているか？

(10) 視床下核—淡蒼球投射と上肢運動の制御

浜田生馬（東京都神経研・神経生理）

サルの視床下核を実験的に破壊するとヒトのバリスムと同様の異常運動を破壊と反対側の手足にひきおこすことができる。この異常運動は，淡蒼球内節に対する視床下核からの抑制がうしなわれた結果と考えられてきた。しかし視床下核からの出力については，むしろ興奮性であることを示唆する実験結果が近年つぎつぎとえられえており，視床下核—淡蒼球投射についてもあらためてみなおす必要がある。

われわれは，視床下核—淡蒼球投射が興奮性であるかどうかを直接的に調べるため，また視床下核が随意運動の制御にはたす役割を調べるために無麻酔のサルで実験的に視床下核を破壊し，運動課題の遂行と淡蒼球のニューロン活動に起こる変化を調べた。サルには肘の屈曲伸展によってハンドルを指定の位置に動かす運動課題を行なわせ，さらに一定位置に保持中のハンドルにトルクパルスを加えて，受動的な肘の屈曲または伸展を起こした。イボテン酸の微量注入による視床下核の破壊の前と後に同じサルの淡蒼球ニューロンの課題運動遂行中の活動を記録し比較した。視床下核の破壊部位は核内に限局しており，2頭のサルで，それぞれ，30％および50％の領域におよんでいた。

視床下核の破壊後も，サルはとくに支障なく運動課題を遂行したが，淡蒼球の内節及び外節のニューロンのスパイク発射活動は大きく変化していた。２頭のサルの内節で視床下核の破壊後に記録されたニューロンのハンドル保持中の発射頻度の平均は破壊前に記録したニューロンの発射頻度の平均に比べて有意に低かった。外節でも同様の変化が見られた。淡蒼球内節，外節で視床下核の破壊前には肘の屈曲伸展にともない発射頻度の増加を示すニューロンが多く見られたが破壊後にはその数が減少した。視床下核の破壊前には内節，外節でそれぞれ30％，32％のニューロンがトルクパルスに応答して発射頻度の変化を示したが，破壊後には少数のニューロン（８％，９％）にしか有意な応答はみられなかった。特に発射頻度の増加を示したニューロンはごく少数であった。

これらの結果は，淡蒼球の内節および外節にたいして視床下核が興奮性の入力源であるという考えを強く指示する。この視床下核から淡蒼球への興奮性入力が随意運動制御にはたす役割について考察する。

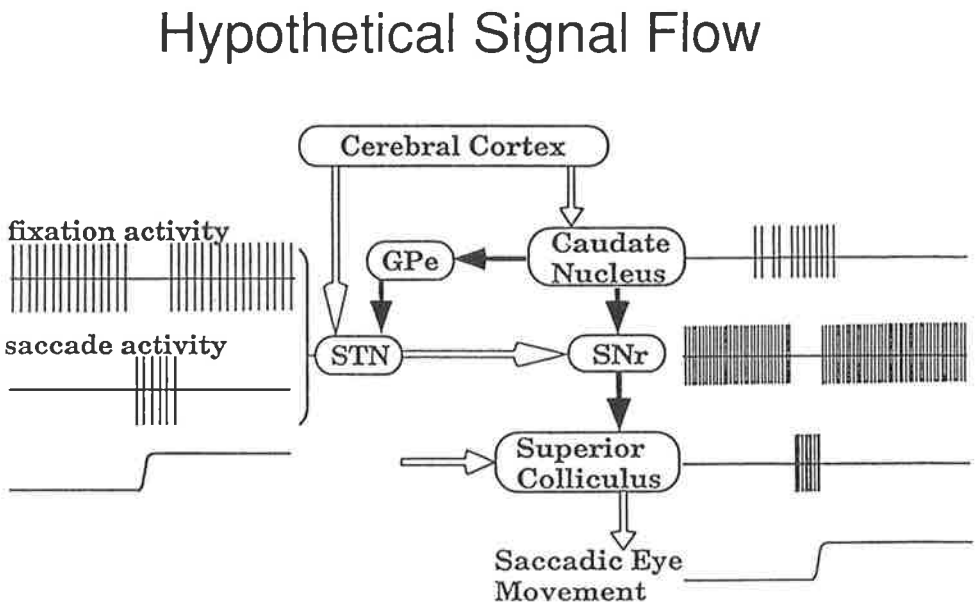
(11) サル視床下核における視覚刺激と眼球運動に関連する細胞活動

小島　淳，松村　賢（生理研・高次神経性調節）

視床下核は，淡蒼球外節及び大脳皮質から入力を受け，淡蒼球外節及び大脳基底核の出力核である黒質網様部と淡蒼球内節へ投射している。このことは，視床下核が大脳基底核の出力を制御する上で重要な位置にあることを示唆している。視床下核の投射する黒質網様部は，眼球運動，特にサッケードの発現に重要な役割を持っていることが知られている。さらに，視床下核は前頭眼野及び補足眼野からも投射を受けていることが報告された。我々はこのことから，視床下核が四肢運動のみならず，眼球運動の制御にも密接に関係していると考え，眼球運動課題を訓練したサルで視床下核ニューロンの記録を行った。

課題遂行中に記録した265個の細胞のうち，46（17％）個は視覚刺激あるいは眼球運動課題に関連して発火の変化（固視応答，サッケード応答，視覚応答，報酬応答）を示した。固視応答は，視覚ターゲットを固視している間に持続発火を示した。サッケード応答は，主に対側視野へ向かうサッケードの直後に発火頻度の増加が見られた。視覚応答は対側視野内の視覚刺激に応じて発火頻度の増加が見られた。また，サルがターゲットを固視し報酬を待機している時のみに発火頻度が増加するものがあった（報酬応答）。さらに，これらの活動は常に課題遂行中においてのみ観察され，課題外での自発眼球運動，固視，報酬の時には観察されなかった。これら眼球運動，視覚刺激に関連したニューロンは視床下核のおもに腹側に位置していた。

黒質網様部ニューロンは通常高頻度発火しており，サッケードに先行して発火頻度が一過性に減少し上丘の脱抑制を促し，サッケードを引き起こすと考えられている。固視時に視床下核で持



続的に発火するニューロンは，その興奮性投射により黒質網様部のニューロンの発火を維持しサッケードの発現を抑制していると考えられる。また，視床下核のサッケードに関連する活動はその発火がほぼ常にサッケード直後であることより，サッケードの終止，あるいはサッケード後の眼位の安定に寄与しているのではないかと考えられる。

Matsumura M, Kojima J, Gardiner TW, Hikosaka O. J. Neurophysiol. 67 : 1615-

(12) 条件付け学習に伴う線条体ニューロン活動の変化とドーパミン系の関与

木村　實（大阪大・健康体育）
青崎敏彦，坪川　宏（自治医大・第一生理学）

外界からの感覚情報や一時的な記憶に依存して手や眼球の運動を行うように条件づけされたサルの線条体のニューロンは，運動のための手掛りとしての感覚刺激や運動，運動の準備や予測と関連した活動をすることが知られている。これらのニューロン活動の特徴は，運動がどのような状況でなされるのかに強く依存していることである。例えばあるニューロンは感覚刺激に誘導された運動で強く活動し，他のニューロンは記憶などの内的な情報に依存して行う運動に選択的である。このような状況依存的線条体ニューロンの活動は大脳基底核が運動のパラメータ制御などの機能よりも状況に適した運動の選び出し過程への関与を示唆する。

線条体ニューロンの状況依存的な活動は条件づけ学習に伴って形成されると考えられる。この形成過程における大脳基底核の役割を知るために，私達は聴覚刺激と口の運動との条件づけ学習の前，条件づけの過程，条件づけ完成後におけるサルの被殻と尾状核の単一ニューロン活動を記録した。線条体ニューロンの中持続的な自発放電をもつⅠ型細胞は，条件づけ前には10－20％が聴覚刺激に応答したのみであったが，条件づけと共に応答するニューロンが増加し，条件づけの完成後には60－70％のニューロンが応答するようになった。この応答は刺激がどのような状況で与えられるかに依存していた。このような線条体ニューロンの応答は一側の線条体に MPTP を投与してドーパミンを枯渇させると消失した。これらの結果と，条件づけ学習に伴う黒質緻密部のドーパミンニューロンの活動についての報告（Ljungburg ら1992）に基づいて条件づけられた運動の習得とその発現における線条体の役割と黒質線条体ドーパミン系の関与について考察する。

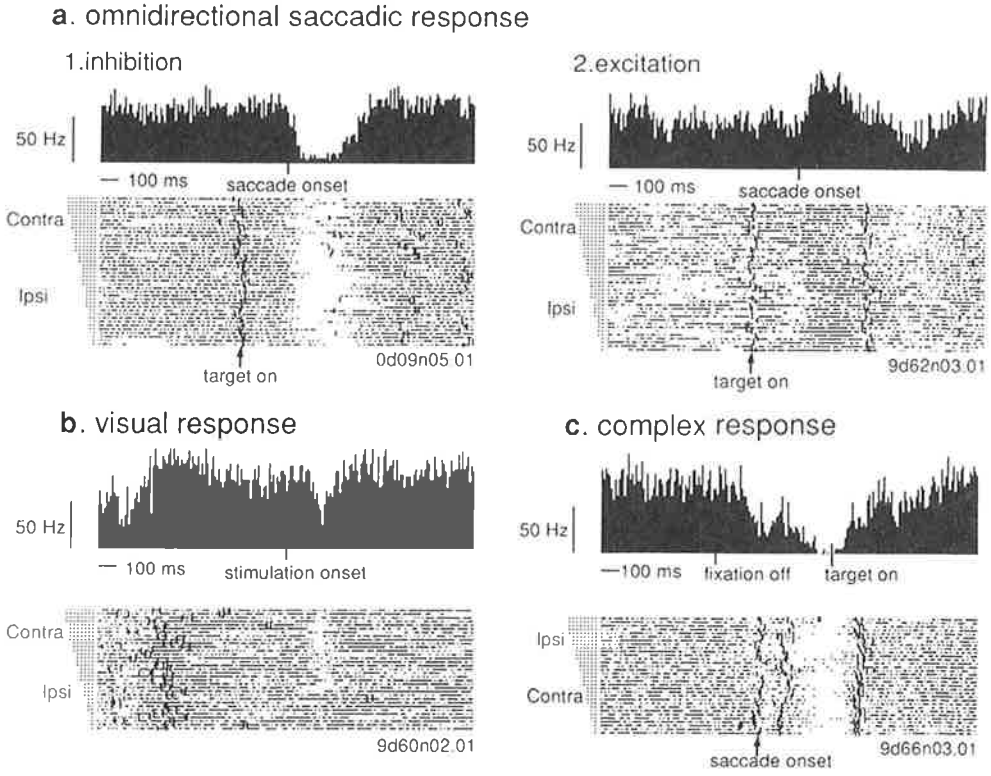
(13) 淡蒼球における眼球運動関連ニューロンの活動

加藤　誠（生理研・高次神経性調節）

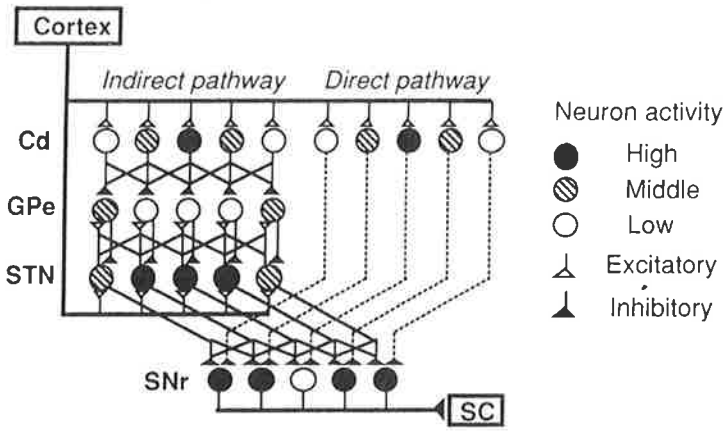
大脳基底核の入力と出力を結ぶ経路は大きく二つの経路に分かれている。それは，尾状核（被殻）―黒質網様部（淡蒼球内節）からなる直接路と，尾状核（被殻）―淡蒼球外節―視床下核―黒質網様部（淡蒼球内節）からなる間接路である。これらの経路に含まれる神経核は，視床下核が興奮性である以外はすべて抑制性である。直接路では，尾状核への興奮性入力は黒質網様部を抑制し，黒質網様部のターゲットである上丘・視床に脱抑制を起こす。それに対して間接路では，尾状核への興奮性入力は淡蒼球外節を抑制し，その結果，視床下核は脱抑制を起こして黒質網様部の活動を高め，直接路とは逆に上丘・視床を抑制する。このように二つの経路は基底核の出力に対して相反する効果を持つので，それらを通る神経情報は大きく異なると考えられる。しかし，これまでの研究では，間接路である淡蒼球外節の神経細胞の活動と基底核の出力である黒質網様部（淡蒼球内節）の活動には違いが見出されていない。そこで本研究では，２頭のサルの淡蒼球外節の神経細胞の眼球運動に関連する活動を記録し，尾状核，黒質網様部の活動と比較した。

淡蒼球外節から記録した410個の細胞の内，79個は視覚刺激または眼球運動に関連して活動が変化した。この中で，64個は，サッケードに関連して一過性に活動が減少（39個，Fig. a-1），増加（22個，Fig. a-2），または増減（３個）した。サッケードに関連した細胞の多くは方向選択性がなく（31個），選択性がある場合でも視野の半側を含むような広いものであった。サッケードに対する活動の onset latency は－150ms から＋200ms であった。また半数（33個）の細胞が報酬，レバー押しにも関連して活動が変化した。視覚刺激に対する一過性の応答は，活動が減少するもの（18個，Fig. b）と増加するもの（16個）があり，受容野は広く，onset latency は80－200ms であった。多くの細胞（72個）は，眼球運動課題の event 間（たとえば，サッケードから報酬を

Activity of GPe neurons



Hypothetical signal distribution



もらうまでの間）に，活動が，持続的に増加または減少したり，漸増または漸減した。さらに，これらの応答（サッケード，視覚，持続的応答）が，一つの細胞において複雑に組合わさって活動が変化することがしばしば見られた (Fig. c, center off ＋ saccade response)。

以上のように，淡蒼球外節の眼球運動関連の活動は，尾状核，黒質網様部の活動に比べて，方向選択性や時間的選択性が低かった。これは，淡蒼球外節の細胞が，尾状核や視床下核の様々な選択性を持つ細胞から収束性の入力を受けているためであると考えられる。淡蒼球外節のこのような非選択的な神経情報は視床下核を介して大脳基底核の出力を広汎に変化させる働きを持つであろう。特に淡蒼球外節の減少性の活動は，直接路を通る神経情報に対して側抑制の働きをして，最終的な出力の選択性を高めていると考えられる。

4．「視覚機能分化と神経回路構築解明への学際的アプローチ」

1992年７月30日－８月１日

代表者　福田　淳（大阪大・医・生理）

所内世話人　大塚輝彌

特別講演

「再生の研究と視覚研究の接点」

阿形清和（姫路工大・理）

「HGF の多様な生物活性と臓器活性」

中村敏一（九州大・理）

一般演題

(1)　光受容機能を与えられた未分化細胞（卵母細胞）について

安藤啓司，中町容子（神戸大・医・第二生理）

(2)　イモリ網膜の単離培養神経節細胞における基質の効果

酒井秀人，金子優子，斎藤健彦（筑波大・生物科学）

(3)　In vitro における網膜からの神経再生機構の研究

高野雅彦（横浜市大・医・眼科）

堀江秀典（第一生理）

(4)　光受容膜におけるレクチン結合部位の電顕観察：
切片法およびディープ・エッチング法

石川　誠，吉田美加，外崎　昭（山形大・医・第一解剖）

(5)　GAP-43 cDNA 導入トランスジェニックカーブの作成と単離網膜神経節細胞の軸索の成長について

新保　漬，豊田順一，千葉篤彦（聖マリアンナ医大・第一生理）

朝倉幹雄（神経精神科・難病治療研究センター）

原　正幸，鈴木卓朗（第一解剖）

矢後長純（共通放射能基礎医学研究施設）

(6)　網膜網状層の形成に関与する膜蛋白分子 B2 の解析

太田訓正，水谷章一，高木　新，川上厚志，藤澤　肇（名古屋大・理・分子生物）

(7)　ウズラ松果体を用いた錐状体視細胞の分化因子の研究

荒木正介（自治医大・解剖）

(8)　脊椎動物の視物質の多様性と類似性

久富　修，茅田誠也，青木義矢，徳永史生（大阪大・理・生物）

(9) ATP の錐体 cGMP-activated current に対する影響

渡辺修一（慶應大・医・生理）

(10) ウシ網膜二次ニューロンに存在する，グルタミン酸受容体と連関するG蛋白質

吉川知志，中川将司，岩佐達郎，津田基之（姫路工大・理）

金子章道（慶應大・医）

(11) イモリ網膜単離神経節細胞のグルタミン酸受容体に関する電気生理学的研究

千葉親文，酒井秀人，斉藤建彦（筑波大・生物科学）

(12) 網膜水平細胞のグルタミン酸(Glu)応答に対するアニラセタムの作用

岡田　隆，有村朋美，立花政夫，小林克典（東京大・文・心理）

(13) キンギョ網膜双極細胞における Ca 電流と細胞内 Ca イオン濃度の関係

小林克典，立花政夫，岡田　隆，有村朋美（東京大・文・心理）

(14) 錐体終末における GABA 電流の脱感作と色覚との関連

小野真佐子，海野　修（東邦大・情報科学）

(15) 光による膜電位固定下で明順応と連動したザリガニ視細胞膜抵抗の再増加

山田雅弘（電総研・超分子）

安井湘三（九州工大・情報工学）

(16) ドーパミン(DA)のパターン ERG (PERG) に与える影響

不二門尚，大本達也，田野保雄（大阪大・医・眼科）

(17) 人眼暗所閾値電位 (scotopic threshold response, STR) の特徴と応用

斎藤友護，若林謙二，北　勝利，河崎一夫（金沢大・医・眼科）

(18) 神経切断後のラット網膜神経細胞の形態とシナプス入力

田内雅規（国立リハセンター）

日高　聡（東女医大）

(19) 発生期マウス網膜における 2 つの retinol dehydrogenase の出現時期について

石黒誠一，鈴木祐子，玉井　信（東北大・医・眼科）

(20) ヤツメウナギ網膜の単クローン抗体による免疫組織学的考察

吉田美加，石川　誠，外崎　昭（山形大・医・第一解剖）

(21) 二重染色法による網膜遠心性神経の標的細胞の形態学的同定

平野　穣，大塚輝彌（生理研・神経情報）

(22) コイ目に属するウグイ (Tribolodon) とコイ (Cyprinus) の視覚投射

吉本正美，伊藤博信（日本医大・解剖第二）

(23) サル網膜中心窩における錐体小足間のギャップ結合

塚本吉彦（兵庫医大・第二解剖）

(24) 網膜アマクリン細胞間で形成されている相同なカップリング

日高　聡，前原通代，海野　修，盧　　陽，橋本葉子（東女医大・第一生理）

(25) 魚類双極細胞間の電気的結合

海野　修（東邦大・情報科学）
前原通代，日高　聡，北　重夫，橋本葉子（東女医大・第一生理）

(26) ウマヅラハギ網膜水平細胞の光応答とその形態

河又邦彦，大坂知恵子，大塚京兵（秋田大・教育・生物）
内山博之（日医大・解剖）

(27) 網膜神経回路の構造と初期視覚

八木哲也（九州工大・情報）
松本　隆（早稲田大・電気）

(28) 情報量最大保持原理に基づく色受容野の自己組織化

中内茂樹，高橋克典，臼井支朗（豊橋技大・工・情報工）

(29) ナキウサギ(Ochotona rufescens rufescens)の網膜(A preliminary report)

白井由佳子（日本医大・眼科）
内山博之，伊藤博信（解剖）

【討論参加者】

斎藤友護，北　勝利，高比良雅之（金沢大），橋本葉子（東女医大），立花政夫，小林克典，山下晶弘，岡田　隆（東京大），渡辺修一（慶應大），中谷　敬（筑波大），河又邦彦（秋田大），石黒誠一（東北大），安藤啓司（神戸大），北原健二（慈恵医大），斉藤建彦（筑波大），金子章道（慶應大），金子優子，千葉親文，酒井秀人（筑波大），宇治幸隆（三重大），高野雅彦，堀江秀典（横浜市大），津田基之，吉川知志（姫路工大），吉田美加，外崎　昭（山形大），村上元彦（慶應大），高橋　広（産業医大），日高　聡（東女医大），阿形清和（姫路工大），宮地栄一，加藤千恵子（藤田保衛大），鯨岡　徹，近藤博明，豊田順一，新保　清（聖マ医大），玉井　信（東北大），石川誠（山形大），福田　淳，山下勝幸（大阪大），久富　修（大阪大），石井宏幸，河合房夫（豊橋技科大），山田雅弘（電総研），杉岡美保，沢井　元（大阪大），保　智己，森田広大（浜松医大），中村敏一（九州大），徳永史生（大阪大），白井由佳子（日本医大），安井湘三（九州工大），内山博之（日本医大），宇宮弘明（麻布大），吉本正美，伊藤博信（日本医大），塚本吉彦（兵庫医大），荒木正介（自治医大），赤川公朗（生理研），田内雅規（国立リハセンター研究所），白尾　裕，河崎一夫（金沢大），藤澤　肇（名古屋大），中村孝文（静岡大），不二門尚（大阪大），海野　修，小野真佐子（東邦大），八木哲也（九州工大），臼井支郎，中内茂樹（豊橋技大），平野　穣，大塚輝彌（生理研），

【研究会の概要】

過去数十年にわたる視覚研究を振り返ってみると，その大きな進歩は主として単一細胞における視覚情報処理機能の解析とそれを支える形態学的基盤の確立によってもたらされてきた。たと

へば網膜では視細胞の杆体細胞と錐体細胞への分化に始まり，双極細胞の ON/OFF 細胞への分化，神経節細胞の大型，中型，小型細胞への分化にいたるまで，それらの細胞の形態と機能の分化がよく解明されてきた。これら網膜における研究が基礎になって，やがて視覚中枢の研究においても，色の情報，形の情報，動きの情報などが別々の層あるいは別々の領野の細胞で処理されている事実が明らかにされ，並列情報処理機構が確立された。この視覚系における神経細胞の機能と形態における分化，およびそれらの細胞間の選択的結合がどのような機序によって形成されるのかは，これからの視覚研究に与えられた大きな課題である。そこで本年は「視覚機能分化と神経回路構築解明への学際的アプローチ」のテーマで本研究会を企画した。

阿形清和（姫路工大理学部，助教授）と中村敏一（九州大学理学部，教授）の両先生に，それぞれ「再生研究と視覚研究の接点」，「HGF の多用な生物活性と臓器再生」と題して特別講演をいただいた。阿形先生はプラナリアの目の再生過程における分子機構について，また中村先生は最近発見されその分子構造を解明された肝再生因子 (HGF) について，とくにそれを一員とした生体修復系の概念について解説された。いずれも最先端の分子生物学及び分子遺伝学的手法を駆使したもので啓蒙されるところが多かった。また29題の一般講演が行なわれ，その発表内容は網膜細胞のイオンチャネル解析，カルシウム画像処理，伝達物質の効果，視物質の分子遺伝学的解析，網膜内シナプス結合の電顕的解析，網膜内神経回路の計算論的解析など多岐にわたった。生理学，解剖学，眼科学，電子工学，生物物理学，発生生物学など多くの研究分野から70名以上の参加があり，視覚に関係する幅広い分野の研究者の相互交流と緊密な情報交換がなされ，実りある共同研究のための場が形成された。特に今回は若手研究者が活発な発表と討論を行ない，活気の溢れた研究会となった。

HGF の多様な生物活性と臓器発生

中村敏一（九州大・理・生物）

HGF (hepatocyte growth factor) は長らく実体が不明であった肝再生因子の本体と考えられる新しい増殖因子である。HGF は分子量 82kDa の熱及び酸処理に不安定な蛋白質であり，分子量 69kDa の α 鎖と 34kDa の β 鎖からなるヘテロダイマー分子である。その後，HGF は肝細胞以外にも多くの上皮細胞の増殖を促進することが明らかになり，最近では mitogen としてのみならず，上皮細胞の cell motility を促進する motogen として，また管腔形成などの形態形成を促す morphogen として働く pleiotropic factor であることが明らかになった。HGF はこれら 3 つの M (Mitogen, Motogen, Morphogen) で示される生物活性を介して，肝再生に限らず，腎再生やその他多くの組織，器官の再生に重要な役割を演じる因子である。

【文献】
1）Nakamura, T. et al. (1989) Nature, 342 : 440-443
2）Nakamura, T. (1991) Prog. Growth. Factor Res., 3 : 67-85
3）Matsumoto, K. & Nakamura, T. (1992) Crit. Rev. Oncogenesis, 3 : 27-54

(1) 光受容機能を与えられた卵母細胞について

安藤啓司（神戸大・医・第二生理）

視物質が光応答を惹起する上で必要な要素を知る目的で，イカの眼球からロドプシンを含むmicrovilliを取りだし，アフリカツメガエル卵母細胞に注射したところ，徐々に光応答を示すようになった。この光応答の閾値は視細胞のものに比べ数万倍高い。この応答の発生は蛋白合成阻害剤のcycloheximideによって抑制されたので，卵母細胞にあるmaternal mRNAから翻訳されて作られる何等かの蛋白質が応答発生に必要とされるらしい。また注射したmicrovilliの大半は細胞中央部に局在していたので，桿体外節と同様に視物質がG蛋白や，その標的酵素と一緒に細胞膜から離れた膜の上に存在し，光照射により2nd messengerがそこから放出されると考えられる。注射してから応答できるようになるまでの期間に，この様な情報伝達に関与する物質の配置が行なわれるものと考えられる。

(2) イモリ網膜の単離培養神経節細胞における基質の効果

酒井秀人，金子優子，斎藤建彦（筑波大・生物科学）

イモリ網膜神経細胞の機能分化と再生に適した培養条件を確立するための基礎実験として，正常網膜から単離した神経細胞に対する各種基質；concanavalin A (con A), fibronectin (FN), collagen (COL), poly-L-lysine (PLL)の効果を調べた。基質に対する接着率・生存率はcon Aで78%・22%と最も高く，PLL, FN, COLの順に低下した。網膜の各種神経細胞をcon A存在下で培養したところ，神経節細胞においてプロセスの成長が認められた。

各基質で培養された神経節細胞の興奮性をホールセルクランプ法を用いて調べた結果，どの基質からもNa^+，Ca^{++}，K^+の膜電流が確認された。しかし，con A存在下で最も大きな電流値が得られた。

con Aを基質として，色素を持たない再生初期の網膜から単離した細胞の培養を行なった。その結果，一部の細胞に，プロセスの成長が観察された。これらの細胞は活動電位を発生したこと

から神経節細胞に分化したものと思われる。

(3) in vitro における網膜からの神経再生機構の研究

高野雅彦（横浜市大・医・眼科）
堀江秀典（横浜市大・医・第一生理）

哺乳類の網膜神経節細胞からの神経再生を新生期から成熟期まで in vitro において検討した。生後数日のマウスの網膜を摘出，コラーゲンゲル培養法にて器官培養した結果，神経節細胞からの神経突起再生をみとめた。しかし，網膜の後極部では周辺部に比べ生後早期に神経再生能力が低下し，周辺部でも生後２週以降再生を認めなかった。成熟ラットではあらかじめ視神経を切断し，７日間飼育後に眼球を摘出，網膜を培養することにより神経突起再生を認めた。この神経突起は逆行性蛍光色素ラベル法により神経節細胞から再生したものであることが確認出来た。この網膜からの神経突起再生は肝細胞の培養上清液により促進されることを見いだした。現在成熟ラット網膜をもちいて種々の神経再生促進因子を探索中である。

(4) 光受容膜におけるレクチン結合部位の電顕観察：切片法およびディープ・エッチング法

石川　誠，吉田美加，外崎　昭（山形大・医・第一解剖）

コンカナバリンＡ (Con A) はロドプシンおよび色覚物質の糖鎖を認識する。今回我々は，脊椎動物の祖先型とみられるヤツメウナギ光受容細胞に con A を作用させ，光受容膜における結合部を超薄切片法およびディープ・エッチング法によって検討した。

【方法】

固定したヤツメウナギ網膜に，フェリチン (Fe) 標識 Con A を作用させた。四酸化オスミウムによる後固定をおこなった後，試料を樹脂に包埋し，超薄切片を作製した。一部試料は40％メタノールに浸漬後，液体窒素投入凍結を行ない，ディープ・エッチング法によりレプリカ膜を得た。

【結果・考察】

Fe 粒子の密度比は，超薄切片法では長細胞：短細胞＝２：３，ディープ・エッチング法では１：４であった。これは，ディープ・エッチング法によって，密に分布する短細胞上の Fe 粒子を重視なく定量できた為と考えられる。

(5) ラット GAP-43 cDNA-トランスジェニックカーブの作成と単離網膜神経節細胞の軸索成長について

新保　清，豊田順一，千葉篤彦（聖マリアンナ医大・第一生理）
朝倉幹雄（神経精神科学・難病治療研究センター）
原　正幸，鈴木卓朗（第一解剖学）

プロテインカイネースCの基礎蛋白質である GAP-43 は成長錐に存在し，神経突起の成長を促進すると考えられている。我々は Rous sarcoma virus long terminal repeart プロモーターとラット GAP-43 cDNA の結合遺伝子 LTR-GAP43 を作成し，人口受精後１～４時間のコイ受精卵の胚盤にマイクロインジェクションした。処理卵60個中19個が孵化し，13個が孵化後１年まで成長した。このうち２個体から LTR-GAP43 が検出され，トランスジェニック雌カーブから排卵誘導して成熟卵を採取した。紫外線照射し不活化した精子で媒精した卵を，約40分間冷水に浸け第二極体の放出を抑制し，単為発生的に126匹の f1 を得た。胸鰭の生検から f152匹中22匹で LTR-GAP43 を検出した。トランスジェニック f1 の剝離網膜のノーザン解析の結果からラット GAP-43 の発現が，また単離網膜神経節細胞の培養から軸索成長速度の増大が観察された。

(7) ウズラ松果体を用いた錐状体視細胞の分化因子の研究

荒木正介（自治医大・解剖）

松果体と網膜の発生には多くの類似性がある。また，トリの松果体には光受容能があり，視物質抗体に陽性の細胞（視細胞）がある。例えば，ウズラ松果体では，視細胞は２種類あり，それぞれロドプシンおよびイオドプシンの単クローン抗体によって染色することができる。イオドプシン陽性の錐状体タイプは，ロドプシン陽性の杆状体タイプより，かなり少ない。網膜では，むしろ逆であるので，網膜には，錐状体の分化因子が豊富にあると予想される。この因子を分離する目的で，次のような実験を行なった。

ウズラ胚の松果体を単離し，酵素処理によってバラバラにし，これをメンブレンフィルターを底にはりつけた培養カップ内で培養し，これに網膜や大脳・視蓋の培養上清液を加え，その効果を調べた。網膜の培養上清を添加した場合のみ，イオドプシン陽性細胞が５－10倍増加した。ロドプシン細胞の数はほとんど変化しなかった。この結果から，培養網膜細胞は，視細胞の分化因子を産生していると予想された。

(8) 脊椎動物の視物質の多様性と類似性

久富　修，茅田誠也，青木義矢，徳永史生（大阪大・理・生物）

色覚を持つ脊椎動物は，吸収極大波長の異なる複数種の視物質を持っている。視物質の吸収スペクトルの多様性は，オプシン部分の違いによって生じる。これらの視物質をコードする遺伝子は，ある一つの“祖先視物質の遺伝子”から遺伝子重複により生じたと考えられている。我々は，脊椎動物視物質の分子進化に興味を持ち，脊椎動物の視物質中に共通に存在するアミノ酸配列に対応するオリゴヌクレオチド混合体を合成した。このオリゴヌクレオチド混合体を用い，種々の脊椎動物のゲノム DNA または cDNA を鋳型として，PCR 法により DNA 断片を増幅した。得られた種々の DNA 断片の塩基配列から推定されるアミノ酸配列から，分子系統樹を作成した結果，脊椎動物の視物質には，少なくとも５つのグループが存在していることが示唆された。この５つの視物質グループの存在を仮定することにより，（顕微分光法等で明らかにされている）脊椎動物視物質の吸収極大波長が系統的に説明された。

(9) ATP の錐体 cGMP-activated current に対する影響

渡辺修一（慶應大・医・生理）

コイ錐体外節から得た inside-out patch 上の cGMP-activated current に対する ATP の効果を調べた。20 μM cGMP を投与すると電流が発生するが，パッチの29％（28例中８）ではこの電流は１ mM ATP によって増強された。同様の現象は phophodiesterase (PDE) の阻害剤である IBMX 存在下で，cGMP の非水解性アナログ，8-Br-cGMP による電流についてもみられた。したがってこの増強作用は PDE 活性の変化を介するのではなく，チャネルレベルでの現象と考えられる。一方36％のパッチでは ATP はチャネル活動を抑制した。この抑制は１ mM ADP ではみられなかった。

以上のように ATP は錐体 cGMP-activated channel に対して増強と抑制の２つの作用を持つことが明らかになった。

(10) ウシ網膜2次ニューロンに存在する，グルタミン酸受容体と連関する百日咳毒素基質G蛋白質

吉川知志，中川将司，岩佐達郎（姫路工大・理）
金子章道（慶應大・医）
津田基之（姫路工大・理）

桿体外節を除去したウシ剝離網膜膜画分を百日咳毒素と放射標識したNADによりADPリボシル化を行った後，SDS-PAGE, オートラジオグラフィーを行ったところ，39～40kDaに放射標識されたバンドが見られた。この蛋白質はコレラ毒素によってはADPリボシル化されないことから，桿体外節由来のトランスデューシンとは異なるものと考えられる。Mg^{2+}存在下にL－グルタミン酸またはそのアナログであるAPB（2－アミノ－4－ホスホノ酪酸）を加えることにより，このADPリボシル化が部分的に抑制された。また，膜標品に対するGTPγSの結合量が，APBを共存させることにより増加した。これらの結果は，グルタミン酸受容体，なかでもAPB受容体と連関するGTP結合蛋白質が網膜膜画分に存在すること，および受容体と連関しているGTP結合蛋白質は百日咳毒素感受性であることを示唆している。

(11) イモリ網膜単離神経節細胞のグルタミン酸受容体に関する電気生理学的研究

千葉親文，酒井秀人，斎藤建彦（筑波大・生物科学）

イモリ網膜の神経節細胞を単離し，ホールセルパッチクランプ法によってそのグルタミン酸受容体の性質を調べた。神経節細胞にはグルタミン酸によって脱分極する細胞(Type 1)と過分極する細胞(Type 2), そしてグルタミン酸投与で過分極し，投与が切れるとすばやく脱分極する細胞(Type 3)が存在した。グルタミン酸に対する脱分極応答は膜抵抗の減少を伴い，過分極応答は膜抵抗の増加を伴った。グルタミン酸電流は膜電位をマイナス側に固定したときType 1で内向き，Type 2で外向きであった。反転電位は双方ともおよそ0mVであった。APBは両タイプの受容体にアゴニストとして作用した。これらの結果は，イモリ網膜神経節細胞にはAPB感受性でイオンチャンネル直結型のグルタミン酸受容体と，APB感受性で代謝型のグルタミン酸受容体が存在する可能性を示唆している。

(12) 網膜水平細胞のグルタミン酸応答に対するアニラセタムの作用

岡田　隆，有村朋美，立花政夫，小林克典（東京大・文・心理）

伝達物質として放出された興奮性アミノ酸をアメリカナマズの網膜から単離した水平細胞によって電気生理学的に実時間でバイオアッセイする方法を既に報告した。アニラセタムはグルタミン酸(Glu)応答を増強するという報告があるので，アニラセタムによって興奮性アミノ酸検出器としての水平細胞の感度が上昇可能か否か検討した。水平細胞をホールセルモードで＋40mVに膜電位固定し，Glu アゴニストによる電流応答を記録した。Glu 応答はアニラセタムが 100 μM 以上，Glu が 3 μM 以上の時に増強された。キスカル酸応答はアニラセタムによって約 4 倍に増強されたが，NMDA 応答は約75％に抑制された。キンギョ網膜の双極細胞から放出される興奮性アミノ酸で引き起こされるアメリカナマズの水平細胞の応答はアニラセタムを投与しても増強されず，APV で強く阻害され CNQX で僅かに抑制された。双極細胞の伝達物質はおもに水平細胞の NMDA 受容体を介して応答を引き起こすと結論した。

(13) キンギョ網膜双極細胞における Ca 電流と細胞内 Ca イオン濃度の関係

小林克典，立花政夫，岡田　隆，有村朋美（東京大・文・心理）

キンギョ網膜から単離した ON 型双極細胞に，パッチクランプ法と Fura-2 蛍光測光法を適用して Ca イオンの流入量と細胞内遊離 Ca イオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) との関係を調べた。ホールセルクランプモードでの膜電位固定下で，細胞を脱分極し Ca 電流を活性化させると，軸索終末部では $[Ca^{2+}]_i$ が急速に上昇したが，細胞体では殆ど上昇は見られなかった。ニカルジピンを投与すると Ca 電流は完全に阻害され，$[Ca^{2+}]_i$ の変化も全く認められなかった。したがって双極細胞の Ca チャネル（ジヒドロピリジン感受性）は軸索終末部に局在していると結論した。脱分極パルスの振幅や持続時間を調節した Ca イオンの流入量を変化させると，軸索終末部における $[Ca^{2+}]_i$ は，流入量が約 200 μM 以下のときには流入量にほぼ比例して増加し，流入量の約0.5％以下であった。さらに流入量が増えると $[Ca^{2+}]_i$ はしだいに頭打ちになり，約 250nM 以上には増加しなかった。

⑭ 錐体終末における GABA 電流の脱感作と色覚との関連

小野真佐子，海野　修（東邦大・理・情報科学）

赤色光で生じる R/G 型水平細胞の脱分極応答は，背景光照射により増大する。この現象を実験および計算機シュミレーションにより調べた。実験ではコイ網膜を用い，L 型および R/G 型水平細胞の細胞内応答の同時記録を行った。その結果，L 型水平細胞から R/G 型水平細胞への信号伝達効率が，背景光照射中上昇することが明らかになった。伝達効率の増大は R/G 型水平細胞の脱分極応答の増大に対応している。この増大は背景光照射直後から生じ，背景光照射中持続した。したがって，interplexiform 細胞はこの現象に関与していないと考えられる。

計算機シュミレーションを行ったところ，脱感作が伝達効率増加に寄与している事が示唆された。R/G 型水平細胞の 2 相性のスペクトル応答は色覚に関係している。したがって本研究結果は，「脱感作により明るい光環境下でも色覚が維持できる」という興味ある仮説を提供している。

⑮ 光による膜電位固定下で明順応と連動したザリガニ視細胞膜抵抗の再増加

山田雅弘（電総研・超分子），安井湘三（九州工大・情報工学）

ザリガニ視細胞における明順応過程の動特性について，光による膜電位固定法とブリッジバランス法を組合わせた新方法で研究した。光強度を制御し一定の脱分極に保持した状態で，膜抵抗は光照射で急激に減少した後，徐々に再増加した。この再増加の状態で膜コンダクタンスと光感度は，連動して同様の時定数の指数関数で減衰した。時定数は明順応や高 Ca の灌流で短くなり，Ca チャネル阻害剤（Ni^{2+}, La^{3+}）で長くなった。

以上から明順応は Ca チャネルで制御され，細胞内の Ca 濃度が明順応下での膜のコンダクタンスや光感度の減衰の速度を決めると示唆される。

⑯ ドーパミン (DA) のパターン ERG (PERG) に与える影響

不二門尚（大阪大・医・眼科）

DA は明・暗順応過程に重要な役割を果たし，また軸性近視を発症させるプロセスにも関係することが推測されている。今回，DA の ON, OFF 反応および PERG に与える影響を検討した。ON 反応に対する振幅増強効果が，背景輝度に依存すること，および PERG の振幅が高空間周波

数領域で著明に抑制されることが見出された。これらのことからDAは網膜レベルでコントラスト感度に影響を与えることが推察された。このDAの効果はD2レセプターの選択的agonistであるBromcryptineでは生じないことから，D1レセプターを介した反応と考えられる。また片眼を遮蔽して飼育した雛に近視化が起こるが，近視化はDA agonistであるapomorphineの結膜下注射を隔日に行うことで軽減した。このことは，DAはパターン刺激を受けて，眼球の発育を制御するメカニズムに関係していることが，推察される。

(17) 人眼暗所閾値電位 (scotopic threshold response, STR) の特徴と応用

斎藤友護，若林謙二，北　勝利，河崎一夫（金沢大・医・眼科）

暗所閾値電医 (scotopic threshold response, STR) は近年同定されたERGの新成分で，b波閾値以下の暗順応絶対閾値近傍での唯一のERG応答であり，その基礎的研究の発展と種々の網膜疾患への臨床応用が期待されている。我々はSTRを記録するためのリモコン式フィルター変換装置を備えた全視野刺激装置およびアーチファクト除去機能を備えた記録装置を開発し，人眼STRの記録に成功した。正常人眼においてSTR閾値はb波閾値より約3 log unit低く，刺激持続時間を10msecとしたときは刺激強度（網膜面照度換算）4.0～5.0log quanta (507 nm)/deg^2·secの間でSTR振幅の時間的加重が成立し，この刺激域がSTRの評価に適していると考えられた。さらに臨床応用として眼底白点症の症例では十分な暗順応後にはSTRは正常であること，無βリポ蛋白血症の症例ではSTRは消失していることおよび杆体系の異常を伴う錐体ジストロフィーの症例でSTRは正常であることを報告した。

(18) 視神経切断後のラット網膜神経節細胞の形態とシナプス入力

田内雅規（国立身障者リハセンター研）
日高　聡（東女医大・第一生理）

哺乳類網膜の視神経を切断すると軸索再生は起きず，神経節細胞は小数を除いて死滅すると考えられている。今回，成ラットを用いて，視神経切断後の神経節細胞生存数，生存細胞の樹状突起形状，さらに長期生存し得た神経節細胞のシナプス入力の特徴などについて検討した。生後70日令のラットの視神経を眼球から5㎜以内の部位で全切断し，切断端に蛍光色素を与えて全ての神経節細胞を逆行性に標識した。視神経切断後2カ月の網膜で蛍光標識細胞数は1066個で，250日を経過した網膜では683個の細胞が生存していた。ルシファー色素注入により生存細胞の樹状

突起形状を見た結果，正常と区別できない例が多かったが，より単純であったりあるいは再生したと思われる例も観察された。長期生存神経節細胞を超薄切片で観察した結果，双極細胞およびアマクリン細胞からの化学シナプス入力と共に，アマクリン細胞との間にギャップ結合が少なからず観察された。

(19) 発生期マウス網膜における２つのレチノール脱水素酵素の出現時期について

石黒誠一，鈴木祐子，玉井　信（東北大・医・眼科）

哺乳類網膜では，視サイクルに関与する２種類のレチノール脱水素酵素が知られている。１つは網膜色素上皮細胞に存在し，11－シスレチノールを11－シスレチナールに転換している。もう１つは光受容細胞に存在し，光退色したロドプシンから放出される全トランスレチナールを全トランスレチノールに転換している。我々は，発生期網膜において視サイクルがどのように形成されてくるのかを知る目的で，これらの酵素の出現時期を免疫組織化学的に調べた。色素上皮細胞のレチノール脱水素酵素は，生後３日目から反応がみられ，オプシンなどの視サイクル関連物質と時期的に近い関係がみられた。一方，光受容細胞にみられるレチノール脱水素酵素は，これよりも遅く，開瞼近くの生後11日目より反応が出現した。光受容細胞のレチノール脱水素酵素は，同じ細胞で発現するオプシンとは異なる時期に出現し始めることから，別な調節機構によりその発現が調節されていると考えられた。

(20) ヤツメウナギ網膜の単クローン抗体による免疫組織学的考察

吉田美加，石川　誠，外崎　昭（山形大・医・第一解剖）

ヤツメウナギの網膜光受容細胞は形態学的に明らかに異なる二種の細胞，長光受容細胞と短光受容細胞によりなり，それぞれ高等動物の錐状体，桿状体に対応するものと考えられている。当教室ではこの二種の細胞の外節にそれぞれ特異的に反応する単クローン抗体を作製した。長細胞外節に特異的な抗体 L31 はウェスタンブロット法により，40KDa 付近の蛋白を認識し，短細胞外節に特異的な抗体 S70 は陽性バンドを示さなかった。免疫組織学的に両抗体の交叉反応性を検討したが，L31 は他種脊椎動物網膜の視細胞には反応せず，ヤツメウナギ視細胞に特異的な抗体と思われた。また S70 はニワトリ網膜で錐状体を染め分け，さらに他種網膜においても多彩な反応性を示した。両抗体とすでに報告した二種の抗ヤツメウナギロドプシン抗体 (H16, B11) との比較検討の結果，両抗体は視物質の抗体と思われた。

(21) 二重染色法による網膜遠心性神経の標的細胞の形態学的同定

平野　稼，大塚輝彌（生理研・神経情報）
野本茂樹（都老人研・中枢神経）

鳥類の中枢は網膜に遠心性神経を投射し，視覚情報の制御を行っている。しかし，その神経機構については不明である。そこで本実験では，遠心性神経の標的細胞を同定した。ハト視蓋の Isthmo-optic neucleus (ION) にカルボシアニン系蛍光色素 DiI を注入し，遠心性神経線維に沿って神経終末を標識した。次に網膜を摘出し，蛍光顕微鏡下でこの神経終末を確認した後，標的細胞にルシファーイエローを細胞内注入した。二重標識した網膜は共焦点レーザ顕微鏡下で細部を解析した。その結果，遠心性神経の標的細胞は，内網状層第２，３層に１層の樹状突起を放射状に広げるアマクリン細胞，および，内網状層第１層に網膜辺縁部に向かう１本の main dendrite を延ばすアマクリン細胞の２種類であることが明らかになった。

(22) コイ目に属するウグイ (Tribolodon) の視覚系

吉本正美，伊藤博信（日本医大・解剖第二）

コイの視覚系は進化の過程で一度退化した後，再び発達したといわれている。コイ目に属し清流に棲息するウグイ（体長15－18㎝）の視覚系を検索しコイと比較した。網膜視神経細胞の総数は約25－29万個（コイは約14－18万個）あり，側頭側部に高密度の細胞分布域を持っていた。視神経の投射領域は Optic hypothalamus, 視蓋，N. pretectails superficialis pars parvocellularis, Area pretectalis, N. dorsalis thalami, N. ventromedialis thalami (VM), n. of posterir commissure, n. of accessory optic tract, でコイとほぼ同様であったが，視蓋へ深層からも入ることと，視床の VM にも終止する点が異なっていた。

(23) サル網膜中心窩における錐体小足間のギャップ結合

塚本吉彦（兵庫医大）
SJ Schein (UCLA), P Masarachia & P Sterling (Univ Pennsylvania)

連続超薄切片（319枚）の電顕写真から錐体小足間のギャップ結合の分布と面積を調べた。再構築した小足群は横走するヘンレ線維を介して偏心度 250-350 μm の錐体内節に対応する。各

小足はミュラー細胞の薄板様突起によって約99％が含まれているが，約５ケ所にわたって小さな窓が開き，隣の小足と直接し，接着帯様の構造とギャップ結合をもつ。接着構造あたり約３個，小足あたりでは約15個の小さなギャップ結合（平均 0.0016 μm^2）があり，約４個の隣接小足との間に非選択的に認められる。また偏心度約 50 μm の錐体内節に対応する小足間にもギャップ結合が追加観察された。コネクソンの推定最大数は170個／小足であり，伝導度の上限は 17nS と見積もられた。心理物理学の実験結果からは，ギャップ結合は高照度下で閉じ，低照度下で開くと考えられる。空間分解能が優先しない薄明視のために，電気的結合によって信号の空間的加算を行い，感度の増強に役立つのであろう。

(24) 網膜アマクリン細胞間で形成されている相同なカップリング

日高　聡，前原通代，盧　　陽，橋本葉子（東女医大・第一生理）
海野　修（東邦大・理・情報科学）

脊椎動物網膜内の情報伝達には，視細胞，双極細胞から神経節細胞へと伝わる縦の伝達経路に対して，水平細胞及びアマクリン細胞によって側状に広がる経路がある。今回，アマクリン細胞間の電気的なカップリング特性を調べる目的で，ギャップ結合を容易に通り抜けると考えられる低分子量トレーサー，biocytin (M. W. = 372) を光応答特性を解析したアマクリン細胞に注入した。アマクリン細胞は，これまでに知られている一過性型と，脱分極または過分極性の持続型の光応答から同定された。実験した全てのアマクリン細胞は，同一形態の細胞とトレーサーカップリングを示した。この結果から，内網状層では相同形態のアマクリン細胞同士がギャップ結合で連結していることが示された。解剖学的な解析から，連結した細胞群は機能単位ごとに独立して存在することが示唆された。おのおの機能群は特有な空間特性を示して内網状層において側状伝達を行なっていると推定される。

(25) 魚類双極細胞間の電気的結合

海野　修（東邦大・理・情報科学）
前原通代，日高　聡，北　重夫，橋本葉子（東女医大・第一生理）

網膜双極細胞間の電気的結合を調べるため，双極細胞に Lucifer yellow および biocytin を注入した。ここでは光刺激に対して中心が赤，周辺が緑の受容野を持つ OFF 型双極細胞を詳細に検討した。Lucifer yellow は周囲の３個の双極細胞へ，biocytin は20～30個の双極細胞へ拡散した。

隣接する双極細胞同士の接触部位は樹状突起および軸索終末双方で観察された。軸索終末は内網状層a層に位置していた。ラベルされた双極細胞が突起を送っている視細胞を調べるため，双極細胞の樹状突起を超薄連続切片（299枚）から立体構築した。その結果，ラベルされた双極細胞は光刺激に対して同じ特性を持つと考えられるが，接触している視細胞の数にばらつきがみられた。したがって双極細胞の電気的結合の機能として，「視細胞からの入力信号のばらつきを，双極細胞同志が電気的に結合して平均化することにより補正している」ことが考えられる。

(27) 網膜神経回路の構造と初期視覚

八木哲也（九州工大・情報）
松本　隆（早稲田大・電気）

Marrは初期視覚の問題が，数学的に不良設定問題となっていることを指摘した[1]。さらにPoggioらはこの不良設定問題を解くために，初期視覚を標準正則化問題として定式化した[2]。この理論的枠組みは視覚をトップダウン的に定式化しようと試みたものであり，いくつかの初期視覚問題にうまく解くことができる。そこで，この理論に沿った情報処理が生体で実行されているならばどのような神経回路構造によるものなのか？という疑問は自然でかつ興味深いものである。この視点にたち像の平滑化—コントラスト強調について，網膜の等価電気回路モデルと標準正則化問題との間の関係を調べた。

1．平滑化とコントラスト強調：　生体の視覚は雑音の影響を受ける。光の量子性による雑音，神経回路網に内在するシナプス雑音，チャネル雑音などである。これらの雑音を取り除くため空間的な平滑化が必要となる。ただし，平滑化は空間解像度の低下すなわち像のぼやけを引き起こす。一方像から輪郭の情報を抽出するため（あるいは直流空間周波数成分を取り除くため）には，光強度の空間的変化のみを強調する操作が必要となる。この操作は当然雑音（高い空間周波数成分より成る）を増強する。従って初期視覚においては平滑化と空間微分操作を入力画像の信号対雑音比に応じて適度に調節して実行しなければならない。

2．標準正則化問題：　Poggioらは，上記の問題を以下のような標準正則化と呼ばれる数学的手法により定式化した。まず入力画像から雑音を適度に除去した“外界像モデル”を以下の関数G（k次評価関数とよぶ）を最小にするfとして求める。

$$G = (f(x) - d(x))^2 + \lambda_r \Sigma \int (f_r(x))^2 dx \quad (1)$$

ここにdは入力画像であり雑音を含む，fはdから推測される外界像モデル，f^kはfのk階微分である。右辺の第一項はfがdに“近い”ほど小さい値となり，第二項以下はfが“なめらか”な程小さい値をとる。λ_rは“平滑化”の程度を調節する正則化係数であり，入力画像の信号対雑音比が小さい程大きな値をとる。こうして求めた外界像モデルfの空間微分をとることにより

コントラストを強調する。

3．外網膜等価電気回路と標準正則化の対応：　外網膜では，平滑化は視細胞，水平細胞における電気シナプスを介した側方結合により実行される。Yagi[3]らは視細胞，水平細胞，双極細胞のなす神経回路網を等価電気回路網により表現した。詳しくは述べないが解析の結果，この等価回路によって表される視細胞および水平細胞応答の空間分布は，方程式(1)の解となっていることが分かった。水平細胞，視細胞の正則化係数は，細胞の膜コンダクタンスと電気シナプスコンダクタンスにより表現された。この対応からDAによる水平細胞の電気シナプス抵抗変化[4]は像の信号対雑音比に応じた正則化係数の調節と解釈される。

【参考文献】

(1) Marr, D. : Vision, Freeman (1982).

(2) Poggio, T., Torre, V. and Koch, C. : Nature, 317, 314/319 (1985).

(3) Yagi, T., Funahashi, Y. and Ariki,F. : IEEE and INNS, Proc. of the Int'l Joint Conf. on Neural Net., 1, pp. 787-789 (1989).

(4) Teranishi, T., Negishi, K. and Kato, S. : Nature 301, 234-246 (1983).

5．「生理学実験手技研究会」

1992年８月25日－27日

代表者　富田忠雄（名古屋大・医・生理）

世話人　山岸俊一

(1)　パッチクランプ法

山口和彦（生理研）

(2)　細胞内 Ca 光学測定法

小西真人（慈恵医大）

(3)　組織培養法

小幡邦彦（生理研）

(4)　ビデオ顕微鏡画像処理法

寺川　進（生理研）

パッチクランプの実習

山岸俊一，山口和彦，古家喜四夫，筒井泉雄，加藤建一（生理研）
森元克士（尚絅短大）

細胞内イオン濃度測定の実習

栗原　敏，小西真人（慈恵医大）
菅野富夫，葉原芳昭（生理研）
浅田尚登（北海道教育大）

ビデオ顕微鏡法の実習

寺川　進，上條　篤（生理研）

組織培養法の実習

小幡邦彦，赤川公朗，古家園子，中山　孝（生理研）

第３回目の研究会として実施したが，上記以外に28名の参加があり，内容的にも昨年度よりもさらに充実した内容であった。研究会終了後のアンケートでは，日本生理学雑誌にも発表しているように，参加者全員から大変有意義であったという高い評価が得られた。

6．「生体内における水構造，NMR-CT, 水・電解質輸送の研究」

1992年 9 月14日－15日

代表者：曽我美勝（藤田保衛大・総医研・分子生理）

世話人：亘　　弘

(1) マイクロ波でみる生体結合水

真下　悟，三浦信広（東海大・理・物理）

梅原利宏（お茶の水大・理・物理）

(2) 水溶液系の水の動的構造―ラマン散乱と TDR ―

富永靖徳，王　　研，三好幸子，匹田昭子，梅原利宏（お茶の水大・理・物理）

(3) DNA の中性子散乱

安居院あかね，池田　進，富永靖徳（お茶の水大・理・物理）

(4) 中性子ラジオグラフィの生体に対する応用研究

松本元一（藤田保衛大・衛生・放物），加藤一夫（稲沢市民病院）

(5) 溶血にともなう赤血球浮遊液粘度の変化

前田信治，鈴木洋司（愛媛大・医・第二生理）

精山明敏（大阪大・医・第二生理）

(6) MR イメージング用ファントム開発への基礎研究

恵良聖一，桑田一夫，中村浩二（岐阜大・医・第二生理）

曽我美勝（藤田保衛大・総医研・分子生理）

亘　　弘（生理研）

(7) タンパク溶液→ゲル変換における水構造変化の研究

曽我美勝，中上　寧，高崎昭彦（藤田保衛大・総医研・分子生理）

恵良聖一，桑田一夫，加藤一夫（岐阜大・医・第二生理）

恵良田知樹，田崎　明（筑波大・物理工）

松本元一（藤田保衛大・衛生・放物）

亘　　弘（生理研）

(8) 水クラスターの ^{17}O-NMR による解析

清水昭夫，須貝新太郎（創価大・工・生物工）

(9) 生体分子の水和構造・水和エネルギーに関する実験的・理論的研究

櫻井　実，井上義夫（東京工大・理工・生命理工）

(10) 疎水性の物理的起原

曽田邦嗣（長岡技科大・生物）

(11) 培養細胞のKイオン輸送と細胞容積変化

池原敏孝，宮本博司（徳島大・医・第一生理）

(12) 血液脳関門を介する水，電解質輸送の動的解析

能勢　博，土井康生，森本武利（京都府医大・第一生理）

(13) 棒状高分子電解質の解離平衡のモンテカルロシミュレーション

西尾草広，南方　陽（浜松医大・物理）

(14) スペクトル線分離方法の提案

亘　　弘（生理研）

(15) 緩衝反応の回路網表現

今井雄介，宮本　学，藤芳直彦，堀川浩司（大阪医大・第一生理）

(16) ニトロキシドスピンラベルの in vivo ESR スペクトルと MRI

西川弘恭（明治鍼灸大・生理）

生体内における水構造，NMR-CT，水・電解質輸送の研究の将来計画

司会：亘　　弘（生理研）

須貝新太郎（創価大・工・生物工）

【討論参加者】

○曽我美勝，中上　寧，高崎昭彦（藤田保衛大・総医研），松本元一，根原孝彦，江尻和隆，沢田高広，宮地富美子（藤田保衛大・衛生），加藤一夫（稲沢市民病院），今井雄介（大阪医大），前田信治（愛媛大・医），能勢　博（京都府医大），富永靖徳，安居院あかね，三好幸子，梅原利宏，櫻井　実，匹田昭子，王　　研（お茶の水大・理），天羽優子（東京大・先端研），曽田邦嗣（長岡技科大），南方　陽，西尾草広（浜松医大），惠良聖一，中村浩二，永井直樹（岐阜大・医），多田羅恒雄（静岡赤十字病院），西川弘恭，林　知也，森本泰司（明治鍼灸大），真下　悟，三浦信広（東海大・理），須貝新太郎，清水昭夫（創価大・工），井上義夫（東京工大・生命理工），池原敏孝（徳島大・医），上坂伸宏（日本医大），秀村和彦（名古屋大・医），亘　　弘，村上政隆，寺川　進，岡田泰伸（生理研）

【研究会概要】

生体の約60％をしめる水の輸送現象について生理学ではかなり研究されている。また，基礎，臨床医学の分野において正常と腫瘍細胞内・水構造の差異が研究され，水構造変化の機序が不明のまま，その成果は MRI として臨床診断に応用されている。しかしながら生理学の分野では細胞内水構造について系統的な研究がなされていない。生理学，生物物理学の水構造研究グループと水・電解質輸送研究グループが一同に会し，両分野が共同研究し，生理学研究所に設置された研究用高分解能 MRI，強固に結合した水，ATP(^{31}P-NMR) 等も測定し得る固体・液体両用 NMR スペクトロメーターを用いた研究計画などについて討議した。具体的内容は次の通りである。

(1) 水構造の基礎的研究： 水構造の計算機実験，各種イオンと水構造，生体高分子および合成高分子の水和，生体高分子ゾル・ゲル変換における水和，水構造変化，微小間隙内の水構造。
(2) 正常と腫瘍細胞内・水構造の差発現機序の研究。
(3) 水・電解質輸送機構の研究： 生理学的手法，回路網熱力学，各核種 NMR 手法による研究。

(1) マイクロ波でみる生体結合水

真下 悟，三浦信広（東海大・理・物理）
梅原利宏（お茶の水大・理・物理）

自由水と生体結合水では電場に対する配向の仕方が異なることが早くから注目されていた。そこで我々はこの配向の差に注目し，誘電緩和スペクトル測定(100kHz-20GHz)を時間領域反射法(TDR)を用いて種々の生体物質に対して行った。動物や魚の皮膚や筋肉，野菜，木材等おおよそ全ての生体物質で100MHz付近に結合水の配向によるピークが，20GHz付近には自由水の配向によるピークが観測される。DNAでは結合水の量によりＢ型からＡ型，Ｚ型へ構造転移することが示され，トロポコラーゲンや球状蛋白質でも結合水がみいだされた。結合水は生体分子の構造に敏感に依存し，変性した蛋白質のようなランダムコイルには付きにくいことも明らかになってきた。

(2) 水溶液系の水の動的構造―ラマン散乱と TDR ―

富永靖徳，王 研，三好幸子，匹田昭子，梅原利宏（お茶の水大・理・物理）

生体中では，水や水和水の動的な構造，つまり水分子の時間的なゆらぎ構造が，機能を明らかにするうえで重要な働きをしているにちがいないというのが，この研究の背景である。いきなり生体中では難しいので，蒸留水を参照しながら水溶液中での水の動的な構造を探ることから始めている。時間的なゆらぎを視る手段として，低振動数ラマン散乱と TDR （時間領域反射法誘電測定装置，*T*ime *D*omain *R*eflectometery）を組合わせる事により，周波数領域にして，1MHz～7500GHz (250cm-1) の領域での特徴を解析した。

水溶液としてアスコルビン酸異性体を取り上げ，生理活性のあるＬ－キシロアスコルビン酸(ビタミンＣ）と，生理活性のほとんどないＤ－アラボアスコルビン酸の水溶液中で，水と水和水に動的構造の違いがあるかどうかを調べた。

解析の結果，ビタミンＣは水和水以外のバルクの水の構造をほとんど壊さないが，Ｄ－アラボ

型は，バルクの水の構造まで壊していると思われる結果を得た。

(3) DNAの中性子散乱

安居院あかね，富永靖徳（お茶の水大・理）
池田　進（高エ研ブースター）

DNAの水和水については，これまでにもラマン散乱などの方法で研究を行ってきた。中性子散乱では，中性子の水素に対する非干渉性散乱の散乱断面積が著しく大きいことを用いると，選択的に水素の運動を観ることができる。今回我々はDNAの20w/w%ゲルについて，中性子散乱の実験を測定温度範囲−100℃から60℃で行った。

非弾性中性子散乱のスペクトルには，いくつかのピークがみられた。特に6.2meVと70meVに顕著なピークがあることが分かった。このうち6.2meVのピークは，低振動ラマン散乱のスペクトルとの比較から，DNAの周りの水和水の運動や二重螺旋の塩基対についた水素結合の振動モードに関係したものであると思われる。

また，弾性散乱成分の積分強度は温度の上昇と共に減少し，−20℃付近で折れまがった。これは，DNAの周りの水和水の凍結過程と関連していると思われる。

(4) 中性子ラジオグラフィの生体に対する応用研究

松本元一（藤田保衛大・衛生・放物）
加藤一夫（稲沢市民病院）

中性子ラジオグラフィはX線ラジオグラフィと類似の技術で，中性子ビームの試料による減衰パターンをコンバーターで変換し，フィルムに撮像する技術である。物質との相互作用がX線では核外電子によるものであるのに反して，中性子では核そのものとであり，それ故異なった相補的な情報が得られる。

水は水素の散乱によって非常に強力な熱中性子の減弱材であるので，現在まで厚さの薄い生物試料に対象が限られていた。しかし世界中でも1か2のJRR-3MのTNRFが利用可能となったので，ラットとマウスの実時間撮像に試用してみた。

その結果について概説すると，骨による中性子の減弱は少なく，生体内の含水量が像を決定するようである。そのため，例えば足と尾の軟骨などは識別可能であった。特に足の骨髄は外部の肉厚が薄いため，明瞭に識別可能であった。心配されていた線量率も約2×10^{-3}Sv/sで，今後

に期待の持てるものであった。

このような中性子の利点を生かす分野が生体研究には存在すると確信して，今後この方面の研究を促進させたいとの希望を抱いている。

(5) 溶血にともなう赤血球浮遊液粘度の変化

前田信治，鈴木洋司（愛媛大・医・第二生理）
精山明敏（大阪大・医・第一生理）

部分的に溶血した赤血球浮遊液の粘度変化を調べ，結果についてはCassonの式を適応して解析を行った。

（1）溶血の程度が増すとCasson粘度は上昇するが，赤血球膜のない状態では（すなわち，ヘモグロビン溶液に赤血球が浮遊している状態）では粘度の上昇は抑制された。

（2）Cassonの降伏値はヘマトクリットが増すと増加するが，部分的に溶血した赤血球浮遊液においてはヘマトクリットと溶血の程度の両方に依存していた。

（3）赤血球浮遊液の粘度はわずかな溶血においても著しく増加し，ある溶血度において最大となった。最大粘度を与える溶血度は全ヘモグロビン濃度とズリ速度の両方に依存していた。

（4）（2），（3）の現象は赤血球浮遊液とヘモグロビン溶液の混合液（赤血球膜の浮遊していない状態）においても明らかに認められた。

したがって，部分的な溶血による血液粘度の上昇は赤血球膜のみならずヘモグロビン分子の赤血球－赤血球間相互作用に対する何らかの影響によると考えられる。

(6) MRイメージング用ファントム開発への基礎研究

恵良聖一，桑田一夫，中村浩二（岐阜大・医・生理）
曽我美勝（藤田保衛大・総医研・分子生理）
亘　　弘（生理研）

生体組織内の水構造研究の一環として，今までに360MHz ^{1}H-NMRにより，主として縦緩和時間(T_1)，タンパク質より水分子への交差緩和時間(T_{1S})を測定し，特にT_{1S}が生体組織内における水構造変化を鋭敏に反映し，このT_{1S}をNMRパラメーターとして用いることが新しいMRイメージング法につながる可能性が示唆された。一方，臨床分野でMRイメージングを撮像する場合，得られるイメージングの性能評価用のファントムが必要であり，そのファントムの素材は少

しでも生体に近い材料として寒天，ゼラチン，ポリアクリルアミドなどの高含水高分子ゲルが検討されたが，現在のところ polyvinyl alcohol (PVA) ゲルによるファントムが使用されている。我々は上述の水構造研究の一環としてソフトコンタクトレンズ (SCL_S) 内の水構造研究の際，SCL_S の組成を種々に変化させることで，できるだけ生体に近い水構造を示す材料を検討し，MR イメージング用ファントムとしての基礎研究を行った。

合成高分子として，2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) と glyceryl methacrylate (GMA) との copolymer, HEMA と N-vinyl pyrrolidone (NVP) との copolymer, GMA, NVP と methyl methacrylate (MMA) との copolymer, NVP と MMA との copolymer を用い，それぞれの組成を変えることで含水率の異なった SCL_S を使用した。これらの SCL_S を棒状に加工し，内径 1.1mm ϕ のガラス細管に入れ，ロック用溶媒を入れた 5mm ϕ NMR 試料管に挿入した。^{1}H-NMR 測定には Bruker 社製 AM500 NMR スペクトロメーターを用いて T_1, T_{1S} を測定し，SCL_S 内の水構造を比較検討した（T_{1S} は7.13，−4.00ppm を $\gamma H_2/2\pi \sim 69$Hz で f_2 照射して求めた)。また生体試料として ddy マウス（2，4，8 週齢）の水晶体を同様に測定した。

HEMA-GMA 系 copolymer 及び HEMA-NVP 系 copolymer が生体試料の結果に良く一致した。

(7) タンパク質溶液→ゲル変換における水構造変化の研究

曽我美勝，中上　寧，高崎昭彦（藤田保衛大・総医研・分子生理）
恵良聖一，桑田一夫，加藤一夫（岐阜大・医・生理）
恵良田知樹，田崎　明（筑波大）
松本元一（藤田保衛大・衛生・放物）
亘　　弘（生理研）

ウミ血漿アルブミンの溶液→ゲル変換（BPA*ゲル）における水構造変化を ^{1}H-NMR, 動的光散乱を用いて測定した。BPA*ゲル中では，BPA*の大粒径分子集合体が観測された。また，BPA*ゲルの ^{1}H-NMR スペクトルには，1.70p.p.m. に，半値幅～ 1900Hz の Lorentz 型成分が観測された。ゲル化により水分子の縦 (T_1), 横緩和時間 (T_2) が短縮した。特に，タンパク質より水への分子間交差緩和時間が大幅に短縮した。また，−10～15p.p.m. の ^{1}H を順番に一定強度のラジオ波で10秒間照射し，水への飽和移動スペクトルを測定すると，溶液では ^{1}H-NMR スペクトルにほぼ似ているが，ゲルでは，前述の半値幅の大きい Lorentz 型吸収線の寄与の大きい飽和移動作用スペクトルになった。タンパク質より水への交差緩和（飽和移動）では，結合水量と大粒径分子集合体の寄与が大であろう。

(8) 水クラスターの ^{17}O-NMR による解析

清水昭夫，須貝新太郎（創価大・工・生物工）

生体内水構造の基礎的研究として，超純水製造の各過程，及び種々のガス含有の水の ^{17}O-NMR の T_1, T_2 と誘電特性等，又種々の陽イオンの臭化物水溶液の ^{1}H, ^{2}H, ^{17}O-NMR の T_1 の測定を行った。

超純水製造の各過程の ^{17}O-NMR の T_1 は一定だが T_2 は pH に依存し，それは周りの水との水素交換の仮定で説明できた，誘電緩和時間，その分布からも一次純水から超純水までそのクラスター構造の変化は考えられない。O_2, N_2, は NMR 特性を変化させないが，CO_2 は pH 変化を通じて T_2 を変える。以上は最近よく言われる NMR 的小さい水の存在を否定する。

また水の種々の核の NMR の T_1 からその運動の等方性が，一方正の水和イオン（Na^+等），負の水和イオン（K^+等）の水和水の運動は等方的でない事が推論されたのに，テトラアルキルアンモニウムイオンの周りでは水の運動は殆ど等方的と考えられる結果を得た。この疎水水和の特性を含めて水溶液中の水構造，その運動性について論議する。

(9) 生体分子の水和構造・水和エネルギーに関する実験的・理論的研究

井上義夫，櫻井　実（東京工大・生命理工）

われわれのグループでは，基本的な生命現象のメカニズムを水との関わりにおいて解明することを試みている。現在の研究対象について以下に項目別にまとめる。

1．生体分子の水和エネルギーの量子科学計算

水溶液中で起こる分子認識反応や酵素反応を理解するためには，反応に与る分子や反応中間体（遷移状態も含む）の水和エネルギー及び水和によって受ける電子構造変化を正確に評価しなければならない。われわれは，分子軌道計算に溶媒効果を組み入れる理論を境界要素法を用いて展開し，いくつか応用を試みた。その一つとして基本的化合物の水和エンタルピーを計算し実験値と比較したところ，定量的一致を示した。また，この理論を用いて酵素のモデルとみなされるシクロデキストリンの触媒活性の機構を調べた。特に，脱炭酸反応に対する加速効果に関しては，水媒質とシクロデキストリンキャビティーの役割を明確にした。

2．生物の耐乾燥・耐凍結能力と水構造

乾燥・凍結状態に耐える生物は，そのような極限状態におかれると体内に糖類を貯える。中でも，トレハロースと呼ばれる二糖は細胞の耐乾燥・耐凍結活性に優れている。われわれは，そのメカニズムを解明すべく，現在次の観点から研究を行っている。

i）他の糖に比べてトレハロースの活性が高い理由
NMR, DSC による糖類の水和特性の比較
計算機シミュレーションによる糖の水和構造
ii）モデル系を用いた膜－糖相互作用
糖の水和特性が膜物性に与える影響
iii）NMR によるイースト菌細胞内の水状態
トレハロース含料の多い細胞と少ない細胞中での水の運動性の比較

(10) 疎水性の物理的起原

曽田邦嗣（長岡技科大・生物）

疎水性の物理的起原を解明するために，溶媒中への空孔形成自由エネルギーの解析を行い，次の結論を得た。

1．疎水効果を決定する主要な物理的因子は，水溶媒中への非極性溶質の導入に伴う溶媒水の配位エントロピーの減少である。この配位エントロピーは，剛体球溶媒でも存在する幾何学的効果に起因し，所謂“水和水の構造化”とは別のものである。
2．上の配位エントロピーの減少は，常温常圧における液体の中で最もサイズの小さい分子からなる水において最も著しい。
3．水溶媒中に導入された空孔周辺の水和水の構造変化による，水のエンタルピーとエントロピーの変化の効果は互いに打ち消し合い，自由エネルギーの変化には寄与しない。
4．水和水は，水素結合網を保つために相互に何らかの再配置を行うという意味である種の構造を作るが，エネルギー的にはバルク水に近い。

(11) 培養細胞のＫイオン輸送と細胞容積の変化

池原敏孝，宮本博司（徳島大・医・第一生理）

付着及び浮遊した HeLa 細胞を 235mOsM の低張液にさらすと，いずれも swell した。浸透圧が 166mOsM に低下すると，付着細胞では，液交換後，急速に水分と K^+ が細胞外へ排出され，次いで，逆に両成分が次第に細胞内に取りこまれた。しかし浮遊細胞では，即座に swell し，次ぎに K^+ 排出と RVD が生じた。1mM quinine は，両細胞からの水分排出を阻害した。この排出の速度及び開始時間の比較より，付着細胞により強い K^+ channel の活性化が示唆される。また

低張液の Ca^{2+} 除去及び 10mM $BaCl_2$ 添加は浮遊細胞の RVD を部分的に阻害した。これらの結果より，低張液中では，付着細胞から net の水排出が生じるが，これには Ca^{2+} 依存性 K^+ channel を介する K^+ loss が関与する。一方浮遊細胞では浸透圧的に swell した後，K^+ channel を介する K^+ および Na^+ ポンプを介する Na^+ の排出を伴う RVD が生じることが示唆される。また両細胞の容積変化の違いは，K^+ channel と Na^+ ポンプの活性化の違いによるものと考えられる。

(12) 血液脳関門を介する水，電解質輸送の動的解析
—高張性 NaCl 溶液血中投与時の髄液 Na 濃度の過渡的応答—

能勢　博，土井康生，森本武利（京都府医大・第一生理）

急性に血液 Na 濃度が上昇した際の髄液 Na 濃度変化を定量化することを目的として，麻酔下ラットの血液中に 1M NaCl を体重 100g 当り 0.1ml (n＝5), 0.2ml (n＝6), 0.3ml (n＝5) をそれぞれ注入した際の血液 Na 濃度 ([Na] p) と髄液 Na 濃度 ([Na] csf) を電極法で連続測定した。その結果，[Na] p は注入終了時に各群とも最大増加量（8.6±0.6，12.8±1.2，17.9±1.4mEq mean ± SE）を示し，次の10分間で急速に低下して定常値に達した。注入終了時の各群の [Na] p の最大増加量 (△ [Na] p^{max}) を100％とすると注入終了後20分目にはどの群も40％の値を示した。一方，[Na] csf は食塩水注入中 [Na] p に比例して増加し，いずれの群でも [Na] p の最大値より 2 − 3 分の遅れで△ [Na] p^{max} の20％の値に達し，その後その値を維持した。以上の結果は血液中の急激な Na 濃度の上昇に対して髄液中 Na 濃度は抵抗を示し，比較的安定していること，また [Na] p と [Na] csf の変化との間には線形関係が成立することが明かになった。

(13) 棒状高分子電解質の解離平衡のモンテカルロシミュレーション

西尾卓広，南方　陽（浜松医大・物理）

棒状高分子電解質の無塩系の解離平衡を円筒セルモデルにおいてモンテカルロ (MC) 法でシミュレートし，Poisson-Boltzmann (PB) 方程式の解析解と比較した。

この方法は，低分子イオンの位置だけでなく解離基の状態（解離・未解離）をも変化させ，与えられた pH における平均の解離度とイオン分布を同時に求めるもので，自由エネルギーとその成分の計算から解離平衡の熱力学的な検討が可能となる。

高分子電解質を細い円筒の表面に規則的に解離基が並んだものとし，対イオンを帯電した剛体球とみなしたモデル系について調べた結果，MC 法で得られた対イオン分布は，高分子の半径と

対イオンの半径の組合わせを適当に選べば，PB 方程式の解とよく一致したが，△ pK の値は PB 法に比べかなり低くなった。これは，PB 法では電荷間の位置の相関が取り入れられていないため静電エネルギー項に差を生じることによるものと考えられる。

(14) スペクトル線分離方法の提案

亘　弘（生理研）

【まえおき】

生体より発する情報は，生体が不均質である事から，各々の部分よりの情報が混在して測定されるのが常である。しかも我々が要求する情報と言うものは，量的に言って全てのうちのごく一部であることが多い。例えば細胞内の細胞膜に近接している水分子の物理性質を知る場合等はこの例の一つとしてあげられよう。したがって，生体での測定に際しては，空間的に分離して特定の情報を検出するか，特定部位での特別な物理性質を検出する測定方法を利用しなければならない。しかし常に空間的に分離して検出する様な手段が完備しているとは限らない。という事になると，観測された信号より微小の部分を抜き出す以外に方法はない。

従来スペクトルは CW 一方式（周波数領域）で測定されてきた。したがって周波数領域でのフィルター技術はアナログ方式からディジタル方式まで種々のものが開発された。種々の信号が混ざりあったスペクトルから個々の信号を分離する手法は数多い。また古くは光学顕微鏡，X 線 CT や，近赤外線画像などは周波数領域で測定されているが，空間情報を加味したもので，これらは計算機の駆使なしには有り得ない。

しかし最近では時間領域での測定の例も多くなり，時間領域での波形分離も手掛けられるようになってきた。例えば NMR や ESR における緩和時間の差を利用する信号の分離や，多量子遷移のみを取り出すパルス列の使用等は特定部位の物理性質の情報のみを検出する測定方法の一例である。またこれらの画像化は近年急速に進歩した。

時間及び周波数領域のスペクトルはフーリエ変換により結ばれているので，その解析を時間領域においても併用して行うと，スペクトルの持っている情報を有効に利用出来る筈である。少しづつ周波数の異なった信号が混ざりあった周波数領域のスペクトルより，時間領域の利用による個々の信号を分離する方法を提案したい。

【結果】

まず ω_A と ω_B とに極大を持ち，対称である二つの信号A，Bによって合成された周波数スペクトル（S）を考える。これの正の部分のみをとり，$\omega_1 = \omega_A$ となるような回転座標系にのせる（信号Aを on resonance にする）（図左上）。これの逆フーリエ変換したものは実数部 (Re) と虚数部 (Im) に信号を持つ。これらを別々に分離し，それぞれをフーリエ変換するとスペクトルが

えられる（図中・右上）。後者を90°回転[exp(－iπ/2)]させる（図右下）。これを実数に変えた[x(－i)]後，前者とたし合わすと，off resonanceの場合と異なり，信号Aのみが抽出されてくる零となる（図中下）。

この分離方式に要求されるのは信号が対称である必要がある。しかしいわゆる信号の幅に関する情報が抜き出されている特徴がある。

(15) 緩衝反応の回路網表現

今井雄介，宮本　学，藤芳直彦，堀川浩司（大阪医大・第一生理）

生体溶液を酸滴定することによって，その中の緩衝成分の量と酸塩基平衡定数を求めることを目的とする。複数の緩衝成分の緩衝反応が進行する様子を容易に考察できるように回路網で表現し，そのモデルを用いて滴定実験をシミュレートして緩衝反応の理解を深める。滴定回路表現の矢印は成分の流れ，○印は流れが分配される並列回路，また濃度依存性の反応を示す記号も用いる。各成分の溶液容量体を大文字Cで示す。回路化すると相互関係が容易に理解でき，多くの緩衝成分のある系でも滴定量から[H]変化を予想する式が導かれる。モデルを用いてのシミュレーションは既知の緩衝液についての滴定実験を完全に再現するものであった。

血液等の生体溶液を酸滴定実験を行い，それとシミュレーションを対応させて，血液中の緩衝成分の量と平衡定数について考察を加えた。

(16) ニトロキシドスピンラベルの in vivo ESR スペクトルと MRI

西川弘恭（明治鍼灸大・生理）

in vivo ESR 装置を用い，麻酔したマウスに尾静脈からニトロキシドフリーラジカル溶液(CTPO：40mM/L, TEMPOL：100mM/L)を一定速度(4ml/h)で注入し，マウス頭部と大腿部でLーバンドESRスペクトルを得た。このスペクトルは波形解析によりニトロキシドラジカルの超微細構造を示す3つの共鳴線とそれの中央の共鳴線に一致した位置にある別の線幅の広い共鳴線で構成されていることが明かとなった。後者の共鳴線が高濃度ニトロキシドラジカルの存在によるのか，スピントラップにより生じた別のラジカル種によるものかを検討するためT_2強調スピンエコーMRI(TR/TE＝2000/70)をESR測定と同一条件下で得た。その結果前者の仮説を支持するMRIにニトロキシドラジカルの局在を示唆するT_2緩和時間短縮部位の存在が認められた。

本研究は新谷元章，村上守生，永井康雄（武田薬品・創薬研究本部）との共同研究である。

7．「脳腸ホルモンの生理作用に関する研究会」（第6回）

1992年11月26日－27日
代表者　菅野富夫
世話人　菅野富夫，葉原芳昭

(1)　ヒドラの原始的な散在神経系における神経細胞の動的性質
小泉　修（福岡女子大）

(2)　PACAP レセプター
矢内原昇，星野　稔，李　　敏，鄭　立勤（静岡県大）

(3)　細胞内・細胞間シグナルとしての $[Ca^{2+}]_c$ 振動波
菅野富夫，葉原芳昭（生理研）

(4)　成長ホルモン放出ホルモン (GHRH) の作用機序
加藤昌克（群馬大）

(5)　グルカゴンによるラット肝セリントランスアミナーゼ誘導の分子機構とその生理的意義
市山　新（浜松医大）

(6)　ラット視床下部視索上核ニューロンのグルタミン酸受容
山下　博（産業医大）

(7)　脳内 VIP とガラニンに及ぼす塩酸ビフェメランの作用の特異性
矢内原千鶴子，黒川信夫（大阪大）

(8)　視床下部下垂体系におけるグルタミン酸受容体
木山博資，遠山正弥（大阪大）

(9)　下痢の発症機序を考える
藤田恒夫（新潟大）

【討論参加者】

小泉　修，矢内原昇，加藤昌克，市山　新，山下　博，矢内原千鶴子，木山博資，藤田恒夫，亘弘，成瀬　達，桑原厚和，菅野富夫，葉原芳昭，Julia Busik

【研究会概要】

最も原始的な神経網モデルであるヒドラの散在神経系を構成するニューロンは，種々の脳腸ホルモンを含有しており，最も未分化なニューロンであって，パラニューロンとの共通性も多く，パラニューロンの一群を成している脳腸ホルモン分泌細胞との共通性も多い。

セクレチンや VIP に類似しているペプチドである PACAP がその標的細胞の受容体に結合すると，細胞内の環状 AMP 量が上昇し，細胞内シグナルとして働き，その細胞の反応を引き起こす。

PACAP 受容体は VIP, PHI やヘロデルミンにも結合するが，ペプチドの中には結合しても環状 AMP を産生しないものもある。

脳腸ホルモン分泌細胞とそれらの標的細胞の主要な細胞内シグナルは，環状 AMP 濃度と細胞内カルシウムイオン濃度，$[Ca^{2+}]_c$, の変動である。多くの場合，$[Ca^{2+}]_c$ は振動性に変動しており，それがその細胞の反応を持続させていると考えられる。GHRH は，環状 AMP と細胞外からの Ca^{2+} 流入をシグナルとして GH 分泌細胞の反応を引き起こす。

さらに，受容体の脳・視床下部・下垂体分布，細胞内シグナルと反応とを連結する諸過程の分子レベルの解析，脳腸ホルモン種々の病態との関係についても考察を深めた。

(1) ヒドラの原始的な散在神経系における神経細胞の動的性質

小泉　修（福岡女子大）

腔腸動物ヒドラは，動物界で最も単純な神経系・散在神経系を持ち，脳や神経節の分化が見られず体全体に神経網を形成している。最近，神経ペプチドの抗血清および単一クローン抗体を用いた蛍光染色法により，この神経網を正確にかつ詳細に観察することが可能になった。その結果ヒドラの神経系も多くの部分集合から成り立っていて，神経網は各部位で異なり部位特異性の高い分布を維持していることが判明した。

更にヒドラに於ては，神経細胞が成熟個体においても常に幹細胞より分化・生産されている。同時に，神経細胞は常にその位置を変え両端より脱落していて，継続的な生産と消失のバランスのうえにある。このような特異な成長動態のもとで，一定の神経網を維持するため，ヒドラの神経細胞は，位置環境に依存して神経ペプチドの発現を切り替えたり，異なった神経細胞タイプ間の変換をする能力を持ち，神経系の動的側面が顕著であることが判明した。

このような動的なヒドラの散在神経系の中で，免疫組織化学により頭部に神経環が観察された。この神経環は神経細胞の突起同志が接着して神経束を形成し，それが咽頭の周囲を走り神経の環を形成していた。この神経環の構造と形成・維持を詳しく調べたところ，この神経環は他の部位の動的な神経網とは対照的に発生学的に非常に静かな神経構造であり，中枢神経系の原始モデルとしてとらえられる可能性を示唆していた。

(2) PACAP レセプター

矢内原昇，星野　稔，李　　敏，鄭　立勤（静岡県大）

本研究は，ヒト神経芽細胞腫培養細胞系 NB-OK-1 に PACAP 受容体が認められたことから，合成 PACAP-38, PACAP-27 ならびにそれらのN端とC端フラグメント8種，VIP, PHI, ヘロデルミンおよびセクレチンを用い，NB-OK-1 細胞の PACAP 受容体に対する結合活性および細胞内 cAMP 産生能を比較検討した。

受容体結合実験には，[^{125}I] PACAP-27 を用い，各ペプチドの結合活性を求めた。各ペプチドの結合活性は，PACAP-38＞PACAP-27＞PACAP (8-27)＞PACAP (16-38)＞PACAP (22-38)＞VIP＞helodermin＞PACAP (13-27)＞PHI＞PACAP (16-27)＞PACAP (1-15)＞secretin の順であり，PACAP(16-27), PACAP (1-15) および secretin の結合活性は顕著に低いものであった。一方，細胞内 cAMP 産生能は，PACAP-38＞PACAP-27＞VIP＞helodermin＞PHI＞PACAP (8-27)＞PACAP (22-38)＞PACAP (16-38) ＝ PACAP (1-15)＞PACAP (13-27) ＝ PACAP (16-27) ＝ secretin の順であった。

PACAP 及び PACAP フラグメントの PACAP 受容体への結合活性および cAMP 産生能の結果から，PACAP (8-27) は，PACAP-38 および PACAP-27 の結合に対して拮抗作用を示した。一方，PACAP (8-27) は，PACAP, VIP および helodermin の結合には有意の影響を示さなかった。すなわち，本研究の結果は，NB-OK-1 細胞には PACAP, VIP および helodermin にそれぞれ特異的な受容体が存在することを示唆した。

(3) 細胞内・細胞間シグナルとしての $[Ca^{2+}]_c$ 振動波

菅野富夫，葉原芳昭（生理研）

副腎髄質細胞のように細胞極性が明らかではなくて細胞間にギャップ結合が認められない細胞では，分泌刺激がそれぞれ固有の受容体に結合した後，細胞内シグナルとして細胞質カルシウムイオン濃度，$[Ca^{2+}]_c$ が上昇しても，伝播の方向性は明確ではない。それに対して，ニューロンや膵腺房細胞のように，細胞極性が認められる細胞では，刺激一分泌連関の方向に順行して $[Ca^{2+}]_c$ 波が伝播する。膵腺房細胞のように分泌反応が持続する細胞は，低頻度の $[Ca^{2+}]_c$ 振動波が，受容体が局在する細胞膜血管側から放出部位である腺腔側に向って伝播する。分泌刺激が薬理・病理的高濃度で，一個ずつに遊離された細胞あるいはどちらかの条件下では，その伝播の方向性は失われる。このシグナルは細胞間のシグナルとしての役割も担っており，この時は栄養効果などの長時間の効果に関連していると考えられる。

(4) 成長ホルモン放出ホルモン (GRF) の作用機序

加藤昌克（群馬大）

視床下部ペプチドであるGRFは血流を介して下垂体前葉の成長ホルモン (GH) 産生細胞に作用しGH放出を促進する。その細胞レベルでの作用メカニズムを明らかにする目的で実験を行い以下の結果を得た。1）GRFによるGH放出の過程に細胞外Ca^{2+}とNa^{+}の存在が不可欠であった。2）GRF作用により$[Ca^{2+}]_i$の上昇が見られた。特に細胞膜直下でその変化は著明であった。この作用も外液Ca^{2+}とNa^{+}の存在に依存した。3）GRFはGF細胞に作用しNa^{+}依存性の脱分極を引き起こした。この脱分極の過程にCa^{2+}は関与しなかった。

以上からGRFの作用機序は次のように考えられる。1）GRFはGH細胞に作用しcAMPを介して細胞膜のNa^{+}透過性を上げる（脱分極）。2）膜電位感受性Ca^{2+}チャンネルが活性化される（Ca^{2+}の細胞内への流入）。3）開口放出によるGH分泌が促進される。

(5) グルカゴンによるラット肝セリントランスアミナーゼ誘導の分子機構とその生理的意義

市山　新（浜松医大）

セリントランスアミナーゼ（SPTと略）はラット肝ではペルオキシソームとミトコンドリアの両方に存在し，ミトコンドリアのSPTのHがグルカゴンによる誘導を受ける。SPT遺伝子は一種類であるが，第一エキソン内の異なる開始部位からの転写により5'末端部の長さが異なる2種類のmRNAが生産される。5'末端が長いmRNAはミトコンドリア標的N末端延長配列を指令する塩基配列を翻訳領域に持つので産物はミトコンドリアへ移行する。初代培養ラット肝細胞を用いてこのグルカゴンによる選択的誘導機構を理解した結果，以下の点が明らかになった。(1) グルカゴンはcAMPとプロテインキナーゼAを介する機構でSPT遺伝子の上流側開始部位からの転写は選択的に促進する。(2) このグルカゴンあるいはcAMPによる転写促進はグルココルチコイドにより遮断される。以上の知見を加味して，SPTが2種類のオルガネラに存在することの生理的意義を討論した。

(6) ラット視床下部視索上核ニューロンのグルタミン酸受容

山下　博（産業医大）

視床下部視索上核ニューロンへの主な興奮性入力の一つとしてグルタミン酸が知られている。我々は視床下部スライス標本を用いて，視索上核ニューロンに対するグルタミン酸アゴニストの作用およびNMDAで誘起される反応に対して，新しい神経伝達物質として注目されている一酸化窒素がどのように影響するか細胞内記録法により検討した。NMDAおよびnon-NMDAレセプターアゴニスト（カイニン酸・キスカル酸）は用量反応的に脱分極反応を誘発した。この反応はテトロドトキシン存在下でも観察された。NMDAで誘起された脱分極のおおきさは外液Na濃度に比例したが，外液Ca濃度の増加と共に減少した。また，NMDAで誘起された脱分極はニトノプルシド，一酸化窒素合成阻害剤(LNNA)あるいはヘモグロビンの同時投与で変化した。以上の結果は，NMDAで誘起された視索上核ニューロンの脱分極反応は外液イオン組成に影響されること，および，この反応に一酸化窒素が関与している可能性を示唆している。

(7) 脳内VIPとガラニンに及ぼす塩酸ビフェメランの作用の特異性

矢内原千鶴子，黒川信夫（大阪大）

神経ペプチドを指標とする各種脳循環代謝改善薬の作用特異性の解析を目的とする研究の一部として塩酸ビフェメラン(BFM－HCl)の腹腔内単回投与ラットの脳内VIPとガラニン(Gal)に及ぼす影響を解析し，塩酸インデロキサジン(IND-HCl)の場合と比較した。投与BFM－HCl(30mg/kg)の脳各組織内分布には組織特異性は認められなかった。BFM－HCl(10, 20, 30mg/kg)投与後の脳組織内免疫活性VIP(VIP-IR)濃度は，大脳皮質，視床（基底核部を含む），視床下部で有意に上昇したが，その上昇の用量反応性は，投与5分後の視床および15分後の視床下部においてのみ認められた。なお，大脳皮質では投与30分後にVIP-IRの有意な低下が確認された。IND－HCl(10, 30mg/kg)投与でも大脳皮質VIP-IRは5分後に有意に上昇したが30分後の低下は見られなかった。また，視床でのVIP-IRの変動パターンもBFMとINDで明らかに相違していた。免疫活性Gal(Gal-IR)は，測定したいずれの時点（投与5，15，30，45分後）においてもGal-IRの上昇はなく，有意な低下，低下傾向，あるいは変動なしという結果であり，特に視床での低下が顕著であった。さらに，シナプトゾーム分画を用いる^{3}H-BFMの結合実験により，視床でのBFMの特異結合部位の存在を支持する結果を得た。本研究で明らかにした脳内VIP-IRとGal-IRの変動はBFM-HClの作用特異性の解析に基礎的データを提供するのみならずBFM-HClがVIPの合成／放出に関する薬理学的試薬になりうることを支持するものであった。

(8) 視床下部下垂体系におけるグルタミン酸受容体

木山博資，遠山正弥（大阪大）

下垂体における AMPA 型グルタミン酸受容体の局在をサブユニット (GluR1, GluR2/3, GluR4) に特異的な抗体を用いて検索した。その結果これらのサブユニット免疫陽性構造は特異的な局在様式を示し，下垂体においても中枢神経系同様にグルタミン酸による情報伝達が行われていることを示唆した。特に後葉ではピチュイサイトに GluR2/3 陽性反応が認められたほか，強い GluR4 陽性反応が神経終末様の形態を呈していた。視床下部大細胞性神経分泌細胞で，GluR4mRNA の豊富な発現を認めたことより，GluR4 サブユニットが視床下部大細胞性神経分泌細胞で産生され下垂体後葉の神経終末に局在し，神経終末よりの後葉ホルモン分泌にはグルタミン酸が関与している可能性が示された。また本結果はピチュイサイト自身もグルタミン酸により制御を受けている可能性を示すものであり，これらの可能性は神経内分泌系におけるグルタミン酸を介した新たなホルモン分泌調節機構の存在を示唆すると考えられる。

(9) 下痢の発症機序を考える

藤田恒夫（新潟大）

私たちは先に麻酔犬の小腸ループに高張ブドウ糖やコレラトキシンを注入し，EC 細胞の脱果粒をみいだし，放出される 5HT が下痢をひきおこすものと推測した。

ところが最近，腸管壁の膜片標本を 5HT と VIP の両抗体で二重染色し，上皮下の VIP 神経網が EC 細胞と接合することを見いだし，次の下痢発症機転を想定した。

催下痢物質（内腔）－→ EC 細胞の 5HT 放出－→神経の VIP 放出－→腸液分泌亢進等（下痢）

目下，麻酔犬の小腸ループを用いて 5HT, VIP の腸液分泌の促進を確認しており，さらに 5HT ブロッカーなどを用いて，上の仮説を検討中である。

8．「音声コミュニケーションのニューロエソロジー的研究」

1992年11月25－26日
代表者：谷口郁雄
世話人：山岸俊一

(1) セキセイインコ field L の神経細胞の種特異的鳴き声に対する反応
森　浩一（東京大・医・音声研）

(2) セキセイインコの音声の知覚・学習機構
奥村　浩，藤原宏子（日女大）

(3) 鳥類発声中枢のカテゴリカル聴反応
斎藤　望（獨協医大・第２生理）

(4) ヒゲコウモリ大脳皮質 FM-FM 野背側部位における CF 音応答
浅沼　厚，柳沢慧二（鶴見大・歯）
Haibing Teng，菅乃武男（ワシントン大）

(5) コウモリ FM-FM 野ニューロンの同期放電
下澤楯夫（北沢大・電子研）
加納正道，Jagmeet Kanwal，菅乃武男（ワシントン大）

(6) コウモリの音声コミュニケーション
松村澄子（山口大・医療技術短大）

(7) ブタオザル自発発声時の疑核運動ニューロン活動に関する電気生理学的研究
矢島幸雄（兵庫医大・第２生理）
Chuck Larson（ノースウエスタン大）

(8) チンパンジーの種特異的音声の知覚
小嶋祥三（京都大・霊長類研）

(9) モルモットの鳴き声に対する聴覚中枢の応答
橋本　亨（東医歯大・医用研）

(10) 皮質聴覚領の機能的構造のリアルタイム・イメージング
谷口郁雄・堀川順生・森山俊男・那須昌啓（東医歯大・難研・聴覚情報）

(11) 先行音効果 (Precedence effect) か，後続音効果か
亀田和夫，鎌田　勉（北海道大・歯）

(12) 両側側頭葉損傷による小児の聴覚失認２症例の聴覚および発話障害
進藤美津子，田中美郷，鈴木淳一（帝京大・医）
加賀君孝（東京大・医）

⑬ 蝸牛電気刺激による耳鳴抑制とそのメカニズムの考察

伊福部達，坂尻正次（北海道大・電子研）
松島純一（北海道大・医）

⑭ 人工内耳患者の言語聴取能

舩坂宗太郎（東京医大）

【参加者】

森　浩一，奥村　浩，藤原宏子，斎藤　望，浅沼　厚，下澤楯夫，松村澄子，矢島幸雄，小嶋祥三，橋本　亨，谷口郁雄，亀田和夫，進藤美津子，伊福部達，松島純一，舩坂宗太郎，丸山直滋，村田計一，力丸　裕，鈴木淳一，青木　清，筧　一彦，柳沢慧二，堀川順生，鎌田　勉

【研究会概要】

動物の音声によるコミュケーションは種固有の音声を媒介として，音声を発する側とそれを聴く側との間にループが形成されることにより成立する。このことから聴覚（感覚）系と発声（運動）系とが密接な関係をもっていることが予想される。本研究会はこのような課題に対して，ニューロエソロジー的なアプローチを行う目的で開催された。報告された動物の種については，トリ，コウモリ，モルモット，サル，チンパンジーそしてヒトと多種にわたっている。またその研究手法もエコロジー，実験心理学，電気生理学，神経活動の光学的計測法，そして臨床医学と，多岐にわたっている。これら方法論的に異なる分野の研究者が目指していること，あるいは結果として得られる情報は，究極的には人間の音声認識のメカニズムの解明につながるであろう。

(1) セキセイインコ field L の神経細胞の種特異的鳴き声に対する反応

森　浩一（東京大・医・音声研）

セキセイインコは大きな集団を作り，社会生活をする動物で，音声によるコミュニケーションが発達している。聴覚の能力については，オペラント条件付けによって，すでに詳しく研究されている。特に，鳴き声のうちでも contact call (distant call) と呼ばれるものについては，仲間の声であれば，個体識別ができるらしい事が示されている。ところが，このような行動の元となる神経機構についてはほとんど調べられていない。今回の研究では，個々の contact call に特異的に応じる神経細胞が脳の中にあるのではないかと考え，前脳の第1次聴覚中枢である field L より単一単位記録を行なった。

セキセイインコは購入後数週間飼って鳴き声が安定するのを待って，防音箱の中で鳴き声を録音した。実験はウレタン麻酔下で，脳定位的に微小電極により，細胞外単一単位記録を誘導した。

探索音刺激にはセキセイインコの鳴き声 (contact calls and one thwart call) と白色雑音を用いた。

探索音刺激に応じた細胞のうち，雑音と鳴き声のどちらを好むかを見ると，55％のユニットは鳴き声の方に強く反応し，14％のみが雑音の方により強く応答した。残りは，雑音にも鳴き声にも反応した。鳴き声の方に強く反応した群を詳しく見ると，86％が純音バーストに反応し，95％が周波数にスイープに応答したが，白色雑音には46％が応答しなかった。純音バーストに対する反応では，同調の鋭いものや，抑制のあるもの，同調のピークが複数あるものなどが見いだされた。９％のユニットは用意した鳴き声のうち一つのみに特に強く応じた。Field L には，鳴き声に対する選択性を形成するための複雑な応答特性を持った細胞が豊富に見いだされるということが判明した。

(2) セキセイインコの音声の知覚・学習機構

奥村　浩・藤原宏子（日女大・生物）

セキセイインコは人間の言葉等を模倣し，ワーブルと呼ばれるこの種特有の鳴き声に組み込み，求愛行動などの種内コミュニケーションに使用している。ワーブルは多くの elements が不規則に繰り返されるように聞こえる鳴き声であり，鳴禽類のソングに相当する。ワーブルにみられるいくつかの物理的パラメーターの継時的変動（時間的パターン）を明らかにするために，音声分析に自己相関関数法を応用した。各 element の amplitude と interval を測定しコレログラムを作成したところ，２つのパラメーターに共通の特徴が見いだされた。この特徴は他の鳴き声にはみられないことから，ワーブル特有の時間的パターンを表現していると考えることが出来る。さらに，学習後の模倣音の組み込まれたワーブルにもこの特徴的パターンが存在することがわかった。これより，ワーブルの機能には時間的パターンが必須な特徴である，と考えられる。

さらに，雛のうちに内耳の除去により聴入力を遮断した個体をつくり音声の発達を観察した。その結果，ワーブルに特徴的な時間的パターンが生得的なものであることがわかった。

それではワーブルに特徴的なパターンはセキセイインコの脳でどのように処理されているのだろうか。知覚・学習機構を明らかにするための最初のステップとして，デオキシグルコース法等による聴覚系の解析を行った。

(3) 鳥類発声中枢のカテゴリカル聴反応

斎藤　望（獨協医大・第２生理）

鳴きん類は生後一定の時期（臨界期）に歌学習を始める。両親からの歌パターンをあらかじめ臨界期に入力しておき，その後一定期間をおいてからそのパターンを出力する。そのために，歌パターンを脳内に記憶しておき，出力する際の手本(auditory template)として参照する必要がある。auditory templateが脳内のどこに保存されているかが問題である。

従来から，脳局所の破壊実験によりMAN (magnocellular nucleus anterior nestriatum)が歌学習に不可欠と考えられていたが，その機能的な面については明確ではなかった。我々はキンカチョウの実験でMANの聴反応が他の大脳の聴－発声中枢核と比較して特異的な応答をすることを明らかにした。

歌パターンはCF（一定周波数）とFMの２つの要素に分けられるが，それら要素内部での組み合せと要素の組み合せ音に対して聴反応を調べると，MANニューロンは，これらパターンに対してカテゴリカルな反応を示す。他の核HVcにはこのような反応がない。従って，MANは歌パターンのカテゴリカルな弁別に関係が深く，auditory templeteを保存する一部と考えられる。

(4) ヒゲコウモリ大脳皮質FM-FM野背側部位におけるCF音応答

浅沼　厚，柳沢慧二（鶴見大，歯，生理）
Haibing Teng，菅乃武男（ワシントン大）

ヒゲコウモリはCF音とそれに続くFM音から成る音を発する。このうちのCF音とそのドプラーシフトの度合からガ等の獲物との相対速度情報を得ている。大脳皮質においてはこの情報はまずCF/CF野と呼ばれる部位で処理を受けると考えられる。さらにこのCF/CF野からFM-FM野のより背側で外側窩近くの非常に小さな領域（DIF野）への投射がHRPを使用して解剖学的に報告されている。そこで今回われわれはこの部位における応答特性を調べCF/CF野におけるそれとの比較を試みた。

その結果，１）DIF野におけるlatencyはCF/CF野のそれより長い傾向がみられた。２）両野においてオーバーラップはあるもののDIF野においてより高い速度の表示が認められた。

(5) コウモリ FM-FM 野ニューロンの同期放電

下澤楯夫（北海道大・電子研・神経情報）
加納正道，Jagmeet Kanwal，菅乃武男 (Dept. Biol. Washington Univ. St. Louis. Mo. USA)

哺乳類大脳聴覚野における複合音分析の神経機構を知る目的で，ヒゲコウモリ (Pteronotus parnellii) の FM-FM 野皮質の 2 ヶ所からニューロンの放電活動を記録し，その同期性を検定して皮質ニューロン間の機能的接続を電気生理学的に調べた。53対のニューロンについて調べた結果，10対について10msec 程度のゆらぎをもった長経路の相互干渉を検出できたが，単シナプス性などの直接的接続は検出できなかった。

2 つの皮質ニューロンの間の機能的結合を検出するためには，それぞれのニューロンに活動を引き起こす特徴的な刺激を同時に与え，2 つのニューロンの神経放電の相互の時間関係を調べなければならない。しかし，単なる相互相関では刺激からそれぞれのニューロンまでの信号経路の特徴も含まれてしまう。ニューロン同士の接続経路の効果のみを検出するためには，刺激から 2 つのニューロンまでの信号経路の寄与を取り除く必要があり，通常は 2 つのニューロンの反応をシャッフルして求めた相互相関と比べる。

今回は 2 つのニューロンの活動の時間的関係を 2 次元平面上に表現する Joint Post Stimulus Time Histogram (JPST) を用いた。これによるニューロン同士の機能的接続の検出方について述べる。

(6) コウモリの音声コミュニケーション

松村澄子（山口大・医療技術短大）

コウモリが発する超音波の反射情報に基づく定位の能力はエコロケーションとしてよく知られている。これはコウモリによる音声を使った環境（空間，事物，仲間）との交互作用に他ならない。さらにまた，ヒトでは音声（言語）を仲間との交信のためにのみ用いるため，コウモリのような，二機能的な用法（定位とコミュケーション）は理解され難い。コウモリのこの特異な能力も哺乳類の聴覚系の基本構造から出発し，他の哺乳類と共通する普遍的な特徴を備えていると考えられる。

今回は CF コウモリとして知られるキクガシラコウモリ母子の音声コミュニケーションについて紹介する。キクガシラコウモリ類の新生児は開眼が遅く，移動能力も乏しいため母の保護と音声コミュニケーションに頼る度合いは著しく大きい。新生子の産声はおよそ 8 KHz の可聴音で，反復して呼びかける母の声に正しく応答して発声をはじめる。新生児には母の呼びかける超音波

の声は聞こえないため，母は自分の超音波音声を，低い周波数成分で変調した特別な母親語を発声する。彼ら母子の音声コミュニケーションでは音声の同期と冗長性が際立った特徴である。ヒトやサルでもごく初期，ある音響的特徴をもつ母親語の反復されるよびかけに対して乳幼児の高い応答が起こることや，初期の聴覚経験によって後の発声が影響を受け，音声模倣がおこることが知られている。

(7) ブタオザル自発発声時の疑核運動ニューロン活動に関する電気生理学的研究

矢島幸雄（兵庫医大・第2生理）
Chuck Larson（ノースウエスタン大）

ブタオザル (Macaca nemestrina) の内喉頭筋を支配している運動神経細胞の発声，呼吸，嚥下運動時の単位放電活動の特徴が検討された。リンゴジュースを報酬として発声を道具的に条件づけられたブタオザルに手術を施し頭蓋上にエバーツ型のチェンバーと内喉頭筋に筋電図電極及び反回神経に刺激用電極を慢性的に埋め込んだ。タングステン微小電極を延髄腹外側の疑核領域に刺入して同側の反回神経刺激に対して誘発される逆行性応答に基づいて疑核運動神経細胞を生理学的に同定した。自発性発声，呼吸運動及び嚥下運動時の疑核運動神経細胞の単位放電と内喉頭筋筋電図の発火パターンが "Brain wave" によって解析・処理された。逆行性，順行性インパルスの衝突によって同定された疑核運動神経細胞とその周辺部に位置する網様体細胞の喉頭筋活動における役割が比較検討された。約半数の疑核運動神経細胞は発声に対して特異的に同期した放電活動を示したが残りの運動神経細胞は発声と呼吸または発声と嚥下の両方に同期した発火パターンを示した。以上の結果は最近提唱されている疑核運動神経細胞の喉頭筋運動における多重機能説を示唆する。

(8) チンパンジーの種特異的音声の知覚

小嶋祥三（京都大・霊長類研）

チンパンジーにヒトの母音を弁別させた。彼女らはおもに第1ホルマントに基づいて弁別していることが分かった。したがって第1ホルマントが類似している [i]-[u], [e]-[o] の対では弁別の成績が悪い。この現象の一般性を検討するために，チンパンジーの母音的な音声のホルマント，各倍音をデジタル・フィルターで除去し，それらの成分の重要性を，元の音声との弁別により明らかにした。その結果，第2ホルマントに比べて，第1ホルマントが除去されずに残っていると，

元の音声との弁別が容易でなく，ヒトの母音の結果を再現した。また，第1，2ホルマントのいずれか一方のみを操作した合成母音の実験も同じく第1ホルマントの重要性を示した。この結果を，チンパンジーの母音レパートリー，聴感度と関連づけて考察する。さらにチンパンジーの母音知覚におけるプロトタイプ効果などに関する予備的なデータを示す予定である。

(9) モルモットの鳴き声に対する聴覚中枢の応答

橋本　亨（東京医歯大・医用研）

鳴き声を媒介とする動物の情報伝達を音声通信の原型と考え，音声言語のモデルとして動物の鳴き声に対する聴覚中枢の活動を調べた。

音声通信が成立するためには，種特異性のある発声を可能とする発声機構，聴覚機構，両者を統合する発達した中枢機構の存在が前提となる。行動と結びついた発声が同種の個体間における情報伝達の手段に用いられている例は，高等動物については広く見られるものであり，これが音声通信のモデルと考える根拠であるが，典型的な発声が存在すると同時に，それを聴取・識別・認識する神経機構にも個体間に普遍性・共通性が存在しなくてはならない。言い換えれば，種特異性のある発声に対応して聴覚中枢に独特の応答の発生が期待される。この観点から，モルモットの自発的な鳴き声をデジタル・データとして収録し，その中から典型的と見られる鳴き声のレパートリを選び，聴覚刺激として用いた。聴覚中枢電気活動は，膜電位感受性蛍光色素による光学的記録法によって可視画像化し，その時・空間パターンをビデオ・カメラとイメージ・プロセッサでとらえ，中枢活動の全貌に迫ろうとした。

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，大脳皮質聴覚領において中枢活動が複数個の島状の領域に集中することが見いだされた。しかし，聴覚領の活動パターンは個体差が大きく，種固有の応答パターンとして対応関係を特定することは容易ではない。

(10) 皮質聴覚領の機構的構造のリアルタイム・イメージング

谷口郁雄・堀川順生・森山俊男・那須昌啓（東医歯大・難研・聴覚情報）

モルモットの大脳皮質聴覚領に音によって誘発される神経活動の時空間パターンを，電圧感受性色素をプローブとして用い光学的な方法により観測した。音刺激に伴って変化する，皮質からの光信号の強度を12×12チャンネルのフォトダイオード･アレイで検知し，16ビット，4 μsのA/Dコンバータでサンプリングした。さらに，その光信号の振幅をカラーコード化し，0.58 ms

毎に，連続する２次元のイメージに変換して観察した。

周波数局在が，聴覚領のサブエリアである field A と field DC にみつかった。これらの領域の周波数勾配は鏡面対称になっており，電気生理学的研究の結果と一致した。しかし，本研究で観察された周波数特異性を示す応答は過渡的に出現し，消失する。field A に先ず現れるスポット状の興奮は二つの方向に，等周波数線に沿った背側方向と，もう一つは field DC に向かって尾側方向に伝搬する。この結果は，皮質における音の情報処理が一次の領域である field A に始まり，その出力が field DC に伝えられることを示唆する。その機能的な性質がこれまでわからなかった field DC はヒエラルキー的な考え方からすると，おそらく二次の領域であろう。

この多チャンネルの光学的計測法を利用して，はじめて皮質の機能的構造がリアルタイムで観測され，時系列の情報である音情報が脳でも，時間に依存して処理されている様子がイメージとしてとらえられた。

(11) 先行音効果 (precedence effect) か，後続音効果か

亀田和夫，鎌田　勉（北海道大・歯）

簡単に音声認識モデルを作ろうとすると，音声をフィルタなどで瞬時瞬時に判断し，それを順々に積み重ねて認識して行くようなものになろう。しかし，現実の音声認識では，後続部分が先行部分の認識を遡行的 (retrograde) に修正するかのような事象が起こる。時間は逆行しないし，後続現象を予感した判断が下せるものでもないので，瞬時判断モデルは少なくとも修正を要する。

両耳現象にも似たことがある。左右のラウドスピーカによるステレオ再生では一側のスピーカの音は同側耳のみでなく対側にも届き，人は合計４つの音を受ける。その場合方向判断が主に最初の左右一対の刺激によっていることを「先行音効果」と呼ぶ。しかし後続対も影響を与えるのであって，その一見遡行的な効果こそが難問である。瞬時判断でなく，遅延を置いて判断されるとすれば，逆説的な後続音効果も説明できる。さてその遅延回路は高次中枢にあってもよいし，末梢にあると考えることも可能である.

ネコの上オリーブで単一ニューロン反応を調べてみた。上述の後続音効果に類似する反応が観察された。即ち遅延回路は末梢に存在しうる。Licklider の周期性ピッチを説明するモデルは聴覚系に遅延回路を持ち込んでいるが，神経生理学的根拠はなかった。両耳干渉での今回の例は多少の根拠を与えた。音声認識に直接敷衍はできないとしても，類推の資料にはなろう。

⑿　両側側頭葉損傷による小児の聴覚失認２症例の聴覚および発話障害

進藤美津子，田中美郷，鈴木淳一（帝京大・耳鼻科）
加賀君孝（東京大・耳鼻科）

人間では音声言語の習得は聴覚を通じておこなわれる。したがって，小児期に両側の聴覚中枢が障害され聴覚失認をきたすと，聴覚を介しての言語習得が極めて困難となる。私どもは小児の聴覚失認２例を経験し，その聴覚および発話の障害と言語指導法について検討した。２症例は，各々単純ヘルペス脳炎および白血病により発症し，MRIにより両側第一側頭回に損傷を認めた。第一例は言語習得前の生後１歳３か月時に，第二例は言語習得後の13歳６か月時に発症したが，いずれも発症前は正常発達をとげていた。２症例は聴性脳幹反応聴力検査では正常閾値を呈していたが，語音弁別や聴覚的理解は完全に障害されていた。第一例では聴覚認知および音声言語の発達は全くみられず，視覚（サイン言語）を用いた言語指導を行った結果，サイン言語によるコミュニケーションが可能になった。第二例では発症後，聴覚的言語理解および意図的な発生・発語が困難になったため，手話を導入してコミュニケーションの回復をはかった。

以上の２症例より，小児期の早期に両側の聴覚中枢が障害されると，末梢聴力は正常範囲であっても，音声言語によるコミュニケーションの発達が阻害されることが示された。

⒀　蝸牛電気刺激による耳鳴抑制とそのメカニズムの考察

伊福部達，坂尻正次（北海道大・電子研）
松島純一（北海道大・医）

聴神経電気刺激で耳鳴が抑制されるらしいことは古くから報告されていた。我々もこれまでに人工内耳の開発過程で，蝸牛電気刺激により耳鳴が抑制されたり消失することを経験してきた。そこで，耳鳴抑制装置を開発し，北大病院で約360例について治療を行った。

刺激方式は，鼓膜麻酔後，鼓膜切開孔から白金イリジウム(Pt-Ir)電極を鼓室岬角に置いた。対極の銀塩化銀電極は耳後部に設置した。その結果，総耳数での効果は，耳鳴が止まった例が26.5％で，抑制された例が35.7％であることが分かった。

治療の過程で，耳鳴耳の反対の耳の蝸牛に電気刺激を与えても耳鳴が抑制される例があった。また，治療の前後に脳磁界をSQUIDで測定した結果，治療後に聴覚領野が活性化される傾向を示した。さらに，言葉の聞き取りが良くなったと答えた患者が多く見られた。以上を総合すると蝸牛への電気刺激は中枢にまで及んでおり，さらに中枢神経系が活性化されて発生した耳鳴が埋没された可能性がある。

⑭ 人工内耳患者の言語聴取能

舩坂宗太郎（東京医大・医）

人工内耳は，聾患者の蝸牛に電極を埋め込み，音声を分析して刺激電流に変え，蝸牛神経を直接電気刺激して音声での会話を可能とするもので，側頭骨に埋め込む電極，音声を分析するスピーチ・プロセッサ，スピーチ・プロセッサの作動プログラムを作るパソコンとからなる。

スピーチ・プロセッサは，基本周波数，第１・第２ホルマントの抽出，子音部の特徴抽出を実時間で行い，これに基づいて，刺激電気パルスの頻度，刺激電流量，刺激電極の遷移パターンを設定する。

母音については，人工内耳の刺激電極遷移パターンがソナグラムで分析したホルマント周波数配列を再現しており，人工内耳のみでも80％以上の正答率となった。異聴表からみて．第２ホルマント周波数が近接しているか，または第１・第２ホルマント周波数比が同等である母音の間で異聴が多いとの結果となった。

14子音については，人工内耳のみで50％，読話を併用すると85％の正答率であった。情報伝達率を異聴表から求め，鼻音性，破裂性，摩擦性で34～43％，有声性，半母音性で53～55％との値を得た。情報伝達率を説明変数，正答率を被説明変数として，重回帰分析を行い，正答率への寄与度を求めた。その結果，鼻音性で0.76，半母音性で0.52，摩擦性で0.31の値を得，人工内耳患者の正答率への寄与は鼻音性＞半母音性＞摩擦性の順であることが判明した。

9．「消化器の機能及びその調節機能」

1992年8月26－27日
代表者：鈴木裕一
世話人：尾崎　毅，桑原厚和

(1)　消化管ホルモンと脳・腸ペプチド―歴史・現在・未来―
桑原厚和（生理研）

(2)　壁内神経の形態
小林　繁（名古屋大・医）

(3)　活性ペプチドによる大腸イオン輸送の調節―ガラニンとエンドセリンを中心に―
清原達也（大阪大・医）

(4)　ウナギの腸より抽出した新規ペプチド
安藤正昭（広島大・総合科学）

(5)　食品由来の生理活性ペプチド
吉川正明（京都大・農）

(6)　消化管内分泌細胞の形態と機能
藤田恒夫（新潟大・医）

(7)　小腸の CCK 放出ペプチド（モニターペプチド）受容体
伏木　亮（京都大・農）

(8)　生後発達に伴う腸管上皮細胞の巨大分子輸送機構
原田悦守（北海道大・獣医）

(9)　細胞内及び細胞間隙透過経路による薬物腸管吸収の改善とその機構
林　正弘（東京理大・薬）

(10)　小腸粘膜のミクロ環境 pH の役割―特に Ca^{2+}，小分子ペプチド吸収における重要性
星　　猛（静岡県大・栄養科学）

(11)　脂溶性有害物質排出ポンプ（P－糖蛋白質）
植田和光（京都大・農）

(12)　大腸上皮の H^{+}－ポンプ
鈴木裕一（山形大・医）

(13)　腸吸収と体液調節
細見　弘（香川医大）

(14)　吸収性高分子による腸内水分調節
辻　　彰（金沢大・薬）

⑮ 食後の胃血流の変化

成瀬　達（生理研）

⑯ 寿命を終えた腸上皮細胞の新しい処理機構

岩永敏彦（新潟大・医）

⑰ 消化管内の微生物環境と小腸粘膜リンパ球の応答

梅崎良則（ヤクルト中央研）

⑱ 小腸上皮細胞のKおよびClチャネル

岡田泰伸（京都大・医）

⑲ コレラ毒素及び毒素原大腸菌の産生する易熱性エンテロトキシンの構造と機能

辻　孝雄（藤田保健衛生大・医）

⑳ 胃粘膜細胞の受容体

千葉　勉（神戸大・医）

㉑ 壁細胞のイオンチャネル

酒井秀紀（富山医薬大・薬）

㉒ 胃 H^+／K^+－ ATPase の分子生物学

前田正知（大阪大・産業研）

㉓ 肝 mdr pump 機能の発現及び免疫抑制剤の効果

竹口紀晃（富山医薬大・薬）

ポスター

1．NaCl 吸収における肝―空腸反射の中枢機構：弧束核の関与

森田啓之（香川医大・生理）

2．空腸の水，電解質吸収に及ぼす弧束核破壊の影響

田中和孝（香川医大・生理）

3．Importance of Area Postrema for Water Balance, Homeostasis in Arginine Vasopressin-induced Hypervolemic State.

西田育弘（香川医大・生理）

4．Effects of Endothelins on Fluid and NaCl Absorption across the Jejunum in Anesthetized Dog.

Mahfuzur Rahman Khan Chowdhury（香川医大・生理）

5．消化管内圧上昇時の電解質吸収に及ぼす自律神経系の影響

村上　宏（香川医大・生理）

6．腸内細菌の定着と小腸上皮細胞の応答：主要組織適合性抗原の発現動態について

松本　敏，瀬戸山弘美，岡田康志，今岡明美，梅崎良則（ヤクルト中央研究所）

7．難消化性糖類の保水力と消化管内容物の通過速度の関係

菊池弘子，矢島高二（ヤクルト中央研究所）

8．薬物の腸管吸収における細胞間隙透過性の重要性

富田幹雄，島崎達也，栗津荘司（東京薬大・薬剤）

林　正弘（東京理大・薬）

9．ウナギ腸の抽出物のイオン輸送に及ぼす影響

上坂敏弘（広島大・総合科学）

10．海水ウナギの食道におけるイオン輸送

長島　圭（広島大・総合科学）

11．牛乳由来の平滑筋収縮性ペプチド：腸粘膜 Cl 分泌に及ぼす効果

金子健也，鈴木裕一（山形大・医・生理）

吉川正明（京都大・農・食品工学）

12．大腸腺（クリプト）細胞のアセチルコリンで活性化されるKチャネル

鈴木裕一（山形大・医・生理）

泉井　亮，西山明徳（東北大・医・生理）

【討論参加者】

辻　孝雄，小林　繁，飯野　哲，竹口紀晃，酒井秀紀，森井孫俊，藤田恒夫，岩永敏彦，岩永ひろみ，梅崎良則，松本　敏，菊池弘子，林　正弘，海保房夫，栗津荘司，富田幹雄，水間　俊，島崎達也，清水直樹，清原達也，奥野　優，杉町正光，篠村恭久，原田悦守，植田和光，吉川正明，鈴木裕一，金子健也，伏木　亮，前田正知，千葉　勉，木下芳一，細見　弘，森田啓之，西田育弘，溝端乃里夫，香川広司，村上　広，武田智博，田中和孝，Khan Chowdhury，上村信久，岩永裕氏，桑原厚和，成瀬　達，星　　猛，林　久由，今村千春，岡田泰伸，老木成稔，久保町子，富永真琴，立田　浩，安藤正昭，上坂敏弘，長島　圭，辻　　彰，玉井郁巳，高長ひとみ，坂田　篤，富沢直子，寺川　進，尾崎　毅

【研究会概要】

本研究会は，主として粘膜機能を中心とした消化管機能に関して，分子レベルから細胞，organ レベルまで幅広い範囲での研究者が集まり，活発な討論を行った。多くの方面に興味深い発表があり，たがいの研究の意外な繋がりに関する意見もあった。この分野の今後の研究の発展のひとつのきっかけになると思われた。

(1) 消化管ホルモンと脳・腸ペプチド—歴史・現在・未来—

桑原厚和（生理研）

The major purpose of the gastrointestinal tract is to provide for the assimilation of nutrients required for growth, maintenance, energy, and reproduction. The assimilation is regulated by neuroendocrine system. Neuroendocrine system uses various substances as chemical language.

(2) 消化管運動の組織学的基盤

小林　繁（名古屋大・医）

カナダの生理学者 Daniel は，J. Gastrointest. Motil. (1992) 102:56-68 に，消化管運動の調節機構を論ずる総説を発表した。その末尾には半ページ余りの Addendum があり，「カハールの間質細胞 (interstitial cells of Cajal : ICCs)」に関する私の研究が特別に論評されている。先日この総説を読んだところ，カハールの「間質細胞」と消化管運動における特殊平滑筋細胞の意義が，Daniel を始めとする多くの学者に今なお正しくは理解されていないことが判明した。そこで，主としてイヌ近位結腸内輪筋層粘膜下縁における形態学的研究に基づいて，消化管運動の組織学的基盤を改めて考察した。

ここでは消化管筋層の細胞を 3 群に分類する。第 1 群は神経系に属し神経伝達物質分泌を通じて消化管運動の調節機能を担当する。第 2 群は平滑筋細胞に属し，運動機能を担当する。平滑筋細胞には特殊平滑筋細胞と一般平滑筋細胞の区別があり，前者はペースメーカー細胞として緩徐波の発生源となる。後者の収縮・弛緩機能によって，消化管運動が生ずる。Daniel らがイヌ結腸内輪筋層粘膜下縁で ICCs としているのは私のいう特殊平滑筋細胞である。第 3 群は線維芽細胞，組織球，肥満細胞を含む本来の間質の細胞である。

カハールが記載した「間質細胞（ニューロン）」は一種の人為構造であり第 1 群の神経に属するという私の結論は正しい。今日一般に「カハールの間質細胞 (ICCs)」とされているのは第 3 群の結合組織性の細胞である。ペースメーカー細胞と ICCs とを混同してはならない。

(3) 活性ペプチドによる大腸イオン輸送の調節

清原達也（大阪大・医）

【目的】神経ペプチドであるガラニンと血管作動性ペプチドであるエンドセリンのラット大腸イオン輸送に対する影響を検討した。

【方法】SD 系雄性ラットの下部大腸を Ussing chamber に装着・灌流し，粘膜のイオン輸送を反映する短絡電流 (Isc) を測定した。ガラニンとエンドセリンの添加による変化を観察し，各種インヒビターの影響を検討した。また isotope を用いて Na イオンと Cl イオンの能動輸送速度の変化を定量した。

【結果】ガラニンとエンドセリンによりラット大腸粘膜の Isc は急峻な上昇を示した。各種インヒビターを用いた検討により，ガラニンは神経ペプチドとして非コリン作動性神経を選択的に刺激して大腸イオン分泌を促進しているのに対して，エンドセリンは内因性のエイコサノイド産生を亢進し，これが主として壁内神経を介しながら大腸イオン分泌を刺激していると考えられた。

(4) ウナギの腸より抽出した新規ペプチド

安藤正明（広島大・総合科学）

ウナギの腸管のアセトン抽出物を C-18 カートリッジ (Sep-Pac, Waters) にかけ，保持されたものをメタノールで溶出し，それを C-18 逆相 HPLC (ODP-50, 旭化成)，さらに陽イオン交換 HPLC (SP－5 PW, 東ソー) にかけ，純化を進めた。最終的に純化されたペプチドのアミノ酸配列は，Gly-Phe-Trp-Asn-Lys であった。C－端の構造を決定するために FAB－質量分析をおこない，C－端はフリーであることが示された。抽出物の構造をさらに確かめるために，H-Gly-Phe-Trp-Asn-Lys-OH を合成し（ペプチド研），逆相と陽イオン交換 HPLC での溶出位置が等しいことを見た。このペプチドはウナギの食道－胃連結部の輪走筋の収縮頻度・収縮強度を増大した。その他に胃や腸の縦走筋の収縮を増強させ，胃－腸連結部の輪走筋を収縮させた。またラットの空腸の縦走筋の収縮を増強させる作用もあった。

(5) 食品蛋白質由来の生理活性ペプチド

吉川正明（京都大・農）

食品蛋白質消化物から単離された生理活性ペプチドの最初の例としてはカゼインペプトンから単離されたオピオイドペプチド *β-casomorphin*（Brantl ら，1979）がある。我々はこの10年の間に蛋白質の酵素消化物から種々の生理活性ペプチドを単離してきた。それらは合目的性を説明しやすい乳蛋白質のみならず，血液蛋白質，筋肉蛋白質および大豆，小麦などの植物蛋白質からも派生する。これらのうち分子量が比較的小さいものは経口投与で有効性を示した。さらに，脂質によるエマルジョン化によって多くのペプチドが経口有効化された。今回はモルモット回腸摘出標本のアッセイ系を用いて単離したペプチドについて述べる。この系で得られたペプチドのいくつかは動脈や中枢に対しても作用を示した。

(6) 消化管内分泌細胞の形態と機能

藤田恒夫（新潟大・医）

われわれのパラニューロンの概念は，腸の上皮に散在して食物の化学情報を受容しながら信号物質を分泌する細胞の研究から始まった。「小さな脳」ともよばれる腸の自律的調節は，このパラニューロンと壁内神経叢のニューロンによって，「脳腸ホルモン」とあだ名される信号物質を用いて作動している。そしてこの道具立てと作動原理は，ヒドラの段階から5億年の進化を通じて変わらない。本稿ではさらにパラニューロンの一般的性質，とくに各種の分泌物の共存の問題や，パラニューロンのマーカーとしてのクロモグラニンについても述べた。

(7) 小腸の CCK 放出ペプチド（モニターペプチド）受容体

伏木　亮（京都大・農）

タンパク質摂取による膵酵素分泌機構にはいくつかの仮説があるが，未だに明らかにはなっていない。タンパク質の部分水解物やトリプシンインヒビターが直接小腸表面を刺激するという説，トリプシンやキモトリプシンが結合するという説，CCK 放出ペプチドを介するという説，（膵臓 CCK 放出ペプチドと小腸 CCK 放出ペプチドの2つがある）等がある。何れの説も，対応する結合部位を小腸表面に見いだすことが必須であるが，未だ明らかになったものはない。

タンパク質を摂取したときにおこる膵酵素分泌亢進の機構として，我々はCCK放出活性を持つペプチドが膵臓から分泌されることを見いだし，これが膵酵素分泌をメディエートしていることを提唱してきた。この仮説に従えば，ラットの小腸管腔表面に，モニターペプチドに対する，受容体が存在するはずであるので，放射性モニターペプチド，点変異モニターペプチド等を用いて検討した。

放射性標識したモニターペプチドは，ラット空腸分散細胞と結合し，この結合は大量の非標識モニターペプチドによって阻害された。モニターペプチドはカザル型トリプシンインヒビターの一種でこのトリプシン阻害活性と小腸への結合の関係を知るために，活性部位のアミノ酸をコードするコドンを置換したDNAを大腸菌に組み込んで変異モニターペプチドを作り，小腸との結合を調べたところ，トリプシンインヒビター活性をもつ変異体のみが小腸細胞と結合することが明らかになった。小腸細胞を予めTLCKで処理してトリプシン基質結合部位をブロックするとモニターペプチドの結合は顕著に減少した。小腸表面のモニターペプチド受容体はトリプシン様の特異性をもつタンパク質であると考え，各種のトリプシンインヒビターを調べたところ，カザル型の膵分泌性トリプシンインヒビターのみがモニターペプチド受容体と結合した。大豆，卵白トリプシンインヒビター，FOY305等は結合しなかった。モニターペプチド受容体は小腸上部（胃側）に多く，回腸では約1/3，大腸には殆ど無く，CCK分泌細胞の分布と良く一致した。SDS電気泳動，架橋後オートラジオグラフィーの結果，分子量約5万のタンパク質が結合に関与していることが推定された。

(8) 生後発達に伴う腸管上皮細胞の巨大分子輸送機構

原田悦守（北海道大・獣医）

母乳は，タンパク質，脂肪，炭水化物，ミネラルなどの栄養素のみならず，免疫関連物質，ホルモン，成長因子等，多くの生理活性物質を母親の血清レベルと比べて極めて高濃度含んでいる。これらの生理活性物質は，ミルクを飲むことによって消化管から取り込まれ乳児の発育成長に重要な役割を担っているものと考えられ，これら物質の栄養生理学的な解析が注目されている。多くの動物の新生子は，生後の一定期間，初乳に高濃度含まれる免疫グロブリンなどの高分子物質を消化管から効率的に吸収し，生体防御機能の獲得のみならず種々の生体機能の発達に寄与している。然し乍ら，この機能には動物種による差があるけれども，生後の極く限られた時期に閉止する。(GUT CLOSURE, INTESTINAL CESSATION)。この取り込み能を制御する因子としては，遺伝的な要因に加えて，母乳由来の生理活性物質や新生子の内因性因子，特にコルチコステロンやサイロキシンの関与が検討されて来たが，その作用機序は未だ不明な点が多い。この研究では，新生子の腸管を介した高分子物質の取り込み能を制御する因子及び腸管上皮に存在する二糖類分

解酵素の発現に及ぼす生理活性物質の役割を明らかにしようと試みている。

(9) 細胞内及び細胞間隙透過経路による薬物腸管吸収の改善とその機構

林　正弘（東京理大・薬）

【Summary】

1．従来のpH分配理論を修正するものとして，非イオン型薬物が透過する細胞内経路(Transcellular Pathway)のみでなく，イオン型薬物も透過できる細胞間隙経路(Paracellular Pathway)の存在に注目し，イオン型薬物の腸管吸収性を改善するために，吸収促進剤の作用を上記2種の透過経路別に検討した。

2．難吸収性薬物の代表としてのCefmetazoleの腸管吸収に対する吸収促進剤の代表としてのCaprate (C10)の作用は結腸＞空腸であった。

3．細胞内径路へのC10の作用は膜脂質，膜蛋白質との相互作用を介した膜Perturbationに依ることが示され，このときの透過性の増大は空腸＞結腸であり，上記2の吸収部位差の結果と矛盾していた。

4．細胞間隙経路へのC10の作用は，Cefmetazole, Inulinの吸収性とEquivalent Pore半径の増大との良好な相関性，細胞間隙透過物質である水溶性非電解質の透過増大，Impedance測定，Voltage Clamp法等の各種解析により，細胞間隙は拡大されており，その程度は結腸＞空腸であった。

5．2，3，4の結果より，C10の作用は，空腸より結腸の方が大であり，細胞内よりも細胞間隙に有効に作用していることが示唆された。

6．C10の結腸細胞間隙経路に対する作用機構には，EDTAの持つキレート作用だでなく，Tight Junction付近のActomyosin系のエネルギー依存的収縮作用が関与している可能性が示された。

7．GlucoseにもC10と同様に空腸でのActomyosin収縮活性化作用があることから，C10の空腸への作用が見出しにくかったのは，実験系におけるGlucoseの存在が関係している可能性が示唆された。

(10) 小腸粘膜のミクロ環境pHの役割—特にCa^{2+}，小分子ペプチドにおける重要性

星　　猛（静岡県大・栄養科学）

栄養吸収の諸問題，あるいは腸管吸収に関する諸問題に関しては，それぞれの分野で多くの新しい問題が提示され，概念上の進歩も種々みられるが，それらの全般を外観することは本稿の範

囲を超えるので，近刊の刊行物[1-3]に譲ることとし，ここでは筆者の研究領域に近い分野から3つの問題をとり上げ，その概要を述べてみたいと思う。1つは蛋白質消化産物吸収における異なった2種類の輸送機構の存在，特に近年その作動機構が明らかになってきた小分子ペプチド輸送と，それに果たしている刷子縁膜でのプロトンサーキットの役割，第2は栄養吸収に伴う吸収上皮のタイト接合部の挙動と高分子物質吸収の問題，第3に近年高血圧病因との関係で注目されている腸管カルシウム吸収の異常の問題である。

(11) 脂溶性有害物質排出ポンプ（P－糖蛋白質）

植田和光（京都大・農）

MDR1 遺伝子のコードするP－糖蛋白質は，構造に類似性のない多くの抗癌剤を，細胞内から細胞外へ，ATP 加水分解のエネルギーを利用して排出し，細胞を多剤耐性にする。P－糖蛋白質は本来，副腎，腎臓，肝臓，大腸，小腸，血液脳関門，妊娠時の胎盤などで発現しており，食物中に含まれる脂溶性の有害物質や代謝物を体外へ排出するとともに，脳を保護していると考えられる。P－糖蛋白質は，癌治療の大きな障害である多剤耐性に関与していることが示唆されるため，耐性克服を目的として多くの研究がなされてきた。しかし，P－糖蛋白質が多様な構造の物質をどのようして認識しているのか，生理的基質は何かなどまだ不明な点が多い。最近我々は，精製したP－糖蛋白質を人工膜に再構成することによって薬剤結合にコレステロールの存在が必要であること，またヒトP－糖蛋白質をブタ腎臓由来の培養細胞中で極性発現させることによって，副腎ステロイドホルモンのコルチゾール，アルドステロンおよび強心配糖体ジゴキシンをP－糖蛋白質が輸送することなどを明かにした。P－糖蛋白質の現状を紹介する。

(12) 大腸上皮の H^+ ポンプ

鈴木裕一（山形大・医）

哺乳動物遠位大腸の上皮細胞膜には H^+ ポンプが存在し，大腸の管腔内方向へ H^+ 分泌を行っている。この H^+ ポンプは，Vanadate で抑制されるので，Na, K-ATPase などと同じグループに属する (P-type) 膜輸送 ATPase と考えられる。ATPase 活性や，H^+ 輸送活性を調べると，K^+ に依存することから，H/K 逆輸送を行っていると考えられる。阻害剤感受性の比較から，この大腸 H^+ ポンプは，Na, K-ATPase や胃の H, K-ATPase と良く似てはいるが，明らかに異なるものであった。さらに，この H^+ ポンプのアミノ酸配列を決めるべく遺伝子のクローニングを試みて

いる。

(13) 腸吸収と体液調節

細見　弘（香川医大）

体液量の調節に腸管からの吸収調節が重要な役割を演じている可能性を示唆する実験結果を得たので報告する。本研究の発端は，下大静脈内に NaCl 溶液を注入すると起こる腎交感神経活動の抑制が，圧受容器の除神経だけでは消失せず，肝臓神経の除神経を併せて行うことで消失するすることから，肝門脈に NaCl 濃度受容器が存在することが示唆された[1]。次いで，Na 利尿を促進する ANP が空腸からの水と NaCl の吸収を抑制する[2]ことから，腎の排泄機能と腸の吸収機能は相互に協同して体液量を調節していると考えられた。さらに，肝門脈内に存在する NaCl 濃度受容器は，腎機能を調節すると同時に腸管での吸収をも調節していると考え次の実験を行った。門脈内に9%NaCl 溶液を注入すると，腎臓からの NaCl の排泄は増加し（肝腎反射），腸管からの NaCl の吸収は抑制された（肝腸反射）。この求心路は肝臓神経，遠心路は腎神経と迷走神経である[3]。以上より，体液量の調節に腸管からの吸収調節が重要な役割を演じている。

(14) 吸水性高分子による腸内水分調節

辻　　彰（金沢大・薬）

ポリカルボフィルは下痢あるいは便秘症状を呈する過敏性腸症候群の治療薬として考えられている吸水性高分子化合物である。本研究では，ポリカルボフィルの腸管粘膜を介した水の吸収抑制効果について，ラット in situ のループ法および単回灌流法を用いて検討した。ポリカルボフィルは濃度依存的に，空腸および結腸の水の吸収を抑制することが示唆された。この効果は腸管内腔の浸透圧を低下させても影響を受けなかった。ポリカルボフィルの水の吸収抑制作用のメカニズムは，ポリカルボフィルの濃度，浸透圧，腸管の部位によらず，efflux を変化させずに influx を抑制する事が示唆された。また，ポリカルボフィルはラットの糞便重量を増加させるとともにラットおよびマウスのヒマシ油下痢および prostaglandin E_2 下痢を有意に抑制することが確認された。

(15) 食後の胃血流の変化

成瀬　達（生理研）

空腹期および食後期の胃血流を運動と共に測定した。

【方法】

ビーグル犬を用い，麻酔下に開腹して左胃動脈に電磁血流計または超音波トランジットタイム血流計のプローブを装着し，同時に胃瘻を造設した。術後１週間の回復期を置いた後，左胃動脈血流を意識下にて測定した。胃の運動は，カテーテル型圧トランスデューサーを胃瘻より挿入して計測した。

【成績】

空腹期．空腹時の胃血流は，約100分間隔で生じる胃の周期運動 (MMC) に同期して変動した。左胃動脈血流は，胃の律動収縮時に約30% 減少し，その直後に逆に約60% 増加した。また収縮期 (Phase II-III) には基礎値が静止期 (Phase I) の約180% まで増加した。

食後期．摂食により，左胃動脈血流は一過性に２－３倍に増加したが，約10分で減少した。胃血流の増加は，以後，食前値の５－10% にとどまり，胃運動および胃血流の周期的変動は抑制された。摂食後の胃血流の一過性増加は，食物のみならず水およびバルーンによる伸展刺激により惹起された。しかし，反応量は等量の牛乳摂取時の約1/2であり，この反応には，機械受容器のみならず化学受容器が関与していると推定される。また，この反応は胃粘膜麻酔剤（オキセサゼイン），両側頚部迷走神経ブロック，神経節遮断剤（ヘキサメソニウム）により抑制され，フェノオキシベンザミン，プロプラノロール，アトロピンにより抑制されないことから，胃粘膜を介する非アドレナリン非コリン作動性の迷走神経反射が関与していると推定される。

【結論】

左胃動脈血流は空腹期に胃運動と共にダイナミックに変動する。摂食直後に迷走神経反射を介した，一過性の胃血流増加が生じるが，食後の胃酸分泌および運動に伴う左胃動脈血流の増加は僅かである。

(16) 寿命を終えた腸上皮細胞の新しい処理機構

岩永敏彦（新潟大・医）

腸の上皮細胞は絨毛の先端で寿命を終え管腔内へはげ落ちるとされているが，モルモットの腸管では，上皮細胞は固有層に集合するマクロファージによって貪食される。このマクロファージの集積は十二指腸から回腸末端まですべての絨毛先端部にみられる。大腸では，マクロファージ

は上皮（陰窩の間の上皮）直下に集積している。マクロファージの集積はすべての個体に普遍的にみられ，しかも新生児の腸にも出現するので，決して炎症や異物除去のためにあるのではない。同じような集積はサル，ウマ，ヒトでもみられるが，ラットやマウスでは存在せず，動物差がある。

(17) 消化管の微生物環境と小腸上皮細胞間リンパ球の応答

梅崎良則（ヤクルト中央研）

消化管内の微生物が腸上皮細胞間リンパ球(i-IEL)の構成と機能に与える影響を明らかにするため，無菌マウス(BALA/c)に強制的に腸内フローラを定着させて（通常化）i-IELの動態を調べた。その結果，通常化によって$\alpha\beta$T細胞抗原レセプター(TCR)のi-IELのみが増加し，$\gamma\delta$ TCRタイプはほとんど変化しないことが明かとなった。無菌マウスの胸腺を除去して通常化しても，$\alpha\beta$ TCRをもったi-IELの応答が認められた。通常マウスのi-IELを通常環境のscidマウス（機能的なTおよびB細胞を欠損している）に移入すると$\alpha\beta$TCRタイプのi-IELの再構成が認められたが，無菌マウスに移入してもi-IELの増加はまったく観察されなかった。一方，i-IELと接している小腸上皮細胞では，通常化によるi-IELの応答の直前に糖脂質のフコシル化や組織適合性抗原クラスⅡ分子の誘導が認められた。これらのことより通常化に伴う$\alpha\beta$ TCRタイプのi-IELの応答には胸腺外，おそらく腸上皮細胞を中心とした腸管微小環境の変化が重要な働きをしていることが示唆された。

(18) 小腸上皮細胞のK及びClチャネル

岡田泰伸（京都大・医）

小腸上皮は吸収と分泌の両機能を持ち，これらの一方向的能動輸送にはNa^+ポンプやNa^+－有機溶質共輸送体のみならずK^+チャネル及びCl^-チャネルが重要な役割を果たしている。小腸上皮細胞の激しい溶質輸送活動によって細胞内外の浸透圧環境の著しい変動がもたらされるので，輸送過程にはいつも細胞容積調節過程が伴われなければならない。最近，細胞膨張後の調節性収縮能にはK^+及びCl^-チャネルの活性化が不可欠であることが明らかとなってきた。本報告ではこれまで内外で報告されてきた小腸上皮細胞のK^+およびCl^-チャネルについて概説する。そして私達が最近得た知見，特に，立田浩がモルモット絨毛部上皮細胞で見いだした新しいK^+チャネル，伊藤彰子がヒト株細胞Intestine 407で見いだしたCa^{2+}とCキナーゼで制御されるK^+チャネル，久保町子が見いだした容積調節性Cl^-チャネルの電流特性について詳しく紹介する。

(19) コレラ毒素及び毒素原性大腸菌の産生する易熱性エンテロトキシンの構造と機能

辻　孝雄（藤田保健衛生大・医）

毒素原性大腸菌の産生する易熱性エンテロトキシン(LT)はコレラ菌の産生するコレラ毒素(CT)と同様に毒素活性（ADPリボシル基転移酵素活性によるアデニル酸シクラーゼの活性化）を持つAと受容体（GMIガングリオシド）と結合するBサブユニットから構成されている。LTは既に結晶解析され，AのGlu112が毒素活性部位，BのTrp88が受容体結合部位とされている。一方下痢発現機構の解明は十分には進んでいないが，上昇したcAMPが腸絨毛部位の上皮細胞でNa^+の吸収阻害，クリプト部位の上皮細胞でのCl^-の分泌促進により，水の吸収阻害が起こるとされている。しかしこれのみでは説明できない現象があり他の未解明の機構の関与により総合的に下痢がおこると考えられている。

(20) 胃粘膜細胞の受容体

千葉　勉（神戸大・医）

胃酸はペプシノーゲンをペプシンへと活性化させて蛋白質を分解するという重要な生理的役割を担っている。しかし胃酸は一方では代表的な攻撃因子として消化性潰瘍発症の元凶ともなり得る。したがって生体にとって適切な酸分泌を得ることはきわめて重要であるが，実際胃壁細胞からの酸分泌は，神経性，液性に微妙な調節を受けている。

そこで今回は種々の神経性あるいは液性因子が胃体部粘膜内で酸分泌にどのように関与しているかについて，主として単離胃粘膜細胞を用いた実験成績をもとに紹介してみたい。

(21) 壁細胞のイオンチャネル

酒井秀紀（富山医薬大・薬）

ウサギ胃酸分泌細胞基底側膜に存在するsub-ps Cl^-チャネル（0.3—0.4pS）のGTP結合タンパクによる抑制機構をパッチクランプ法（ホールセルクランプ法）により検討した。細胞内にGTPγSと共にスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)を適用すると，GTPγSのCl^-電流抑制効果はほぼ完全に消失した。GTPγSと共にSOD＋カタラーゼを適用してもGTPγSの効果は同様に消失した。しかし，デスフェラール（・OHの除去剤）はGTPγSの効果に影響を及ぼさなかっ

た。これらの結果から，GTPγSのCl⁻チャネル抑制機構には，·OHやH_2O_2ではなく，スーパーオキシドラジカル(O_2^-)の産生が介在していることが示唆された。そこで細胞内にキサンチン(XA)＋キサンチンオキシダーゼ(XO)を適用し人為的にO_2^-を産生させたところ，Cl⁻電流は顕著に抑制された。この効果はSOD＋カタラーゼによりほぼ完全に消失した。XA＋XOを細胞外に適用してもCl⁻電流は変化しなかった。また細胞外にSOD＋カタラーゼを適用してもGTPγS電流抑制効果は影響を受けなかった。したがってO_2^-は細胞内で産生され，作用点は細胞の内側であることが分かった。

(22) 胃 H^+/K^+-ATPaseの分子生物学

前田正知（大阪産業研）

私達の研究室における分子生物学的手法に基づく最近の解析により，H^+/K^+-ATPase（胃酸分泌酵素）の蛋白質としての構造および遺伝子の構造が明らかになってきた。現在では，H^+/K^+-ATPaseは2個のサブユニット（αとβ）からなり，アミノ酸配列ばかりでなく遺伝子構造もNa^+/K^+－ATPaseと良く似ていることが判明している。Na^+/K^+-ATPaseは種々の細胞で発現しているが，H^+/K^+-ATPaseは胃壁細胞に特異的に見いだされる。私達は，この調節機構に興味をもち，細胞特異的な転写調節因子が存在すると予想し研究を進めている。これまでの検討から，胃粘膜から調製した核蛋白質の中にH^+/K^+-ATPaseのαとβサブユニット遺伝子の上流に存在するRNAポリメラーゼⅡ結合部位近傍の配列，(G/C) PuPu (G/C) NGAT (A/T) PuPyを認識するものがあるという結果を得ている。この蛋白質の構造と役割が，胃壁細胞の機能発現という面から興味深い。

(23) 肝 mdr pump 機能の発現及び免疫抑制剤の効果

竹口紀晃（富山医薬大・薬）

【Summary】

Fluorescence image analysis of isolated rat hepatocyte couplets, which retain a bile canaliculus between them, has shown the presence of transport systems for bile acid and nonbile acid organic anion in the canalicular membrane.The cells transported also Fura-2 and BCECF, which are fluorescent indicators of intracellular Ca^{2+} and H^+ concentrations, respectively, into the canaliculus.Both Fura-2 and BCECF transports were inhibited by progesterone, verapamil, vinblastine and

daunomycin, indicating that the transports are due to a multidrug efflux pump (P-glycoprotein) in the canalicular membrane.Interestingly, the transport by the multidrug efflux pump was inhibited by immunosuppressants FK506 and cyclosporin A,their half-maximal inhibitory concentrations in the cell suspension being 10 μM and 0.6 μM, respectively.In contrast, the reported immunosuppressive potency of FK506 is 10- to 100-fold that of cyclosporin A.Inhibition by immunosuppressants of the multidrug efflux pump, which is a transporter of cytotoxic and other drugs and present in normal human tissues such as kidney, liver, blood-brain barrier, colon, may, at least partly, explain side effects caused by cyclosporin A in these tissues of transplant recipients.FK506 at its clinical concentrations may not inhibit the multidrug efflux pump.

10.「内外受容器のブドウ糖分子識別ならびに反応発現機構」

1992年12月14日－15日

代表者　日地康武（鳥取大・医・第一生理）

世話人　山岸俊一（生理研）

(1)　味細胞の糖応答

外崎肇一（朝日大・歯・口腔生理）

(2)　イヌの味蕾の微細構造と糖刺激による変化

金澤寛明，藤田恒夫（新潟大・医・第三解剖）

(3)　味蕾基底側の三次元的微細形態

井上貴央（鳥取大・医・第二解剖）

(4)　グルマリンの味覚自律神経反射と腸管グルコレセプターへの効果

新島　旭（前新潟大・医・第一生理）

(5)　内因性 sugar acid と内分泌・自律神経系

山下　博，稲永清敏，松村逸郎，*新島　旭，**佐々木和男，***大村　裕

（産業医大・第一生理，*前新潟大・医・第一生理，**富山大・工電子情報，***日本臓器）

(6)　高血糖とインスリン受容体機能異常について

前川　聡，柏木厚典（滋賀医大・第三内科）

小林　正（富山医薬大・第一内科））

(7)　肥満ラットに対するギムネマ酸の効果

日地康武，寺澤　光，加藤達生，安陪隆明（鳥取大・医・第一生理）

(8)　ストレスによる血糖上昇―空腹時と摂食時の差―

山田不二子，田中克明，井上修二（横浜市大・医・第三内科）

(9)　視床下部による血中カルシウム調節とブドウ糖調節

粟生修司，馬　静怡，堀　哲朗（九州大・医・第一生理）

(10)　視床下部神経ヒスタミン分泌に及ぼす glucoprivation の作用機作とその生理的意義

坂田利家，吉松博信，大原明彦（大分医大・第一内科）

(11)　摂食による記憶促進

大村　裕，佐々木和男，李愛軍（日本臓器・製薬生物活性科学研）

(12)　最後野のグルコース応答性ニューロンについて

足立　明（岡山大・歯・口腔生理）

(13)　膵β細胞のアルギニン応答のグルコース依存性機構

矢田俊彦（鹿児島大・医・第一生理）

⑭ 膵β細胞の細胞内 pH は直接的には glucose 反応に関与しない

服部政憲，何　莉萍，北里　宏（滋賀医大・第二生理）

⑮ ATP 感受性 K^+ チャンネルとスルホニル尿素受容体

仁木一郎（長寿科学振興財団）

【参加者氏名】

粟生修司（九州大・医・第一生理），大村　裕（日本臓器・製薬生物活性科学研），坂田利家，黒川　衛（大分医大・第一内科），柏木厚典，前川　聡（滋賀医大・第三内科），足立　明（岡山大・第三内科），井上貴央（鳥取大・医・第二解剖），藤田恒夫，金澤寛明（新潟大・医・第三解剖），外崎肇一（朝日大・歯・口腔生理），新島　旭（前新潟大・医・第一生理），仁木　厚，仁木初美（愛知学院大・歯・内科），仁木一郎（長寿科学振興財団），北里　宏，丁　維光，服部正憲，内田康和，久保田真吾，何　莉萍（滋賀医大・第二生理），矢田俊彦（鹿児島大・医・第一生理），山下　博（産業医大・第一生理），井上修二，田中克明，山田不二子（横浜市大・医・第三内科），坂本康二（福岡大・医・第一生理），日地康武，井元敏明，寺澤　光，加藤達生，宮坂昭子（鳥取大・医・第一生理），山岸俊一（生理研）

(1)　味細胞の糖応答

外崎肇一（朝日大・歯・口腔生理）

舌背面に各種味物質を刺激として与えた際の味細胞の味応答をプロシオンイエロー色素をつめたガラス微小電極を用いて細胞内記録を行った。その結果，各種糖によって同一味細胞においても応答の大きさに差のあることが解り，さらに各種糖刺激で順応させた味細胞に交差順応法によって各種糖を与えても応答の大きさに差の認められることより味細胞受容膜受容部位に各種糖間でも違いのあることが推定された。また味応答の性質の異なる糖と食塩間での交差順応法による味応答の記録をしてみると，糖による順応によって食塩応答が強く抑制されることが判明した。従って，糖と食塩では発現される味応答には差があるが，交差順応応答の発生のさいには受容膜部位での競合もしくは細胞内情報伝達の過程においての競合，つまり糖と食塩の情報発生伝達に関与する物質間のお互いの修飾もしくは競合の存在する可能性が推察された。

(2) イヌの味蕾の微細構造と糖刺激による変化

金澤寛明，藤田恒夫（新潟大・医・第三解剖）

イヌ舌の有郭乳頭を用いて味蕾の電子顕微鏡的研究を行った。イヌの味蕾は他の哺乳類の味蕾と基本的には同じで，Ⅲ型細胞が神経とシナプスをつくり，小型無芯小胞と大型有芯小胞を有し，味細胞と判断された。

しかし，イヌの味細胞は基底部が広く基底膜に接していて，この部分にはシナプス部よりも多量の大型有芯小胞が見られた。

0.1M ショ糖で舌を刺激後，試料を作製し観察すると大型有芯小胞のシナプス膜へのオメガ状の開口放出像が見られた。同様の開口放出像は基底面でも観察された。

このシナプス外の基底面でみられた開口放出は，味蕾直下の毛細血管に窓あき型が多くみられたことと合わせて，味細胞が味刺激により分泌物の一部分を傍分泌ないし内分泌している可能性が示された。この場合の標的器官として，特にエブネル腺への作用が想定されるので，今後さらに検討していきたい。

(3) 味蕾基底側の三次元的微細形態

井上貴央（鳥取大・医・第二解剖）

走査型電子顕微鏡は表面形態を三次元的にとらえることができ，立体構築の解明には有用な手段である。味蕾の味孔側の表面形態はこれまでに数多く観察例があるが，基底側の観察はまだなされていない。味蕾基底側には粘膜上皮と粘膜固有層を境する基底板があるので，通常の試料作製法では味蕾の基底像をとらえることはできなかったからである。今回，加温水酸化ナトリウムを用いて基底板を消化させたところ，上皮組織を剝離することができ，上皮の裏側から味蕾の基底面を観察することに成功した。味蕾基底部には多数の神経線維が認められ，味蕾の直下で分岐，吻合して神経叢を形成していた。この神経線維はすべて無髄神経であったが，神経叢を取り囲む数層の線維芽細胞層より外側では有髄神経も認められた。また，味蕾基底部には，毛細血管が輪状に走っている様子が観察された。

(4) グルマリンの味覚自律神経反射と腸管グルコレセプターへの効果

新島　旭（前新潟大・医・第一生理）

実験にはウイスター系ラットを使用した。

1．味覚自律神経反射

ウレタン麻酔下で開腹，迷走神経胃枝，あるいは膵臓枝を切断，中枢側より神経フィラメントを分離し，遠心性神経活動を記録した。10％ショ糖液で5分間味覚刺激を与えると胃枝では神経活動の抑制，膵臓枝では促進が観察された。2.8% MSG 液で5分間の刺激では胃枝，膵臓枝両者ともに活動の促進がみられた。グルマリン液 (20 μg/ml) を口腔内に注入，5分後に洗い流した後10％ショ糖液で5分間の刺激では胃枝，膵臓枝ともに遠心性活動に変化はみられなかったが2.8% MSG 液刺激では両者で促進反応が観測された。グルマリンは甘味刺激による自律神経反射を遮断するが，うま味刺激効果は遮断しないことから両刺激の異いが示唆される。

2．腸管グルコレセプターへの効果

十二指腸に注入用のカテーテルを挿入し，小腸に流出用のカテーテルを入れ，約15cm の長さの腸管に体温に暖めた5％グルコース 3ml を注入し，5分後に洗い流した。迷走神経腹腔枝の切断末梢側よりフィラメントを分離し求心性活動を記録した。5％グルコース刺激により求心性活動の増加が観察された。グルマリン液 3 μl (2mg/ml) を注入すると一過性に求心性活動の促進がみられた。グルマリンを洗い流した後再び5％グルコースを注入したが求心性活動の促進は観察されなかった。舌の甘味受容器と同様に腸のグルコレセプターもグルマリンにより活動をブロックされるものと思われる。

(5) 内因性 sugar acid と内分泌・自律神経系

山下　博，稲永清敏，松村逸郎（産業医大・第一生理）
新島　旭（前新潟大・医・第一生理）
佐々木和男（富山大・工・電子情報）
大村　裕（日本臓器）

2Buten-4-Olide(2B-4-O) は内因性 sugar acid であり，従来食欲抑制物質と考えられていた。この作用に加えて，静脈内に 2B-4-O を投与すると，血中のグルココルチコイドとノルアドレナリン濃度を上昇させることが判った。視床下部スライス実験では室傍核の CRF 産生と自律神経系に関わる小細胞性ニューロンの放電を上昇させた。脾・膵・腎・褐色脂肪組織への交感神経活動を記録すると，いずれも 2B-4-O 投与で増加した。これらの結果は 2B-4-O が視床下部室傍核の

グルコース受容性ニューロンに働き，視床下部—下垂体—副腎系を体液性に，神経性に交感神経系を促進していることが判った。したがって，2B-4-O がストレス・アレルギー・免疫系異常に対しても効果があることが期待される。

(6) 高血糖とインスリン受容体機能異常について

前川　聡，柏木厚典（滋賀医大・第三内科）
小林　正（富山医薬大・第一内科）

非インスリン依存型糖尿病患者腹壁筋よりインスリン受容体を部分精製し，その機能を検討したところ，インスリン結合能は対象の約80％に減少し，また受容体自己リン酸化能，外因性基質である Glu/Tyr ポリマーに対するチロシンキナーゼ活性は障害され，その程度が空腹時血糖と逆相関した。そこで，高血糖のみでインスリン受容体機能不全をおこしうるか否かを検討するため，Ratl 線維芽細胞にヒトインスリン受容体を大量発現させた HIRc 細胞を，27mM ブドウ糖存在下に 4 日間培養しインスリン受容体機能を検討した。まずインスリン結合能及び受容体自己リン酸化能は，高ブドウ糖培養にて変化を認めなかった。一方，Glu/Tyr に対するキナーゼ活性は対照のの約 7 ％に低下しており，この変化は24時間培養で既に認められ，浸透圧対照である27mM ラフィノースにて，キナーゼ活性の変化を認めなかったことから，ブドウ糖特異的なものと考えられた。高ブドウ糖培養細胞のプロティンキナーゼ C(PKC) 活性を測定したところ，膜分画 PKC 活性は約 3 倍に上昇しており，また受容体キナーゼの逆反応酵素であるプロティンチロシンフォスファターゼ (PTPase) 活性を測定したところ，高ブドウ糖濃度状態において，その活性が上昇している可能性が示唆された。

高血糖状態では，このようにインスリン受容体以降のインスリンシグナル伝達経路にも種々の障害がもたらされインスリン抵抗性が，生じていると考えられた。現在インスリン情報伝達系で重要な伝達物質である IRS-1 (PP185) の cDNA クローニングとタンパク質の精製及びインスリンシグナルにより動く PTPase の cDNA クローニングを行ない，受容体結合以後の情報伝達のスイッチ "on""off" 機構を明らかにするとともに，高グルコースによるその情報の修飾機構を検討する予定である。

(7) 肥満ラットに対するギムネマ酸の効果

日地康武，寺澤　光，加藤達生，安陪隆明（鳥取大・医・第一生理）

実験動物は，遺伝性肥満ラット (Wistar fatty rat) を使用し，飼育方法は，飼料の摂取カロリー量が標準食と変らない低脂肪食にギムネマ・シルベスタ葉抽出物を添加して，1日当り 25g の制限食で長期間飼育し肥満に対するギムネマ酸の有効性を検討した。

その結果，ギムネマ酸は明らかに肥満ラットの耐糖能低下を改善した。この傾向は正常ラットにおいてもみられた。中性脂肪と総コレステロール値の血中濃度の変化は両値とも，週令に伴う高値を全般的に抑制した。また，低脂肪食を20週間連続投与した期間中のギムネマ酸添加でみられる体重増加抑制率の平均は，肥満ラットで3.50±0.23%，正常ラットで5.66±0.31%と，いずれも抑制されていた。

以上の結果から，肥満に対するギムネマ酸の有効性が認められた。

(8) ストレスによる血糖上昇（空腹時と摂食時の差）

山田不二子，田中克明，井上修二（横浜市大・医・第三内科）

ストレスによる血糖上昇には，カテコラミン，コルチコステロン，インスリン，グルカゴンなどの血糖調節ホルモンが関与することが知られているが，絶食時と摂食時におけるこれらのホルモンの役割の差異について検討した報告は少ない。本研究では，1）偽手術，2）副腎髄質摘出，3）副腎摘出ラットを作成し，拘束ストレスがラットの糖代謝に及ぼす影響を絶食時および摂食時で比較検討した。拘束ストレスにより血糖は，絶食時では血中エピネフリンの上昇した偽手術群でのみ上昇したが，摂食時では偽手術群＞副腎髄質摘出群＞副腎摘出群の順で3群とも上昇を示した。両条件下で，血中グルカゴンおよびノルエピネフリンは3群とも上昇，血中エピネフリンは偽手術群のみで上昇，コルチコステロンは偽手術群と副腎髄質摘出群で上昇を示した。肝グリコーゲン含有量は，絶食時ではストレス前より低値を示し拘束ストレス後も変化は見られなかったが，摂食時では拘束ストレスにより3群ともに有意の低下が見られた。以上の結果により，ストレス高血糖においては，肝グリコーゲンの枯渇した絶食時では血中エピネフリンが重要な役割を果たし，肝グリコーゲンの存在する摂食時では，血中エピネフリンのみならず，コルチコステロンおよびグルカゴンが相互に高血糖に寄与していることが示唆された。

(9) 視床下部による血中カルシウム調節とブドウ糖調節

粟生修司，馬　静怡，堀　哲朗（九州大・医・第一生理）

血液中のブドウ糖およびカルシウム(Ca)レベルは生体機能の維持のために狭い範囲に厳密に調節されている。視床下部は血糖調節に重要な役割を果しているが，血中Ca調節作用についてはよくわかっいない。本研究では視床下部電気刺激時の血中Caレベルを検討し，視床下部ブドウ糖／Ca調節系の存在の可能性を検討した。ネンブタール麻酔科でラット視床下部外側野，室傍核，腹内側核を電気刺激(0.5ms, 0.1mA, 30Hz, 60min)し，血中Ca^{++}レベルを測定した。視床下部外側野刺激では刺激30分後からCa値が低下し始め，90分から150分（測定終了）まで持続的に有意に低下した。室傍核では刺激開始60分後に一過性にCa値が低下した。前者の作用は迷走神経胃枝の切断で消失し，後者の効果は迷走神経甲状腺/副甲状腺枝切断で抑制された。腹内側核刺激は効果がなかった。視床下部から迷走神経を介する血糖調節系に加えて血中Ca調節系の存在が示唆される。

(10) カロリー性及びノンカロリー性満腹信号としての視床下部神経ヒスタミン

坂田利家，吉松博信，大原明彦（大分医大・第一内科）

視床下部神経ヒスタミン(HA)は視床下部腹内側核(VMH)及び室傍核(PVN)のヒスタミンH_1受容体を介し，摂食を抑制性に調節している[1-3]。VMHを含むmicrodialysisの結果でも，HA濃度は摂食行動の後半から上昇してくることが確認された[4]。これらの結果から，HAは満腹信号として作働している，そう我々は結論づけるに至った。インスリンで低血糖を誘発したり，2-deoxy-D-glucose (2-DG)で神経細胞内の糖欠乏状態を誘発すると，視床下部のHA代謝回転は亢進し[5]，遅発性の摂食抑制が誘発されることも，一方でわかってきた。

食欲中枢におけるグルコースの動態からみると，これらの両結論は矛盾する。前者では摂食（血糖上昇）によってHA濃度が上昇するのに，後者では低血糖でもHA代謝回転が亢進するからである。そこで次の実験を計画した。三叉神経中脳路核(Me5)は，中枢ヒスタミン神経系の中では唯一のシナップス形成をしている核である。しかも，歯根膜と咬筋から感覚信号を受けている。ラットのMe5とVMHへ，それぞれα-fluoromethylhistidineを微量注入し，神経HAをほぼ完全に近く枯渇させてみた。VMHに注入すると，摂食の量に関係する測定パラメーターがすべて減量するが，Me5では食事の速度に関係する指標が遅くなるという結果を得た。次に，40分間継続して食事をさせ，食事開始後15分と60分のHA代謝回転を調べることにした。VMHのHAは60分値だけが代謝回転を亢進させたのに対し，Me5では15分値も60分値も，ともにHA代謝

回転は亢進していた。この差はエネルギー摂取の結果として起きたものか，あるいは咀嚼等の口腔内感覚由来のものか，こういう問いを新しく提起することになった。そこで，胃チューブで非経口的に食事を胃内注入する実験をおこなった。VMH 及び Me5 とも，tube feeding では HA 代謝に何の変化も起こさないことが確認された。Me5 への末梢信号は口腔内固有感覚を介したもので，non-nutritional control 系であるといえる。

一連の実験を通じての結論は次のようになる。摂食調節に関与する HA 神経系は，2 つの異なった調節系を制御している。ひとつは VMH を介す系で，これは摂食量を含むエネルギー調節に関与している。いまひとつ Me5 を介す系で，咀嚼，材質，味覚といった口腔内感覚によって，non-nutritional に調節される。これまでにわかっていた HA の nutritional control 系に加えて，今回の結果は non-nutritional control 系を明らかに出来たことに意義がある。HA 神経を介した摂食調節系には機能分化が認められ，nutritional と non-nutritional の dual control をおこなっているといえる（図）。

文　献

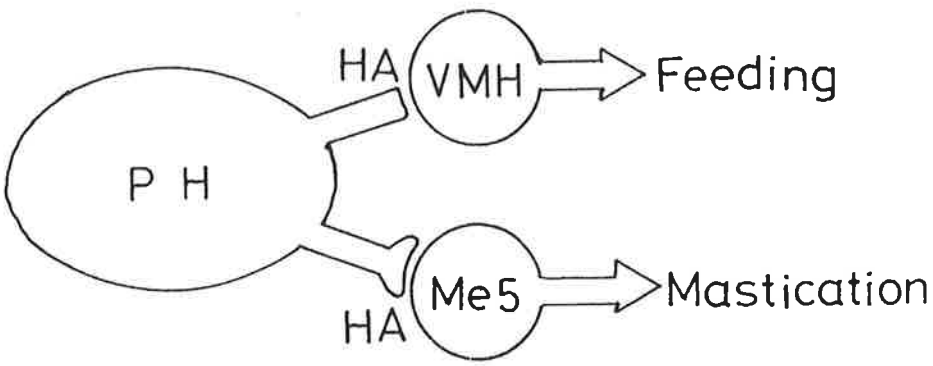
1）Sakata, T. et al : Experientia. 44:216-217, 1988.

2）Fukagawa, K. et al : Am. J. Physiol. 256 : R605-R611, 1989.

3）Sakata, T. et al : Brain Res. 537 : 303-306, 1990

4）Itoh, Y. et al : Neurosci. Lett. 125 : 235-237, 1991

5）Ohara, A. et al : J.Neurochem. in press.



Dual control of hypothalamic neuronal histamine in feeding and mastication.
PH : posteriol hypothalamus including magnocellular neuclei.
VMH : ventromedial neucleus in the mesencephalon.
HA : neuronal histamine

(11) 摂食による記憶促進

大村　裕（日本臓器製薬　生物活性科学研）
佐々木和男（富山大・工・電子情報）
李　愛軍（九州大・医・生理）

摂食あるいはブドウ糖投与(I. P)によって，血中および脳脊髄液中のブドウ糖濃度は2倍に上昇する。これに反応して脳グルコセンサーである上衣細胞から酸性線維芽細胞増殖因子(aFGF)が脳内に放出される。放出されたaFGFは2時間後に海馬，中隔などのニューロンから取り込まれている。これはaFGF受容器がこれらニューロン膜に存在するためである。ブドウ糖投与2時間後に受動的回避学習やMorris水迷路学習を行うと，それによる情動性記憶や空間性記憶が有意に促進されている。この促進効果は，ブドウ糖投与30分前に抗aFGF抗体を投与(I. C. V)しておくと無効になる。また海馬CA1領域を虚血により壊死させると，これら学習記憶は強く障害される。上衣細胞は脳室内投与のブドウ糖にだけ反応してaFGFを放出（0.7pmolから15分後に0.7nmol，1時間後に7nmol，2時間後に0.7nmolと増加）するが，マンニトール，D-leucineなどには反応しない。これが膵臓Β－細胞と異なる点である。結局摂食により放出されたaFGFが海馬に作用して脳に記憶促進の準備状態をつくっているのである。

(12) 最後野のグルコース応答性ニューロンについて

足立　明（岡山大・歯・口腔生理）

これまで，麻酔下のラットの最後野から神経活動を記録し，グルコースに特異的に応答するニューロンの存在することを明らかにしてきたが，今回はラット新鮮脳スライス標本を用い，in-vitroの条件下で再確認した。この条件下ではニューロンの自発性放電頻度が低下したが，グルコースに対して応答するニューロンの存在を認めた。これらのニューロンのうち，あるものはCCKにたいしても応答した。しかし，グルコースには応答せずCCKにのみ応答するニューロンも存在するから，グルコースに応答するニューロンがCCKにも応答すると考えるより，別のニューロンがCCKに応答し，シナプスを介してグルコース応答性ニューロンを興奮させたと考えられる。CCKは摂食抑制作用があるから，このニューロンは摂食抑制系に関与しているものと思われる。

(13) 膵β細胞のアルギニン応答のグルコース依存性機構

矢田俊彦（鹿児島大・医・第一生理）

アルギニン (ARG) の膵島β細胞内 Ca^{2+} 濃度（$[Ca^{2+}]_i$）に対する効果とそのグルコース（G）依存性を解析した。

【方法】 ラットの単離β細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を，fura-2 顕微測法により測定した。

【結果】 ① ARG (10mM) は，2.8mM G 存在下 (2.8G) で，26％のβ細胞に $[Ca^{2+}]_i$ 増加を誘起した。② ARG に $[Ca^{2+}]_i$ 応答を示すβ細胞の割合および $[Ca^{2+}]_i$ 増加の振幅は，G 濃度上昇 (5.0G, 8.3G) に伴なって増加した。③代謝性刺激 Glyceraldehyde と Leucine は G 同様に ARG 応答を増強した。④G 同様に膜脱分極をもたらす KCl は ARG 応答を著明には増強しなかった。⑤β細胞で代謝されない ARG 誘導体も同様の $[Ca^{2+}]_i$ 増加を誘起した。

【結論】 ① ARG は，非代謝性に，β細胞 $[Ca^{2+}]_i$ 増加を誘起し，G 濃度上昇はこれを増強する。② ARG 応答の G による増強は，単にβ細胞膜脱分極によるのではなく G 代謝活性化に伴う過程が関与する。

(14) 膵β細胞の細胞内 pH は直接的には glucose 反応に関与しない

服部政憲，何　莉萍，北里　宏（滋賀医大・第二生理）

膵β細胞は細胞外 glucose 濃度の上昇のほかに細胞外 Na^+ 濃度の低下や amiloride の投与によっても脱分極をおこすことが知られている。今回私達は微小電極法と蛍光色素法を用い，マウス膵β細胞の電気的活動および細胞内 pH の変化を記録し，これらの脱分極をおこさせる物質を細胞外に投与した際に細胞内 pH がどのように変化するかを調べ，glucose 反応による細胞内電位の変化との関連につき検討した。

①細胞外 glucose 濃度を 2.8mM から 11.1mM の間で変化させても細胞内 pH の変化は認められなかった。

②細胞外 glucose 濃度が 11.1mM であるときに細胞外に amiloride 加えると膜電位は脱分極方向に移動し，細胞内 pH は次第に低下した。

③細胞外 glucose 濃度が 11.1mM であるときに細胞外 Na^+ 濃度を 135mM から 25mM に下げると膜電位は脱分極方向へ移動するにもかかわらず細胞内 pH は一定の傾向を示さなかった。

以上の結果から膵β細胞にも Na^+/H^+ 交換輸送系が存在するが，膵β細胞の細胞内 pH は直接的には glucose 反応に関与していないと考えられた。

(15) ATP 感受性 K^+チャンネルとスルホニル尿素受容体

仁木一郎（長寿科学振興財団）

膵β細胞においてグルコース刺激と細胞内 Ca^{2+} 上昇をつなぐ重要な機構である ATP-sensitive K^+-channel を生化学的に検討する目的で，このチャンネルの特異的阻害剤であるスルホニル尿素とそのレセプターとの結合特性を膵β細胞の膜分画を用いて調べた。ATP は Mg に依存してこの結合を抑制した。ADP は Mg の存在にかかわらずスルホニル尿素とそのレセプターとの結合を競合的に阻害した。ATP-sensitive K^+ -channel を開くダイアゾキサイドは，燐酸化されたスルホニル尿素レセプターに作用し，そのリガンドに対する結合を非競合的に阻害した。ATP-sensitive K^+-channel の活性を調節するこれらの物質が，スルホニル尿素とそのレセプターとの結合活性を変化させることは，このチャンネルとレセプターとが深く関わっているか，または同一であることを示唆する。私たちは，更にこのレセプターを部分精製する affinity cchromatography を開発した。この分子の糖尿病病態との関連が期待される。

11.「細胞膜輸送機能と細胞システム」

1993年1月21日－22日

提案代表者　今井雄介（大阪医大）

世話人　山岸俊一，菅野富夫，村上政隆

共催　上皮膜研究会（藤本守）

(1) 蛙皮上皮細胞のイオン輸送の回路網表現

今井雄介，吉田秀世，宮本　学，中張隆司，相馬義郎（大阪医大・第一生理）

(2) Na^+／酸性アミノ酸輸送に連結する K^+ 逆輸送の生理学的意義

今村千晴，林　久由，星　　猛（静岡県大・食品栄養科学）

(3) ラット摘出甲状腺の誘電解析

小桜謙一，安藤元紀，入交昭彦（高知医大・第二生理）

(4) 角膜内細胞層の hydraulic conductivity および reflection coefficient に関する研究

久保田真吾，北里　宏（滋賀医大・第二生理）

(5) 腎集合管の水チャネルの cDNA クローニング

丸茂文昭，伏見清秀，内田真一，佐々木成（東京医歯大・第二内科）

(6) 腎近位尿細管糖輸送における管腔側膜と周囲側膜のクロストーク

藤本　守，中川眞代，萩原暢子，松岡良子，久保川学，森　偵章，窪田隆裕，小寺邦彦

（大阪医大・第二生理）

(7) ラット耳下腺のカルセイン排出を指標とした水とアミラーゼに対するギャップ結合の効果

菅野義信，杉田　誠，柴　芳樹（広島大・歯・口腔生理）

(8) 壁細胞プロトンポンプの転座と阻害

1）in vivo におけるポンプの転座

富山愛隆，森井孫俊，竹口紀晃（富山医薬大・薬・薬物生理）

(9) 壁細胞プロトンポンプの転座と阻害剤

2）ポンプのコンフォメーションと阻害剤

森井孫俊，竹口紀晃（富山医薬大・薬・薬物生理）

(10) H^+，K^+－ATPase と大腸上皮機能

鈴木裕一，金子健也，鈴木敏枝，渡辺敏行（山形大・医・生理）

(11) 心室筋 Ca^{2+} 透過性カチオンチャネルと心筋炎

富永真琴，堀江　稔，松森　昭（京都大・医・第三内科）

岡田泰伸（生理研）

⑿ 顕微蛍光法を用いた細いヘンレの上行脚細胞膜における Na^+ 輸送体の解析

根東義明，藤原幾磨，高橋信行，伊藤　修，五十嵐裕，多田啓也，阿部圭志
（東北大・医・小児科，病態液性調節学・第二内科）

⒀ 集合尿細管おけるイソプロテレノールの作用

吉富宏治，池田正浩，八十嶋弘一，今井　正（自治医大・薬理）
伊従正博，林　松彦，猿田享男（慶應大・医・内科）
黒川　清（東京大・医・第一内科）

⒁ 腎培養細胞 (A6 cell) のイオン輸送に及ぼす抗利尿ホルモンの影響

萩原暢子，藤本　守（大阪医大・第二生理）
丸中良典（トロント大学・小児研究所）

⒂ 涙腺介在部導管細胞の KCl コンダクタンスとアセチルコリンの作用

斉藤禎隆，桑原創一郎（国立療養所岩手病院）

⒃ Effects of K^+ channel blockers on inwardly and outwardly rectifying whole-cell K^+ currents in sheep parotid secretory cells

T. Ishikawa and D. I. Cook (Dept. Physiol., Sydney Univ.)

⒄ 顎下腺腺房細胞のカルシウム流入機序
—IP_3 感受性プールによる調節の可能性—

泉井　亮，福士靖江，張　　偉，西山明徳（東北大・医・第一生理）
佐々木司（第一内科）

⒅ 細胞外 ATP による腎尿細管 Ca 透過性チャネルの活性化

河原克雅（千葉大・医・第二生理）

⒆ 膵 β 細胞 ATP 感受性Kチャネルとインスリン非依存性糖尿病

津浦佳之，石田　均，清野　裕（京都大・医・臨床代謝栄養）
岡田泰伸（生理研）

⒇ 膜動輸送（開口放出）の細胞外電極による検出

丸山芳夫，富田行成，猪岡　元（自治医大・生理）

(1) 蛙皮上皮細胞のイオン輸送の回路網表現

今井雄介，吉田秀世，宮本　学，中張隆司，相馬義郎（大阪医大・第一生理）

生命科学では分析と統合の必要性が認められている。分析方法を熱力学に求め，統合方法を回路理論に求めた回路網熱力学は生命科学の有力な手段となる。今回，この回路網熱力学を用いた

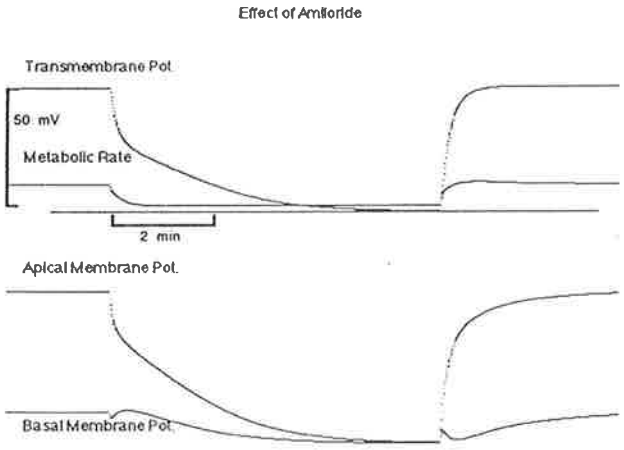


図1　膜電位に対するアミロライド効果

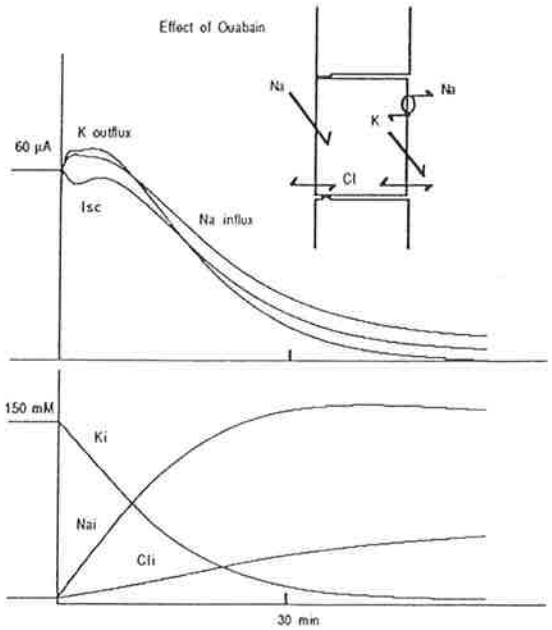


図2　短絡電流に対するウワバイン効果

蛙皮イオン輸送の統合的研究を紹介する。蛙皮イオン輸送の実験的研究は歴史が長く多くの成果がある。これらの成果を熱力学過程として解釈し，回路理論に法った結合枝グラフとした。蛙皮上皮細胞のイオン輸送は比較的単純ではあるが，統合的に解釈するとなると必ずしも単純ではない。今回蛙皮回路モデルを作り，このモデルが膜電位，短絡電流およびそれらに対する阻害剤の

作用をシミュレートするのみでなく，電気浸透，泳導電位といった蛙皮の動電現象，さらには電圧－電流曲線のヒステリシスまでもよくシミュレートするものであり，統合的理解の一助となることを報告した。

(2) Na^+／酸性アミノ酸輸送に連結する K^+逆輸送の生理学的意義

今村千晴，林　久由，星　　猛（静岡県大・食品栄養科学）

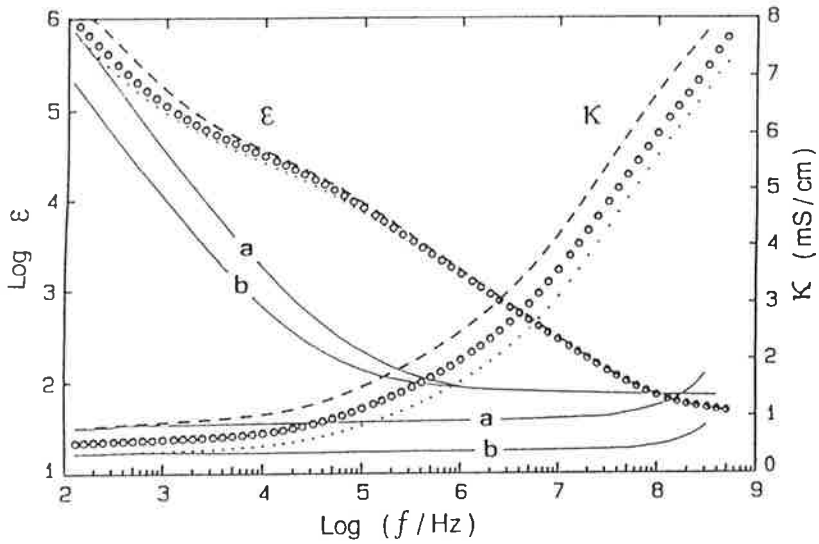
哺乳動物小腸，近位尿細管の刷子縁膜の酸性アミノ酸の担体輸送は Na^+，K^+, H^+の3種のカチオンと共役する極めて複雑な特性をもっている。その stoichiometry や3種イオンの役割，複雑カチオン関与の生理学的意義は未確定であり，それらを明らかにするのを目的とした。

酸性アミノ酸 (e. g. glutamate, Glu) の輸送は絶対的に外液 Na^+に依存し正味に Glu と1：1の比率で正荷電を輸送する起電性を示す。外液（粘膜側）の K^+はこの輸送に抑制的に働き，K^+濃度上昇は正荷電輸送に基づく輸送電位発生を抑制する。また Glu 輸送に際しては1：1の比率で細胞内から外液に向けての K^+エフラックスを生ずる。H^+は Glu の Vmax を低下させ K_t 値を低くすると共に，輸送電位の立ち上がり，平衡に達する時間を早める。Glu 輸送は細胞内 pH に Gly-Gly （H^+と共輸送）と異なりアルカリ化する。これらの成績より Glu 輸送のカチオン共役モデル図を提示する。

(3) ラット摘出甲状腺の誘電解析

小桜謙一，安藤元紀，入交昭彦（高知医大・第二生理）

甲状腺の機能と濾胞構造との関連を非侵襲的に捉えることを目的として，100Hz～500MHz にわたる組織インピーダンスを測定し，shell model による誘電解析を行った。正常甲状腺の低周波域における誘電率は数万のオーダーを示した。これは組織を単に細胞の suspension と見なした model では説明できず，濾胞構造を積極的に取り入れた model により再現できた。さらに，甲状腺製剤 (T_4) および抗甲状腺剤 (PTU) により，機能亢進群，低下群を作成し，誘電挙動と濾胞形態との関連を調べた。T_4 群，PTU 群ともに正常群とは異なる分散曲線が観測された。各群間でコロイド容積，濾胞上皮が著しく変化していることから，甲状腺の形態変化が組織インピーダンスに鋭敏に反映されていると考えられた。



Frequency dependence of relative permittivity (ε) and conductivity (κ) for thyroid hemilobes isolated from control rats.
Circles, average of data from 22 hemilobes. The range of scatter is shown by hroken and dotted lines. Lines a and b represent data for two aqucous solutions of NaCl. Note that solution a was isoconductive with the most conductive specimen and solution b with the least conductive one. Steep rises in ε for lines a and b with decreasing frequency show the effect of electrode polarization.

(4) 角膜内細胞層の hydraulic conductivity および reflection coefficient に関する研究

久保田真吾，北里　宏（滋賀医大・第二生理）

角膜に於ては，実質の proteoglycan が常に前房から水溶液を角膜内へ吸引しているにもかかわらず，生理的状態ではその容積は一定に保たれている。今回，我々は実質－前房間のイオン及び glucose の濃度差が，水を移動させる力となり得るかという点を検討し，次の結果を得た。①実質－前房間に存在する内皮細胞層の水に対するコンダクタンスは温度に依存しており，生活環境温度より低温では水の粘性の逆数と相関するが，高温では水の粘性変化から期待される値より大きくなる。②内皮細胞間隙は分子量18,300の dextran の大きさに相当する。③低分子量の NaCl, $NaHCO_3$ 及び glucose に対する反発係数の値は0.1以下である。これらの実験結果より以下の結論が示唆される。①生活環境温度より低温では内皮細胞の間隙は一定であるが，高温では細胞間隙が増大すると考えられる。② NaCl, $NaHCO_3$ 及び glucose の濃度差は水を排泄する力を発生し得

ない。従って内皮の細胞膜自体に水を排出する機能があると考えられる。

(5) 腎集合管の水チャネルの cDNA クローニング

丸茂文昭，伏見清秀，内田真一，佐々木成（東京医歯大・第二内科）

ADH は腎集合管の水チャネルを管腔膜に挿入し，水透過性を高める。我々は PCR クローニング法を用いて腎 cDNA ライブラリーより WCH-CD と呼ぶ cDNA クローンを得た。WCH-CD はアミノ酸271個で 6 回膜貫通であり，糖鎖付着部位は 1 つ認められた。Northern blot では 1.6Kb の単一のバンドが腎のみに認められ，皮質に比して髄質に発現が多かった。PT-PCR 法では WCH-1 の mRNA は皮質ならびに髄質集合管に特異的に認められた。WCH-CD の C 端に特異的な抗体による免疫染色でも発現は集合管のみに認められ，細胞内では管腔膜に強く染色した。WCH-1 より mRNA を作成しアフリカツメガエル卵に注入すると浸透圧性水透過性が3.5倍の増加を示した。以上より WCH-1 は集合管に特異的な水チャネルで ADH 感受性のものと考えられる。今後この WCH-1 の cDNA や抗体を使用して腎濃縮機構を細胞・分子レベルで検討する予定である。

(6) 腎近位尿細管糖輸送における管腔側膜と周囲側膜のクロストーク

藤本　守，中川眞代，萩原暢子，松岡良子，久保川学，森　偵章，窪田隆裕，小寺邦彦
（大阪医大・第二生理）

腎近位尿細管における糖再吸収は，発電性 Na^+-糖共輸送を受ける。その過程において細胞内イオン，細胞膜電位 (E_M) の変化を通じて，上皮膜の表裏のクロストークを起こす。方法は食用蛙灌流腎で，微小灌流を行ないながら二連イオン微小電極で実験を行なった。管腔側よりグルコース 10mM を 2 分間投与すると，E_M は 10mV 脱分極した。その間，Na_i は初期増加の後，次第に減少し，また，pH_i は0.08上昇した。Na^+ との共輸送体は管腔膜に存在し，また Na^+ の細胞外への汲み出し機構の一部には，基底膜の HCO_3^- の発電的な去出機構が関わっている。管腔より Na^+-糖の侵入が促進された際，E_M を脱分極させ，Na_i の上昇をもたらす。この Na_i 上昇は周囲膜の Na^+, K^+ ポンプを刺激し，血液側への Na^+ の汲み出しを促進する。さらに糖誘発性脱分極は時に，周囲膜の発電性 HCO_3^- 去出を抑制して，pH_i の上昇を起こす。この pH_i 上昇は pH 感受性 K^+ チャネルを活性化し，膜電位のそれ以上の低下を防止する。周囲側からアルカリを投与すると，E_M の過分極と共に pH_i が上昇して K^+ コンダクタンスの上昇をもたらし，Na^+ 糖輸送駆動力を上昇させる。結論：Na^+-糖輸送は管腔膜と周囲膜のクロストークを引き起こし，近位尿細

管での Na^+ 再吸収のみならず細胞保全にも与っている。

(7) ラット耳下腺のカルセイン排出を指標とした水とアミラーゼに対するギャップ結合の効果

菅野義信，杉田　誠，柴　芳樹（広島大・歯・口腔生理）

唾液腺の分離腺房を用いアミラーゼやムチンの分泌機構は調べられてきたが，水分泌を表す実験系は確立されていない。今回，カルセインという蛍光色素を用い，ラット耳下腺分離腺房における水分泌現象を観察できないか調べた。細胞内に取り込ませたカルセインは，musucarinic 刺激や α-adrenergic 刺激により排出される。またカルシウムイオノフォアの A23187 刺激によつても排出され，水分泌との関連が示唆された。次に蛍光色素カルセインとアミラーゼの二種類の分泌系で，ギャップ結合の機能する腺房と機能しない単一腺房細胞での反応性の違いを比較した。カルセインの排出は腺房よりも単一腺房細胞のほうが反応性が高かったのに対し，主に β-adrenergic 刺激により起こるアミラーゼ分泌は逆に腺房のほうが反応性が高かった。したがってギャップ結合を介し，カルセイン排出においては抑制性の，アミラーゼ分泌では促進性の情報伝達を行っている可能性が示唆された。

(8) 壁細胞プロトンポンプの転座と阻害
1）in vivo におけるポンプの転座

富山愛隆，森井孫俊，竹口紀晃（富山医薬大・薬・薬物生理）

胃壁細胞のプロトンポンプは細胞小胞と頂端膜との間を往復する。プロトンポンプの特異的な阻害剤である E3810 及び AG-1749をラットに in vivo で投与した時，約 2 時間で酸分泌はほぼ完全に阻害された。その時の細胞中に存在する細管小胞中のポンプの活性はほとんど減少していなかった。約 4 時間以降で顕著な失活が観察されるようになった。このことは頂端膜に存在するポンプがまず阻害されること，その後頂端膜から細管小胞への脱融合に伴って，失活したポンプが細管小胞に移行したことを示している。この脱融合は AG-1749 がポンプに結合することにより著しく抑制された。その抑制はポンプが E2 コンフォメーションにある，あるいは E1, E2 コンフォメーション変化が抑制されていることにもとづくと考えられ，脱融合機構におけるポンプのコンフォメーションの重要性が指摘される。

薬物投与後によるポンプの失活からポンプ活性の回復に要する時間は E3810 の方が AG-1749

の場合より短い。S-S 還元剤によるポンプからの薬物のはずれやすさは AG-1749 より E3810 の方が大きい。このことが，両薬物での脱融合速度の違いと相まって，in vivo での酸分泌回復性の一部を説明する。

(9) 壁細胞プロトンポンプの転座と阻害剤
2）ポンプのコンフォメーションと阻害剤

森井孫俊，竹口紀晃（富山医薬大・薬・薬物生理）

Omeprazole and E3810 were found to inhibit gastric H^+, K^+-ATPase following different biochemical mechanisms. Effects of the bound inhibitor on the conformational state were studied by measuring the fluorescence of the enzyme labeled with fluorescein 5'-isothiocyanate (FITC). The absolute fluorescence level of the omeprazole-bound enzyme was lower than that of the control enzyme, and reduction of S-S cross-linking between the enzyme and omeprazole increased the fluorescence to the control level. This suggests that the omeprazole-bound enzyme has a low fluorescence conformation (E_2 form). On the other hand, the conformation of the E3810-bound enzyme was the same as that of the control enzyme (E_1 form). Addition of K^+ into the control vesicle solution quenched the fluorescence ($E_1 \rightarrow E_2K^+$). The quench was inhibited in the omeprazole-bound enzyme, but not in the E3810-bound enzyme. Dephosphorylation step from the phosphoenzyme formed from Mg-ATP was inhibited by E3810 but not by omeprazole. The steady state phosphoenzyme level was not inhibited to the same extent as did the K^+-ATPase activity in both inhibitors. These experimental results have shown that the inhibition mechanism of H^+, K^+-ATPase by omeprazole was different from that by E3810 : the partial reaction that was the most strongly inhibited by omeprazole was the luminal K^+-induced conformational change from the E_1 to the E_2K^+ from and that by E3810 was the luminal K^+-induced dephosphorylation step.

(10) H^+, K^+-ATPase と大腸上皮機能

鈴木裕一，金子健也，鈴木敏枝，渡辺敏行（山形大・医・生理）

哺乳類の大腸遠位部粘膜上皮には少なくとも：1）Na 吸収，2）Cl 分泌，3）K 分泌，4）H/K 逆輸送，の 4 種の輸送機構がある。一方で，大腸は crypt と surface epithelium からなり，さらに crypt の細胞は，goblet cell と vacuolated cell からなる。こう言った状況の中で次のよう

な問題が考えられる。

1）上記の各輸送機構は，各々どの細胞に分布しているか？

2）同じ細胞で起きているならば，相互の関係はどの様なものであるか？

3）クリプト底から表面で脱落するまで，移動する間どの様な発達変化をきたすか？

現在まで得られている知見から，次のような可能性が考えられる。

1）Na吸収は，surface epithelium (principal cell) で起きている。

2）Cl分泌は，crypt cell (vacuolated cell) で起きている。

3）H/K exchangeは，principal cellとvacuolated cellの両者で起きている。

4）K分泌は，独立の細胞で起きている。

(11) 心室筋 Ca^{2+} 透過性カチオンチャネルと心筋炎

富永真琴，堀江　稔，松森　昭（京都大・医・第三内科）
岡田泰伸（生理研）

心筋炎マウスから得た抗心筋抗体陽性血清のモルモット単離心筋細胞の膜電流及び細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) に対する効果を観察した。パッチクランプ法では，全細胞型電流記録で陽性血清投与により内向き電流の活性化がみられ，電流・電圧特性からこれは非選択性陽イオンチャネルであり，Ca^{2+} や Ba^{2+} に対しても透過性を示すことが明らかとなった。単一チャネル電流記録では Ba^{2+} に対する conductance が 12pS のチャネルであることが分かった。fura-2 法で，陽性血清投与時に $[Ca^{2+}]_i$ が増加することが確認された。陰性血清は膜電流にも $[Ca^{2+}]_i$ にも影響を与えなかった。抗心筋抗体によって活性化されたチャネルから流入する Ca^{2+} による Ca overload が細胞障害へとつながるものと考えられた。

(12) 顕微蛍光法を用いた細いヘンレの上行脚細胞膜における Na^+ 輸送体の解析

根東義明，藤原幾麿，高橋信行，伊藤　修，五十嵐裕，多田啓也，阿部圭志
（東北大・医・小児科，病態液性調節学・第二内科）

細いヘンレの上行脚は1970年代よりNaClの能動輸送の有無をめぐって議論がすすめられてきた尿細管セグメントである。今回我々は，同尿細管をin vitroで単離灌流し，顕微蛍光法を用いて細胞内 Na^+ およびpHを測定し，細胞膜上の Na^+ 輸送体の解析を行なった。

定常状態において，細胞内 Na^+ およびpHはそれぞれ20mmol/l，7.10前後だった。血管側の

K^+を除去と 1mmol/l ウワバインはいずれも細胞内 Na^+ を外液レベルまで上昇させ，血管側細胞膜上に Na/KATPase が唯一の Na^+ くみ出し機構として存在することを示唆した。同 ATPase の活性は非常に低く，細いヘンレの上行脚では能動的 Na^+ 再吸収はほとんどおこらないことが示された。血管側の Na^+ 除去や 1mmol/l アミロライドは細胞内 pH を急激に低下させ，同尿細管血管側細胞膜上にはアミロライド感受性 Na/H 交換輸送体が存在し，細胞内 pH 調節にとって重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

(13) 集合尿細管おけるイソプロテレノールの作用

吉富宏治，池田正浩，八十嶋弘一，今井　正（自治医大・薬理）
伊従正博，林　松彦，猿田享男（慶應大・医・内科）
黒川　清（東京大・医・第一内科）

腎集合尿細管では，構成細胞（主細胞，α間在細胞，β間在細胞）の役割分担により，最終尿の組成を決定している。βアドレナリン受容体刺激は，この部位での Cl^- 再吸収を増加させることが報告されており，尿細管管腔側膜に Cl^--HCO_3^- 逆輸送体を，血管側に Cl^- チャネルを持つβ間在細胞が，その役割を担当している可能性が示唆されていた。しかし，個々の集合管構成細胞を単離して実験することが困難であったためβアドレナリン作用の詳細は不明であった。そこで FITC-ピーナッツレクチン標識したβ間在細胞はフローサイトメトリーで単離し，パッチクランプ法を用いて膜電流わ測定することによりβ受容体刺激時の Cl^- チャネル活性化の情報伝達機構を検討した。イソプロテレノール (ISO) は，用量依存性に Cl^- 電流を活性化し，この作用はβ拮抗薬であるアテノロールで抑制された。cAMP 細胞内注入は，ISO の作用を模倣し，プロテインキナーゼＡのペプチド性抑制薬である PKI 細胞内注入は ISO の作用を抑制した。GTPγS 細胞内注入は ISO の作用を不可逆にし，GDPβS 細胞内注入は，ISO の作用を抑制した。以上より，β間在細胞は，ISO で活性化される Cl^- チャネルを持ち，そのシグナルは，レセプター，Ｇ蛋白，cAMP，プロテインキナーゼＡと伝達することが示された。

(14) 腎培養細胞 (A6 cell) のイオン輸送に及ぼす抗利尿ホルモンの影響

萩原暢子，藤本　守（大阪医大・第二生理）
丸中良典（トロント大学・小児研究所）

【目的】

体液の浸透圧や循環血液量が変化すると，抗利尿ホルモン (ADH) やアルドステロンが遠位尿細管に直接作用することが知られている。現在までに A6 cell で，各種イオンチャネルが報告されているが，ホルモン実験では比較的高濃度のアルドステロン (1 μM) が前処理されており，生理的レベルでのホルモン効果は観察されていない。我々はアルドステロン基礎レベル下で ADH の効果を検討した。

【方法】

パッチクランプ法を A6 cell に用いて ADH （アルギニンバソトシン 40mIU/ml）投与時のチャネル活性を検討した。結果： ADH 投与により 32±2pS の非選択性カチオンチャネルの活性化が認められた。このチャネルは電位依存性があり，脱分極で開口確率 (Po) が上昇した。またアミロライド (1 μM) 投与により30秒後より Po の減少が認められた。さらに低濃度の Ca^{2+} 溶液で高い Po が認められた。結論：生理的条件下で抗利尿ホルモンが A6 cell の非選択性カチオンチャネルを活性化した。このチャネルが集合尿細管上皮の水電解質透過性上昇に関与していることが予想される。

(15) 涙腺介在部導管細胞の KCl コンダクタンスとアセチルコリンの作用

斉藤禎隆，桑原創一郎（国立療養所岩手病院）

涙腺分泌における導管の役割を明らかにするために，ラットの眼窩外涙腺の介在部導管を酵素処理により取りだしてパッチクランプ法により細胞膜に存在するイオンチャンネルと膜コンダクタンスを研究した。介在部導管細胞の血管側膜には，コンダクタンスが約 300pS の Cl チャンネル，12pS の Cl チャンネルおよび 80pS の K チャンネルが存在することが分った。後二者は膜電位の脱分極により活性化された。12pS の Cl チャンネルは強い Ca 依存性を示したが，K チャンネルは pCa＞ 9 の条件でも開口がみられた。ホールセル電流は著明な外向き整流をしめした。TEA 又は Ba の投与あるいは細胞内（ピペット内）の Ca 濃度の減少は膜コンダクタンスの減少をもたらし，アセチルコリンの投与は内向きおよび外向き電流を増加させた。以上の結果から介在部導管細胞は高い K 透過性を有し，アセチルコリン刺激は膜の KCl 透過性を増すものと考えられる。

(16) Effects of K^+ channel blockers on inwardly and outwardly rectifying whole-cell K^+ currents in sheep parotid secretory cells

T. Ishikawa and D. I. Cook (Department of Physiology, Sydney University)

We have used whole-cell patch-clamp techniques to examine the sensitivities of the inwardly and the outwardly rectifying K^+ currents in sheep parotid cells to K^+ channel blockers. Extracellular tetraethylammonium (ID_{50} = 200 μmol/l), quinine (ID_{50} = 100 μmol/l), verapamil (ID_{50} = 30 μmol/l) and charybdotoxin (ID_{50} < 0.1 μmol/l) reduced the outwardly rectifying current but had no effect on the inwardly rectifying current.Quininidine inhibited the outwardly rectifying current (ID_{50} = 200 μmol/l) and, at a concentration of 1 mmol/l, reduced the inwardly rectifying current by 35%. Extracellular Ba^{2+} inhibited both the inwardly and outwardly rectifying K^+ currents but the inwardly rectifying K^+ current was more sensitive to it (ID_{50} = 1 μmol/l) than was the outwardly rectifying K^+ current (ID_{50} = 2mmol/l). Extracellular Cs^+ reduced the inwardly rectifying K^+ current (ID_{50} = 100 μmol/l) without affecting the outwardly rectifying current. In excised outside-out patchs, the additon to the bath of quinine (100 μmol/l), quinidine (100 μmol/l), verapamil (100 μmol/l) or charybdotoxin (100nmol/l) inhibited Ca^{2+} - and voltage-sensitive 250 pS K^+ channels (BK channels). The pattern of blocker sensitivities is thus consistent with the hypothesis that BK channels are responsible for the outwardly rectifying whole-cell current seen in resting sheep parotid cells.

(17) 顎下腺腺房細胞のカルシウム流入機序 —IP_3 感受性プールによる調節の可能性—

泉井　亮，福士靖江，張　　偉，西山明徳（東北大・医・第一生理）
佐々木司（第一内科）

分泌刺激による顎下腺腺房細胞の Ca^{2+} 流入機序については，細胞内プールの Ca^{2+} 濃度が低下する（Ca^{2+} 放出の結果）ことで Ca^{2+} 流入路が開くという説が有力である。これまでの我々の実験結果もこれを支持しており，さらに流入した Ca^{2+} は一旦細胞内の Ca^{2+} プールに取り込まれ，second messenger, IP_3 によって再び放出されることを示している。IP_3 を介する Ca^{2+} 放出は振動性であり，これは，Ca^{2+} 一依存性 Cl^-，K^+ 電流として記録される。この両電流振動はほぼ同期しているが，発生の時間経過をさらに詳細に検討すると，（1）K^+ 電流は欠落することがある，（2）およそ50％の例で振動のピークは Cl^- 電流のほうが早い，（3）刺激直後は振動に先立っ

て持続性の K^+ 電流がみられる。一方，蛍光抗体法 (mAb18A10) を用いて IP_3 受容体の分布を調べると，basolateral 側に局在していた。Ca^{2+} 流入は IP_3 感受性プールが調節すること，これとは別の振動性の Ca^{2+} 放出プールが Cl^- チャネル近く (apical) に存在することが示唆される。

(18) 細胞外 ATP による腎尿細管 Ca 透過性チャネルの活性化

河原克雅（千葉大・医・第二生理）

腎遠位尿細管培養細胞（A6 細胞）において，細胞外 ATP (0.2 ～ 2 μM) により活性化される Ca 流入路について，パッチクランプ法（whole-cell clamp 法）及び蛍光顕微測光法 (fura-2) で検討した。細胞外 ATP により，持続的細胞内 Ca 増加（外液 Ca (+)）と一過性の細胞内 Ca 増加（外液 Ca (−)）を示した。Whole-cell clamp 状態で 5mMEGTA により細胞内 Ca を強くキレートすると，細胞外 ATP による一価カチオン電流は減弱し，Mn 電流は消失した。Pertussis toxin (1 μg (ml) 前投与した細胞では，細胞外 ATP により活性化する Ca (Mn) 電流が抑制（活性化までの時間延長）された。結論：A6 細胞には受容体依存性の Ca チャネルが存在し，Mn 透過性である。

(19) 膵 β 細胞 ATP 感受性 K チャネルとインスリン非依存性糖尿病

津浦佳之，石田　均，清野　裕（京都大・医・臨床代謝栄養）
岡田泰伸（生理研）

グルコース刺激によるインスリン分泌は電位依存性 Ca チャネルからの Ca 流入を trigger とするが，その開始は ATP 感受性 K チャネル（K_{ATP} チャネル）の閉口による。インスリン非依存性糖尿病 (NIDDM) 状態ではグルコース刺激によるインスリン分泌能が低下しており，その異常機構を解明する目的で実験的 NIDDM モデルの NSZ ラット及び遺伝的モデルの GK ラットを用いて膵 β 細胞の K_{ATP} チャネルの性質を検討した。いずれのラットでも K_{ATP} チャネルの unitary conductance, ATP への感受性は正常群と比較して有意差はなかったが，グルコースによるチャネルの抑制は有意に低下していた。この現象は，NIDDM 状態では膵 β 細胞内グルコース代謝が障害され ATP 産生能が低下している可能性を示唆する。次に GK ラットを用いて障害部位の特定を試みた。直接ミトコンドリア内に入り代謝される 2-ketoisocaproate や解糖系の途中から入り代謝される glyceraldehyde による K_{ATP} チャネルの抑制は正常群と有意差を認めず，代謝障害部位は glyceraldehyde-3-phosphate より近位部に存在することが示唆された。

⑳ 膜動輸送（開口放出）の細胞外電極による検出

丸山芳夫，富田行成，猪岡　元（自治医大・生理）

酸化還元が可能な物質に一定の電圧を印加すると，その酸化または還元電流は電極を用いた定電圧電流適定法にて検出することができる。この原理に基づき，微小カーボンファイバー電極を単一分泌細胞近傍に設置することで，セロトニン等の放出に伴う酸化電流を計測した。直径7umのカーボンファイバーをガラス管に封入し，通常のガラス電極作成用プラーにて微小ピペットとした。このピペットの先端を炎熱処理することでカーボンファイバーの先端有効面積を限定し，先端電気抵抗が電極電位600mVにて10から60ギガオームとなる電極を実験に供した。肥満細胞およびクロマフィン細胞よりベースライン電流応答（ベースラインより立ち上がりベースラインに復帰する反応）を記録し得た。このことは分泌応答が量子的であることを示している。

12.「第12回睡眠促進物質研究会」

1992年12月17日－18日

代表者　井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

世話人　山岸俊一

(1)　睡眠促進物質研究の曲がり角

井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

(2)　青斑核および延髄腹外側部から視束前野睡眠関連ニューロンへの機能連絡

大坂寿雅，松村人志，早石　修（大阪バイオサイエンス研）

(3)　橋における Ach 放出と VIP の効果

児玉　亨(東京都・神経研)

(4)　吸入麻酔薬インフルレンのラット脳内アミン及び PGD_2, PGE_2 に及ぼす影響

高橋　敏，荒木　功，佐藤哲観，松木明知（弘前大・医）

(5)　妊娠・哺乳・胎児行動と睡眠

張　士青（東京医歯大・医）

(6)　ウシ大脳皮質シナプス膜画分におけるウリジンおよび誘導体―特異的結合活性―ウリジン受容体の検索

木村敏行，寺岡政作，渡辺和人，近藤繁美，I.K.Ho，山本郁男

(北陸大・薬，日水製薬，ミシシッピ大)

(7)　酸性繊維芽細胞増殖因子(aFGF)の生理作用

大村　裕，佐々木和男，李愛軍（日本臓器製薬・生物活性研，富山大・工，九州大・医）

(8)　ウラシル誘導体の睡眠促進効果

本多和樹，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

(9)　Vitamin B_{12} promotes sleep and prolongs the period of circadian temperature rhythm in freerunning rats

池田真行，本多和樹，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

(10)　Neuronal activity in the brain of hibernating and non-hibernatig animals

孫　久榮（北京大・理）

(11)　ゴールデンハムスターの冬眠発現時における脳内 DSIP 含量変化について

川上公子，中村明弘，塩見浩人（福山大・薬）

(12)　日中の作業効率（パフォーマンス）が体温リズムに与える影響

小林敏孝，荒川一也（足利工大）

【研究会参加者】

池田真行，井上昌次郎，菰田泰夫，本多和樹（東京医歯大・医用器材研），稲瀬正彦，山岸俊一，尾崎　毅（生理研），木村敏行，山本郁男（北陸大・薬），塩見浩人，川上公子（福山大・薬），大坂寿雅（大阪バイオサイエンス研），大村　裕（日本臓器製薬・生物活性研），岡野善郎（久留米大・医），児玉　亨（東京都神経研），小林敏孝（足利工大），高橋　敏（弘前大・医），孫　久榮（北京大・理），張　士青（東京医歯大・医）

【研究会の概要】

今年度は従来の開催時期より早く12月に開催したため，常連であった人たちが出席できなくなり参加者は前年よりやや減少した。しかし，新人の参加があって演題数は前年とかわらず，新しい話題も豊富で討論が盛り上がり，いつものように大変活気ある会合となった。また中国からの参加者が２名あったこと，英語による発表が２題あったことも特色であった。その概略は以下の要旨にみるとおりである。今回も経験豊かな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，例年どおり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。

(1)　睡眠促進物質研究の曲がり角

井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

1980年代からめざましい発展を遂げた睡眠物質の研究は，いま曲がり角にさしかかったようである。睡眠物質という実体が存在するかどうか，それがどのような化学構造をしているか，その睡眠修飾作用の特性はなにか，そのための方法論は妥当か，といった基本的かつ探究的な問題はあらかた解決されたからである。現在では，睡眠物質が存在することを前提としてさらに踏み込み，睡眠調節における睡眠物質の役割を脳内メカニズムの面から多角的に捉えようとする研究が台頭しつつある。1992年に世界各地で開催された睡眠学会や，1993～1994年に開催が予定されている睡眠関連学会でも，中枢神経系との関連あるいは細胞レベルや分子レベルの動態に焦点を合わせたシンポジウムやワークショップの企画が多い。このような動向は睡眠物質研究が神経科学の主要な一分野として成熟してきたことを示すものであろう。

(2) 青斑核および延髄腹外側部から視束前野睡眠関連ニューロンへの機能連絡

大坂寿雅，松村人志，早石　修（大阪バイオサイエンス研）

睡眠中枢である外側視束前野と覚醒系に属する青斑核および延髄腹外側部との間の機能連絡を調べるために，ラットの青斑核および延髄腹外側部を電気刺激して外側視束前野の睡眠関連ニューロンの活動を細胞外記録した。青斑核および延髄腹外側部のどちらの刺激によっても，調べた29個の睡眠ニューロンの約半数が抑制され，残りの細胞は反応しなかった。興奮した細胞はなかった。これに対して，25個調べた覚醒時活動ニューロンで見られた主な反応は興奮反応だった。睡眠や覚醒に関連した活動をしない62個のニューロンの大部分は刺激に反応しなかった。青斑核を刺激したときには逆方向性活動電位が睡眠時活動ニューロンおよび覚醒時活動ニューロンともに約15％ずつ記録された。以上の結果から青斑核および延髄腹外側部は外側視束前野の睡眠機構を抑制する機能があることが示唆された。また一部の睡眠関連ニューロンは青斑核に投射し，上行性賦活系に作用することによって，覚醒レベルの調節をしている可能性が示唆された。

(3) 橋におけるアセチルコリン放出と VIP の効果

児玉　亨（東京都神経研）

これまでの生理学的，薬理学的，そして解剖学的研究によって逆説睡眠は橋に発現部位があると考えられている。そこで我々はこれまで橋背外側において睡眠覚醒サイクルにおけるいくつかの神経伝達物質の変化をマイクロダイアリシス法を用いて測定してきた。その結果，アセチルコリンの逆説睡眠期における特異的増加が観測され，コリン受容性細胞の逆説睡眠発現への関与が示唆された。一方で睡眠物質の研究はいくつかのペプチドが逆説睡眠に関係していると報告している。これらの物質は先に述べたアセチルコリンなど神経伝達物質とどのように関連しているのだろうか。そこで VIP, CCK-8など逆説睡眠に関係していると考えられる神経ペプチドを PCPA 投与による不眠状態のネコの脳室内に投与し，アセチルコリンの変化を調べてみた。結果は VIP 投与でアセチルコリンが増加したが，CCK-8では変化しなかった。

(4) 吸入麻酔薬イソフルレンのラット脳内アミンおよび PGD_2, PGE_2 に及ぼす影響

高橋　敏，荒木　功，佐藤哲観，松木明知（弘前大・医）

麻酔と睡眠は，可逆的意識消失という共通点をもっている。麻酔薬による意識消失－覚醒という現象と脳内睡眠関連物質との関係を明らかにする目的で，ラットを吸入麻酔薬イソフルレンで麻酔し，分割脳内アミン含量と全脳 PGD_2 ならびに PGE_2 含量の変化を検討した。イソフルレン麻酔による意識消失後，多くの部位で脳内アミン含量は増加し，一方それらの代謝産物は減少する傾向を示し，麻酔による脳内アミン放出の減少を意味しているものと考えられた。また麻酔からの覚醒時にはノルアドレナリン含量の減少とその代謝産物 MHPG 含量の増加が認められ，特に視床下部前部での変化が著しく，麻酔覚醒時におけるノルドレナリンの重要性が示唆された。全脳 PGD_2, PGE_2 含量は共に麻酔により有意に減少し，覚醒後は速やかに麻酔前のレベルに戻った。以上の結果から，脳内モノアミン，PG は麻酔－覚醒に深く関与していることが考えられる。

(5) 妊娠・哺乳・胎児行動と睡眠

張　士青（東京医歯大・医）

Several physiological and endocrinological changes that occur during pregnancy may influence sleep in pregnant women. I want to review these studies in recent years. Helen et al. demonstrated that slow-wave sleep (SWS) was singnificantly high at 27-39 weeks of gestation than at 8-16 weeks, as predicted by the restorative theory of sleep, and that there was no reduction of stage 4 sleep in pregnancy. But most of studies show reduction in stage 4 sleep during late pregnancy. Helen et al. reported that REM sleep time decreased between 17 weeks, gestation and parturition, compared to that in 8-16 weeks. However, Gila et al. reported that REM sleep only slightly increased at postpartum period and late pregnant women showed increased wake after sleep onset (WASO), increased percentage of stage 1 and lower sleep efficiency. But increased stage 4 sleep, decreased REM sleep, a significant reduction in WASO and increased sleep efficiency were found during postpartum period. Until recently, during pregnancy and lactation, the relationship of sex hormones and sleep has been clear, it is a necessary and valuable subject to research how the fluctuation of estrogen, progesterone and prolactin is reflected on the rhythm of NREM-REM sleep and what mutual connection exists between the endocrine and sleep mechanisms.

(6) ウシ大脳皮質シナプス膜画分におけるウリジン及び誘導体—特異的結合活性—ウリジン受容体の検索

木村敏行，寺岡政作，渡辺和人，山本郁男（北陸大・薬）
近藤繁美（日水製薬）
I. K. Ho （ミシシッピ大）

睡眠促進物質の1つであるウリジン(Ud)を修飾した化合物 N^3 ーフェナシルウリジン(N^3-PhAcUd)はマウス脳室内投与で睡眠作用を惹起させる。我々は，ラジオレセプターアッセイによる実験から，その睡眠作用発現に一部GABA-ベンゾジアゼピン受容体複合体が関与していることを明らかにしてきた。しかしながら，N^3-PhAcUdのGABA-ベンゾジアゼピン受容体複合体に対する親和性は低いことから，新たなる作用部位，すなわちUdのオリジナルな受容体の存在が想定された。そこで，[^{3}H] Udをリガンドとして，ウシ大脳皮質シナプス膜に対して結合能があるのかを検討した。[^{3}H] Ud 0.1-5.0 nMをウシ大脳皮質シナプス膜0.2 mg protein，取込み阻害剤のp-nitrobenzylthioinosine 100 μM存在下，4℃，5分間インキュベート，反応液をセル・ハーベスターによりろ過，グラスフィルター上の放射能を測定した。その結果，シナプス膜に[^{3}H]Udに相当する放射能があ認められ，Ud受容体の存在が示唆された。スキャッチャード解析により，この結合はシングルコンポーネントでありHill係数は0.97であった。しかし，アデノシン受容体のリガンドである2-chloroadenosineは，[^{3}H] Udに相当する結合に影響を与えた。以上の結果は，シナプス膜上にUdの結合する部位があり，既存のアデノシン受容体と相互に関係していると示唆された。

(7) 酸性繊維芽細胞増殖因子(aFGF)の生理作用

大村　裕（日本臓器製薬・生物活性研）
佐々木和男（富山大・工）
李　愛軍（九州大・医）

摂食によって，脳脊髄液中に上昇したグルコースに反応して脳のグルコセンサーである上衣細胞から放出されたaFGFがシナプス可塑性に有効に作用する。これは放出のaFGFが摂食2時間後に記憶に関係する海馬，中隔などのニューロン群にaFGF受容器を介してインターナリゼーションされることから判明した。グルコース投与，2時間後のマウスおよびラットでは受動性回避学習およびMorrisの水迷路学習において学習による記憶を有意に促進させているが，この促進効果は抗aFGFの前処置で無効になる。海馬CA1領域ニューロンを脳虚血によって壊死させ

ると学習記憶は大きく障害されるから，CAIは記憶にとって重要な部位である。aFGFの記憶促進作用の原因を検索するため一つは電気生理学的ラット海馬薄片標本を用い，Schaffer側枝のテタヌス電気刺激によるCAI領域でのシナプス集合電位の長期増強(LTP)を測定した。aFGFをテタヌス20分前から灌流液に投与すると，用量・反応的にLTPは促進される。一方化学的に海馬にどのような遺伝子発現が起こるかを転写因子zif/268について測定した。グルコース投与で2時間後あるいはそのあとの学習によってもzif/268mRNAおよびzif/268RNAは変化しなかった。このことから記憶に関与する化学因子についてはまだ不明である。

(8) ウラシル誘導体の睡促進効果

本多和樹，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

ウリジン（睡眠促進物質SPSの1成分）の基本骨格であるウラシル環は催眠薬バルビタールの母核であるバルビルーツ酸ときわめて近い化学構造であることから，ウラシル誘導体が催眠効果を持つことが期待できる。そこで，新たに合成された2種類のウラシル誘導体1-amino-5-bromouracil (ABU) および1-amino-5-chlorouracil (ACU) をラットに経口投与あるいは脳室内連続注入して催眠効果を検討した。ACU (27.2mg) の経口投与で徐波睡眠 (SWS) 量は暗期開始後1時間に97.9%（$p<0.05$）増加した。これはSWSエピソードの持続時間が147.9%（$p<0.01$）増加したためである。この期間内には脳波のデルタ帯域成分 (0.5-3.0 Hz) が増加した。さらに逆説睡眠潜時が38.3%（$p<0.01$）の短縮となった。ABU (0.01, 0.1, 1.0 nmol) およびACU (0.1, 1.0 nmol) の脳室内連続注入ではほとんど催眠効果は検出されなかった。ウラシル誘導体に上記のような催眠活性があることから，新しい性質の睡眠薬に発展する可能性が示唆され，またその代謝あるいは作用機構が詳細に検討されれば，ヌクレオシド類による睡眠調節機構解明の一助となることが期待される。

(9) Vitamin B_{12} promotes sleep and prolongs the period of circadian temperature rhythm in freerunning rats

池田真行，本多和樹，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

In human patients with circadian rhythm sleep disorders, chronic administration of vitamin B_{12} (mecobalamine) may improve their desynchronized sleep-wake cycles. The central mechanism involved in this phenomenon remains unknown, although the circadian clock system appears to be

responsible for the inprovement. We previously reported that 10-h nocturnal intracerebroventricular (icv) infusion of 1-100 nmol vitamin B_{12} dose-dependently enhanced both slow wave sleep (SWS) and paradoxical sleep (PS), and modulated brain temperature (Tbr) for prolonged period in unrestrained rats under 12-h light and 12-h dark regimen (LD 12:12). In the present study, we further attempted to analyze the sleep and temperature modulatory activity of vitamin B_{12} using freerunning rats under continuous dim illuminatioin (dim LL). Animal conditions, the surgery for icv infusion and the recovery under LD were done according to our conventional manner. After 1 week for acclimation under dim LL (about 1 lux), vitamin B_{12} solution (30 nmol/90 μl) was infused in place of normal saline for 3 h at CT12 (activity onset, $n = 5$) or at CT24 (sleep onset, $n = 5$). Comparing to the previous control day, the vitamin B_{12} infusion at CT12 resulted in a long-term enhancement of both SWS and PS during consecutive subjective day (the mean hourly changes of SWS and PS were 5.31 ± 1.68 and 1.29 ± 0.63 min, $n = 5$; $p < 0.01$ and 0.05, respectively by paired t-test). The infusion at CT24, however, did not show such enhancement. Tbr showed a phasic reduction after the vitamin B_{12} administration at CT12. And its single administration at both CT12 and CT24 induced a significant prolongation of circadian Tbr rhythms up to 10 days (tau was changed from 24.51 ± 0.13 to 24.94 ± 0.26 h, $n = 7$; $p < 0.001$ by paired t-test). In conclusion, it was demonstrated that, similar to LD-entrained rats, freerunning sleep-wake and Tbr rhythms responded to vitamin B_{12} administration at active phase by increasing both SWS and PS along with modulating Tbr. It was also demonstrated that a 3-h vitamin B_{12} infusion prolonged the freerunning circadian period. These findings clearly indicate that vitamin B_{12} may affect the function of the circadian clock system via influences on sleep and the brain mechanism involved in these and other vitamin B_{12} induced responses.

(10) Neuronal activity in the brain of hibernating and non-hiberbnating animals

孫　久榮（北京大・理）

Three kinds of thermosensitive neurons (TSNs) in the preoptic area of hibernators and nonhibernators have been indentified in single unit study. However, the thermosensitivity (Ts) of TSNs and their cold tolerance (Ct) in different reports were not consistent. In this work, the characteristic of TSNs in preoptic tissue slices from ground squirrels (G.S., a hibernator) were examined by determining their individual firing rate in response to thermal shift (from 20-42 ℃ in the late spring to summer, and from 5-41 ℃ in winter) as compared with that of the rat (a nonhibernator). Sixty-five spontaneously firing neurons were recorded in the preoptic area of G.S.

in later spring to summer and classified according to Ts; 38% of TSNs were warm-sensitive (Ts > 0.8 Hz/s), 9% cold-sensitive (Ts, − 0.6 Hz/s), 51% thermo-insensitive and 2% cold-warm-sensitive. The firing partterns could be categorized as dense, sparse, outbreaking, cluster and disordered. The TSNs were distributed dispersively and extensively in the preoptic area. The Ct of TSNs was near 26℃. In rats, 58 TSNs were recorded in summer and winter. The percentage of warm, cold and cold-warm sensitive neurons were 36%, 7%, and 5%, respectively. The thermo-insensitive TSNs were 52%. Their Ct was 24 ℃ with no significant difference from that of G.S. Very interesting results were revealed from winter hibernating G.S.: the Ct of TSNs (24 neurons) decreased to 6 ℃, and the optimum temperature of TSN activity moved down and the percentage of cold-sensitive neurons increased by 21%, 42% and 37% in warm, cold-sensitive and thermo-insensitive neurons, respectivey. These profound changes suggested that the hibernator's TSNs were adapted to hibernating state.

(11) ゴールデンハムスターの冬眠発現時における脳内 DSIP 含量変化について

川上公子，中村明弘，塩見浩人（福山大・薬）

冬眠と徐波睡眠の間の密接な関連性が以前より示唆されている。本研究においては，内因性睡眠物質の一つであるデルタ睡眠誘発ペプチド(DSIP)について，その脳内各部位における含量が冬眠サイクル中に変化するか否かを検討した。実験動物としては，雌のゴールデンハムスターを用い，保冷庫中（5℃）で，LD サイクル8:16の環境で飼育した。ハムスターの冬眠は寒冷暴露後約40-80日で観察された。DSIP は，室温（25℃）飼育群，寒冷非冬眠の3群（冬眠未経験群，冬眠と冬眠の間で覚醒している群，冬眠を繰り返した後冬眠しなくなった群），冬眠群の5群より抽出した。その結果，冬眠サイクルを通して有意な変化が認められた部位は，延髄，線条体，視床下部，海馬の4部位で，大脳皮質，中脳，小脳においては有意な変化は認められなかった。冬眠サイクル中に特定の部位において DSIP 含量に変化が認められたことは，冬眠調節に脳内 DSIP が何らかの役割を果たしている可能性を示唆している。

(12) 日中の作業能率が体温リズムに与える影響

小林敏孝，荒川一成，斎藤泰彦（足利工大）

我々が普段仕事をしていると，午前中仕事に集中できる人と午後から夕刻にかけて集中できる

人がいる。このような仕事への集中度を覚醒の質的な変化として考え，この［覚醒の質］に関する精神生理学的な背景を検討するために，９名の健康な男子大学生（20-25才）に対して，昼間の精神作業の作業能率として１分間の単純加算演算数を30分毎に，代謝レベルの指標としての体温を24時間連続記録した。その結果，体温が最高値に達する直前の体温の上昇期に必ず作業能率が高くなった。これは作業能率として現れる覚醒の質的変化が体温の変化として現れる代謝レベルと密接に関係していることを示唆するものである。

13.「ギャップ結合の構造及び生理機能調節機構」

1993年2月8日－9日

代表者：柴田洋三郎（九州大・医・解剖学）

世話人：亘　　弘

(1) 培養成獣心筋におけるギャップ結合の形成および調節機構の研究

柴田洋三郎，波多江龍彦，岡山俊直，飯田　弘（九州大・医・第2解剖）

(2) ラット新生仔培養心房細胞の同期性拍動とギャップ結合

小山田正人，小山田ゆみ子，上林淑人，森　道夫（札幌医大・医・第2病理）

木村永一（同・薬理）

(3) 心筋ギャップ結合と興奮伝導

丸山　徹（九州大・医・第1内科）

(4) 不整脈における gap junction の意義

今永一成（福岡大・医・生理第1）

(5) 骨細胞のギャップ結合

明坂年隆，吉田寿穂（朝日大・歯・解剖第2）

(6) マウス果粒層細胞におけるギャップ結合の形態形成

渡辺　皓，外崎　昭（山形大・医・第1解剖）

小池数与（同・産婦人科）

(7) 腎尿細管上皮細胞におけるコネクシンの発現について

藤本　和（京都大・医・解剖）

(8) ヒト鼻，喉頭粘膜における connexin 43 の分布

宇佐美真一，朴沢二郎，新川秀一，松原　篤，藤田繁俊，一戸　学（弘前大・耳鼻咽喉科）

(9) コネクシン43遺伝子の転写と細胞間チャンネルの形成は CAMP によって調節されている

山本正夫，片岡勝子（広島大・医・解剖）

P. P .Metha, B. Rose (Dept. Physiol.& Biopys., Univ. Miami Sch. Med.)

(10) 細胞増殖因子による細胞膜運動 (membrane ruffling) 誘導とその解析

榎本　平，朝比奈宏（神戸大・医・放基医）

綾木　仁（京都大・放生研）

浅野有紀（大阪大・微研）

(11) 退縮型ラット乳癌細胞の悪性化に伴う細胞間連絡能の変化

武市紀年，浜田淳一（北海道大・医・癌研細胞制御）

永易裕樹，任　　進（同・病理）

(12) アンドロゲンによる脊髄運動ニューロンのギャップ結合蛋白 mRNA の発現調節

松本　明（順天堂大・医・第２解剖）

(13) 網膜アマクリン細胞間のカップリング

日高　聡，前原通代，橋本葉子（東京女子医大・第１生理）

海野　修（東邦大・理・情報科学）

(14) ラット耳下腺の蛍光色素カルセインとアミラーゼ分泌におけるギャップ結合の関与

杉田　誠，柴　芳樹，菅野義信（広島大・歯・口腔生理）

(15) 肝発癌抑制物質 2,4-diamino-6-(2,5-dichlorophenyl)-s-triazine maleate のコネクシン26への修飾効果

杉江茂幸，吉見直巳，岡本清尚，田中卓二，森　秀樹（岐阜大・医・病理）

(16) ラット肝臓における DDT の細胞間連絡阻害作用の経時的変化について

立野知世，田中三菜，伊藤聖一，吉武　彬（住友化学工業㈱．生物環境科学研）

(17) 慢性四塩化炭素肝障害における肝ギャップ結合の変動

仲田　裕，岩井　将，嶋津　孝（愛媛大・医・生化学第１）

【討論参加者】

○柴田洋三郎，倉岡晃夫，岡山俊直（九州大・医），武市紀年，浜田淳一（北大・医），小山田正人，小山田ゆみ子（札幌医大），宇佐美真一（弘前大・医），渡辺　皓，小池数与，酒井伸嘉（山形大・医），平光　司，中村裕昭（埼玉医大），村松　敬（東京歯大・歯），峯　徹哉（東大・医），大草敏史（東京医歯大・医），松本　明（順天堂大・医），橋本葉子，日高　聡（東京女子医大），太田英彦（杏林大・医），杉江茂幸，岡本清尚（岐阜大・医），明坂年隆（朝日大・医），小川和朗，藤本　和（京都大・医），伏木信次，西村裕美（京都府立医大・脳血管系老化研），上田房雄，三村清隆（日本新薬・中央研），立野知世，田中三菜（住友化学工業），菅野義信（広島大・歯），柴　芳樹，杉田　誠，片岡勝子，森野恵理，山本正夫，張　　文，岩井　将，仲田　裕（愛媛大・医），矢田俊彦（鹿児島大・医），榎本　平（神戸大・医），藤倉義久（山口大・医），津志本元（大塚製薬・徳島研），宮地栄一（藤田保衛大・医），今永一成（福岡大・医），丸山　徹（九州大・医），児玉隆治（基生研），亘　　弘（生理研）

【研究会概要】

隣接する細胞間で親水性チャンネルを形成するギャップ結合は，ほとんどの動物組織に存在し，分子量約1,000以下の生理活性物質やイオンの交流を行い，細胞社会における機能的・代謝的な協調や組織・細胞の増殖・分化に密接に関与している。このチャンエルの構造は，膜蛋白質コネキシン6個が隣接細胞の表面膜間で対合しており，コネキシン蛋白の分離精製およびクローニングの結果，組織特異性を示す分子ファミリーからなることが判明している。またチャンネル開閉には，細胞内 Ca^{2+}，ph，cAMP，膜電位をはじめ，TPA，c-Kinase，癌遺伝子，カルモジュリン，低

級アルコールなどによる制御が知られている。

ギャップ結合の研究は，電位測定，色素拡散など生理学領域，電顕的微細構造や免疫染色など形態学領域，構成蛋白の分離・精製など生化学領域さらにはクローニングなど，これまでさまざまな研究領域において個々に研究が進められてきた。本研究会では，これら各分野での研究者が一堂に会して研究発表を行ない，ギャップ結合を制御する因子がどのような機構によってその構造と生理機能を調節しているかに焦点をあてて，各領域のわくを越えた幅広い検論を行なった。さらにギャップ結合の生物学的意義に関しての統合的な理解と解明を目指した。

(1) 培養成獣心筋におけるギャップ結合の形成および調節機構の研究

柴田洋三郎，波多江龍彦，岡山俊直，飯田　弘（九州大・医・第２解剖）

成獣ラット心房筋細胞を，コラゲナーゼ消化によって単離し，10％ウシ胎児血清と，チトシンアラビノシドを加えたM119培養液で培養した。この系では心房筋細胞は３－４日目から自律的収縮を示しはじめ，５－７日で周囲の細胞と接着して同期した律動的拍動を呈する。この培養系において①刺激伝達が生じ同調収縮が開始する前後での，ギャップ結合の発達状態を凍結割断レプリカにより，電子顕微鏡観察した。３～４日目で未だ同調収縮を認めない時期でも，心房筋細胞間の突起が接着した部位に５～10個程の小さなギャップ結合粒子の集合斑が散在性に分布した。ついで線上や帯状の非定型的なギャップ結合形態を示すものが出現し，７日目までに粒子が密集した典型的な粒子集合斑が完成した。②培養心房筋をＣ×43の抗体で蛍光標識した。標識は２日目には細胞質内に認め，４日目には細胞表面に局在を示した。細胞外領域の抗体は８Ｍ－尿素処理によって細胞接着を開裂した場合のみ対応する両細胞表面が標識された。③Scrape-loading法により，培養７日目の心房筋細胞に対する各種薬剤のギャップ結合伝達に及ぼす影響を検討した。低カルシウム外液下では７－９細胞列以上の色素伝幡を認めた。1mM Octanol ２分処理後には１－２細胞列にまで色素伝幡が抑制された。この処理細胞を凍結割断レプリカ観察すると，ギャップ結合周囲の細胞膜に波状縞模様の出現が認められ，Octanalが膜に浸潤してチャンネル構造に直接の変化が生じることを示唆した。

(2) ラット新生仔培養心筋細胞の同期性拍動とギャップ結合

小山田正人，小山田ゆみ子，上林淑人，森　道夫（札幌医大・医・第二病理）
木村永一（同・薬理）

心臓は，全ての心室の心筋細胞が同期的に拍動し，ポンプとしての役割を果たしている。同期性の保持は心筋細胞間に存在するギャップ結合が重要な役割を果たしていると考えられているが，直接の証明はされていない。今回われわれは，新生仔ラットより心筋細胞を酵素処理で分離し初代培養を行ない，Cx43 の発現，局在（ノーザンブロット，免疫染色）を，ギャップ結合細胞間コミュニケーション能 (GJIC) Ca^{2+} の動態（共焦点顕微鏡による Fluo-3 の観察）を解析し，同期性拍動におけるギャップ結合の役割を明らかにしようと試みた。

培養心筋細胞の自動拍動は，培養 3 日目から 7 日目に拍動数が増加し，非同期性拍動が同期性拍動へ変化した。Cx43mRNA の発現は，培養初期よりみられたが，免疫染色によるコネクシン蛋白の局在は，主に 5 日目では細胞質内，7 日目では心筋細胞間の細胞膜上にスポットとして見られた。GJIC は，培養時間とともに増加し，同期拍動している心筋細胞間では，Ca^{2+} の増減も同期していた。

(3) 心筋ギャップ結合と興奮伝導

丸山　徹（九州大・第 1 内科）

心筋細胞間のギャップ結合は，電気的興奮伝導および細胞間の物質交換に重要である。心筋虚血時には細胞内 Ca^{2+} ハンドリング異常，組織アシドーシス，ATP の枯渇がギャップ結合の抑制 (uncoupling) をひきおこし，興奮伝導遅延，ひいては虚血時の不整脈の発生素地となる。今回モルモット右室乳頭筋の表面灌流標本で虚血類似状態（酸素分圧 20mmHg, pH = 6.5, K^{+} 濃度 9.0mM, グルコース無添加）を作成し，細胞内 Ca^{2+} ハンドリングを修飾する薬剤 (BAY K 8644, ryanodine) が虚血類似状態における uncoupling および興奮伝導遅延に及ぼす効果を検討した。BAY K8644 は uncopling と興奮伝導遅延を促進し，ryanodine は逆にこれらを抑制したことより，虚血類似状態における細胞内 Ca^{2+} の蓄積が uncoupling をひきおこし，これが興奮伝導遅延に関与すると考えられた。

(4) 不整脈における gap junction の意義

今永一成（福岡大・医・生理学第１）

心臓における不整脈発生には，自動能亢進と興奮伝導障害が関与している。伝導障害に起因する re-entry が，どれ程の範囲の細胞間干渉で起こり得るかは興味深い問題である。今回，家兎右心室 Purkinje 線維の aconitine 誘発膜電位変化への heptanol の影響からこの問題を検討した。

aconitine (10^{-6}M) により規則正しい振幅，放電間隔をもつ高頻度自発放電を示す flutter が，つづいて脱分離を伴う不規則な振幅，放電間隔を特徴とする fibrillation が出現した。heptanol (3～5mM) により，flutter を示す細胞は一過性に fibrillation に移行するものの直ちに flutter に変化した。また fibrillation を示す細胞は flutter に移行した。fibrillation 時，約 300 μm 離れた細胞間でも相互の干渉が認められ，heptanol 誘発 flutter では夫々の細胞独自の興奮のみで細胞間干渉は全く認められなかった。

これらのことにより，fibrillation 時には，きわめて局所の細胞間においても gap junction を介する相互干渉による re-entry 現象が発生していることが示唆された。

(5) 骨細胞のギャップ結合

明坂年隆，吉田寿穂（朝日大・歯・解剖第２）

骨細胞におけるギャップ結合の超微構造について検索した。骨組織のうち石灰化基質は通常造骨細胞に取り囲まれ基質中に埋め込まれた骨細胞とは突起でつながっており骨細胞のネットワークを作っている。隣接する造骨細胞相互，骨細胞と造骨細胞間では突起にギャップ結合が存在し，凍結レプリカでは種々の大きさのギャップ結合が明らかとなった。造骨細胞相互が骨形成のみならず破骨細胞性骨吸収に深く関わっていることが理解されるようになってきた。骨のリモデリングとは骨吸収と骨形成がカップリングして起こることをさし，破骨細胞性骨吸収後の骨形成細胞の骨面への再付着は造骨細胞でのギャップ結合の消失と再生が骨のリモデリングと対応していることを示している。一方，骨吸収細胞である破骨細胞とそれ以外の細胞との結合が存在するかどうか未解決の問題であった。急速凍結後に観察される破骨細胞と周辺細胞間結合の存在は破骨細胞を含めたすべての骨細胞が一連の骨組織の動的平衡に関わることを示唆している。

(6) マウス果粒層細胞におけるギャップ結合の形態形成

渡辺　皓，外崎　昭（山形大・医・第1解剖）
小池数与（同・産婦人科）

卵胞の成熟にともない，著しい形態変動を示す果粒層細胞のギャップ結合(GJ)に注目し，その形態形成について免疫電顕法および凍結割断レプリカ法による観察を試みた。

一般にGJの形成初期には，formation plaque (FP)とよばれる10-11 nmの大型膜内粒子の集合を伴う場合と，tight junction様構造を伴う場合が知られているが，マウス果粒層細胞では上皮性であるにも関わらず，前者のみが観察された。FPに対応する超薄切片像として，5-10nmの狭い間隙をもつ特殊なpuncta adherentiaが最も相応しい構造と考えられる。しかし，この領域には，GJにみられたようなコネクシン43抗体に対する反応が認められなかった。

これらの結果をもとに，FPに特異的な大型膜内粒子が，GJの形態形成に果たす役割について考察を行う。

(7) 腎尿細管上皮細胞におけるコネクシンの発現について

藤本　和（京都大・医・解剖）

成獣マウス腎の尿細管上皮細胞におけるギャップ結合蛋白コネクシン(Cx)の発現ならびに胎生あるいは新生仔腎におけるネフロン形成に伴うCxの動態を免疫組織化学的に検討した。成獣腎では，Cx26, Cx32とCx43が発現している。Cx32は近位尿細管上皮細胞に局在しているのに対して，Cx43は主としてヘンレのわな細い部を含む遠位尿細管上皮細胞に発現していた。Cx26は尿細管全域の上皮細胞に広く分布していた。胎生15日令の腎において細管様構造は形成されているが，それらを構成する細胞にはCxの発現は認められなかった。胎生18日令になると，ある程度の尿細管の機能的な分化が明瞭になり，一部の尿細管上皮細胞にNa-K-ATPase活性が検出されるようになり，この酵素活性を持つ細胞においてはCx43の発現が認められた。これらの所見は，尿細管上皮各部におけるCx局在の多様性は尿細管各部の生理的機能やその発現に密接に関係している可能性を示唆している。また，本研究会では腎におけるCxとカドヘリンとの関連性についても報告する。

(8) ヒト鼻，喉頭粘膜における connexin 43 の分布

宇佐美真一，朴沢二郎，新川秀一，松原　篤，藤田繁俊，一戸　学（弘前大・耳鼻咽喉科）

手術時に採取したヒト鼻，喉頭粘膜における connexin 43 の分布を免疫組織化学的に検討した結果，鼻粘膜において基底細胞に，また喉頭粘膜では重層扁平上皮の基底層，有棘細胞層に陽性反応が認められた。これらの部位の細胞間には斑点状の connexin 43 陽性反応が分布し細胞間のコミュニケーションが存在する可能性が示唆された。上気道粘膜はつねに外界からの刺激を受け，それに対応していると考えられているが，今回上気道粘膜において粘膜上皮の新生，再生に関与すると考えられている基底側の細胞間に connexin 43 の陽性反応が認められたことは興味ある所見と思われた。

(9) コネクシン43遺伝子の転写と細胞間チャンネルの形成は cAMP によって調節されている

山本正夫，片岡勝子（広島大・医・解剖）
P. P. Metha, B. Rose （Dept. Physiol. & Biophys., Univ. Miami Sch. Med.）

コネクシン43の mRNA 量 (43R) を northern blot により比較観察し，cAMP の効果を調べた。MHcell は通常 43R は極めて少なく，cell couplin (CC) も持たないが，Forskolin (FK) 投与下 43R は刺激直後から増加し始め，数時間後最大となり，以後減少した。一方 CC は数時間まで増加を続け，最大となり，以後ゆっくりと減少した。この様な効果は db-cAMP (Db) Ro, Ro + Db, Ro + FK でも同様であったが，Db, Ro では CC の増加は弱く，Dideoxyforskolin では 43R, CC とも増加しなかった。Dot blot analysi は control, Ro, Db + FK 投与下極めて低い数値を示し，FK, Db, 8Br-cAMP は control の30−40倍，さらに Ro を加えると50−60倍の高い数値を示した。したがって cAMP が C × 43 gene からの mRNA の生産を増加させ，さらに Posttranslational な過程でも Phospholylation を介して，Cell coupling 調整している可能性があると考えられる。

(10) 細胞増殖因子による細胞膜運動 (membrane ruffling) 誘導とその解析

榎本　平，朝比奈宏（神戸大・医・放基医）
綾木　仁（京都大・放生研）
浅野有紀，榎本　平（大阪大・微研）

細胞膜運動は，形態形成や癌転移において重要な役割を果しているが，この膜運動を司る機構は解明されていない。細胞運動の初期反応の一つである Membrane Ruffling の促進及び抑制の機構，特に膜運動に連なるシグナル伝達を解明する手がかりを得るため，Balb/c3T3 細胞を親株として，これを UV 照射し各種の増殖因子によって Membrane Ruffling が誘導される変異株 Balb/c3T3TR4 を分離した。

TR4 細胞では，調べた10種の増殖因子の内 PDGF, Insulin, IGF-I, II, 及び FGFa, b で顕著な Membrane Ruffling の誘導がみられた。一方，親株ではどの因子でも Ruffling 等の誘導は見られなかった。融合細胞はすべて親株の形質を示した。又、PDGF の受容体に有意な差はなかった。これらの結果から，TR4 では増殖因子による膜運動誘導に抑制的に働く因子に劣性変異が生じていると考えられる。

(11) 退縮型ラット乳癌細胞の悪性化に伴う細胞間連絡能の変化

武市紀年，浜田淳一（北海道大・医・癌研細胞制御）
永易裕樹，任　　進（同・病理）

我々の開発したラット乳癌の *in vivo* における悪性化モデルを用い，癌の悪性化に伴う癌細胞の細胞間連絡能の変化を検討した。ラット乳癌由来の ER-1 細胞は低腫瘍原性・低転移性であるが，この細胞をプラスチック・プレートに付着させ，同系ラットに移植し，生じた腫瘍の培養株 ERpP 細胞は，高い腫瘍原性ならびに転移能を示した。さらに ERPP 細胞の *in vitro* における浸潤能，遊走能ならびに軟寒天培地中での増殖能も ER-1 細胞のおそれらに比べ高かった。Lucifer yellow CH を用いた色素移行法によって細胞間連絡を測定したところ，ERpP 細胞の細胞間連絡能は ER-1 細胞のそれに比べ有意に低いことが明らかとなった。ER-1 細胞の悪性化は EGF や TGF-beta などによっても引き起こされることから，現在これらの増殖因子の ER-1 細胞の細胞間連絡能に対する影響についても検索している。

(12) アンドロゲンによる脊髄運動ニューロンのギャップ結合蛋白 mRNA の発現調節

松本　明（順天堂大・医・第2解剖）

ギャップ結合は隣接する2つのニューロン間のコミュニケーションや電気活動の同期化に重要な役割を果たしていると考えられている。雄ラット腰髄の球海綿体脊髄核 (SNB) の運動ニューロンはアンドロゲン感受性ニューロンで，この運動ニューロン間のギャップ結合の大きさや出現頻度は血中アンドロゲン量に依存して可塑的に変化する。コネクシン32の mRNA に対する相補性 DNA （ハーバード大・ Goodenough 博士提供）を用いたインサイチュ・ハイブリダイゼンション法によって，SAB 運動ニューロンのギャップ結合蛋白の mRNA の発現を調べた。ハイブリダイゼイションの特異的なシグナルは SNB 運動ニューロンの細胞体や近位樹状突起に局在して検出された。その発現量は血中アンドロゲン量に依存して変化することが判った。

(13) 網膜アマクリン細胞間のカップリング

日高　聡，前原通代，橋本葉子（東京女子医大・第1生理）
海野　修（東邦大・理・情報科学）

網膜内のギャップ結合による神経細胞間連絡は主に側状に広がるニューロンで知られている。網膜外層の水平細胞は各々の型の間でお互いにギャップ結合によって電気的に連結している。魚類アマクリン細胞は刺激光に対して樹状突起野を越える受容野中心部を形成するが，これまでに一部のアマクリン細胞が通電実験やルシファー黄 (M.W = 457) の注入の結果から電気的カップリングを形成していると報告された。本研究はアマクリン細胞のギャップ結合による連結と受容野形成を調べるために，光応答特性を解析したコイ科ウグイのアマクリン細胞にルシファー黄と同時に低分子量トレーサー，biocytin (M.W = 372) を注入した。光応答で同定したアマクリン細胞では，色素カップリングは一定しては観察されなかったが，starburst 細胞以外の全ての実験例で同一形態の細胞とトレーサーカップリングの形成が認められた。電顕解析からカップリングを形成した細胞の樹状突起間の接触部位にギャップ結合を確認した。以上より，今回解析を行った網膜アマクリン細胞は内網状層で同一形態のものとお互いにギャップ結合によって連結していることが分かった。

(14) ラット耳下腺の蛍光色素カルセインと アミラーゼ分泌におけるギャップ結合の関与

杉田　誠，柴　芳樹，菅野義信（広島大・歯・口腔生理）

ラット耳下腺ではmuscarinic刺激やα-adrenergicにより電解質移動がおこり，水が分泌され，β-adrenergic刺激でアミラーゼ開口分泌する。ラット耳下腺の分離腺房細胞内に取り込ませた蛍光色素カルセインは，muscarinic刺激やα-adrenergic刺激により排出する。カルセインはカルシウムイオノフォアのA23187刺激によっても排出し，細胞内カルシュウム濃度上昇を介し電解質輸送が起こり，それに伴い排出されると考えられる。ギャップ結合の機能する分離腺房と機能しない単一腺房細胞においてカルセインの排出を比較すると，カルバコールやノルアドレナリン刺激で単一腺房細胞のほうがカルセイン排出量が多い．またA-23187刺激でも単一腺房細胞のほうが反応性が高いため，細胞内カルシウム濃度上昇の次の過程での，ギャップ結合を介する抑制性調節機構の存在が示唆された。一方，アミラーゼ分泌は単一腺房細胞よりも腺房において分泌量が多く，ギャップ結合を介する促進性の情報伝達機構の存在が考えられた。

(15) 肝発癌抑制物質 2, 4-diamino-6-(2, 5-dichlorophenyl)-s-triazine maleate の コネクシン26への修飾効果

杉江茂幸，吉見直己，岡本清尚，田中卓二，森　秀樹（岐阜大・医・病理）

Interellular communicationを促進することが報告されている。2,4-diamino-6-(2,5-dichlorophenyl)-s-triazine maleate (DDSTM) がsuppressing agentとして肝発癌を抑制することを見いだした。その機序として肝発癌過程におけるgap junctionの変化並びにDDSTMによるgap junctionの修飾作用についてこれまでコネクシン32及びコネクシン43について免疫組織化学的手法を主として用いて検索し，DDSTMによってその増加や発現を見いだしてきた。今回コネクシン26について，DDSTM及びphenobarbital (PB) 投与によるラット肝における変化を免疫組織化学的手法を用いて検索した。正常肝では，既に報告されているごとく門脈周辺を中心に染色性を捕らえることができたが，DDSTM及びPB投与肝では染色性の強弱は少々見られるものの共に部位による差が消失する傾向にあり，顕著な差異は認められなかった。このことからDDSTMによる主たるgap junctionの増加はコネクシン32によるものと示唆された。

⑯ ラット肝臓における DDT の細胞間連絡阻害作用の経時的変化について

立野知世，田中三菜，伊藤聖一，吉武　彬（住友化学工業㈱・生物環境科学研）

前回，肝発癌プロモーターである DDT を 2 週間連続経口投与したラット肝臓において，細胞間連絡阻害および connexin 32 (Cx32) の発現の減少が用量相関的に認められたことを報告した。今回，DDT をラットに連続経口投与し，0，1，2，4，6 週目における細胞間連絡の機能と Cx32 の発現様式について，in vivo/in vitro 色素注入法と，C ×32抗体の蛍光抗体染色により調べた。

その結果，DDT を投与したラット肝臓においては，投与後 1 週間で最も顕著な細胞間連絡阻害が認められ，6 週ではほぼ回復していた。一方，細胞 1 個あたりの Cx32 蛋白の蛍光スポット数は対照群と比較して殆ど変化は見られなかったが，スポット小型化が 4，6 週で観察された。また，Cx26 の蛍光抗体染色および Cx32 の Northern Blot および Western Blot の結果についても報告する。

⑰ 慢性四塩化炭素肝障害における肝ギャップ結合の変動

仲田　裕，岩井　将，嶋津　孝（愛媛大・医・生化学第 1）

ラットに四塩化炭素を投与して実験的慢性肝障害を作成し，肝細胞間ギャップ結合の変化を調べた。四塩化炭素 0.5ml/kg をラットに皮下投与した後，肝コネクシン32の量的変化をウエスタンーブロット法で測定すると，単回投与では，有意な変化は見られなかった。同量の四塩化炭素を週 2 回の割合で12週間投与すると，肝の線維化が促進し肝硬変の形態を示す。四塩化炭素最終投与の後，血漿 GPT 活性が正常値付近まで回復し急性肝障害の影響が除かれたと考えられる12日目のラット肝コネクシン32含量を測定すると，対照群の30％にまで低下していることが判明した。蛍光抗体を用いた免疫組織染色においても，慢性肝障害の肝細胞ではコネクシン32の特異蛍光斑の減少が認められた。これらの実験結果から，慢性肝障害においては，ギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションが低下していることが推測される。

14.「分泌反応の細胞内シグナル」

1992年11月12日－13日
代表者　小林　繁
世話人　菅野富夫，葉原芳昭

(1)　副腎髄質の抹消性グリア細胞
飯野　哲，小林　繁（名古屋大・解剖）

(2)　神経細胞膜に存在する新しいカルモジュリン結合蛋白質
前川昌平（東京大・生物化学）
中村　俊（国立精神神経センター・神経研）

(3)　シンプトタグミンのアイソフォームの性質と脳内局在
高橋正身，笠井陽子，伊藤朋子（三菱生命研）

(4)　シナプトタグミン及びωコノトキシン受容体と複合体を形成する35kDaタンパク質の分子構造
吉田　明，於保　力，高橋正身（三菱生命研）

(5)　エキソサイトーシスと細胞内Ca^{2+}信号の同時ビデオ観察
寺川　進（生理研）

(6)　培養ラット交感神経細胞間に形成されるシナプスでの伝達物質の放出
持田澄子，小林春雄（東京医大・生理）

(7)　開口放出の分子機構：Ca^{2+}効率がどう調節されるか？
熊倉鴻之助（上智大・生命研）

(8)　クロム親和細胞のアミン取り込みと神経およびステロイドホルモン
平野鉄雄（新潟大・生理）

(9)　PC-12細胞を使ったCO-CULTUREの可能性
遠藤泰久（京都工繊大・応用生物）

(10)　プロトオンコジーンtrkA産物のチロシン燐酸化
畠中　寛，山田雅司（大阪大・蛋白研）

(11)　分泌刺激に共役した非リン酸化
杉谷博士（日大松戸・歯・生理）

(12)　中枢ニューロンにおけるATP量とNaポンプアイソフォーム活性
井上順雄（横浜市大・生化）

⑬ 副腎髄質細胞の Ca^{2+} 調節機能

藁科　彬，山口賢一（新潟大・生理）
葉原芳昭（生理研）
菅野富夫（北海道大・生理研）

⑭ ATP 受容体とドーパミン受容体のクロストーク

井上和秀（国立衛生試験所・薬理）

⑮ 伝達物質分泌のアデノシンによる調節：海馬シナプス可塑性における役割

黒田洋一郎，関野裕子（東京都・神経研）

【討論参加者】

小林　繁，飯野　哲，前川昌平，高橋正身，吉田　明，寺川　進，持田澄子，小林春雄，熊倉鴻之助，平野鉄雄，遠藤泰久，畠中　寛，杉谷博士，井上順雄，藁科　彬，井上和秀，黒田洋一郎，菅野富夫，浜　　清，葉原芳昭，山岸俊一

「分泌反応の細胞内シグナル」

ニューロン・パラニューロンの刺激・放出連関におけるカルシウムと調節因子について，分子生物学的に究明するための情報交換を行なった。副腎クロム親和細胞を材料にして行なわれた研究が主流である。形態学的にはグリア細胞の重要性が強調された。新しいカルモジュリン結合蛋白質やシナプトタグミンおよびωコノトキシン受容体と複合体を形成する蛋白質の報告があった。「開口放出の分子機構がどこまで解明されたか。」が中心テーマとなったが，これについては細胞内 Ca^{2+} 信号との同時ビデオ観察の紹介や諸種の Ca^{2+} 阻害剤との関連を調べた電気生理学的研究が紹介された。ドパミン輸送体の存在とその神経性・液性調節を解明する研究もあった。

中枢ニューロンや交感神経節を材料にして行なわれた研究結果は，副腎クロム親和細胞の場合と比較しながら討論された。刺激・放出連関の分子機構，特にその細胞内シグナルはすべてのニューロン・パラニューロン系に共通のものが多いと予想される。この意味で，形態学，生化学，薬理学等で専門を異にする広い分野の研究者の集会は有効であった。

(1) 副腎髄質の抹消性グリア細胞

飯野　哲，小林　繁（名古屋大）

副腎髄質の抹消性グリア細胞であるシュワン細胞（髄質内に進入する神経を包む）と支持細胞（クロム親和細胞を取り囲む）を抗 S-100 蛋白質抗体と電子顕微鏡を用いて観察した。

マウス副腎髄質における S-100 蛋白質の免疫活性はシュワン細胞と支持細胞に検出できた。

シュワン細胞は多くの神経線維を束ねているが，その先では支持細胞に移行するように見える。１つの支持細胞は数個のクロム親和細胞を細長い細胞質の突起を延ばして囲む。一部のクロム親和細胞が支持細胞に囲まれていた。シュワン細胞と支持細胞がまとまって網目を作りクロム親和細胞の集団を取り囲んでいる所も見られた。カテコールアミンの蛍光組織化学と対比するとノルアドレナリン細胞の集団にS-100蛋白質陽性細胞が密な傾向があった。電顕的にはシュワン細胞は神経線維を包み基底膜で被われクロム親和細胞には接しない。支持細胞はクロム親和細胞を直接に取り囲み，その突起は神経線維や神経終末部も同時に取り囲んでいた。

以上からマウス副腎髄質ではシュワン細胞と支持細胞は移行しつつ共に神経線維を包むという点で共通性を持つ抹消性グリア細胞である。シュワン細胞は神経線維のみを包むが支持細胞は神経線維と共にクロム親和細胞を包み込む性質を持っている。

(2) 神経細胞膜に存在する新しいカルモジュリン結合蛋白質

前川昌平（東京大）
中村　俊（国立精神神経センター）

【目的】

神経成長円錐は細胞内外からの情報が神経突起の伸長・退縮，シナプス形成等に変換される部位であり高い運動性や分泌活動が観察されている。こういった活動の分子機構を知る為にこの部位の細胞膜裏打ち蛋白質を検索した結果神経系に特異的と思われる酸性蛋白質を見いだした。

【結果】

ラット脳成長円錐画分の不溶性画分の２次元電気泳動によりこの画分には多量のチューブリンの他に未知の酸性蛋白質が濃縮されていることがわかった。この蛋白質を精製してみるとカルシウム依存的にカルモジュリンと結合すること，SDS-PAGEで得られるみかけの分子量がアクリルアミドの濃度によって変化すること，2.5%過塩素酸処理や熱水処理によっても沈澱しない事等が分かった。これらは細胞内のＣ－キナーゼ基質と考えられているMARCKSとよく似た性質である。しかしながら部分ペプチド配列及びcDNAクローニングの結果はこの蛋白質が既知のものではない事を示している。クローニングの結果はまたこの蛋白質が極めて高い親水性を持つこと，アラニン含量が異様に高いこと，Ｎ端がミリスチル化されうること，高次構造をとりづらいこと等を明らかにした。抗体による解析の結果はこの蛋白質が神経組織以外では検知されないこと，神経細胞内では成長円錐のみならず細胞体や樹状突起，軸索にも存在すること等を示した。

(3) シナプトタグミンのアイソフォームの性質と脳内局在

高橋正身，笠井陽子，伊藤朋子（三菱生命研）

シナプトタグミン (stg) はシナプス小胞膜やシナプス前膜に局在する膜蛋白質で，その分子構造中にCキナーゼの活性制御ドメインであるC2部位と相同な繰り返し構造を持ち，Caイオンや燐脂質を結合する。我々は神経伝達物質の遊離を制御しているN型Caチャンネル（ωコノトキシン受容体）がstgと結合することを見いだし，この蛋白質が刺激分泌連関で重要な働きをしている可能性を示した。遺伝子解析の結果ラットでは異なる遺伝子でコードされる2種類のstg (stg-1, stg-2) が発現していることが示されている。今回我々は2種のアイソフォームを区別する抗ペプチド抗体を用いてそれらの分布，性質について検討を加えた。イムノブロットの結果stg-1は大脳，小脳，副腎などで発現していた。それに対してstg-2の含量は小脳で最も高く副腎では認められなかった。抗stg-2抗体で小脳を免疫染色するとstg-1と同様分子層，顆粒層が染色された。一方海馬においては抗stg-2抗体はstg-1とは異なる部域を染色した。

抗stg-2抗体は可溶化し^{125}I-ωCgTXで標識した小脳のωコノトキシン受容体を用量依存的に免疫沈降した。以上の結果はstg-1とstg-2は共にωコノトキシン受容体と相互作用を持って機能しているが神経系で異なった分布をしている事が明かとなった。

(4) シナプトタグミン及びωコノトキシン受容体と複合体を形成する35kDaタンパク質の分子構造

吉田　明，於保　力，高橋正身（三菱生命研）

【目的】

シナプス部位における非常に速い神経伝達物質の放出には，シナプス終末におけるCa流入部位いわゆるアクティブゾーンの近傍にシナプス小胞が予め準備されていることが必要であると考えられている。そこで我々は，このアクティブゾーンに存在すると考えられるCaチャンネルであるωコノトキシン受容体と結合するタンパク質を除去するため，ωコノトキシン受容体を免疫沈降するモノクローナル抗体を作成し，その抗原分子について検討を行った。

【結果】

ラット脳ωコノトキシン受容体を約40％免疫沈降でき，SDS-PAGE上で35kDの分子量を示すタンパク質 (p35) を認識するモノクローナル抗体を得た。ωコノトキシン結合タンパク質の1つであるシナプトタグミン (P65) に対するモノクローナル抗体1D12も約40％のωコノトキシン受容体を免疫沈降するが，この両者の抗体の免疫沈降活性には相加性がみられなかった。また，脳

の膜タンパク質を可溶化した後，それぞれの抗体で免疫沈降を行った沈降物中にはp35，及びシナプトタグミンの存在することが確認された。以上の結果は，ωコノトキシン受容体とp35とシナプトタグミンが複合体を形成していることを示している。p35の脳内での局在を免疫組織染色を行い検討したところ，シナプトフィジンやシナプトタグミンとよく似た分布を示し，シナプス部位に多く存在していることがうかがわれた。この抗体を用いラット大脳のcDNAライブラリーをスクリーニングし，p35をコードするcDNAをクローニングした。予想されるアミノ酸配列から，このp35は上皮の形態形成の誘導に関わるエピモルフィンと非常に類似したタンパク質であることが示された。

(5) エキソサイトーシスと細胞内Ca信号の同時ビデオ観察

寺川　進（生理研）

倒立顕微鏡の光学系の一部を改造し，1万倍以上の超高倍率でノマルスキー微分干渉像と紫外励起蛍光像とを完全同時に別々のビデオ画像処理系で観察するのに成功した。これによって，分泌顆粒のエキソサイトーシス反応とfura-2をロードした細胞の蛍光像を同時観察できるようになった。ウサギの好中球の貪食作用に伴うエキソサイトーシスでは，初め細胞全体にCa信号が生じ，すぐそれが食胞近傍に限局するようになる。エキソサイトーシスはこのCa信号限局部位に一致して起こるのがわかった（広島大・須崎，升島との共同研究）。ウシ副腎髄質のクロマフィン細胞では電気刺激に応じて速いCa信号が生じ，その持続とエキソサイトーシスの反応はほぼ平行して起こった。神経型に分化した標本のひとつの終末が隣接細胞と接着してシナプス様の構造をつくっているところで観察すると，終末のCa信号に伴って接着部近辺にエキソサイトーシスが観察でき，これに続いて隣接細胞のCa信号が生じるのが観察できた。これによって初めて，信号伝達の証明できたシナプスでのエキソサイトーシスの可視化が確認できた（上智大・熊倉との共同研究）。

(6) 培養ラット交感神経細胞間に形成されるシナプスでの伝達物質の放出

持田澄子，小林春雄（東京医大）

【目的】

神経終末からの神経伝達物質の放出制御因子として多くの蛋白が同定されているが，その分子機能の詳細は不明なものが多い。最近，血小板からのヒスタミン放出，副腎髄質からのカテコー

ルアミン放出へのミオシン軽鎖キナーゼの関わりが示され，神経伝達物質の放出制御因子として働く可能性のあるミオシンの機能解析を試みた。

【材料及び方法】

培養下で形成されるラット上頚交感神経節細胞間シナプスでは，アセチルコリンが伝達物質として放出されるが，細胞体が大きく，隣接する細胞に短い神経突起を伸ばしてシナプスをつくるため，シナプス前細胞体に注入した物質のターミナルでの伝達物質放出への効果を，シナプス応答の変化として容易に観察できる。

【結果及び考察】

培養3～4週間でミオシン抗体はシナプス形成部（synaptophysin 認識部）にミオシンを認識する。シナプス前細胞に注入したミオシン軽鎖キナーゼの特異的阻害剤 (wortmannin), 疑似基質インヒビター (SM-1), ミオシン抗体は濃度に依存した放出抑制を示したことから，ミオシンは神経伝達物質放出にも関与する放出機構に共通した鍵蛋白（放出制御因子）であることが窺われる。

(7) 開口放出の分子機構：Ca^{2+}効率がどう調節されるか

熊倉鴻之助（上智大）

神経終末やクロム親和細胞からの開口放出による伝達物質放出は，細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がトリガーとなる。Ca^{2+} が開口放出を引き起こす分子機構には不明な点が多く残されているが，Ca^{2+} が最終的に開口を引き起こす効率，即ち「開口放出機構の Ca^{2+} 親和性」が細胞内調節の標的の一つである可能性がある。この観点から，我々はクロム親和細胞における開口放出の細胞内調節機構の解明を目的として，G蛋白質による Ca^{2+} 親和性の調節，およびマストパランのカテコールアミン放出作用について解析を行った。

クロム親和細胞では，Ca^{2+} 依存性放出が百日咳毒素感受性G蛋白質によって抑制的調節を受けることが知られているが，我々は最近 Go α および Gi α に対する特異抗体を用いて，開口放出の Ca^{2+} 親和性が Go によって抑制的に調節されることを明らかにした。一方G蛋白質を直接活性化する事が知られているマストパランは，細胞内 Ca^{2+} の上昇をともなわずにカテコールアミン放出を引き起こす。さらに，ミオシン軽鎖キナーゼが Ca^{2+} 依存性機構の重要な一部である可能性を，最近明らかにした。これらの全ての実験結果と最近の他の報告に基づいて，特に Ca^{2+} 親和性の調節が開口放出の細胞内側節の一端を担う可能性を考察した。

(8) クロム親和細胞のアミン取り込みと神経およびステロイドホルモン

平野鉄雄（新潟大）

【目的】

[3H] ドパミンを用いたオートラジオグラフィーで，副腎皮質直下のクロム親和細胞が中心部の細胞より多くの [3H] ドパミンを取り込むと，神経を切断するとその差が更に顕著になることから，副腎皮質ホルモン及び神経がアミンの取り込みを regulate していると考えた。

【材料及び方法】

雄マウスの左副腎神経を切断し，8時－20時明期の周期で飼育する。6時と18時に [3H] ドパミンを副腔内に注入し，2，15，30，60，120分の副腎の放射活性を調べた。また，6時に予めコルチコステロン (CS : 10mg/kg) を注入したマウスで同様に放射活性を調べた。

【結果及び考察】

6時には対照側で high affinity uptak がみられるが，CS により抑制された。しかし，除神経側では殆ど変化がなかった。これは，正常な神経支配があると，大量の皮質ホルモンはアミン取り込みを抑制するが，神経がないとその効果がない。皮質ホルモンはアミン取り込みの basal activity には必要だが，大量になると抑制する。神経支配の存在はその抑制効果を発現させている。

(9) PC-12 細胞を使った CO-CULTURE の可能性

遠藤泰久（京都工繊大）

cell line を用いた細胞培養系で抹消自律神経系の *in vitro* モデルの構築を試みている。NGF で分化する PC-12 細胞を神経要素として，標的細胞としては血管平滑筋様の SM-3 細胞（ウサギ大動脈由来），insulinoma の RINr 細胞（X線照射ラット膵臓由来）を用いている。

この培養系構築の目的は，①抹消自律神経系の三次元的な形態形成機構の解明，②終末網の形成およびその維持・安定性の解析，③神経伝達物質の non-synaptic release の定量的解析，④ varicosity の動態の解析，⑤ bioassay 系としての応用…等である。

PC-12 の突起と標的とした細胞の間には，特異的な接触が構成されることが電顕で観察できるが，synapse と呼べる程の膜の修飾は形成されない。MAP2 の分布を免疫染色で調べると，標的細胞と接触する突起で有意に MAP2-negative なものが増加し，突起の分化が起こっている可能性が示される。しかし，PC-12 の突起は非常に不安定で，かなり動いており，細胞体自身も移動する。安定な回路形成にはさらに種々の要素が必要である。

(10) プロトオンコジーン *trk*A 産物のチロシン燐酸化

畠中　寛，山田雅司（大阪大）

神経成長因子 (NGF) は rat pheochromocytoma PC12 細胞に対して，その神経細胞への分化を促進することが知られている。最近見いだされた protooncogene である *trk*A の産物 $gp140^{trkA}$ は，PC12 細胞においての NGF の高親和性レセプターを構成するとされている。

NGF は $gp140^{trkA}$ を活性化することによって，細胞内 signal transduction cascade を動かすとされている。我々は，この初発反応と考えられる $gp140^{trkA}$ の tyrosine 燐酸化を，PC12h 細胞および PC12h-R 細胞を用い解析した。PC12h-R 細胞は NGF 応答の極めて早いクローンである。解析には，ヒト $gp140^{trkA}$ のC末の14残基ペプチドに対するポリクローナル抗体を作製し用いた。NGF は，これら細胞の $gp140^{trkA}$ に対し tyrosine 燐酸化を促進し，少なくとも 3 種の蛋白質 (42kDa, 44kDa, 54kDa) についても tyrosine 燐酸化を促進した。

(11) 分泌刺激に共役した非リン酸化

杉谷博士（日大松戸）

【目的】

ラット耳下腺腺房細胞では β－アドレナリン受容体刺激によりアミラーゼの開口放出が惹起される。この細胞内情報伝達に関与する非リン酸化反応について検討した。

【方法】

ラット耳下腺腺房細胞を遊離し，サポニンを用いて可透過化性細胞を作成した。細胞を β－アゴニストや cAMP 存在下で $[^{32}P]$ NAD^+ または $[\alpha\text{-}^{32}P]$ ATP と加温したのちホモジナイズし，その10万 g 沈渣および上清画分に含まれる ^{32}P ラベルされたタンパク質について検討した。

【結果】

$[^{32}P]$ NAD^+ を用いた時，イソプロテレノールあるいは cAMP により，10万 g 上清画分の 24kDa タンパク質の ADP リボシル化が促進された。ラベルされた 24kDa タンパク質は蛇毒ホスホジエステラーゼ処理により水解され，その分解産物よりこの反応はオリゴ ADP リボシル化であった。

$[^{32}P]$ NAD^+ を用い，ADP リボシル化反応をチミジンで阻害すると，イソプロテレノールまたは cAMP により10万 g 沈渣画分の 33kDa と 23kDa の分子種への ^{32}P の取り組みが促進された。

$[\alpha\text{-}^{32}P]$ ATP を用いても同様な ^{32}P の取り込みが認められ，アデニリル化の可能性が示唆された。

(12) 中枢ニューロンにおけるATP量とNaポンプアイソフォーム活性

井上順雄（横浜市大）

Naポンプはニューロン内のエネルギーの過半を使ってイオン輸送を行ない，細胞の機能，生存を維持している。ここでは，ラット大脳由来の培養ニューロンを用いて，エネルギー欠乏時の細胞内ATPの量と脳型Naポンプおよび普遍型Naポンプの活性を測定した。細胞をGlucose非存在下で30分間処理した後では，Glucose存在下と比較してATP量は約70％に減少したが，全体のNaポンプ活性は変化しなかった。しかしこの時，脳型Naポンプの活性が全体の活性の約60％であり，Glucose存在下で脳型活性が全体の約1/3であるのと相違した。Glucose非存在下における処理時間が長くなるにつれてATP量は減少したが，この減少の時間経過より遅く全体のNaポンプ活性が低下した。この時，脳型活性は常に全体の活性の約60％であった。以上から，エネルギー欠乏時には，細胞の生存を維持するために脳型Naポンプが重要であると推定した。

(13) 副腎髄質細胞の Ca^{2+} 調節機能

藁科　彬，山口賢一（新潟大）
葉原芳昭（生理研）
菅野富夫（生理研・北海道大）

ラット副腎髄質をコラゲナーゼ処理により単離，あるいは小集団に分離した細胞にfura-2を負荷し，細胞内 Ca^{2+} 濃度（$[Ca^{2+}]_i$）を画像解析法により測定すると，大多数の細胞で $[Ca^{2+}]_i$ が静止レベルと考えられる100nM前後から数百nM，時には1 μMを超える振幅での自発的振動を示した。振動は長い休止期間を挟む間欠的なもの，ノイズ状の連続振動を示すもの，ほとんどの期間高い $[Ca^{2+}]_i$ レベルにあるものと様々な形態を取り，隣接する細胞間の振動に相関は見られなかった。この $[Ca^{2+}]_i$ 振動はchlorobutanolおよびTMB-8により抑制された。前者は電位依存性 Ca^{2+} チャンネル，および細胞内伝達物質により開かれる Ca^{2+} 導入経路を，後者は細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出を抑制する作用があると考えられ，振動の発生機序に，これらの Ca^{2+} 動員経路が複合的に関与することが示唆された。

(14) ATP 受容体とドーパミン受容体のクロストーク

井上和秀（国立衛生試験所）

PC12 細胞では，ATP 受容体刺激により非選択的カチオンチャネルが活性化され，そこを介して流入した Ca^{2+} によりドーパミン (DA) 放出が惹起されることを報告してきた (Review : News in Physiol. Sci., 7, 56-59, 1992)。今回は，放出された DA の ATP 誘発内向き電流および DA 放出に対する影響を検討した。DA （10および 100 μM）は ATP (3-100 μM) による内向き電流を増強し，その作用は濃度に対してベルシェイプであった。DA は ATP 惹起電流の activation および inactivation をともに促進した。増強作用のメカニズムを調べるために諸種化合物をピペット溶液内に入れて検討したところ，K252a および ATPγS は DA による増強作用を完全に抑制した。一方，cAMP, cGMP, ホルボールエステル類は全く影響を及ぼさなかった。従って，DA による ATP 惹起電流増強作用には，A，GおよびCキナーゼではないタンパク質りん酸化酵素が関与していることが示唆された。

(15) 伝達物質分泌のアデノシンによる調節：海馬シナプス可塑性における役割

黒田洋一郎，関野裕子（東京都・神経研）

【目的】

ATP およびその分解産物であるアデノシンは，神経伝達物質の放出および神経細胞の興奮にともないシナプス間隙に放出される。外液中に投与したアデノシンはシナプス伝達を強く抑制することが知られているが，神経興奮に依存して放出される内因性アデノシンが果たす役割については未だ充分な検討はなされていない。これらの内因性アデノシンによる伝達物質分泌の調節及びシナプス可塑性の発現に対する役割について，海馬スライス標本を用いて検討した。

【材料および方法】

ラットまたはモルモットの海馬より，厚さ450－500 μm のスライス標本を取りだし，O_2 95%，CO_2 5 %で飽和した人口脳脊髄液で灌流する。CA1 への入力線維である Schaffer 側枝をテスト刺激し，CA1 野の錐体細胞細胞層より集合活動電位 (PS), 樹状突起層より集合興奮性シナプス後電位 (EPSP) を記録した。内因性アデノシンが通常のシナプス伝達に与えている影響を調べるため，アデノシン受容体 (A1, A2) 拮抗薬がシナプス応答に与える影響を検討した。さらに，アデノシン受容体 (A1, A2) 拮抗薬存在下で Schaffer 側枝をテタヌス刺激し，テタヌス刺激により生ずる海馬のシナプス可塑性の発現に内因性アデノシンが関与する可能性を検討した。

【結果および考察】

アデノシン A_1受容体拮抗薬である 8-cyclopentyletheophylline (8-CPT) は，テスト刺激に対する応答を増強したが，A_2受容体拮抗薬である CP-66713 は影響しなかった。このことから，アデノシンは刺激により伝達物質とともに放出されており，A_1受容体を介して伝達物質の放出量の調節を行っていることが示唆された。

5Hz20s のテタヌス刺激は，5 －10分持続するシナプス伝達抑制を引き起こすが，これは 8-CPT により阻害された。さらに，100Hz1s のテタヌス刺激により生じる長期増強に対しては，A_2拮抗薬が EPSP の長期増強のみ阻害し，PS の長期増強には影響を与えなかった。これらの結果から，神経細胞の興奮に依存して細胞間隙に遊離するアデノシンがシナプス可塑性を調節する可能性が示唆された。

【 国際シンポジウム報告 】

新プログラム第3回国際シンポジウム
DYNAMICS OF PERCEPTION

文部省新プログラム「生体の動的機構の解明」の研究推進の一環として，第3回国際シンポジウム“Dynamics of Perception （知覚の動的機構）”が1993年1月27日－29日の3日間にわたって開催された。講演者はスイス，米国，イタリー，オーストラリア，イスラエル，スエーデン，カナダの各国から9名，国内10名，参加者は100名であった。

知覚の神経機構の研究は転換期を迎えている。「外界の事象を忠実に脳に伝え，そこにいわば鏡のように再現するのが知覚である；そのメカニズムは遺伝的なプログラムによって先験的に決定されている；このような明晰な知覚の成立の後にはじめて運動や指向が始まる」－知覚に関するこのような伝統的な概念がいま崩れようとしている。ではそれに代わるものは何か。このシンポジウムの目的は，知覚の新たな概念－動的な知覚－を探ることにあった。その結果，いかに述べるように，多くのすばらしい研究成果が示され，重要な問題点をめぐって建設的な討論が行われた。

(1) 知覚はいくつかの意味で動的である。知覚の機構は，これまで思考や認知の作用と考えられていたプロセスを含んだ構成的なものである。たとえば，実際には網膜には写っていないものを，線・動き・重なりとしてわれわれは「見る」ことができる。そしてそのメカニズムは，大脳皮質視覚野のなかの信号処理プロセスのかなり早い段階ですでに存在する。

(2) 知覚の神経情報は周期的なニューロン活動によって時間的にコードされ得る。これは，外界を大脳皮質表面にあたかも地図のように再現することによって知覚が成立するという今までの考え方を修正し，新たな動的な性質を与えた。

(3) ものの空間的位置はさまざまな座標系によってコードされ，しかも異なる座標系のあいだでの変換がすばやく，柔軟に行われている。視覚は網膜座標系によって与えられるが，大脳皮質視覚前野では身体座標系への変換が行われていることが初めて示された。これは画期的な発見である。

(4) 知覚のニューロン機構は，発達や学習によって適応的に大きく変化し得る。サルやヒトの知覚学習では大脳皮質第一次感覚野のニューロン活動が変化する。それは数時間の間におこり，REM睡眠が必要である。適応的変化は感覚器からの入力の初期の段階でもおこり得る。それには特定のタイプのグルタミン酸受容体(NMDA)が必要である。

(5) 知覚には大きく分けて2種類ある。第一は，意識され，記憶されるものであり，第二は，必ずしも意識されず，ものを探索し，操作するために使われる。脳の特定の領域の破壊によって，これらのどちらかだけが障害されるという重要な発見によってこれが証明された。

これらの新発見とそれらが提起する問題点は，これからの知覚の研究，さらに行動と脳との関係に新たな視点を提供するものとなった。

The 3rd New Program Symposium

DYNAMICS OF PERCEPTION

January 27-29, 1993

Organizing committee : Ebashi, S., Hikosaka, O., Yamagishi, S., Nambu, A.

Opening remarks by Ebashi, S. (Okazaki National Research Institutes)

(1) Shimojo, S. (Univ. of Tokyo, Japan) Perception of transparent and opaque surfaces

(2) Von der Heydt, R., Heitger, F. and Peterhans, E. (Univ. Hospital Zürich) Perception of occluding contours : Neural mechanisms and a computational model

(3) Komatsu, H. (Electrotechnical Laboratory) Neural coding of color and from in the inferior temporal cortex of the monkey

(4) Gray, C. M. (Salk Institute for Biological Studies) Temporal correlation in visual cortex : Functional implications

(5) Fujita, I. (RIKEN Institute) Columns in the inferotemporal cortex : Machinery for visual representation of objects

(6) Ojima, H. (RIKEN Institute) Two feedback systems originating from different layers in the cat primary auditory cortex

(7) Brainard, M. S. and Knudsen, E. I. (Stanford Univ.) Visual calibration of the neural representation of auditory space in the barn owl

(8) Hikosaka, K. (Tokyo Metropolitan Inst. for Neuroscience) The polysensory region in the anterior bank of the caudal superior temporal sulcus of the macaque monkey

(9) Galletti, C., Battaglini, P. P. and Fattori, P. (Universitá di Bologna) Cortical mechanisms of visual space representation

(10) Kusunoki, M., Tanaka, Y. and Sakata, H. (Nihon Univ.) Neural correlates of perception of spatial characteristics and depth movement in the monkey parietal cortex

(11) Irvine, D. R. F. and Rajan, R. (Monash Univ.) Reorganization in auditory cortex of adult mammals with unilateral restricted cochlear lesions

(12) Recanzone, G. H. (National Eye Institute) Neural correlates of psychophysical performance in the cerebral cortex

(13) Mikami, A. (Kyoto Univ.) Visual discrimination and memory in the temporal association cortex

(14) Sagi, D. (Weizmann Institute of Science) Perceptual learning in preattentive vision

(15) Komatsu, Y. (Kyoto Pref. Univ. of Medicine) Long-term potentiation in developing visual cortex

(16) Miyashita, Y. (Univ. of Tokyo) Memory-code and imagery in the primate temporal cortex

(17) Johansson, R. S. (Univ. of Umeå) Predictive feedforward sensory control during grasping and manipulation in man

(18) Iwamura, Y. (Toho Univ.) Dynamic and hierarchical processing in the monkey somatosensory cortex

(19) Goodale, M. A. (Univ. of Western Ontario) Visual routes to knowledge and action

General Discussion

Sakata, H. (Nihon Univ.)

Toyama, K. (Kyoto Pref. Univ. Medicine)

Closing remarks by Hama, K. (Director-General, Natl. Inst. Physiol. Sci.)

【 生理研コンファレンス 】

生理学研究所コンファレンス

毎年特定研究の一環として開催している生理研コンファレンスは，本年度第18回を迎え，「カルシウムによる細胞機能の制御」(Calcium regulated cellular control) のタイトルの下に平成５年３月２－４日所内で実施された。今回のテーマは，カルシウムによる筋収縮弛緩の制御機構を解明してカルシウム時代の扉を開いた江橋節郎前所長が本年度で岡崎国立共同研究機構長を退任されるのを記念して選定された。周知のごとくカルシウムイオンはいくつかの基本的分子機構により受精から脳機能までの広範な生理機能を制御していることが明かにされており，所内でも重要な研究対象であるとともに共同研究，研究会でもしばしば取り上げられているが，今回は国外からも第一線研究者を迎え，最先端の研究を総括して将来への展望を行うことを目的として企画された。プログラムの編成には江橋博士のサジェスチョンを得ながら山岸俊一，小幡邦彦が当たった。

国外からの招待演者は Berridge (Cambridge), Charlton (Toronto), Cherksey (New York), Douglas (Yale), Duchen (London), Gillespie (New Castle upon Tyne), Godfraind (Bruxelles), Petersen (Liverpool), Rall (Columbus, Ohio) の９名であり，従来のコンファレンスに比してヨーロッパ勢が目だったが，この研究分野の情勢を反映しているのであろう。参加者は名誉教授から大学院生まで120名にのぼった。講演は上記に江橋節郎，丸山工作，桑山秀人，馬淵一誠，野々村禎昭，宮崎俊一，遠藤　実，西塚泰美，日高弘義，藤澤　仁，小浜一弘，祖父江憲治，井上　勲，菅野富夫，丸山芳夫，大森治紀博士を加えた25名によって行われた。また会期中，講義室周辺に田野倉優博士以下による13題のポスターが掲示され，指定の時間や休憩時間に討論が行われた。

まず同年令の江橋，Douglas 教授がそれぞれ収縮弛緩と分泌におけるカルシウムの役割の発見とこれまでの研究についてレビューした後，各演者により発見された各種筋細胞，卵細胞，培養神経細胞などにおけるカルシウムの細胞内濃度変動，ストアからの動員，結合蛋白，誘発される生化学的反応が紹介され，このような機構が受精・細胞分裂からシナプス伝達・可塑性までの細胞機能にどのように関与するかが述べられた。とくに Berridge 教授や遠藤教授による細胞内カルシウム濃度の波動的変動発現機構の講演はみごとであった。詳細な内容は Biomedical Research のサプルメントとして発行されたプロシーディングス (Vol. 14, Suppl. 2) を参照されたい。

PROGRAM
THE 18TH SEIRIKEN CONFERENCE
"CALCIUM REGULATED CELLULAR ACTIVITIES"

March 2－4, 1993

Opening remarks Hama, K.

L1. Ebashi, S. (Okazaki Natl. Res. Inst.) From the relaxing factor to troponin.

L2. Douglas, W. W. (Yale Univ.) Calcium : Primary stimulus and intracellular signal for autonomous secretion : lessons from melanotrophs.

L3. Rall, J. A., Wahr, P. A. and Johnson, J. D. (Ohio State Univ.) Calcium regulation of relaxation in skeletal muscle.

L4. Maruyama, K. (Chiba Univ.) Calcium and proteolysis of giant muscle proteins.

L5. Kuwayama, H. (Obihiro Univ. of Agricul. Veter. Med.) Amino acid sequence of myosin light chain kinase from bovine stomach with special references to its actin binding domain.

L6. Mabuchi, I. (Univ. of Tokyo) Mechanism of cleavage furrow formation in animal cells.

L7. Nonomura, Y. (Univ. of Tokyo) Multifunctional role of myosin molecules in various kinds of cell.

L8. Miyazaki, S. (Tokyo Women's Med. Coll.) Essential role of the IP_3 receptor in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs.

L9. Berridge, M. J. (Univ. of Cambridge) Intracellular channels and calcium spiking.

L10. Endo, M. and Iino, M. (Univ. of Tokyo) Calcium mobilization from intracellular stores in smooth muscle cells.

L11. Nishizuka, Y. (Kobe Univ.) Intracellular signaling by phospholipid hydrolysis and protein kinase C activation.

L12. Hidaka, H. (Nagoya Univ.) Function and atructure of two family of Ca^{2+} -receptive protein, annexin and EF-hand protein.

L13. Fujisawa, H. (Asahikawa Med. Coll.) Regulation of the activities of Ca^{2+} /calmodulin-dependent multifunctional protein kinases.

L14. Kohama, K. (Gunma Univ.) Calcium inhibition, A new mode for Ca^{2+} regulation.

L15. Duchen, M. R. (Univ. Coll. London) The role of calcium in the regulation of mitochondrial function in mammalian cells.

L16. Sobue, K. (Osaka Univ.) Molecular approach of smooth muscle differentiation : Expression change of caldesmon isoforms links to phenotypic modulation of smooth muscle cells.

L17. Inoue, I., Tsutsui, I. and Bone, Q. (Tokushima Univ.) An evolutionary step in skeletal muscle excitation-contraction coupling.

L18. Godfraind, T. (Univ. Catholique de Louvain) Pharmacological control of calcium channels and muscle contractility.

L19. Cherksey, B., Sugimori, M., Hillman, D. E. and Llinas, R. (New York Univ.) The P-type voltage dependent calcium channel : its distribution and possible functions in the CNS.

L20. Gillespie, J. I., Otun, H., Nichalls, J. A. and Greenwell, J. R. (Univ. of Newcastle) A Caffeine independent Ca^{2+} induced Ca^{2+} release mechanism in cultured human vascular smooth muscle cells.

L21. Kanno, T. and Habara, Y. (Hokkaido Univ. and Natl. Inst. Physiol. Sci.) Recurrent Ca^{2+} tide as an intra-and intercellular signal.

L22. Petersen, O. H. Thorn, P., Lawrie, A., Tepikin, A. V. Petersen, C. C. H., Smith, P. and Gallacher, D. V. (Univ. of Liverpool) Local and global cytosolic Ca^{2+} oscillations evoked by agonists and inositol triphosphate.

L23. Maruyama, Y. (Jichi Med. Coll.) Ca^{2+} signaling and its control by cyclic AMP in megakaryocytes.

L24. Charlton, M. (Univ. of Toronto) Organization of channels and trigger molecules at active zones of synapses.

L25. Ohmori, H. (Kyoto Univ.) Intracellular Ca^{2+} mediates inhibitory postsynaptic potentials in hair cells.

Closing remarks Endo, M.

P1. Tanokura, M. (Univ. of Tokyo) Calorimetric study of Ca^{2+} binding to Ca^{2+} binding proteins : Regulatory steps driven by entropy.

P2. Suzuki, S., Hino, N., Shibayama, R. and Sugi, H. (Teikyo Univ.) Electron probe X-ray microanalysis studies on the intracellular calcium translocation during the contraction-relaxation cycle in vertebrate skeletal muscles.

P3. Ishii, Y. (Biomotron Project ERATO JRDC) Cooperative turning-on of thin filament.

P4. Tsutsui, I. and Ohkawa, T. (Natl. Inst. Physiol. Sci. and Osaka Univ.) L type Ca^{2+} channel in algal plant *Chara corallina*.

P5. Murayama, T. and Ogawa, Y. (Juntendo Univ.) Potential factors which affect the Ca^{2+} -sensitivity of ryanodine receptors.

P6. Ebashi, S. (Okazaki Natl. Res. Inst.) Phosphorylation of myosin light chain (MLC) is not the main activation mechanism of smooth muscle contraction.

P7. Shibuya, I. and Douglas, W. W. (Yale Univ. and Hokkaido Univ.) Spontaneous phasic entry of Ca into isolated melanotrophs of *Xenopus laevis* : omega-conotoxin reduces amplitude

whereas dopamine reduces frequency.

P8. Nishimura, T. and Akasu, T. (Kurume Univ.) Do calcium-induced calcium release and calcium pump cooperate generate spontaneous oscillation of membrane current in mammalian neurons?

P9. Enomoto, K., Furuya, K. Maeno, T. and Yamagishi, S. (Shimane Med. Univ. and Natl. Inst. Physiol. Sci.) Mechanically induced calcium response in mammary epithelial cells.

P10. Kon, K., Murakami, J., Maeda, N. and Shiga, T. (Ehime Coll. of Health Sci., Ehime Univ. and Osaka Univ.) Effect of intracellular calcium content on erythrocyte deformation.

P11. Yamaguchi, K. and Furuya, K. (Natl. Inst. Physiol. Sci.) Regulation of neurite-outgrowth by intracellular calcium in cultured mammalian neuron.

P12. Hanai, H., Yamada, M., Kaneko, E. and Fujita, M. (Hamamatsu Univ.) A model for Ca^{2+} transport in duodenal enterocytes from spontaneously hypertensive rats.

P13. Takayanagi, S., Hanai, H. and Kaneko, E. (Hamamatsu Univ.) Ca/calmodulin- and protein kinase C-dependent signal transduction affect serotonin uptake in rat jejunal enterocytes.

【セミナー報告】

セ ミ ナ ー 報 告

〈生理研セミナー〉

1. Ca^{++} in vertebrate photoreceptors : calcium ions and phototransduction in isolated rod outer segments of the vertebrate retina.

Giorgio Rispoli (Instituto di Fisiologia Generale dell'Universita)

(1992年4月24日)

Ca^{++} is a second messengr in vertebrate photoreceptors : it affects the concentration of the internal transmitter cGMP by cooperatively regulating guanylate cyclase, through a negative feedback, and phospodiesterase activity. This regulatory effect plays a key role in the recovery of the dark state of the photoreceptr after light stmulation as well as in light adaptation. In this talk, I will describe a methodology to study photoreceptors, consisting in the application of the whole cell recording to rod outer segments detached from the reat of the retina. Depending upon the dialysis solution, this preparation allows for the selective recording of the cGMP current and/or the exchange current with the transduction cascade to function or not. The low frequency noise in photoreceptors in not generated by spontaneous activations of transduction cascade but eather by fluctuations in the negative feedback regulating cyclase activity ; the Ca^{++} entry through the cGMP channels is regulated by nucleoside triphosphates and cGMP itself ; the Ca^{++} extrusion through the exchanger is a consecutive rather than a simultaneous process as suggested from the analysis of the current transients observed ffollowing rapid external solution changes.

(担当：大塚輝彌)

2. Functional brain mapping noninvasive MRI

Seiji Ogawa (AT & T Bell Laboratories)

(1992年4月28日)

Deoxyhemoglobin is Known to be Paramagnetic and therefore and act as an endogenous contrast agent for magnetic resonance imaging. we reported previously that in a high resolution brain image of rodents measured at a very high magnetic field. We could observe Blood Oxygen Level Dependent (BOLD) contrast which reflected the microvasculature for the venous blood in the brain. BOLD image signals obserced in gradient echo images have been shown to be sensitive to the phy-

siological state of the brain. This image contrast is a magnetic susceptibility effect due to venous blood vessels which contain deoxyhemoglobin. Recently We have shown that this BOLD image change is observable in human brain. Visual stimulation produces an easily detectable (5-20%) transient increase in the intensity of water proton magnetic resonance signals in human primary visual cortex in gradient echo images at 4T field strength. The observed changes predminantly occur in areas containing gray matter. This function brain imaging depends on the cerebral hemodynamics, with changes with human neuroactivity, in a similar way to PET. Now MRI can widen its scope to cover functional brain mapping with its high spatial resolution in addition to the anatomical information it provides.

(担当：亘　　弘)

3. Molecular communities in two dimension the cosmography of cell membranes.

Pedro Pinto da Silva (National Cancer Institute)

(1992年5月12日)

Dr. silvaは，電顕解剖学者でフリーズフラクチャー法と金コロイドラベル法を併用して膜内蛋白粒子の種類を同定しながら，その分布や細胞骨格との相互作用を解析する手法を考案したことで有名です。

(担当：寺川　進)

4. Myosin and muscie contraction

Ralph G. Yont (Washington State University, Dept. of Biochemistry & Biorhysics)

(1992年5月22日)

ミオシンは筋収縮や細胞運動に於いて主要な働きをしているエネルギー交換酵素である。滑り運動を発生するために，ミオシンATPase反応はアクチンとの相互作用によって明確に調整されている。この生体運動の分子機構を理解するためには，力の発生に際してこれらのタンパク質分子にどの様な性質の変化が生ずるのかを知ることが大切である。その第一歩としてミオシンの活性中心がいかなる特徴を持っているかを明らかにしようと試みてきた。ミオシンには化学反応性に富むアミノ酸残基がいくつも存在するので，活性中心を形成するペプチド構造とそこに存在するアミノ酸残基を固定するためには光アフィニティラベル法が有効である。幸いなことに，ミオシンATPaseの基質特異性は，さほど厳密ではないので我々が合成したATPのアナログの多く

は酵素反応の優れた基質であると同時に，グリセリン処理筋の張力発生から判断しても ATP の優れたアナログとなり得た。これらの光アフィニティアナログを活性中心の特異的標識のために用いた。その際，我々は通称“TRAP AND ZAP”と呼んでいる方法を行っている。これはミオシン ATPase の活性中心に MgATP が統合した残基間の化学架橋やバナジン酸などを用いる。活性中心に TRAP されなかった ATP の光アフィニティアナログを除去して，光照射 (ZAP) を行えば活性中心のみが標識できる。この様にして骨格筋，心筋などの横紋筋や平活筋から得たミオシンの活性中心に関与するアミノ酸残基のいくつかが固定された。筋収縮に於いてミオシンの頭部がどの様に基質を認識し，結合と加水分解しているのかについてタンパク質の構造の視点から考え述べたい。

（担当：小幡邦彦）

5．Protective role of glutathione and cystine transport in the defence against oxidative stress in acute pancreatitis

G. E. Mann (King's College London, University of London)

（1992年 5 月25日）

Reactive oxygen species have been associated with spectyum of imflammatory diseases, yet little is known about theri importance in the pathogenesis of acute pancreatitis. This disease is characterized by a block of pancreatic secretion, acinar cell vacuolization, marked inflammation and tissue necrosis. Recent studies in humans and animal models implicate reactive oxygen metabolites as mediators of celluar damage in acute pancreatitis, with substantial improvemement noted following treatment with antioxidants and glutathione prodrugs. Our previous studies in the isolated perfused rat pancreas have established by multiple basolateral transporters with differential sensitivity to islet hormones, diabetes and dietary composition. We have now shown that caerulein-induced pancreatitis is associated with markedly reduced pancreatic GSH lecels, whilst others have reported that pretreatment with GSH monoethyl ester protects against cellular damage. We recently reported that oxidative stress abolishes carbachol-induced secretion in the perfused rat pancreas and stimulates transport of the GSH precursor amino acid L-cystine in a cultured human pancreatic ductal cell line. Our ongoing research should enhance our understanding of the defence mechanisms of pancreatic acinar and ductal cells against oxidative stress in pancreatitis

（担当：菅野富夫）

6．ショウジョウバエの精子形成の動的過程

徳安清輝 (University of Callifornia. San Diego)

(1992年５月29日)

1970年頃まで，昆虫の精子は，その形態が多様で又幾何学的に見事な事だけで知られ，その形成過程については殆ど知られてなかった。その頃我々は，Drosophila melanogster の或る変種の研究の必要上，その精子形成過程について，組織的な研究を始めた。ショウジョウバエの種の数は夥しいが，その精子の長さ，形状は種の保存に直接関係していると考えられている。D. melanogaster の精子は1.8㎜（殆ど成虫の長さ）に及ぶが，spermatid の縦横比は最初の１に近い値から成熟時には2000位に達する。２個の somatic な細胞 (cystcells) が作る袋に64 (2^6) 個の spermatid がとじこまれて発達の単位を作るが，cyst cells からの間接的な help を除けば，その多岐にわたる成熟過程は，貯えられたインフォメーションだけで行われることが分かっている。この極めて整然とした過程につき，Individualization Process （精子がシンシチュウムから解放される過程）に重点を置いて述べたい。

（担当：月田承一郎）

7．Evidence for a role of G-proteins, annexin Ⅱ and protein kinase C in secretory processes in chromaffin cells.

Dominique Aunis, (Unite INSERM U. 338 Strasbourg)

(1992年６月５日)

Dr. D. Aunis は Chromaffin 細胞の分泌の仕事を長く手がけられた細胞生物学者です。Chromaffin 細胞内の actin 分布を蛍光染色法により調べ，膜の裏打ちとしての actin 繊維層が acetylcholine 刺激によって急激に脱重合し，分泌顆粒が細胞膜へ装着できるようになることが exocytosis の引き金である，という Barrier 仮設を提唱して有名になりました。これは今でも仮設として重要なものになっています。今回は exocytosis に至る細胞内 messenger 系の解析に新しい発展が得られたので，そのお話をして頂きました。

（担当：寺川　進）

8. Locomotion forces single lenkocyte

宇佐美駿一 (Institute of Biomedical Sciences Academia Sinica)

(1992年6月24日)

Shunichi Usami*, Wung Shu-Li*, Boguslaw A. Skierczynaki**, Richard Skalak** and Shu Chien** (*Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, Republic of China, ** Department of Applied Mechanics and Engineering Sciences, University of California, San Diego, La Jolla, California, USA)

There have been very few studies which provide the physical forces qenerated by cells during active movements. We have designed a micropipette system which is able to observe cell motion within the ppette. A small gage needle, containing f-met-leu-phe (fMLP) in 1% gelatin, is inserted from the rear into a micropipette. The tip of the micropipette is placed near a human polymorphpnucear lekocyte (PMN). After about 1-2 minutes, the PMN enters into the pipette and advances toward the fMLP source. The application of a pressure to counter the chemotactic migration of the cell in the pipette provides a direct measure of the locomotion force generated by the cell. An average velocity of forward motion is 0.03um/sec. In contrast, under a positive counter-pressure (C-P), the velocity of cell forward motion decreases with increasing of C-P. At 16 cmH^2O of C-P, the cell velocity drops to zero and even moves backward with a higher C-P. The results show that the decrement of velocity is linearly related to the magnitude of the C-P with a complete stoppage at a pressure of about 16 cmH^2O or a force of about 0.004 dynes. The maximun work rate of the cell is about $3x10^{-8}$ergs/sec. (supported by Academia Sinica and National Council of R. O. C. and N. I. H. HL 43036 of U. S. A.)

(担当：亘　弘)

9. 視覚のひきがね機構

中西香爾 (University of Columbia)

(1992年7月9日)

11－シスレチナールを発色団とするロドプシンに光があたると，トランス形に変化し，一連の酵素反応を経て視覚がおこることはよく知られている。しかし，酵素反応をおこす「ひきがね」が何であるかは分かっていない。今回，一連のレチナールのアナログを取り込んだロドプシン類の実験から，この「ひきがね機構」を明らかにする事ができた。さらにビタミンA由来の新しい

細胞内メッセンジャー分子を同定したので，それについても述べられた。

（担当：大塚輝彌）

10. Time-resolved fluoroimmunoassay

Timo J. Nevalainen (Deparment of Pathology University of Turku)

（1992年 9 月17日）

The time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) provides a sensitive and rapid method for the measurement of protein, peptide and other antigens in tissue extracts and body fluids. The detection principle, based on the long fluorescence decay time of the rare earth metal Europium, elminates all the fluorescence background problems that have hampered fluoroimmunoassays requiring high sensitivity. The decay time of the fluorescence of conventional florochromes is in the range 1-20 ns whereas the decay time of Europium is 0.01-1 ms. hus the measurement of specific fluorescence after the decay of background signals, originating in the fluorescence of biomolecules such as proteins and nucleic acids present in the sample, provides and excellent sensitivity for the assay. We ave developed TR-FIAs for various forms secretory phospholipases A2. Commercial Kits are available for 30 different analytes including immunoglobulins, hormones and other clinically interestimg substances. The principle of time-resolved fluoromeasurement has been applied also in methods of molecur biology.

（担当：菅野富夫）

11. Cytoskeletal interactions in smooth muscle

J. V. Small (Austrailia National Academy Institute of Moleculan Biology)

（1992年 9 月17日）

Small 博士は，細胞骨格研究の世界的リーダーの一人であり，特に平滑筋細胞における細胞骨格の研究で有名です。光学顕微鏡，電子顕微鏡を駆使しつつ，生化学的な手法を併用するオーソドックスな細胞生物学的研究法を早くから用い，数々の優れた業績を挙げておられます。J. Cell Biology の Editorial Board を長年続けられており，現在，オーストリア国立アカデミー，分子生物学研究所の Department Head の要職につかれています。今回，生理学研究所を訪問されるにあたり，セミナーをお願いしました。

（担当：月田承一郎）

12. Neural and molecular mechanisms of a simple form of learning in aplysia

John H. Byne (Department of Neurobiology and Anatomy, The University of Texas Health Science Center at Houston)

(1992年10月15日)

Emerging principles of mechanisms underlining learning will be illustrated by describing biophysical, biochemical and molecular changes in individual neurons, which are associated with a simple form of learning known as sensitization. The discussion will progress from a description of the behavior and its ability to be modified, to an analysis of the underlying neural circuitry and the sites of plasticity. Neural and molecular mechanisms such as activation of second messenger systems and modulation of membrane channels that contribute to the short-term (minutes) memory for sensitization will be compared to those loci and mechanisms for the long-term (days) memory for sensitization. In particular, the roles morphological changes (new growh) and new protein synthesis will be discussed.

(担当：小幡邦彦)

13. NMR studies of halophilic bacteria

Haggai Gilboa (Israel Institute of Technology Haifa)

(1992年10月20日)

演者は，多核種NMR法を用いて，好塩菌細胞の生理機能を研究しているイスラエルの生物学者です。当日は，^{13}C, ^{31}P, ^{23}Na NMRを用いた，halophilic eubacteria Balとvibrio costicolaの浸透圧ストレスと温度ストレスに対する反応についての最新の知見が紹介されます。

(担当：瀬尾芳輝)

14. Three dimensional reconstruction of networks including T-system

Lee D. Peachey (University Pennsylvania)

(1992年10月27日)

演者は400KVの超高圧電顕を用いて生体内超微細構造の三次元的解析を精力的に進めており，学会で活躍されているアメリカの細胞生物学者です。当日はステレオ像のデモストレーションも行われる予定であり，電子顕微鏡を用いた超微細形態の三次元的構造の研究の最先端の話が

期待されます。

（担当：有井達夫）

15. New forms of natriuretic peptides including urodilatin

Wolf-Georg Forssmann (Niedersachsisches Institut fur Peptid-Forschung GmbH, Hannover)

（1992年11月18日）

A new family of peptide hormones has been discovered in the early 1980ies : these regulator peptides form heart atria control the body fluid and electrolyte balance as well as blood pressure. They exhibit a striking structural homology and share common functional and pharmacological activities with several subsequently detected regulatory peptides df brain and other tissues. In 1983 atrial natriuretic peptide (ANP) and cardiodilatin (CDD) were isolated form cardiac atrial tissue extracts. This tissue was known for a long time to contain endocrine secretory granules. When the amino acid sequence of CDD/ANP was available, these peptides and many homologues were synthesized, antibodies for radioimmunoassay and immunohistochemistry were raised, and corresponding nucleotide sequences of gene and mRNA greatly enhanced our knowledeg of this field. The recently described peptides related to the CDD/ANP family are BNP (brain natriuretic polypeptide), CNP (C-type of atrial polypeptides), and urodilatin (CDD/ANP-95-126). Some differences in the physiological and pharmacological properties of the different members of this peptide family are of basic significance for their clinical value. An adequate classification of the homologous peptides has been proposed by Matsuo's working group. The natriuretic peptides are denominated A, B, or C type : A type is the atrial natriuretic polypeptide (ANP), B type is brain natriuretic peptide (BNP), and C type is a further recently sequenced natriuretic peptide (CNP).

（担当：成瀬　達）

16. 水晶体上皮細胞の生存調節

石崎泰樹（東医歯大）

（1992年11月27日）

Raff は最近，「高等動物においては全ての細胞は，その存在に他の細胞からのシグナルを必要とし，それが得られない場合には自殺するようにプログラムされている。」という仮説を提唱した (Nature 356 : 397-400)。この仮説を検証するために水晶体上皮細胞の生存調節を検討した。

水晶体は血管支配も神経支配も受けておらず，さらには内部に繊維芽細胞も存在せず容易に一種類の細胞すなわち水晶体上皮細胞を調整し，培養系に移せるからである。まずラットで水晶体の発生を細胞死の有無の観点から追ってみると，水晶体が外肺葉から形成される時期には多数のアポプトーシスによる細胞死が認められたが，それ以降は水晶体縫合の部分に限局して細胞死が認められるのみで他の部分には全く認められなかった。幼若ラットの眼球から水晶体カプセルを調整し，カプセル上に上皮細胞が単層に生えている状態で培養系に移すと，この一種類の細胞のみからなる培養系は，無蛋白培地中で長期間生存した。次にカプセルに生体内で他種の細胞が産生したシグナルが沈着し，これが上皮細胞の存在を維持している可能性を否定するために，予めラミニンで処理しておいた培養皿にカプセルを置き，上皮細胞をカプセル外に遊走させた後に，カプセルを除去したが，この場合も上皮細胞は無蛋白培地中で長期間生存した。単層に生えている水晶体上皮細胞をトリプシンで処理し，一個一個の細胞に分離した後に無蛋白中で培養した場合，生存率は播種密度に依存することが明らかになった。すなわち，低密度で播種すると無蛋白培地中で長期間生存した。以上より水晶体上皮細胞もアポプトーシスのプログラムを持っていること，このプログラムの実行抑制は他種の細胞からのシグナルは必要としないが，同種の他の細胞からのシグナルを必要とすることが明らかになった。

（担当：小幡邦彦）

17. Regulation of cytokinesis by MPF and phosphoiositide signaling by profilin.

Thmas D. Pollard (The Johns Hopkins University School of Medicine)

（1992年12月 2 日）

ポラード教授は，非筋細胞を材料に，アクチン・ミオシン系の細胞骨格のダイナミクスを幅広く細胞生物学的手法を用いて研究してこられました。研究のテーマは，アクチンやミオシンの重合の機構から，アクチン調節蛋白質の機能，ミオシン－１による細胞内の小胞の輸送活性などに及びます。今回は，MPF がミオシン軽鎖のリン酸化をすることにより，細胞質分裂をも制御することと，アクチン調節蛋白質の一つであるプロフィリンが，P1P2 やアクチンとの結合解離を通して，イノシトールリン酸や RAS を介するシグナル伝達系を調節しているらしいことを中心に話された。

（担当：米村重信）

18. Tight junctions and the blood-brain barrier

Lee L. Rubin (Department of Anatomy & Developmental Biology University)

(1993年1月29日)

Tight Junctionは，上皮細胞や内皮細胞において，細胞間の物質透過のbarrierとして働くだけでなく，細胞の極性形成にも重要な役割を果たす構造として，古くから生理学研究の重要な研究対象でした。近年，この構造を構成する蛋白質が徐々に明らかになり，細胞生物学的な解析が容易になりつつあります。Rubin教授は，血管における物質透過調節機構に関するTight Junctionの役割について活発に研究されている研究者の一人で，来日されたのを機会に生理学研究所で，上記の研究に関する最近の成果についてお話をしていただくことになりました。

(担当：月田承一郎)

19. Electron spin echo study of molecular motion in disordered media

Sergei A. Dzuba (Institute of Chemical Kinetics, Novosibirsk)

(1993年3月19日)

The structure and dynamics of disordered media now are intensively studied using a variety of experimental techniques. This is induced by discovering a series of unusual phenomena characteristic of these media, such as low-energy excitations, non-photochemical hole burning etc. In this report, the results are discussed of a spin-probe study of organic disordered media, employing an electron spin echo technique The spin probes (nitroxide radicals) are modeling behavior of admixture molecules in these media. Two pypes of experiment are possible. The first one involces the microwave hole burning in the EPR spectra. The subsequent magntization transfer is detected employing a rapid stepping of the magnetic field. This method is sensitive to a large-scale spectral diffusion and, so, to a large-scale orientational motion. This type of motion has been observed in organic glasses in a microsecond time domain. The study of magnetization transfer allows also to make conclusion on motional model. The data agree with the model of tumbling between non-equivalent orientations. The another possible electron spin echo method is detection of echo-induced EPR spectra. These spectra reveal the remarkable dependence on the time separation between two echo-forming pulses. This dependence may be easily simulated within the framework of the model of small-scale orientational motion near equilibrium position (molecular librations). The correlation time for this motion lies in a nanosecondtime domain. These both types of molecular motion present in disordered substances of different origin. The correspondence of the obtained data with the results of NMR relaxation and dielectric relaxation studies is discussed.

(担当：亘　　弘)

〈昼食セミナー〉

1．“平滑筋収縮の Ca 制御：ライオトニンと MLCK”

江橋節郎

（1992年 4 月20日）

アクチン側からの制御因子（収縮因子）ライオトニンは，タンパク質としては MLCK （ミオシン軽鎖キナーゼ）と同じ分子であることが示された。しかし MLCK 活性は収縮と関連しない。例えば，ヴォルトマンニンは収縮を抑えることなく MLCK 活性を殆ど完全に抑制する。この様な結果に基き，収縮の機構を考察する。

2．“大脳基底核の随意運動制御における役割”

稲瀬正彦

（1992年 5 月18日）

大脳基底核の出力の一つである淡蒼救内節の神経細胞は，随意運動の遂行中に発射活動の変化を示す。この活動は，運動方向及び大きさに関連して変化する。同部位にムシモールを注入して神経細胞活動を低下させると，姿勢保持の障害と運動の緩徐化が生じる。これらの結果に基づき，大脳基底核の機能を考察する。

3．“メタンフェタミン逆耐性の成立機構について”

吉川武男

（1992年 5 月25日）

覚醒剤であるメタンフェタミンをラットに反復投与すると，惹起される運動の亢進が生じる。また，一旦覚醒剤に対する感受性の増大が生じると，長い新薬期間をおいても感受性は保持される。これらの現象は，いわゆる逆耐性としても知られているが，この状態の成長過程に海馬の関与の可能性を検討したので報告する。

4．“細胞間接着装置 Adherens Junction の裏打ち分子の解析”

伊藤雅彦

（1992年 6 月 8 日）

細胞間接着装置 Adherens Junction [AJ] は，細胞同士の相互作用において重要な役割を果たしている構造であると考えられる。この AJ の果たす機能，及びその機能がどの様に調節されているかについて解析するために，モノクローナル抗体の作製を行い，その構成因子の固定を試みた結果について報告する。

5．“眼球運動と選択的注意は上丘でどのように表現されているのだろうか？”

小島　淳

（1992年 6 月15日）

私たちが車を運転しているときに，まっすぐ前を見ながらも周囲の動く物体に注意を払います。このような情報はどこで処理されているのでしょうか。この疑問を解くために，我々は眼球運動情報の中継地点である上丘に注目し，その神経活動を調べました。その結果，上丘の神経活動は視覚刺激に対して応答し，その多くは眼球運動や注意によって強い影響をうけることが分かりました。

6．“小脳培養系におけるシナプス形成と可塑性”

平野丈夫

（1992年 7 月13日）

ラット小脳の培養系においてプルキンエ細胞上に形成されるシナプスについて紹介する。顆粒細胞は樹状突起上に興奮性シナプスを形成し，抑制性シナプスの一部は細胞体上に形成されるなど，細胞部位選択的なシナプス形成がなされる。また顆粒細胞・プルキンエ細胞間シナプスは抑制・増強の伝達調節を示す。シナプス形成・伝達調節の研究における培養系の役割についても検討した。

7．“羊耳下腺細胞における K^+ チャンネル”

石川　透

（1992年９月14日）

羊耳腺は２つの点で他の唾液腺と異なっている。

（１）自発性分泌がある。

（２）原唾液腺中のイオン組成が High HCO_3, PO^{3-}, low Cl^- である。羊耳下腺の唾液分泌機構を明らかとする目的で，Whoie-cell patch clamp 法及び，single channel recording 法を用いて K^+ チャンネルの解析を行った。

8．“腸のパネート細胞について”

佐藤洋一

（1992年９月28日）

哺乳類の小腸の腸腺底部に集合する外分泌性のパネート細胞は，およそ100年前に発見されたが，その機能は長らく不明のままであった。近年，この細胞に種々の抗菌物質が含まれていることがわかってきた。更に，無菌動物に人工的な感染を起こして腸内細菌環境を変化させると，パネート細胞は著明な果粒放出像を示した。パネート細胞は腸内細菌環境を整える役目を持っているように思われる。

9．“細胞容積調節に関する Cl^- チャネル”

岡田泰伸

（1992年10月19日）

殆どの細胞は，内外の浸透圧環境の乱れに対して容積調節機能を発揮することによって，オメオタシス維持・生体防御を達成している。今回は，小腸上皮細胞の低浸透圧条件下での容積調節メカニズムと，それに関与する Cl^- チャンネルの性質について述べる。

10. “神経伝達物質放出機構と低分子量G蛋白質”

白瀧博通

（1992年10月26日）

smg p25A/*rab* 3A P25 は，*ras* p21 類似低分子量G蛋白質に属し，神経伝達物質の放出反応に関与していることが明らかになりつつあります。今回は，神経伝達物質の放出反応における *smg* p25A の作用機構と，*smg* p25A 標的蛋白質についてお話しします。

11. “動物実験の倫理とは何か”

尾崎　毅

（1992年11月 9 日）

最近動物実験に対する批判が内外で大きく取り上げられるようになり，社会的関心が強まっている。医学・生物学において動物実験はどのように位置付けられるべきか，動物実験の倫理とはいかなるものかというテーマは動物実験に携わる研究者，技術者にとって避けて通れない問題であるように思われる。今回は最近の動物実験をめぐる社会の動きと共に動物実験を行う際に心得ておくべき問題について話してみたい。

12. “神経細胞の核タンパク質の cDNA クローニング”

鈴木恵理香

（1992年11月16日）

我々は神経細胞の核を特異的に認識する抗体 5E5 を作製し，この抗体が認識するタンパク質の cDNA クローニングを行った。その結果，神経細胞に存在する未知の核内塩基性タンパク質であることがわかった。

13. “大脳基底核・淡蒼救外節ニューロンの活動”

加藤　誠

（1992年12月14日）

大脳基底核の入出力を結ぶ経路は，大きく 2 つに分けられる。1 つは “direct pathway” と呼ばれ，尾状核・被殻→黒質網様部・淡蒼球内節からなり基底核の出力の標的である上丘・視床を

脱抑制することにより運動を促進すると考えられている。もう一つは“indirect pathway”と呼ばれ，尾状核・被殻→淡蒼球外節→視床下核→黒質網様部・淡蒼球内節からなるが，こちらの経路の機能はわかっていない。そこで本研究では，サルを用いてこの経路の一部である淡蒼球外節から単一神経活動細胞外記録を行い，サルに眼球運動課題を行わせ，眼球運動のどのような側面に活動が関連するのか，どのような神経情報がこの経路を流れどのような機能を持つのかを検討した。

14. “刺激—放出関連から刺激—分泌関連へ”

菅野富夫

（1992年12月21日）

W. W. Douglas が stimulus-secretion coupling という言葉を提唱してから30年になる。この言葉はネコ副腎血管灌流標本をアセチルコリンで刺激したときのアドレナリン放出が灌流液中の $CaCl_2$ を除くとほとんど停止するという結果に基づいて提唱されたもので，Ca^{2+} が刺激と開口放出を連結するシグナルであることを表現している。その後，多種多様の分泌細胞の刺激—放出関連の研究が進められ，細胞内あるいは細胞外由来の Ca^{2+} がこの関連を連結しているという結果が多数発表されてきている。近年は，PI 回転説や Gp 蛋白の関与の研究がこの言葉の意味をさらに掘り下げている。腺房細胞などでは，分泌顆粒の開口放出と電解質・水の分泌とが関連しているので，刺激-分泌連関の訳のほうが適切である。ATP は後者に消費され，その産生のシグナルとしての Ca^{2+} の役割にも研究が進められている。Ca^{2+} シグナルが振動していることの意味も研究課題になっている。

15. “順向性栄養因子としてのカルシトニン関連ペプチドの合成調節機構”

樫原康博

（1993年１月11日）

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は，運動ニューロンと感覚ニューロンの，末梢終末端に存在する。運動ニューロン終末端の CGRP はニューロンから筋へ放出される順向性栄養因子として機能し，感覚ニューロン末梢終末端の CGRP は，血管拡張等に参与すると仮定されている。この運動ニューロン，感覚ニューロンの CGRP の１）合成調節機構，２）軸索輸送機構，３）放出機構，及び，４）栄養因子機能についての我々の研究を紹介する。

16. “ラット海馬における神経活動と遺伝子発現”

小幡邦彦

（1993年１月18日）

神経の活動にともない遺伝子発現が変化する。これが脳機能の長期的変化の基盤ではないかと考えられる。キンドリングやけいれん後のラット脳についての分析を紹介し，あわせて最近導入した光学計測システムによる海馬スライスの活動記録を示す。

17. “神経分化と遺伝子発現”

池沖一裕

（1993年２月１日）

脳神経系は多種多様の細胞集団から構成されているが，それらの大部分は発生初期には比較的均一であると考えられている神経上皮細胞から発生・分化する。我々はその分子機構を明かにするために脳特異的に発現している遺伝子群の発現制御機構を研究している。従来我々はニューロンとグリア細胞の分化を決定する因子の同定を目的として実験してきたが，生理研において新たにニューロンの成熟過程を電位依存性カリウムチャンネル遺伝子の発現を通して解析しようと考えている。本セミナーにおいてはこの研究を開始するのに至った歴史的背景と研究方針について発表するので，多くの方々のご意見，ご指摘をいただきたい。

18. “グリア細胞特異的遺伝子の発現制御”

中平健祐

（1993年２月15日）

多様な細胞が混在する系での遺伝子のプロモーター活性調節を明かにするために，レトロウィルスベクターを用いて脳初代培養細胞系でのプロモーター活性測定系を作成した。本セミナーではこの系の特徴と，これを用いて検討したグリア線維性酸性蛋白質遺伝子，ミエリン塩基性蛋白質遺伝子のプロモーターと，プロモーター活性化の時期について発表したい。

19. “誘発 MEG による皮質聴覚野の活動観察”

栗城真也

（1993年 3 月15日）

純音やノイズバーストを刺激音として誘発される MGE 活動源は，シルビウス溝内の聴覚皮質に位置する。ヒトに特徴的な音である母音は単音節を用いて MEG 解析を行うと，皮質内での変化に富んだ活動が観測される。

20. “消化管粘膜上皮でのイオン輸送調節について”

桑原厚和

（1993年 3 月22日）

消化管粘膜上皮での水やイオンの輸送は，生体の恒常性を維持するために重要であると考えられます。最近，粘膜上皮でのイオン輸送調節に，消化管内に存在する壁内神経叢が重要な役割を演じていることが明かになりつつあります。今回は，壁内神経系による消化管粘膜上皮でのイオン輸送調節について紹介したいと思います。

生理学研究所年報　第14巻

発　　行　1994年3月25日

編 集 者　山 岸 俊 一

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
電話　〈0564〉55-7700
FAX　〈0564〉52-7913