岡崎国立共同研究機構

生理学研究所年報

第 15 巻



1994

はじめに

生理学研究所年報第15巻が出来あがりました。生理学研究所における1993年度の研究活動が要約されております。この年度には，従来からの部門および施設の活動に加えて，1992年度以降に人事の交代が行われた部門での，スタッフ，設備の整備が進み，研究活動が軌道に乗って来ました。従来の生理学研究所にみられなかった方向の芽生えをお読み取り戴けることを願っております。この刷子を研究所の将来に向けての小さな milestone としてお届けいたしますので御高覧のうえ，御叱正と御教示を賜わりますようおねがいいたします。

1994年12月

濱　清

主な職員（1993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	丸山　敬（1993.10.1～）
助　手	児島伸彦
〃	山肩葉子
特別協力研究員	STORK Oliver（1993.4.1～1994.3.31）
〃	楊　国瑞
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
外国人研究員	AMMER. Ute（～1993.8.31）
〃	Sergei Andreevich Dzuba（1993.12.1～1994.2.28）
特別協力研究員	JANUSZ KOSCIELNIAK（1993.11.2～1993.11.22）

細胞内代謝部門

客員教授	菅野富夫
客員助教授	佐藤洋一
助　手	桑原厚和
〃	葉原芳昭
大学院学生	BUSIK. Julia V.
特別研究学生	田中敬子
〃	丹羽光一

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	浅賀知也
〃	大林雅春

能動輸送研究部門

客員教授	高井義美
客員助教授	貝淵弘三
助　手	白瀧博通
特別研究学生	沼田真一郎
〃	萩　誠一
〃	山口宣秀（～1994.3.31）
〃	吉松忠憲（～1994.3.31）
協力研究員	林　孝彰（～1994.3.31）

機能協関研究部門

教　授	岡田泰伸
助教授	老木成稔
助　手	樫原康博
〃	挟間章博
特別協力研究員	林　誠治（1993.4.1～1994.3.31）
〃	山本　隆（1993.4.1～1994.3.31）
〃	C.A.R. BOYD（1994.2.28～）
〃	GUY ROY（1993.3.6～1994.3.24）

助　手　富永真琴
特別協力研究員　森島繁（1993. 4. 1～1991. 3.31）
〃　立田浩（1993. 4. 1～1994. 3.31）

生体情報研究系

神経情報研究部門

教　授　池中一裕
助教授　大塚輝彌
助　手　中平健祐
〃　鹿川哲史（1994. 1. 1～）
受託研究員　吉松忠憲（1993. 4. 1～1994. 3.31）
協力研究員　林孝彰
特別研究学生　田村雅一
〃　藤本一朗（1993. 4. 1～1994. 3.31）
〃　平野穣（～1994. 3.31）
〃　山田真久
〃　山口宣秀

高次神経機構研究部門

助　手　八木健（1993. 9. 1～）
大学院学生　渡部聡（1993.10. 1～）
〃　甲斐信行（1993.10. 1～）

情報記憶研究部門

客員教授　金子章道（1993. 4. 1～）
客員助教授　中谷敬（1993. 4. 1～）
助　手　倉橋隆
外国人研究員　Pautler Eugene, L.（1993. 9.21～1994. 3.31）

大学院学生　櫻井孝司
特別研究学生　久保町子

液性情報研究部門

教　授　月田承一郎
助　手　月田早智子
〃　米村重信
〃　永渕昭良
特別協力研究員　安田宝子（1993. 4. 1～1994. 3.31）
〃　長嶋浩貴（1993. 4. 1～1994. 3.31）
学振特別研究員　伊藤雅彦
〃　船山典子
大学院学生　武内恒成
〃　佐藤成樹
〃　石原悟
〃　竹田寛
〃　古瀬幹夫
〃　榊原明
特別研究学生　笠原英子
〃　川島明代志
〃　近藤隆久
〃　平瀬徹明
〃　土井喜宣

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門

教　授　彦坂興秀（～1993. 8.31）
助　手　加藤誠
〃　宮下暢夫（～1994. 3.31）
〃　宮内哲（～1993. 9.30）
特別協力研究員　加藤美弥（～1993. 6.17）
〃　ZOLTAN KARADI（1993. 7. 1～1993. 9.30）
受託研究員　岡村宏樹（1993. 4. 1～1994. 3.31）
大学院学生　宮下加枝（～1994. 3.31）
〃　宮地重弘（～1994. 3.31）

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
助　手　稲瀬正彦
外国人研究員　HALSBAND, Ulrike（～1994. 8.31）
特別研究学生　進藤克博
外国人研究員　SAKAI Sharleen T.（1994. 3. 1～）

生体システム研究部門

	教授	森 茂美 (1993. 4. 1～)		助手	山口和彦 (～1993. 8.31)
	助教授	松山清治 (1993.12. 1～)		特別研究学生	本間 裕
	助手	岩切裕昌 (1993.10. 1～)		〃	横山貴康
	〃	宮下英三 (1993.11. 1～)			

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		教授	柿木隆介
	助教授	南部篤		非常勤の講師	小山幸子 (1993. 9.21～1994. 3.31)
	助手	松崎竜一			
	〃	達本徹 (1993. 4. 1～)			
	〃	久寶真一 (1993. 4. 1～)			

感覚・運動機能研究プロジェクト

	教授	柿木隆介			
	非常勤の講師	小山幸子 (1993. 9.21～1994. 3.31)			

自律機能研究プロジェクト

	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 (～1993. 7.16)		特別協力研究員	中村豊英 (1993. 4. 1～1994. 3.31)
動物実験施設	助教授	尾崎毅		特別協力研究員	鈴木貴祐 (1993. 4. 1～1994. 3.31)
	特別協力研究員	魏睦新			

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		係長	小原正裕
	〃	大河原浩		技官	池田晃子
	〃	高木正浩		〃	佐藤茂基
	〃	阿部ゆかり		〃	山本友美
	〃	葛目博子 (1993. 4. 1～)		〃	奥村絵美 (1993. 4. 1～)

細胞機関研究系技術係

	係長	小原正裕			
	技官	池田晃子			
	〃	佐藤茂基			
	〃	山本友美			
	〃	奥村絵美 (1993. 4. 1～)			

生体情報研究系技術係

	技官	伊藤嘉邦			
	〃	大石久美子			
	〃	水谷裕美			
	〃	関口直美			

生体調節研究系技術係

	技術主任	瀬尾道			
	技官	吉友美樹			
	〃	戸川森雄			
	〃	高須千慈子			
	〃	村瀬覚哉			

研究施設技術班

生理機能技術係

係長	市川　修
技術主任	伊藤昭光
技官	水谷文保
〃	吉村伸明
〃	尾崎有香 (1993. 4. 1—)

実験動物技術係

技官	佐治俊幸
〃	小木曽　昇

工作技術係

係長	加藤勝己
技官	山口　登

統合生理技術係

技官	永田　治
〃	森　将浩
〃	竹島康行

電子顕微鏡技術係

係長	前橋　寛

1993年度　生理学研究所年報

目　　次

はじめに

主な職員（1993年度）

研究活動報告

分子生理研究系 …… 9
細胞器官研究系 …… 35
生体情報研究系 …… 55
生体調節研究系 …… 72
統合生理研究施設 …… 84
生理機能研究施設 …… 100
動物実験施設 …… 106
技術課 …… 109

研究発表

発表論文 …… 129
学会発表 …… 162

共同研究報告 …… 193

磁気共鳴装置共同利用実験報告 …… 273

超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告 …… 315

生体磁気計測装置共同利用実験報告 …… 341

研究会報告 …… 347

国際シンポジウム

生理研コンファレンス …… 561

新プログラム国際シンポジウム報告 …… 567

セミナー報告

生理研セミナー …… 575
昼食セミナー …… 587

研究活動報告

〔目　　次〕

分子生理研究系

神経化学研究部門 …… 9

概　要

海馬 CA1 錐体細胞脱落後の動物行動変化と分子・形態学的変化
（小幡邦彦）

神経海馬回路におけるアルツハイマー病アミロイド蛋白質の発現の解析
（丸山　敬，小幡邦彦）

シナプス可塑性におけるリン酸化の役割
（山肩葉子，小幡邦彦）

黒質網様部ニューロン・チロシン水酸化酵素の抗精神薬による発現変化
（Oliver Stork，小幡邦彦）

超微小形態生理研究部門 …… 12

概　要

磁場掃引方式電子スピン共鳴における信号処理についての考察
（亘　　弘）

分泌中の唾液腺全 Na 輸送に対する各 Na 輸送体の寄与
（村上政隆，瀬尾芳輝，石川　透）

赤血球内 Na^+ の非等方的運動とその局在の検討
（瀬尾芳輝）

パルス磁場匂配 NMR 法による細胞内含 ^{19}F-化合物の制限拡散の解析
（瀬尾芳輝，Ute Ammer，石川　透，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 maxi-k チャネルの役割（石川　透，村上政隆，瀬尾芳輝）

細胞内代謝研究部門 …… 22

概　要

膵腺房細胞における Ca^{2+} 動態の解析：局所投与法による検討
（葉原芳昭，佐藤洋一，菅野富夫）

分泌細胞の細胞内 $Na^+ \cdot K^+$ 濃度の蛍光色素を用いた ratiometry による解析（葉原芳昭，菅野富夫）

レーザー共焦点走査顕微鏡を用いた indo-1 ratiometry による膵腺房細胞 Ca^{2+} 動態の解析（葉原芳昭，中村　竜，坂口一紀，菅野富夫）
マウス回腸陰窩上皮細胞の細胞内カルシウム動態に関する研究
（佐藤洋一，葉原芳昭，菅野富夫）
EFFECT OF SK&F 96365 ON NICOTINIC OR MUSCARINIC AGONIST-INDUCED Ca^{2+} DYNAMICS IN RAT ADRENAL CHROMAFFIN CELLS.
(Julia Busik, Yoshiaki Habara, Akira Warashina, Tomio Kanno)
Procaine をはじめとした局所麻酔薬の膵腺房細胞 Ca^{2+} 動態および分泌に対する効果（池井暢浩，葉原芳昭，Julia Busik，菅野富夫）
高濃度 CCK-8 刺激による細胞障害に関する形態学的検討
（Timo Nevalainen，葉原芳昭，佐藤洋一，菅野富夫）

細胞器官研究系

生体膜研究部門 …… 35
概　要
イカ巨大神経細胞内 Ca 灌流によって発現する Cl コンゴクタンス
（山岸　俊一，筒井泉雄，古家喜四夫）
イカ巨大神経線維ナトリウムチャネルの機能の尿素による修飾
（久木田文夫）
乳腺上皮細胞におけるカルシウム流入制御機構
（古家喜四夫，山岸俊一，榎本浩一）
モルモット輸精管の部位による収縮特性
（加藤健一，筒井泉雄，山岸俊一）
モルモット輸精管平滑筋のKチャネルの研究
（森本克士，久木田文夫，山岸俊一）

機能協関研究部門 …… 41
概　要
細胞容積調節機構とイオンチャネル
（久保町子，老木成稔，富永真琴，森島　繁，岡田泰伸）
消化管上皮細胞の吸収・分泌機構とイオンチャネル（岡田泰伸，林　誠治，立田　浩，挾間章博，堀江　稔，津浦佳久，清野　裕）
イオンチャネルの構造・機能相関
（老木成稔，岡田泰伸，内匠　透，中西重忠）
心筋細胞機能とイオンチャネル
（富永真琴，林　誠治，岡田泰伸，堀江　稔，松森　昭）

運動神経細胞に対する栄養因子 cDNA を有する鶏胚下肢筋 cDNA ライブラリーの作成（樫原康博，久野　宗）
Na ―グルコース・シンポータのゲート電流
（挾間章博，D. D. F. Loo (UCLA), E. M. Wright (UCLA)）
能動輸送研究部門 …… 52
概　要
Rabphilin-3A の Ca^{2+}・ホスフォリピッド結合活性
（山口　務，白瀧博通，貝淵弘三，沼田真一郎，高井義美）
Rabphilin-3A の *Rab3*AGAP に対する抑制作用
（岸田昭世，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 …… 55
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性突然変異マウスの解析
（鹿川哲史，山田真久，山口宜秀，池中一裕）
組織特異的に遺伝子発現を行うレトロウイルスベクターの開発と遺伝子治療への応用（吉松忠憲，田村雅一，中平健祐，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）
錐体におけるオプシン輸送小胞の日周期変動
（平野　穣，大塚輝彌）
液性情報研究部門 …… 62
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）
220KDAJ 裏打ちタンパク質，ZO-1 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）
アンチセンスオリゴを用いた ERM 蛋白質の機能の解析
（武内恒成，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膜蛋白質，オクルディンの同定（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 …… 67
概　要
Fyn 欠損マウスの形態・行動異常の解析
（八木　健）
Fyn が機能する学習領域の決定
（渡部　聡，光村直洋，八木　健）
脳神経形成・学習に関連する新たな情報伝達分子の同定
（安田昌弘，八木　健）
Yeast 系を用いたマウス脳神経形成を司る分子の同定
（甲斐信行，八木　健）
脳神経形成過程を司る遺伝子発現調節分子の同定
（光村直洋，八木　健）
新たな薬剤耐性遺伝子，胚操作法を用いたマウス胚幹細胞遺伝子操作法の
開発（渡部　聡，八木　健）
NMDA レセプター分子欠損マウスの作製
（三品昌美，八木　健）
マウス，コラプシンの単離と遺伝子欠損マウスの作製
（谷口雅彦，渡部　聡，成瀬一郎，八木　健）
情報記憶研究部門 …… 70
概　要
網膜色素上皮に発生する光応答の発生機序
(Eugene L. Pautler)
生体調節研究系
高次神経性調節研究部門 …… 72
概　要
サルの手続き的学習における予測的眼球運動の役割
（宮下加枝，宮地重弘，彦坂興秀）
手続き記憶の神経機構
（宮地重弘，宮下加枝，カラデイ＝ゾルタン，加藤美弥，彦坂興秀）
淡蒼球外節の可逆的ブロックによる眼球の対側偏位
（加藤　誠，彦坂興秀）

誘発電位による CROSSMODAL ATTENTION の研究
（宮内　哲）
生体システム研究部門 …… 78
概　要
筋緊張の制御にかかわる脳幹・脊髄神経機構
（森　茂美，松山清治，宮下英三，岩切裕昌）
吻側橋網様核からの単一下行性軸索の脊髄内投射様式
（松山清治）
運動学習の獲得過程に於ける大脳皮質体性感覚野の役割
（宮下英三）
睡眠・覚醒位相と内側橋網様体におけるセロトニンの細胞外液レベルとの関係（岩切裕昌）
高次液性調節研究部門 …… 81
概　要
被殻の運動制御におけるドパミン受容体サブタイプの役割
（稲瀬正彦，瀬尾　道，丹治　順）
統合生理研究施設 …… 84
概　要
高次脳機能研究プロジェクト
暗算・思考過程における前頭葉脳磁場の研究
（佐々木和夫，達本　徹，南部　篤，松崎竜一，久宝真一）
１次および２次体性感覚野における誘発脳磁場応答
（南部　篤，松崎竜一，久宝真一，達本　徹）
感覚・運動機能研究プロジェクト
ダウン症候群での誘発電位異常
（柿木隆介）
ヒトの体性感覚誘発磁場の検索
（柿木隆介，小山幸子）
ヒトの痛覚認知機構の生理学的検索
（柿木隆介，小山幸子）
自律機能研究プロジェクト
ヒト聴覚皮質における音声誘発反応源の動的特性
（栗城真也，沖田善光）
生理機能研究施設
生体機能検査室 …… 100

概　要
PACAP による消化管血流の調節
（成瀬　達，中村豊英，軒原清史）
組織培養標本室 …… 102
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性質
（古家園子，尾崎有香，中山　孝）
超高圧電子顕微鏡室 …… 103
概　要
超高圧電子顕微鏡の低倍像における平行投影近似と解像度：対物絞りの効果（有井達夫，吉村伸明，濱　　清）
動物実験施設 …… 106
概　要
モルモット小腸壁内神経叢ニューロンの電気活動導出の試み
（尾崎　毅，佐治俊幸，小木曽昇）
技術課 …… 109
研究系技術班
研究施設技術班
1．統合生理研究施設
(1)　生体磁気計測室
2．生理機能研究施設
(1)　生体機能検査室
(2)　組織培養標本室
(3)　超高圧電子顕微鏡室
(4)　電子計算機室
(5)　磁気共鳴装置室
3．動物実験施設
4．共通施設
(1)　電子顕微鏡室
(2)　機器研究試作室
(3)　低温冷凍実験室

分子生理研究系

神経化学研究部門

【概要】

神経系の長期的・反復的活動により分子レベルの永続的変化が引き起こされることが，学習・訓練などにつながる脳可塑性の基盤であると考えられる。このような変化はタンパク質レベル，遺伝子レベル，ひいては微小形態レベルで起こっているはずである。本部門では慢性電気刺激によるキンドリング，薬物誘発けいれん，ニューロン脱落後などにみられる可塑的現象につき，その分子メカニズムを明らかにすることを目標としている。分子クローニング，in situ ハイブリダイゼーション，タンパク質解析など分子生物学的，細胞生物学的技術を中心とし，動物行動解析や光学的神経活動計測を組み合わせた総合的研究を行っている。

本部門では前年度末に5名が転出，海外留学したが，本年度は東京都臨床医学総合研究所研究員丸山　敬を助教授に迎えた。特別協力研究員 Oliver Stork は1年半の滞在を終えて，チューリッヒ市の神経生物学研究所に移った。

海馬 CA1 錐体細胞脱落後の動物行動変化と分子・形態学的変化

小幡邦彦

動物で海馬を破壊すると空間学習が障害され，虚血やけいれんなどで海馬錐体細胞の変性脱落が起こりやすい。海馬で比較的短期に起こる長期増強や虚血性ニューロン死の機構はよく研究されているが，長期的変化については不明の点が多く，細胞脱落後も代償的，可塑的変化が進行しているのではないかと考えられ，本研究を行っている。

生後4週の Wistar 系雄ラットにカイニン酸 12mg/kg を皮下注射した。典型的な辺縁系けいれん発作とけいれん重積状態が起こってから1－3時間後にジアゼパム投与によりけいれんを停止させた。2日後から海馬 CA1 で錐体細胞の変性脱落がみられ，しだいにグリア細胞の浸潤が増加した。空間学習の指標とされる Morris 水迷路学習はけいれん後2週間は不良であったが，1－2か月後は正常であった。

脱落部の錐体細胞層でも小数のニューロンは残存しているが，ゴルジ染色や MAP2 免疫染色でみると，それらの樹状突起の走行が変化していた。またアストロサイトの一部は GABA およびその合成酵素の GAD に対する強い免疫反応性を示した。脱落部で残存成分に突起伸長，シナプス再編等の可塑的変化があり，行動変化に対応しているか否かをさらに検討する。

神経海馬回路におけるアルツハイマー病アミロイド蛋白質の発現の解析

丸山　敬，小幡　邦彦

高齢者の痴呆の原因としてアルツハイマー病 (AD) が注目されている。この疾患には，細胞内に出現する神経原線維変化と細胞外の老人斑という明瞭な形態的病理学的変化がある。これらが痴呆の直接の原因であるかは，確定されていないが，老人斑の周囲には著しい神経変性が観察されることや，老人斑がADに比較的特異的に観察される病理変化であることなどから，老人斑の出現が一義的な現象であるとの考えがある。

老人斑の主成分はアミノ酸40数個のタンパク質（β/A4 タンパク質：β/A4）である。クローニングの結果から，β/A4 は前駆体（アミロイド前駆体：APP）に由来することが明らかとなった。APP は正常な神経細胞にも存在するために，AD では，なんらかの代謝異常によってβ/A4 が蓄積してくると考えられる。

まず APP の代謝を詳細に検討するのに必要な抗血清の作成を行った。β/A4 部位と，そのC末側で膜貫通領域直後のペプチドを合成しウサギに注射することによって，それぞれの部位に特異的で，免疫沈降に使用できる抗血清が得られた。

APP は神経細胞では極く僅かしか発現されていないので，培養細胞で遺伝子導入による cDNA の発現を応用した。サル腎臓線維芽細胞由来の COS 細胞で APP 全長を発現させたところ，すでに報告されているようにαセクレターゼによる分泌系が主な代謝経路であり，β/A4 の生成は観察されなかった。培養上清には比較的高濃度の APP のN末側断片（nexin Ⅱ類似断片）が確認された。APP 分子のうちβ/A4 以下C末側100個のペプチド (C100) を発現させたところ，γセクレターゼによりβ/A4 の生成が観察された。こうして nexin Ⅱとβ/A4 を含んだ試料を比較的容易に調整することが可能になった。

ラット海馬スライスは神経回路のモデルとして研究が進められている。とくに長期増強は記憶の機構として注目されている。AD の主症状は記憶障害である。本研究により nexin Ⅱ型 APP 断片やβ/A4 断片が比較的容易に調整できるようになった。AD 関連物質が海馬スライスの電気活動に及ぼすを検討することが可能になり，AD の病因の解明に有用であることが期待される。

シナプス可塑性におけるリン酸化の役割

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ヶ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の点が多い。我々は，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ている。これまでに，カルモジュリンキナーゼⅡの特異的基質のひとつであり，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るシナプシンⅠを取りあげ，そのリン酸化が，キンドリング完成後の海馬，大脳皮質において特異的に上昇していることを明らかにした。さらに，この結果から予想される，神経終末からの神経伝達物質の放出増大が，実際にキンドリング状態で起っているかどうかを，キンドリングおよびコントロールラットの大脳皮質から調製したシナプトソームを用いて検討した。その結果，代表的な興奮性神経伝達物質のひとつであるグルタミン酸の脱分極刺激によるシナプトソームからの放出が，キンドリングサンプルにおいて優位に上昇していることが観察された。以上の結果から，キンドリングにおけるシナプス伝達効率の上昇に，シナプス前の要因として，カルモジュリンキナーゼⅡによるシナプシンⅠのリン酸化の上昇が機能的に関与していることが示唆された。

黒質網様部ニューロン・チロシン水酸化酵素の抗精神薬による発現変化

Oliver Stork，小幡邦彦

黒質のドーパミンニューロンはドーパミンを標的部の線条体等で軸索末端から，また黒質内でも樹状突起から放出することにより，黒質線条体系で中心的な役割を果たしている。またドーパミンニューロンの活動はGABA性の抑制系によって調節されている。ドーパミンニューロンにおける律速的合成酵素であるチロシン水酸化酵素THの活性はさまざまなメカニズムで調節されているが，遺伝子発現レベルではまだ明らかでない。本研究ではラットにおいてドーパミンニューロンの活動レベルをドーパミン系およびGABA系薬物で変化させたときのTH mRNAの細胞内変化をin situハイブリダイゼーションで，免疫組織化学によるTH蛋白の変化と合わせて，検討した。

抗精神薬でドーパミン・アンタゴニストのハロペリドールを投与すると，数時間後に黒質網様部でドーパミンニューロンの数が70パーセント増加した。これはmRNAと蛋白で同様にみられた。アゴニストのキンピロールを単独投与するとドーパミンニューロン数は変化しなかったが，

併用するとハロペリドールに拮抗した。これらの結果はドーパミン性伝達が低下するとこれを補償する方向にTH遺伝子発現が変化してドーパミン合成が増加するためと解釈される。

つぎに6－ハイドロキシドーパミンを黒質内に注入してドーパミンニューロンを破壊しておいたラットにつきハロペリドールの効果をしらべた。この場合にはドーパミンニューロンの増加は起こらず，上記の増加は検出限界以下であったドーパミンニューロンにおいてTH発現が高進するためであって，非ドーパミン性ニューロンがドーパミン性に変化するのではないと結論された。

つぎにGABA作用を増強する抗精神薬のジアゼパムを投与するとハロペリドールと同様に黒質網様部でドーパミンニューロンの数が増加した。GABAはドーパミンニューロンに作用してドーパミン放出を抑えることがしられているので，ハロペリドールの場合と似てドーパミン性伝達が低下してドーパミンニューロン数を増加させると解釈された。GABAアンタゴニストのピクロトキシンは予想外にもジアゼパムと同様にドーパミンニューロンを増加させたが，これはけいれん誘発などピクロトキシンの持つ広範な作用によるものと考えられた。

TH遺伝子の発現はサイクリックAMPなどによって調節されると考えられるが，この場合の発現機構は今後の研究課題である。

超微小形態生理研究部門

【概要】

超微小形態部門は，生体に存在するイオンや種々の生体分子の特徴的な秩序構造，それに伴う特異的な物理化学的挙動や超微小構造がとのようにマクロな生理機能とむすびつくのか，またこの維持に必要なエネルギー代謝を総括的に研究するために設立された。このために，生体高分子から個体レベルまでを対象として，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，可視および蛍光分光法を用い，分子運動，物質輸送，エネルギー代謝を主テーマに研究を進めている。

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。今年度は，イヌ赤血球細胞内Na^+イオンの動的挙動を二量子フィルターNMR法を用い測定し，細胞内Na^+イオンのうち非等方的挙動を示す分画を検討した。また，基質輸送機構を研究する新手法開発の一環としてパルス磁場勾配F-19NMR法を用い，フッ素でラベルした基質の細胞内外での拡散速度を測定した。

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。本年は，顎下腺灌流標本の静脈側K流出の薬理学的特徴とチャネル活性を比較し，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検討した。その結果，従来想定されてきたBKチャンネルの寄与はかなり少ないことが明らかになった。継続課題として，アンモニウム・パルス実験中にK流出を起こすKチャネルについて検討した。

エネルギー代謝グループは，P-31NMRや酸素消費測定を行い，輸送グループと連携し輸送活性とエネルギー供給系の活動機構を研究しているが，これに加え，磁気共鳴装置室の活動に記載した医学・生物学領域における多核種磁気共鳴法の開発と応用の一環として多くのP-31NMRによる実験をサポートしている。

最近5年間，東は，意識について理論研究を進めており，生命とは，意識のことで，「意識は，2系の，確率の振幅である」という理論的な根拠を得たとしており，「確率の振幅」とは物理学の用語で，その値を自乗すると確率が得られるというベクトル量に過ぎず，「確率の振幅」の「働き」が質量とエネルギーを変換する主体であるという視点にたつと「1即全」の「理論的な展開が可能になる」としている。

平成5年11月ノボスビルスク大学よりDr. Selgei A. Dzubaが文部省外国人研究者として共同研究のため3月間滞在した。文部省外国人研究者のDr. Ute Ammer（マックスプランク生物物理研究所）は，1年間の共同研究を終え平成5年8月帰国した。平成5年10月にミネソタ大学(USA)のJ. -H. Lee, UCSF (USA)のW. D. Roony, オックスフォード大学（連合王国）のS. Wimperis, NIH (USA)のJ. J. Pekar, アラバマ大学バーミンガム校(USA)のM. M. Pike, テルアビブ大学(イスラエル)のG. Navon, H. Shinar, U. Eliav, 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M. C. Stewardが平成6年3月に来所し，共同研究を行なった。亘弘は，8月に，第32回国際生理科学連合大会（グラスゴー）および第12回国際磁気共鳴医学会（ニューヨーク）に出席した。村上政隆は，7月に15日間，コペンハーゲン大学パーナム研究所（デンマーク）にて外分泌腺細胞内情報伝達系測定について，マンチェスター大学（連合王国）にて，灌流臓器の二波長蛍光分光測定についての情報交換と共同研究打ち合せを行ない，帰途第32回国際生理科学連合大会（グラスゴー）に参加した。瀬尾芳輝は，8月にUCSF（サンフランシスコ），UCSC（サンタクルズ），SUNY（ストニイブルック）にてNMR緩和成分の分離測定法による3/2スピン核の動的挙動解析について共同研究を行い，帰途第12回国際磁気共鳴医学会（ニューヨーク）に参加した。また瀬尾芳輝は，11月に14日間，マンチェスター大学（連合王国）にて二量子フィルター画像法についての共同研究，ブ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，大河原浩技官が技術支援のため参加した。石川　透は，12月に10日間，ロンドン大学，マンチェスター大学（連合王国）にて外分泌腺細胞のKチャネル活性とマクロのK流出量について情報交換と研究打ち合せを行った。

磁場掃引方式電子スピン共鳴における信号処理についての考察

亘　弘

最近生体で生理機能に障害を与えると云うフリーラヂカルの存在が問題となっている。その検出には電子スピン共鳴(ESR, electron spin resonance)が利用され，さらにこれを画像化して局在情報の検出までされる様になってきている。しかしその測定にはNMR-CT(MR1)で使われているパルスFT方式とは異なり，従来より使われてきた磁場掃引方式のCW-ESRがもちいられる場合の方が多い。つまりCW方式は磁場変調を与えて，この変調周波に対する位相検波をおこなって，信号検出を行っている。そして位相検波の際，変調周波数と同一の周波数に対しては第1高調波の，あるいは変調周波数の倍の周波数に対しては第2高調波のスペクトルを得ている。CW-ESRがもちいられるのは，使い安さと感度的に有利なためである。

しかし，CW-ESRで慣習的に行って来た信号解析の解釈には，不可解な点がある。すなわち位相検波では元の信号を変調して入力し，同位相の信号のみ検出して，信号の大きさはそのままに再現されると云うのが原理である。ESR信号の場合，マイクロ波はダイオードで検波されて直流信号となるが，磁場変調のためこの周波数によって変調されている。ある固定した磁場において，ダイオード出力を直接オシロスコープで観測すれば明らかで，これを位相検波器に入力しても変調した同じ出力がえられ，同位相の信号のみを検出している。静磁場掃引の場合，出力側に吸収スペクトルを微分したような波形をえられるが，入力側では出力を積分した波形の吸収スペクトルであると考えてきた点に問題がある。

CW-ESRの信号は磁場変調波に対する正位相(in phase)のみならず，90°位相おくれ(out of phase)においてもあらわれる。特に高い電磁波強度をもちいる測定では，第2高調波スペクトルの90°位相おくれ(out of phase)の信号は顕著である。この事実は明らかに位相検波の概念とは異なり，磁場変調の効果が現れたと考えるべきである。

また第1高調波のスペクトルを積分した場合には，一回目は零で，二回目に積分値をもち，第2高調波のスペクトルを積分した場合には，一回目は零で，二回目も零で，三回目に初めて積分値をもち，これらの積分値を信号強度としてきた。しかしある位相角度で第2高調波のスペクトルを積分した場合，積分値を持ち，特に高い電磁波強度をもちいる測定では積分値は顕著である。この事実もスペクトルはそのままスペクトルとして得られると云う位相検波の常識に反する。さらにこの積分値は位相検波器の位相角度に依存して正弦波的に変動するので，したがってベクトル的な積分値が意味を持つことになり，通常の位相検波の概念を凌駕している。

さらにESR信号の線幅を超える磁場変調の振幅をもちいても，ESR信号は観測される。磁場変調の振幅がESR信号の線幅を超える事は信号波形を乱すため，許されないと教科書では教えられてきたのは，ある波形の入力から微分したような波形の出力になるという電子スピンの共鳴の信号処理についての考え方について整合しないためである。

つまりCW-ESRの信号処理の場合，磁場変調による効果が観測されているのに，この効果を位相検波の概念によって歪んで解釈されたものとおもわれ，従来からの解釈では理解されないのは当然であろう。したがって磁場変調をおこなっているCW-ESRの信号の解析のために，磁場変調を加えたブロッホ方程式の厳密解を求めることをこころみる。

分泌中の唾液腺全 Na 輸送に対する各 Na 輸送体の寄与

村上政隆，瀬尾芳輝，石川　透

＜緒言＞唾液腺腺房細胞の原唾液分泌は，基底側膜からのCl^-の二次的能動的取込みにより細胞内のClの電気化学ポテンシャルが持ち上げられ，これがCl^-の管腔への分泌の駆動力となると信じられている。Cl^-の二次的能動的取込みは中性共輸送体($Na^+/K^+/2Cl^-$)および二つの対向輸送体(Na^+/H^+, Cl^-/HCO_3^-)の両方が関与するとされている。能動的なK^+の取り込みと受動的なKの放出から，Kの二次的能動的取り込みは全K取り込みの20－30％でこれは$Na^+/K^+/2Cl^-$共輸送によると推定された[1]。今回，細胞内のNa^+を二量子フィルターNMR法により化学シフト試薬を与えずに，各輸送体のNa^+輸送量を測定し，酸素消費の結果とK^+輸送量の測定値をあわせ，分泌中に全Na^+輸送にどの程度寄与するかを推定した。

＜方法＞Sodium pentobarbital（50mg/kg体重）で腹腔内麻酔したラットより，顎下唾液腺を摘出した。腺(0.2g)は10mm径NMR試料管に設置し，拍動ポンプを用い修正Krebs液（100％酸素にて飽和，bicarbonate free）2ml/minの流速で動脈より灌流した[1]。灌流液の組成(mM)は：Na 146; K 4.4; Ca 1.0; Mg 1.o; Cl 149.4; glucose 5.0。10mM HEPESでpH＝7.4に調整。

細胞内外のNa^+はスピンエコー二量子フィルター法[2]で区別した。23NaNMRスペクトルは，WM/AMX360wb (Bruker, 8.45T)で95.24MHzに調整した10mm径広帯域プローブを用いた。スピンエコー二量子フィルター（D-90°-γ/2-180°-γ/2-90°-δ-90°-取り込み）は，32stepの位相まわし(creation time ＝ 6msec, double quantum evolution time ＝ 0.01msec, relaxation decay ＝ 0.4s)を用いた[1,3]。

静脈流出液と灌流液の酸素分圧はクラーク型の酸素電極によりポーラログラフ法で測定した。酸素消費速度は，酸素含量の動静脈差と灌流流量より計算した[1]。腺静脈よりの流出液は30秒毎に採取し炎光光度計にてK^+濃度を測定した。腺から静脈へ，また唾液への正味のK^+ fluxは，灌流液，静脈流出液，唾液のK濃度より計算した。

＜結果と考察＞

1）ウアバインによるNa^+/K^+ ATPaseの不活性化

アセチルコリン1μMの刺激により細胞内Na^+量は増加しプラトー値で安定した。静止時よりのNa^+増加分は26.9 ± 2.0mmol/l ICF（7.5-30minの平均，静止時の細胞内液量で標準化，

14glands の mean ± SE)。ウアバイン 1mM 添加により細胞内 Na^+ 量はさらに増加し，プラトー値 110.8 ± 8.4mmol/l ICF (30-90min の平均，5glands の mean ± SE)。アセチルコリン 1μM の刺激により酸素消費速度は上昇し，プラトー値で安定した。この酸素消費の増加分はウアバインにより用量依存性に抑圧された[1]。アセチルコリン 1μM の刺激により急激で一過性の K^+ 放出が静脈で観察された。持続分泌の間は唾液に放出される K^+ 量と血管系で取り込まれる K^+ 量が一致し，正味の腺からの放出はゼロであった。ウアバインを添加すると静脈への一過性の放出が認められた。これは，Na^+ /K^+ ATPase の不活性化が K^+ 放出の減少と比較して早いことを示唆している[1]。

2) フロセミドによる Na^+ /K^+ /$2Cl^-$ 共輸送の不活性化

アセチルコリン 1μM の刺激中にフロセミド 1mM 添加すると細胞内 Na^+ 増加分は減少し，静止時からの増加分は 20.9 ± 3.2mmol/l ICF (37.5-60min の平均，5glands の mean ± SE) となった。フロセミドを洗い流すと元のアセチルコリンによる増加レベルにもどった。これは，フロセミド投与中でも Na^+ /K^+ /$2Cl^-$ 共輸送以外の機構が Na^+ 流入を許し，Na^+ /K^+ ATPase による汲みだしでバランスしていることを示している。アセチルコリン刺激による酸素消費増加はフロセミド添加により増加分のうち50-60％減少した。細胞内 Na^+ レベルが比較的保たれているために，Na^+ /K^+ ATPase の活性が持続し，酸素消費上昇も残っていると，説明可能である。アセチルコリン刺激中 K^+ は血管系より取り込まれるが，フロセミドを添加すると取り込みが停止し，正味の放出も流出も認められなかった。フロセミドは唾液分泌を停止させるために導管より正味の K 分泌も停止するためと考えられる。

3) アミロライドによる Na^+ /H^+ 方向輸送の不活性化

アセチルコリン刺激中にアミロライド 1mM 添加すると細胞内 Na^+ 増加分は約80％減少し，静止時からの増加分は 4.8 ± 0.7mmol/l ICF (37.5-60min の平均，4glands の mean ± SE) となった。アミロライドを洗い流すと元のアセチルコリンによる増加レベルにもどった。細胞内の減少はアミロライドによる Na^+ /K^+ ATPase の不活性化とそれに伴う酸素消費速度の減少を説明する。今回の結果は Na^+ /H^+ 対向輸送がアセチルコリン刺激中の主たる Na^+ 流入経路であることを示唆している。アセチルコリンは 1μM の刺激による酸素消費増加は上昇し，アミロライド 1mM 添加すると細胞内 Na^+ 増加分の約90％減少した。アセチルコリン 1μM による持続分泌中の K^+ 取り込みは，0.1mM アミロライドでは減少しなかったが，1mM では緩やかに K^+ 取り込みが減少した。主導管を結札して分泌された唾液をバイパスして血管に戻すようにすると，持続分泌中の K^+ 取り込みは減少し，正味の腺からの放出はゼロとなる。ここで，アミロライドを添加すると一過性の K^+ 取り込みが認められた。これは，Na^+ /K^+ ATPase は不活性化しているので Na^+ /K^+ /$2Cl^-$ 共輸送による一過性の K^+ を示唆している。

4) 全 Na^+ 輸送に対する各輸送体の寄与

アセチルコリンおよびその阻害剤の投与による正味の Na^+ 流入／流出速度は，細胞内 Na^+ 量の変化速度から計算できる。二量子フィルター NMR 法で測定した細胞内 Na^+ 量は，以前報告し

た化学シフト試薬を用い23Na-NMRで測定し単一のローレンツ曲線として波形解析した値[4]よりも高い値である。さらに，実験を進めた結果[5]，細胞内はNa^+はbiexponentialで緩和することが明らかになり，biexponentialで緩和する成分のみを選択的に抽出できる二量子フィルターNMR法で再度測定した。今回の測定値は前の値のほぼ2倍であった。

正味のNa^+流入量は，アセチルコリンおよびその阻害剤の投与中の輸送体活性のバランスを基礎としている。中性共輸送体(Na^+ /K^+ /$2Cl^-$)および二つの対向輸送体(Na^+ /H^+，Cl^-/HCO_3^-)をNa^+流入の主たる機構と仮定すると，ウアバイン添加時のNa^+流入(13.3μmol/g-min)はNa^+ /K^+ /$2Cl^-$共輸送とNa^+ /H^+対向輸送が両方活性化されている場合の流量を示す。フロセミド投与時のNa^+流入(1.25μmol/g-min)は，Na^+ /H^+対向輸送とNa^+ /K^+ ATPaseのバランス，アミロライド添加時のNa^+流入(3.06μmol/g-min)は，Na^+ /K^+ /$2Cl^-$共輸送とNa^+ /K^+ ATPaseのバランスによると推測できる。

Na^+ /K^+ ATPase活性が一定でアセチルコリン刺激による持続分泌では，酸素消費も，細胞内電解質の濃度もプラトー値を維持しており，定常状態と想定される。今回仮定したNa輸送体間には，定常状態で(NaFlux by pump) + (NaFlux by cotransporter) + (NaFlux by antiporter) = 0が成立する。しかし，この定常条件と，今回のアミロライドおよびフロセミドの結果は同時に成立することは困難であった。定常条件をはずすと，アミロライド添加時にはNa^+ /K^+ /$2Cl^-$共輸送5.7μmol/g-minとNa^+ /K^+ ATPase8.8μmol/g-minの差による細胞内Na減少，フロセミド投与時にはNa^+ /H^+対向輸送は5.7μmol/g-minとNa^+ /K^+ ATPase8.8μmol/g-minの差による細胞内Na減少が起こったと計算できる。この結果は，Na^+ /H^+対向輸送：Na^+ /K^+ /$2Cl^-$共輸送＝4：3の比率で各輸送体が全Na^+流入に寄与していることを強く示唆している。

references

1．Murakami M et al (1990) J Physiol 426: 127-143

2．Seo Y et al (1993) Biochim Biophys Acta 1177: 111-116

3．Murakami M et al (1989) Pflugers Arch 414: 385-392

4．Seo Y et al (1987) Pflugers Arch 409: 343-348

5．Seo Y et al (1990) Biochim Biophys Acta 1034: 142-147

赤血球内Na^+の非等方的運動とその局在の検討

瀬尾芳輝

＜緒言＞

イヌ赤血球(RBC)内^{23}Naの二量子コヒーレンスに対応する共鳴信号を観測した結果，ラット灌流唾液腺細胞内の輸送可能な^{23}Na成分とは，緩和の様相が非常に異なっていた。通常のbiex-

ponential な共鳴に加えて，別の成分が二量子フィルターを通過した。この新たに観測された共鳴は，Eliav らが軟骨で（1992），Shinar らが赤血球で（1993）報告の配向した Na^+ イオンと関連する可能性がある。しかし，その局在部位はまだ不明である。

＜材料と方法＞

イヌ静脈血 5ml を健常成犬より採取，4℃にて0.9% Nacl 溶液で3回洗浄後，試験溶液（5mM DyTTHA など）に浮遊させた。^{23}NaNMR スペクトルは AMX-360wb (Bruker, 8.45T), MSL-100 (2.34T) spectrometer を用い，10mm 径広帯域プローブで観測した。T_2 二量子フィルター（D-90°-τ /2-180°-τ /2-90°-δ -90°-取り込み，T_2DQF90）および"マジックアングル" T_2 二量子フィルター（D-90°-τ /2-180°-τ /2-54.7°-δ -54.7°-取り込み，T_2DQF54.7）を用い測定した (Jaccard et al., 1986; Chung et al., 1990; Eliav et al., 1992)。FT スペクトルのピーク高を creation time（τ）を変え測定した。3番目，4番目のフリップ角を5°から200°までに変え，FT スペクトルのピーク高のフリップ角への依存性を観測した。

＜結果＞

1）T_2DQF 実験では，当初 RBC 浮遊液においても RBC 内 ^{23}Na はアルブミン溶液と同様の biexponential な挙動を示すと予測されたが，短い creation time の領域では逆位相の成分が出現した。T_2DQF スペクトルの線形は，アルブミン溶液では creation time に依存しないが，RBC 内 ^{23}Na の線形は，creation time に依存した。

2）non-zero T_{2l} を与える配向した Na^+ イオンの混入の可能性をチェックするために，T_2DQF54.7 を用い RBC を浮遊液を観測すると，フリップ角への依存性が認められた。creation time が 15msec の時は homogeneous な Na^+ の成分に，1msec の時は anisotropic な Na^+ の成分に対応する。creation time が 1msec では，フリップ角が54.7° の時最大値をとり，90° で0になった。creation time が 15msec では，フリップ角が54.7° の時0をとり，90° で最大値となった。これらのフリップ角への依存性は理論計算（Muller ら1987）とよく一致する。従って，この新しい信号は，平均化されない四極子モーメントを持ち，RBC 浮遊液の配向した Na^+ と対応すると考察される。

3）赤血球では配向した Na^+ の局在として3つの可能性がある。(1)ヘモグロビン，(2)細胞骨格タンパク（膜内面），(3)糖タンパク

4）濃縮ヘモグロビン中の Na^+ は通常の biexponential の緩和を示した（通常の生食でも DyTTHA 溶液でも）。freeze-thaw 法で赤血球を溶解した場合，DQF 信号は，通常の biexponential な挙動を示した。この観察からはヘモグロビンと Na^+ の強い相互作用の存在は支持されなかった。むしろ "intact" な赤血球膜構造の重要性が示唆された。

5）異方性の共鳴成分の化学シフトは化学シフト試薬 DyTTHA を溶液に加えても変わらなかったので，細胞内の Na^+ イオンの可能性が高い。T_2DQF90 で観測される細胞内 Na^+ の緩和に影響する因子は，(1)ヘマトクリット，(2) DyTTHA，(3) GdDTPA，(4)細胞外 pH，でありこれらの影響は可逆的であった。GdDTPA の濃度を上げると，T_2DQF90 で観測される homogeneous biex-

ponential な共鳴は減少し，T_2DQF54.7 で観測される anisotropic な共鳴も GdDTPA の濃度を上げると減少した。

6）赤血球膜外面に bound した Na^+ と細胞外液の Na^+ が比較的ゆっくり交換する可能性がある。8.45T で位相感受性 2D-NOESY を用い観測した結果，2, 20, 125msec の mixing time では cross peak は観測されなかった。2.34T で飽和移動 NMR を用いると，細胞内 Na^+ 共鳴を選択的に飽和しても細胞外の信号は2＋-1％の減少にとどまった。この信号減少は細胞外 Na^+ の T1 を 42msec とすると，70mmol/l ICF/sec に相当する。

7）現時点で明確な回答は得られていない。Defreitas ら（1990）は高濃度のシフト試薬，緩和試薬によって，赤血球の形が spiky になると報告している。このような膜の微小変化を T_2DQF54.7 で観測できるならば，膜の変形を感度よく観測できる手法として応用可能である。

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。

パルス磁場匂配 NMR 法による細胞内含 ^{19}F-化合物の制限拡散の解析

瀬尾芳輝，Ute Ammer，石川　透，村上政隆

医学生物学領域における ^{19}F-NMR 応用として，生体内に投与した ^{19}F ラベル化合物を用いての薬物代謝や膜輸送機構の観察が大きく進んでいる。しかしながら，F-19NMR においては in vivo で有効な化学シフト剤がないことなどから，細胞内外の信号を分離して観察することができなかった。これまで，in situ のラット腎による有機酸排せつ機構について蛍光分光法[1]，^{19}F NMR Spectorometry [2] を用い研究してきた。^{19}F-NMR の論文に対する批評のひとつに信号の定量性の不確実さがあげられた。in vivo では，化学シフト剤が細胞内外の信号を分離できないので，腎全体からの信号を観測していた。今回，細胞内分子の拡散速度が細胞外よりもかなり遅いと予測し，パルス磁場匂配 NMR 法[3]により細胞内の ^{19}F NMR 信号の分離を試みた。

＜方法＞ 1）ヒト健常ボランテイアより 5ml 採血，赤血球 (RBC) は0.9% Nacl 溶液で 3 回洗浄後，Steck と Kant の方法[4]でシールされた right-side-out のゴーストを得た。RBC ないしゴーストの浮遊液 2ml を 10mm 径 NMR 試料管に入れた。^{19}F NMR スペクトルは，2.34T，25℃で MSL-100 (2.34T, Bruker) スペクトロメータ，^{19}F RF コイル（15mm 径，94.2MHz），マイクロイメージングのプローブの組み合わせで測定した。化学シフトは外部標準として 5 % (trifluoroacetic acid/water solution) を用い測定した。RBC 浮遊液中の ^{19}F-化合物の拡散係数は STEPFG (stimulated echo pulsed field gradient sequences; d-90°-t_1-δ -t_2-90°-T-90 °-t_1-δ -t_1-90°-t_2-取り込み）で観測した。典型的な実験では，使用したパルス磁場匂配の強度は0.5から 4.0mT/cm まで16とおりに変化させ，90° パルスは 12μsec, t_1 1 msec, t_2 17-15 msec, △（パルス間隔＝ t_1 ＋ δ ＋ t_2 ＋ T）は 60-1000sec, δ （パルス匂配の幅）は 2-4 msec [5] とした。

＜結果と考察＞二種類の ^{19}F ラベル化合物を用いた。：ｉ）tetrafluorosuccinate (TFS, -41.6ppm) およびii）3-trifluorom ethylhippurate (TFMH, 13.3 ppm) [2] いずれの物質も最終濃度が 10mM になるように RBC 浮遊液に添加した。TFS については，細胞内外の信号は完全に重なったが，細胞内 TFMH の信号は，幅の広い共鳴線とシャープな共鳴線からなり 0.4ppm の化学シフトがあった。幅の広い共鳴線がシャープな共鳴線より 0.4ppm 低磁場よりにシフトしており，細胞内からの共鳴線と同定した。理由は１）幅の広い共鳴線の面積はヘマトクリット（細胞容積分画）に比例した。２）RBC 浮遊液に TFMH を添加すると幅広の共鳴線の分画が増加した。細胞内信号のシフト（Hz 単位）は Bo 磁場強度に比例し，溶血により信号が消えるから，細胞内信号のシフトは細胞内外の透磁率の違いによると考えられる。TFS でシフトが見えなかったことより，^{19}F の化学シフトは化学構造に強く依存することを示唆している。TFMH で観測された化学シフトは RBC 浮遊液で報告されている最も大きい化学シフト (0.1-0.25ppm [6]) の一つである。しかし，この内因性の化学シフトのみでは in vivo spectroscopy で細胞内外の信号を区別することは不可能である。

細胞内 TFMH の拡散係数を小さくする原因にはいくつか候補が上げられる。粘性，細胞壁による制限拡散やタンパク分子による分子横断の制限などが想定される。RBC 膜の TFMH 輸送は，TFMH の $1/T_1$ よりはるかに遅いので，まずは最初に細胞境界による制限拡散を考察する。シールされた right-side out の赤血球ゴーストは細胞内のタンパクや小分子は洗い流されているが，球形であることを除き，容積は同じである。そして，細胞内液組成は細胞外の溶液と同じである。5mM の燐酸バッファーで pH ＝ 8.0 に調整している。化学シフト試薬 DyTTHA を用い，Na-23NMR によりゴーストのシールと安定性を確認した。

ゴーストを材料に 5mM TFMH を与えると，ひとつの T_1 緩和をもつ単一の共鳴線を観測した。STESPG 実験では，biexponential な decay が観測された。遅い拡散係数は細胞内 TFMH，速い拡散係数は細胞外 TFMH と同定された。この biexponential な挙動は，細胞膜が制限拡散に寄与していることを強く示唆している。ゴーストにおける TFMH の拡散係数をいくつかの diffusion time （60msec から 1sec の範囲）で測定した。遅い拡散係数の値は diffusion time （$\triangle$-1/3δ）を増加させると有意に減少した。一方，早い拡散係数の値（細胞外の TFHM に対応する）は，一定値（約$0.55^{*}10^{5}cm^{2}sec$）を保った。拡散距離を計算すると ($R = (2D\triangle)^{1/2}$)，2.6μm であった。さらに，細胞内 TFMH の拡散係数および diffusion time は intact な赤血球浮遊液でもゴーストの浮遊液でもほぼ同じ値を示した。

＜結論＞ヒト赤血球および赤血球ゴーストを用いて，TFMH の拡散速度を拡散時間を変化させ測定した。拡散時間の延長にともない，細胞内分子の拡散速度の著しい減少が測定され，赤血球サイズに依存した制限拡散がみかけの拡散速度の減少に大きく寄与していることがあきらかになった。観察された細胞内フッ素化合物の遅い拡散係数は，細胞境界の制限拡散により主として説明できる。細胞内液の粘性や細胞内の巨大分子の影響は主たる因子ではない。

References
1. Ammer U.,Natochin, Y., Ullrich, k. J. Amer. Soc. Nephrology (1992)
2. Ammer U. & Juretschke, H. P., NMR spectroscopy in Nephrology (in press)
3. Seo, Y., Ammer U., Ishikawa, & Murakami, M. Proc. 12th Soc. Magn. Reson. Med, 611 (1993)
4. Steck, T. L., & Kant J. A., Methods in Enzymology, XXXI, 172-180 (1974)
5. Karger, J., Pfeifer, H., & Heink, W., Advances in Magnetic Resonance, 12, p.2-89 (1988)
6. London, R. E., & Gabel, S. A., Biochemistry, 28, 2378-2382 (1989)

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 maxi-k チャネルの役割

石川　透，村上政隆，瀬尾芳輝

パッチクランプ法により哺乳類の唾液腺では血管側膜に存在する maxi-K チャネル及び管腔側膜に存在すると考えられている CI チャネル活性がアセチルコリン (ACh) や細胞内 Ca イオン濃度上昇により増加することから，それらのイオンチャネルが唾液分泌に重要な役割を果たしていることが推察されている。前年度の研究では，ラット顎下腺を人工潅流液で血管潅流し，ACh 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-2CI 共輸送をウアバイン (1mM) とブメタニド (50μM) により抑制し，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，ACh は細胞内 Ca 濃度に依存する外向きKイオンフラックスが観察された。今年度は前年度の研究結果をもとにラット血管潅流顎下腺を用いて血管側膜を介する一方向性の Ca 依存性Kイオン輸送及び水分泌における maxi-K チャネルの役割を調べた。結果を一般化するために ACh のほかに細胞内 Ca 濃度上昇を介し生理活性を示すことがしられているサブスタンス P (SP)，またそれらのレセプターをバイパスするためにカルシウムイオノフォアである A23187 を用いた。それらの結果から ACh の大部分の反応，SP, A23187 による Ca 依存性のKイオンフラックスが maxi-k チャネル阻害剤であるテトラエチルアンモニウム (TEA) によりほとんど影響されないことが示された。またラット遊離腺房細胞標本も用いて単一チャネルおよびホールセルパッチクランプ法により，今回の実験に用いた TEA 濃度（5mM または 10mM）は maxi-K チャネルを完全に抑制することが示された。TEA は A23187 刺激による水分泌に対して抑制効果を示さなかったことから，Ca 依存性の血管側膜を介するKイオン輸送と水分泌に maxi-K チャネル以外のKチャネルが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。これらの結果は現在考えられている唾液腺腺房細胞からの水およびイオン分泌機構に重要な示唆を与えると考えられる。他の薬理学的な実験結果より ACh により活性化されるKチャネルはキニン，キニジン，バリウムにより抑制されるが，カリブドトキ

シン，４－アミノピリジン，リドカイン，ベラパミル，アパミンにより抑制されないことが示された。(pflügers Archiv, 印刷中)

細胞内代謝研究部門

【概要】

本部門ではニューロン・パラニューロンおよび各種分泌細胞の刺激－放出連関のメカニズムを解明することを研究課題としている。ここ数年もっぱら蛍光顕微測光と蛍光顕微画像解析を用いて開口放出始動に重要な Ca^{2+} イオンの細胞内動態を形態学とも組み合わせて探っている。消化管上皮細胞の細胞内 Ca^{2+} ダイナミックスの画像解析，高濃度刺激による膵臓の形態変化，局所投与法を用いた膵臓腺房細胞の Ca^{2+} ダイナミックスの解析，局所麻酔薬を用いた膵臓腺房細胞の Ca^{2+} ダイナミックスの解析，ラット副腎髄質細胞の自発性 Ca^{2+} 振動の解析などを部門の課題として行った。また年度後半には最新型の indo-1 対応レーザー共焦点走査顕微鏡画像解析装置を導入し，通常の顕微鏡による画像解析で障害となっているＺ軸方向からの信号の混入を除いた解析を行う準備にとりかかった。また新しい試みとして，fura-2-Ca^{2+} 測定システムをそのまま使用して細胞内 Na^{+} ·K^{+} の動態も解析した。共同研究は７件であり，旭川医大の大森行雄とはラット副腎髄質細胞機能の生後発達を，北海道教育大学の浅田尚登とは Mn^{2+} クゥエンチング法を用いた膵腺房細胞の Ca^{2+} ダイナミックスの pH 依存性について，福島医大の菅野隆治とはカエル心臓内神経節細胞の Ca^{2+} ダイナミックス解析の予備実験を，新潟大学の藁科彬とは副腎髄質カテコールアミン分泌と Ca^{2+} ダイナミックスについて，同大山口賢一とは副腎皮質球状層細胞の分泌と Ca^{2+} ダイナミックスについて，神戸大学の近藤隆とは膵腺房細胞 Ca^{2+} ダイナミックスの温熱感受性について，京都大学の大塩学而，岡田憲幸とは実験的膵炎腺房細胞の Ca^{2+} ダイナミックスについてそれぞれ共同研究を行った。

生理研研究会については『エネルギー代謝と細胞内シグナル』，『膵臓を中心とした臓器相関』，『クロム親和細胞：分泌現象の神経性調節』をお世話した。

菅野富夫と葉原芳昭は８月にスコットランドのグラスゴーで開催された第32回国際生理科学会議に出席した。また菅野は中国の北京で開催された国際胃腸ホルモンおよび胃腸運動カンファランスに参加した。

膵腺房細胞における Ca^{2+} の動態の解析：局所投与法による検討

葉原芳昭，佐藤洋一，菅野富夫

【目的】

膵腺房細胞における刺激－放出連関に伴う細胞内 Ca^{2+} 濃度勾配について局所投与法を用いて検討した。膵腺房細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度勾配については対立する２つの結果が示されている。すなわち，基底膜側－腺腔側勾配と腺腔側－基底膜側勾配の２つである。我々は，用いる刺激物質の濃度と標本の状態の２点がこの矛盾を解く重要な要因であろうと考えている。本研究では刺激物質の濃度と Ca^{2+} 濃度勾配の方向性に焦点をあてて，窒素ガス圧による局所パフ投与法を用いて検討を行った。

【方法】

ラット膵腺房細胞をコラゲナーゼ処理して遊離腺房標本を得た。fura-2 を負荷した腺房をカバーガラス上に固定し，Argus-50 にて fura-2-Ca^{2+} の蛍光画像を取得した。分泌刺激物質を充填したマイクロピペットを腺房細胞の基底膜側に近づけ，ミリセカンドオーダーで窒素ガス圧をかけ，ピペット先端から分泌刺激物質を局所にアプライした。その後細胞内の Ca^{2+} の空間的変動を解析した。同時に，解析に用いている標本の形態についても検討した。

【結果・考察・結論】

カルバコールをピペット先端から繰り返しアプライすると，ピペット先端近傍の腺房細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇した。Ca^{2+} 濃度の上昇の度合いは窒素ガス圧の負荷時間に依存した。負荷時間が短い場合，Ca^{2+} 濃度勾配は常に基底膜側－腺腔側であったが，負荷時間が長いとこの勾配は逆転ないし消失した。この関係は画像解析でも確認された。例えば負荷時間が 14msec の時，細胞内 Ca^{2+} はまず基底膜直下の細胞質から上昇し始め，次に腺腔側での弱い上昇が続いた。しかし，負荷時間を 100msec に延長すると，粗面小胞体が豊富な細胞質でまず Ca^{2+} が上昇し，勾配は腺腔側であるいは腺腔側を越えて低下するという方向性を示した。この結果は明らかに惹起される細胞内 Ca^{2+} 濃度勾配は刺激物質の適用量に依存しているということを示している。これは横軸に負荷時間，縦軸に基底膜側と腺腔側の Ca^{2+} 濃度をとって定量関係を見るといっそう明確となった。

標本の形態を走査電子顕微鏡で観察したところ，Ca^{2+} 2.5mM 存在下でコラゲナーゼ処理して得た我々が通常用いている遊離腺房標本は，ほとんどの腺房細胞の基底膜の一部と思われる線維性のシートで覆われていた。この標本では腺腔側部分は全く露出されていなかった。一方，Ca^{2+} 非含有 EGTA 含有緩衝液でコラゲナーゼとトリプシンの連続処理で得た単離腺房細胞集団では（これは通常パッチクランプに用いられている），各細胞は膨化して球形化し，多数の突出物が現れており，他の細胞とは限られた部分でしか接触，接合していなかった。これは一見腺房構造を保っているようにも見えるが，疑似腺房とも呼ばれるべきでものであろう。しばしば顆粒

が集積している領域が細胞に認められ，これを腺腔領域と判定する場合が多々あるであろうが，我々はこれはもはや真の腺腔領域であるとは考えていない。さらに細胞膜に多数の小孔が認められた。LDH 漏出でこれら 2 種類の標本を評価したところ，遊離腺房標本では非刺激時，刺激時とも LDH 漏出は無視し得るほどで，細胞膜が保たれていることが確認できたが，単離細胞集団では非刺激時においてすでに 100% の LDH 漏出があることが分かった。

従って細胞内 Ca^{2+} 濃度勾配は分泌刺激物質の濃度と用いる標本の立体構造の保存状態に強く依存すると結論する。

[1]Habara, Y., Satoh, Y. & Kanno, T. (1993) Biomedical Research 14: 377-384

分泌細胞の細胞内 $Na^+ \cdot K^+$ 濃度の蛍光色素を用いた ratiometry による解析

葉原芳昭，菅野富夫

【目的】

内・外分泌細胞の細胞内 $Na^+ \cdot K^+$ 濃度の変動を SBFI および PBFI を指示色素として fura-2-Ca^{2+} 測定に準じた蛍光顕微測光法および蛍光顕微画像解析法で検討し，分泌に伴う細胞内イオン動態を特異的トランスポータ抑制物質を用いて解析した。

【方法】

ラットの顎下腺，耳下腺および舌下腺腺房，膵腺房および副腎髄質細胞をコラゲナーゼ処理にて遊離した。SBFI および PBFI を標本に負荷し，その標本を自作チェンバーに貼り付けたカバーガラスに接着させ，倒立顕微鏡上で灌流した。fura-2-Ca^{2+} 測定に準じた蛍光顕微測光法および蛍光顕微画像解析法を用いて ratiometry を行い，細胞内 $Na^+ \cdot K^+$ 濃度の変動を解析した。なお，解析ソフトウェアは fura-2-Ca^{2+} 測定に開発されたものを用いた。また，励起波長，蛍光波長もともに fura-2-Ca^{2+} 測定で使用するものを用いた。

【結果】

遊離ラット顎下腺粘液分泌細胞，舌下腺細胞および耳下腺細胞の細胞内 Na^+ 濃度は高濃度のカルバコール (1-100μM) およびノルアドレナリン (1-100μM) 刺激で上昇したが，イソプロテレノール（最大 1mM）では変化が認められなかった。またこの細胞内 Na^+ 濃度上昇反応は顎下腺粘液細胞で最大であった（図 1）。しかし，細胞内 K^+ 濃度は変化しなかった。刺激後腺細胞は収縮してその容積を減少したが，時間経過から考えて，細胞内 Na^+ 濃度上昇は収縮による一時的濃度上昇によるものではなかった。CCK-8，カルバコール，VIP, Secretin で刺激した膵腺房細胞，カルバコールで刺激した副腎髄質細胞では $Na^+ \cdot K^+$ 濃度とも変化しなかった。

ウアバイン単独投与で非刺激時の顎下腺粘液細胞の細胞内 Na^+ 濃度がわずかに上昇したが，細胞内 K^+ 濃度は不変であった。Na^+ -K^+ -$2Cl^-$ 共輸送抑制物質である furosemide と bumetanide

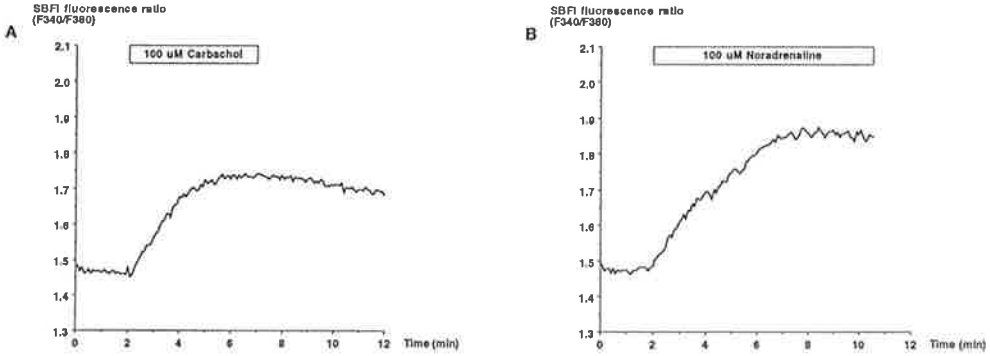


図1　カルバコール (A; 100μM) またはノルアドレナリン (B; 100μM) 刺激による細胞内 Na^+ 濃度の上昇

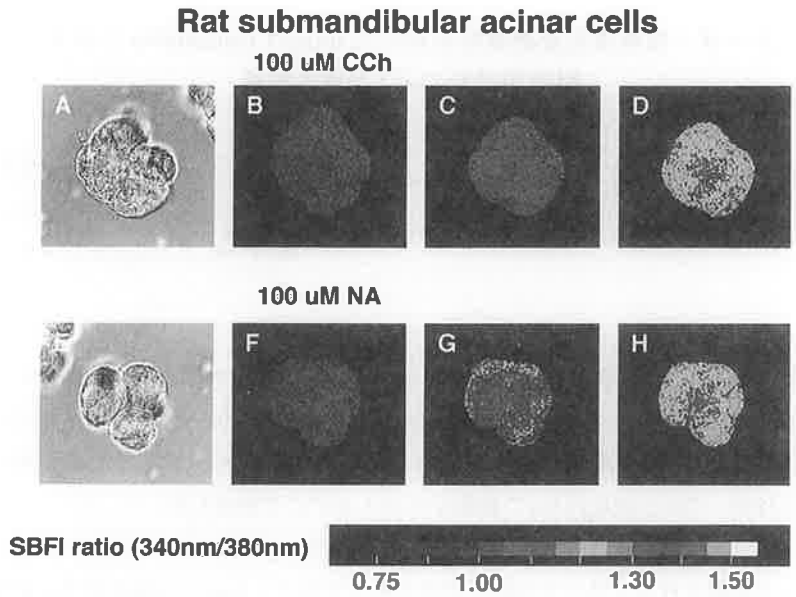


図2　類似カラーで表示した細胞内 Na^+ 濃度の変化。A, E; 測定に用いたラット顎下腺腺房。B; カルバコール刺激前の細胞内 Na^+ 濃度の分布。C; カルバコール (100μM) 刺激直後。D; カルバコール刺激約3分後。F; ノルアドレナリン刺激前の細胞内 Na^+ 濃度の分布。G; ノルアドレナリン (100μM) 刺激直後。H; ノルアドレナリン刺激約3分後。

は予想に反して非刺激時の細胞内 Na^+ 濃度を強く上昇した。Na^+ -H^+ 逆輸送の抑制物質である amiloride は細胞内 Na^+ 濃度を強く低下させた。これらの抑制物質の作用はカルバコールおよび

ノルアドレナリンで刺激した顎下腺腺房細胞でも同様であった。

刺激物質による顎下腺細胞の細胞内 Na^+ 濃度上昇は細胞外の Na^+ 濃度に強く依存していた。

画像解析では細胞の周辺部から腺腔側に向かう Na^+ の伝播を示す像が得られた（図２）。

【考察・結論】

分泌刺激物質により唾液腺腺細胞の細胞内 Na^+ 濃度は K^+ に比べてより顕著に変動する。なかでも顎下腺粘液細胞の変化が大きい。非刺激時の顎下腺細胞でも，Na^+ -K^+ -$2Cl^-$ 共輸送および Na^+ -H^+ 逆輸送によって流入した Na^+ を汲み出すため Na^+ -K^+ pump が働いていると考えられる。刺激時にはこれらの輸送系の活性が上昇する結果細胞内 Na^+ 濃度が上昇すると考えられる。また furosemide と bumetanide の結果から Na^+ -K^+ pump 活性は Na^+ -K^+ -$2Cl^-$ 共輸送活性と機能的に密接に結びついていると考えなければ本結果を説明できない。Na^+ の活発な細胞内および細胞間輸送が，顎下腺細胞の分泌反応における非常に高い分泌圧を生じさせる駆動力であると考えられるが，この機能は膵腺房や副腎髄質では非常に弱いものであると考えられる。

レーザー共焦点走査顕微鏡を用いた indo-1 ratiometry による膵腺房細胞 Ca^{2+} 動態の解析

葉原芳昭，菅野富夫
中村　竜（ニコン）
坂口一紀（ニコンインステック）

【目的】

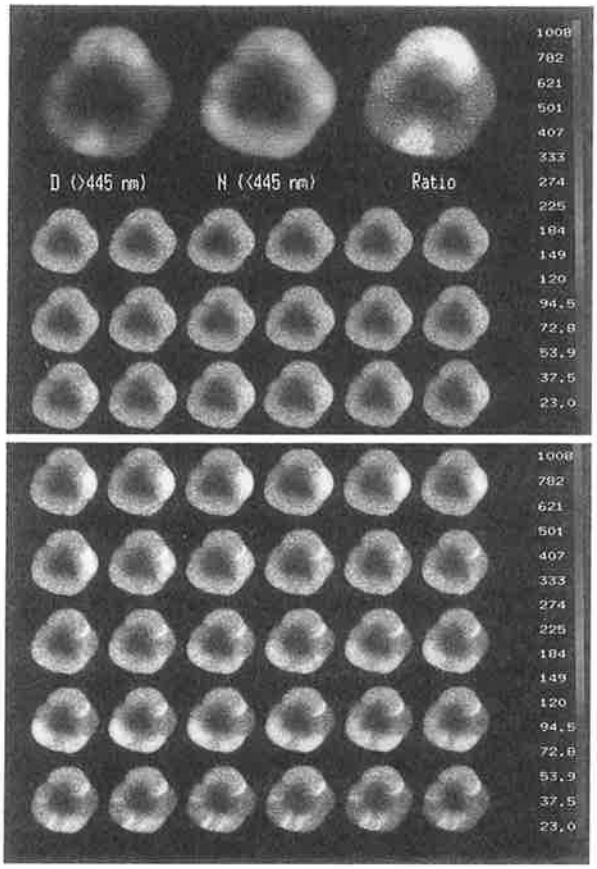
fura-2 を用いた通常の蛍光顕微画像解析法ではいわゆるＺ軸縦方向の分解ができず，厚みのある標本では信号の混入が問題である。この問題の解決法の一つはレーザー共焦点走査顕微鏡を用いることである。我々は最近開発された indo-1 対応レーザー共焦点走査顕微鏡を用いてラット膵腺房細胞の時間・空間的細胞内 Ca^{2+} 動態をリアルタイムで解析した。

【方法】

コラゲナーゼ処理を行ってラットの膵遊離腺房標本を得た。indo-1 を腺房標本に負荷し，自家製チェンバーに取り付けたカバーガラスに腺房を貼り付け灌流を行った。351nm の UV レーザーを 1/30sec の間隔で標本に走査しながら照射し，一走査線あたり512ポイントについて，445nm で分けた短波長側および長波長側の蛍光強度を測光した (RCM 8000, NIKON)。測光後その蛍光強度比を算出し，疑似カラーでモニターに表示して Ca^{2+} 動態の変動を解析した。もっぱら CCK-8 で刺激して刺激－分泌連関における細胞内 Ca^{2+} 動態を観察した。

【結果・考察・結論】

indo-1-Ca^{2+} 蛍光は両波長とも腺房細胞の顆粒領域で弱く，その強度比（Ca^{2+} 濃度）も低かっ



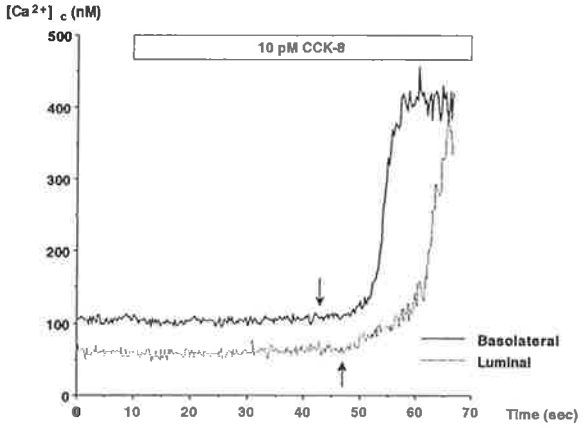


図1　10pM CCK-8 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇　長波長 (D)，短波長 (N) でとらえた蛍光強度の画像及びその ratio 値 (Ratio) の疑似カラー表示，8/30sec 毎にとらえた Ca^{2+} の伝播及び基底膜領域と腺腔側領域での Ca^{2+} 濃度の変化

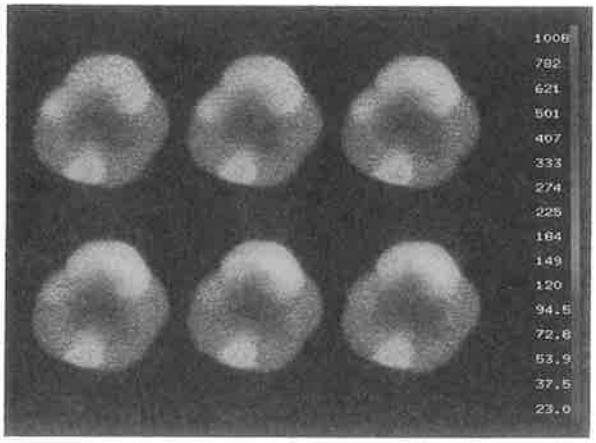


図 2　共焦点面の細胞の周辺部から中心部へ向かう内向きの Ca^{2+} 波

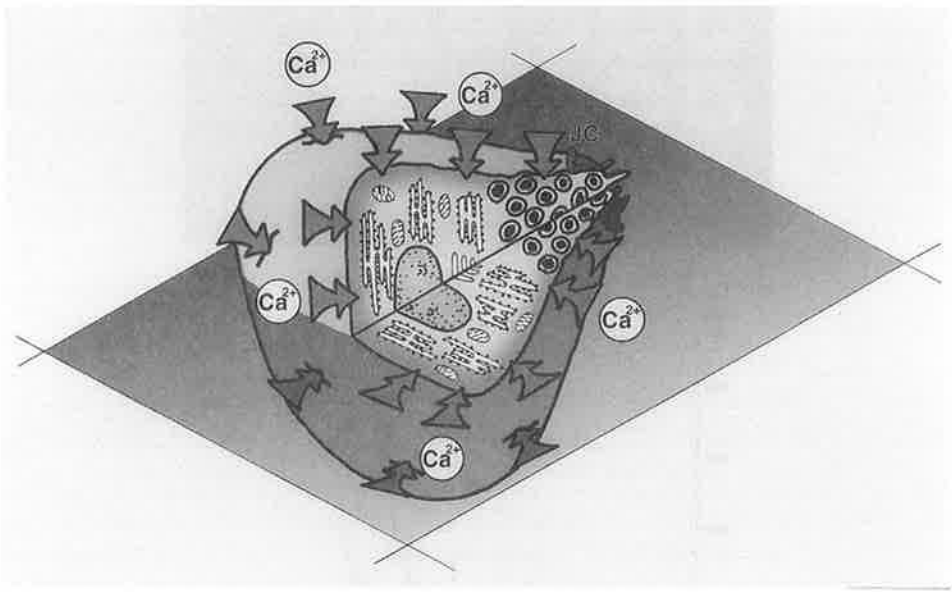


図 3　Ca^{2+} の伝播を示す模式図

た。(図 1A)。生理的濃度範囲の 10 pM CCK-8 で刺激することにより，細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇する時間・空間的変動をリアルタイムでとらえることができた。この時，Ca^{2+} 濃度はまず基底膜側で上昇が認められ，続いて腺腔側で上昇した。従って，Ca^{2+} 濃度勾配は常に基底膜側か

ら腺腔側であった（図 1B）。さらに，レーザー共焦点走査顕微鏡を用いることにより，細胞内 Ca^{2+} 動態にこれまで認められていなかった新しい特徴が観察された。10pM という生理的濃度で持続的に刺激すると，共焦点面にとらえられている個々の細胞の基底及び側面の細胞膜に面した狭い周辺領域でまず Ca^{2+} が上昇し，そのあと Ca^{2+} 波が細胞の中心部に向かって進んで行くという内向きの Ca^{2+} 伝播である（図 1C，図 2）しかし，腺腔側での上昇が基底側面膜直下領域での上昇に先行することはなかった。

この結果は，生理的濃度の CCK-8 刺激時には，結合複合体で分離されている腺腔側の細胞膜を除いた基底側面細胞膜の全域で Ca^{2+} 流入が起こっているということで説明できる。従って Ca^{2+} は細胞の外周表面から細胞中心部へ向かって流れ込んでいると解釈される（図 3）。腺房細胞は 3 次元的に円錐形であると仮定すると，腺腔側の細胞質が占める体積は小さく，基底膜側では大きい。そうすると，Ca^{2+} 流入が起こる基底側面膜と信号をとらえている光学的にスライスした共焦点面との距離は基底領域で長く，腺腔領域では短いことになる。これが細胞の中心部での Ca^{2+} 上昇が外周部及び腺腔領域での Ca^{2+} 上昇に遅れる理由であろうと考えられる。従って信号をとらえている 2 次元共焦点面の像では Ca^{2+} は細胞の中心部に向かって伝播するような画像が得られると考えられる。しかし，刺激物質の濃度を高めるとこの伝播の方向性は不明瞭になる。

マウス回腸陰窩上皮細胞の細胞内カルシウム動態に関する研究

佐藤洋一，葉原芳昭，菅野富夫

消化管上皮細胞は多種多様の細胞から構成されている。一方，これらの細胞は自律神経系によりその働きを調節されている。しかしながら，腸管内の神経末端から放出される神経伝達物質の作用は概略しか捉えられていない。例えばアセチルコリンは上皮からの分泌を，カテコールアミンは吸収を促進すると言われてきたが，具体的にどの細胞にどんな反応を惹起しているか詳細は不明である。多くの細胞で，その細胞が何かしらの機能を果たす際に細胞内カルシウムの変動を伴うことが知られている。我々はこの細胞内カルシウムの変動を指標として，カルバコール (CCh) やカテコールアミンに対する腸管上皮細胞の反応性を検討した。

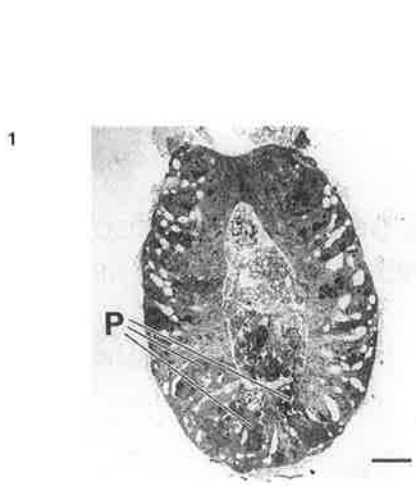
実験には ICR 系雄マウス（体重 30-40g）を用いた。断頭後，回腸末端を取り出し，内腔にガラス棒を挿入し腸管壁を伸展させ，次いで筋層を剝離した。残った粘膜組織の結合組織を，純化コラゲナーゼ（ワージントン社：30-60 U/ml in Hepes-buffered Ringer's solution）で消化し，（37℃，60min），軽くピペッティングすると単離された陰窩標本が得られた（図 1）。単離陰窩標本は生体用接着物質でカバーグラスに付着させ，チャンバー内にて標本周囲をリンゲル液で灌流した。灌流液中に CCh (10μM-1mM), Nicotine (10μM), CCK-8 (100pM), Adrenaline (1-10μM), Noradrenaline (3-10μM), Isoproterenol (10μM) を加え，陰窩標本の細胞内カルシウム濃度の変化

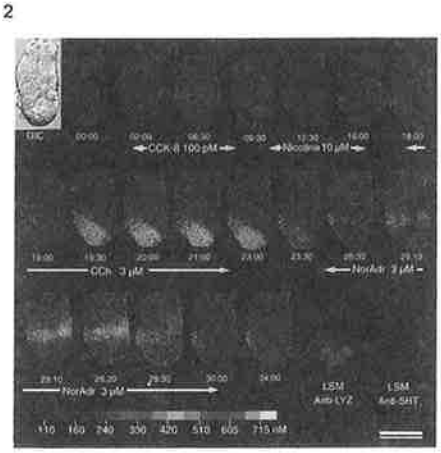
を測定した。カルシウム測定には蛍光・微分干渉顕微鏡(Nikon TMD-2)とArgus 50 (浜松フォトニクス)を用いた。測定後,その標本を4%パラフォルムアルデヒド液,あるいは2.5%グルタールアルデヒド液にて固定し,それぞれ免疫組織化学用および電子顕微鏡用試料に供した。

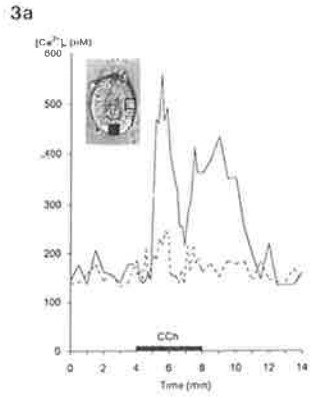
実験に用いたマウス回腸の単離陰窩標本では,上皮細胞は本来の極性を維持しており,細胞間接合構造も正常に保たれていた(図1)。単離陰窩標本にCCh (10μM)を作用させると,陰窩の底部に限局して細胞内カルシウム上昇が観察され,その上昇が他の陰窩領域に伝播することはなかった。(図2, 3)。高濃度のCCh (1mM)を与えたときには,陰窩中部や上部の細胞内カルシウムがやや上昇したものの,最も強い変化は陰窩底部に見られた。この陰窩底部には,大型の分泌果粒を有するパネト細胞が集合しており(図1),CChによる細胞内カルシウム上昇領域と,免疫組織化学的に染め出したパネト細胞領域が一致していた(図2)。この細胞のCChに対する細胞内カルシウムの変動は,初めの急峻な上昇(初期相)とそれに続く比較的持続性の上昇(持続相)とからなる二峰性を示した(図3a)。細胞外灌流液中からカルシウムを抜くと,この二峰性のパターンが消失し,初期相は起きるもののピークが低くなり,持続相も不明瞭となった(図3b)。初期相は細胞内カルシウム貯蔵場からのカルシウム遊離と細胞外カルシウム流入によるもので,持続相は主に細胞外からのカルシウムの流入に由来するものと考えられる。NicotineやCCK-8では変化は見られなかった(図3c)。従って,パネト細胞はムスカリン様受容体を介する細胞内カルシウム変動とそれに伴う分泌亢進機構を有していると考えられるが,以前に想定されていたような「小腸陰窩内の膵臓」としての性質は持ち合わせていないように思われる。陰窩底部に複数個のパネト細胞が集合しているため,個々のパネト細胞が細胞内カルシウムの振動性変動をおこしているかどうか判定はできなかった。一方,粘液分泌性の杯細胞は,CChで細胞内カルシウムの変動をおこさなかった。

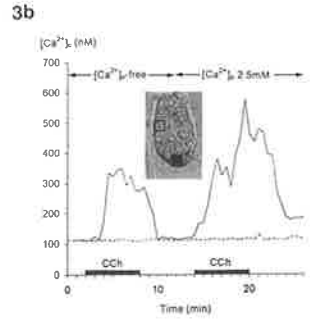
AdrenalineやNoradrenalineを灌流液中に加えると,CChによって惹起される反応領域とは異なる部位に一過性の細胞内カルシウム濃度の変動が見られた。その変動部位はスポット状に限局しており,そこから他の部位に伝播することはなかった。(図2, 3c)。また,細胞内カルシウムの振動性変動は観察されなかった。スポット状に反応した部分のおよそ40%にセロトニン分泌性のEC細胞が存在し,またEC細胞の50%強がカテコールアミンに反応した。しかしながら,Isoproterenolに対する反応は観察されなかった。EC細胞には形態学的にサブグループの存在が想定されていたが,今回の実験でも,カテコールアミンα受容体を介して細胞内カルシウム変動を引きおこすEC細胞と,そうした反応を示さない細胞とが観察され,機能的にもサブグループの存在が示唆された。スポット状の反応部位はそれがEC細胞であろうと非EC細胞であろうと,いずれもほぼ同一の時間経過で一過性のカルシウム濃度変化を示したことから,カテコールアミンに反応した非EC細胞は,EC細胞と同様の細胞内情報伝達メカニズムを有している細胞,即ち他の消化管内分泌細胞である可能性が高い。

今回我々は,腸管上皮組織において,細胞内カルシウム変動の画像解析をおこない,さらに細胞内カルシウム変動領域に存在する細胞の種類を組織学的に同定した。末梢組織では,神経が個々









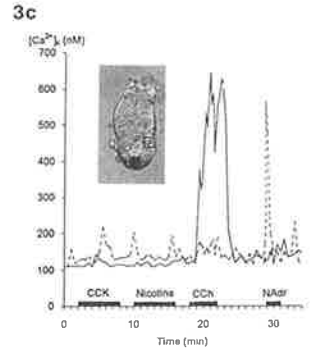


図１　単離されたマウス回腸陰窩の電顕写真。Ｐ：パネト細胞　スケールバー：10μm

図２　単離陰窩の細胞内カルシウム変動を示す画像と，その陰窩標本において免疫組織化学的に抗リゾチーム抗体及び抗セロトニン抗体でそれぞれパネト細胞とEC細胞を染め出した写真。CCKやニコチンに反応する細胞は無いが，CCh刺激で陰窩底部のパネト細胞が反応し，ノルアドレナリン刺激で陰窩中央部に位置するEC細胞の細胞内カルシウムが一過性に上昇している。スケールバー：50μm

図３　単離回腸陰窩標本の微分干渉像と，その細胞内カルシウム濃度の経時的変化。微分干渉像の■と□の部($1\mu m^2$)を測定した値をそれぞれ実線と破線で表している。ａ）図１に示した陰窩のCChに対する変化。初期相と持続相からなる二峰性の上昇を示す。ｂ）細胞外カルシウムを抜いたときのCChに対する変化。細胞外カルシウムを抜くと初期相のピークは低くなり，持続相も不明瞭となる。ｃ）図２に示した陰窩のCChとノルアドレナリン等に対する変化。

の細胞に密接に接していない限り，神経伝達物質はどの細胞にもまんべんなく到達しうる。腸管のように多様な細胞が寄り集まった組織では，それぞれの細胞はある特定の伝達物質にのみ反応し，その反応は他の細胞に容易に伝播していかないようになっているのかもしれない。

EFFECT OF SK&F 96365 ON NICOTINIC OR MUSCARINIC AGONIST-INDUCED Ca^{2+} DYNAMICS IN RAT ADRENAL CHROMAFFIN CELLS.

Julia Busik, Yoshiaki Habara, Tomio Kanno
Akira Warashina （新潟大・医）

In adrenal chromaffin cells, as in many other endocrine cells, elevation of the $[Ca^{2+}]_c$ is an essential factor for exocytosis. The elevation of the $[Ca^{2+}]_c$ in adrenal chromaffin cells can be attributed to the combination of the influx of Ca^{2+} through the plasma membrane and the release of Ca^{2+} from an intracellular store. The relative contribution of these two pathways differ in response to different stimuli. It is known that depolarizing stimuli, such as high K^+ or nicotinic receptor agonists, result in the influx of extracellular Ca^{2+}, whereas there is still considerable controversy concerning the source of Ca^{2+} for the response to muscarinic receptor agonists.

In the present study we used a receptor-mediated and voltage-dependent Ca^{2+} entry blocker, SK&F 96365, to destinguish between different Ca^{2+} pathways involved in the nicotinic or muscarinic agonist-induced Ca^{2+} dynamics in rat adrenal chromaffin cells.

Stimulation with high K^+ at a depolarizing concentration, 56 mM, or nicotine at a maximally effective concentration, 10μM, induced $[Ca^{2+}]_c$ dynamics consisted of the initial transient elevation followed by a gradual decay in isolated Fura-2-loaded rat adrenal chromaffin cells. Addition of 50μM SK&F 96365 abolished completely as high K^+- as nicotine-induced $[Ca^{2+}]_c$ dynamics. These results further confirm a view that in rat adrenal chromaffin cells depolarizing stimuli-induced $[Ca^{2+}]_c$ dynamics is due to Ca^{2+} influx.

Stimulation with a muscarinic receptor agonist, methacholine (200 μM), induced $[Ca^{2+}]_c$ dynamics consisted of the initial transient followed by a sustained plateau phase. Delayed applications of methacholine after block of Ca^{2+} entry by 50μM SK&F 96365 led to a progressive decline of the $[Ca^{2+}]_c$ response with substantial difference in the susceptibility to SK&F 96365 of the initial and the sustained phases. Thus, perifusing the cells with SK&F 96365 for 1-3 min prior to the methacholine stimulation caused progressive inhibition of the sustained plateau phase with little, if any, changes in the initial peak level. Prolongation of the time of perifusing the cells with SK&F 96365 prior to the methacholine stimulation lead to a gradual decline of the initial peak

level as well. These results indicate that methacholine-induced $[Ca^{2+}]_c$ response may consist of two components: initial Ca^{2+} release from intracellular store followed by sustained Ca^{2+} entry.

1) Busik, J., Habara, Y., Warashina, A. and Kanno, T. Biomedical Res. (submitted).

Procaine をはじめとした局所麻酔薬の膵腺房細胞 Ca^{2+} 動態および分泌に対する効果

池井暢浩（大塚製薬）
葉原芳昭，Julia Busik，菅野富夫

【目的】

テトラカインをはじめとする局所麻酔薬が副腎髄質細胞で ACh 刺激による $^{45}Ca^{2+}$ 取り込みとカテコールアミン分泌を抑制するということが報告されているので，刺激－分泌連関における Ca^{2+} の役割を解析する方法の一つとしてこれら局所麻酔薬の利用が考えられる。そこで我々はラット遊離膵腺房細胞を用いてカルバコールおよび CCK-8 で引き起こした fura-2 顕微測光による Ca^{2+} 動態と分泌反応にたいする局所麻酔薬の効果を検討した。加えてムスカリン様リセプターおよび CCK リセプターにたいする効果も検討した。

【方法】

ラット膵臓をコラゲナーゼ処理し，遊離腺房標本を得た。fura-2 を負荷し，蛍光顕微測光にて細胞内 Ca^{2+} 動態を解析した。分泌反応はアミラーゼ活性を測定して解析した。リセプター結合特性を [^{3}H]-NMS および [^{125}I]-CCK-8 を用いて検討した。

【結果・考察・結論】

局所麻酔薬は用量依存性にカルバコールで引き起こされる分泌反応と細胞内 Ca^{2+} 動態を抑制した。その力価は tetracaine ＝ procaine ＞ dibucaine ＞ ethyl-aminobenzoate ＞ lidocaine の順であった。[^{3}H]-NMS の結合抑制の力価もほとんど一致した。例えば procaine について詳細に解析したところ分泌抑制に関しては Schild plot から傾きが 1 ではないという仮説は否定され，procaine が競合的抑制をもたらしていることが示唆された。さらに [^{3}H]-NMS の結合抑制の解析から procaine が [^{3}H]-NMS の結合を競合的に抑制しているという結果が得られた。従って，procaine はムスカリン様リセプターの競合的拮抗物質であるという結論が導き出された。他の類似局所麻酔薬も同様に拮抗物質であると考えられる。しかし CCK-8 で引き起こされる分泌反応及び細胞内 Ca^{2+} 動態にたいしては高濃度を除いて局所麻酔薬は無効であった。また [^{125}I]-CCK-8 の結合も高濃度を除いて抑制は認められなかった。

[1]Ikei, N., Habara, Y. & Kanno, T. (1993) Biomedical Research 14: 145-148

[2]Ikei, N., Busik, J., Habara, Y. & Kanno, T. (1993) British Journal of Pharmacology 110: 603-608

高濃度 CCK-8 刺激による細胞障害に関する形態学的検討

Timo Navalainen （Turku University, Finland）
葉原芳昭，佐藤洋一，菅野富夫

【目的】

食事後に血中コレシストキニンは基礎値の数倍まで上昇するが，その濃度はせいぜい数 pM 程度である。食事後の血中濃度の数十倍，数百倍の濃度の CCK-8 で刺激すると，分泌反応は抑制され，膵炎に類似した形態変化が出現することが知られている。しかし，このメカニズムについては不明である。本研究ではラット膵腺房を薬理学的および毒性学的濃度のコレシストキニン－オクタペプチド (CCK-8) で刺激した際に認められる腺房細胞の形態変化を透過電子顕微鏡および走査電子顕微鏡を用いて分泌反応とともに検討を加え，高濃度刺激がもたらす非生理的反応と形態変化について考察した。

【方法】

ラットの膵腺房をコラゲナーゼ処理して遊離し，Sykus-Moore Chamber に移して腺房を HEPES-Ringer 緩衝液で表面灌流し，生理的濃度の 10pM, 薬理的濃度の 100pM および毒性的濃度の 10nM で持続的に刺激する。灌流液を一定間隔で集め，そのアミラーゼ活性を測定して分泌反応の解析に用いる。刺激終了後の細胞を固定し，透過電顕および走査電顕で形態学的観察を行う。

【結果】

10pM, 100pM の CCK-8 刺激では，無刺激時と同様に細胞形態に顕著な変化は認められなかった。しかし，細胞外 Ca^{2+} 存在下で 10nM の CCK-8 刺激では顕著な変化が出現した。細胞が球形化し，細胞表面に球形の大きな突出が現れた。核および細胞内オルガネラについては，消化酵素様物質を含んだ不定形の大きな空胞形成を除いて特筆すべき変化は認められなかった。灌流液から Ca^{2+} を除くと分泌は抑制されたが細胞の形態変化は抑制されなかった。走査電子顕微鏡による検討でも基本的に同様の結果が認められた。

【考察・結論】

高濃度 CCK-8 刺激で発現する膵腺房細胞の形態変化は，腺房細胞骨格構成成分が障害されることによるということが示唆されている。

[1]Nevalainen, T., Habara, Y., Satoh, Y. & Kanno, T. (1994) Biomedical Research (in press)

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。

神経膜の活動については，イカ巨大神経標本で細胞内 Ca^{2+} とアニオン種によって発現する大きな Cl^- コンダクタンスの性質の解析，および神経膜ナトリウムチャネルの機能に対する尿素による修飾機序の解析を進めた。

乳腺上皮細胞のミルク分泌機序に関しては，機械刺激等による Ca^{2+} の流入経路の解析を進めた。

モルモットを用いた輸精管の収縮機序については，ノルアドレナリン，アセチルコリン，ATP によるそれぞれ異なるパターン且つ輸精管部位によって異なる収縮を見い出している。

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3年目の日英共同研究が進められ，1993年には久木田，筒井，山岸，江橋（生理研）井上（徳島大）が Plymouth の海洋生物学研究所を訪問し，海洋生物の神経細胞，筋細胞を対象に共同研究と共同討議を行った。一方英国からは Drs. Abbott, Brown, Williamson が生理研に来訪し，神経－シュワン細胞の形態と機能，視神経回路網等に関する実験を行った。

共同研究としは，森元（尚絅短大），橋本（東京医科歯科大），美宅（東京農工大），榎本（島根医大），石沢（岐阜大），小栗（香川医大），大川（大阪大）各氏との共同研究が進められた。

イカ巨大神経細胞内 Ca 灌流によって発現する Cl コンダクタンス

山岸俊一，筒井泉雄，古家喜四夫

神経膜においては細胞内外のＫイオン濃度と静止膜Ｋイオン透過性が静止膜電位形成の主役となっている。そこで急激な Na イオン透過性上昇とそれに続くＫイオン透過性増加が起こって活動電位が形成される。このとき，人工海水 (ASW) 中の Cl イオンを他のアニオン，例えばプロピオン酸，メタンスルホン酸等に置換しても，静止電位，活動電位には何の影響も与えない。

この正常条件で細胞外または細胞内のＫイオン濃度を変化させると，高い選択性を示し，10倍濃度変化に対し，それぞれ＋ 45mV 及び-23mV の変化を示した。

このとき 3 ～ 5mM 濃度の Ca イオンを細胞内に投与し，１分以上灌流すると，Ｋイオン選択

性を上回るClイオン選択透過性が発現した。コントロールにおいてClイオンとKイオンの透過性比 $P_{cl}/P_k = 0.34$ であったものが Ca^{2+} 投与後には4.77の値に増大した。

また細胞外Clイオンを他のアニオン種，即ち，F, methanesulfonate (MS), HEPESに置換したときの透過性比は

$P_{Cl}: P_F: P_{MS}: P_{HEPES} = 1.00 : 0.54 : 0.23 : 0.13$

であった。

この大きなアニオンコンダクタンス増大を担うClチャネル出現の機序についてはひき続き検討中である。

イカ巨大神経線維ナトリウムチャネルの機能の尿素による修飾

久木田文夫

【目的】

イオンチャネルは脂質膜に埋め込まれているが，その両端は電解質溶液に面していることは自明のことである。電解質溶液にイオンチャネルの機能に対して本来無関係である非電解質を加えてもイオンチャネルの機能は変化しないはずである。一方では高濃度の非電解質を加えることにより，不可避な様々な問題が起こってくる。1975年に第一の問題点である浸透圧については軸索膜の両側の浸透圧を一致させると浸透圧その物はイオンチャネルの機能に対して無関係であることを明らかにした。但し，①浸透圧勾配が定常的に存在する場合や②浸透圧により細胞膜に力学的力が加わる場合にはイオンチャネルの機能は変化する。イカ巨大神経線維の細胞内灌流標本では①と②の問題を無視できる条件下で実験を行うことが出来る。このような条件下で観察された非電解質（グリセリン，グルコース，蔗糖）の効果はナトリウム電流の活性化過程及び不活性化過程の時間経過を緩やかにして，その大きさを減少させることである。又，カリウムチャネルに対しても同様な作用があるために，活動電位は時間軸を引き延ばしたように緩やかにする。この非電解質の効果は温度を下げた場合や圧力を上げた場合に類似している。何故，非電解質はナトリウムチャネルの開閉の確率（Hodgkin-Huxleyの確率）を変化させるかを解明するのは今後の課題である。この現象の発見に伴い，実験のアーチファクトではないかと言う疑念がしばしば登場してきた。しかし，イカ巨大神経線維の場合は，「実験条件としては直列抵抗が増大した条件下で測定しているが，直列抵抗を極力減らし，且つ直列抵抗の回路的な補償を十分行っても，非電解質の効果は観察される。又，一方では電解質の濃度を変化させて直列抵抗が数倍大きくなっている実験条件下でも，非電解質を加えた影響程度の変化しか見られない」など，実験データは非電解質そのもの効果で直列抵抗の増大による二次的変化ではないことが認められている。その効果を説明するモデルとしては非電解質の水酸基がイオンチャネルの水溶性セグメントと相互作

用して開閉のキネティクスを遅くしていると考えられる。

非電解質全体を眺めると前述のグリセリン，グルコース及び蔗糖のような細胞内灌流実験に歴史的に使われてきた非電解質（1群の非電解質と呼ぶ）以外の非電解質として尿素が有名である。水溶性タンパク質の生化学の研究では前者はタンパク質に対して無影響だったり安定化したりする種類の非電解質として用いられてきており，後者は可逆的なタンパク質変性剤として有名である。本研究では尿素がイオンチャネルに対して，他の非電解質と比べ質的に異なる影響を与えるかどうかを詳細に検討した。

【実験方法】

イカ巨大神経線維の細胞内灌流法と直列抵抗補償を行える軸電極膜電位固定法を用いた。高濃度の非電解質溶液中での実験を可能にするために，細胞内外液が同時に変化させられるように溶液交換を工夫した（高浸透圧溶液細胞内灌流法）。直列抵抗の補償を通常より大きくできるようにした。

【実験結果】

① 3M 尿素でナトリウム電流は30％になるが，カリウム電流は80％になる。一方，1群の非電解質は同じグラム濃度ではナトリウム電流及びカリウム電流がともに6割程度になる。つまり，尿素の効果はナトリウムチャネルにより特異的に現れる。

②尿素でナトリウム電流の活性化過程が緩やかになる，不活性化過程の変化は小さい。一方1群の非電解質では活性化過程も不活性化過程も緩やかになるが，不活性過程のほうがより緩やかになる。時間経過の変化は非電解質を加えたために生じる溶液の性質の変化に比例しているが，溶液の「広義の粘性」の変化と相関が大きい。従って膜－溶液界面でのイオンチャネルタンパク質の動きが膜電位依存性のイオンチャネルの開閉（特に閉状態間の転移）に関与していることを示唆できる。又，不活性化過程はより強く「広義の粘性」の増大により影響を受ける。

③非電解質を加えてもナトリウム電流の平衡電位や膜電位依存性の活性化曲線は大きな変化はない。

④ナトリウムチャネルが開いてから尿素がイオンチャネルに詰まる効果でないことは，尿素を含む溶液を灌流してからしばらくしてからナトリウムチャネルを脱分極で繰り返し開いてやると，1回目もそれ以後もナトリウム電流の大きさは変わらないことから明らかである。従って，ナトリウムチャネル内に尿素が詰まることが電流の減少の原因だとすると，ナトリウムチャネルが閉じた状態でも尿素がナトリウムチャネルの細孔に入り込むことになる。

⑤尿素（分子量60）の大きさは1.95×2.1Åでオリーブ油－水の分配係数は0.15である。尿素が単にイオンチャネル（一番狭い部分で3.2×5.2Åであると推定されている）に詰まるような効果も考えられるが，分子量の近いエチレングリコール（分子量62，大きさは2.13×2.34Åで，分配係数は0.49）とメチル尿素（分子量74.08，大きさが2.36×2.38Åで，分配係数は0.44）の作用は異なる。エチレングリコールは1群の非電解質であり，メチル尿素は尿素と同じ作用がある。従って，尿素はナトリウムチャネルに直接詰まるとは考えにくい。

従って尿素の効果はナトリウムチャネルの親水性セグメント（その中に不活性ボールも含まれ

る）に対する作用で，水の環境及び１群の非電解質の効果との違いとしてのみ観察される。

イオンチャネルに対する非電解質の効果はその水溶性タンパク質に対する作用の分子的機構の様々なデータを利用して解明することも可能であろう。本研究は膜タンパク質の安定性や水界面との相互作用の研究という一般性の高い研究から解明されるべきものであるが，現時点では正確な実験データの示すことが重要である。又，イオンチャネルタンパク質の一次構造が次々に明らかになり，部位特異的変異で機能との関連が明らかになってきているが，イオンチャネルタンパク質の高次構造とその安定性及びイオンチャネルの開閉に伴うタンパク質の構造変化の研究はこれからである。20年前に発見された実験事実であるが，今回，新たに尿素の効果を詳細に解析できた。非電解質の効果は温度や圧力と共に普遍的な意味を持って現実に存在している。これらの実験事実の詳細な解析により，分子的の実験データの相補的な情報を得られると思っている。より新しい実験技術や実験系を用いてこのような分野が発展することが重要であるが，現時点ではイカ巨大神経線維のナトリウムチャネルは物理的な解析に十分耐えうる「純粋な系」の一つであることは確かである。

乳腺上皮細胞におけるカルシウム流入制御機構

古家喜四夫，山岸俊一
榎本浩一（島根医大）

乳腺上皮細胞は機械的刺激やUTP, UDP, ATPといったヌクレオチドによる刺激によって細胞内のカルシウムストアからの遊離によるカルシウム増大を引き起こす。このストアは１，２回の刺激によって容易に枯渇するが，絶えず外液からカルシウムが補給されている。乳腺細胞においてはこのカルシウム流入の経路は刺激の有無に関わらず，いつも開いていると考えられる。fura-2 蛍光の Mn^{2+} による消光速度を定量的に解析することにより，この乳腺に特異的なカルシウム流入経路の制御機構を研究した。

Mn^{2+} 流入はカルシウムによって拮抗的に阻害され，Mn^{2+} はカルシウム流入経路を通って入っていると考えられる。ヌクレオチドによるカルシウム反応を押さえる La^{3+} はカルシウム流入経路にたいしては混合型の阻害を示した。小胞体のカルシウムポンプの阻害剤である thapsigargin (Tg, 1μM) は，まずストアからのカルシウム遊離を引き起こし，その後外液からのカルシウム流入を促進する（図１）。Mn^{2+} 消光で見ると，Mn^{2+} 流入が顕著に活性化されていることが分かる。一方，蛋白脱燐酸化酵素の強力な阻害剤であるオカダ酸 (OA) によって処理（20nM, 数時間）すると ,Mn^{2+} 流入は顕著に抑制され，この流入経路が閉じることが分かった。Mn^{2+} 流入速度に対する，Tg による活性化及び OA による抑制は，ともに非拮抗的な作用であった。

乳腺上皮細胞では上記のようにカルシウムストアへのカルシウムの補充の他に，カルシウムが

非常に豊富なミルクへのカルシウムの輸送も行われており，カルシウム流入経路は他の細胞と異なり，絶えず開いた状態にあると考えられる。我々の結果は蛋白脱燐酸化酵素の働きによってこのカルシウム流入経路が開いた状態に維持されていることを示唆する。

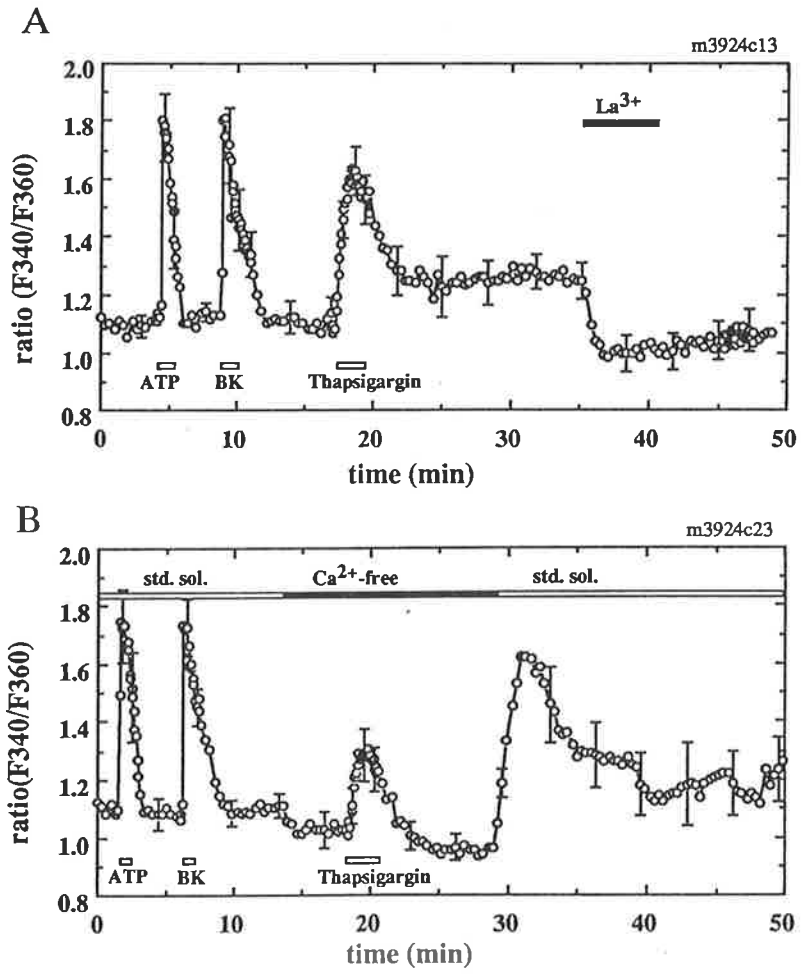


図1　乳腺上皮細胞（マウス乳癌細胞）に対する thapsigargin (Tg) の作用
A；ATP (10μM), bradykinin (BK, 0.1μM) 及び Tg (1μM) による細胞内カルシウム反応（fura-2 蛍光比，F340/F360)。Tg による反応は初期相のピークと持続相のプラトーから成り，持続相は 100μMLa^{3+}によって阻害された。B；Ca^{2+}-free 溶液中では Tg による持続相は消失し，初期相のみとなる。カルシウムを含んだ standard 溶液に戻すとカルシウム反応が起こった。

モルモット輸精管の部位による収縮特性

加藤健一，筒井泉雄，山岸俊一

我々は，モルモット輸精管の部位による収縮特性の違いを調べている。輸精管をそれぞれ，Epididymis（E部），Middle（M部），Prostata（P部）の3つの部位に分け，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。図1にノルアドレナリン(NA)による収縮反応の典型例を示す。E部では，一過性のおおきな収縮とそれに続く持続性の収縮が観察された。M部では，ほぼE部と類似した収縮性を示すが，E部よりも持続性の収縮が小さい傾向にあった。P部では，ほぼ一過性の収縮のみしか観察されなかった。これらの収縮反応は，TTX (1μM) により神経活動を抑制した条件下でも同様の反応を示すので，直接筋に作用していると考えられる。この様な収縮反応は，ATP, ACh（アセチルコリン）に対してもほぼ同様の結果であった。

次に，細胞内カルシウムの変化とこれらの収縮特性との関係を調べる目的でFura-2を輸精管に負荷して，アゴニスト投与時の細胞内カルシウム変動を観察した。高濃度K, NA, AChに対するそれぞれの部位での細胞内カルシウム変動は，収縮反応と相関性のある反応を示した。これらのことから，部位による収縮反応の違いは，細胞内のカルシウム濃度の調整機構の差によっている可能性が示唆された。

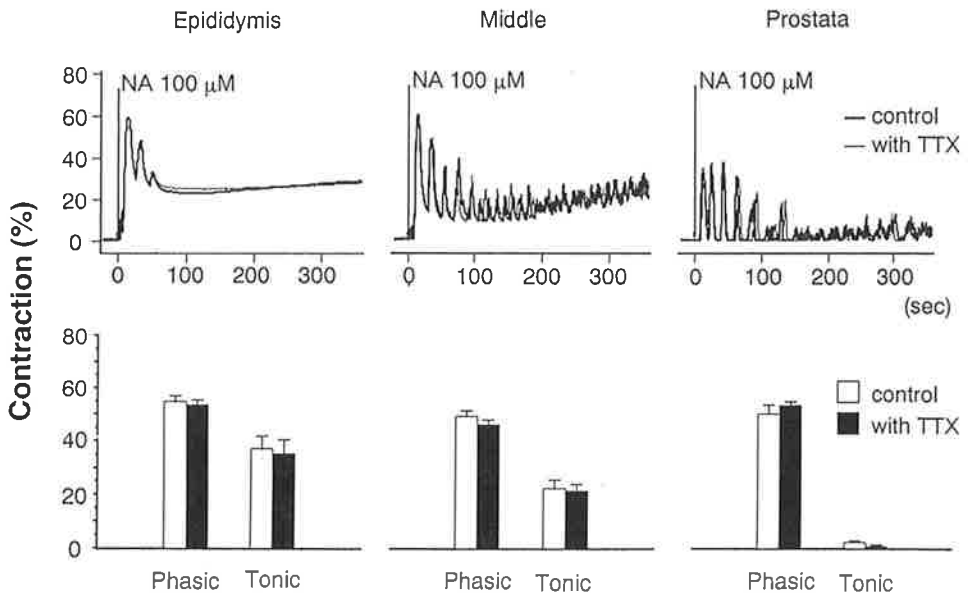


図1　NAに対する収縮反応（上）と一過性の収縮のピーク(phasic)と持続性の収縮(tonic)の平均値±S.E.（下）。

モルモット輪精管平滑筋の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

モルモット輪精管平滑筋細胞の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と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。開閉時間は早い成分は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と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。

参考文献

Morimoto, K., Kukita, F., Yamagishi, S.
Ca^{2+} -activated K channel in vas-deferens smooth muscle cells.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 707: 407-409. (1993)

機能協関研究部門

【概要】

細胞機能のすべては，細胞膜におけるチャネルやポンプやキャリアなどの膜輸送分子の働きによって，担われたり，支えられたりしている。本部門では，主として「イオンチャネルと細胞機能」および，「イオンチャネルと（キャリアやポンプなどの）トランスポータとの機能的・構造的な協関」について，細胞分子生理学的研究を行っている。

細胞容積調節機構とイオンチャネル

久保町子，老木成稔，富永真琴，森島　繁，岡田泰伸

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次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。このような容積調節能は，病理的過程のみならず，浸透圧性物質の激しい輸送・蓄積を伴う組織（小腸，腎，脳など）では生理的過程に

おいても，細胞生存に本質的役割を果たす。

細胞外低浸透圧（または細胞内高浸透圧）負荷下での膨張後の容積調節能は調節性容積減少(regulatory volume decrease)と呼ばれるが，小腸上皮細胞におけるこのメカニズムには各種イオンチャネルの働きが関与することを私達は明らかにしてきた（文献１）（図１参照)。

1993年度は，これらのうちで細胞内制御因子が不明であった容積調節性 Cl^- チャネルのパッチクランプ研究を昨年度より引き続いて行い，新たに細胞内 ATP の存在がチャネル活性維持に不可欠であることを見いだした（文献２)。このとき ATP は加水分解される必要は無く，単に細胞内でチャネルに結合しているだけで充分であることが明らかとなった（文献３）（図１)。

消化管上皮細胞の吸収・分泌機構とイオンチャネル

岡田泰伸，林　誠治，立田　浩，挾間章博
堀江　稔，津浦佳久，清野　裕（京大・医）

私達はこれまで，小腸上皮細胞や胃壁細胞や膵β細胞にパッチランプ法を適用し，それらの能動的分泌・吸収のメカニズムについて研究してきた（文献４)。

膵β細胞におけるグルコースによるインスリン分泌は，グルコース代謝で増加した細胞内 ATP が静止時に開口している ATP 感受性 K^+ チャネルを閉じさせ，それによってもたらされる脱分極が電位作動性 Ca^{2+} チャネルを開口させ，その結果引き起こされた細胞内 Ca^{2+} 濃度増によってエキソサイトーシスが誘起されることによりもたらされる。

抗不整脈剤である disopyramide は散発性に低血糖をもたらすことが知られていたが，私達はこの薬剤が膵β細胞の ATP 感受性 K^+ チャネルをブロックしてインスリン分泌を亢進させることをはじめて証明し（文献５)，その原因を解明した。

インスリン非依存性糖尿病 (NIDDM) の遺伝性モデルラット（GK ラット）の膵β細胞の ATP 感受性 K^+ チャネルの性質を調べたところ，そのチャネル自身の（ATP 感受性などの）諸性質には異常は認められないものの，グルコース感受性のみが著しく傷害されていることを見いだした（文献６)。1992年度の NIDDM の薬剤誘起性モデルラット（NSZ ラット）を用いた研究結果（文献７）を併せると，NIDDM の原因はこの ATP 感受性 K^+ チャネルの異常には求められないことが明白となった。

小腸上皮における糖やアミノ酸などの有機溶質の能動的吸収は，絨毛上部の（刷子縁構造を間腔側にもった）吸収上皮細胞によって行われる。Na^+ の能動的吸収とカップルしたこの有機溶質吸収過程に，基底側壁細胞膜の Na ポンプと K^+ チャネルの働きが不可欠であることはかねてより想定されてきた。そこで，モルモット小腸より単離した吸収上皮細胞にパッチクランプ法を適用し，K^+ チャネル活性の有無を調べたところ，（神経やリンパ球細胞に存在するような）電位作

動性K^+チャネルがこの基底側壁細胞膜に存在するという驚くべき結果をはじめて得た（文献８）（図２）。現在，このK^+チャネルの性質を詳しく調べている。

現在また，絨毛および膜上皮ごと単離して，その中の極性を保った小腸上皮細胞に対してもパッチクランプ法を適用し始めている。

イオンチャネルの構造・機能相関

老木成稔，岡田泰伸
内匠　透，中西重忠（京大・医）

Isk 蛋白はラット腎臓から発現・クローニング法によって得られたアミノ酸残基が130の膜蛋白である。ヒトの腎臓，ラットの心臓，子宮からも得られ，129から130の極めて相同性の高い蛋白である。アフリカツメガエルに発現させると脱分極により活性化されるカリウム選択性チャネルがあらわれる。このチャネルの特徴は活性化に数十秒を要する極めて遅いチャネル（スローKチャネル）である。膜貫通領域は疎水性プロファイルを見る限り一ヶ所しかない。この蛋白がチャネルを形成するためにはオリゴマーを形成する必要がある。

このチャネルの活性化キネティクスを検討した。10秒間の脱分極パルスでは電流は定常に達しないが，活性化電流は２つの指数関数成分であてはめることができた。

膜貫通領域の近傍への多くの部位特異的変異導入のうち，膜貫通領域のロイシン残基(Leu52)をイソロイシンあるいはアラニンに置換することによって活性化過程が変化した（文献９）（図３）。イソロイシンでは活性化過程が速くなり，アラニンではほとんど変化がなかった。ゲーティングキネティクスを検討することによって，変異による効果は指数関数の速い成分と遅い成分の比が変化することであることがわかった。すなわち開状態や閉状態間の安定性が変化するのである。ロイシンとイソロイシンは異性体で同一の容積($167A^3$)である。いわゆるロイシンジッパーのような疎水性相互作用が関わっていると考えられる。

電位依存性ゲーティングの変化を目的とした部位特異的変異導入は，これまでおもに電荷を持ったアミノ酸残基をターゲットとしてきた。私達の結果は疎水性相互作用もゲーティングに重要な役割をはたしていることを示している。膜貫通部位のヘリックスがオリゴマーのヘリックス束を形成し，このとき疎水性相互作用がチャネルの安定性に寄与するため，電位依存性の構造変化にも関わるものと考えられる。

内向き整流性Kチャネルのファミリーを含めたシェーカースーパーファミリーとの構造の共通性，分子機構の共通性などから今後検討する必要がある。

心筋細胞機能とイオンチャネル

富永真琴，林　誠治，岡田泰伸
堀江　稔，松森　昭（京大・医）

心筋炎・心筋症の患者やモデル動物の血清中に抗心筋抗体が高率に見いだされることは広く知られている。私達は，ウイルス性心筋炎マウスの血清に含まれる抗心筋抗体が，モルモット心筋細胞で単一コンダクタンスが12psの新しいタイプのCa^{2+}透過性陽イオンチャネルを活性化させ，これによって細胞内Ca^{2+}濃度の増加がもたらされることを見いだし，心筋炎・心筋症機序解明に大きな手がかりを与えた（文献10）。

K^+チャネル開口薬の多くは，平滑筋のATP感受性K^+チャネルを開口する事により弛緩反応を引き起こす。また，心筋においてもこのチャネルに作用して，活動電位持続時間を短縮させる。ところが，K^+チャネル開口薬の一つであるMinoxidil Sulfateはモルモット心筋細胞活動電位に対して（他のK^+チャネル開口薬と同様の）短縮作用を示したが，この作用はATP感受性K^+チャネルの選択的な拮抗剤であるglibenclamideでは完全に抑制されなかった。そこで，Minoxidil Sulfateの心筋イオン電流に対する作用を検討した結果，本剤はATP感受性K^+チャネルの開口作用のみならず，電位依存性L型Ca^{2+}チャネルの抑制作用を併せ持つ事を見いだした（文献11）。

運動神経細胞に対する栄養因子cDNAを有する鶏胚下肢筋cDNAライブラリーの作成

樫原康博，久野　宗

胎生期に多数の運動神経細胞が自然に死滅する。この自然細胞死は支配標的筋由来の栄養因子によって制御されていると仮定されているが，この因子は未だ同定されていない。もしこの仮説が正しければ，運動神経細胞の生存を促進する分泌蛋白のmRNAが自然細胞死期の筋で発現しているはずである。

この可能性を検討する目的で，運動神経細胞の自然細胞死の時期の鶏胚の下肢筋を摘出し，poly (A)をもつRNAを精製しこれをアフリカツメガエル卵母細胞に注入し，生理食塩水下でこの卵を5日間飼育後，飼育液を回収した。自然細胞死期の鶏胚の殻に1mm四方の穴をあけ，この回収液を自然細胞死の始まる胚期5日目から終了する9日目まで連日投与し運動神経細胞の自然死が阻止されるかを検討した。さらに，自然細胞死期の運動神経細胞を単離し，回収液存在下で5日間培養して単離運動神経細胞の生存が促進するかを検討した。これら，in vivoとin vitroの運動神経細胞は共に，回収液投与によりその生存数が増加した。従って，運動神経細胞の自然

細胞死期の筋は，運動神経細胞の生存を促進する分泌蛋白の mRNA を発現していると結論された（文献12)。

この筋の mRNA をさらに蔗糖密度勾配遠心法で分画し，それぞれの分画の mRNA を注入することで得られた翻訳分泌蛋白を上記の in vivo あるいは in vitro 系に適用して，栄養因子活性を有する分画を見いだした。さらに，この活性分画 mRNA を用いて cDNA ライブラリーを作成した。vector にはλ Za p Ⅱを用いた。このライブラリーは約40万 pfu を有していた。このライブラリーに事実，栄養因子活性を有する蛋白をコードする cDNA が存在するかを検討するために，このライブラリーの cDNA を用いて in vitro transcription して cRNA を得た。この cRNA を，アフリカツメガエル卵母細胞に注入する事で発現する分泌蛋白を上記アッセイ系に適用したところ，運動神経細胞の生存が促進するのを確認した。従って，作成したライブラリーの中に栄養因子活性を cDNA を有するファージが存在すると結論された。

現在，上記アッセイ系を用いてこのライブラリーより栄養因子 cDNA をスクリーニング中である。

Na ーグルコース・シンポータのゲート電流

挾間章博

D. D. F. Loo, E. M. Wright (UCLA)

既にクローニングされたヒト由来の Na ーグルコース・シンポータ (SGLT1) の mRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入しこの輸送体蛋白を発現させ２本微小電極膜電位固定法により電気生理学的性質を調べた。この輸送体においてはグルコース存在下で Na の取り込みに伴う内向電流が生ずることはよく知られた事実であるが，グルコース非存在下で保持電位 (-50mV) から脱分極及び過分極パルスを与えると脱分極側で著明な一過性外向電流が観察された（文献13）（図５)。また，脱分極から保持電位にもどすと一過性内向電流が生じた。脱分極を与えた時の一過性外向電流と保持電位に戻したときの一過性内向電流によって運ばれる電荷量は一致し，また保持電位を変えて一過性電流を調べると，この電流はかならず保持電位で反転し，ゲート電流の性質を持つことが明らかになった。この一過性電流はフロリジンにより消失し，細胞外低 Na 条件下では脱分極側よりも過分極側で一過性電流が認められるようになった。またグルコースの投与により定常内向電流は増加したのに対して，一過性電流は減少した。この一過性電流の由来については，６状態モデルによりシミュレーションを行い，輸送体に結合した Na の解離と輸送体自体のもつ電荷の状態変化による移動により説明できることが明らかになった。この一過性電流の解析により，グルコース存在下での Na 電流の解析だけでは得られない輸送様式におけるパラメータが得られ，この実験で用いた手法は輸送体の構造・機能協関を研究する上で不可欠なも

のになるに相違無い。

【文献】

1．岡田泰伸（1993）小腸上皮細胞の容積調節とイオンチャネル．医学のあゆみ　166(3)：166

2．Y. Okada & M. Kubo (1993) Volume-regulatory Cl^- channels in human intestinal epithelial cells. XXXII Congress of The International Union of Physiological Sciences. Abstract for Sunday Session. 65

3．Y. Okada, M. Kubo, S. Oiki, C. Petersen, M. Tominaga, A. Hazama & S. Morishima (1994) in "Cl^- Channel: Molecular and Cellular Physiology" (eds., Y. Okada, S. Oiki, S. Yamagishi & K. Hama) pp 28-33, NIPS

4．岡田泰伸(1993)パッチクランプ法による分泌機構の研究．内分泌学の進歩 11: 147-158

5．S. Hayashi, M. Horie, Y. Tsuura, H. Ishida, Y. Okada, Y. Seino & S. Sasayama (1993) Disopyramide blocks pancreatic ATP-sensitive K^+ channels and enhances insulin release. Am. J. Physiol. 265: C337-C342

6．Y. Tsuura, H. Ishida, Y. Okamoto, S. Kato, K. Sakamoto, M. Horie, H. Ikeda, Y. Okada & Y. Seino (1993) Glucose sensitivity of ATP-sensitive K^+ channels is impaired in β cells of the GK rat, a new genetic model of NIDDM. Diabetes 42: 1446-1453

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

8．H. Tatsuta, K. Tsuji, S. Ueda, S. Morishima & Y. Okada (1993) Modulation of inactivation kinetics of voltage-gated K^+ currents by arachidonic acid and Ca^{2+} in guinea pig villus enterocytes. XXXII Congress of The International Union of Physiological Sciences. Abstracts for Monday Session. 65

9．S. Oiki, T. Takumi, Y. Okada & S. Nakanishi (1993) Alterations of gating parameters by neutral substitutions of transmembrane Leu52 of slow potassium channel. Ann. N. Y. Acad. Sci. 707: 402-405

10. M. Tominaga, A. Matsumori, M. Horie, H. Yoshida & Y. Okada (1993) Activation of Ca-permeable cation channels by myocarditis-associated antibody in guinea pig ventricular myocytes. J. Clin. Invest. 91: 1231-1234

11. S. Hayashi, M. Horie & Y. Okada (1993) Ionic mechanism of minoxidil sulfate-induced shortening of action potential durations in guinea pig ventricular myocytes. J. Phramacol. Exp. Ther. 265: 1527-1533

12. Y. Kashihara, C. Takasu & M. Kuno (1993) Messenger RNAs from chick muscle encode a motoneuronal survival promoting factor. Neurosci. Lett. 163: 208-210

13. D. D. F. Loo, A. Hazama, S. Supplisson, E. Turk & E. M. Wright (1993) Relaxation kinetics of

the Na^+ /glucose cotransporter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5767-5771

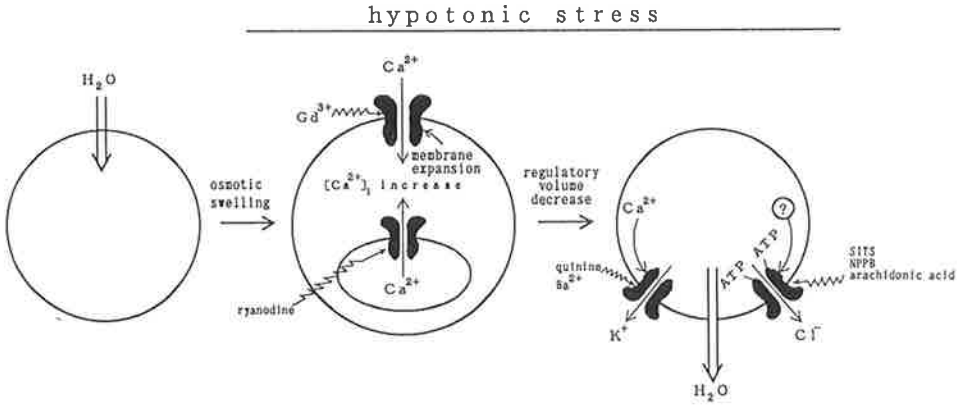


図１　低浸透圧環境下での小腸上皮細胞の容積調節メカニズムの様式図。

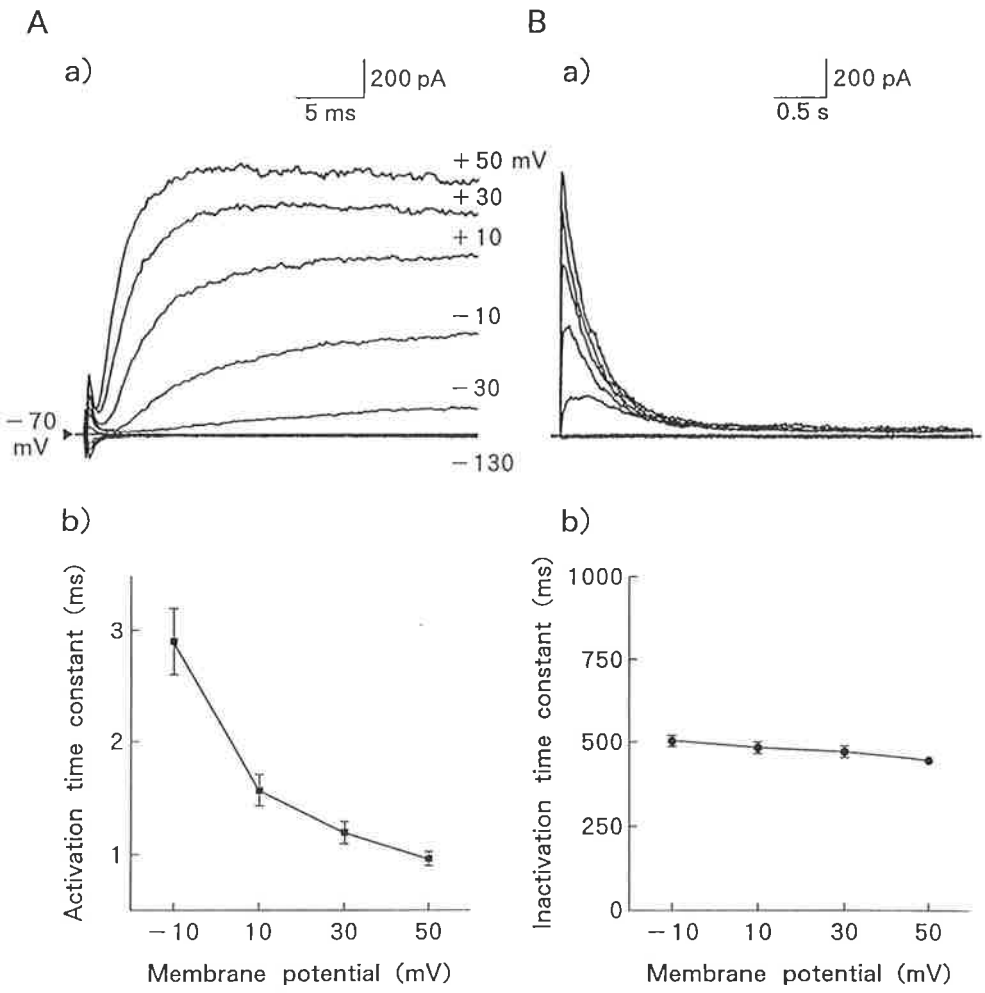


図2　モルモット小腸吸収上皮細胞から全細胞記録された電位作動性 K^+ チャネル電流。A）活性化キネティクス。(a)保持電位(-70mV)より 30msec のコマンドパルス（クランプ電位は示されている）を与えた時の K^+ 電流応答。(b)その時の活性化の時定数（8例の平均）の電位依存性。　B）不活性化キネティクス。(a) 4sec の同様コマンドに対する K^+ 電流応答。(b)その時の不活性化の時定数（35例の平均）の電位依存性。

A

```
      50          60
ALYILMVLGFFGFFTLGIMLSYI
      I
      A
```

B

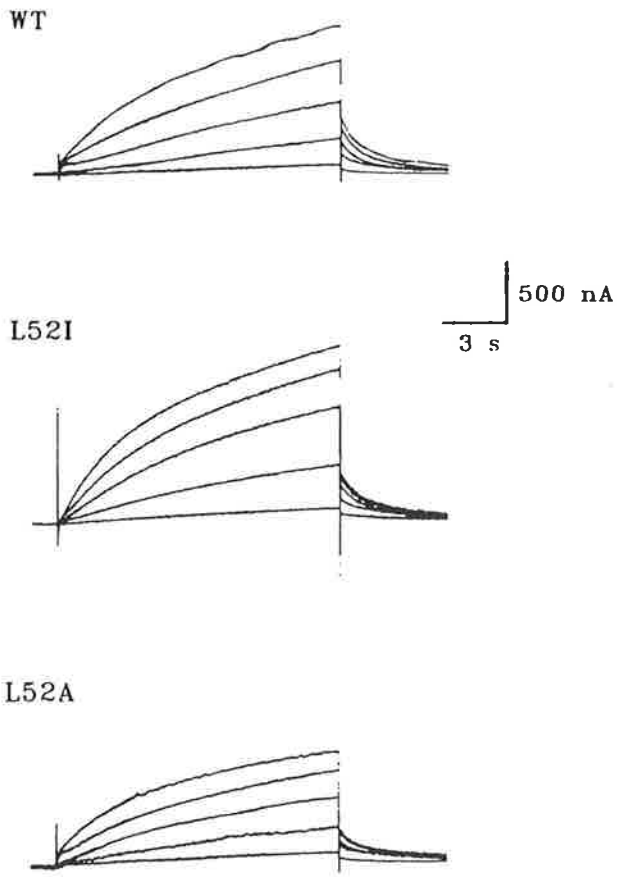


図3　部位特異的変異導入によるスローKチャネル活性化キネティクス変化。
A）IsK 蛋白の膜貫通領域の一次構造。B）ツメガエル卵母細胞に発現させた IsK チャネル電流。保持電位：-70mV。コマンド電位：-20，0，+20，+40，+60mV。WT: wild type。L52I: Leu52 のイソロイシン置換。L52A: Leu52 のアラニン置換。

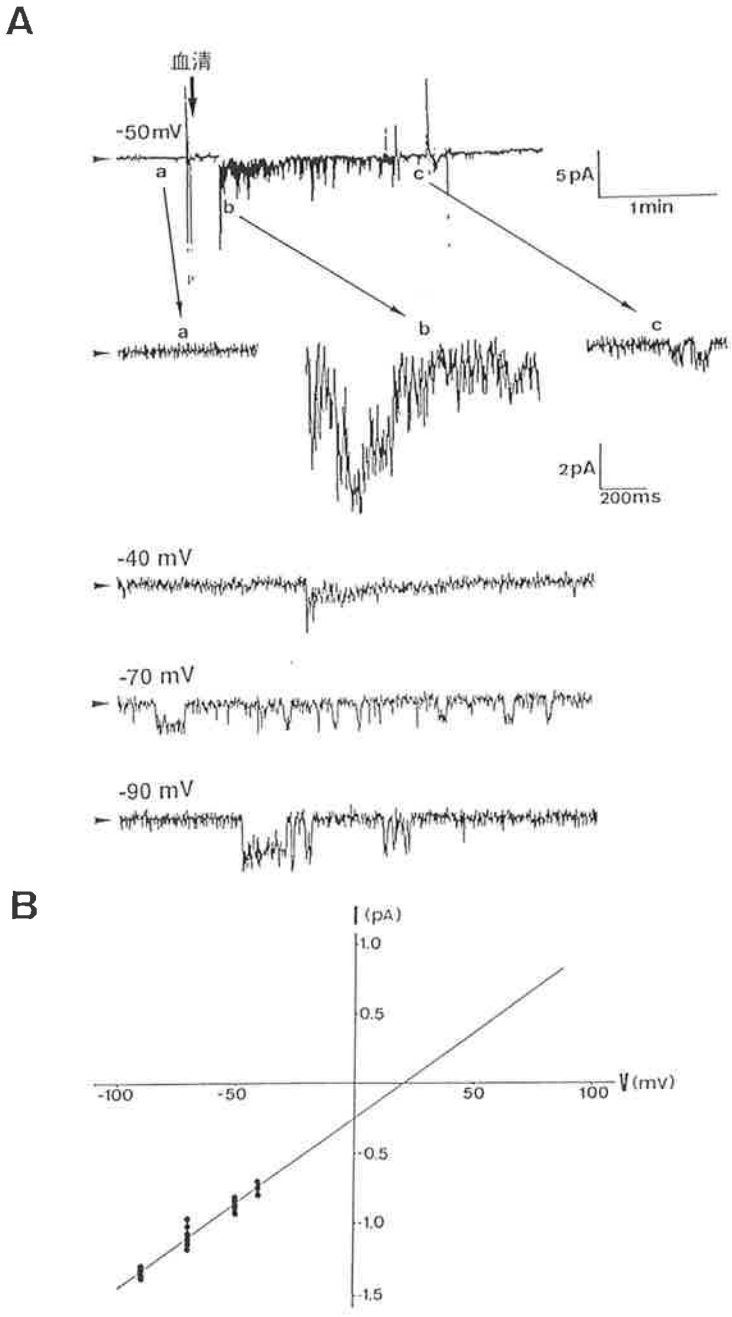
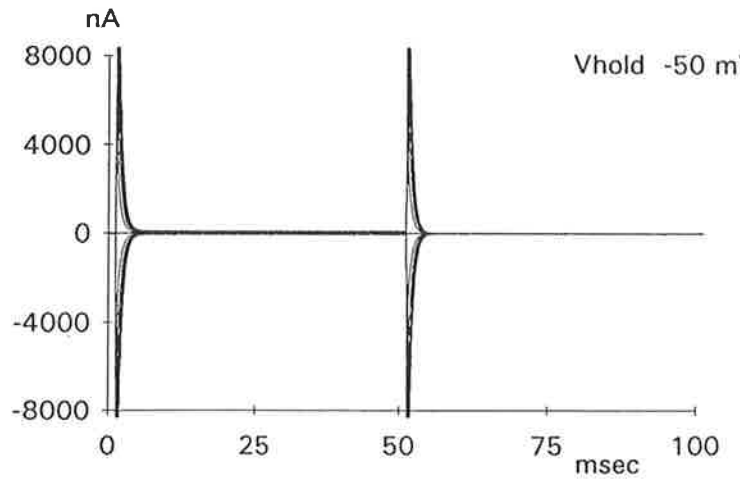


図4　モルモット単離心室筋細胞のセル・アタッチ法による単一 Ba^{2+} 電流。A）抗心筋抗体陽性血清の投与による陰性電位での内向電流の活性化。B）電流・電圧関係。

water injected oocyte



SGLT1 mRNA injected oocyte

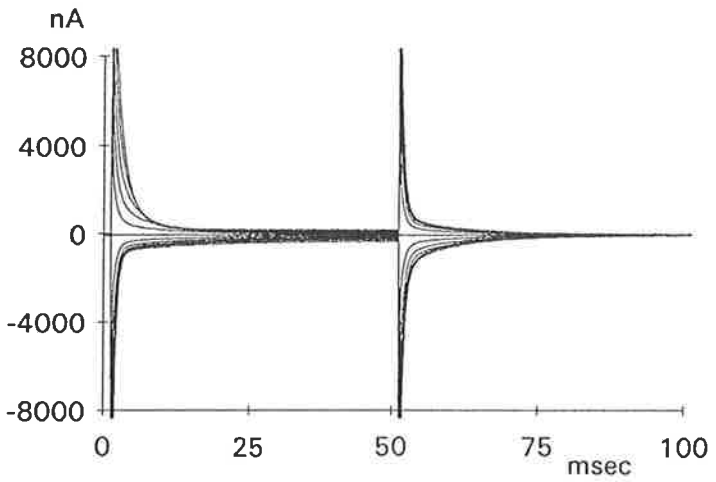


図5　Na－グルコース・シンポータのゲート電流記録。2本微小電極膜電位固定法により，-50mVの保持電位より＋50mVから-150mVまで20mV間隔のステップパルスを与えた場合の電流記録。水を注入した卵母細胞では容量性の電流のみが認められるがSGLT1のmRNAを注入した卵母細胞では，容量性電流より遅い時間経過の一過性電流が認められる。

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。この低分子量G蛋白質は，分子量2～3万でサブユニット構造を有してない一群のG蛋白質であり，現在，60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。このスーパーファミリーの中で *Rab* ファミリーが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りつつある。私共は，*Rab* ファミリーに属する低分子量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。

昨年度までに，私共は *Rab* ファミリーのメンバーである *Rab*3 を発見し，この中の *Rab*3A 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 *Rab*3A の GDP と GTP の交換反応を制御し，*Rab*3A 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，ヨーロッパEMBLのグループとの共同研究において，*Rab*3A 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，*Rab*3A 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-3A と命名している。この Rabphilin-3A 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。このシナプトタグミンは *Rab*3A 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。

本年度は，Rabphilin-3A の特異抗体を作成して Rabphilin-3A の組織・細胞内分布を行い，Rabphilin-3A がシナプスにおいてシナプス小胞に濃縮していることを明らかにした。さらに，Rabphilin-3A が，Ca^{2+}依存性に細胞膜リン脂質と結合する活性を有していることも明らかにした。このことから，私共は *Rab*3A と Rabphilin-3A がシナプトタグミンと共同してCa^{2+}依存性にシナプス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」の原因の解明に応用したいと考えている。

Rabphilin-3A の Ca^{2+}・ホスフォリピッド結合活性

山口　務，白瀧博通，貝淵弘三，沼田真一郎，高井義美

昨年度までに，私共は *Rab* ファミリーのメンバーである *Rab*3 を発見し，この中の *Rab*3A 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。さらに，*Rab*3A の標的蛋白質 (Rabphilin-3A) を見出して cDNA を単離し，その一次構造を決定している。Rabphilin-3A は，シナプスにおいてシナプス小胞に濃縮して存在しており，C末端側にはプロテインキナーゼCの C_2 ドメインと相同性が高い領域が2個存在している。ところで，プロテインキナーゼCは，C_2 ドメインを介して Ca^{2+}・ホスフォリピッドと結合することが知られている。そこで本年度は，リコンビナント Rabphilin-3A を用いて Rabphilin-3A の Ca^{2+}・ホスフォリピッド結合活性について検討した。

Rabphilin-3A は，Ca^{2+}依存性にホスフォリピッドに結合した。特に，酸性リン脂質に強く結合した。さらに，Rabphilin-3A の C_2 ドメインが存在するC末端領域には Ca^{2+}・ホスフォリピッドが結合し，N末端領域には *Rab*3A が結合することが明らかとなった。このことから Rabphilin-3A は，機能的に2つの異なる領域からなり，シナプスにおいて Ca^{2+} センサーとして機能していると考えられる。今後，実際に細胞レベルで Rabphilin-3A が Ca^{2+} センサーとして機能しているかどうかを明らかにしていきたい。

Rabphilin-3A の *Rab*3A GAP に対する抑制作用

岸田昭世，白瀧博通，貝淵弘三，高井義美

昨年度までに，私共は *Rab* ファミリーのメンバーである *Rab*3 を発見し，この中の *Rab*3A 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。*Rab*3A には，GDP 結合型の不活性型と GTP 結合型の活性型が存在し，GTP 結合型の活性型から GDP 結合型の不活性型への変換は GTPase 反応によって行われている。さらに，この GTPase 反応は *Rab*3A GAP によって制御されている。最近，私共は *Rab*3A の標的蛋白質 (Rabphilin-3A) を見出して cDNA を単離し，その一次構造を決定している。しかし，Rabphilin-3A は GTP 結合型の *Rab*3A と特異的に結合する以外，その性状については明らかでない。そこで本年度は Rabphilin-3A の部分精製されている *Rab*3A GAP に対する影響について検討した。

Rabphilin-3A は，*Rab*3A GAP の GTPase 活性促進作用を用量依存性に阻害した。すなわち，Rabphilin-3A は，*Rab*3A と *Rab*3A GAP の結合を阻害して GAP inhibitory protein (GIP) として働いていると考えられる。このことから，私共は *Rab*3A-Rabphilin-3A の神経伝達物質の放出反応

における作用機構を次のように考えている。すなわち，GDP 結合型 *Rab*3A が GTP 結合型 *Rab*3A に転換されると，シナプス小胞に存在する Rabphilin-3A に結合し，シナプス小胞をシナプス膜に輸送してドッキングさせる。*Rab*3A は，Rabphilin-3A の GIP 活性によりシナプス小胞がシナプス膜と融合するまで GTP 結合型に保持されている。そこに，Ca^{2+} が流入してシナプス小胞とシナプス膜の融合が起こると，*Rab*3A は，Rabphilin-3A から解離して *Rab*3A GAP によって GTP 結合型から GDP 結合型へ変換される。

生体情報研究系

神経情報研究部門

【概要】

神経情報研究部門では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と視覚神経系における情報抽出の神経機構の解明に関する研究を行っている。

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，山田，山口，池中）。

以上の研究において開発した神経系における遺伝子導入技術を利用して脳腫瘍の遺伝子治療の基礎的研究を行っている（吉松，田村，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……

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，機能発現には，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メント (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) 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。

Kーチャンネルは膜電位の形成，維持を通じて，神経細胞の興奮性の調節に大きく寄与していると考えられている。本年度は，神経細胞の機能発現の鍵を握るこのKーチャンネルに注目し，その発現調節機構を調べることによって神経系の細胞の分化・成熟を分子レベルで明らかにしていきたいと考え，解析をおこなっている。本年度は，数多く知られているKーチャンネルの遺伝子のうち，shakerタイプの電位依存性Kーチャンネルのcdnaをクローリングし，その脳内における発現について検討した。

現在までに知られているKーチャンネルのcdnaのうち電位依存性でマウスの近縁種であるラットのRCK1からRCK5の配列に基づき，共通性が高い膜貫通領域の部分のPCRプライマーを合成した。マウス胎仔脳のRNAを調整しRT-PCRを行った。これによって既知，未知の両者を含む配列が一括に増幅されるので，PCR産物を別途合成した既知のクローンに特異的なプローブでハイブリダイズすることによってチャンネルの種類を同定した。マウス胎仔においては，脳の発生の初期にあたる胎生12日(E12)の時点でRCK1から5までのすべての遺伝子の発現が認められ，その発現量は時間とともに増大した。ただし，その増加のパターンには遺伝子間で若干差がみられた。

一括して増幅したKーチャンネルcdnaをクローニングし，配列を解析したところ，ラットのRCK1から5に対応するマウスの遺伝子がすべて含まれていた。塩基配列の一致度は90%以上であった。これは増幅した領域が膜貫通領域であり，よく保存されていることを反映しているといえる。次に，クローニングされたcdnaをプローブとして，マウス小脳cdnaライブラリーをスクリーニングした。数回のスクリーニングによってKv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.6に対応するクローンを得た。このうちKv1.1はコーディング領域の全長を含むクローンを得ており，今後，これを用いて強制発現による機能解析を行う予定である。その他の遺伝子についても現在クローニングを継続中である。

クローニングによって得られたcdnaのうち，Kv1.6cdnaについて，3'末端側の領域のアンチセンスプローブを作製し，in situハイブリダイゼーション法によりRNAの発現の組織分布を検討した。その結果，Kv1.6遺伝子は小脳プルキンエ細胞に特に大量に発現していた。その発現は生後プルキンエ細胞の樹状突起形成の開始とともに検出されるようになり，細胞の成熟に伴って増大することが明らかとなった。小脳におけるこの変化は定量的RT-PCRによっても確かめられた。

神経発生に異常を示す遺伝性突然変異マウスの解析

鹿川哲史，山田真久，山口宜秀，池中一裕

高等動物の中枢神経系は多種類の細胞が混在しているため，それぞれの細胞への分化決定にどのような分子が働いているか解明する事は極めて困難である。このような状況の中で，オリゴデンドロサイトの分化異常を示すミエリンプロテオリピド蛋白質 (PLP) 遺伝子変異マウス及び，我々が作製した PLP －トランスジェニックマウスを解析する事によって，PLP 遺伝子産物の一つである DM-20 は細胞分化に関する新しい機能を有することが明らかとなってきた。我々は，新たに in vitro の系で PLP 遺伝子の分化因子活性を測定する方法を開発するとともに，PLP －トランスジェニックマウスの詳細な解析を進めてきた。

in vitro の系を用いた PLP 遺伝子産物の分化因子活性の検討

PLP 遺伝子は従来オリゴデンドロサイト特異的に発現していると考えられていた。しかし，近年，PLP 遺伝子変異マウスジンピーのオリゴデンドロサイトは正常に分化することが出来ないが，正常マウスのアストロサイトの培養上清中に含まれる液性因子によってこれが回復することが報告された。すなわち，PLP 遺伝子はアストロサイトなどオリゴデンドロサイト以外の細胞にも発現し，オリゴデンドロサイトの生存維持又は分化促進に機能していることが示唆された。我々はアストロサイトや神経系に由来する培養細胞には広範に DM-20mRNA が産出されていることを報告してきた。そこで，特に多くの DM-20 を産出していたマウスオリゴデンドログリオーマ G26 細胞，マウスメラノーマ B16 細胞，ラットニューロブラストーマ B104 細胞の培養上清を回収し，これをマウス大脳の初代培養系に加え，オリゴデンドロサイトのマーカーである抗ガラクトセレブロシド抗体陽性細胞数の変化を測定した。するとこれらの培養上清中にはオリゴデンドロサイトの分化を促進する液性因子が放出されている事が明らかとなった。更に我々は，この因子が PLP 遺伝子発現に直接関連したものであるかどうか検討するため，強制発現レトロウイルスベクターを開発し，PLP 又は DM-20cDNA を非神経系の細胞である NIH3T3 に導入したところ，その培養上清にはやはりオリゴデンドロサイト分化促進活性が検出された。PLP や DM-20 蛋白質は強制発現細胞のゴルジ体や祖面小胞体に局在していた。この結果，PLP 遺伝子産物もしくはその修飾産物がオリゴデンドロサイトの分化を促進する液性因子の産生又は放出に機能していることが示された。

PLP －トランスジェニックマウスを用いた解析

我々は，DM-20 の機能を検討するため，PLP 遺伝子全長45Kb を用い，２コピーの外来性遺伝子を有するトランスジェニックマウスを作製し，このマウスにおいてオリゴデンドロサイトの分化・生存異常の生じることを報告した。本年も，この PLP －トランスジェニックマウスについて更に詳細な解析を進めた。

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) を電子顕微鏡を用いて観察すると，ほとんどの軸索にはミエリンが巻いておらず，オリゴデンドロサイトの細胞体にはゴルジ装置が変性したと考えられる異常な液胞が多数観察され，細胞自身が変性していることが明らかとなった。in vitro の系での結果から，PLP 遺伝子産物はゴルジ体や粗面小胞体に産出され，ここでの機能が示唆されていたが，過剰な発現により，逆にこれらの細胞内の小器官の機能を阻害し，オリゴデンドロサイトの変性を招いたことが考えられた。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途中で異常を起こした結果，ミエリン形成が障害されたことを示唆している。ジンピーマウスによく似たこれらの所見は，PLP 遺伝子がオリゴデンドロサイトの細胞分化に対して何らかの機能を有することを示唆している。

最近，DM-20 は DM 遺伝子ファミリーを形成しており，それぞれの遺伝子が現在の脊椎動物にも発現し，機能している分子であることが示唆された。その後，PLP は進化の過程であらたなエクソンを獲得しミエリン蛋白質として機能するようになった事が示唆された。構造的にはこれら DM ファミリー遺伝子はそれぞれシビレエイのアセチルコリンレセプターやラットのグルタミン酸受容体タイプ１型の膜貫通ドメインと相同性が高いことから，イオンチャネルとしての活性が期待される。また，その中には神経細胞特異的に発現しており，その機能は神経突起伸展に関するものであることも示唆されている。この DM 遺伝子ファミリーは神経系特異的なイオンチャネルを形成する事によって，神経系分化を制御する遺伝子群である可能性も考えられ興味深い。現在，我々は PLP 蛋白質を精製し，そのイオンチャネルとしての機能を解析している。

組織特異的に遺伝子発現を行うレトロウイルスベクターの開発と遺伝子治療への応用

吉松忠憲，田村雅一，中平健祐，池中一裕

悪性腫瘍の遺伝子治療のベクターとしてレトロウイルスが多く用いられる。このベクターの特徴は第一に分裂・増殖している細胞の遺伝子にしか組み込まれないことが挙げられる。癌細胞は活発に増殖しているのに対し，周りの正常細胞はほとんど分裂しない。そのため，細胞毒性を示す遺伝子を発現するように組み換えられたレトロウイルスは癌細胞特異的に殺細胞性を示すことが期待される。しかし，このように増殖細胞特異的に毒性を示すという特徴は多くの化学療法剤にもあり，骨髄や腸上皮細胞など活発に分裂している正常細胞をも区別することなく殺すことによって骨髄抑制や下痢という重大な副作用を引き起こすことは周知の事実である。

われわれは脳特異的に発現する遺伝子を多数クローニングし，その組織特異的な発現に必要な遺伝子プロモーター領域を同定してきた。これらの脳特異性を示すプロモーター領域の制御下に毒遺伝子を発現させれば，骨髄細胞や腸上皮細胞にレトロウイルスが感染しても毒遺伝子は発現

しないので，先に述べたような副作用は現れないはずである。しかもこの時，グリオーマ内でも機能する脳特異的プロモーターを用いればグリオーマ細胞を特異的に殺すことが可能となる。

そこで，昨年度開発したプロモーター活性測定系を用いてグリオーマ特異的な発現を行うプロモーターを検索した。脳特異的に発現するプロモーターのうちグリア系の細胞特異性を示すMBP (Myelin Basic Protein), PLP (Myelin Proteolipid Protein), GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) 遺伝子プロモーターを調べたところ，MBP プロモーターがグリオーマにおいては非常に活性が強く，他の細胞 (NIH3T3 繊維芽細胞，A20-2J B　リンフォーマ) ではほとんど発現しなかったので，グリオーマ治療には最適であることが明らかとなった。

そこで，MBP プロモーターの下流に HTK (Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase) 遺伝子を接続したレトロウイルスベクターを構築し，グリオーマ選択的に殺細胞性を示すかどうかを検討したところ，組み換えレトロウイルスが導入されたグリオーマ (RSV-M) が低濃度のガンシクロビルで選択的に死滅した。このように組織特異的な発現を行うレトロウイルスベクターを用いることにより副作用の少ない癌の遺伝子治療が可能となりつつある。

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

1．はじめに

大脳の海馬体におけるシナプス伝達効率の長期増強現象 (long-term potentiation: LTP) は Bliss らにより約20年前に発見され，記憶のモデルとして考えられている。しかし，電気生理学的に LTP を誘導するために用いる入力線維群の高頻度刺激（テカヌス刺激）という現象は生体内では起こりにくく，またレセプターなどの標的分子の同定など物質レベルの実験が困難であった。近年ハチ毒から精製された MCD ペプチド (Mast Cell Degranulating peptide) が海馬切片上で LTP 様の現象を起こすことが報告された。この MCD を用いれば電気刺激で LTP を誘導するよりも容易に受容体など LTP に直結した物質を同定でき，分子生物学的アプローチに適していると考えられた。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強いペプチドであり当研究室では MCD の全合成に成功した。さらに脳の海馬領域において LTP を誘導することも確認し，その作用機序を検討してきた。本研究では MCD が LTP を誘導するのに最も重要である2つの作用に注目し，① MCD の脳内高親和性結合部位である電位依存性の K^+ チャンネルの精製と機能解析，② MCD で活性化される G 蛋白の下流の情報伝達経路について検討を行った。

2．脳内 MCD 高親和性受容体の精製と機能解析

ヘビ毒デンドロトキシンⅠ (DTx Ⅰ) は MCD とおなじ脳内結合部位に MCD よりも強く結合する性質を有する。この性質を利用して DTx Ⅰのアフィニティーカラムを作製し，ラット脳膜画

分からMCD結合蛋白を精製した。DTx Ⅰはブラックマンバ毒からゲル濾過カラム，イオン交換HPLC，逆相HPLCにより精製し，アフィニティーカラムのリガンドとして用いた。アフィニティーカラムの溶出画分はイオン交換HPLC後リポソームに組み込んだ。このリポソームを平面脂質二重膜に組み込むとK^+チャンネルを再構成した。これによりMCD結合蛋白は，以前から推測されていたように電位依存性のK^+チャンネルであることが確認された。さらにこのK^+チャンネルはMCD添加によりそのK^+電流が阻害されることが新たに明らかとなった。そこでMCD感受性のあると報告されているK^+チャンネル(RCK1, RCK2, RCK5)に対するそれぞれのペプチド抗体を作製し，どのK^+チャンネルがMCDのLTP誘導機構に最も重要であるか検討を行った。海馬の初代培養細胞とラットのパラフィン切片の海馬CA1領域における免疫組織を行い検討した結果，RCK1の発現分布とMCD結合部位の分布とがよく一致し，RCK1が最も重要であると考えられた。しかしながらRCK1チャンネルはゼノパス卵母細胞に発現させると遅延整流型の不活化しないチャンネルを形成するが，海馬CA1錐体細胞でMCDにより阻害されるK^+チャンネルは一過性のAチャンネルであることが明らかとなり矛盾する結果となった。そこでRCK1が他のK^+チャンネルとヘテロマルチマーを構成しMCD感受性であり，かつ一過性の電位依存性K^+チャンネルとして存在する可能性を検討した。その結果MCD非感受性であるが一過性のAチャンネルをゼノパス卵母細胞で形成するRCK4蛋白がRCK1蛋白と海馬CA1領域で同じ分布を示すことが明らかとなった。すなわちこの2つのK^+チャンネルが海馬CA1の神経細胞でヘテロマルチマーを構成しMCDのLTP誘導に関与していると考えられた。しかしながらMCDのLTP誘導に必要な濃度（最低0.1μM）と脳内高親和性結合部位への結合定数には100倍以上の開きがることからMCDのG蛋白活性化作用も重要であると考えられた。

3．G蛋白の活性化により阻害されるK^+チャンネルの存在

精製MCD結合蛋白を平面脂質二重膜に組み込んだ際，50nM以下のMCDでは阻害がかからないK^+チャンネルの存在が見いだされた。このK^+チャンネルは平面脂質二重膜に大きなコンダクタンスを示すチャンネルであり高濃度のMCD（150nM以上）でやっと抑制のかかるものであった。このMCD濃度は高親和性結合部位への結合濃度ではなくG蛋白を活性化する濃度に近いものであったので，精製蛋白画分にG蛋白が含まれているのかどうか検討した。G蛋白の抗体を用いたウェスタンブロットと百日咳毒素によるADPリボシル化の実験からGoとGiのG蛋白の存在が確認された。そこでこのK^+チャンネルにG蛋白の活性化剤であるGTPγSを添加することによる影響について検討した。その結果このK^+チャンネルはG蛋白が活性化することにより直接阻害されるものであることが明らかとなった。G蛋白が直接関与するK^+チャンネルはこれまでにも多く報告されているが，そのほとんどはG蛋白が活性化することにより活性化される内向き整流型のものであり，G蛋白が活性化することにより直接不活性化されるものは見つけられていない。今後このチャンネルの分子構造も明らかにしていく予定である。

4．結論

以上の実験結果からMCDは海馬のCA1領域においてRCK1蛋白とRCK4蛋白のヘテロマル

チマーとして存在するAチャンネルを阻害し，さらにG蛋白を活性化することより直接ある種のK^+チャンネルを阻害することによりLTPを誘導する可能性が高いと考えられた。Aチャンネルには脱分極後の頻回発火を鎮静化する作用があるのでMCDはこのAチャンネルを阻害することにより細胞の興奮性を高めると考えられる。しかしAチャンネルの阻害だけでは一過性にしかシナプス伝達効率は増強されないことがAチャンネルの特異的阻害剤である4アミノピリジン添加実験から報告されている。したがってMCDはG蛋白を活性化することによってある種の他のK^+チャンネルの阻害も行い，長期に渡るシナプス伝達効率増強を行っていると考えられる。

錐体におけるオプシン輸送小胞の日周期変動

平野　穣，大塚輝彌

網膜の視細胞は，外節の基部で新しい外節膜が形成され，遠位端が脱落(shedding)する。外節の脱落は杆体では昼間に，錐体では夜間に起こることが，これまでに多くの動物種で確認されてきた。このように外節膜の形成と脱落に関する報告は数多くあるが，視物質の動態や外節膜への組込みなど，供給に関してはよく分かっていない。そこで免疫組織化学的な方法を用いて錐体オプシンの動態を形態学的に解析した。

実験には12時間の明暗サイクル下で，2カ月間飼育した体長約5㎝のキンギョを用いた。光源には白色蛍光灯を用い，水面上の光エネルギーは300μW/cm^2であった。一定時間毎に採取したキンギョは，MS222で麻酔後，眼球を摘出して後眼部をザンボニ液で固定し，型通りに5-10μmの凍結切片を作製した。1次抗体はJohnsonら(1994)によって解読されたキンギョ青錐体オプシンの一部を抗原として，家兎に免疫して得た抗体(Gf-B-N)を用いた。FITCまたはTRSCで標識した2次抗体を用いて，免疫反応を落射蛍光顕微鏡下で観察した。さらに内節に見られる陽性顆粒を定量的に解析するため，共焦点レーザー顕微鏡（オリンパス，LSM-200）を用いた。

キンギョの錐体は形態学的な分類では6種類に分けられる。青錐体オプシンに対する抗体(Gf-B-N)は，この内の短錐体のみに陽性反応を示した。短錐体は外節の他に内節のゴルジ体，粗面小胞体，さらに終足なども陽性反応を示した。さらに内節には多数の陽性顆粒が認められた。この顆粒は点灯（朝6時）直後から消灯（夕6時）までの昼間では，どの時間に採取したキンギョにも青錐体の内節には平均7個／錐体の陽性顆粒が見られた。一方，消灯直後から，内節の陽性顆粒は急速に増加して，3時間後には平均50個／錐体が見られた。この数は時間に伴って漸次減少し，明け方には昼の平均数に戻っていた。陽性顆粒の増減と内在性リズムと光照射との関係を調べるため，昼および夜のキンギョにそれぞれ暗順応，明順応を行った。この結果，陽性顆粒数は光によって変化する因子と内在性リズムの2つの因子からなっていることが明らかになった。

内節の myoid の仲長を制御する 2 つの因子と同様であると考えられる。

さらに免疫電顕法でこの顆粒の微細構造を解析した結果，直径 30-100nm の小胞構造が認められた。これらの結果から内節の夜間に増加する陽性顆粒は，錐体オプシンの輸送小胞であることが確認され，さらに光と内在性リズムによって小胞数が増減することも明らかになった。これまで杆体オプシンが昼に増加するという報告があるが，本研究では夜間に外節が脱落する錐体の場合には，杆体と異なりオプシンが夜間に増加することを形態学的に明らかにした。

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は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。特にこれまでに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，AJ の解析の延長として，tight junction (TJ) の解析を始めた点である。特に，これまで，全く分からなかった TJ の接着分子と思われる分子の同定に初めて成功し，オクルディンと名付け，その cDNA クローニングに成功したことは，きわめて大きな成果であった。この成功をきっかけにして，TJ の分子生物学を大きく飛躍させていく方針である。

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もつのではあいかは我々は考えた。そこで，昨年までに，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に成功し，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を見い出した。本年度はさらに，乳癌の同様のタイプでもαカテニンの発現がほとんど見られないことが分かった。さらに，αカテニンの遺伝子が，ヒトで，5q31の染色体上にあることも分かった。この位置は，癌細胞でしばしばLOHの見られる部位である。以上のことから，αカテニンがある種の癌の抑制遺伝子産物として働いている可能性が強く示唆された。

220KDAJ裏打ちタンパク質，ZO-1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，これまで単離AJの主要構成蛋白質として分子量220kDの裏打ち蛋白質を同定し，そのcDNAのクローニングにより，この蛋白質がZO-1と呼ばれていたTJの裏打ち蛋白質と同じものであることを示した。この研究により，ZO-1の全構造が初めて明らかとなっただけでなく，この蛋白質とカドヘリンとの深い関係が初めて明らかにされたのである。本年度は，このZO-1の機能をさらに解析するために，ES細胞を用いた相同遺伝子組替え法による遺伝子ノックアウトを開始した。全長のZO-1cDNAをもとに，遺伝子を単離し，相同組替えによる遺伝子破壊のためのコンストラクトを作製し，ES細胞に導入した。PCR法とサザーンブロティング法によるスクリーニングの結果，相同遺伝子のうち一方が破壊された細胞を得ることに成功した。この細胞は機能上全く異常が見い出されなかった。現在，残されたもう一方の遺伝子を破壊し，ZO-1

を全く欠損したES細胞の作製を試みつつある。このような細胞が得られれば，試験管内で上皮に誘導することにより，上皮形成におけるZO-1の役割を明らかにする予定である。

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。一昨年，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らかの膜蛋質に結合してその機能を発現しているものと推測できる。昨年度は，この膜蛋白質の同定を試み，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。

本年度は，この膜蛋白質に対するモノクローナル抗体を作製することに成功し，得られたモノクロール抗体を用いて，この膜蛋白質をコードするcDNAを単離することを試みた。その結果，いろいろな基準から考えて，正しいcDNAが単離できたと考えられたので，その塩基配列を決定した。ホモロジーを検索した結果，この膜蛋白質がCD44そのものであることが明らかとなった。CD44は広くいろいろな細胞に分布する膜糖蛋白質で，接着分子として機能し，癌転移などに重要な役割を果たすとして注目を集めている蛋白質である。ラディキシンとCD44の分布を詳細に調べてみた結果，完全に一致することも分かった。今後，CD44とラディキシンの結合の調節機構をさらに明らかにしていく必要がある。

アンチセンスオリゴを用いたERM蛋白質の機能の解析

武内恒成，月田承一郎

前述のラディキシンは，エズリン，モエシンときわめてよく似ており，一つの遺伝子ファミリーを形成する。我々はファミリーにERMファミリーと命名した。このERMファミリーの機能を解析するために，アンチセンスオリゴを用いた解析を開始した。エズリン，ラディキシン，モエ

シンの最初のATGから24塩基に対するアンチセンスオリゴをS－オリゴの形で合成し，培養細胞の培養液に加え続けた。培養細胞としては，上皮細胞としてMTD-1を，浮遊細胞としてリンフォーマ細胞を用いた。

まず，アンチセンスオリゴにより，それぞれの分子の発現が特異的に抑えられることを確認した。そして，3種類のアンチセンスオリゴを混ぜた時のみ，細胞間接着，細胞基質間接着，微絨毛の破壊が起こることを見い出した。詳細な解析の結果，(1)エズリン，ラディキシン，モエシンの発現の重複は，安全のためのリダンダンシーであること，(2)EMR蛋白質は，細胞膜とアクチンフィラメントの結合に直接関与することにより，細胞接着や微絨毛形成において重要な役割を果たしていることが示された。

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込まれ，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たしていることを示している。さらに，詳細な分裂機構形成の分子機構を解析中である。

タイトジャンクションの構成膜蛋白質，オクルディンの同定

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 分画にカイトジャンクション (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。我々は系統発生上遠いニワトリの肝臓より得た AJ 分画から調製した膜分画をラットに注射してもモノクローム抗体を多数作製し，その中から TJ の膜関白室を認識すると思われる抗体を運び出すことに成功した。この抗体は光学顕微鏡レベルでも，電子顕微鏡レベルでも，特異的に TJ を染色した。以上のことから，我々はこの膜蛋白質をオクルディンと命名した。

さらに，この抗体を用いて，オクルディンをコードする cDNA を単離した。そして，構造を詳細に解析した結果，オクルディンは，膜を 4 回貫通するタイプの膜蛋白質であること，その細胞外領域が異常にグリシンとチロシンに富んでいることなどが明らかになった。このように，TJ には全く新しいタイプの膜蛋白質が局在することが明らかになったので，今後分子生物学的手法を駆使して，TJ の機能を分子レベルで解析していく予定である。

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。さらに c-protein の各部分のリコンビナント蛋白質を作製して用いることにより，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絞り込むことに成功した。

高次神経機構研究部門

【概要】

高次神経機構部門では，1993年９月より八木　健が着任した。1994年度より三品昌美教授が着任する予定である。

本研究部門では中枢神経系の構造・機能がどのような遺伝情報として保存され，分子メカニズムとして機能しているかを研究している。当然，本能や学習を含む動物の行動は中枢神経系の構造・機能に依存しているので行動がどのように遺伝情報として保存されているかについても研究を展開している。現段階ではマウス胚幹細胞を用いた発生工学及び遺伝工学的手法を用いて中枢神経系の構造・機能に関連している遺伝子座を改変したマウス個体を得，その異常について解析を行っているが，今後は得られた変異マウスの結果をふまえながら中枢神経形式・行動様式を制御している新たな分子や分子メカニズムの解明を模索して行くことを考えている。

我々は最近神経系で細胞間相互認識に重要な機能を持つと考えられている Fyn 遺伝子座を改変した変異マウスの作製に成功した。このマウスは哺乳行動の異常が認められるだけでなく，ミルクプールを用いた空間学習行動に異常が認められた。現在，これらの行動異常と Fyn がどのように関連するかについてその分子メカニズムの解析を進めている。また，同時に空間学習と関連しているシナプスの長期増強に関わる NMDA レセプター遺伝子座を変換したマウスの解析，ニューロンネットワーク形成に関わる遺伝子座変換マウスの作製を行う予定である。

Fyn 欠損マウスの形態・行動異常の解析

八木　健

現在までに我々は Fyn 欠損マウスにおいて海馬体の構造異常，学習・哺乳行動の異常を認めている。しかし，Fyn は中枢神経系形成過程に於いて感覚神経経路，ミエリン形成過程，嗅球，海馬，大脳，小脳，感覚系の神経核で特徴的な発現を示すことが観察されるので，他の脳領域・行動異常も考えられる。我々は現在，中枢神経系形成過程での構造異常，及び他の行動異常について詳細な観察を行っている。その結果，形態的には，海馬以外に嗅球の Glomeruli，大脳皮質層構造，小脳小葉形成等で新たに異常が観察されている。また，行動では情動行動に関する異常，環境ストレスにより行動異常を生じやすい等の新たな異常が観察されている。現在，これらの異常の観察を進めるとともに，その異常における Fyn の役割について解析を進めている。

Fyn が機能する学習領域の決定

渡部　聡，光村直洋，八木　健

Fyn 欠損マウスでは学習障害が認められている。この異常は，現在海馬体での異常であると考えられている。しかし，本当に海馬体に依存した変異であるかどうかについては，Fyn の発現が脳の広範で認められることより明らかではない。我々はこの行動異常が脳のどの領域，またどの神経形成過程時期に関連するかについて，遺伝子導入法，ジーントラップ法を応用した新たな方法を開発し，解析を進めている。

脳神経形成・学習に関連する新たな情報伝達分子の同定

安田昌弘，八木　健

脳神経系形成・学習・記憶に関連する情報伝達分子については現在までのところ殆どは神経伝達分子阻害剤の作用機作からの解析が進められている。我々が得ている Fyn 欠損マウスの神経系形成・行動異常の観察より Fyn が神経系形成・行動制御の遺伝情報として重要な役割を担っていることが明らかとなった。Fyn は細胞外から細胞内への情報伝達に関連した分子であり，脳形成過程に於いて Fyn と共役して機能する分子は行動制御・神経系形成の遺伝情報として重要な分子であることが想像される。この共役分子を同定・解析することにより，Fyn が神経系でどのような細胞外情報を細胞内に伝えているのかを解明するとともに，神経系形成・行動制御の新たなメカニズムの解明を目指して研究している。

Yeast 系を用いたマウス脳神経形成を司る分子の同定

甲斐信行，八木　健

脳神経系で機能する分子は，機能している神経経路の多様な分化に依存して多種存在している可能性がある。また，それらの分子の発現は領域・時期において限定されていることが想像される。よって，神経回路形成に特徴的な役割をもつ分子の解析には，分子を同定・解析する技術として限局された 1 種類の分子を相手にできる技術が必要となる。我々は最近開発された yeast での two hybrid system を用いて神経回路形成に特徴的な新たな分子の同定を試みている。

脳神経形成過程を司る遺伝子発現調節分子の同定

光村直洋，八木　健

脳神経系形成に於いては各脳領域・発生過程で特徴的な遺伝子発現制御を司る分子の存在が想定されているが，現在までのところその実体は殆ど分かっていない。β－ガラクトシダーゼを用いたFynの発現様式の解析で，Fynは感覚神経経路，ミエリン形成，神経伸長，学習に関連する神経回路等で特徴的な発現を示す。我々はこの発現調節に関連する新たな分子を同定することをとうして，神経回路形成，学習行動形成の遺伝子発現制御による調節機構の解明を目指している。

新たな薬剤耐性遺伝子，胚操作法を用いたマウス胚幹細胞遺伝子操作法の開発

渡部　聡，八木　健

近年，遺伝子欠損マウスの作製法が開発され多くの成果が報告されている。しかし，この技術は未だ一般的なものではなく幾つかの克服されなければならない技術的な壁がある。この壁を乗り越えるために現在，我々はより簡単なキメラマウス作製技術の開発に努めている。また，今まではマウス胚幹細胞のG418耐性株でのみ変異マウス作製系が成功していたが，他の薬剤については未知であった。他の薬剤を使うことにより，胚幹細胞でのダブルミュータントの作製，他の遺伝子導入等が可能となる。現在，我々はこれらの点からの技術開発を進めている。

NMDAレセプター分子欠損マウスの作製

三品昌美，八木　健

NMDAレセプターはシナプスの可塑生に関連する分子であり，学習・記憶への関与が想定されている分子である。我々はこの分子を現在までに同定し，この遺伝子欠損マウスの作製を試みている。

マウス，コラプシンの単離と遺伝子欠損マウスの作製

谷口雅彦，渡部　聡，成瀬一郎，八木　健

コラプシンは神経伸長を阻害する細胞外分子であり，神経経路形成，シナプス形成機構に重要な分子であることが想定されている。われわれはマウスでこの分子を同定するとともに，その遺伝子欠損マウスの作製・解析により，その脳神経系形成過程での意義について研究を進めたいと考えている。

情報記憶研究部門

【概要】

本部門は，本年度から金子章道（教授），中谷敬（助教授）及び倉橋隆（助手）の新メンバーによってスタートした。さらに平成５年９月から平成６年３月まで統合生理研究施設客員教授として来所した，コロラド州立大学教授 E. L. Pautler 博士が当部門において研究を行った。主に(1)視覚系や嗅覚系などの感覚系における生体刺激の受容機構及び(2)神経ネットワークにおける情報処理機構の解明をめざして，電気生理学的手法を中心にもちいて研究を行っている。

感覚細胞の情報変換の機構に関する研究の歴史は古く，視細胞や聴覚・平衡感覚を司る有毛細胞に関する情報変換の機構はすでに多くの知見が得られている。しかしながら，嗅細胞や味細胞など化学刺激をキャッチする感覚細胞の情報変換機構に関しては驚くほど未知の問題が多く残されている。本部門では，生体から単離した嗅細胞にパッチクランプ法を適用して，嗅細胞の匂い物質に対する膜電流応答を観測する実験に成功している。この系を用いて，現在(1)匂い情報の電気信号への変換機構，(2)嗅覚細胞における匂い順応のメカニズム，(3)匂い情報変換チャネル（＝cAMP 感受性チャネルと Ca 感受性 Cl チャネル）の特性を知るための実験を進めている。

また，本部門では網膜の情報処理機構に関する研究を行っている。網膜は視覚情報を処理する神経ネットワークであり，脳などの高次神経ネットワークのモデルとして，その情報処理機構の解明が注目されている。本部門では，主に網膜から単離した神経細胞にパッチクランプ法を適用して，個々のニューロンに対する伝達物質の作用機序やその細胞内情報伝達系に関する実験を行っている。最近，網膜第２次ニューロンで視細胞からシナプス入力を直接受容する双極細胞の情報変換機構に関して興味ある知見が得られた。網膜内の双極細胞は光刺激に対して脱分極性応答を示す On 型と，過分極性応答を示す Off 型とに分けられる。本部門では，ネコ網膜から単離した双極細胞が，視細胞の放出するグルタミン酸に対して全く異なる応答を示す２つのグループに分類できることを見いだし，各々が On 型双極細胞と，Off 型双極細胞に対応するものであることを明らかにした。すなわち，第一のグループは，グルタミン酸によって陽イオンチャネルが

開口し，またもう一つのグループの細胞では，逆にグルタミン酸によって陽イオンチャネルが閉じるのである。また，後者の情報伝達には細胞内の cGMP が重要な役割をしていることがわかり，現在，双極細胞の cGMP 感受性イオンチャネルの解析を行っている。

E. L. Pautler 博士は，視神経機能の維持に関する研究を行った。

網膜色素上皮に発生する光応答の発生機序

Eugene L. Pautler （生理研）

眼に強い青色光を照射すると網膜が障害を受けることが知られている。この効果は「青色光効果」として知られている。この原因は網膜直接ではなく，色素上皮，脈絡膜にあるとされているが，詳細は不明である。今回は網膜色素上皮に対する「青色光効果」の発生機構を明らかにすることを目的として本研究を行った。市内の屠場から入手し，低温条件下で輸送した新鮮なウシの眼球から網膜色素上皮を膜状に剝離し，Ussing の記録装置に装着した。色素上皮膜の両側を炭酸バッファを含む生理的溶液で灌流した。通常の室内照明下でこの標本に0.1-0.5％の Ethanol を投与すると応答振幅約 2mV の網膜側がプラスになる応答が記録された。しかし，暗黒中で Ethanol を投与しても応答は発生しない。Ethanol 依存性応答 (EIR) の作用スペクトルは 520mm にピークを示した。網膜は残存していないので，この応答は色素上皮細胞自身が光感受性を持っていること，スペクトルの最大値から考えて，厳密な意味では青色光効果ではないことが明らかになった。また，この応答は百日咳毒素によって消失したが，コレラ毒素には影響されなかった。EIR の発生には GTP 結合タンパクを含む細胞内情報伝達系，おそらくアラキドン酸の関与が考えられた。

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門

【概要】

随意運動，感覚入力に対する選択的注意の中枢神経機構を大脳基底核とそれに関連する脳領域に於いて研究している。サルに複数のボタンを手で順に押していくという手続き的記憶課題を行わせて，その学習過程，形成された記憶の性質，そして，それらに対する大脳基底核諸核の神経活動抑制の影響を，彦坂，加藤美弥，宮下加枝，宮地，カラディらが研究した。また，サルに眼球運動課題を行わせ，眼球運動に対する大脳基底核淡蒼球外節の神経活動抑制の影響を加藤誠が調べた。さらに，視覚的注意と他の感覚 modality の注意との相互作用について人を被験者にして視覚的誘発電位，体制感覚誘発電位の変化を宮内哲，岡村宏樹らが調べた。

本研究部門では，彦坂は1993年９月より順天堂大学医学部第一生理学教室に転出した。加藤美弥は，６月よりアリゾナ州立大学に転出した。宮内は10月より郵政省通信総合研究所通信科学部信号処理研究室に転出した。宮下加枝，宮地らは1994年３月より順天堂大学医学部大学院に編入学した。宮下暢夫は1994年４月より順天堂大学医学部第一生理学教室に転出した。岡村は1994年４月より統合生理研究施設に移った。

サルの手続き的学習における予測的眼球運動の役割

宮下加枝，宮地重弘，彦坂興秀

運動の手続き記憶は学習によって獲得される。初めは動作ひとつひとつを意識的に行うが，反復すると巧みに，しかも自動的に行えるようになる。我々は今までに，手続き記憶の形成過程を調べるため，順序立てて一連のボタンを押す過程を開発し，サルの手の運動を中心に観察してきた。しかしこの課題は少なくとも学習の初期は視覚刺激を手の運動に変換しており，眼球運動が手続き記憶の獲得と表出に重要な役割をしていると考えられる。そこで課題試行時の眼球運動と手の運動との関係について調べた。

課題は縦横４個ずつ16個の LED ボタンを用いた，“２×５”の組み合わせからなる10個の sequence のボタンを押すものである。サルが手元のホームキーを押すと，16個のうち２個のボタンが同時に光る。(この２個の刺激の組合せを“セット”と呼ぶことにする。) サルはこれを正しい順序で押さなくてはいけないが，それは試行錯誤で見つける。２つを正しい順序で押すとボタンは順次消え，一定の delay の後，次の新たな２つが同時に光る。途中で間違えるとこの試行

は中断され，始めのセットからやり直す。このようにして５番目のセットまで順次記憶しボタンを押していくと，１回の試行が完了する。５つのセットの組合せをハイパーセットと呼ぶ。１つのハイパーセットは21回成功すると終了し，別の種類のハイパーセットを行う。この課題を用い，２頭のサルにおいて現在までに計約1000種類のハイパーセットについて調べた。用いる左右の手はハイパーセット毎に一定にした。

学習達成の基準を１つのハイパーセットにおいて10試行成功するまでとし，基準達成までの試行数，それに要した performance time をそれぞれ日を追って調べた。試行数は特に学習初期に急激に減少し，25日前後以降に一定になった。一方 performance time は40日過ぎまでに徐々に短縮した。

眼球運動を調べると，学習初期ではボタンが光って後約 120-200ms の latensy で押すべきボタンへのサッケードがおこる。このときボタン押しの latensy は 500ms 前後であった。しかし，学習が進むとボタンが光る前にサッケードが開始するようになる。サッケードの方向も一定になり，amplitude も大きくなるため，ボタンが光る前からすでに次に押すべきボタンに目を向けるようになる。すなわち予測的サッケードが出現する。このときのボタン押しの反応時間は 150-200ms であった。予測的サッケードの出現率は徐々に増加し，約25日目過ぎから60－70％まで上昇した。これは基準達成までの試行数が減少して一定になる時期と一致した。さらに，ビデオによる記録から，学習が進むにつれて眼球運動だけでなく予測的な手の運動もみられた。

そこで手と眼球の運動学習の関係を調べるために，ある課題の学習が片方の手で十分進んだ後，反対の手にかえて課題を行わせた。基準達成までの試行数，それに要した performance time が増加することは，すでに加藤美弥，彦坂らが報告した。これは学習が進むと用いる手に固有の運動の記憶が形成されることを示している。では眼球運動はどうだろうか。可能性は２つある。１つは用いる手が変わっても視覚についてみれば刺激の位置は変化しないので眼球運動は変わらない。もう１つは，眼球運動は手の運動と関連があるので影響をうける。結果は後者であった。用いる手をかえるとサッケードの方向が乱れ amplitude も hypometric で，ボタンが光る前に次に押すボタンに到達しなかった。いずれのハイパーセットについても手をかえると予測的サッケードの出現率が悪くなった。このことから予測的サッケードは用いる手に関連して形成されているといえる。

これらの結果より予測的サッケードは手の運動と関連しながら形成され，学習された sequential な運動の発現を先導する役割があると考えられる。

手続き記憶の神経機構

宮地重弘，宮下加枝，カラデイ＝ゾルタン，加藤美弥，彦坂興秀

大脳基底核は，手続きおよび運動の学習に関与していると言われているが，その役割は未だ明らかではない。我々は手続きの学習，記憶における大脳基底核の役割を調べるために，サルを用い，基底核の入力部位である線条体を muscimol でブロックして，以下に述べるボタン押し学習課題を行わせた。

サルの前には4×4＝16個の LED ボタンのついたパネルが置かれる。まずサルは，このパネルの下方にあるボタン (home button) を押して待っていると，パネル上のボタンの内，二つのボタンが1セットとして同時に点灯する。サルはこのボタンをあらかじめ決められた順序で押さなければならない。一つの課題 (hyperset) は5セットからなり，合計10個のボタンを決められた順序で押すこと (1 trial) になる。この課題では，異なった hyperset を8000億近く作ることが出来，いくらでも新しい sequence の学習を行わせることができる。この実験に使用しているサルは，現在まで700個以上の hyperset を経験しており，そのうち完全に覚え込むまでに学習したものが28個ある。以下で述べる注入実験ではこのサルが初めて経験する hyperset (new task) を180個，経験したことのある hyperset (learned task) を14個使っている。これらの learned task はいずれも200回近く経験している。

線条体への薬物の注入のために，脳の前後方向の30のレベルに合計12本の guide tube を埋め込んだ。muscimol の量は，一個所につき 5μg, 1回の実験で1ないし4ヵ所に同時に注入した。課題は，一つの hyperset について21回成功するまでを1ブロックとして，ブロックが終わるごとに別の hyperset をやらせた。注入を行わない日も，トレーニングのため，また，通常の学習過程を見るために，平日は毎日この課題を行わせた。注入実験は，前日のトレーニング中に異常が見られないことを確認した上で行った。また，注入の次の日には，回復の様子を観察した。

線条体をブロックすると，予想される障害は少なくとも三種類考えられる。第一は学習症の障害。学習が障害されれば，new task でのエラーの増加となって現れるはずである。第二は記録された sequence の再現と実行の障害。これは，learned task でのエラーの増加として現れるはずである。三番目は運動そのものの障害である。これは，目や手の運動速度の低下として現れると考えられる。

muscimol 注入後の performance の変化を new task の学習，learned task の実行，目および手の運動能力，および運動の initiation の障害に注目して，各注入について観察した。これらの結果の中から，学習障害，記憶の再現の障害，運動の障害の3つについてまとめると，以下のようになる。

尾状核頭部あるいは吻側被殻の腹側部（尾状核との境界付近）への注入では強い学習障害が起こった。1ブロック，つまり21回 trial が成功するまでのエラーの数は，正常な状態では，

learned task ではほとんどが5回以下である。new task では10回から40回位間違えると。muscimol 注入後は，learned task ではあまり変化がみられないが，new task のエラーは非常に多くなった。多いときには，100回以上エラーを重ねてもとうとう10回しか trial の成功がなかった。正常な状態と，muscimol 注入後の学習課程を比べると，注入後の変化には3つの特徴がある。第一に，進歩が遅い。第二に一日5セットまで到達してもまた間違いを繰り返す。また特定のセットで繰り返し間違えることもしばしばあった。

被殻中央部および後方に同時にムシモールを注入した場合には，尾状核頭部（又は被殻吻側腹側部）のときとはまったく逆の結果となった。learned task での間違いが目立って増加したが，new task での間違いはそれほど増えなかった。また，この注入では，運動の速度の目立って低下した。眼球運動の速度の分布および各セット2番目の LED に対する反応時間を，注入前と比較した。2番目の LED への反応時間とは，1番目の LED を押してから2番目を押すまでの時間のことである。ここでは押すボタンを迷う余地はないので純粋に運動にかかった時間を表す。注入後では，眼球運動の速度は低下し，手の反応時間は長くなった。またこの日の実験の最後の方では catalepsy の様な症状が見られた。つまり，5セット目までボタンを押し終わっても手をパネルの上に置いたままでなかなか home button に戻ってこなかったのである。

被殻吻側部の被殻的広い範囲をブロックすると，intiation の障害あるいは motivation の障害と言うべき症状が起こった。LED が点灯しても課題を始めようとしなくなったのである。この時，一旦始めれば，課題の実行に問題はなかった。

以上の注入実験の結果をまとめると，以下のようになる。

1．尾状核頭部及び被殻吻側腹側部は，新しい sequence の学習にかかわっている。
2．被殻中央および後部は，すでに学習した sequence の実行に関与している。
3．被殻吻側部を広い範囲にわたってブロックすると motivation が障害される。

淡蒼球外節の可逆的ブロックによる眼球の対側偏位

加藤　誠，彦坂興秀

【目的】

最近の大脳基底核のモデルでは，基底核の入出力を結ぶ経路は大きく2つに分かれると考えられ，それらは Direct pathway, Indirect pathway と呼ばれる。眼球運動に関連する基底核内の経路において Direct pathway では，尾状核から黒質に直接つながり，尾状核への入力は結果として上丘を脱抑制し眼球運動を促進する。それに対して Indirect pathway と呼ばれている，尾状核から淡蒼球外節，視床下核を介して間接的に黒質につながる経路では，抑制性結合が一つ増えるため，運動を抑制すると考えられている。昨年，我々は，淡蒼球外節から unit 記録を行い，尾

状核，黒質での活動と比較したところ，淡蒼球外節の活動は，視覚性応答の受容野や sacade の movement field が大きく，尾状核や黒質に比べて選択性が低いことを報告した。従って，淡蒼球外節は，上丘のニューロンの活動を限定して不要な入力により興奮するのを抑制する働きを持つと考えられる。そこで，今回我々は，仮説を検証するため，淡蒼球外節の神経活動をブロックして眼球運動がどのように変化するのかを調べた。淡蒼球外節をブロックすると，視床下核は脱抑制され，黒質はより強く興奮して上丘は抑制され，対側に向かう眼球運動は抑制されることが予想される。

【方法】

実験には2頭のサルを用いていくつかの saccade task を学習させて，unit 記録により mapping した後，眼球運動関連ニューロンが多く存在する淡蒼球外節背側部に 1 μ 1 の saline に溶かした 5μg muscimol を注入し，眼球運動の変化を調べた。また control として淡蒼球外節背側部周囲にも注入を行い，症状の現れるまでの時間を比較した。

【結果】

自発性眼球運動を二次元表示して調べてみると，注入前では，スクリーン中央を中心にほぼ万遍なく眼球は動き注視点も中央付近に集まっていたが，注入20分後では眼位は注入部位に対して反対側に片寄り，saccade で見ると，対側に向かう saccade は小さいものが，同側に向かう saccade は大きいものが増え，注視点は，対側の hemifield に集中した。水平成分について見てみると，眼球は大抵は反対側に向いていて時々大きな saccade で同側に向かい，対側に戻るときには階段状に小さないくつかの saccade で移動した。1時間20分後では，眼球運動は対側の15-20度あたりで水平，反対側に向かう急速相をもつ nystagmus を起こすようになった。翌日24時間後では，それほど強くないが，逆に同側に眼位は片寄り，48時間後には，注入前の状態に戻った。saccade の amplitude と velocity の関係には明らかな変化が見られなかった。垂直成分では，注入前後で特に変化はみられなかった。

また，saccade task に対する効果に付いても調べてみた。サルはまず task の始めに，screen の中央の注視点に向かって saccade してそれに fixate する。注入後ではこのような saccade の latency が著しく延びた。次に中央の注視点が消えると同時に，target point がついてサルは target に向かって saccade する。target は20度 8 方向の中から random に一つ点灯する。このような saccade では，注入後には，反対側に向かう saccade の latency は短くなり，同時に向かう saccade の latency は長くなった。また memory guided saccade においても同様な効果がみられた。この場合，サルは注視点が消えた後，target は現れないで，数秒前に与えられた予告刺激の位置に向かって saccade する。このような saccade でも，注入後 latency は，反対側に向かう saccade では短くなり同側に向かう saccade では長くなった。saccade をその offset で揃えると，反対側に向かう saccade の速度が減少していた。サルが center に fixate しているときに，次に saccade を行うべき位置の予告として対側の周辺視野に視覚刺激を行っても，普通はサルは容易に fixate し続けることができる。しかし，注入後では，周辺視野に視覚刺激すると，fixate し続けること

ができず，その視覚刺激に向かって saccade がしばしば起こった。同側の視覚刺激では saccade は起こらず，むしろ，長い時間 fixate し続けられなく目が反対側に向かってそれて行くことがあった。

以上の注入による効果が現れ始める時間と，注入部位との関係を調べると最も効果の現れるのが早いのは，淡蒼球外節の背側の部分だった。この部位から遠ざかるにつれて時間が長くなった。従って muscimol は淡蒼球外節の背側部に作用して眼球運動の障害を起こしたと考えられる。この部分は昨年我々が報告したように，淡蒼球外節の中でも眼球運動関連のニューロンの多く分布している部分である。

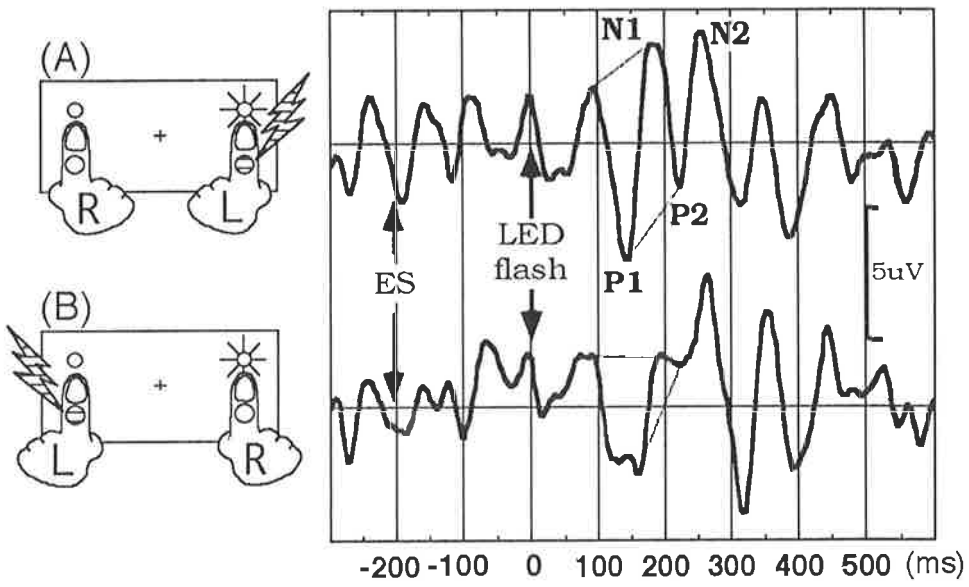
【考察】

muscimol による淡蒼球外節の抑制の効果は，大きく 2 つに分けられる。それは対側に向かう眼球運動を抑制する側面と，促進する側面である。抑制効果としては，反対側への saccade の速度が減少する場合があること，同側への saccade の latency が長くなること，促進効果としては，反対側への眼位の偏位，視覚刺激に対して fixation を維持できずに対側に saccade してしまうこと，反対側への saccade の latency が短くなること，がある。抑制効果は，従来の基底核の model による予想と一致するが，促進効果は説明が困難であり，この model を考え直す必要がある。可能性としては，淡蒼球外節のニューロンの活動を抑制した時に，脱抑制による視床下核の活動の増加が必ずしも起きない，或いは，視床下核の出力が興奮性ではなく抑制性の出力も含まれている，或いは，これらの経路以外にも淡蒼球外節から何らかの下降する経路があるのかもしれない。今後，淡蒼球外節を block したときに視床下核や黒質網様部の神経細胞がどのような活動を示すのか，調べる必要がある。

誘発電位による CROSSMODAL ATTENTION の研究

宮内　哲

Pourpose. "Illusory line motion" reveals focal visual attention (Hikosaka et al., Miyauchi et al., ARVO '91). The illusory motion can be yielded by non-visual (auditory and somatosensory) stimuli (Shimojo et al., ARVO '92). These results raised the possibility that spatial attention ia crossmodal. In order to get electrophysiological evidence for the crossmodality, we recorded evoked potentials to visual stimulation (VEP) which was preceded by somatosensory stimulation on the same or opposite side. Methods. The subject fixated a central spot while placing his index fingers just below two LEDs (7.8°apart from the fixation, to left and right). Electric stimulation (threshold × 2) was applied randomly to the right or left index finger, and one of the LEDs flashed after 0 to 400ms. Results. The early VEP components (latency: 100-250ms, P1, N1 and P2) were larger



when these two stimuli were on the same than opposite side. However, it was still possible that laterralized somatosensory information simply enhanced visual processing in the same hemisphere. To exclude this possibility, we asked the subject to cross his hands and repeated otherwise the same experiment. The VEPs were larger when the somatosensory stimulation was spatially matched (A), not hemispherically matched (B). Conclusions. These results suggest that there are cross-modal mechanisms of spatial attention.

生体システム研究部門

【概要】

本研究部門では運動の制御に関わる中枢神経系をシステムとして捉え，そのシステムが発現する作動様式の解析からシステムの構築原理とその動作原理を解明することを目的とする。このようなシステムは中枢神経系内において多くの場合 multi-synaptic な parallel neuron network として構成される。そのため第一にシステムを構成するニューロン間のシナプス接続様式を細胞内・外の膜電位記録法や spike-triggered averaging 法などを用いて電気生理学的に同定し，第二に順行性および逆行性の神経標識法を用いて，そのシステムを微小形態学的に同定する。第三にシステム構成ニューロンのそれぞれについて，興奮性および抑制性伝達物質に対する受容膜特性を同

定する。第四に同定できたneuron networkの起始部位に神経伝達物質を微小注入してその部位に存在する神経細胞群を選択的に興奮させ，その一方ではシステム構成ニューロンの活動様式を細胞外から同時に記録し，システム全体の作動様式を解明する。第五に同定できたシステム全体の作動様式を動物行動の発現およびその修飾様式と対応させる。

筋緊張の制御にかかわる脳幹・脊髄神経機構

森　茂美，松山清治，宮下英三，岩切裕昌

筋緊張のレベルは脳幹から下行するmultisynaptic-neuron networkの働きによって制御される。脳幹の吻側橋網様核nucleus reticularis pontis oralis (NRPo)から下行するreticuloreticular fibersは延髄の巨大細胞性網様核nucleus reticularis gigantocellularis (NRGc)に投射し，NRGcから始まる網様体脊髄路細胞reticulospinal neuronと興奮性にシナプス接続する。これらの網様体脊髄路細胞は脊髄レベルで抑制性の介在細胞inhibitory interneuronと興奮性にシナプス接続し，介在細胞は後肢の伸筋extensorおよび屈筋flexor支配の運動細胞と抑制性にシナプス接続する。すなわちNRPoのreticuloreticular neuronが興奮すると，上記のmulti-synaptic-neuron networkが活動し，伸筋および屈筋支配アルファ運動細胞に非相反性nonreciprocalな抑制効果がおよぶ。そしてその結果，筋緊張のレベルは低下する。しかしNRGcのreticulospinal neuronに脱促通効果がおよぶと，アルファ運動細胞群は抑制から開放されて興奮性を増強し，その結果，筋緊張のレベルは増大する。さらにNRPoのreticuloreticularおよびreticulospinal neuronは第Ⅳ脳室底の直下に拡がる背側被蓋灰白野dorsal tegmental grayに存在するアセチルコリン含有ニューロンおよびセロトニン含有ニューロンから神経支配をうける。すなわち筋緊張のレベルを抑制するNRPoのニューロン群はmonoaminergic-cholinergic interactionの支配下にもある。

吻側橋網様核からの単一下行性軸索の脊髄内投射様式

松山清治

脳幹の主要な下行性出力路である網様体脊髄路系は姿勢制御や歩行運動などの四肢・体幹の協調を伴う運動の遂行に重要な役割を果たす。このような網様体脊髄路系の機能的動作原理を明確にするためには，この系の脊髄内投射様式に関して形態学的にその微細構築を明らかにする必要がある。本研究では，単一下行性軸索レベルでの脊髄内投射様式について，その軸索側枝の脊髄内分枝様式および脊髄灰白質内における投射様式を明らかにすることを目的とした。ネコの脳幹

網様体とくに吻側橋網様核（NRPo 核）に順行性神経標識物質である Phascolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) を微量注入し，８週間の生存期間後に動物を灌流固定し，第３頚髄から第２胸髄にいたる頚膨大部を中心とした領域，および第４腰髄から第２仙髄にいたる腰膨大部を中心として領域について厚さ 50μm の凍結連続切片標本を作製した。これらの標本を用いて順行性標識された下行性軸索，その軸索側枝および神経終末を含む終末線維の走行および分布様式について光学顕微鏡的解析を行った。頚膨大および腰膨大領域のそれぞれにおいて，PHA-L 注入側と同側の脊髄前索内を下行する３本の単一軸索を同定することができた。これらの軸索について詳細な解析を行った結果，以下の３点を明らかにすることができた。１）脊髄内において，それぞれの下行性軸索からは複数の髄節に対して軸索側枝の分枝が認められた。それらの分枝は頚膨大領域では一髄節内で最小１から最大４本であるのに対し，腰膨大領域では最大２本と少なかった。２）それぞれの下行性軸索からの代表的な軸索側枝について，各髄節の灰白質内における投射様式を比較した。頚および腰膨大領域の両者において，２本の下行側軸索からの軸索側枝のすべては，主軸索の下行側と同側の脊髄灰白質内にのみその終末線維を投射した。他の１本の下行性軸索からの軸索側枝のすべては，主軸索の下行側と同側および反対側の灰白質内にも終末線維を分布した。３）投射領域は脊髄前角内の Rexed Ⅶ，Ⅷ層を中心とした脊髄介在細胞層が主体であった。さらにそれぞれの下行性軸索から分枝する軸索側枝の投射領域を複数の髄節にわたって比較したところ，同一下行性軸策から始まる軸索側枝はどの髄節レベルにおいてもほぼ同様な投射領域を示した。すなわちそれぞれの下行性軸索は，複数の軸索側枝を介して多髄節にわたりそれぞれの軸索に特徴的な灰白質領域へ終末線維を分布していることが解明できた。

運動学習の獲得過程に於ける大脳皮質体性感覚野の役割

宮下英三

大脳皮質体性運動野の可塑性について，浅沼ら (J. Neurophysiol. 1991. vol. 65 pp. 1435-1441) は，１）大脳皮質体性感覚野の頻回刺激によって大脳皮質体性運動野ニューロンに長期増強 (LTP) が生じること，２）視床運動核の頻回刺激のみでは大脳皮質体性運動野のニューロンには LTP は生じないが，視床運動核と大脳皮質体性感覚野の同時頻回刺激により視床運動核刺激に対する LTP が生じることを報告している。しかし，これら大脳皮質ニューロンに見られる可塑性の生理学的意義はいまだ十分に解明されていない。本研究では次の作業仮説を検証する目的で，二頭のサルを用いて実験を行った。“運動学習の獲得過程では大脳皮質体性感覚野が視床運動核の求心性入力に対して教師的な役割を演じるが，運動学習の獲得後において大脳皮質体性感覚野からの求心性入力は運動課題の遂行には必ずしも重要な役割を演じない。”実験パラダイムとしては，サルにとって上肢の高次運動技巧が要求される food-catching task を用い，一側の大脳皮

質体性感覚野を破壊した後にこの運動課題を左右の上肢でそれぞれ学習させた。次に，学習曲線がプラトーに達した時点で反対側の大脳皮質体性感覚野を破壊し，運動課題の遂行度に対する破壊の影響を考察した。その結果次の二点が明らかになった。1）運動課題の学習前に破壊した大脳皮質体性感覚野と反対側の上肢による運動課題学習の上達度は正常な大脳皮質体性感覚野と反対側の上肢による学習の上達度と比較して有意に低い。2）運動課題を学習した後に破壊した大脳皮質体性感覚野と反対側の上肢による運動課題の遂行度は一次的に低下するが3～5日後には破壊以前のレベルに回復する。これらの成績から，運動学習の獲得過程において大脳皮質本性感覚野は重要な役割を果しているが，学習結果の保持には必ずしも重要な役割を演じないことが示唆された。

睡眠・覚醒位相と内側橋網様体におけるセロトニンの細胞外液レベルとの関係

岩切裕昌

本研究では細胞外液中に遊離された神経伝達物質の連続測定を可能とする脳内微小透析法を用い，内側橋網様体の細胞外液中に遊離されるセロトニンレベルを測定し，そのレベルと睡眠覚醒位相との関係を解明しようと試みた。実験には成ネコをもちいた。脳内微小透析用の透析プローベ（透析膜長3mm，直径220μm，分画分子量4500）を内側橋網様体へ刺入し，そのinletからリンゲル液を1μl/minの流速で灌流し，得られた灌流液中に含まれるセロトニンレベルをHPLC-ECDをもちいて測定した。また同時に脳波，筋電図，眼球運動およびPGO波を記録し睡眠・覚醒位相を判定した。その結果動物の覚醒時にセロトニンレベルはもっとも高く，徐波睡眠時には低下し，レム睡眠時にはそのレベルはさらに低下することが解明できた。睡眠・覚醒位相の変化とセロトニンレベルの変動との間には有意な関係を認めたが，睡眠，覚醒位相の変化と5-HIAA（セロトニンの代謝産物）レベルの変動との間には有意な関係を認めなかった。本研究の結果から内側橋網様体に投射するセロトニン作動系は覚醒時，徐波睡眠時，レム睡眠時の順でより強く活動し，睡眠・覚醒の制御に重要な役割をは果たしていることが示唆された。

高次液性調節研究部門

【概要】

本研究部門は，高次脳による随意運動の制御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領野や大脳基底核，小脳などが，それぞれどのような局面でどのように運動の発現や調節に関与しているかを調べている。具体的には，慢性サルを用いて運動課題遂行中に脳の各部

位から神経細胞活動を記録する神経生理学的実験と，各種の順行性・逆行性標識物質を脳の各部位に注入して入出力を同定する神経解剖学的実験を組み合わせて行っている。本年度は，1）被殻の運動制御におけるドパミン受容体サブタイプの役割，2）複数の運動を順次遂行する際の補足運動野と一次運動野の細胞活動（共同研究），および3）視床腹側核を中心とした神経回路網（共同研究）について検討した。

被殻の運動制御におけるドパミン受容体サブタイプの役割

稲瀬正彦，瀬尾　道，丹治　順

大脳基底核の機能を考える上で極めて有力な，DeLong 等の提唱する「直接路・間接路」仮説を，慢性サルを用いて検証した。すなわち，1）被殻ニューロンは，D1 型および D2 型ドパミン受容体作働薬に対する選択性により 2 群に分けられるか，2）2 群に分けられるなら，各群は運動制御においてどのような情報を有しているか，について調べた。

実験には，2 頭のニホンザルを用いた。遅延型 GO/NOGO 課題を遂行中に，多連微小ガラス管電極を使って，被殻から課題に関連したニューロン活動を記録し，微小電気泳動法により選択的 D1 型 (SKF38393) および D2 型 (Quinpirole) ドパミン受容体作働薬を投与して，その応答を調べた。さらに，課題関連活動と薬物応答性との関係を検討した。

その結果，課題関連活動を示し，両型の作働薬の応答性を調べた296個の被殻ニューロン中，234個で何らかの薬物応答を得た。95％以上の細胞では，投与した薬物により自発発射頻度は変化せず，課題関連活動が増減した。薬物に応答した234個中，41％は D1 作働薬のみに（D1 群），36％は D2 作働薬のみに（D2 群），そして23％は D1 と D2 の両方に（D1/D2 群）応答した。図に D1/D2 群の 2 例を示す。一方，被殻ニューロンは課題関連活動により，GO 試行に活動する細胞（GO 細胞），NOGO 試行に活動する細胞（NOGO 細胞），そして GO および NOGO 両試行に活動する細胞（GO/NOGO 細胞）に分けられた。D1 群，D2 群，および D1/D2 群のそれぞれに，相当数の GO 細胞，NOGO 細胞，そして GO/NOGO 細胞のいずれもが含まれた。D1/D2 群では，D1 群や D2 群に比べて，GO/NOGO 細胞の占める割合が大きかった。

以上の結果より，被殻には D1 型および D2 型両方の受容体を機能的に活用するニューロンが存在し，両方の受容体が運動制御において同種の情報を調節していることが示唆された。

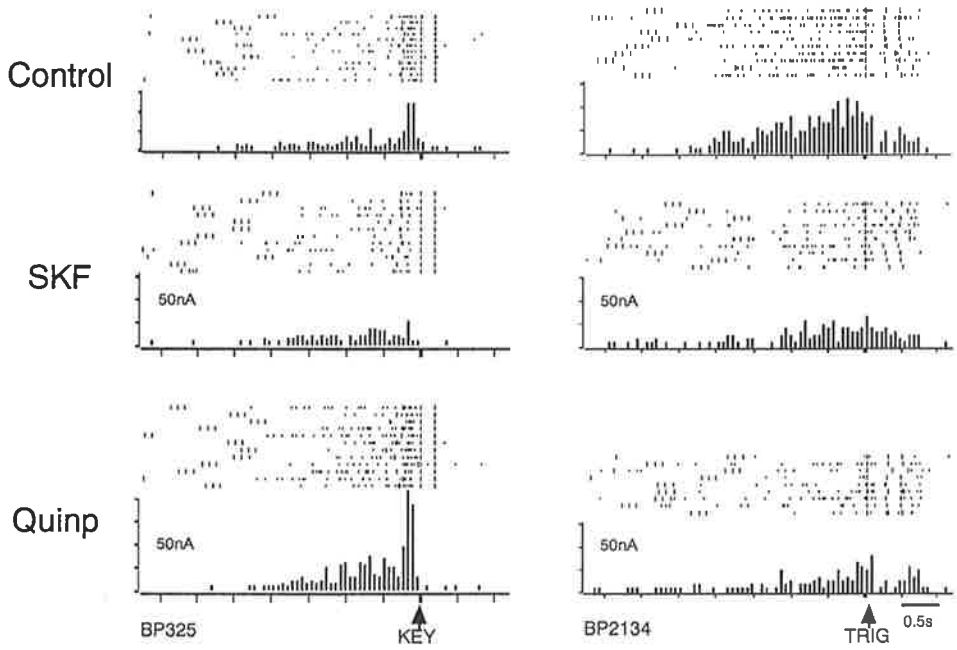


図　D1 型及び D2 型ドパミン受容体作働薬の両方に応じた被殻ニューロンの 2 例を示す。左列および右列はそれぞれ 1 個のニューロンで，上段，中段，および下段に，対照時 (Control), D1 作働薬投与時 (SKF), D2 作働薬投与時 (Quinp) の細胞活動を示す。

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次元脳画像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74箇所から同時に観測する装置で，全く非浸襲であり，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。

暗算・思考過程における前頭葉脳磁場の研究

佐々木和夫，遠本　徹，南部　篤，松崎竜一，久宝真一

要旨

我々が暗算をしたり，種々の時間空間的事象を思考する際の大脳皮質各領野の律動的脳磁場変化を，SQUID 脳磁計で記録分析した。周波数分析により，暗算（簡単な引算）と特定の音楽を想起した場合などに，左右の前頭葉に 5-7Hz の脳磁場の出現する被験者が見いだされた。これまで脳波記録により報告された Fm θ 波に相当すると考えられる。この θ 脳磁波は時間経過とともに振幅を増減し，その電流双極子を推定すると，左右大脳半球の前頭葉内に散在して発現していることが判明した。広範囲の前頭葉皮質の活動を反映するものと考えられる。

緒言

神経心理学的研究は，計算・言語操作・論理的思考における一側（多くの場合左側）の大脳半球の優位性を示唆するとともに，これらの機能が大脳皮質内の異なった領域で実現されている可能性を示してきた。PET に代表される局所脳血流量や脳代謝量を測定する手法によっても，これらの所見は裏づけられてきた。しかし，脳の情報処理過程を解明するためには，各機能の局在

部位を知るだけではなく，その動的なふるまいを明らかにする必要がある。本稿では，SQUID脳磁計によってとらえられた，思考過程中の時々刻々変化する脳活動について報告する。

方法

被験者に，2分間，目を閉じて暗算や音楽を思い浮かべることを命じ，その際の脳磁場を37チャンネルのSQUID脳磁計で記録した。暗算課題は，100から3を繰返し引く作業をできる限り速く行い，音楽課題は，予め暗記した楽譜により曲を頭の中で演奏した。一部の実験については37チャンネルの脳磁計を2台使用して，左右両側からの同時記録を行った。

結果

2分間左右両側を同時記録して，高速フーリエ変換法で処理した結果の一例を図1に示す。安静時（図1－Ⅰ）と比べて，暗算（図1－Ⅱ）や音楽（図1－Ⅲ）の場合に前頭葉の上から5-7Hzのθ波領域の脳磁場が強く記録されていることがわかる。計算の場合は被験者7人中7人に，音楽の場合は5人中3人にこのようなθ脳磁場が再現性をもって観測された。このθ脳磁場の出現は，被験者の主観的な課題のでき具合と良く相関しており，計算や思考に関連する脳活動に伴って出現すると考えられた。脳波で報告されているFm θ波(frontal midline theta rhythm)に相当するものと思われる。

図1の計算中の脳磁場の生データを4.9-6.1Hzのバンドパス・フィルターで処理し，θ波を抽出したものを図2に示す。θ波が両側前頭葉に強く出現すること，その振幅が増減し，しかも記録部位ごとに異なった時間経過を示すことがわかる。このことから，θ波の発生源は前頭葉の中を移動するものであることが推察される。

一般に大脳皮質の広い範囲が同時に活動しているときに，その活動部位を脳磁場から正確に推定するのはかなり困難である。しかし，このθ脳磁場が，単一の電流双極子が発生源であるとして説明できるような180度の位相反転をしばしば示すため，2分間のうちそのような場合について，θ波の発生源を推定した。計算中のθ脳磁場の発生源の推定された位置を図3－Ⅰ，Ⅱに例示する。2分の間に色々な位置にθ波の発生源が移動していることがわかる。MRI画像との比較により，推定された電流双極子は，ほとんどが両側前頭葉皮質に広く分散して存在することが判明した。稀に，視床，白質，脳室など，細胞構築からみて強い電流双極子を作るとは考えにくい部位に推定されることもあった。これは実際には複数の大脳皮質の部位が磁場の発生源となっているのに，合成された磁場がたまたま単一の電流双極子から発生しているかのような分布となったため，実際とは違う位置に電流双極子を推定してしまったものであると考えられる。

考察・結論

暗算・思考過程中に，両側前頭葉皮質からθ波が発生する。これは脳波で報告されたFm θ波に相当すると考えられる。脳波でのFm θ波は前頭部正中で最大振幅となり明確な位置局在を示さなかったが，脳磁場測定により，このθ波の発生源は固定的なものではなく，時間とともに前頭葉内で位置と強度を変化させるものであることが推定された。

このθ波活動は，暗算・思考過程の主観的なでき具合と良く相関するため，これに関連する脳

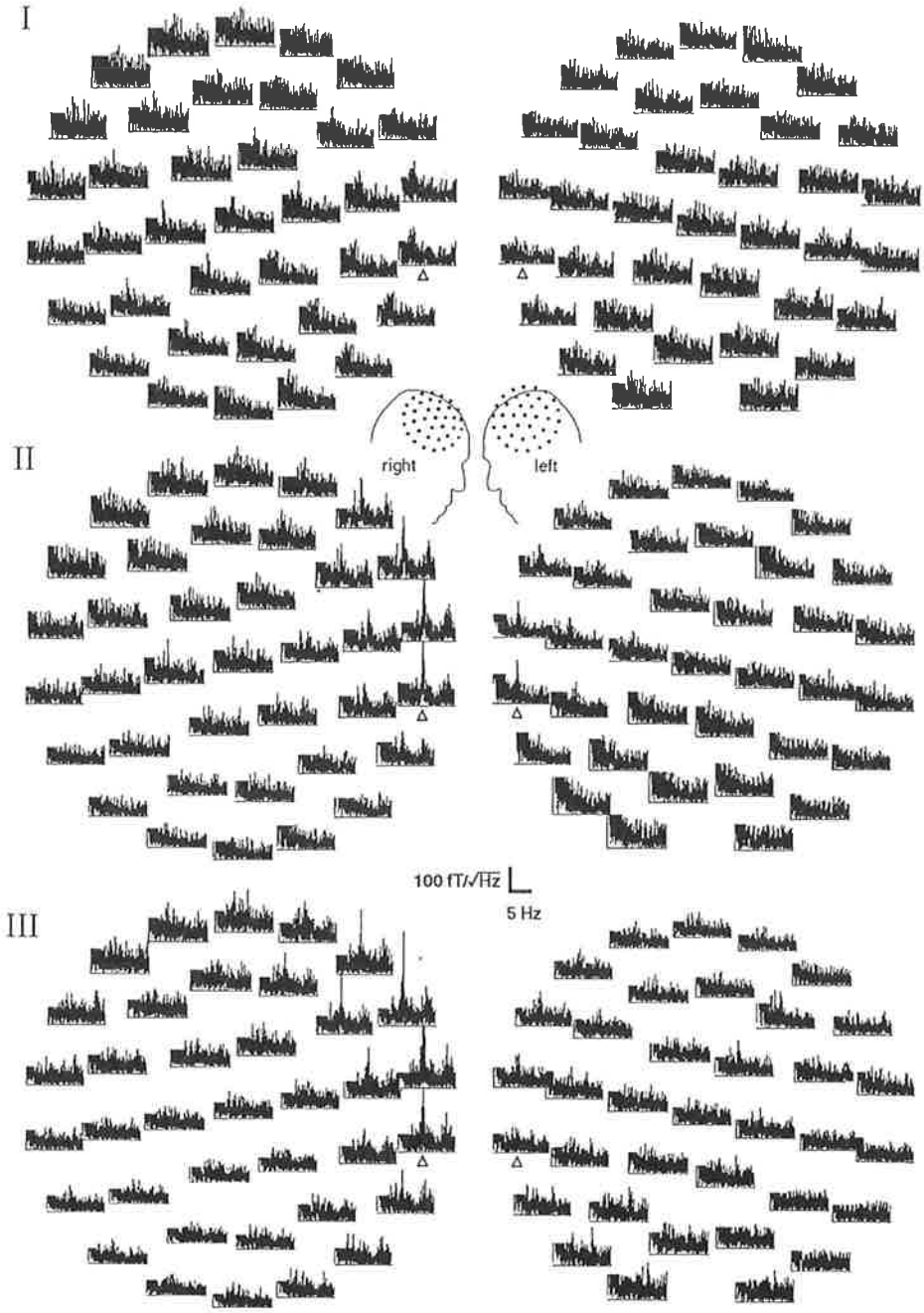


図１：脳磁場を２分間記録し，高速フーリエ変換法で処理した一例。同一の被験者で安静時（Ⅰ），暗算時（Ⅱ），音楽を頭の中で演奏した時（Ⅲ）の脳磁場を，それぞれ左右同時に記録した。挿入頭蓋（左右）の図の点が，各センサーのあった位置を示す。横軸は周波数を，縦軸は磁場の振幅を表す。暗算時と音楽をうかべた時に前頭部優位に，約 5Hz の脳磁場が強く発生している（三角印）。2.5Hz 以下の低周波ノイズはカットした。

活動を反映していると思われる。それ故，「Fm θ波」の語は，frontal mental theta rhythmの意味で使用できると考えられる。

このFm θ波の強度に左右差の認められる被験者があり，優位大脳半球との関連に興味が持たれる。しかし，この左右差はあくまで相対的なものであり，大脳半球の優位性，劣位性も相対的なものである可能性が示唆される。

この前頭葉のθ波が実際の脳の情報処理過程とどのように関係しているかは不明であるが，前頭葉の広い範囲が動員されてダイナミックに活動している様子を反映している可能性があると考えられる。

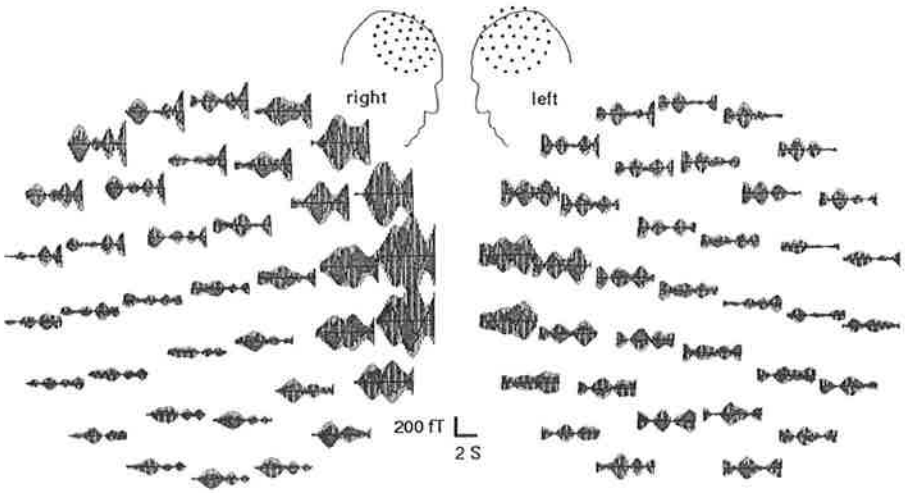


図2：図1の暗算時の生データを4.9-6.1Hzの6次ディジタル・バンドパス・フィルターで処理し，そのうち約5秒間分を表示したもの。全チャンネルは同時記録されたもので，挿入図の点が，各センサーのあった位置を示す。横軸は時間を，縦軸は磁束密度を示す。

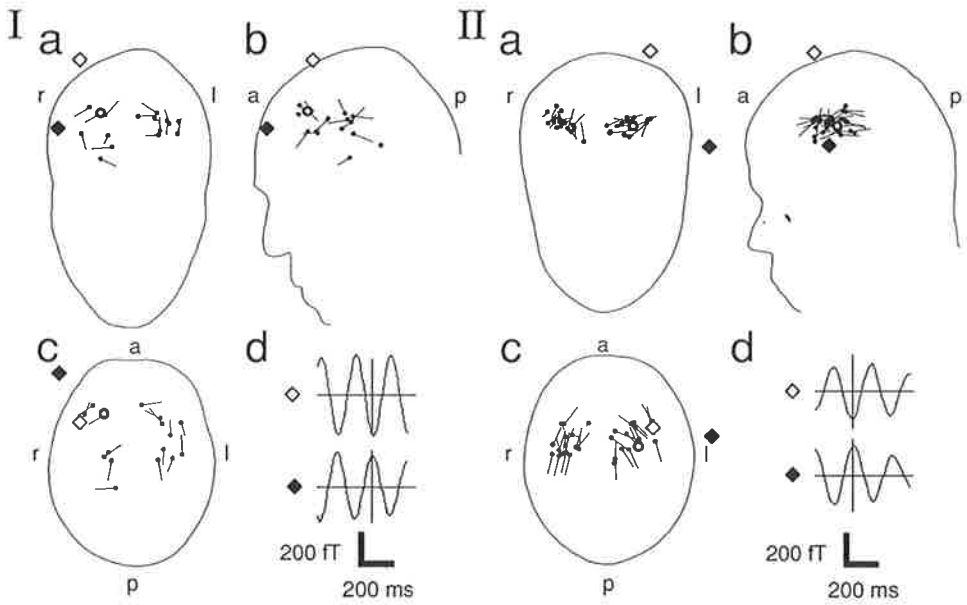


図３：暗算中のFm θ波の発生源の推定位置。Ⅰは，図１－Ⅱ・図２と同一の計測データにもとづく。Ⅱは異なる被験者についての例。２分間の測定のあいだで，θ脳磁場が180度の位相反転を示した場合について，発生源となる電流双極子の位置を推定した。a, b, c は，それぞれ正面，左方，下方からの透視図。黒丸と棒は，電流双極子の位置と方向を示す。電流双極子の大きさは，本図では示されていない。d の白抜き四角と黒四角でマークした波形は，白丸で示す電流双極子が推定されたときに，a, b, c 図内の対応する印の位置にあったセンサーで記録されたθ脳磁場を例示したもの。縦線の時点で電流双極子が推定された。180度の位相反転を示している。θ脳磁場を抽出するために，Ⅰの例では図２と同一のフィルターを使用し，Ⅱの例では3.9-6.1Hz の６次ディジタル・バンドパス・フィルターを使用した。

１次および２次体性感覚野における誘発脳磁場応答

南部　篤，松崎竜一，久宝真一，遠本　徹

１．概要

37チャンネル SQUID 脳磁場計を用い，正中神経および脛骨神経の電気刺激による誘発脳磁場の計測をヒトで行った。１次体性感覚野 (SI) に起因する反応以外に，両側の側頭部において，前後方向の磁場の極性の逆転が観測された。この前後方向の反応は，１次体性感覚野由来のものより潜時が長く，その電流源はシルビウス溝周辺に推定されることより，２次体性感覚野 (SII) に由来すると考えられる。

2．緒言

1次体性感覚野に由来する誘発脳磁場は，比較的よく研究されているが，各成分の由来については，必ずしも明確とはいえない。本報告においては，過去の動物実験の結果と比較することにより，この脳磁場の成因について考察を加えた。また，Hari ら[1,2]は，2次体性感覚野由来の磁場応答についても報告しているが，この反応の記録も試みた。

3．方法

末梢神経の電気刺激は，通常の方法によった。すなわち，持続時間 0.3ms，感覚閾値の1.5～2倍の強度の定電圧パルスを，正中神経の場合は手首部に，脛骨神経の場合は足首部に，1.5～2秒のランダムな周期で与えた。記録には，磁気シールドルーム内に設置された37チャンネル一次 SQUID 脳磁場計 (Magnes, BTi) を用い，刺激の時点で，500～1000回加算平均を行った。

また，球モデルによって推定された電流源の位置を，三次元再構成した MRI 画像と重ね合わせることにより，活動部位の推定を行った。

4．結果

まず，1次体性感覚野に由来する磁場応答について述べる。図 1A に，正中神経を電気刺激した場合の，刺激と対側の頭部背外側での誘発脳磁場を示す。電気刺激後，約 20ms で第一の頂点が形成され，頭蓋の内外側で極性が逆転していた。その後，潜時約 60ms で第二の頂点が形成され，その極性は，第一のものとは逆であった。これらの電流源を求めると，第一の成分は，中心溝周辺から前向きの電流双極子として，第二の成分は，後ろ向きの電流双極子として推定された。

また，脛骨神経を刺激した場合は，頭頂部正中を中心に，磁場の極性の逆転が見られ，電流双極子は，頭頂正中部に推定された。このように，この反応は体性感覚野の機能地図と一致した体部位局在を示した。

次に，記録部位を，より外側に移すと，2次体性感覚野由来と思われる反応が記録された。図 1B に，脛骨神経を刺激した場合の同側の側頭部からの記録を示す。頂点潜時約 65ms と 95ms に，反応が観察されるが，潜時は1次体性感覚野のものと較べて遅く，また逆転も前後方向であった。このうち，第一および第二の反応は，それぞれ下向きと上向きの電流双極子によると考えられた。また，対側の脛骨神経刺激でも，同様な反応が観察され，この応答は両側性であった。

3次元再構成した被験者の MRI 画像に，第二の成分から推定された電流双極子を重ね合わせると，シルビウス溝周辺に推定された。これは解剖学的な2次体性感覚野の位置に一致する。

以上より，この応答は2次体性感覚野に由来すると考えられた。

一方，正中神経刺激の場合の同側の2次体性感覚野付近からの記録を図 1C に示す。頂点潜時約 50ms と 80ms に反応が，観察された。このうち，第二の成分に関しては，前後方向に逆転が見られるが，第一の成分に関しては，逆転が不明確で，吸い込みのみが見られ，対応する吹き出しは観察されなかった（図 1C*）。対側側頭部では，1次体性感覚野の反応が優位であるが，潜時によって，2次体性感覚野に由来すると考えられる前後方向での磁場の逆転が，観察された。

5．考察

最初に，1次体性感覚野の応答について考察する。動物実験でのフィールド電位の記録では，末梢神経の電気刺激で，1次体性感覚野に，まず表面陽性－深部陰性の電位が観察される[3]。これは感覚情報が視床の中継核を介して，大脳皮質1次体性感覚野のⅣ層に到達[4]することを，反映している。このようなシナプス活動は，大脳皮質錐体細胞の尖樹状突起起始部（深部）に興奮性シナプス後電位(EPSP)を発生させ，尖樹状突起内に深層から表面に向かう細胞内電流を生じさせる（図2A左）。このような細胞内電流が，脳磁場の主な発生源と考えられている[5,6]。このうち，脳溝壁の部分の電流が観測される脳磁場への寄与が大きいこと，体性感覚野のうち3b野（中心溝後壁），3a野への感覚入力が強い[4]ことなどにより，全体として中心溝から前向きの電流双極子として近似されることになる（図2B）。

動物実験では，表面陽性－深部陰性電位に引き続き，表面陰性－深部陽性電位が観測される[3]。これは大脳皮質錐体細胞の尖樹状突起先端部（表層部）への興奮性シナプス入力を表しており，皮質深部の活動が皮質内回路などにより，皮質表層に伝わったものである。これは，先ほどとは逆に，皮質の表面から深層に向かう細胞内電流を生じさせ（図2A右），全体として中心溝から後ろ向きの電流双極子として，近似されることになる（図2B）。

従って，末梢神経の電気刺激によって，1次体性感覚野に生じた第一と第二の反応は，それぞれ視床から体性感覚野への入力，および皮質内ニューロンの活動を表していると考えられる。

2次体性感覚野においても末梢神経の刺激で，1次体性感覚野と較べて遅い潜時ではあるが，同様に，表面陽性－深部陰性の電位に引き続き表面陰性－深部陽性電位が観察され[3]，それぞれ視床中継核（あるいは1次体性感覚野）から2次体性感覚野深層への入力[4]，および皮質内ニューロンの活動を表している。従って，本報告において，脛骨神経を刺激した場合に観察される，2次体性感覚野由来の第一と第二の成分は，それぞれ，2次体性感覚野への入力，および皮質内ニューロンの活動を表していると考えられる。

一方，正中神経刺激の場合，第一の成分に関しては，明確な逆転が観察されなかった。これは以前より，2次体性感覚野に早い反応が観察されず[1,2]，問題となっていたが，次のように解釈される。正中神経刺激においても，刺激と同側の2次体性感覚野に潜時約50msの第一の反応は存在するが，頭部後方で観測されるべき成分（図2B中央*，この図では，吸い込みに相当）に，対側の1次体性感覚野由来の第二の成分（潜時約60ms，図2B中央**，吹き出しに相当）が重畳し，打ち消されていると考えられる。

以上をまとめると，末梢神経刺激により，対側の1次体性感覚野と両側の2次体性感覚野が活動する。この活動は，始めは前向きと下向きの電流双極子として表され，後に極性が逆転する（図2B）。これらはそれぞれ，皮質深層への入力，および皮質内ニューロンの活動を反映している（図2A）。実際に記録される反応は，各電流双極子が引き起こした脳磁場（図2B中央）の合成されたものと考えられる。

参考文献

1）Hari R, Karhu J, Hamalainen M, Knuutial J, Salonen O, Sams M, Vilkman V: Functional organization of the human first and second somatosensory cortices: a neuromagnetic study. Europ J Neurosci 5: 724-734, 1993

2）Hari R, Reinikainen K, Kaukoranta E, Hamalainen M, Ilmoniemi R, Penttinen A, Salminen J, Teszner D: Somatosensory evoked cerebral magnetic field from SI and SII in man. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 57:254-263, 1984

3）Amassian VE, Wallter HJ, Macy J: Neural mechanism of the primary somatosensory evoked potential. In: Sensory Evoked Responses in Man, ed by Whipple HE, Ann NY Acad Sci 112: 5-32, 1964.

4）Jones EG: The Thalamus. Plenum, New York 1985, 935pp

5）Okada Y: Neurogenesis of evoked magnetic fields. In: Biomagnetism, an Interdisciplinary Approach, ed by Williamson SJ, Romani G-L, Kaufman L, Modena I, Plenum, New York 1983, pp399-408

6）佐々木和夫，玄番央恵，南部　篤，松崎竜一：NO-GO 電位の電気生理学的および磁気生理学的研究．日本生体磁気学会誌 5 (1): 36-39, 1992

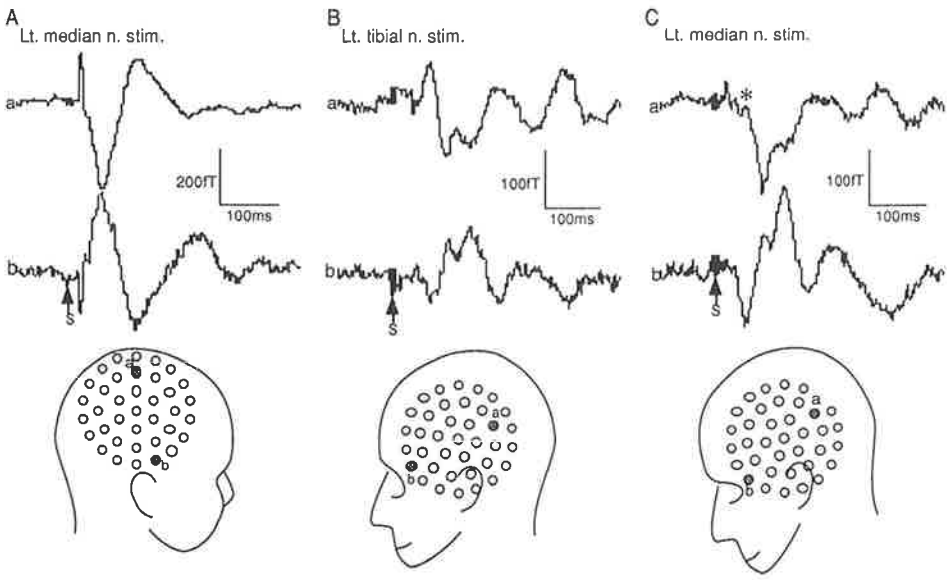


図１：A，左正中神経を刺激した場合の右１次体性感覚野；B，左脛骨神経を刺激した場合の左２次体性感覚野；C，左正中神経を刺激した場合の左２次体性感覚野の反応を示す。上向きは，頭蓋からの磁場の吹き出しに相当する。刺激の時点 (S) で500回加算平均をした。下段は37チャンネルのセンサー位置で，このうち影をつけた２チャンネル (a, b) から得られた記録を上段に示す。

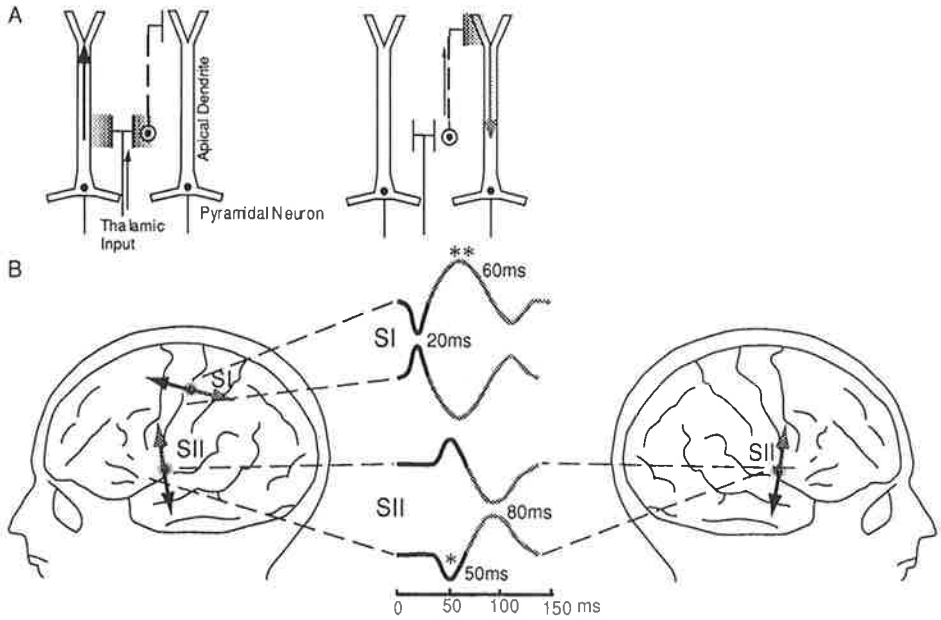


図２：体性感覚誘発脳磁場の成因を示す模式図。A，第一（左図，黒矢印）と第二の成分の電流双極子（右図，影矢印）を大脳皮質の細胞レベルで示す。上側が皮質表層。B，対側の１次体性感覚野 (SI) と両側の２次体性感覚野 (SII) に第一 (黒矢印) と第二の成分の電流双極子 (影矢印) が異なった潜時で生じる。各電流双極子は，それぞれ脳磁場を引き起こす（中央)。

ダウン症候群での誘発電位異常

柿木隆介

ダウン症候群患者では知能低下のみならず，種々の感覚異常を呈することがしられており，特に屈折異常，白内障，眼振などの眼科的異常が高率に合併することが知られている。しかし，知能低下のため，その客観的評価はきわめて困難であり，誘発電位が極めて有効である[1)-4)]。本年度は視覚誘発電位の検索を行い，本患者における視覚機能の生理的機能を明らかにすることを目的とした[5)]。

36名（65眼）のダウン症候群患者を対象とした。男性19名，女性17名で19才より48才におよんだ（平均33才)。年齢，性を一致させた39名（78眼，男性17名，女性22名）を正常対照者とした。白黒格子縞パターン反転視覚誘発電位 (VEP) を記録した。VEP は米国脳波学会のガイドラインに準じておこない，P100 電位を検索対象とした。可能な範囲で眼科的検査を行い，VEP の結果と比較検討した。

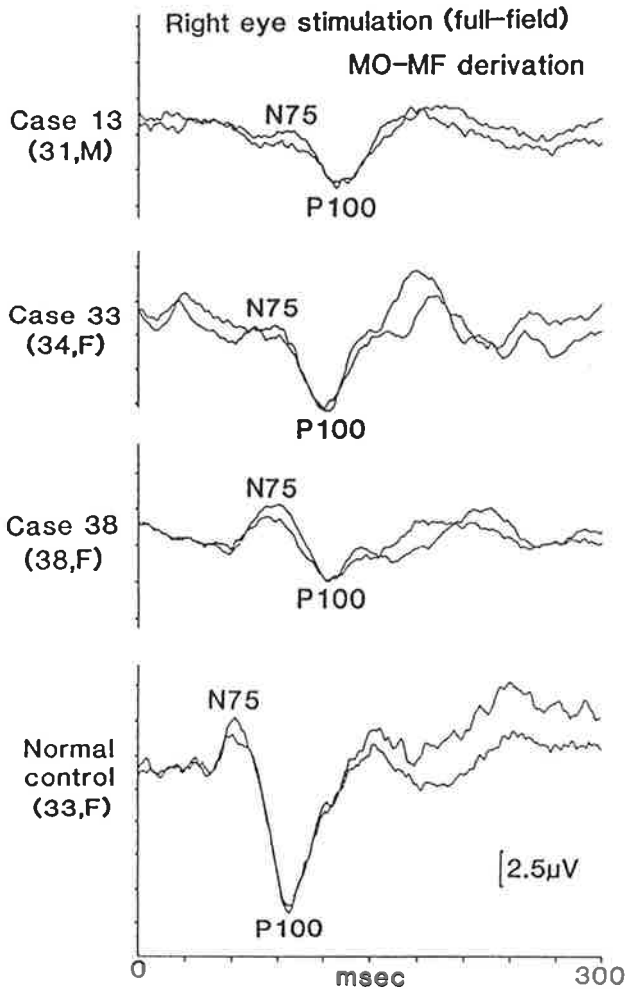


図1：ダウン症候群3名と正常者のVEP

ダウン患者では潜時延長と振幅低下の傾向がみられる。カッコ内は年齢と性（M：男性　F：女性）を示す。Case 13は屈折異常を示したが白内障および眼振はなかった。Case 33は眼科的異常を認めなかった。Case 38は屈折異常，白内障，眼振のすべてを示した。

P100潜時はダウン群の16名（24眼）で有意（正常者の平均＋3標準偏差以上）に延長していた（図1）。ダウン群と正常者群間の統計分析（Student t検定）をおこなったところ，ダウン群では正常者に比し有意に潜時延長と振幅低下を認めた($P<0.001$)。ダウン群の47眼で屈折異常，白内障，眼振のいずれかを認めた。異常の見られた群では，見られなかった群に比し有意に($P < 0.02$)潜時延長していたが，振幅には有意差を認めなかった。ダウン群で眼科的異常を認めな

かった18眼と正常者群を比較した。潜時はダウン群で延長傾向を示したが，有意差は見られなかった。ただし，３眼では全く眼科的異常を認めないにもかかわらず，有意に潜時延長していた。

ダウン群で眼科的異常を呈さない群は呈する群に比し有意に潜時が短縮していた。また，眼科的異常を呈さなかった患者群と正常者群との間には，有意差は見られなかった。従って，屈折異常，白内障，眼振といった眼科的異常がVEP異常の主原因と考えられる。しかし，なんらかの眼科的異常を示さなかった例でもP100電位の延長がみられたことにより，何らかのダウン症候群特有の要素も加味している可能性が示唆された。ダウン症候群では急激な老化現象とアルツハイマー病様の病理変化が見られるが，その影響は否定的であった。

文献

1．Kakigi R (1989) Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 74: 88-94.

2．Kakigi R & Shibasaki H (1991) Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 80: 364-371

3．Kakigi R & Kuroda Y (1992) Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 84: 293-295

4．Kakigi R & Shibasaki H (1992) Brain Topography, 5: 253-261.

5．Kakigi R et al (1993) Acta Neurol Scand, 87: 410-415.

ヒトの体性感覚誘発磁場の検索

柿木隆介，小山幸子

ヒトの体性感覚誘発電位(SEP)および体性感覚誘発磁場(SEF)を検索している。SEPではこれまで，刺激対側の感覚野付近のみならず，刺激同側での反応および前頭部での反応も検索してきたが[1-5]，容積伝導の問題もあり，結論を出すことはできなかった。本年度はSEFを用いてヒトの体性感覚誘発反応の詳細な検討を試みた[6]。

当施設の37チャネル脳磁場測定装置(MEG, SQUID)を用いて，先ず一般的な正中神経電気刺激による脳磁場(median SEF)の研究をおこなった。５名の正常被験者において，装置を両側の第１次感覚野(SI)付近（図１），第２次感覚野(SII)付近，前頭部および頭頂部付近の６ヵ所において，頭部全体での記録を試みた。

Median SEFでは，その反応の主要なものは刺激対側の第１次感覚野(SI)の3b野と１野で発生すること，また微弱ながらも刺激後約100msで両側の第２次感覚野(SII)でも反応がみられることがわかった。すなわち，一般的な誘発脳波で記録される刺激同側半球や前頭部および頭頂部での反応は，刺激対側のSIおよび両側のSIIでの反応の双極子成分によるものか，容積伝導によって記録されるものと考察している。現在はmedian SEFに対する運動負荷(gating effect)の影響および，下肢刺激でのSEFを検索中であり，次年度にその成果を報告したいと考えている。

文献

1．Kakigi R & Shibasaki H (1983) Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 56: 430-437

2．Kakigi R & Shibasaki H (1984) Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 59: 44-56

3．Kakigi R (1986) Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 64: 246-259

4．Kakigi R & Shibasaki H (1991) J Clin Neurophysiol, 8: 320-330.

5．Kakigi R & Shibasaki H (1992) J Clin Neurophysiol, 9: 431-440.

6．Kakigi R (1994) Neurosci Res, 20: 165-174.

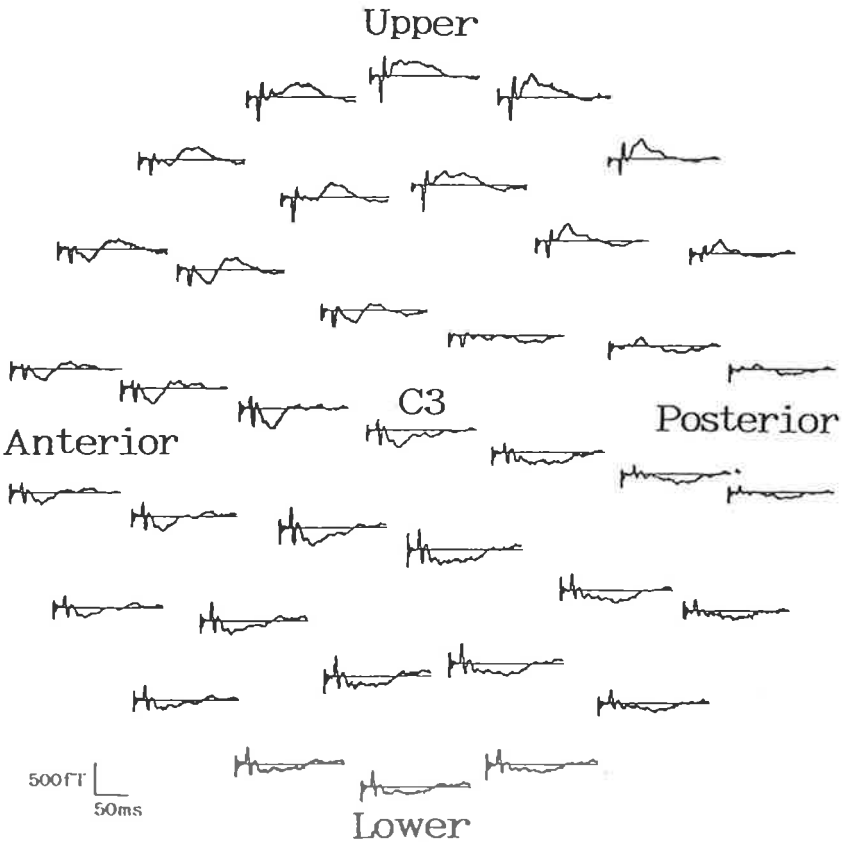


図１：正常被験者における右正中神経刺激体性感覚誘発磁場 (SEF) の結果。刺激対側（左半球）の手の感覚野付近 (C3) に装置の中心部を置いて記録。

ヒトの痛覚認知機構の生理学的検索

柿木隆介，小山幸子

ヒトの痛覚機能の生理学的要素を，CO_2 laser 光線を用いた体性感覚誘発電位（痛覚 SEP）を用いて検索している。CO_2 laser 光線は，痛覚（熱覚）のみを純粋におこしうること，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。特に近年は，痛覚認知に対する種々の条件刺激による干渉効果に関する研究を主要テーマとしている。

1992年度は，Melzack & Wall が提唱した gate control theory について詳細に分析した[1]。laser 刺激が与えられた手への振動覚刺激および手指の自動運動により痛覚 SEP の振幅は有意に低下し，潜時は延長した。また痛覚閾値の上昇と反応時間の延長が見られ，gate control theory に一致した所見であった。手指への冷覚刺激では逆の現象が出現し，異なる侵害刺激の相乗効果ではないかと思われた。

1993年度は，laser 刺激が与えられた手以外の四肢にも同様の干渉刺激を与え，その影響を検索した[2]。刺激部位以外の四肢への振動覚刺激では，痛覚 SEP の変化は見られなかった。しかし，いずれかの部位の自動運動によっても痛覚 SEP は有意な振幅低下を示した（図１）。また他動運動によってもその程度は軽いものの同様の現象が見られたが，運動する意志はあるが実際には動かさないという条件 (movement imagery) では有意な変化はみられなかった（図２）。以上のことより，運動に関与する大脳半球での活動が痛覚認知機構に大きな影響を及ぼすことが示唆された。

また，Le Bars らが提唱している Diffuse noxious inhibitory control (DNIC) の機序の解明を痛覚 SEP を用いて検討した[3]。これは，身体の一部に加えられた侵害性の痛覚あるいは熱刺激により，他の部位への痛み刺激が抑制されるという理論である。41℃および46℃の温水に右手を浸し，その前後において左下肢に laser 刺激を与えた時の痛覚 SEP の変化を調べたところ，明らかな抑制効果が見られたため，その機序の解明を追求した。

以上の結果のまとめを，1993年12月に行われた第17回日本神経科学学会において発表した[4]。本分野の研究を行っている施設は，世界的にも当研究室のみと思われ，さらに研究を続行していきたい。

文献

1．Kakigi R & Shibasaki H (1992) J Neuorl Neurosung Psychiatry, 55: 282-286.
2．Kakigi R, Matsuda Y & Kuroda Y (1993) Acta Neurol Scand, 88: 376-380.
3．Kakigi (1994) J Neurol Sci (1994) 125: 198-205.
4．Kakigi (1993) Neurosci Res. 18 (suppl), S200

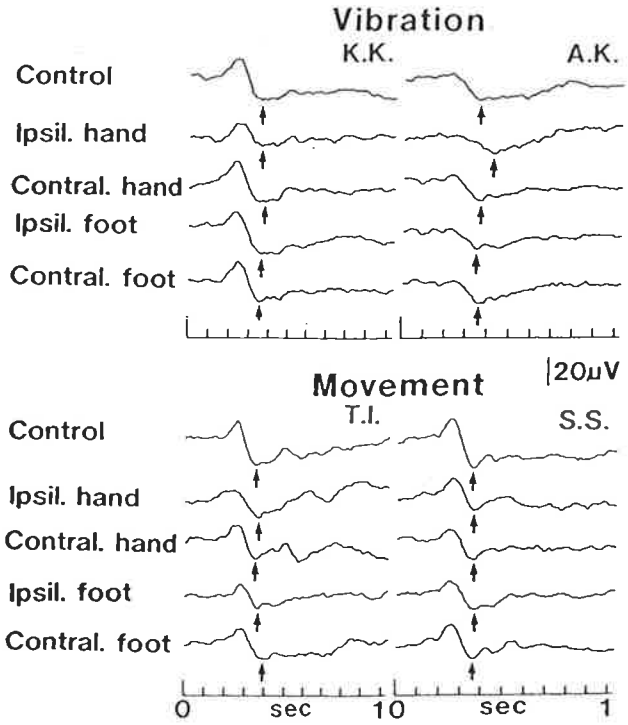


図１：４名の正常被験者における痛覚 SEP の結果。CO_2 laser 光線は手背に照射。種々の部位に振動覚刺激および自発運動をおこなった時の変化を示す。Control.：干渉刺激を与えない場合，Ipsi. & Contral.：刺激同側及び対側。P1 電位を矢印で示す。振動覚刺激では刺激同側に与えられた時のみ振幅低下がおこるが，運動ではいずれの部位によっても振幅が低下する。

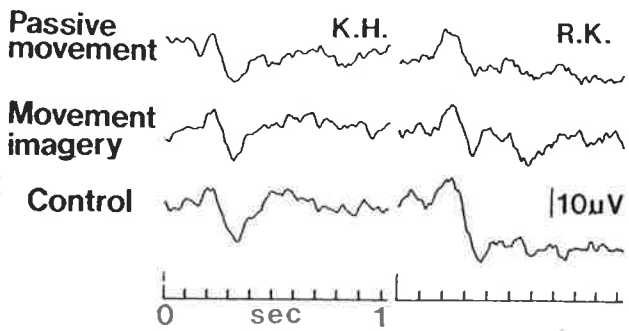


図２：２名の正常被験者における痛覚 SEP。Passive movement：他動運動，Movement imagery：運動しようと考えるが実際には動かさない。この２名では両条件ともに振幅低下が見られるが，統計的には passive movement 時にのみ有意な低下が見られた。

ヒト聴覚皮質における音声誘発反応源の動的特性

栗城真也
沖田善光（北大・電子科学研究所）

SQUIDによる脳磁界計測では頭蓋に平行な電流成分をもつ神経活動をとらえるので，シルビシウス溝内にあるヒト聴覚皮質の活動を解析するのに適している。栗城らは，以前から音声を刺激として用いたときの誘発脳磁界反応の特性について調べている[1]。多チャンネルSQUIDでは時間と空間両者においてコヒーレントな情報を取得できるので，聴覚皮質活動のダイナミックな時空間特性が解析できる。

実験では，日本語音声／あ／，／か／，／は／，／な／により誘発される脳磁界反応を計測した。アナウンサーの発生した刺激音声を両耳に与え(80-87dBSPL)，37チャンネルSQUI D (BTi)により左側頭から誘発脳磁界を記録し，帯域1-40Hz，128回の加算平均をして1試行のデータとした。被験者あたり平均5試行の繰り返し測定を行い，計6名の男性被験者からデータを得た。

データの解析に先立ち，多チャンネル記録した波形の雑音である背景磁界を調べた結果，自発性の脳磁界が主要な成分であることが分かった。主成分分析によると，側頭上で記録した自発脳磁界は空間相関の高い信号であり，加算平均（非同期）により振幅は減衰するものの，空間相関は失われない。さらに，シミュレーションによりこのような背景脳磁界のもとで誘発磁界の活動源推定を行うと，SN比が高いにもかかわらず大きな推定誤差が生じた。一方，記録時の異なる背景脳磁界は相互の空間相関が低いことから，多数回試行の測定データを用いて活動源推定を行うと推定精度が向上することが分かった。そこで，平均4試行のデータを用いて推定を行った。多試行データから電流双極子源を計算する方法としては，以前に開発したもので，雑音に強く局所ミニマムの解におちいること少ないパラメータ探索法を用いた[2]。解析対象としてはもっとも安定に観測された長潜時反応である，潜時約100msに生じるN1m活動源について調べた。

多試行データから推定したN1mピーク活動源は，異なる音声に対するものは各々の被験者において一辺約10mmの立方体中にあり，互いに近接した場所での神経活動によることがわかった。3名の被験者においてはMR断層像をとり，脳磁界座標とMRI座標を対応させることにより，N1m活動源の存在する冠状断面および横断面を切り出してそれぞれの断面上に活動源を重畳させた。その結果，いずれの音声の活動源もシルビウス溝下壁の聴覚皮質内にあることが確認された。とくに一次聴覚野がそのなかにあるとされているHeschl's横回を含む狭い領域内にすべての活動源が推定された。

つぎに異なる音声の活動源間の位置の差異について検討した。ここで，座標原点を左右の耳孔前点の中点として，鼻根点に向かう軸をX軸，左耳に向かう軸をY軸，頭頂に向かう軸をZ軸とする。X軸方向において音声間でわずかな違いが見られ，摩擦音／は／や破裂音／か／の活動源は，子音部のない鼻音／な／や母音／あ／に比べ数mm後方にあった。また，これらの子音活動

源は，Y軸すなわち頭皮からの深さ方向において，活動の初期には母音や鼻音より内側にあった。

以上に対し活動源の時間的な変動に注目すると，音声の種類によらず，潜時とともに前方に変移する傾向が見られた。その大きさは，N1m ピーク近傍の 30ms 間で 4 ～ 5mm 程度である。これまでの研究において，純音誘発脳磁界の N1m 活動源においても前方への変移が認められている[3]ことから，聴覚皮質の活動に特有の現象と思われる。これに対し，内側・外側方向においては，音声の種類に依存する選択的な変移が見られた。すなわち，母音においては活動源は内側に変移するが，摩擦音や破裂音においては外側に変移する。その大きさは 4 ～ 6mm である。これらの内側・外側の変化は，それぞれの音声のもつ周波数スペクトルの時間変化では全てを説明することはできない。

以上の実験結果から，音声により誘発される長潜時 N1m 反応は，聴覚皮質にその起源をもつ狭い領域内にある活動であるが，前後と内外（左右）の方向に対してダイナミックな動きをすることがわかった。このように皮質神経活動が時空間的な特性をもつことは，音声ないしすべての音情報が時間的変化により特性づけられることに関連すると推測される。

参考文献

1）S. Kuriki and M. Murase, Exp Brain Res, 77: 127-134 (1989)

2）O. Oshiro, M. Mukai, F. Takeuchi and S. Kuriki, Phys Med Biol. 37: 845-852 (1992)

3）R. L. Roger, A. C. Papanicolaou, S. Baumann, C. Saydjari and H. M. Eisenberg, Electroenceph and clin Neurophysiol, 77: 237-240 (1990)

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。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。1993年度の音響実験室の利用は延べ17件，人工気候室は５件，計測機器等の短期利用は161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）腹部内蔵循環に関する研究，（２）膵外分泌と消化管運動の関係，（３）全身運動の消化機能に及ぼす影響，（４）脈管作動性ペプチドの分子認識機構と生理作用等の共同研究を行った。

PACAP による消化管血流の調節

成瀬　達，中村豊英（生理研）
軒原清史（島津製作所バイオ機器部）
V. Wray （GBF）

PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) は視床下部より単離された VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide) と類似の構造を有する神経ペプチドであり，PACAP38 と PACAP27 の２つの分子型が存在する。PACAP は中枢神経系のみならず消化管の神経系にも存在しており，消化管における生理的役割が注目されている。本研究では無麻酔犬を用いて，胃および小腸の血流に対する PACAP の作用を VIP と比較検討した。

方法：エーテル麻酔下にてビーグル犬５頭に胃瘻ならびに十二脂腸瘻を造設した。超音波トランジットタイム血流計のプローブを左胃動脈および上腸間膜動脈に装着し，大腿動脈にテレメトリー用の血圧トランスデューサーを挿入した。術後回復期を置いた後，意識下にて PACAP および VIP を経静脈的に投与し，胃および小腸の血流と血圧を連続的に測定した。

成績：左胃動脈および上腸間膜動脈血流の基礎値は，それぞれ22± 4，142±20ml/分であった。PACAP38, PACAP27 および VIP の静脈内投与 (5, 10, 25, 50, 100pmol/kg) により，心拍数と左胃動脈血流は用量依存性に増加し，血圧は用量依存性に低下した。PACAP38 と PACAP27 の胃血流増加作用（400％）は VIP より強力であったが，両者間には差が無かった（図１）。PACAP38 の心拍数および左胃動脈血流の増加作用は，PACAP27 ならびに VIP の作用より長く

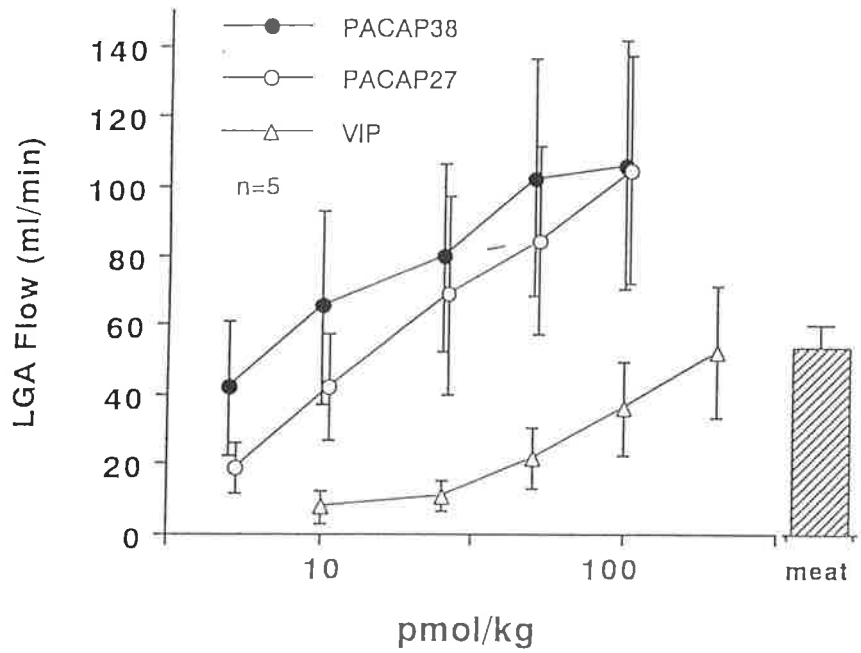


図1　PACAP の左胃動脈 (LGA) 血流増加作用

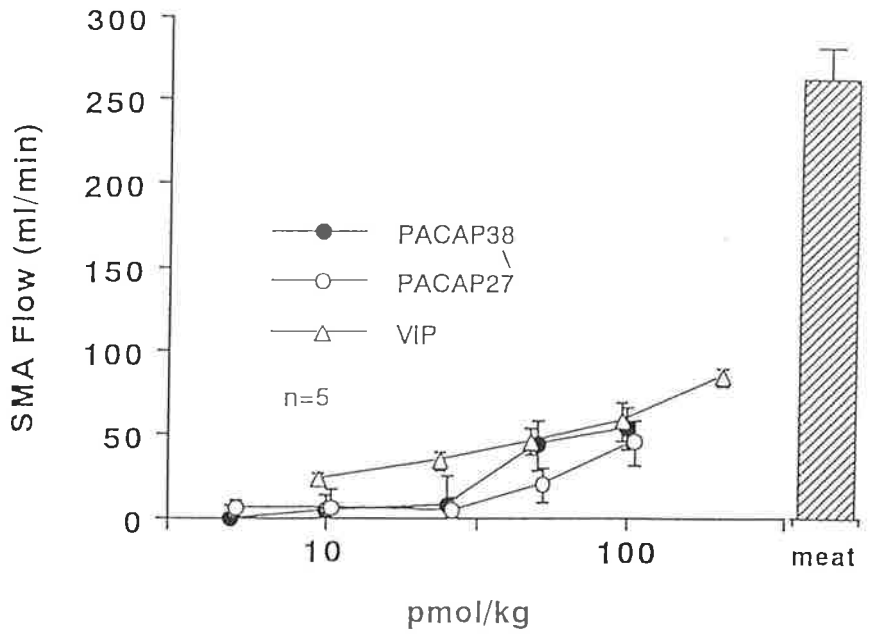


図2　PACAP の上腸管膜動脈 (SMA) 血流増加作用

持続した。いずれのペプチドも上腸間膜動脈血流増加作用は弱く（40%），PACAP と VIP の力価に差を認めなかった（図２）。

結論： PACAP は VIP より強力なイヌの胃血管拡張作用を有するが，小腸血管に対する作用は弱く，VIP と同等である。胃血管ならびに心拍数に対する PACAP38 の作用時間は PACAP27 より長い。PACAP は消化管，特に，胃血流の神経性調節に関与する有力な候補因子である。

組織培養標本室

【概要】

組織培養標本室は組織培養室および組織標本室から成る。1993年度は組織標本室の充実をはかり，落射蛍光ノマルスキー付正立顕微鏡オリンパス BX を導入した。又，培養細胞のタイムラプセビデオ画像を画像処理する為に，ビデオ画像記録処理システムを導入し，利用の便を計った。本年度の利用者は所内27名，所外４名の計31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性質

古家園子，尾崎有香，中山　孝（横浜市大）

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神経伝達物質や血管作働物質に対する生理的な性質や，細胞内 cAMP レベルに従って形態変化する点など，脳のアストロサイトと非常に類似した性質を示す。そこで筋線維芽細胞を抗原として，脳のアストロサイト，腸管筋層介在細胞を染めるモノクローナル抗体を得たことを昨年度報告した。本年度はこのモノクローナル抗体，8E1 の認識する物質の生化学的及び組織化学的性質を SDS 電気泳動法および免疫組織化学にて調べた。

免疫組織化学による結果： 8E1 抗体は生後10日から成体までのラットの大脳皮質および髄質のアストロサイト，小脳の Bergmann グリア，顆粒層および髄質のアストロサイト，視神経のグリアなど，中枢神経系のアストロサイトを染めた。しかし，生後１－４日のラットでは，大脳髄質や小脳髄質のアストロサイトは染まるが，大脳皮質や小脳顆粒層のアストロサイトは染まらなかった。抗 GFAP 抗体と 8E1，および抗ビメンチン抗体と 8E1 で二重ラベルしてみると，抗 GFAP 抗体で染まるアストロサイトはすべて 8E1 抗体で染まったが，生後数日までの，抗ビメンチン抗体でのみ染まり抗 GFAP 抗体では染まらない大脳皮質のグリア細胞は 8E1 では染まらなかった。この様に，中枢神経系では 8E1 と抗 GFAP 抗体は同一のグリア細胞を染める。しか

しながら，8E1 はビメンチンを持ち GFAP は持たない培養筋線維芽細胞を染めるし，また小腸筋層の介在細胞を染める。培養筋線維芽細胞において 8E1 の免疫電顕を行うと，中間径フィラメントにイムノゴールドが付随する。これらの観察から，8E1 は GFAP ともビメンチンとも異なった中間径フィラメントに付随している物質を認識していると考えられる。

SDS 電気泳動法による結果：成体のラットの大脳，小脳，培養筋線維芽細胞，C6 グリオーマ細胞等をホモジェナイズし，SDS 電気泳動を行い，ウエスタンブロテイングを行うと，分子量約 50K の位置に単一のバンドがでる。生後１－４日のラットでは，小脳では薄くバンドが出るが，大脳では検出できず，免疫組織化学の結果とよく一致していた。現在，8E1 の認識している物質の精製と同定を進めている。

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５年度は共同利用実験計画が12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５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137日，修理調製等70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5,521枚，フィラメン点灯時間は428.4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いる。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，雰囲気試料室および液体窒素型クライオトランスファーホルダーを用いた基礎実験等に取り組んでいる。

平成５年６月にフィラメント交換を行なった。また同年12月に高圧タンク内の加速管のＯ－リングを交換し真空の信頼性を向上させた。

超高圧電子顕微鏡の低倍像における平行投影近似と解像度：対物絞りの効果

有井達夫，吉村伸明，濱　　清

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

これまでに理想的なレンズ条件においても照射の条件に応じて平行投影近似には有効厚さと分解能に応じた適用限界が光軸を中心とした領域に生じることをあきらかにした(年報8)。これは試料位置における強磁場によっている。このとき試料に対する電子線の照射条件を第二コンデンサーレンズの電流を変化させて検討し電子線のクロスオーバーを試料の上側（対物レンズ中心に対してより離れる側）につくるように第二コンデンサーの励磁をより強めるように設定することにより試料に入射する電子線をより平行に近づけることができ倍率変化量に関しては改善できることを示した（年報9)。歪像収差の寄与は中間レンズと投射レンズの励磁を適当に調整することにより補正できることが知られているができるだけ歪みの少ない選ばれた倍率で撮影することも重要である。(年報10)。

低倍用としてレンズ電流を強励磁対物レンズのモードより約1/8に減少させ，さらに対物レンズと第二対物レンズ電流を固定させて中間レンズで焦点を合わせる走査モード（Scan2：倍率500X）がある。約± 400μm の焦点外れの試料に対して像の倍率の変化はほとんどなく（$\triangle M/M \sim 1.5\times10^{-3}$)，焦点外れ像の外れに依存する像回転も強例磁対物レンズの場合の約1/7と改善されている。しかしこのモードでは対物レンズの焦点距離が長くなるので収差（球面収差および色収差）の寄与が大きく，とくに色収差の寄与は厚い試料の鮮明な像をえることを困難にしている。対物レンズを標準電流で使用するモードでの少ない色収差係数の状態で低倍(X1000)においても撮影する必要がある。しかし標準モードでは対物絞りによる視野カットが大きく広い領域を観察するためには 50μm の対物絞りを使用せざるを得なかった。これは試料位置における対物レンズの前磁場の影響で，対物レンズのすぐ前で平行に照射しても収束性の照射になり，試料上で光軸からの距離が離れるにしたがってより強く曲げられているので，光軸から離れたところの試料では入射電子線が対物絞りを通過しないことによる。大きい対物絞りを用いることにより試料に対する照射損傷を低減できる特徴はあるが，厚い試料に対しては空間分解能とコントラストが減少する。照射損傷の少ない条件下で対物レンズの色収差，球面収差によるぼけを増大させることなくできるだけ広視野を撮影する必要がある。

これらの条件をより満足させるために試料位置を約 1.5mm 上にあげて焦点をあわせてみると対物絞りによる視野カットが著しく改善され（約1/5）る効果があることが実験的にあきらかとなった。このとき対物レンズ電流は約24％減少する。レンズの強さは $NI/\sqrt{E^*}=21$ から約16と下

がる。このとき最終倍率は約７％減少する。

対物レンズのみの励磁により倍率校正用グレイティングレプリカ像から求めた倍率の値を用いて対物レンズの焦点距離を求めると約 5.4mm とわずかの増加であるので色収差係数，球面収差係数の増加もわずかと考えられる。低倍 (X1000) 撮影時において，試料位置を約 1.5mm あげて撮影すれば，焦点距離のわずかの増加のもとで対物レンズの強さを下げて使用できるので試料損傷の少ない照射条件という制限はあるが，むしろ結像に用いる電子線の開き角を減少させることができるので，厚い試料の広視野を，フィルム上でより分解能の高い状態で，観察できる。またこのとき入射電子の試料に対する平行性が増加しておりしかも試料位置の磁場の強度も減少するので立体計測における有効領域が拡大することも意味する。

サイドエントリー傾斜機構は，精度を維持するために製作にあたって対物レンズの外枠に固定されており，傾斜機構を光軸に沿って移動できないので，試料位置を移動させた特性を有効に生かすためには，新たに対物レンズポールピース位置を下げた低倍対策をした対物レンズが必要とされるので準備しているところである。

動物実験施設

【概要】

生命科学における目ざましい技術的進歩は，動物実験の内容にも様々な形で投影され，きわめて多様な手法の実験が展開されつつある。生理学研究所動物実験施設においても，遺伝子工学的手法を用いて作出されたトランスジェニックマウスや，遺伝子ノックアウトマウスの飼育が開始されたほか，キメラマウス，ミュータントマウスの飼育数も大幅に増大している。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法が広い領域で応用されるようになり，使用動物の種類，数量とも確実に増している。一方，実験動物の福祉を求める世論は，様々な形をとって表面化してきており，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行われるようになった。動物実験施設では，このような事態に備えてかねてより陸生動物飼育室の増築を要望してきたところであるが，今年度ようやく実現の運びとなり，関係者の協力を得て新棟増築に取り組むこととなった。建物設計に当たっては，旧棟の機能を最大限に生かしつつ，新たな実験需要に対応できるように，また，衛生上の問題と作業性を考慮すべく様々な角度から検討が加えられた。さらに，予算の性質上，年度内完成という時間的制約と，旧棟飼育室系統空調機の全熱交換器の改修工事を行うために現在飼育中の動物の待避先を用意する必要があり，作業計画の策定はきわめて困難なものとなったが，平成６年３月末無事に竣工し，平成６年度からの運用に備えられた。増築棟に設置する機器・設備は，補正予算による配分が認められ，増築棟１・２階部分はイヌ，ネコ，サルの検疫及び飼育のためのスペースとして，３・４階はトランスジェニック動物の作出と飼育実験を行うための区域として，飼育機器，実験機器の整備が進められた。飼育室，実験室の空調機のコントロールおよび監視には，デジタル方式のビル管理システムが導入され，従来よりきめ細かい空調監視が可能になったが，年間を通して最適な運転を行うには様々な負荷条件下でのデータの蓄積が必要であり，現在試行中である。増築棟の稼働に伴って，空室となる旧イヌ，ネコ，サル飼育室，検疫室，予備観察室などの再利用計画については次年度以降の課題として残された。

水生動物室においては，海水による腐食の著しい水槽架台20基について改修し２段組水槽は平置型に改装した。これは，将来の加熱冷却ユニットの老朽化に伴う熱交換ユニットの入れ替えと，水槽監視システムの導入に対応したもので，システム構築に向けて，今後の研究開発に期待したい。懸案であった飼育室の照明設備は前年度の改修により自動化されたが，これまで大きなトラブルもなく順調に機能している。

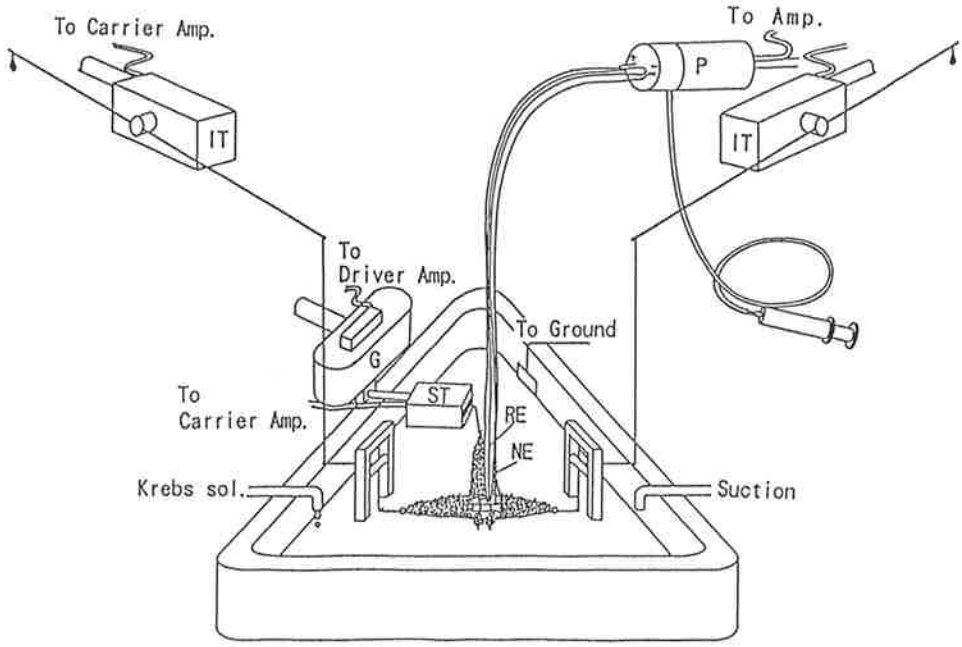
モルモット小腸壁内神経叢ニューロンの電気活動導出の試み

尾崎　毅，佐治俊幸，小木曽昇

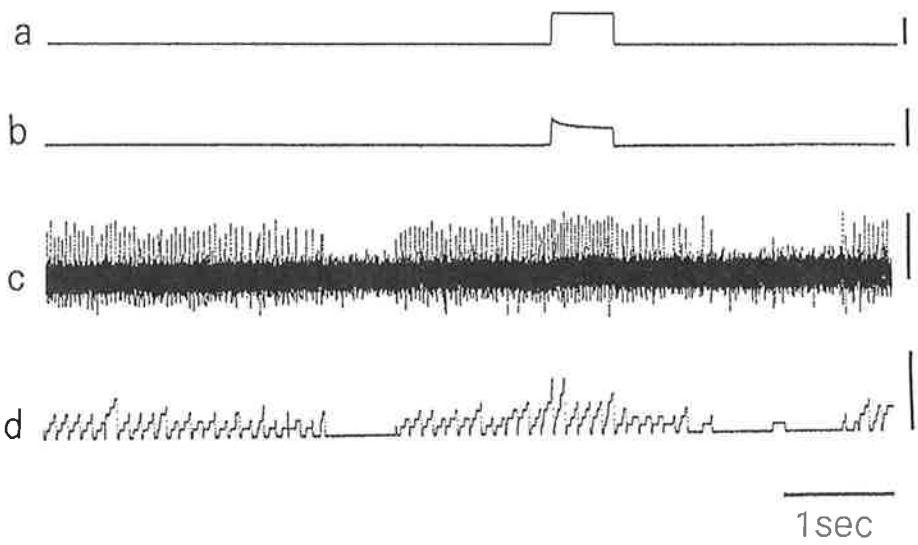
小腸の蠕動は腸管内腔の機械的刺激あるいは化学的刺激によって反射的に起きる。これは，腸の粘膜やその外側にある神経叢中の化学受容器や機械受容器が刺激に応じてインパルスを発射し，これが壁内神経叢に伝えられ，最終的にはこの神経叢のニューロン活動によって口側の腸管平滑筋群に興奮を，肛門側の平滑筋群に抑制を生ずることによるとされている。このことは，壁内神経叢が蠕動の中枢として機能することを意味しており，反射のモデルとしても興味深い領域といえる。従来蠕動発現を構成する個々の要素についてはよく調べられてきたが，壁内神経叢そのものの性質—壁内神経叢における神経伝達や情報の統合機序など—の解析は進んでいない。腸管は自発運動をするため標本を固定することが困難なこと，標本を電解質溶液の中に置くため電極間抵抗を高くすることが困難なことなどが研究の隘路となっている。我々は記録電極と電極のマニピュレーションを工夫することによって，この問題を解決出来るのではないかと考え，腸管を固定することなく，補正液中においたまま壁内神経叢ニューロンの電気活動を記録することを試みた。

記録電極は標本の動きに追従できるよう浮遊吸引電極を用いることとし，φ0.02㎜の白金線を電解研磨した後塩化付けしたものにリード線をつけ，これを引き延ばした塩化ビニールチューブに取り付けた先端約20μのガラス管に挿入して，1ml ディスポシリンジで吸引するようにした。記録電極は，実体顕微鏡下で，３次元マニピュレーターを用いて，壁内神経叢の任意の部位に装着できるようにした。不感電極及びアースには銀塩化銀を用い，差動入力プローブ（ダイヤメディカル DPZ-150）を介して細胞外用高感度増幅器（ダイヤメディカル DPA-100E）に接続した。導出された信号は低域 100Hz 高域 3KHz のフィルターを通してサーマルヘッド感熱記録計（オムニコーダー 8M24）で記録した。

モルモット小腸摘出標本は，腸間膜付着部を切開した後「T」字型に切り出し，顕微鏡下で粘膜及び輪走筋の一部を剝離して壁内神経叢を露出し，露出面を上にしてクレブス液を満たしたチャンバーに（図１）のように固定し，輪走方向に機械的に伸展刺激が行えるようにした。機械刺激装置は市販の心電計を改造して自作した物を用い，伸展張力をモニターするためストレーンゲージを挟んだ。（図２）にニューロンからの自発放電及び機械的刺激に応答して現れた壁内神経叢ニューロンの電気活動の１例を示す。電気活動は多くの場合複数のユニットから成り，大きさも一定しない。機械的刺激に応じて現れる放電パターンも記録部位により，増加，減少，不変，増減など様々なものが得られ，時間経過や刺激法によっても異なった。部位によっては自発放電の全く見られないか散発するものや，複数のユニットが頻回放電を持続したり，間欠的放電を繰り返すものなど様々なものが観察された。この記録法は，自発収縮，機械刺激に対して安定で，長時間の記録が可能であることが確かめられた。



（図１）実験装置の模式図
Ｐ；プローブ　IT；等張性トランスデューサー　Ｇ；ガルバノメーター
ST；ストレーンゲージ　RE；記録電極　NE；不感電極



（図２）モルモット回腸壁内神経叢ニューロンの自発放電と伸張刺激の効果
ａ；伸張刺激の長さ（示標は１㎜）　ｂ；伸張刺激の強さ（示標は 0.5g）
ｃ；ニューロンの自発放電の記録（示標は 50μV）　ｄ；放電頻度（示標は 10pulse/sec）

技　術　課

南　定雄

平成５年度は前年の退職者に代わって奥村絵美（公務員試験農学Ⅱ種），尾崎有香（公務員試験農学Ⅱ種），葛目博子（公務員試験化学Ⅱ種）が平成５年４月１日付けで技官として採用され，約１ケ月の新任者研修の後，それぞれ細胞器官研究系，生理機能研究施設，分子生理研究系へ出向した。内部の異動では，４月より伊藤嘉邦技官が生体調節研究系から生体情報研究系へ，森将浩技官が生体情報研究系から統合生理研究施設へ，高須千慈子，村瀬覚哉技官がそれぞれ生体情報研究系，分子生理研究系から生体調節研究系へ出向換えとなった。

技術課独自の技術研修は今年度も次のように実施した。９月には所外研修として２班に分かれ，近郊のマスプロ電工㈱（通信機器開発，製造）並びにアサヒビール（株）名古屋工場へ出張し，特に商品開発に関する講演を聴講した。技術陣はもとより社員の創造力の高揚，少数強力なプロジェクトによる計画的な開発など実例の解説は，今後，業務を遂行するうえで有意義な研修であった。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，出向先の業務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16回）は1994年２月に生理学研究所において開催し，国内の28生理科学研究機関から関係技術者100名の参加を得た。分科会別に３会場を設置し口演や技術支援について活発な意見の交換を行った。昨年につづいて今年も16題のパネル発表の時間をもうけて，専門外の技術の一端を知る機会をつくった。共通の研修講演は，「遺伝子治療に関する技術」と題して池中一裕教授（生理学研究所）に遺伝子操作技術の概要と技術応用の総説をお願いした。専門別講演では「ゲノム解析プロジェクトに関したデータベースネットワーク技術」中井謙太先生（基礎生物学研究所），「コンピュータを用いた光顕及びレントゲン画像の解析」伊東丈夫先生（東海大学），「In Situ Hybridization における RNA ラベリングシステム」西端信博氏（ベーリンガーマンハイム社），「動物実験における倫理問題」松林清明先生（京都大学・霊長類研究所），「パッチクランプ法を用いた単一細胞膜容量リアルタイム測定システム」挾間章博先生（生理学研究所），「ウインド時代のソフト開発技法」池田明聡氏（日本総合研究所），「ウインド時代のソフト開発ツールの紹介」伊藤公一氏（ニューロンデータジャパン社）について，専門の教官並びに技術者から指導を受けた。これらの研修は技術支援に必要な理論や新技術の動向を知る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，出向部門や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，機能構造物質検索，クランプアンプ製作，形態技術，画像通信，モンキーチェア開発，遠隔監視システム，DNA シー

クエンス，NMR 基礎技術，ポリクローナル抗体の 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16回生理学技術研究会および1993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16号）および生理学研究所技術課報告（第 9 号）に掲載の予定である。



第16回生理学技術研究会（1994．2．17～18）

研究系技術班

大庭明生

研究系技術班は，４研究系，13研究部門（専任部門：８部門，客員部門：５部門）からなり，総数21名の技官（専任部門：16名，客員部門：５名）が配属されている。

研究系技術班は，実験を通じての研究者への技術支援の場である。研究現場では，電気生理学的技術を軸にした研究環境から，遺伝子工学技術，抗体作製技術，免疫組織化学技術，培養技術，画像処理技術，電気回路作製技術，データ処理プログラム作製技術等の多種多様な技術が用いられる研究環境へと変貌しつつあり，個々の班技官に新たな多様な技術習得を改めて要求される研究環境になりつつある。また同時に境界的研究に対しての専門技術を異にする多方面の技官の総合的な技術支援についても新たな意味づけが求められている。

そうした問題への対応のために，系では毎週ミーティングを開き，課員の連帯を試みているが，同時に系，部門の役職による責任ある統括体制への整備が必要となっている。現在，研究系技術班には，班長，係長，主任が各１名が配置され，班長は系の統括，係長，主任は部門の統括を役割としている。係長，主任不在部門については年長技官への役割委託による体制作りを今年から進めている。そうした体制の中で研究環境の変化への対応の方策を議論していくことが研究系技術班の今後の課題である。

研究施設技術班

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，森　将浩

生体磁気計測装置は被検者に対し非侵襲であることから，各種刺激における脳活動の解明等に利用されている。現在まで主にLEDによる視覚刺激と音による聴覚刺激，及びCo^2レーザによる痛覚刺激等が行われてきたが，今後実験の多様化により文字や画像によるビジュアルな刺激が要求されている。それらの状況に対応するため，本年度において鏡面反射または液晶プロジェクタによりシールドルーム内に画像を伝送する装置を設置した。前者は外部モニタディスプレイに表示された画像等を鏡面及びプリズム等の光学的な手法によりシールドルーム内に誘導し被験者にリアルタイムで表示することができ，使用形態もジョイントの回転によりフレキシブルに状態が設定できる。同様な機材は多数の光学ファイバを集束研磨したものが考えられるが，極めて高価であり機械的強度も低いので本装置におけるコストパフォーマンスは極めて有用である。ただし，誘導時における装置内の減衰のため光源であるディスプレイ装置は通常よりも高輝度のものが用いられる。また，同様の目的において簡易的な手法として液晶プロジェクトによる画像投影装置を設置した。投影位置においてはある程度制限されるが，輝度においては上記装置よりも数段高いものが得られるため目的に応じて使い分けられる。なお，これらの装置を導入するに際してはシールドルーム外壁に100φの貫通孔を設ける必要があるため，遮蔽能力の低下が懸念されたが，フラックスゲート磁束計およびSQUID本体による環境ノイズ測定を行った結果，開口後のノイズレベルに顕著な差異は見られず，規定のスペックを充分クリアしている。さらに，計測装置本体においては各種データ出力の多極化に対応するため，処理装置のI/Oインターフェイスを40ch増設しEEG等の同時多チャネル記録に対応した。また解析装置においては，オフラインの解析処理効率を引き上げるためワークステーション(SPARC station10)を1台増設しネットワークによって有機的に接続利用できる様にした。さらに，本装置においてはバックアップ用にDATテープ装置（記憶容量最大圧縮時8Gバイト）を装備しており，これによってSQUIDの処理装置全てのシステムバックアップがネットワーク経由において容易にフルダンプできるので，信頼性も同時に向上している。これらの使用状況は，各自データベースを除いてMOディスクデータを保存管理するシステム形態であるが状況によってはHD上にデータを展開することがあり，解析用のワークエリアとプリンタスプーラを圧迫する事態が発生している。その様な事態を回避するためには個々にHDを増設するよりハードディスクサーバ等を設置し，集中管理した方が有効であろう。

三次元画像解析装置においては学会等の報告形態においてVTRと同時にスライドの需要が多いため，任意の画像を一眼レフカメラに編集出力する装置としてデジタルフィルムレコーダを設置した。本装置の使用により，ディスプレイ上の三次元画像をネットワークを使用してパーソナルコンピュータに転送し文字の作図・グラフの合成等を容易に実行でき，35ミリフィルムに出力

することによりフルカラーの三次元画像スライドを逐次作製することができる。

2．生理機能研究施設

(1) 生体機能検査室

尾崎有香

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2波長以上でのピーク検出や，データ処理のできる高速液体クロマトグラフの分析システムを導入した。また，その送液ユニットも一新した。

(2) 組織培養標本室

尾崎有香

組織培養標本室は組織培養室と組織標本室からなっている。培養室にはクリーンベンチ，炭酸ガスインキュベータなどの機器が完備されており，今年度は炭酸ガスインキュベータが追加導入された。標本室には各種顕微鏡システム及びタイムラプスビデオが整備されており，組織標本の観察に利用されている。今年度は新たに落射蛍光ノマルスキー付正立顕微鏡と，ビデオ画像記録処理システムを導入した。

(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。稼動率は，利用日数と使用可能日数より求めている。

1993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
1993年 4月	30	9	6	15	4	2	6	40%	修理１日
1993年 5月	31	13	5	13	4	1	5	38%	
1993年 6月	30	8	8	14	5	8	13	93%	修理５日
1993年 7月	31	9	4	18	8	7	15	83%	
1993年 8月	31	9	5	17	6	2	8	47%	
1993年 9月	30	10	6	14	6	3	9	64%	
1993年10月	31	11	5	15	7	4	11	73%	
1993年11月	30	10	6	14	8	2	10	71%	
1993年12月	31	12	10	9	3	3	6	67%	修理８日
1994年 1月	31	11	5	15	10	9	19	127%	修理１日
1994年 2月	28	9	4	15	6	12	18	120%	
1994年 3月	31	9	6	16	5	12	17	106%	
計	365	120	70	175	72	65	137	78%	

フィラメント点灯時間　　428.4時間
使用フィルム枚数　　5,521牧

(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，今年度は中央コンピュータシステム (HP9000/835SRX) の更新の年にあたり，仕様策定から導入までほぼ１年にわたり作業を行った。更に今年度は，岡崎国立共同研究機構としてのネットワーク整備も進められており，一挙にコンピュータとネットワークの環境が整いつつある。

電子計算機室における中央コンピュータの利用形態は，情報サービス（メイル，ニュース等），ファイルサービス（FTP, NFS 等），プログラム開発及びメディア変換などに分類することができる。また，これらの利用形態を円滑に運用していくためには，所内 LAN の管理，整備も重要になってきている。このような現状をふまえた上で，新しい中央システムとして「生体情報解析システム」の仕様策定を進めた。今回のシステムには，電子計算機室のこれまでの経験を生かし，機能と目的により複数のサブシステムに分けることにより，それぞれが独立して機能する（他の

機能を阻害しない）と共に，それぞれが有機的に接続されている特徴を持つ。「生体情報解析システム」として，以下にそれぞれのサブシステムと役割（機能，目的）を示す。

(1)情報解析支援・サブシステム (HP9000/755CRX48Z)：科学技術計算や画像処理を中心としたプログラム開発や処理を行う高速なCPUサーバとして使用する。また，実験データ等のバックアップやメディア変換などの作業は，本サブシステムで各ユーザが行える。主な装備（ハードウェア： CD-ROM, DAT, MT, MO, FDD, レーザプリンタ　ソフトウェア： IMSL, PV-WAVE, PHIGS, PEX, AVS, SPIDER)。(2)データファイリング・サブシステム (HP9000/800-H50)：研究室や研究施設で収集された各種実験データ等を，高速なLANを利用することにより，多量データの処理やデータバックアップ等ができる環境を提供する。主な装備（ハードウェア： HD (20GB), MO (20GB))。(3)コミュニケーション・サブシステム (HP9000/715-50)：所内の複雑化するネットワーク環境を管理し，各種管理情報の収集や各ノードで必要とする各種情報等を提供する。また，メイルサーバとして，所内・所外（海外）へのコミュニケーションの中核マシンとして機能する。(4)データ処理支援：サブシステム (HP9000/715-33CRX24)： X線やMRIなどの医療分野で定型化された処理プログラム等，パッケージで入手できるソフトウェアの実行環境を提供する。(5)高速ネットワーク：既設の基幹 (Ethernet) と有機的に結合させ，ワークステーション間での高速なデータ転送や，画像データ等の多量な実験データの転送が頻繁に行われても，各支線に影響しないネットワーク環境を提供する。高速ネットワークのバックボーンは，国際標準に対応したFDDIを採用。

現在，コンピュータとネットワークの整備作業を進めているが，今回のシステムは，機能的にも能力的にも今までとは大きく異なるため，新たなシステムを構築していくのと同じように，新しい知識（技術）を必要とする。しかし，できるだけ多くの研究者が利用できるシステムにしていくため，電子計算機室として新しい技術に積極的に取り組んでいくつもりである。

生理研ネットワークは，1989年度より本格的に開始されたが，本年度6月全部門・施設の接続が完了した。これに伴い電子メールの利用数も飛躍的に増加した。図1に各月の電子メール利用数を示した。折れ線部分は，所内と所外に分けたメールの授受形態（所内発—所内宛，所内発—所外宛，所外発—所内宛）を示している。図2は所内の電子メール利用者数を示した。それぞれ1カ月の利用数が送受信あわせて1通以上，5通以上，30通以上を示している。

ネットワークサービスでは，電子メール以外では昨年度9月から開始した電子ニュースに加え今年度6月よりGOPHERを開始した。このサービスは所外からも利用でき，所内ユーザの電子メールアドレスの検索が簡単に行える様になっている。GOPHERを核とした付属サービスも逐次整備を行っている。

今年度は新たなネットワーク整備が行われた。図3に現在の構成図を示す。従来の構成は太い黒実線で示した10BASE5 (10Mbps) 1本によるバックボーンに全てのマシンが接続され，3台のサーバでサービスを行っていた。このラインの接続機器が100台を越えたこととサービス数の増加によりサーバが過負荷になり，更に高速なワークステーションが接続されるようになったこ

とも合わせてネットワークも過負荷状況になった。そこで今年度の機器更新で新たなバックボーン整備を FDDI (100Mbps) を中心として行った（図 3 の中濃度色部分)。更に機構ネットワーク整備によって新ネットワーク整備が完了した（図 3 の淡濃度部分)。

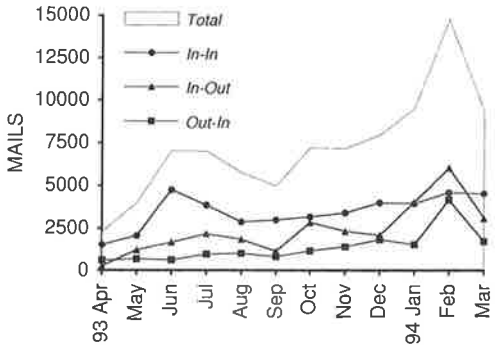


図 1

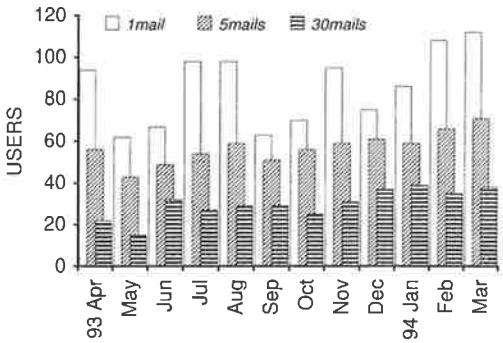


図 2

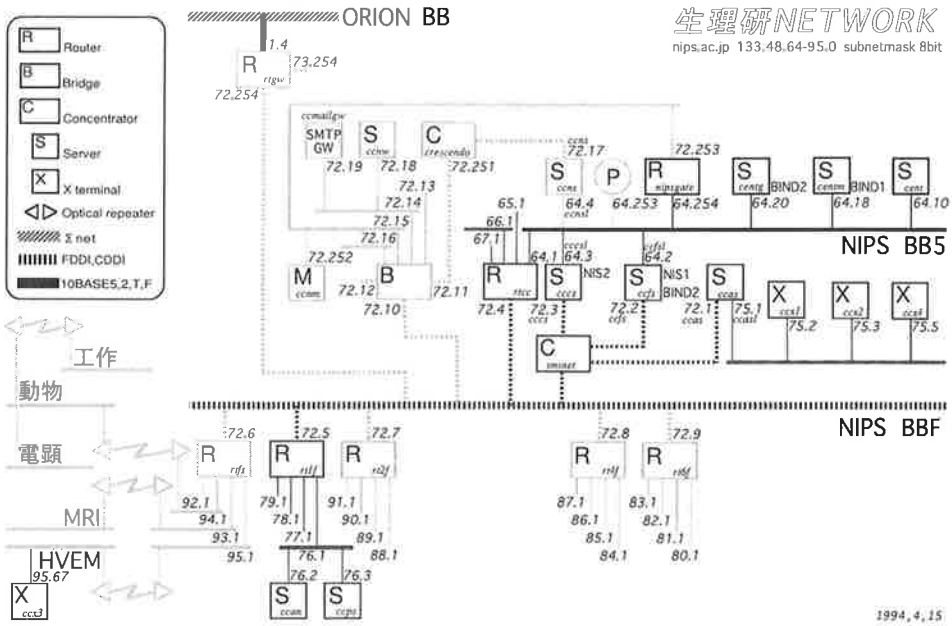


図 3

(5) 磁気共鳴装置室

市川　修

平成5年度における磁気共鳴装置室共同利用実験は，13テーマが採択され実施された。これらの実験結果については，磁気共鳴装置共同利用実験報告の章に詳述されている。

磁気共鳴装置は研究所内外の多くの研究者に使用され，導入以来ずっと高い利用率で稼働してきた。定期点検などにより安定な状態に維持してきたが，やむを得ない故障と保守で年間30～70日位が使用不能である。装置の構成品の多くは研究所固有の物であるため，量産機のように対応しづらいことも一因していると思われる。故障期間を最小，間隔は最大となるよう以下の点に留意し整備を行ってきた。

・過去の実績から，故障部位の予測による保守項目や点検方法の再検討

・故障時の迅速な対応のため，技術資料や保守技術の収集蓄積，修理部品，予備物品の充実

平成5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
1993年　4	30	1	29	10	11	21	72	
5	31	2	29	9	10	19	68	停電1
6	30	2	28	9	15	24	86	
7	31	1	30	7	22	29	97	
8	31	0	31	3	22	25	81	
9	30	2	28	0	16	16	57	停電1
10	31	0	31	2	18	20	65	
11	30	0	30	2	11	13	43	
12	31	1	30	5	14	19	63	
1994年　1	31	11	20	1	12	13	65	保守
2	28	2	26	1	14	15	58	修理
3	31	0	31	0	13	13	42	
計	365	22	343	49	178	227	66	

＊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

【陸生動物室】

本年度，陸生動物室の飼育室利用は，生理研16部門，基生研15部門の合計31研究部門であった。生理研，基生研ともに研究部門の研究員，大学院生等の研究人口が増加傾向にあり，飼育室の利用件数は対前年度比８％増となった。月平均61件（延べ727件）の利用件数となった。搬入動物数は，13種，延べ5,532匹で昨年と比較し，ニワトリが減少した。他はほとんどの動物種で増加した。

今年度はトランスジェニックマウスやミュータントマウスが導入され，系統維持のための飼育数の増大が著しくなった。また，マウスやウサギを用いた抗体作製を目的とした動物の搬入も依然として増加傾向にあり，飼育期間も長期化している。

搬入動物に関するトラブルはモルモット・ネコ・サルで，原因の多くは導入前の感染や飼育環境変化によるストレスと思われ，死亡個体の他，食欲不振や下痢の症状を示すものがみられた。モルモット２例，ネコ４例，搬入後数日で死亡する個体があった。

長期飼育動物については，サルで麻酔後の管理失宜による死亡がみられたほか，抗体作製中のウサギで老齢や感染症，手技の不良による衰弱または死亡する例がみられた。ウサギの手技不良の中では，麻酔薬投与量のミス，過剰量の採血の他，特に実験前後の保定ミス等による腰椎脱臼等が目立った。

一昨年，京都大学でラットの腎症候性出血熱(HFRS)が発見され全国的に動物実験施設で飼育中のラットコロニーの抗体調査が実施された。当施設においては全コロニー中24検体をサンプリングして調査を依頼したところ２例について陽性と判定されたものがあった。しかしこれらの陽性と判定されたラットコロニーは急性実験に使用されたためHFRSウィルスは確認されなかった。

検疫は，イヌ３件，ネコ11件，サル31件について行った。ネコについては飼育環境の違いによるストレス等の影響で衰弱したり死亡する例が多く，今後，搬入直後の飼育方法に検討が必要である。サルは捕獲野生ザル由来のものが多いため，例年同様体重のばらつきや，外傷，手足の指欠損等が見られた。

実験室の利用は，ウサギの抗体作製のための抗原投与や部分採血，全採血等を目的とする手術室や解剖室の利用が増加した。

設備・機器関係のトラブルとして，焼却炉のプロテクトリレーの故障や膨張タンクの水位センサー不良，クーリングタワーの凍結による空調用チラーの停止が発生した。飼育設備については腐食による流水ユニット貯水タンクの漏水，電磁弁動作不良による故障が散発した。飼育機器では，経年劣化によるマウスのケージ蓋やラットブラケットケージ，ウサギ固定器，ウサギケージのヒンジ部分等の溶接外れが目立った。

懸案であった，動物実験施設の増築が認められ平成６年３月末に竣工した。1F検疫エリア，

2F 一般飼育室，3F トランスジェニック動物飼育室，4F 実験エリアからなる 4 階建て約 1000m^2 の建物で，既設棟とは 2F 渡り廊下で接続されている。飼育条件を改善するためイヌ，ネコ，サルは，2F の一般飼育室に移され，これらの動物の検疫作業は，新館 1F で行うこととなった。各飼育室とも飼育ケージサイズの拡大を行い，イヌ飼育室には，ペン型飼育ケージ（床面積約 1.9m^2）を設置した。サル飼育室には，大型の容量可変ケージを新たに 7 基設置し，総ての飼育を行えるようにした。ネコ飼育室には，イヌケージを改装しサイズを大きくしたネコ飼育ケージを設置した。3F にはトランスジェニック動物飼育を目的として，マウス室 3 室，ラット室 2 室，鳥類室 2 室と洗浄室が用意された。現在既にマウス室 3 室が稼働中で，これらの飼育室は一方向気流方式の空調システムが採用されている。4F の実験エリアには，P3 実験に対応可能な胚操作実験室 2 室と培養実験室，慢性動物実験室各 1 室が用意され実験室としての整備が進められている。

【水生動物室】

平成 5 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 8 部門22件の利用があった。加熱冷却ユニットの動作不良が 6 件発生し修理を行ったが，機器の交換作業と修理費の増加に対しての根本的な解決に迫られている。フロン対策も考慮に入れ，熱源集中発生管理の温度コントロール方式に切り替えたい。

本年は，腐食のために倒壊の危険のあった水槽架台交換のための予算が認められ，主に500リットル水槽24基の架台をステンレス製に交換を行った。この交換により，2 段 4 基組の水槽 2 セットを残し500リットル水槽は総て改装された。予算的に総ての水槽に濾過槽を設置できなかったが，容易に追加設置可能な構造であるため，順次設置予定である。改装時に，水槽架台 2 基で脚部が腐食のために破損しているのが見つかった。この架台に設置されていた水槽には，歪みによると思われる亀裂があり現在修理中である。また，A 列の 1t 水槽の架台も改装の必要に迫られている。

【伊根実験室】

平成 5 年度の利用は，ヤリイカを用いた神経生理学実験を中心に，延べ69日，20名の利用があった。実験者の増加に対応できるように，第二水槽室と第一水槽室の間にドアを設置し，第二水槽室を実験室として利用できるようにした。次年度には，第二水槽室の床の張り替え工事を予定している。

手術・実験室　月別利用件数（平成５年度）

室名＼月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
手術室＊	11	3	3	9	14	15	11	13	19	11	10	13	132
生理実験室＊	2	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	2	25
生化学実験室	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
飼育実験室＊	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	24
解剖室	0	0	1	3	4	0	0	0	3	1	1	1	14
レントゲン室＊	0	1	4	1	7	0	0	0	0	1	2	1	17
計	15	8	12	17	29	20	15	17	26	17	17	19	212

＊は長期使用も含む

陸生動物　部門別・動物種別　搬入動物数（平成５年度）

部門＼動物種	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	ウズラ	スンクス	リス	ヤギ	カモ	合計
神経化学	250	2			16											268
超微小形態生理	414															414
細胞内代謝	172	24				3										199
生体膜	13					61										74
機能協関	52					130	3									185
神経情報	18	321			4					5			1	1	1	351
液性情報	60	1,236		312	5											1,613
能動輸送	197				2											199
高次神経性調節		11							7							18
高次液性調節									18							18
生体システム	3	15						11								29
組織培養標本室	19	9			1											29
統合生理									6							6
動物実験施設1						199										199
動物実験施設2					15		1									16
高次神経機構	3	846			2											851
細胞機構					12											12
細胞分化	20	100			3											123
細胞融合	30	84														114
生殖		118			14											132
形態形成		40			13					2						55
情報制御					2											2
感覚情報	120	100	6		8							20				254
細胞器官培養室	30	62														92
大型スペクトル		99														99
遺伝子第一					10											10
行動制御	2															2
細胞情報		2														2
細胞増殖		161			5											166
合計	1,403	3,230	6	312	112	393	4	11	31	7	0	20	1	1	1	5,532

水生動物　部門別・動物種別　搬入動物数（平成５年度）

部門＼動物種	キンギョ	メダカ	ニジマス	ティラピア	ウナギ	ナマズ	ウグイ	イモリ	ゼノパス	タコ	イカ	アサリ	ホタテ	ザリガニ	カブトガニ	合計
生体膜										15	116	3(Kg)	18	21		170
機能協関									85							85
神経情報							20									20
液性情報															30	30
生殖	2,000	3,500	15	10	42	4										5,601
形態形成								1,200								1,200
細胞機構											22					22
合計	2,000	3,500	15	10	42	4	20	1,200	85	15	138	3(Kg)	18	21	30	7,128

陸生動物　月別・動物種別搬入動物数（平成５年度）

動物種＼月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
ラット	87	120	125	194	118	65	160	89	110	13	98	224	1,403
トランスジェニックマウス										6			6
マウス	174	174	88	135	80	49	333	588	431	330	453	395	3,230
ハムスター	40		119	148			2		3				312
ウサギ	10	8	14	11	2	4	15	3	7	10	7	21	112
モルモット	26	25	34	33	30	50	34	37	40	15	44	25	393
サル	6		5			7		1		6		6	31
イヌ		1					3						4
ネコ						2	4			3	2		11
ニワトリ				2			5						7
ヤギ		1											1
カモ					1								1
スンクス					10	2						8	20
リス						1							1
ウズラ													0
合計	343	329	385	523	241	180	556	718	591	383	604	679	5,532

水生動物　月別・動物種別搬入動物数（平成５年度）

動物種＼月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
ワキン											1,000	1,000	2,000
ウナギ						42							42
イカ		22								21	40	55	138
メダカ			500	1,500	1,000				500				3,500
ナマズ								4					4
アメリカザリガニ		21											21
ホタテガイ		8								10			18
ウグイ								20					20
タコ										7		8	15
イモリ	1,200												1,200
ゼノパス		20	15	20	15			15					85
ティラピア						40							40
カブトガニ					30								30
ニジマス						5		1				6	15
合計	1,200	71	515	1,520	1,045	87	0	43	500	38	1,040	1,069	7,128

4．共通施設

(1) 電子顕微鏡室

前橋　寛

(a) 電顕室の状況

平成５年度は，フロンガス対策として，120kV 型透過電子顕微鏡２台の高圧タンクを SF5 ガス用と交換し，保守を容易にした。

利用頻度が高くなりつつある共焦点レーザ走査顕微鏡システムのバージョンアップを行い，蛍光２重染色した試料を同時に記録できる高解像（1024×768画素）システムとした。また，その断層像から立体像をモデリングするシステムも回転・切断等ができる３次元ソフトとなった。それらの改良を機に，利用者の講習会を行い40名の参加を得た。導入時の光源は Ar レーザ（波長488,514.5nm）のみであったが，蛍光２重染色像の分離をよくする要望が多く，新たに He-Ne レーザ(543.5nm) を光源として加えた。このシステムにおいてもインターネットワークに接続し，作画室のコンピュータ等にデータを転送できるようにした。

写真作画室では，前年度設置された 35mm フィルムスキャナーとフィルムレコーダーを使用して，直接スライド標本から画像入力したり，組写真やスライド作成，画像計測等の画像処理が行われているが，フィルムレコーダーによるスライド作製は時間がかかりコンピュータが占有され，またレーザ顕微鏡等の画像データが大きいため処理速度の速い機種を一台増設した。

(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27件であった。機構内では17件あり，機構外は，国内で７件，国外ではフランス，アメリカの研究者による利用が３件あった。下記の表はその研究部門・施設，大学，研究所と研究内容の一覧表である。

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	オリゴデンドロサイトのレザー顕微鏡観察 網膜視細胞における視物質局在の免疫組織化学的解析
	液生情報	細胞及び組織の形態観察
	神経化学	ラット海馬の観察
	細胞内代謝	分泌細胞の形態観察
	組織培養標本室	小腸筋繊維芽細胞の免疫組織学的研究
	生体膜	モルモット輸精管平滑筋の形態的特徴の解析
	技術課	血管樹脂鋳型の走査電子顕微鏡観察 ナメクジ卵の走査電子顕微鏡観察
基生研	形態形成	ウズラ色素上皮の構造観察 動物細胞の分化形態の観察 タンパク質の細胞内分布
	生殖	魚類の生殖細胞の発生
	細胞内エネルギー変換	微細藻類の構造観察及び細胞化学的研究
	細胞機構	高等植物におけるオルガネラの機能変換の形態および免疫組織学的観察
分子研	機器センター	超微粒子の形態観察及び粒径分布測定の為の電子線回折による構造決定
	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
北海道大学	野田坂 伸佳	神経回路網の解析
東京女子医科大学	日高 聡	網膜神経回路網の電顕解析
鶴見大学	尾口仁志	ハイドロキシアパタイトと骨の Interface の観察
名城大学	新居直祐	葉緑体の観察
慶應義塾大学	永本敏之	術後水晶体上皮細胞と細胞外基質の観察
京都大学原子エネルギー研究所	東野達	金属超微粒子の粒径測定および電子線回折
三重大学	斉藤弥八	球形炭素クラスターの結晶学的研究

所外（国外）

国名，大学，研究所	研究者名	研究内容
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
アメリカ ニュージャージー医科歯科大学	B. K. Khosh	魚類のステロイド代謝酵素遺伝子の発現（凍結切片を用いた電子顕微鏡法による in situ hybridization）
アメリカ コロラド大学	E. L. Pauttler	初代培養ブタ網膜上皮細胞の走査像観察

(2) 機器研究試作室

加藤勝已，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，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，プラスチック用超音波溶着機 (SUZUKI SUW-150D) と万能ハンドプレス（産協株式会社 5500シリーズ）の２台の機器を新たに導入した。超音波溶着器は，超音波エネルギーによってプラスチック（テフロンを除く熱可塑性樹脂）のスポッ

ト溶着，リベットによるかしめ，切断などの加工が可能な機器である。また工具は，手で持つホルダータイプのため複雑な形状のワークや狭い所の接合，バリ取りなどに有効である。一方万能プレスは，パンチおよびダイスの形状を変更することによって，薄板（アルミニュウム板　厚さ2mm 程度まで）の穴あけ，折り曲げ，切断などの加工が可能な機器である。穴あけの形状には，ニブル工具（角穴 5mm × 5mm），BNC コネクター穴用，ヒューズ穴用，D 型コネクター (9P, 15P, 25P, 37P, 50P) 穴用がある。また切断では，板の折り曲げによるケースなどの製作に必要なコーナーカットが一度のプレスで可能である。

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，本年度より岡田教授が担当されることになった。

7 月 5 日（月）

○委員長及び副委員長の選出

○平成 4 年度の機器の利用状況報告

○平成 4 年度の予算執行

○平成 4 年度の新設備機器の紹介

○平成 5 年度の運営計画，及び購入希望機器について

○非常ベルの修理について

○技官の補充について

なお，機器研究試作室の平成 5 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 5 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	17	13	27	7	11	6	3		20	104
5	17	12	14	4	5	5	2		21	80
6	19	24	16	13	13	12	3	3	16	119
7	35	25	17	25	15	8	5	5	33	168
8	17	15	15	12	5	6	4	2	11	87
9	14	14	13	9	4	5	1		11	71
10	6	12	12	9	2	3	8	1	15	68
11	15	12	9	8	6	5	3		20	78
12	14	9	10	8	5	2	3	3	11	65
1	15	19	11	10	4	10	2		12	83
2	4	7	7	4	5	5	2	1	6	41
3	14	10	18	8	7	10	5		27	99
合計	187	172	169	117	82	77	41	15	203	1063

機器研究試作室利用人数表　　（平成５年度）

月	生理研（人）	基生研（人）	その他（人）	合　　計	延べ時間（h）
4	44	14		58	91
5	48	7		55	77
6	57	4	2	63	115
7	77	9		86	210
8	44	7		51	89
9	33	12		45	41
10	28	15	1	44	38
11	29	11		40	62
12	26	8	1	35	71
1	44	8	1	53	72
2	22	7		29	36
3	63	10		73	89
合計	515	112	5	632	996

機器研究試作室部門別利用状況　　（平成５年度）

高次神経性調節	74	情報記憶	70	統合生理研究施設	57
超微小形態生理	52	生体システム	48	生体膜	42
動物実験施設	35	機能協関	28	技術課	26
神経化学	15	細胞内代謝	12	生体機能検査室	11
超高圧電顕室	10	高次液性調節	8	磁気共鳴装置室	7
電子顕微鏡室	5	神経情報	5	液性情報	4
能動輸送	3	電子計算機	2	高次神経機構	1
大型スペクトロ	24	情報制御	17	エネルギー変換	16
細胞融合	8	計時機構	8	RI 実験施設	8
電子計算機室	5	細胞情報	5	分析室	4
遺伝子発現統御第一	4	形態形成	3	人工気象室	3
生殖	2	技術課	2	感覚情報処理	1
行動制御	1	細胞分化	1		
分子研その他	5				

(3)　低温・冷凍実験室

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 …… 130
超微小形態生理研究部門 …… 132
細胞内代謝研究部門 …… 136
生体膜研究部門 …… 138
機能協関研究部門 …… 139
能動輸送研究部門 …… 140
神経情報研究部門 …… 142
液性情報研究部門 …… 144
高次神経機構研究部門 …… 146
情報記憶研究部門 …… 146
高次神経性調節研究部門 …… 146
生体システム研究部門 …… 147
高次液性調節研究部門 …… 149
高次脳機能プロジェクト …… 152
感覚・運動機能プロジェクト …… 155
自律機能プロジェクト …… 156
生体機能検査室 …… 157
組織培養標本室 …… 158
磁気共鳴装置室 …… 159
超高圧電子顕微鏡室 …… 159
動物実験施設 …… 160
江橋研究室 …… 160

発　表　論　文

《神経化学研究部門》

1. Kojima N Shirao T and Obata K (1993) Molecular cloning of a developmentally regulated brain protein, chicken drebrin A and its expression by altemative splicing of the drebrin gene. Mol Brain Res 19: 101-114

2. Stork O Hashimoto T and Obata K (1993) Regulation of tyrosine hydroxylase gene-expression in the rat substantia nigra, pars reticulata. Soc Neurosci Abstr 19: 806

3. Sekino Y Tanifuji M and Obata K (1993) Delayed signal conduction from CA3 to CAl via the CA2 region in rat hippocampal slices revealed by optical recordings. Soc Neurosci Abstr 19: 907

4. Obata K (1993) Training of young physiologists in institutes. Jpn J Physiol 43 Suppl 2: S3

5. Obata K and Hashimoto T (1993) Gene expression in the rat hippocampus after seizure. Jpn J Physiol 43 Suppl 2: S25

6. Obata K Sekino Y and Tanifuji M (1993) Investigation on pathways of signal transduction from CA3 to CAl activated by mossy fiber stimulation with the optical recording in the rat hippocampal slice. Jpn J Physiol 43 Suppl 2: S199

7. Obata K (1993) Relation between learning impairment, hippocampal pyramidal cell loss and other celluar changes in the rats after seizure induced by kainic acid and pilocarpine. Neurosci Res Suppl 18: S153

8. 小幡邦彦 (1993) カイニン酸けいれんによるラット海馬の組織，機能障害。厚生省精神・神経疾患，高次脳機能の発達とその障害に関する基礎的並びに臨床的研究平成5年度研究報告書 pp. 49-52

9. 丸山　敬，宇佐美美穂子，山尾—針ケ谷和花子，熊谷善弘，西道隆臣，斎藤祐見子，川島誠一 (1993) 培養細胞におけるアルツハイマー病アミロイド前駆体タンパク質の発現。Dementia 7, 250-259

10. 丸山　敬，山尾—針ケ谷和花子，斎藤祐見子，西道隆臣，川島誠一，宇佐美美穂子 (1993) 精神疾患の分子生物学—アルツハイマー病と筋緊張性ジストロフィー—。脳と精神の医学 4, 261-278

11. Tagawa K Yazaki M Kinouchi T Maruyama K Sorimachi H Tsuchiya T Suzuki K and Ishiura S (1993) Amyloid precursor protein is found in lysosomes. Gerontology 39 (suppll): 24-29

12. Usami M Yamao-Harigaya W and Maruyama K (1993) The triplet of lysine residues (Lys724-Lys725-Lys726) of Alzheimer's amyloid precursor protein plays an important role in membrane anchorage and processing. J Neurochem 61: 239-246

13. Maruyama K Usami M Yamao-Harigaya W Kametani F Tanaka K and Yoshikawa K (1993) The characterization of "secretase", Alzheimer amyloid precursor protein secreting enzyme. Advances in the Biosciences 87: 313-314

14. Fukushima D Konishi M Maruyama K Miyamoto T Ishiura S and Suzuki K (1993) Activation of the secretory pathway leads to a decrease in the intracellular amyloidogenic fragments generated from the amyloid protein precursor. Biochem Biophys Res Commun 194: 202-207

15. Maruyama K Endo T Kume H Kawamura Y Kanzawa N Nakauchi Y Kimura S Kawashima S and Maruyama K (1993) A novel domain sequence of connectin localized at the I band of skeletal muscle sarcomeres: homology to neurofilament subunits. Biochem Biophys Res Commun 194: 1288-1291

16. Shimokawa M Nakamaura K Maruyama K Tagawa K Miyatake T Sugita H Ishiura S and Suzuki K (1993) Inhibitory spectra of purified protease nexin-Ⅱ and related proteins towards cellular proteinases. Biochimie 75: 911-915

17. Yamagata Y and Thiel G (1993) Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ. Haeberli, A., ed. Human Protein Data, 2nd Installment. Weinheim, VCH.

18. 山肩葉子 (1993) シナプシン．Mebio 10: 66-72

19. Yamagata Y Obata K Greengard P and Czernik AJ (1993) The in situ phoshporylation state of synapsin I is increased in septal kindling. Soc Neurosci Abstr 19: 804

《超微小形態生理研究部門》

1. Seo Y, Roony WD & Murakami M (1993) An analysis of intracellular ^{23}Na relaxation using the double-quantum filtered NMR signal from the perfused rat salivary gland. Biochim Biophys Acta 1177: 111-116

2. Larcombe-McDouall JB, Seo Y & Steward MC (1993) Continuous measurement of cell volume changes in perfused rat salivary glands by ^{1}H relaxometry. NMR in Biomed 31: 131-138

3. Ishikawa T & Cook DI (1993) A Ca^{2+} -dependent Cl^{-} current in sheep parotid secretory cells. J Membr Biol 135: 261-271

4. Ishikawa T & Cook DI (1994) Characterization of an outwardly rectifying chloride channel in a human submandibular gland duct cell line (HSG). Pflugers Arch 427: 203-209

5. Yoshizaki K, Arizono N, Hayano T & Watari H (1993) Allergen-induced histamine secretion associated with lactate production in mast cells detected by ^{1}H NMR. Magn Res Med 29: 732-736

6. Seo Y (1993) Anisotropic motion of Na^{+} in red blood cells and its location. In Molecular Environment of Intra- and Extracellular Sodium. Ed. Y Seo et al. Kenbun Printing Okazaki 27-30

7. Murakami M, Ishikawa T & Seo Y (1993) Contribution of transporters to total Na^{+} handling during secretion by rat mandibular salivary gland. In Molecular Environment of Intra- and Extracellular Sodium. Ed. Y Seo et al. Kenbun Printing Okazaki 69-72

8. Yoshizaki K, Arizono N, Hayano T, Ito H & Watari H (1993) ^{1}H-NMR study on histamine secretion and lacate production in mast cell. In Molecular Environment of Intra- and Extracellular Sodium. Ed. Y Seo et al. Kenbun Printing Okazaki 81-84

9. Era S, Sogami M, Takasaki A, Kuwata K, Ejiri K, Kajihara T, Nakamura K & Watari H (1993) Structural transition of human serum albumin in the acidic region: the N → F and F → E transitions. In Molecular Environment of Intra- and Extracellular Sodium. Ed. Y Seo et al. Kenbun Printing Okazaki 93-95

10. Sogami M,Era S, Takasaki A, Kuwata K, Erata T, Tasaki A, Kato K, Ejiri K, Kajihara T, Nakamura K & Watari H (1993) Intermolecular cross-relaxation in bovin plasma albumin gel and solution states: basic studies on magnetization transfer contrast (MTC) imaging. In Molecular Environment of Intra- and Extracellular Sodium. Ed. Y Seo et al. Kenbun Printing Okazaki 97-100

11. Seo Y, Ammer U, Ishikawa T & Murakami M (1993) Organic acid transport of red blood cells measured by ^{19}F pulsed fielded gradient NMR. 生物物理 33 (Suppl) S182

12. Watari H (1993) Application of magnetic resonance to physiological sciences. Jpn J Physiol 43 (Suppl 2) S27

13. Watari H (1993) An analysis of the spectral width of each band in optical spectra of biomolecule. Jpn J Physiol 43 (Suppl 2) S59

14. Seo Y, Lee J-H & Murakami M (1993) Relaxation of Na ion in agar gel analyzed by ^{23}Na dqf and pfge NMR. Jpn J Physiol 43 (Suppl 2) S70

15. Murakami M, Ishikawa T & Seo Y (1993) NH_4^+ and K^+ transport by the rat mandibular salivary gland during perfusion with NH_4Cl. Jpn J Physiol 43 (Suppl 2) S78

16. Ishikawa T & Cook DI (1993) A Ca^{2+} -dependent Cl^- current in sheep parotid secretory cells. Jpn J Physiol 43 (Suppl 2) S78

17. Sogami M, Era S, Takasaki A, Kuwata K, Nakagami Y, Ejiri K, Kajihara T & Watari H (1993) ^1H-NMR studies on water structure in protein gel and solution. Jpn J Physiol 43 (Suppl 2) S48

18. Sogami M, Era S, Kuwata K,Takasaki A, Ejiri K, Nakagami Y, Kajihara T & Watari H (1993) ^1H-NMR and CD studies on the molten-globule state of sodium dodecyl sulfate -bovine mercaptalbumin complex. Jpn J Physiol 43 (Suppl 2) S48

19. Era S, Sogami M, Kuwata K, Nakagami Y, Takasaki A, Ejiri K, Kajihara T, Nakamura K & Watari H (1993) Structural transition of human serum albumin (HSA) in acidic rigeon. Jpn J Physiol 43 (Suppl 2) S49

20. 東　晃史 (1993)「政治権限」と「地球環境」—大脳生理学の立場から—東京。技術出版

21. 東　晃史 (1993)「万能量子論」による「天国と地獄」—太陽系の生理学—東京。技術出版

22. 瀬尾芳輝，ウテアンマ，石川　透，村上政隆 (1993) パルス磁場勾配 NMR 法による細胞内含 ^{19}F 化合物の制限拡散の解析。NMR 討論会講演要旨集 32: 15-18

23. 曽我美勝，惠良聖一，桑田一夫，高崎昭彦，恵良田知樹，田崎　明，江尻和隆，梶原孝彦，加藤一夫，中村浩二，亘　　弘 (1993) ウシ血漿アルブミン溶液，ゲル状態における分子間交差緩和現象の研究— Magnetization Transfer Contrast (MTC) Imaging の基礎的研究。NMR 討論会講演要旨集 32: 341-344

24. 曽我美勝，惠良聖一，亘　　弘 (1993) タンパク質の溶液→ゲル変換における水構造変化。食品の物性に関するシンポジウム講演要旨集 20: 8-9

25. 曽我美勝，惠良聖一，桑田一夫，亘　　弘 (1993) ^{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（工業技術会編）30-43

26. 曽我美勝，惠良聖一，亘　　弘 (1993) Magnetization transfer と生体内水構造。アドバンスト MR 入門講座テキスト 1: 9-22

27. 吉崎和男，早野尚志，平川和文，森本武利，亘　　弘 (1993) NMR 画像測定法の基礎的検討。生物物理 33 (Suppl) S121

28. 村上政隆，石川　透，瀬尾芳輝 (1993) 塩化アンモニウム投与による唾液腺 K^{+} 輸送機構の解析。生物物理 33 (Suppl) S181

29. 石川　透，村上政隆，瀬尾芳輝 (1993) ラット灌流顎下腺におけるカルシウム依存性血管側外向き K イオン輸送。生物物理 33 (Suppl) S182

30. 曽我美勝，惠良聖一，桑田一夫，高崎昭彦，恵良田知樹，江尻和隆，梶原孝彦，中村浩二，加藤一夫，亘　　弘 (1993) ^{1}H-NMR によるタンパク質の溶液→ゲル変換における水構造変化の研究。生物物理 33 (Suppl) S116

31. 曽我美勝，惠良聖一，桑田一夫，高崎昭彦，江尻和隆，梶原孝彦，中村浩二，亘　　弘

(1993) 酸性側におけるヒト血清アルブミン構造転移の研究。生物物理 33 (Suppl) S215

32. 瀬尾芳輝，ウテアンマ，石川　透，村上政隆 (1993) パルス磁場勾配 NMR 法をを用いた細胞内含 ^{19}F 化合物の測定。日磁医誌 13 (Suppl) 923

33. 曽我美勝，惠良聖一，桑田一夫，高崎昭彦，恵良田知樹，田崎　明，江尻和隆，梶原孝彦，加藤一夫，中村浩二，亘　　弘 (1993) ウシ血漿アルブミン溶液，ゲル状態における分子間交差緩和現象の研究—交差緩和イメージングの基礎研究。日磁医誌 13 (Suppl) 145

34. 惠良聖一，中村浩二，高崎昭彦，曽我美勝，亘　　弘 (1993) 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Ⅱ。日磁医誌 13 (Suppl) 146

35. 寺川　進，村上政隆 (1993) ビデオ顕微鏡によるツパイ唾液腺の水と粘液分泌の観察。日本生理誌 55 (10): 408

36. 惠良聖一，中村浩二，桑田一夫，曽我美勝，亘　　弘 (1993) 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。日本生理誌 55 (1): 22

37. 曽我美勝，惠良聖一，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 (1993) ウシ血漿アルブミン溶液→ゲル変換における水構造変化の研究。日本生理誌 55 (1): 22

38. 曽我美勝，惠良聖一，高崎昭彦，江尻和隆，桑田一夫，梶原孝彦，亘　　弘 (1993) ウシ血漿アルブミン溶液，ゲル状態における分子間交差緩和時間の濃度依存性。日本生理誌 55 (12): 506

39. 惠良聖一，桑田一夫，中村浩二，曽我美勝，亘　　弘 (1993) 核磁気共鳴測定による生体内における水の存在状態解析。日病生誌 1 (2): 47

40. 曽我美勝，惠良聖一，江尻和隆，高崎昭彦，桑田一夫，中村浩二，梶原孝彦，亘　　弘 (1993) タンパク質の溶液→ゲル変換における水構造変化— Magnetization Transfer Contrast Imaging の基礎的研究。藤田医学会誌 17 (Suppl) 246

41. 高崎昭彦，曽我美勝，惠良聖一，桑田一夫，江尻和隆，梶原孝彦，亘　　弘 (1993) ^{1}H-NMR 及び CD 測定によるヒト血清アルブミン (HSA) 構造転移の研究。藤田医学会誌 17

(Suppl) 247

42. 村上政隆，瀬尾芳輝 (1993) 二量子フィルター法による細胞内 Na^+ イオン，K^+ イオンの動的パラメータの測定。平成２―４年度重点領域研究(1)「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 45-48 （和文），257-258 （英文）

《細胞内代謝研究部門》

1. Satoh Y, Habara Y, Kanno T & Ono K (1993) Carbamylcholine-induced morphological changes and spatial dynamics of $[Ca^{2+}]_c$ in Harderian glands of guinea pigs: Calcium-dependent lipid secretion and contraction of myoepithelial cells. Cell Tissue Res 274: 1-14

2. Habara Y, Kanno T (1993) Dual effects of chlorobutanol on secretory responese and intracellular Ca^{2+} dynamics in isolated pancreatic acini of the rat. Br J Pharmacol 109: 685-692

3. Ikei N, Habara Y & Kanno T (1993) Inhibitory potency of various local anesthetics in carbachol-induced amylase release parallels that in muscarinic receptor binding in rat pancreatic acini. Biomedical Res 14: 145-148

4. Kanno T & Habara Y (1993) Decay in recurrent Ca^{2+} spikes induced by continuous stimulation in pancreatic acinar cells. Biomedical Res 14, suppl. 2: 125-129

5. Kanno T & Habara Y (1993) Intra-and inter-cellular propagation of recurring Ca^{2+} tide in pancreatic acinus. Biomedical Res 14: suppl. 3: 13-19

6. Ikei N, Busik J, Habara Y, Kanno T (1993) Competitive inhibition by procaine of carbachol-induced stimulus-secretion coupling in rat pancreatic acini.Br J Pharmacol 110: 603-608

7. Busik J, Habara Y, Maruyama T & Kanno T(1993) Inhibition by a receptor-mediated Ca^{2+} entry blocker, SK & F 96365, of Ca^{2+} and secretory responses in rat pancreatic acini. Eur J Pharmacol-Mol Pharmacol Sec 247: 273-281

8. Kondo T, Kano E, Habara Y, Kanno T (1993) Enhancement of cell killing and increase in

cytosolic calcium concentration by combined treatments with hyperthermia and TMB-8 in mouse mammary carcinoma FM3A cells. Cell Calcium 14: 621-629

9. Habara Y, Satoh Y & Kanno T (1993) The direction of Ca^{2+} wave propagation is dependent on the dose of carbachol and acinar topography in rat pancreas. Biomedical Res 14: 377-384

10. Warashina A, Habara Y, Yamaguchi K & Kanno T (1993) Effects of chlorobutanol on calcium mobilization and catecholamine secretion in rat adrenal medullary cells. Biomedical Res 14: 411-417

11. Habara, Y. and Ohno, H. (1993) Functioning of endocrine organs under thermal stressful environment: with emphasis on insulin. Ann. Natl. Acad. Sci. (India) 29: 63-72

12. Kumakura K, Ohara-Imaizumi M, Muramatsu S, Terakawa S & Kanno T (1993) Mastoparan evokes exocytosis without Ca^{2+} movement in adrenal chromaffin cells. Jpn J Physiol 43, suppl. 1: S109-S113

13. Yamaguchi K, Habara Y, Warashina A & Kanno T (1993) Effects of corticosteroids on cytosolic free calcium concentration of the rat adrenal zona glomerulosa cell. Biological Signals 2: 352-358

14. 大野秀樹，葉原芳昭，山本三毅夫，山下　均，大河原知水，長沢純一，上野伸正，中村健一 (1993) 高温環境は糖尿病を改善するか—とくに褐色脂肪組織を中心として—大和證券ヘルス財団の助成による研究業績集。第17集 p19-25

15. 池井暢浩，Julia Busik，葉原芳昭，菅野富夫 (1993) カルバコールあるいは CCK-8 によって始動する刺激—分泌連関に及ぼすプロカインの抑制効果の比較—ラット遊離膵腺房標本を用いた解析—消化管ホルモンXII 103-109 医学図書出版

16. 菅野富夫 (1993) 細胞内カルシウムイオン濃度分布の画像解析。実験医学 11: 99-102

17. 菅野富夫 (1993) 分泌。生体の科学 44: 416-419

18. 菅野富夫 (1993) 膵外分泌をめぐる最近の知見。肝胆膵 27: 937-939

《生体膜研究部門》

1. Watanabe N, Matumura T, Kinoshita K, Shimanuki Y, Furuya K, Taguchi T, Taniguchi M & Kihara H (1992) Observation of biological materials by X-ray photoelectron-conversion contact microscopy. J Microscopy 170: 141-146

2. Furuya K, Enomoto K & Yamagishi S (1993) Spontaneous calcium oscillation and mechanically and chemically induced calcium responses in mammary epithelial cells. Pflügers Arch **422** 295-304

3. Furuya K, Enomoto K, Maeno T & Yamagishi S (1993) Mechanically induced calcium signal in mammary epithelial cells. Jap J Physiol 43: S105-108

4. Enomoto K, Furuya K, Yamagishi S & Maeno T (1993) Proliferation-associated increase in sensitivity of mammary epithelial cells to inositol-1, 4, 5-trisphosphate. Cell Biochem Func **11** 55-62

5. Furuya S & Furuya K (1993) Characteristics of cultured subepithelial fibroblasts of rat duodenal villi. Anatomy Embriology 187: 529-538

6. Enomoto K, Furuya K, Yamagishi S & Maeno T (1993) Mechanically induced calcium response in mammary epithelial cells. Biomedical Res 14 (S2): 135-137

7. Kukita F & Mitaku S (1993) Kinetic analysis of the denaturation process of the sodium channels in squid giant axons by alcohol. J Physiol (Lond) 463: 523-543

8. Morimoto K, Kukita F & Yamagishi S (1993) Ca^{2+} -activated K channel in vas deferens smooth muschle cells. Ann N Y Acad Sci 707: 407-409

9. Yamaguchi K & Furuya K (1993) Regulation of neurite-outgrowth by intracellular calcium in cultrued mammalian neuron. Biomedical Res 14 (S2): 161-162

10. Shi Y L, Furuya K, Wang W P, Terakawa S, Xu K & Yamagishi S (1993) Toosendanin-induced Ca^{2+} conductance increase in neuroblastoma x glioma hybrid cells. Chinese Science Bulletin 38: 1489-1493

11. 古家喜四夫 (1993) 神経活動電位とイオンチャネル　In:「イオンチャネル２」(東田陽博　編, メジカルビュー社) 16-25

12. 山岸俊一 (1993) ニューロン膜電位のイオン機序 CLINICAL NEUROSCIENCE 11: 259-261

13. 山岸俊一 (1993) シナプスにみる細胞間連絡。朝日百科：動物たちの地球 Vol. 12 からだ作りの神秘：細胞の社会 pp216-217 朝日新聞社

14. 山岸俊一 (1993) イギリス生理学の伝統と現在。医学のあゆみ 166: 578-580

《機能協関研究部門》

1. Tominaga M, Matsumori A, Horie M, Yoshida H & Okada Y (1993) Activation of Ca-permeable cation channels by myocarditis-associated antibody in guinea pig ventricular myocytes. J Clin Invest 91: 1231-1234

2. Hayashi S, Horie M & Okada Y (1993) Ionic mechanism of minoxidil sulfate-induced shortening of action potential durations in guinea pig ventricular myocytes. J Phamacol Exp Therap 265: 1527-1533

3. Hayashi S, Horie M, Tsuura Y, Ishida H, Okada Y, Seino Y & Sasayama S (1993) Disopyramide blocks pancreatic ATP-sensitive K^+ channels and enhances insulin release. Am J Physiol 265: C337-C342

4. Tsuji K, Taminato T, Ishida H, Okamoto Y, Tsuura Y, Kato S, Kurose T, Okada Y, Imura H & Seino Y (1993) Selective impairment of the cytoplamic Ca^{2+} response to glucose in pancreatic beta-cells of streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetic rats. Metabolism 42: 1424-1428

5. Tsuura Y, Ishida H, Okamoto Y, Kato S, Shakamoto K, Horie M, Ikeda H, Okada Y & Seino Y (1993) Glucose sensitivity of ATP-sensitive K^+ channels is impaired in β cells of the GK rat, a new genetic model of NIDDM. Diabetes 42: 1446-1453

6. Oiki S, Takumi T, Okada Y & Nakanishi S (1993) Alterations of gating parameters by neutral

substitutions of transmembrane Leu52 of slow potassium channel. Ann NY Acad Sci 707: 402-405

7. Loo DDF, Hazama A, Supplison S, Turk E & Wright EM (1993) Relaxation kinetics of the Na^+ /glucose cotransporter. Proc Natl Acad Sci USA 90: 5767-5771

8. Kashihara Y, Takasu C & Kuno M (1993) Messnger RNAs from chick muscle encode a motoneuronal survival promoting factor. Neurosci Lett 163: 208-210

9. 岡田泰伸 (1993) 小腸上皮細胞の容積調節とイオンチャネル。医学のあゆみ 166: 166

10. 富永真琴，松森　昭，堀江　稔，篠山重威，岡田泰伸 (1993) 抗心筋抗体による Ca^{2+} 透過性陽イオンチャネルの活性化。心筋の構造と代謝 15: 275-281

11. 岡田泰伸 (1993) パッチクランプ法による分泌機構の研究。内分泌学の進歩 11: 147-158

12. 岡田泰伸 (1993) イオンチャネルと疾病。"分子病理学"（杉山武敏編）45－50頁。文光堂。東京

《能動輸送研究部門》

1. Miura, Y., Kikuchi, A., Musha, T., Kuroda, S., Yaku, H., Sasaki, T., and Takai, Y. (1993) Regulation of morphology by *rho* p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (*rho* GDI) in Swiss 3T3 cells. J. Biol. Chem., 268: 510-515

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

3. Ullrichi, O., Stenmark, H., Alexandrov, K., Huver, L. A., Kaibuchi, K., Sasaki, T., Takai, Y., and Zerial, M. (1993) *Rab* GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of *rab* proteins. J. Biol. Chem., 268: 18143-18150

4. Burstein, E. S., Brondyk, W. H., Macara, I. G., Kaibuchi, K., and Takai, Y. (1993) Regulation of

the GTPase cycle of the neuronally expressed *Ras*-like GTP-binding protein *Rab*3A. J. Biol. Chem., 268: 22247-222250

5. Kishida, S., Shirataki, H., Sasaki, T., Kato, M., Kaibuchi, K., and Takai, Y. (1993) *Rab*3A GTPase-activating protein-inhibiting activity of Rabphilin-3A, a putative *Rab*3A target ptotein. J. Biol. Chem., 268: 22259-22261

6. Sasaki, T., Kato, M., and Takai, Y. (1993) Consequences of weak interaction of *rho* GDI with the GTP-bound forms of *rho* p21 and *rac* p21. J. Biol. Chem., 268: 23959-23963

7. Orita, S., Kaibushi, K., Kuroda, S., Shimizu, K., Nakanishi, H., and Tkai, Y. (1993) Comparison of kinetic properties between two mammalian *ras* p21 GDP/GTP exchange proteins, *ras* guanine nucleotide-releasing factor and *smg* GDP dissociation stimulator. J. Biol. Chem., 268: 25542-25546

8. Yamaguchi, T., Shirataki, H., Kishida, S., Miyazaki, M., Nishikawa, J., Wada, K., Numata, S., Kaibuchi, K., and Takai, Y. (1993) Two functionally different domains of rabphilin-3A, *rab*3A p25/*smg* p25A-binding and phospholipid-and Ca^{2+}-binding domains. J. Biol. Chem., 268: 27164-27170

9. Takaishi, K., Kikuchi, A., Kuroda, S., Kotani, K., Sasaki, T., and Takai, Y. (1993) Involvement of *rho* p21 and its inhibitory GDP/GTP exchange protein (*rho* GDI) in cell motility. Mol. Cell. Biol., 13: 72-79

10. Shirataki, H., kaibuchi, K., Sakoda, T., Kishida, S., Yamaguchi, T., Wada, K., Miyazaki, M., and 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

11. Kishi, K., Sasaki, T., Kuroda, S., Itoh, T., and 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

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

13. Takaishi, K., Sasaki, T., Kato, M., Yamochi, W., Kuroda, S., Nakamura, T., Takeichi, M., and Takai, Y. (1993) Involvement of *Rho* p21 small GTP-binding protein and its regulator in the HGF-induced cell motility. Oncogene, 9: 273-279

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

15. Sawai, T., Asada, M., Nunoi, H., Matsuda, I., Ando, S., Sasaki, T., Kaibuchi, K., Takai, Y., and Katayama, K. (1993) Combination of arachidonic acid and guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) induce translocation of *ras* p21s to membrane and activation of NADPH oxidase in a cell-free system. Biochem. Biophys. Res. Commun., 195: 264-269

16. Garrett, M. D., Kabcenell, A. K., Zahner, J. E., Kaibuchi, K., Sasaki, T., Takai, Y., Cheney, C. M., and Novick, P. J. (1993) Interaction of *Sec*4 with GDI proteins from bovine brain, drosophila melanogaster and saccharomyces cerevisiae: conservation of GDI membrane dissociation activity. FEBS Letter., 331: 233-238

17. Motoike, T., Sano, K., Nakamura, H., and Takai, Y. (1993) Expression of *smg* p25A/*rab* 3A guanine nucleotide dissociation inhibitor (GDI) in neurons and glial cells from rat brain. Neuroscience Letter, 156: 87-90

18. Takai, Y., Kaibuchi, K. Kikuchi, A., Kawata, M., Sasaki, T., and Yamamoto, T. (1993) GDP/GTP exchange proteins for small GTP-binding proteins. In The *ras superfamily of GTPase*(Lacal, J. C., ed) pp. 489-505, CRC press, Boca Raton

19. Takai, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A., Sasaki, T., and Shirataki, H., (1993) Regulators of small GTPases. In *Ciba Foundation Symposium on the GTPase superfamily*, pp. 128-146, John Wiley & Sons, Chichester

《神経情報研究部門》

1. Nakajima, K., Ikenaka, K., Nakahira, K., Morita, N., Mikoshiba, K. (1993) An improved retroviral vector for assaying promoter activity. Analysis of promoter interference in pIP211 vector. FEBS Lett., 315: 129-133

2. Kato, H., Ikenaka, K., kondo, T., Fujimoto, I., Ito, K., Mikoshiba, K. (1993) The induction mechanism of long term potentiation by synthetic by tetanic stimulation in hippocampal CA1 neurons studied in vitro. Yamagata Med. J., 11: 1-16

3. Nakajima, K., Ikenaka, K., Kagawa, T., Aruga, J., Nakao, J., Nakahira, K., Shiota, C., Kim, S. U., Mikoshiba, K. (1993) Novel isoforms of mouse myelin basic protein predominantly expressed in embryonic stage. J. Neurochem., 60: 1554-1563

4. Miyao, Y., Shimizu, K., Moriuchi, S., Yamada, M., Nakahira, K., Nakajima, K., Nakao, J., Kuriyama, S., Tsujii, T., Mikoshiba, K., Hayakawa, T., Ikenaka, K. (1993) Selective expression of foreign genes in glioma cells: Use of the mouse myelin basic protein gene promoter to direct toxic gene expression. J. Neurosci. Res., 36: 472-479

5. Kuriyama, S., Yoshikawa, M., Tominaga, K., Nakatani, T., Sakamoto, T., Fukui, H., Ikenaka, K., Tsujii, T. (1993) Gene therapy for the treatment of hepatoma by retroviral mediated gene transfer of the herpes simplex virus thymidine kinase. Int. Hepatol. Commun. 1: 253-259

6. Shimizu, H., Ochiai, K., Ikenaka, K., Mikoshiba, K., Hase, S. (1993) Structures of N-linked suger chains expressed mainly in mouse brain. J. Biochem. 114: 334-338

7. 中平健祐，池中一裕，御子柴克彦，(1993) 細胞分化と遺伝子発現。実験医学 11: 1296-1301

8. 池中一裕，鹿川哲史，御子柴克彦，(1993) 分化因子としてのミエリン蛋白質。実験医学 11: 1344-1348

9. 池中一裕，鹿川哲史，井上芳郎，御子柴克彦 (1993) 神経疾患の動物モデル—ミエリンプロテオリピド蛋白質遺伝子過剰発現によるミエリン形成不全および脱髄マウスの作製—。最新医学 48: 1560-1566

10. 御子柴克彦，池中一裕，岡野栄之，有賀　純，中平健祐，鹿川哲史，仲島一範 (1993) 神経分化と遺伝子発現。神経研究の進歩 37: 997-1010

《液性情報研究部門》

1. Yonemura, S., Nagafuchi, A., Sato, N. & Tsukita, Sh. (1993) Concentration of an integral membrane protein, CD43 (leukosialin, sialophorin), in the cleavage furrow through the interaction of its cytoplasmic domain with actin-based cytoskeleton. J. Cell Biol. 120: 437-449

2. Funatsu, T., Kono, E., Higuchi, H., Kimura, S., Ishiwata, S., Yoshioka, T., Maruyama, K. & Tsukita, Sh. (1993) Elastic filaments in situ in cardiac muscle: Deep-etch replica anaysis in combination with selective removal of actin myosin filaments. J. Cell Biol. 120: 711-724

3. Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Yasuda-kitani, T., Tsukita, Sa & Tsukita, Sh. (1993) The 220kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. J. Cell Biol. 120: 491-502

4. Funatsu, T., Kono, E., & Tsukita, Sh. (1993) Time-resolved electron microscopic analysis of the behavior of myosin heads on actin filaments after photolysis of caged ATP. J. Cell Biol. 121: 1053-1064

5. Oda, H., Uemura, T., Shiomi, K., Nagafuchi, A., Tsukita, Sh. & Takeichi, M. (1993) Identification of a Drosophila homologue of α catenin and its association with the armadillo protein. J. Cell Biol. 121: 1133-1140

6. Tsukita, Sh., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S. & Tsukita, Sa. (1993) Submembranous junctional plaque proteins include potential tumor suppressor molecules. J. Cell Biol. 123: 1049-1053

7. Oda, T., Kanai, Y., Shimoyama, Y., Nagafuchi, A, Tsukita, Sh. & Hirohashi, S. (1993) Cloning of the human α catenin cDNA and its aberrant mRNA in a human cancer cell line. BBRC 193: 897-904

8. Morton, R. A., Ewing, C. M., Nagafuchi, A., Tsukita, Sh. & Isaacs, W. B. (1993) Reduction of E-cadherin levels and deletion of the α catenin gene in human prostate cancer cells. Cancer Res. 53: 3585-3590

9. Furukawa, Y., Nakatsuru, S., Nagafuchi, A., Tsukita, Sh. Muto, T., Nakamura, Y. & Horii, A. (1993) Structure, extression and chromosomal assignment of the human α catenin gene. Cytogenetics & Cell Genetics 65: 74-78

10. Hashimoto, T., Amagai, M., Parry, D. A. D., Dixon, T. W., Tsukita, Sa., Tsukita, Sh., Miki, K., Sakai, K., Inokuchi, Y., Kudoh, J., Shimizu, N. & Nishikawa, T. (1993) Desmoyokin a 680 kDa keratinocyte plasma membrane-associated protein, is homologous to the protein encoded by human gene AHNAK.J. Cell Sci. 105: 275-286

11. Kadowaki, T., Shiozaki, H., Inoue, M., Tamura, S., Oka, H., Doki, Y., Iihara, K., Matsui, S., Iwazawa, T., Nagafuchi, A., Tsukita, Sh. & Mori, T. (1993) E-cadherin and α catenin expression in human esophageal cancer. Cancer Res. 54: 291-296

12. Nagafuchi, A., Tsukita, Sh. & Takeichi, M. (1993) Transmembrane control of cadherin-mediated cell-cell adheision. Seminar in Cell Biol. 14: 175-181

13. Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, Sa. & Tsukita, Sh. (1993) Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. J. Cell Biol. 123: 1777-1788

14. 月田早智子，月田承一郎 (1993) 細胞接着とチロシンキナーゼ。実験医学。増刊号『情報伝達研究の新しい展開』151-156

15. 月田早智子 (1993) 神経線維腫症 2 の原因遺伝子がコードする蛋白質。Molecular Medicine 30: 1335-1336

16. 月田承一郎，永渕昭良 (1993) 細胞接着の制御とがん浸潤・転移。nonoGiGA 2: 709-712

17. 月田承一郎 (1993) 分子細胞生物学の時代における形態学。蛋白質核酸酵素 38: 2138-2140

18. 月田承一郎 (1993) 細胞間接着制御機構と癌転移。最新医学 48: 359-366

19. 米村重信 (1993) 細胞質分裂の機構。実験医学 8: 78-80

《高次神経機構研究部門》

1. Yagi, T., Shigetani, Y., Furuta, Y., Nada, S., Okado, N., Ikawa, Y., and Aizawa, S. (1994) Fyn expression during neurogenesis in mouse embryo. Oncogene, in press.

2. Umemori, H., Sato, S., Yagi, T., Aizawa, S., and Yamamoto, T. (1994) Initial events of myelination involve Fyn tyrosine kinase signalling. Nature 367, 572-576

3. Yagi, T., Aizawa, S., Tokunaga, T., Shigetani, Y., Takeda, N., and Ikawa, Y. (1993) A role for Fyn tyrosine kinase in the suckling behaviour of neonatal mice. Nature 366, 742-745. 1,

6. 塚田晃代，八木　健　マウス遺伝子ターゲティングの実際。実験医学 12, 140-147, 1994

7. 八木　健　脳神経研究におけるジーンターゲティング法の現状。生体の科学 45, 121-125, 1994

《情報記憶研究部門》

1. Kurahashi, T. and Kaneko, A. (1993) Gating properties of the cAMP-gated channel in Toad Olfactory Receptor Cells. Journal of Physiology 466 287-302.

2. Kurahashi, T. and Yau, K.-W. (1993) Co-existence of Cationic and Chloride Components in Odorant-induced Current of Vertebrate Olfactory Receptor Cells. Nature 363 71-74.

3. Kurahashi, T and Yau, K.-W. (1994) Tale of an Unusual Chloride Current. Current Biology 4 256-258.

4. 倉橋　隆 (1993) 脊椎動物嗅細胞の情報変換電流における陽イオン成分と陰イオン成分の共存性。上原記念生命科学財団研究報告集。7, 207-209.

《高次神経性調節研究部門》

1. Voluntary and stimulus-induced attention detected as motion sensation. O. Hikosaka, S.

Miyauchi and S. Shimojo Perception, 1993, 22: 517-526

2. Focal visual attention produces illusory temporal order and motion sensation. O. Hikosaka, S. Miyauchi and S. Shimojo Vision Research, 1993, 33: 1219-1240

3. Visual attention revealed by an illusion of motion
O. Hikosaka, S. Miyauchi and S. Shimojo Neuroscience, Research, 1993, 18: 11-18

《生体システム研究部門》

1. Homma Y, Yokoyama Y, Matsuyama K, Kobayashi Y & Mori S (1993) Projection from the fastigial nucleus to brainstem and cerebellar cortex in the cat. Jpn J Physiol 43 (Suppl. 2): S243

2. Iwakiri H, Matsuyama K & Mori S (1993) Extracellular levels of serotonin in the medial pontine reticular formation in relation to sleep-wake cycle in cats: a microdialysis study. Neurosci Res 18: 157-170

3. Iwakiri H, Matsuyama K & Mori S (1993) Levels of extracellular serotonin in the pontine reticular formation changes with sleep-wake cycle in cats. Jpn J Physiol 43 (Suppl. 2): S277

4. Keller A, Weintraub D & Miyashita E (1993) Early tactile experience influences the organization of movement representation in rat motor cortex. Society for Neuroscience Abstract 19: 317. 7

5. Kobayashi Y, Matsuyama K & Mori S (1993) Postnatal development of serotoninergic neurons in the brainstem of cats. Jpn J Physiol 43 (Suppl. 2): S244

6. Mackel R & Miyashita E (1993) Nucleus Z: a somatosensory relay to motor thalamus. J Neurophysiol 69 (5): 1607-1620

7. Matsuyama K, Kobayashi Y, Takakusaki K, Mori S & Kimura H (1993) Termination mode and branching patterns of reticuloreticular and reticulospinal fibers of the nucleus reticularis pontis oralis in the cat: an anterograde PHA-L tracing study. Neurosci Res 17: 9-21

8. Matsuyama K, Kobayashi Y & Mori S (1993) Projection patterns of single pontine reticulospinal axons in the cervical and lumbar enlargements in the cat. Society for Neuroscience Abstract 19: 588. 9

9. Matsuyama K, Kobayashi Y, Takakusaki K & Mori S (1993) Descending projections from the nucleus reticularis pontis oralis in tha cat. Jpn J Physiol 43 (Suppl. 2): S244

10. Miyashita E & Mackel R (1993) Nucleus Z: a somatosensory relay to "motor" thalamus. Jpn J Physiol 43 (Suppl. 2): S234

11. Mori S, Oka T, Iwakiri H, Kobayashi Y, Matsuyama K & Takakusaki K (1993) Comparison of the executing neuronal mechanisms related to the pontine carbachol-induced and electrically-induced generalized suppression of postural muscle tone. Neurosci Res (Suppl. 18): S157

12. Mori S (1993) Motor control in relation to postural and locomotor control. In: Studies in Health Technology and Informatics. vol. 5. Electrophysiological Kinesiology. (Eds): Pedotti A. IOS press (Amsterdam) pp1-8.

13. Myoga H, Matsuyama K, Takakusaki K & Mori S (1993) Postnatal development of locomotor movement and postural reflex in neonatal rats. Jpn J Physiol 43 (Suppl. 2): S245

14. Myoga H, Iwakiri H, Oka T, Kobayashi Y & Mori S (1993) Role of serotonin on postnatal development of locomotor activities in rat. Neurosci Res (Suppl. 18): S157

15. Oka T, Iwakiri H & Mori S (1993) Pontine-induced generalized suppression of postural muscle tone in a reflexively standing acute decerebrate cat. Neurosci Res 17: 127-140

16. Oka T, Iwakiri H, Takakusaki K & Mori S (1993) Simultaneous suppression of the neck, lumbar back, forelimb and hindlimb muscles by electrical microstimulation of the pontine tegmentum in a reflexively standing decerebrate cat. Jpn J Physiol 43 (Suppl. 2): S243

17. Pavlides C, Miyashita E & Asanuma H (1993) Projection from the sensory to the motor cortex is important in learning motor skills in the monkey. J Neurophysiol 70 (2): 733-741

18. Takakusaki K, Kohyama J, Matsuyama K & Mori S (1993) Synaptic mechanisms acting on

lumbar motoneurons during postural augmentation induced by serotonin injection into the rostral pontine reticular formation in decerebrate cats. Exp Brain Res 93: 471-482

19. Takakusaki K, Matsuyama K, Kobayashi Y, Kohyama J & Mori S (1993) Pontine microinjection of carbachol and critical zone for inducing postural atonia in reflexively standing decerebrate cats. Neurosci Lett 153: 185-188

20. Takakusaki K, Matsuyama K & Mori S (1993) Spinal mechanisms of medullary induced motor inhibition in cats. Jpn J Physiol 43 (Suppl. 2): S243

21. Yokoyama T, Homma Y, Iwakiri H, Kobayashi Y, Nonaka S & Mori S (1993) Activities of intrinsic laryngeal and respiratory muscles during cough evoked by mechanical stimulation of tracheal carina. Jpn J Physiol 43 (Suppl. 2): S244

22. 本間　裕，片田彰博，小林吉史，森　茂美 (1993) ネコ大脳皮質体性感覚・運動野の脳幹に対する投射様式の解析．日生誌 (55) 478-479.

23. 茗荷秀昭，岡　哲夫，小林吉史，森　茂美 (1993) ラット神経系の生後発達におけるセロトニンの役割．日生誌 (55) 479.

24. 森　茂美（共著；板倉　徹，前田敏博編）：脳幹における感覚と運動の統合 In: 脳幹［神経科学の基礎と臨床］ブレーン出版（東京）pp 55-74.

25. 横山貴康，片田彰博，小林吉史，森　茂美 (1993) 咳・くしゃみ時の内喉頭筋・呼吸筋活動の解析．日生誌 (55) 479.

《高次液性調節研究部門》

1．Anderson ME, Inase M, Buford J, Turner RS (1993) Movement and preparatory activity of neurons pallidal-receiving areas of the monkey thalamus. In: Mano N, Hamada I, DeLong MR (eds) Role of the cerebellum and basal ganglia in voluntary movement. Excerpta Medica, Amsterdam, 163-170

2．Shima K & Tanji J (1993) Involvement of NMDA and non-NMDA receptors in motor task-re-

lated activity in the primary and secondary cortical motor areas of the monkey. Cerebral Cortex 3: 330-347

3. Tokuno H, Kimura M, Tanji J (1993) 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

4. Halsband U, Ito M, Tanji J, Freund H-J (1993) The role of premotor cortex and the supplementary motor area in the temporal control of movement in man. Brain 116: 243-266

5. Tokuno H & Tanji J (1993) Input organization of distal and proximal forelimb areas in the monkey primary motor cortex: a retrograde double labeling sutudy. J Comp Neurol 333: 199-209

6. Aizawa H, Tanji J (1993) Roles of corticocortical and thalamocortical inputs to the primary motor cortex of monkey. In: Mano N, Hamada I, DeLong MR (eds) Role of the cerebellum and Basal Ganglia in Voluntary Movement. Excerpta Medica, Amsterdam 247-251

7. Tanji J, Mushiake H & Inase M (1993) Premotor and Supplementary motor cortex in sequential motor tasks. In: Ono T, Squire DI, Perrett & Fukuda M (eds) Brain Mechanisms of Perception and Memory: From Neuron to Behavior. by. Oxford press, pp. 464-472

8. Tanji J, Hikosaka O, Yamagishi S, Ebashi S (eds) Voluntary motor control by the brain (1993) Biomedical Research Foundation, Tokyo.

9. 丹治　順 (1993) 大脳運動関連諸領野の機能特性と解剖学的・免疫組織化学的特性の対応。学術月報第46巻第5号 432-437

10. 丹治　順 (1993) 随意運動と脳の機能。筋運動制御系。星宮　望，赤澤堅造編。昭晃堂 73-105

11. 蔵田　潔，丹治　順 (1993) 随意運動の発現と運動企画。感覚統合研究。第6集。協同医書出版社

12. 丹治　順，虫明　元 (1993) 特集／随意運動の神経機構―新しい考え方―大脳運動皮質（運

動野，運動前野，補足運動野）のはたらき。BRAIN and NERVE 第45巻第7号 617-626

13. 丹治　順，嶋　啓節 (1993) 随意運動の認知的制御。神経心理学・第1巻第1号 14-22

14. 嶋　啓節，丹治　順 (1993) 特集／高次脳機能の最近の話題。運動の認知的制御とその可塑性。理学療法ジャーナル第27巻第9号 612-617

15. Inase M, Tanji J (1993) Distribution of thalamocortical neurons projecting to the primary motor cortex and terminal fields of pallidothalamic neurons in the monkey. Jpn J Physiol 43: S240

16. Tanji J & Halsband U (1993) Coding of visually guided and internally instructed motor sequences in the primate supplementary, presupplementary and premotor cortex. Can J Neurol Sci 4. S106

17. Halsband U & Tanji J (1993) Cross-cultural comparison of trajectorial learning in German and Japanese subjects. Can J Neurol Sci 4. S152

18. Shindo K, Shima K & Tanji J (1993) Distribution of thalamic cells projecting to the primaty motor cortex and the supplementary motor area. Soc Neurosci Abstract 19: 497. 16

19. Tanji J (1993) Multiple cortical motor areas: why multiple? Neurosci Res 18: S6-3

20. Tanji J & Matsuzaka Y (1993) Neuronal activity in motor areas reflecting information about what to do next. Jpn J Physiol 43: S15

21. Shima K & Tanji J & (1993) Differential involvement of NMDA and non-NMDA receptors in synaptic transmission of SMA and SI inputs to the primary motor cortex of awake monkeys. Jpn J Physiol 43: S632

22. Shindo K, Shima K & Tanji J & (1993) A multiple labeling study on thalaic projections to the primary motor cortex and the supplementary motor area. Jpn J Physiol 43: S633

23. Tanji J (1993) How does the primate brain use input to the motor cortex? Abstr. XXXII Congress Int. Union Physiol. Sci. II: 155. 2/0

24. 進藤克博，嶋　啓節，丹治　順(1993)サル大脳補足運動野の上肢領域と一次運動野の遠位及び近位上肢領域に投射する視床細胞の多重標識法による解析。日本生理学雑誌 55: 9

《高次脳機能プロジェクト》

1. Sasaki K, Gemba H, Nambu A & Matsuzaki R (1993) No-go activity in the frontal association cortex of human subjects. Neurosci Res 18: 249-252

2. Sasaki K & Gemba H (1993) Action of the cerebello-thalamo-cortical projection upon visually initiated reaction-time hand movements in the monkey. Stereotact Funct Neurosurg 60: 104-120

3. Sasaki K & Gemba H (1993) Prefrontal crotex in the organization and control of voluntary movement. *In* Brain Mechanism of Perception and Memory: From Neuron to Behavior. Ed. Ono T, Squire LR, Raichle ME, Perrett DI & Fukuda M, Oxford University Press, New York, 473-496

4. Sasaki K & Gemba H (1993) Cerebro-cerebellar interactions: For fast and stable timing of voluntary movement. *In* Role of the Cerebellum and Basal Ganglia in Voluntary Movement. Ed. Mano N, Hamada I & Delong MR, Elsevier, Amsterdam, 41-50

5. Nambu A, Yoshida S, Tanibuchi I & Jinnai K (1993) Movement-related activity in the pallido-thalamo-cortical loop. Biomed Res 14 (Suppl 1): 31-35

6. Kyuhou S & Okada YC (1993) Detection of magnetic evoked fields associated with synchronous population activities in the transverse CA1 slice of the guinea pig. J Neurophysiol 70: 2665-2668

7. Tsujimoto T, Gemba H & Sasaki K (1993) Effect of cooling the dentate nucleus of the cerebellum on hand movement of the monkey. Brain Res 629: 1-9

8. Jinnai K, Nambu A, Tanibuchi I & Yoshida S (1993) Cerebello- and pallido-thalamic pathways to area 6 and 4 in the monkey. Stereotact Funct Neurosurg 60: 70-79

9. Jinnai K, Nambu A, Yoshida S & Tanibuchi I (1993) The two separate neuron circuits through the basal ganglia concerning the preparatory or execution processes of motor control. *In* Role of the Cerebellum and Basal Ganglia in Voluntary Movement. Ed. Mano N, Hamada I & Delong MR, Elsevier, Amsterdam, 153-161

10. Yoshida S, Nambu A & Jinnai K (1993) The distribution of the globus pallidus neurons with input from various cortical areas in the monkeys. Brain Res 611: 170-174

11. 佐々木和夫 (1993) 前頭葉の事象関連電位と脳磁図。神経進歩 37: 72-81

12. 佐々木和夫，玄番央恵，南部　篤，松崎竜一 (1993) 随意運動の中枢神経機構の研究： MEG による NO-GO 電位の電源双極子推定。平成 4 年度厚生省特定疾患運動失調症調査研究班研究報告書： 74-77

13. 南部　篤，松崎竜一，玄番央恵，佐々木和夫 (1993) 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。第 8 回日本生体磁気学会大会論文集： 162-165

14. 南部　篤，佐々木和夫 (1993) 脳磁場計測によるヒトの脳機能研究。Med Imag Tech 11: 472-482

15. Sasaki K, Nambu A, Matsuzaki R & Gemba H (1993) Usefulness and limitation of MEG studies on the brain function. Jpn J Physiol 43 (Suppl 2): S28

16. Sasaki K (1993) Study on integrative function of the frontal association cortex of monkeys and humans. Neurosci Res (Suppl 18): S1

17. Sasaki K, Gemba H, Nambu A & Matsuzaki R (1993) Prefrontal activity on no-go decision. Abstracts of Advances in Biomagnetism: 158-159

18. Nambu A, Matsuzaki R, Gemba H & Sasaki K (1993) Magnetic fields in the cerebral cortex associated with visually initiated finger movement in human brain. Abstracts of Advances in Biomagnetism: 146-147

19. Nambu A, Matsuzaki R, Gemba H & Sasaki K (1993) Magnetic fields in the cerebral cortex associated with visually initiated finger movement in human subjects. Soc Neurosci Abstr 19:

20. Nambu A & Matsuzaki R (1993) Neuromagnetic responses in the primary and secondary somatosensory cortices in human subjects. Jpn J Physiol 43 (Suppl 2): S214

21. Nambu A, Matsuzaki R, Tsujimoto T & Kyuhou S (1993) Retinotopic organization of visual cortex revealed by visual evoked magnetic fields. Neurosci Res (Suppl 18): S182

22. Kyuhou S & Okada YC (1993) Magnetic fields of synchronized population activities in the presence of picrotoxin in transverse CA1 slice of the guinea pig. Abstracts of Advances in Biomagnetism: 404-405

23. Kyuhou S & Okada YC (1993) Magnetic evoked fields from the transverse CA1 hippocampal slice of the guinea pig. Soc Neurosci Abstr 19: 1466

24. Kyuhou S & Okada YC (1993) Magnetic evoked fields from the CA1 hippocampal slice of the guinea pig. Neurosci Res (Suppl 18): S236

25. Gemba H & Sasaki K (1993) Functional differences between the prefrontal cortices of left and right cerebral hemispheres in the monkey. Jpn J Physiol 43 (Suppl 2): S250

26. Gemba H, Miki N & Sasaki K (1993) Field potential change in the prefrontal cortex of the left hemisphere during learning process of reaction-time hand movement with complex tone in the monkey. Neurosci Res (Suppl 18): S165

27. Okada YC & Kyuhou S (1993) Magnetic evoked fields produced by the longitudinal CA1 and CA3 hippocampal slice of the guinea pig. Soc Neurosci Abstr 19: 1466

28. Okada YC & Kyuhou S (1993) Characteristics of the magnetic evoked field associated with neuronal activities in longitudinal slices of the guinea pig. Abstracts of Advances in Biomagnetism: 438-439

29. 玄番央恵，佐々木和夫 (1993) サルの前頭前野における機能的大脳半球非対称性。脳波と筋電図 21 (4): 352

《感覚・運動機能プロジェクト》

1. Kakigi R & Shibasaki H (1993) Scalp Topography of somatosensory evoked potentials following median and posterior tibial nerve stimulation in Down's syndrome. Brain Topography 5: 253-261.

2. Kakigi R, Oono S, Matsuda Y & Kuroda Y (1993) Pattern-reversal visual evoked potentials in Down's syndrome. Acta Neurol Scand 87: 410-415.

3. Kakigi R, Matsuda Y & Kuroda Y (1993) Effects of movement-related cortical activities on pain-related somatosensory evoked potentials following CO_2 laser stimulation in normal subjects. Acta Neurol Scand 88: 376-380.

4. Kuroda Y, Fukuoka M, Endo C, Matsui M, Kurohara K, Kakigi R & Tokunaga O (1993) Occurrence of primary biliary cirrhosis, CREST syndrome and Sjogren's syndrome in a patient with HTLV-I-associated myelopathy. J Neurol Sci 116: 47-51.

5. Kuroda Y, Ikeda A, Kurohara K, Kakigi R, Ryuh S, Kouda H, Misago N & Sugihara H (1993) Occurrence of paroxysmal synchronous EEG discharge in subcortical arterio-sclerotic encephalopathy (Binswanger's disease). Internal Medicine 32: 243-246.

6. Endo C, Kakigi R, Tachikawa N, Miyahara M & Kuroda Y (1993) Detection of a central nervous system lesion in a patient with Fisher's syndrome. Internal Medicine 32: 722-724.

7. 柿木隆介 (1993) ダウン症候群の誘発電位［1］短潜時体性感覚誘発電位，臨床脳波 35: 684-687.

8. 柿木隆介 (1993) ダウン症候群の誘発電位［2］中潜時体性感覚誘発電位，臨床脳波 35: 818-822.

9. 渡辺素子，牛山　理，松井　真，柿木隆介，黒田康夫 (1993) 著明な頭蓋内圧亢進を呈した Crow-Fukase 症候群の１例　臨床神経，33: 422-426.

10. 池田昭夫，黒田康夫，柿木隆介，大西晃夫，小田健一郎 (1993) 高度小脳萎縮を伴った遺伝性運動感覚ニューロパチーⅡ型の１例，神経内科，38: 367-373.

《自律機能プロジェクト》

1. Murakami S, Kuriki S, Fukatsu R & Takahata N (1993) Magnetic field responses to visual stimulation in human parietal association cortex. Neurosci Res 16: 225-228

2. Kamada K, Oshiro O, Takeuchi F, Kuriki S, Houkin K, Iwasaki Y & Abe H (1993) Identification of central sulcus by using somatosensory evoked magnetic field and brain surface MR images: three dimensional projection analysis. J Neurol Sci 116: 29-33

3. Kobayashi T, Kuriki S & Takeuchi F (1993) A simulation study on the dynamic characteristics of neuromagnetic fields using single-moving-dipole and two-fixed-dipoles models. Phys Med Biol 38: 1271-1282

4. Kamada K, Takeuchi F, Kuriki S, Oshiro O, Houkin K & Abe H (1993) Functional neurosurgical simulation with brain surface magnetic resonance images and magnetoencephalography. Neurosurg 33: 269-273

5. Oshiro O, Murakami S, Kuriki S, Fukatsu R & Takahata N (1993) Localization of multiple current dipolar sources of visually evoked fields in human parietal cortex. Abst 9th Int Conf on Biomagnetism: 64-65

6. Kuriki S & Takeuchi F (1993) Localizaion of auditory cortical sources from multichannel-recorded magnetic fields elicited by monosyllable speech sounds. Abst 9th Int Conf on Biomagnetism: 84-85

7. 栗城真也 (1993) 聴覚誘発 MEG。Clin Neurosci 11: 200-202

8. 松島純一，藤村　裕，林　光夫，永橋立望，酒井　昇，犬山征男，栗城真也，伊福部達 (1993) 耳鳴患者への聴性誘発脳磁界測定の応用。Audiol Japan 36: 182-190

9. 福田恵子，栗城真也，竹内文也 (1993) 誘発脳磁界計測における重み付き加算法による雑音低減の検討。医用電子と生体工学 31: 239-244

10. 栗城真也，小林哲生 (1993) 聴覚誘発脳磁界における単一および 2 双極子解析。Med Imag Technol 11: 538-543

11. 沖田善光，竹内文也，平田恵啓，小林哲生，栗城真也 (1993) 37チャンネル同時計測誘発脳磁界における雑音を考慮した信号源の動的解析。音響学会聴覚研究会資料 H93-29: 1-7

12. 小林哲生，竹内文也，栗城真也 (1993) 聴覚誘発脳磁界の時空間的解析とシミュレーション。電子情報通信学会技術研究報告 MBE93-41: 23-28

13. 大和田徹，加藤和夫，小林哲生，栗城真也 (1993) 両眼視野の闘争・融合過程間に見られる自発脳波リズムの空間的差異。生体・生理工学シンポジウム論文集： 53-58

14. 関原謙介，竹内文也，栗城真也 (1993) 誘発脳磁界信号源推定における Brain Noise の影響除去。生体・生理工学シンポジウム論文集： 215-220

15. 栗城真也，川端文雄，平田恵啓 (1993) ヒト後頭，頭頂葉における光刺激脳磁界の信号源解析。生体・生理工学シンポジウム論文集： 239-242

《生体機能検査室》

1. Suzuki T, Naruse S, Yanaihara N (1993) The inhibitory effect of octreotide on exocrine pancreatic secretion in conscious dogs. Pancreas 8: 226-232.

2. Hayakawa T, Kondo T, Shibata T, Kitagawa M, Sobajima H, Sakai Y, Ishiguro H, Tanikawa T, Nakae Y, Naruse S (1993) Longitudinal changes of plasma pancreatic enzymes and hormones in experimental pancreatolithiasis in dogs. Dig Dis Sci 38: 2098-2103.

3. Naruse S, Suzuki T, Ozaki T, Nokihara K (1993) Vasodilator effect of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) on femoral blood flow in dogs. Peptides 14: 505-510.

4. Wray V, Kakoschke C, Nokihara K, Naruse S (1993) Solution structure of pituitary adenylate cyclase activating peptide by nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochemistry 32: 5832-5841.

5. Li M, Hoshino M, Zheng L, Naruse S, Yanaihara C, Ohshima K, Iguchi K, Mochizuki T, Yanaihara N (1993) Helodermin analogues: structure-function studies of helodermin. Biomed. Res. 14 (suppl 3): 61-69.

6. Naruse S, Takagi T, Kato M, Ozaki T (1993) Relationship between gastric blood flow and motility. Gastrointestinal Function: regulation and disturbances. Nagao F, et al. ed. Excerpta Medica, Tokyo, pp45-55.

7. Wray V, Nokihara K, Naruse S (1993) Solution structure of PACAP by ^{1}H NMR spectroscopy, distance geometry, and molecular dynamic calculations. Peptides Chemistry 1992. Yanaihara N ed. Escom Science Publishers BV. Leiden. pp. 220-223.

8. Nokihara K, Naruse S, Ando E, Wray V (1993) Synthesis and structure-activity relationship of PACAP-VIP related peptides. Peptides 1992. Schneider and Eberle ed. 1993 Escom Science Publishers BV, Leiden, pp723-724.

9. 成瀬　達 (1993) 食後の消化管粘膜における血流増加はなぜ起こるか。医学のあゆみ 156: 154-157.

10. 成瀬　達 (1993) Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP). 肝胆膵 27: 969-975.

11. 鈴木貴祐，成瀬　達，矢内原昇 (1993) PACAP の膵酵素分泌作用。消化管ホルモンXII，医学図書出版，pp. 147-152.

12. 成瀬　達 (1993) 食物摂取による血流の変化と胃運動。急性胃粘膜病変—その基礎と臨床，医学図書出版 pp. 194-199.

《組織培養標本室》

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

2. Furuya S, Furuya K (1993) Characteristics of cultured subepithelial fibroblasts of rat duodenal villi. Anatomy & Embryology 187: 529-548

《磁気共鳴装置室》

1．Yoshida T & Watari H (1993) ^{31}P-MRS study of the time course of energy metabolism during exercise and recovery. Eur J Appl Physil 66: 494-499

2．Yoshida T & Watari H (1993) Metabolic consequences during interval exercaise in long distance runners. Eur J Appl Physiol 67: 261-265

3．Yoshida T & Watari H (1993) Changes in intramuscular pH during repeated exercise. Eur J Appl Physiol 67: 274-278

4．吉田敬義，亘　弘 (1993) ^{31}P-MRS よりみたスポーツ選手の筋エネルギー代謝の特徴。第3回健康スポーツ医科学フォーラム講演集 107-112

5．吉田敬義，亘　弘 (1993) 運動時の ^{31}P-MRS の Pi ピーク分裂と筋 pH の動態について。第8回生理・生体工学シンポジウム論文集 275-280

6．吉田敬義，亘　弘 (1993) 核磁気共鳴装置による運動中の筋代謝の非観血的および連続測定 Innervision 8: 63-64

7．Koizuka I, Seo R, Sano M, Matsunaga T, Murakami M, Seo Y & Watari H (1993) High-resolution MRI of the human inner ear. Proceedings of 17th Barany Society Meeting: 96-98

8．Yoshida T & Watari H (1993) Effect of hypoxia on muscle metabolites during exercise studied by ^{31}P-MRS. Jpn J Physiol 43 (Suppl 2) S145

9．吉田敬義，亘　弘 (1993) ^{31}P-MRS による運動中の Pi ピーク分裂と筋線維タイプ動員の関連について。日本生理学雑誌 55: 468-469

《超高圧電子顕微鏡室》

1．T. Arii, N. Yoshimura and Y. Kamiya (1993) Intensity Measurement of high voltage electron microscopic images by YAG-TV recording systems. J. Electron Microsc. 42: 55-63.

2．M. Taniguchi, N. Watanabe, S. Aoki, H. Kihara, S. Phansiri, T. Taniguchi and T. Arii (1993) Comparative studies on cultured plant protoplasts using X-ray and optical microscopes and high voltage electron microscope (Abstract) 4-th Int. Conf. on X-ray Microscopy (Moscow)

3．谷口美恵子，依田　功，村松　聡，荒金宏臣，谷口　武，有井達夫，渡辺紀夫，青木貞雄，木原　裕 (1993) 植物培養細胞の超高圧電子顕微鏡及びX線顕微鏡による観察。第31回生物物理学会予稿集 S172. 名古屋

《動物実験施設》

1．Naruse S., Suzuki T. Ozaki T. and Nokihara K. (1993) Vasodilator effect of pituitary adenylatecyclase activating polypeptide (PACAP) on femoral blood flow in dogs. Peptides 14: 505-510

2．Naruse S. and Ozaki T. (1993) The effect of pituitary adenylatecyclase activating polypeptide (PACAP) on isolated guinea pig gallbladder. Jpn. J. Physiol. 43. S141

3．大森俊明，竹田康男，竹田亮祐，桑原厚和，尾崎　毅，矢内原昇 (1993) 5-$HT_{3,4}$ レセプター拮抗剤 (ICS 205-903) によるサブスタンスP誘発モルモット回腸輪走筋収縮の抑制。消化管ホルモン（Ⅻ）381-387

《江橋研究室》

1．時空雑感　江橋節郎　シンポジウム「時間・空間」―簗瀬睦男先生退任記念― (1992) 77-79

2．江橋節郎　カルシウム物語（Ⅵ）カルシウムの解放　最新医学 **48,** (1993) 452-454

3．江橋節郎　カルシウム物語（Ⅵ）エピローグ　最新医学 **48,** (1993) 610-614

4．江橋節郎　世界の曲り角　蛋白質・核酸・酵素，**38,** 31-33 (1993)

5．Ebashi S. (1993) From the Relaxing Factor to Troponin, Biomedical Research **14** Supplement

2, 1-7

6. Kuwayama, H., Suzuki, M., Inoue, A., Kobayashi, H., Tanaka, T., Mikawa, T., Sugiura M. and Ebashi, S. (1993) Amino Acid Sequence of Myosin Light Chain Kinase From Bovine Stomach with Special References to its Actin Binding Domain, Biomedical Research **14,** Supplement 2, 113-116

7. Ebashi, S. (1993) Phosphorylation of Myosin Light Chain is not the Main Activation Mechanism of Smooth Muscle Contraction, Biomedical Research **14,** Supplement 2, 117-119

b．学会発表

〔目　　次〕

神経化学研究部門 …… 163
超微小形態生理研究部門 …… 164
細胞内代謝研究部門 …… 167
生体膜研究部門 …… 170
機能協関研究部門 …… 171
能動輸送研究部門 …… 173
神経情報研究部門 …… 175
液性情報研究部門 …… 176
高次神経機構研究部門 …… 179
情報記憶研究部門 …… 179
高次神経性調節研究部門 …… 180
生体システム研究部門 …… 181
高次液性調節研究部門 …… 182
高次脳機能プロジェクト …… 183
感覚・運動機能プロジェクト …… 184
自律機能プロジェクト …… 185
生体機能検査室 …… 186
組織培養標本室 …… 187
磁気共鳴装置室 …… 187
超高圧電子顕微鏡室 …… 190
動物実験施設 …… 190
江橋研究室 …… 191

学　会　発　表

《神経化学研究部門》

1．小幡邦彦 (1993. 2) 神経細胞の活動と c-fos の役割。平成 4 年度基礎生物学研究所シンポジウム（岡崎）

2．丸山　敬，宇佐美美穂子，針ヶ谷和花子，斎藤祐見子，西道隆臣，熊谷義弘，川島誠一 (1993. 3) 遺伝子導入による培養細胞でのアルツハイマー病アミロイド前駆体蛋白質の代謝の検討。日本薬理学会総会（横浜）

3．小幡邦彦，橋本隆紀 (1993. 4) けいれんによる海馬の遺伝子発現。第70回日本生理学会大会（山梨）

4．小幡邦彦 (1993. 4) 研究所における生理学者養成。第70回日本生理学会大会（山梨）

5．小幡邦彦，関野祐子，谷藤　学 (1993. 4) 海馬スライスにおける多方向性興奮伝播の光学計測。第70回日本生理学会大会（山梨）

6．小幡邦彦 (1993. 8) 神経系の遺伝子発現と可塑性。文部省重点領域研究「脳の高次情報処理」第 1 回夏のワークショップ（長野）

7．丸山　敬，石浦章一，木南秀紀，川島誠一，小幡邦彦 (1993. 10) プロテアーゼ cDNA 導入によるアミロイド前駆体の代謝の分析。日本生化学会大会（東京）

8．西道隆臣，横田正幸，丸山　敬，針ヶ谷和花子，斎藤祐見子，鈴木紘一，谷　栄一，矢島由紀子，川島誠一 (1993. 10) 蛋白質分解反応を捕捉する。日本生化学会大会（東京）

9．田川一彦，神山和子，丸山　敬，土屋隆英，石浦章一，鈴木紘一 (1993. 10) アミロイド前駆体蛋白質 (APP) の限定分解の特異性。日本生化学会大会（東京）

10. 宇佐美美穂子，佐原成彦，丸山　敬，吉川和明，吉岡　昇，森　　啓 (1993. 10) β/A4 タンパク質の細胞外への分泌におけるシグナル配列の役割について。日本神経化学会大会（大阪）

11. Stork O Hashimoto T and Obata K (1993. 11) Regulation of tyrosine hydroxylase gene-ex-

pression in the rat substantia nigra, pars reticulata. The 23rd Annual Meeting for The Society for Neuroscience (Washington D. C.)

12. Sekino Y Tanifuji M and Obata K (1993. 11) Delayed signal conduction from CA3 to CA1 via the CA2 region in rat hippocampal slices revealed by optical recordings. The 23rd Annual Meeting for The Society for Neuroscience (Washington D. C.)

13. Yamagata Y Obata K Greengard P and Czernik AJ (1993. 11) The in situ phoshporylation state of synapsin I is increased in septal kindling. The 23rd Annual Meeting for The Society for Neuroscience (Washington D. C.)

14. 小幡邦彦 (1993. 12) カイニン酸とピロカルピンけいれんによるラットの水迷路学習障害と海馬錐体細胞死。第17回日本神経科学大会（名古屋）

《超微小形態生理研究部門》

1．村上政隆，瀬尾芳輝 (1993. 2) 細胞内液における Na^+ イオン，K^+ イオンの動的挙動。重点領域研究公開シンポジウム「溶液の非平衡課程の分子論的アプローチ」（名古屋）

2．曽我美勝，恵良聖一，高崎昭彦，桑田一夫，中上　寧，江尻和隆，梶原孝彦，亘　　弘 (1993. 4) タンパク質溶液，ゲル状態における水構造の研究。第70回日本生理学会大会（山梨）

3．曽我美勝，恵良聖一，桑田一夫，高崎昭彦，中上　寧，江尻和隆，亘　　弘 (1993. 4) ウシ・メルカプトアルブミン (BMA) の molten-globule state. 第70回日本生理学会大会（山梨）

4．恵良聖一，曽我美勝，桑田一夫，中上　寧，高崎昭彦，梶原孝彦，中村浩二，亘　　弘 (1993. 4) 500MHz ^{1}H-NMR による葉歯牙組織内の水構造の研究。第70回日本生理学会大会（山梨）

5．亘　　弘 (1993. 4) スペクトルにより求めた相関関数による分子の状態解析。第70回日本生理学会大会（山梨）

6．恵良聖一，曽我美勝，中村浩二，桑田一夫，中上　寧，高崎昭彦，亘　　弘 (1993. 4) 500MHz ^{1}H-NMR によるマウス水晶体内の水構造の研究。第70回日本生理学会大会（山梨）

7. Seo Y, Lee JH & Murakami M (1993. 4) Relaxation of Na ion in agar gel analysed by ^{23}Na DQF and pfge NMR. 第70回日本生理学会大会（山梨）

8. 村上政隆，石川　透，瀬尾芳輝 (1993. 4) アンモニウムーパルス実験中のアンモニウム及び K^+輸送。第70回日本生理学会大会（山梨）

9. 村上政隆 (1993. 6) 細胞内 Na^+, K^+の動的挙動。日本化学会東北支部第114回常会（福島）

10. Nakamura K, Kuwata K, Era S, Sogami M, Sato S, Kato K, Imai H & Watari H (1993. 8) ^1H-NMR studies on water structure in rabbit knee articular cartilage. 32nd Congress Int Union Physiol Sci Abstract 363. 4 (Glasgow)

11. Era S, Nakamura K, Sogami M, Kuwata K, Kato K, Imai H & Watari H (1993. 8) ^1H-NMR studies on water structure in soft contact lens (SCL) and mouse lens. 32nd Congress Int Union Physiol Sci Abstract 363. 5 (Glasgow)

12. Sogami M, Era S, Kato K, Kuwata K, Takasaki A, Nakagami Y, Ejiri K & Watari H (1993. 8) ^1H-NMR studies on dynamic water structure in hepatic cells. 32nd Congress Int Union Physiol Sci Abstract 363. 6 (Glasgow)

13. Murakami M, Ishikawa T, Seo Y (1993. 8) Contribution of transporters to total Na^+ handling during secretion by rat mandibular salivary gland. 32nd Congress Int Union Physiol Sci Abstract 93. 20 (Glasgow)

14. Seo Y, Ammer U, Ishikawa T & Murakami M (1993. 8) Application of ^{19}f pulsed fielded gradient NMR to discriminate ^{19}F labelled substances in intra- and extracellular space. 12th Ann Meet Soc Magn Reson Med Abstract 611 (New York)

15. Steward MC, Seo Y, Larcombe-McDouall JB & Murakami M (1993. 8) Cell volume changes in perfused tissues measured by diffusion-weighted ^1H spectroscipy. 12th Ann Meet Soc Magn Reson Med Abstract 1154 (New York)

16. Era S, Sogami M, Nakamura K, Takasaki S, Kuwata K, Kato K & Watari H (1993. 8) Field dependence of magnetization transfer contrast imaging in normal human brain. 12th Ann Meet Soc Magn Reson Med Abstract 1292 (New York)

17. Era S, Sogami M, Nakamura K, Takasaki A, Kuwata K, Kato K & Watari H (1993. 8) Cross-relaxation studies on water structure in synthetic polymer gels — basic studies on the phantom for magnetic resonance imaging. 12th Ann Meet Soc Magn Reson Med Abstract 1293 (New York)

18. Seo Y, Ammer U, Ishikawa T & Murakami M (1993. 9) Organic acid transport of red blood cells measured by ^{19}F pulsed fielded gradient NMR. 日本生物物理学会第31回年会（名古屋）

19. 瀬尾芳輝，ウテアンマ，石川　透，村上政隆 (1993. 9) パルス磁場勾配 NMR 法を用いた細胞内含 ^{19}F 化合物の測定。第21回日本磁気共鳴医学会大会（筑波）

20. 曽我美勝，惠良聖一，桑田一夫，高崎昭彦，恵良田友樹，田崎　明，江尻和隆，梶原孝彦，加藤一夫，中村浩二，亘　　弘 (1993. 9) ウシ血漿アルブミン溶液，ゲル状態における分子間交差緩和現象の研究—交差緩和イメージングの基礎研究。第21回日本磁気共鳴医学会大会（筑波）

21. 惠良聖一，中村浩二，高崎昭彦，曽我美勝，亘　　弘 (1993. 9) 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Ⅱ。第21回日本磁気共鳴医学会大会（筑波）

22. 吉崎和男，早野尚志，平川和文，森本武利，亘　　弘 (1993. 9) NMR 画像測定法の基礎的検討。日本生物物理学会第31回年会（名古屋）

23. 村上政隆，石川　透，瀬尾芳輝 (1993. 9) 塩化アンモニウム投与による唾液腺 K^+ 輸送機構の解析。日本生物物理学会第31回年会（名古屋）

24. 石川　透，村上政隆，瀬尾芳輝 (1993. 9) ラット灌流顎下腺におけるカルシウム依存性血管側外向きKイオン輸送。日本生物物理学会第31回年会（名古屋）

25. 曽我美勝，惠良聖一，桑田一夫，高崎昭彦，恵良田知樹，江尻和隆，梶原孝彦，中村浩二，加藤一夫，亘　　弘 (1993. 9) ^1H-NMR によるタンパク質の溶液→ゲル変換における水構造変化の研究。日本生物物理学会第31回年会（名古屋）

26. 曽我美勝，惠良聖一，桑田一夫，高崎昭彦，江尻和隆，梶原孝彦，中村浩二，亘　　弘 (1993. 9) 酸性側におけるヒト血清アルブミン構造転移の研究。日本生物物理学会第31回年会（名古屋）

27. Seo Y (1993. 10) Anisotropic motion of Na^+ in red blood cells and its location. 第 3 回国際ワークショップ「細胞内外の Na の分子環境」(岡崎)

28. Murakami M, Ishikawa T & Seo Y (1993. 10) Contribution of transporters to total Na^+ handling during secretion by rat mandibular salivary gland. 第 3 回国際ワークショップ「細胞内外の Na の分子環境」(岡崎)

29. Yoshizaki K, Arizono N, Hayano T, Ito H & Watari H (1993. 10) ^{1}H-NMR study on histamine secretion and lacate production in mast cells. 第 3 回国際ワークショップ「細胞内外の Na の分子環境」(岡崎)

30. Era S, Sogami M, Takasaki A, Kuwata K, Ejiri K, Kajihara T, Nakamura K & Watari H (1993. 10) Structural transition of human serum albumin in the acidic region: the N → F and F → E transitions. 第 3 回国際ワークショップ「細胞内外の Na の分子環境」(岡崎)

31. Sogami M, Era S, Takasaki A, Kuwata K, Erata T, Tasaki A, Kato K, Ejiri K, Kajihara T, Nakamura K & Watari H (1993. 10) Intermolecular cross-relaxation in bovin plasma albumin gel and solution states: basic studies on magnetization transfer contrast (MTC) imaging. 第 3 回国際ワークショップ「細胞内外の Na の分子環境」(岡崎)

32. 瀬尾芳輝, ウテアンマ, 石川　透, 村上政隆 (1993. 11) パルス磁場勾配 NMR 法による細胞内含 ^{19}F 化合物の制限拡散の解析。第32回 NMR 討論会 (東京)

33. 曽我美勝, 恵良聖一, 桑田一夫, 高崎昭彦, 恵良田知樹, 田崎　明, 江尻和隆, 梶原孝彦, 加藤一夫, 中村浩二, 亘　　弘 (1993. 11) ウシ血漿アルブミン溶液, ゲル状態における分子間交差緩和現象の研究— Magnetization Transfer Contrast (MTC) Imaging の基礎的研究。第32回 NMR 討論会 (東京)

《細胞内代謝研究部門》

1. Kanno T & Habara Y (1993) Recurrent Ca^{2+} tide as an intra- and intercellular signal. In "Calcium Regulated Cellular Activities" L-21

2. Busik J, Habara Y, Maruyama T & Kanno T (1993) Inhibitory effect of SK & F 96365 on

Ca^{2+} and secretory responses in rat pancreatic acinar cells. Jpn J Physiol 43, suppl. 2: S43

3. Ikei N, Busik J, Habara Y & Kanno T (1993) Inhibitory effect of procaine on stimulus-secretion coupling in rat pancreatic acini. Jpn J Physiol 43, suppl. 2: S46

4. Warashina A, Yamaguchi K, Busik J, Habara Y & Kanno T (1993) Origin of calcium to cause spontaneous oscillation of the intracellular free calcium concentration in rat adrenal medullary cells. Jpn J Physiol 43, suppl. 2: S65

5. Habara Y & Kanno T (1993) $[Ca^{2+}]_c$ gradient reverses depending on dose of secretagogues and preparations in rat pancreatic acinus. Abstract of XXXII Congress of the International Union of Physiological Sciences (Sunday) P112

6. Kanno T & Habara Y (1993) Role of $[Ca^{2+}]_c$ dynamics in sustaining responses in pancreatic acinar cells. Abstract of XXXII Congress of the International Union of Physiological Sciences (Tuesday) P159

7. Kanno T, Habara Y, Warashina A & Busik J (1993) Spatial and temporal $[Ca^{2+}]_c$ dynamics in chromaffin cells of rat and guinea pig. 7th International Symposium on Chromaffin Cell Biology and Pharmacology

8. Kondo T, Habara Y, Kanno T & Kano E (1993) Thermosensitization and modification of cytosolic calcium concentration by verapamil and diliasem in mouse mammary carcinoma cells. Extended Abstract of Eighth International Conference on Chemical Modifiers of Cancer Treatment p215-p216

9. Kondo T, Kano E, Habara Y & Kanno T (1993) Enhancement of cell killing by combined treatments with hyperthermia and TMB-8 in mouse mammary carcinoma FM3A cells. J Radia Res 34: 355

10. Kanno T & Habara Y (1993) Recurrent Ca^{2+} spikes as intracellular signal for secretion in pancreatic acinar cells and paraneurons. International Conference on Gut Hormone

11. Kanno T, Habara Y & Busik J (1993) Stimulus-secretion coupling in the gastro-entero-pancreatic paraneurons and in the pancreatic acinar cell. International Conference on Gastrointes-

tinal Hormones and Gatrointestinal Motility

12. Busik Julia, 葉原芳昭, 菅野富夫 (1993) クロム親和性細胞の刺激・放出連関, SK & F 96365 による解析。生理研研究会『クロム親和細胞：分泌現象の神経性調節』生理研年報 印刷中

13. 葉原芳昭, 菅野富夫 (1993) 膵腺房細胞分泌反応に及ぼすクロロブタノールの作用。生理研研究会『エネルギー代謝と細胞内シグナル』生理研年報 印刷中

14. 葉原芳昭, 菅野富夫 (1993) 生理的分泌反応に IP_3 とカルシウム動員は無関係か。生理研研究会『膵臓を中心とした臓器相関』生理研年報 印刷中

15. 葉原芳昭, 菅野富夫 膵腺房細胞のカルシウムイオン動態：局所投与法による検討。第116回日本獣医学会

16. 山口賢一, 葉原芳昭, 藁科 彬, 菅野富夫 (1993) 副腎皮質ホルモン分泌調節機構における細胞内カルシウムイオン動態の意義。生理研研究会『膵臓を中心とした臓器相関』生理研年報 印刷中

17. 近藤 隆, 葉原芳昭, 菅野富夫 (1993) 温熱処理による細胞致死効果と細胞内カルシウムイオン濃度の変化。生理研研究会『膵臓を中心とした臓器相関』生理研年報 印刷中

18. 寺川 進, 桜井孝司, ジュリア・ブシク, 葉原芳昭, 菅野富夫 (1993) ビデオマイクロスコピーによる膵臓腺房細胞の開口分泌解析。日本生理学雑誌 55: p503

19. 近藤 隆, 加納永一, 葉原芳昭, 菅野富夫 (1993) カルシウム代謝阻害剤による温熱細胞致死効果の増強に関する研究。日本ハイパーサーミア学会誌 9: p211

20. 近藤 隆, 加納永一, 葉原芳昭, 菅野富夫 (1993) TMB-8 による温熱細胞致死効果の増強に関する研究。第36回日本放射線影響学会講演要旨集 p260

21. 井内裕満, 佐藤洋一, 小野一幸 (1993) ラット膀胱の CGRP および NPY 免疫反応陽性神経の生後発達について。解剖学雑誌 68: p249

22. Satoh Y, Oomori Y, Ishikawa K & Ono K (1993) Myoepithelial cell configuration in various

exocrine glands of guinea pigs. 解剖学雑誌 68: p764

23. Oomori Y, Ishikawa K, Satoh Y & Ono K (1993) Immunohistochemical study of tyrosine hydroxylase and dopamine β-hydroxylase immunoreactivities in the adult rat pancreas. 解剖学雑誌 68: p769

《生体膜研究部門》

1. Furuya S, Furuya K & Nakayama T (1993. 3) The structure and function of cultured subepithelial fibroblasts of rat intestinal villi. Conference on Biological Structure. Joint Annual Meeting of American Association of Anatomists and Japanese Association of Anatomists (San Diego)

2. Furuya K, Enomoto K & Yamagishi S (1993. 8) Mechanically and chemically induced calcium signals in cultured mammary epithelial cells. 32nd Congress of IUPS (Glasgow)

3. Yamagishi S, Tsutsui I & Furuya K (1993. 8) The Emergence of the chloride conductance by intracellular calcium and some anions in squid giant axons. 32nd Congress of IUPS (Glasgow)

4. Morimoto K, Kukita F & Yamagishi S (1993. 8) Effects of cations on calcium-activated potassium channel. 32nd Congress of IUPS (Glasgow)

5. Kato K, Tsutsui I, Ozaki T & Yamagishi S. (1993. 8) Gradual changes in contractile responses in the guinea-pig vas deferens. 32nd Congress of IUPS (Glasgow)

6. Enomoto K, Furuya K, Maeno T & Yamagishi S (1993. 3) Mechanically induced calcium response in mammary epithelial cells. The 18th Seiriken Conference "Calcium Regulated Cellular Activities" (岡崎)

7. Yamaguchi K & Furuya K (1993. 3) Regulation of neurite-outgrowth by intracellular calcium in cultured mammalian neuron. The 18th Seiriken Conference "Calcium Regulated Cellular Activities" (岡崎)

8. Tsutsui I & Ohkawa T (1993. 3) L-type Ca^{2+} channel in algal plant chara corallina. The 18th

Seiriken Conference "Calcium Regulated Cellular Activities" (岡崎)

9. 榎本浩一, 古家喜四夫, 山岸俊一, 前野　巍 (1993. 4) 乳癌細胞の機械的刺激伝達とオリゴADP リボースの放出。第70回日本生理学会大会 (甲府)

10. 山岸俊一, 筒井泉雄 (1993. 4) 細胞内溶液条件による神経膜 C1 チャネルの発現とその制御。第70回日本生理学会大会 (甲府)

11. 加藤健一, 筒井泉雄, 山岸俊一 (1993. 4) 細胞内カルシウムストアによる平滑筋の持続性収縮の調節。第70回生理学会大会 (甲府)

12. 榎本浩一, 古家喜四夫, (1993. 10) 上皮細胞間の機械的刺激反応の伝達。日本生物物理学会第31回年会 (名古屋)

13. 筒井泉雄, 山岸俊一 (1993. 10) イカ巨大神経 C1 チャネルに対する細胞内 Ca の効果。日本生物物理学会第31回年会 (名古屋)

14. 久木田文夫, 望月一人, 広川貴次, 諏訪牧子, 美宅成樹 (1993. 10) ナトリウムチャネルの立体構造予測。日本生物物理学会第31回年会 (名古屋)

15. 石井　健, 坂田美和, 久木田文夫, 美宅成樹 (1993. 10) バクテリオロドプシンとナトリウムチャネルに対する尿素, 塩酸グアニジンの効果。日本生物物理学会第31回年会 (名古屋)

《機能協関研究部門》

1. Okada Y & Kubo M (1993) Volume-regulatory Cl^- channels in human intestinal epithelial cells. XXXII Congress of The International Union of Physiological Sciences. Abstracts for Sunday Session. 65

2. Tatsuta H, Tsuji K, Ueda S, Morishima S & Okada Y (1993) Modulation of inactivation kinetics of voltage-gated K^+ currents by arachidonic acid and Ca^{2+} in guinea pig villus enterocytes. XXXII Congress of The International Union of Physiological Sciences. Abstracts for Monday Session. 65

3. Hazama A, Hager K, Kwon H & Loo DDF (1993) Kinetics and specificity of cloned renal Na^+ /myoinositol cotransporter (SMIT). FASEB J 7: A575

4. Tsuura Y, Ishida H, Horie M, Okada Y & Seino Y (1993) Impaired glucose sensitivity of ATP-sensitive K^+ channels in β cells of a genetic model of type 2 diabetes. Jpn J Physiol 43 (Supplement 2) S56

5. Kitano T, Hazama A, Sugiyama H & Okada Y (1993) Volume-sensitive cation channels in mouse B-lineage cells. Jpn J Physiol 43 (Supplement 2) S60

6. Hayashi S, Horie M, Tsuura Y, Ishida H, Seino Y & Okada Y (1993) Disopyramide blocks ATP-sensitive K^+ channels and enhances insulin release in pancreatic β-cell. Jpn J Physiol 43 (Supplement 2) S65

7. Kajita H, Tatsuta H, Ueda S, Urade Y, Okada T & Okada Y (1993) Coupling of endothelin B receptor to maxi chloride channels in gastric parietal cells of guinea pig. Jpn J Physiol 43 (Supplement 2) S66

8. Kubo M, Morishima S, Oiki S & Okada Y (1993) Regulation of volume-sensitive Cl^- currents by ATP through non-hydrolytic binding in an intestinal eqithelial cell line. Jpn J Physiol 43 (Supplement 2) S71

9. Morishima S, Horie M, Matsumori A, Sasayama S & Okada Y (1993) Fast inactivating outward currents in newborn rat ventricular myocytes. Jpn J Physiol 43 (Supplement 2) S87

10. Yuzuki Y, Horie M, Sasayama S & Okada Y (1993) Methylxanthine-activated maxi-cation channels in newborn rat ventricular myocytes. Jpn J Physiol 43 (Supplement 2) S87

11. Tominaga M, Horie M, Matsumori A, Sasayama S & Okada Y (1993) Glibenclamide inhibits cardiac A-kinase-dependent Cl^- currents. Jpn J Physiol 43 (Supplement 2) S88

12. Suzuki H, Horie M, Matsumori A, Sasayama S & Okada Y (1993) Activation of Na-Ca exchanger by caffeine in hamster cardiac myocytes. Jpn J Physiol 43 (Supplement 2) S98

13. Makita T, Horie M, Sasayama S & Okada Y (1993) Modulation of cardiac adenylate cyclase

activity by the basal activity of GTP-binding protein. Jpn J Physiol 43 (Supplement 2) S165

14. Kato S, Ishida H, Tsuura Y, Okada Y & Seino Y (1993) Increased L-type voltage-dependent calcium currents of the β cells in NIDDM model rats. Jpn J Physiol 43 (Supplement 2) S287

15. Oiki S, Koeppe RE II & Andersen OS (1993) Gating mechanism of voltage-dependent gramicidin channels. The 19th Taniguchi International Symposium in Biophysics Towards Molecular Biophysics of Ion Channels, 29-30

16. 老木成稔 (1993) 電位依存性グラミシジン・チャネルのゲーティング分子機構。生物物理 33: S52

《能動輸送研究部門》

1．高井義美 (1993. 4) 侵襲と細胞の反応機構。第93回日本外科学会総会シンポジウム。

2．貝淵弘三，佐々木卓也，田中一馬，白瀧博通，高井義美 (1993. 4) 低分子量G蛋白質と細胞機能。第70回日本生理学会大会シンポジウム。

3．佐々木卓也，貝淵弘三，田中一馬，白瀧博通，高井義美 (1993. 10) *ras* スーパーファミリーの機能と作用機構。第52回日本癌学会総会シンポジウム。

4．高井義美 (1993. 10) 細胞増殖のシグナル伝達機構。第66回日本生化学会大会シンポジウム。

5．黒田真也，清水一也，織田　聡，中西宏之，貝淵弘三，高井義美 (1993. 10) *Ras* の活性化機構と作用機構。第46回日本細胞生物学会大会シンポジウム。

6．白瀧博通，貝淵弘三，佐々木卓也，高井義美 (1993. 12) *Rab* と細胞内小胞輸送。第46回日本細胞生物学会大会シンポジウム。

7．高井義美，貝淵弘三，佐々木卓也，田中一馬，白瀧博通，中西宏之 (1993. 12) *Ras* と *Rho* の機能と作用機構。第16回日本分子生物学会年会シンポジウム。

8．白瀧博通，貝淵弘三、佐々木卓也，田中一馬，中西宏之，高井義美 (1993. 12) *Rab*3A-

Rabphilin-3A 系と神経伝達物質の放出機構。第16回日本分子生物学会年会シンポジウム。

9. 高井義美 (1993. 12) *Ras* スーパーファミリーの機能と作用機構。平成 5 年度日本生化学会近畿支部シンポジウム「細胞の増殖・分化・死のメカニズム」

10. 高井義美 (1993. 1) G 蛋白質とシグナル伝達。千里ライフサイエンスセミナー「細胞におけるシグナル伝達」

11. 高井義美 (1993. 8) ホルモンの作用機構。第136回関西ホルモン同好会。

12. 黒田真也，清水一也，増田忠之，織田　聡，貝淵弘三，高井義美 (1993. 10) *ras* p21 の標的蛋白質 (*ras* p21-dependent ERK kinase stimulator: REKS) の同定と部分精製。第52回日本癌学会総会。

13. 織田　聡，貝淵弘三，黒田真也，清水一也，高井義美 (1993. 10) *smg* GDS と *ras* GRF による *ras* p21 の活性化機構。第52回日本癌学会総会。

14. 高石健司，佐々木卓也，加藤正樹，矢持　亘，西山隆之，黒田真也，高井義美 (1993. 10) *rho* p21 と HGF による細胞運動の制御。第52回日本癌学会総会。

15. 西山隆之，佐々木卓也，高石健司，黒田真也，加藤正樹，高井義美 (1993. 10) *rho* p21 と細胞増殖因子による細胞膜の ruffling の制御。第52回日本癌学会総会。

16. 中西宏之，貝淵弘三，織田　聡，高井義美，松岡耕二，竹縄忠臣 (1993. 10) Ash/Grb2 とその結合蛋白質 (mSos) による *Ras* の活性化機構。第66回日本生化学会大会。

17. 加藤正樹，佐々木卓也，高井義美 (1993. 10) *Rho* GDI による *Rho* と *Rac* の活性制御機構。第66回日本生化学会大会。

18. 清水一也，貝淵弘三，黒田真也，織田　聡，佐々木卓也，高井義美 (1993. 10) *Smg* GDS と Dbl による *Rho* の活性化機構。第66回日本生化学会大会。

19. 西川淳介，白瀧博通，山口　務，岸田昭世，宮崎睦雄，幸野秀志，和田　謙，沼田真一郎，貝淵弘三，高井義美 (1993. 10) *Rab*3A/*Smg*25A 標的蛋白質 (Rabphilin-3A) の cDNA クローニングと機能解析。第66回日本生化学会大会。

20. 沼田真一郎，白瀧博通，岸田昭世，貝淵弘三，高井義美 (1993. 10) *Rab*3A/*Smg*25A の標的蛋白質 (Rabphilin-3A) の *Rab*3A GTPase 活性に対する作用。第66回日本生化学会大会。

21. 矢持　亘，田中一馬，野中秀太郎，前田彰男，武者孝志，高井義美 (1993. 12) 出芽酵母低分子量 GTP 結合蛋白質 *Rho*1 の出芽形成における機能と局在。第16回日本分子生物学会年会。

22. 増田忠之，田中一馬，野中秀太郎，矢持　亘，前田彰男，高井義美 (1993. 12) 出芽酵母 *Rho* GDI の精製とクローニング。第16回日本分子生物学会年会。

《神経情報研究部門》

1. Ikenaka, K., Kagawa, T., Nakao, J., Mikoshiba, K. (Lees, M.)(1993) Role of DM-20 in Oligodendorosyte defferentiation. A. S. N. (American Society for Neurochemistry) 24th ANNUAL MEETING Abstracts: 248

2. Kagawa, T., Ikenaka, K., Inoue, Y., Mikoshiba, K. (1993) Molecular mechanism underlying oligodendrocyte degeneration in PLP trangenic mice. I. S. N. (International Society for Neurochemistry) Satellite Meeting Abstracts: 38

3. Ikenaka, K., Nakao, J., Kagawa, T., Mikoshiba, K. (1993) Differentiation of oligodendrocyte is enhanced by the culture supernatant of PLP/DM20-producing cells. I. S. N. (International Society for Neurochemistry) Satellite Meeting Abstracts: 61

4. Nakahira, K., Nakajima, K., Morita, N., Mikoshiba, K. (1993) Promoter activity of glial fibrillary acidic protein gene in embryonic brain cells. 23RD. ANNUAL MEETING Society for Neuroscience Abstracts 704-12

5. 落合　康，清水洋行，池中一裕，御子柴克彦，長谷純宏 (1993) マウス脳中に顕著に存在する N-配糖体糖鎖　生化学 65: 1022

6. 藤本一朗，池中一裕，近藤哲朗，相本三郎，田口隆久，川崎隆史，葛西道生，堅田利明，御子柴克彦 (1993) MCD ペプチドによるシナプス伝達効率長期増強の分子機構　生化学 65: 1000

7．池中一裕，中平健祐，御子柴克彦(1993)グリア細胞の発生における遺伝子発現　第46回日本細胞生物学会要旨集 MS6-1

8．吉松忠憲，中平健祐，森田規之，三好健一，池中一裕(1993)新規レトロウイルスベクターによる遺伝子導入系の検討。第46回日本細胞生物学会要旨集 MS11-3

9．山田真久，中尾純治，鹿川哲史，御子柴克彦，池中一裕(1993)PLP 遺伝子産物のオリゴデンドロサイト分子因子としての機能。第46回日本細胞生物学会要旨集 MS6-7

10. 山田真久，中尾純治，鹿川哲史，御子柴克彦，池中一裕(1993) 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。神経化学 32: 46-47

11. 鹿川哲史，池中一裕，井上芳郎，御子柴克彦(1993)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の機能解析—トランジェニックマウスの系を用いて—神経化学 32: 48-49

12. 森田規之，河田光博，中平健祐，御子柴克彦，池中一裕(1993) GFAP 遺伝子転写活性の可視化によるアストロサイトの分化の解析。第17回神経科学大会抄録集 1C-05

13. 中平健祐，藤本一朗，池中一裕(1993)脳の発生過程における電依存性 K^+ チャンネルの発現。第17回神経科学大会抄録集 1C-06

《液性情報研究部門》

1．月田承一郎(1993. 1)細胞骨格・膜骨格とシグナル伝達　千里ライフサイエンスセミナー（大阪）

2．月田早智子(1993. 1)細胞接着と細胞癌化・転移機構　筑波がんセミナー（筑波）

3．月田承一郎(1993. 4)細胞間接着の制御と情報の伝達　第33回サイトカイン研究会（大阪）

4．Tsukita, Sh., Tsukita, Sa., Nagafuchi, A., and Yonemura, S. (1993. 5) Signal transduction in cell-to-cell adherens junctions. Gordon Conference on Biological Structure and Gene Expression (Volterra, Italy)

5．Tsukita, Sh. (1993. 5) Regulation of signal transduction of cadherin-based cell adhesion. The 8th Toyobo Biotechnology Foundation Workshop on Adhesion Molecules and their Biological Significance. (Tokyo)

6．月田承一郎 (1993. 7) 細胞接着と細胞癌化・転移　第4回嬬恋シンポジウム（嬬恋）

7．月田承一郎 (1993. 7) 細胞接着装置と細胞膜裏打ち蛋白質　第11回脳腸ホルモン学会（仙台）

8．月田承一郎 (1993. 10) 細胞接着。シンポジウム『がんのバイオサイエンスの進展』第66回日本生化学会大会（東京）

9．月田承一郎 (1993. 10) 細胞間接着制御とシグナル伝達　シンポジウム『細胞増殖制御とシグナル伝達』第52回日本癌学会総会　（仙台）

10. 米村重信，永渕昭良，月田承一郎 (1993. 10) 細胞膜―アクチン相互作用と CD43 の細胞質領域。ミニ・シンポジウム『形質膜機能と裏打ち蛋白質』　第46回日本細胞生物学会大会（前橋）

11. 相良淳二，牧　克之，河合明彦，月田早智子，月田承一郎 (1993. 10) ウイルス増殖と細胞骨格との関わりについて。ミニ・シンポジウム『細胞骨格と病態』第46回日本細胞生物学会大会（前橋）

12. 月田承一郎 (1993. 10) 細胞間接着装置の構成蛋白質と癌抑制遺伝子産物。ミニ・シンポジウム『細胞間接着の分子機構』第46回日本細胞生物学会大会（前橋）

13. 月田早智子，大石久美子，佐藤成樹，武内恒成，相良淳二，河合明彦，月田承一郎 (1993. 10) ERM ファミリーメンバーと CD44 の結合。ミニ・シンポジウム『細胞間接着の分子機構』第46回日本細胞生物学会大会（前橋）

14. 永渕昭良，月田承一郎 (1993. 10) カドヘリンの細胞接着能と細胞骨格結合能：αカテニンを介した制御。ミニ・シンポジウム『細胞間接着の分子機構』第46回日本細胞生物学会大会（前橋）

15. 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 (1993. 10) Tight Junction に局在する内在性膜蛋白質Ⅰ．モノクローナル抗体による同定とその分布。

ミニ・シンポジウム『細胞間接着の分子機構』　第46回日本細胞生物学会大会（前橋）

16. 笠原英子，加藤延夫，伊藤雅彦，永渕昭良，米村重信，月田早智子，月田承一郎(1993. 10) 心筋型 C-protein による自己免疫性心筋炎。ミニ・シンポジウム『筋蛋白質と分化・病態』第46回日本細胞生物学会大会（前橋）

17. 佐甲靖志，永渕昭良，月田承一郎，楠見明弘(1993. 10) カテニンと細胞骨格—膜骨格系における E-カドヘリンの運動制御。第46回日本細胞生物学会大会（前橋）

18. 武内恒成，川島明代志，佐藤成樹，月田早智子，月田承一郎(1993. 10) Band4. 1 スーパーファミリーの構成とその解析。第46回日本細胞生物学会大会（前橋）

19. 竹田　寛，伊藤雅彦，永渕昭良，米村重信，月田早智子，月田承一郎(1993. 10) 温度感受性 v-src の活性化に伴う細胞間接着装置の動態　第46回日本細胞生物学会大会（前橋）

20. 伊藤雅彦，永渕昭良，米村重信，木谷（安田）宝子，月田早智子，月田承一郎(1993. 10) 220kD 蛋白質／ ZO-1 とカドヘリンの関係について。第46回日本細胞生物学会大会（前橋）

21. 平瀬徹明，古瀬幹夫，伊藤雅彦，永渕昭良，米村重信，月田早智子，月田承一郎(1993. 10) Tight Junction に局在する内在性膜蛋白質　Ⅱ．cDNA クローニング。第46回日本細胞生物学会大会　（前橋）

22. Tsukita, Sh. (1993. 11) Signal transduction and regulation of cadherin-based cell adhesion (Special lecture) The 2nd Joint Meeting of the Japanese Society for Ultrastructural Cutaneous Biology and the Society for Cutaneus Ultrastructure Research (Nara)

23. Tsukita, Sh. (1993. 11) Submembranous junctional plaque proteins as potential tumor suppressor molecules. The 24th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund (Tokyo)

24. 月田承一郎(1993. 11) 細胞接着と細胞癌化・転移転移。第73回慶応医学会シンポジウム（東京）

25. 月田承一郎(1993. 12) 細胞接着と転移。第 9 回 Wako ワークショップ『がんの浸潤と転移』（東京）

26. 月田承一郎 (1993. 12) 血管内皮細胞間の細胞接着。第15回循環器代謝研究会（大阪）

27. 月田承一郎 (1993. 12) 細胞間接着と細胞増殖制御。シンポジウム『シグナル伝達の分子メカニズム』第16回日本分子生物学会年会（千葉）

28. 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 (1993. 12) Tight Junction に局在する膜蛋白質の同定と cDNA クローニング。第16回日本分子生物学会年会（千葉）

29. 武内恒成，佐藤成樹，川島明代志，永渕昭良，月田早智子，月田承一郎 (1993. 12) アンチセンスオリゴによる細胞膜裏打ち蛋白質群 ERM ファミリーの解析。第16回日本分子生物学会年会（千葉）

《高次神経機構研究部門》

1．Yagi, T.: "Behavioral abnormalities of Fyn-deficient mice." 1st Winter GIBCO-BRL Symposium, Tokyo, 1994.

2．八木　健 Fyn 欠失マウスの哺乳行動異常の解析。第17回日本神経科学会シンポジューム

《情報記憶研究部門》

1．Kurahashi, T. and Yau, K. -W. (1993) Co-existence of Cation and Anion Components in the Odorant-induced Current of Vertebrate Olfactory Receptor Neurons. The Fifteenth Annual meeting of Association for Chemoreception Sciences (Sarasota, Florida, USA).

2．Kurahashi, T. and Yau, K. -W. (1993) Co-existence of Cationic and Chloride Components in the Olfactory Transduction Current. 11th International Symposium of Taste and Smell (Sappro, Japan).

《高次神経性調節研究部門》

1. Saccadic responses of border cells in the laminae surrounding the globus pallidus of the monkey. Makoto Kato, Okihide Hikosaka. Jpn. J. Physiol., Vol. 43, Suppl. 2, 1993, S257

2. Procedural learning in monkey-a new behavioral paradigm. Miya Kato-Rand, Okihide Hikosaka. Jpn. J. Physiol., Vol. 43, Suppl. 2, 1993, S258

3. Reversible blockade of external globus pallidus induces contraversive eye deviation. Makoto Kato, Okihide Hikosaka. Neurosci. Res. Suppl. 18, 1993, S164

4. Role of anticipatory eye movement in procedural learning.Kae Miyashita, Shigehiro Miyachi, Okihide Hikosaka. Neurosci. Res. Suppl. 18, 1993, S226

5. Deficits in execution and learning of eye/hand movements by reversible blockade of the monkey striatum. Shigehiro Miyachi, Kae Miyashita, Zoltan Karadi, Okihide Hikosaka. Neurosci. Res. Suppl. 18, 1993, S226

6. Spatial attention is crossmodal - an evoked potential study
S. Miyauchi, O. Hikosaka, S. Shimojo and H. Okamura Annual meeting of the association for research in vision and ophthalmology, Salasota, Frolida, 1993, pp1234 (2606-15)

7. Line motion can be induced by visual expectation and memory guided motor readiness. S. Shimojo, S. Miyauchi and O. Hikosaka Annual meeting of the association for research in vision and ophthalmology, Salasota, Frolida, 1993, pp1290 (2895)

8. 宮内　哲　REM 睡眠中の急速眼球運動と視覚活動。第57回日本心理学会ワークショップ，1993年 9 月 8 日，東京

9. 宮内　哲，彦坂興秀，岡村宏樹　自発的注意が somatosensory evoked magnetic evoked fields に及ぼす影響。第17回日本神経科学会，1993年12月 8 日，名古屋

《生体システム研究部門》

1. Keller A, Weintraub D & Miyashita E; Early tactile experience influences the organization of movement representation in rat motor cortex. Society for Neuroscience (Washington)

2. Matsuyama K, Kobayashi Y & Mori S; Projection patterns of single pontine reticulospinal axons in the cervical and lumbar enlargements in the cat. Society for Neuroscience (Washington)

3. 岩切裕昌，松山清治，森　茂美；ネコ橋網様体におけるセロトニンレベルと睡眠・覚醒位相。第70回日本生理学会大会（山梨）

4. 岡　哲夫，岩切裕昌，高草木薫，森　茂美；橋網様体の微小電気刺激による筋活動の抑制。第70回日本生理学会大会（山梨）

5. 小林吉史，松山清治，森　茂美；ネコ脳幹のセロトニン含有細胞及びセロトニン線維の生後発達。第70回日本生理学会大会（山梨）

6. 高草木薫，松山清治，森　茂美；全汎的運動抑制の脊髄機構。第70回日本生理学会大会（山梨）

7. 本間　裕，横山貴康，松山清治，小林吉史，森　茂美；ネコ小脳室頂核の脳幹網様体に対する神経線維および終末の投射様式。第70回日本生理学会大会（山梨）

8. 本間　裕，片田彰博，小林吉史，森　茂美；ネコ大脳皮質体性感覚・運動野の脳幹に対する投射様式の解析．第72回北海道医学大会生理系分科会（札幌）

9. 松山清治，小林吉史，高草木薫，森　茂美；ネコ延髄巨大細胞性網様核および大細胞性網様核からの下行性投射様式。第70回日本生理学会大会（山梨）

10. 宮下英三，Mackel R ；視床運動核への体性感覚入力。第70回日本生理学会大会（山梨）

11. 茖荷秀昭，松山清治，高草木薫，森　茂美；新生仔ラットの生後発達と自発歩行運動量の測定。第70回日本生理学会大会（山梨）

12. 茖荷秀昭，岩切裕昌，岡　哲夫，小林吉史，森　茂美；ラットの自発歩行運動の生後発達におけるセロトニンの役割。第17回日本神経科学大会（名古屋）

13. 茖荷秀昭，岡　哲夫，小林吉史，森　茂美；ラット神経系の生後発達におけるセロトニンの役割。第72回北海道医学大会生理系分科会（札幌）

14. 森　茂美，岡　哲夫，岩切裕昌，小林吉史，松山清治，高草木薫；橋網様体の微小電気刺激と微小化学刺激で誘発される筋トーヌスの抑制効果。第17回日本神経科学大会（名古屋）

15. 横山貴康，本間　裕，小林吉史，野中　聡，森　茂美；咳反射における呼吸筋活動の解析。第70回日本生理学会大会（山梨）

16. 横山貴康，片田彰博，小林吉史，森　茂美；咳・くしゃみ時の内喉頭筋・呼吸筋活動の解析. 第72回北海道医学大会生理系分科会（札幌）

《高次液性調節研究部門》

1．丹治　順 (1993. 4) 記憶された運動の手順に関するニューロン。第70回日本生理学会大会（甲府）

2．嶋　啓節，丹治　順 (1993. 4) 入力部位に依存したサル大脳一次運動野ニューロンのグルタミン酸受容体。第70回日本生理学会大会（甲府）

3．進藤克博，嶋　啓節，丹治　順 (1993. 4) 補足運動野と一次運動野に投射する視床細胞の多重標識による解析。第70回日本生理学会大会（甲府）

4．稲瀬正彦，丹治　順 (1993. 4) 淡蒼球内節の入力を受ける視床ニューロンは第一次運動野に投射するか。第70回日本生理学会大会（甲府）

5．Tanji J (1993. 7) How does the primate brain use input to the motor cortex? 32nd Congress Int. Union Physiol. Sci. (Grasgow, UK)

6．Shindo K, Shima K, Tanji J (1993. 11) Distribution of thalamic cells projecting to the primary motor cortex and supplementary motor area. Society for Neuroscience, 23rd Annual Meeting (Washinton DC, USA)

7．丹治　順 (1993. 12) 大脳皮質に多数の運動関連領野が存在する意義は？　第17回日本神経

科学大会（名古屋）

《高次脳機能プロジェクト》

1．佐々木和夫 (1993. 4) MEG による脳機能の局在化と限界。第70回日本生理学大会（甲府）

2．Sasaki K (1993. 5) Cerebro-cerebellar interactions in voluntary movement. (Duesseldorf, Germany)

3．Sasaki K (1993. 5) The frontal cortex in no-go decision and motor suppression. Symposium to celebrate Sir John's 90th birthday (Frankfurt/M, Germany)

4．Sasaki K, Gemba H, Nambu A & Matsuzaki R (1993. 8) Prefrontal activity on no-go decision. 9th International Conference on Biomagnetism (Vienna, Austria)

5．佐々木和夫 (1993. 12) 前頭連合野の統御機能研究と脳磁場・脳電場計測。第17回日本神経科学大会（名古屋）

6．南部　篤，松崎竜一 (1993. 4) 手指電気刺激による誘発脳磁界。第70回日本生理学大会（甲府）

7．南部　篤，松崎竜一，玄番央恵，佐々木和夫 (1993. 6) 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。第 8 回日本生体磁気学会大会（東京）

8．Nambu A, Matsuzaki R, Gemba H & Sasaki K (1993. 8) Magnetic fields in the cerebral cortex associated with visually initiated finger movements in human brain. 9th International Conference on Biomagnetism (Vienna, Austria)

9．Nambu A, Matsuzaki R, Gemba H & Sasaki K (1993. 11) Magnetic fields in the cerebral cortex associated with visually initiated finger movements in human subjects. 23rd Annual Meeting, Society for Neuroscience (Washington, D. C., U. S. A.)

10. 南部　篤 (1993. 11) 高次脳機能に関連する脳磁界。第23回日本脳波・筋電図学会学術大会（鹿児島）

11. 南部　篤，松崎竜一，達本　徹，久宝真一 (1993. 12) 脳磁場計測によるヒトの大脳皮質視覚野における視野局在性の研究。第17回日本神経科学大会（名古屋）

12. Kyuhou S & Okada YC (1993. 8) Magnetic fields of synchronized population activities in the presence of picrotoxin in transverse CA1 slice of the guinea pig. 9th International Conference on Biomagnetism (Vienna, Austria)

13. Kyuhou S & Okada YC (1993. 11) Magnetic evoked field from the transverse CA1 hippocampal slice of the guinea pig. 23rd Annual Meeting, Society for Neuroscience (Washington, D. C., U. S. A.)

14. 久宝真一，岡田義男 (1993. 12) 高解像度磁束計によるモルモット海馬切片からの磁場計測。第17回日本神経科学大会（名古屋）

15. 玄番央恵，佐々木和夫 (1993. 4) サル前頭前野の電位からみた機能的大脳半球非対称。第70回日本生理学大会（甲府）

14. 玄番央恵，佐々木和夫 (1993. 11) サル前頭前野における機能的大脳半球非対称性。第23回日本脳波・筋電図学会学術大会（鹿児島）

15. 玄番央恵，三木直樹，佐々木和夫 (1994. 12) サルにおける複合音始動性運動の学習と左半球前頭前野電位。第17回日本神経科学大会（名古屋）

16. Okada YC & Kyuhou S (1993. 8) Characteristics of the magnetic evoked field associated with neuronal activities in longitudinal slices of the guinea pig. 9th International Conference on Biomagnetism (Vienna, Austria)

17. Okada YC & Kyuhou S (1993. 11) Magnetic evoked field produced by the longitudinal CA1 and CA3 hippocampal slice of the guinea pig. 23rd Annual Meeting, Society for Neuroscience (Washington, D. C., U. S. A.)

《感覚・運動機能プロジェクト》

1. Kakigi R, Neshige R, Matsuda Y & Kuroda Y (1993) Do patients with Down's syndrome rec-

ognize Mickey Mouse? Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 87: S129.

2. Kakigi R (1993) Interference effects by movement and various modalities of sensation on pain perception and pain-related brain potentials. Neurosci Res, 18 (Suppl) S200.

3. Shibasaki H, Nakamura M, Nishida S, Imajoh K, Mitsuyasu I, Neshige R, Kakigi R & Ikeda A (1993) Automatic interpretation of awake background EEG by means of computer-assisted method and artificial neural network. Electroencephalogr Clin Neurophysiol, 87: S116.

4. 柿木隆介 (1993)Down 症候群における誘発電位，脳波と筋電図 21: 108-109.

5. 柿木隆介，黒田康夫，松田由紀 (1993) 通覚認知に対する運動発現機構の干渉作用，臨床神経，33: 1461.

《自律機能プロジェクト》

1. 栗城真也，竹内文也 (1993. 4) ヒト聴覚野皮質神経活動による磁気応答の計測。日本生理学会大会（山梨）

2. 藤巻則夫，竹内文也，小林哲生，栗城真也，蓮尾信也 (1993. 5) Silent speech における事象関連脳波。日本 ME 学会大会（山梨）

3. 小林哲生，竹内文也，栗城真也 (1993. 5) 誘発脳磁界の動的シミュレーション——単一ダイポールと 2 ダイポールとの比較——。日本 ME 学会大会（山梨）

4. 大和田徹，盛田　稔，小林哲生，栗城真也 (1993. 5) α 波減衰に基づく競合図形間で生じる視野闘争過程の検討。日本 ME 学会大会（山梨）

5. 藤巻則夫，竹内文也，小林哲生，栗城真也，蓮尾信也 (1993. 5) サイレントスピーチにおける事象関連脳波。脳電磁図トポグラフィー研究会（千葉）

6. 竹内文也，栗城真也 (1993. 6) 脳磁界信号源推定における Brain Noise の影響とその除去（Ⅰ）。日本生体磁気学会大会（東京）

7．関原謙介，竹内文也，栗城真也 (1993. 6) 脳磁界信号源推定における Brain Noise の影響とその除去（Ⅱ）。日本生体磁気学会大会（東京）

8．沖田善光，竹内文也，小林哲生，栗城真也 (1993. 6) CV 刺激誘発脳磁界における雑音の特性。日本生体磁気学会大会（東京）

9．小林哲生，竹内文也，沖田善光，栗城真也 (1993. 6) 聴覚誘発脳磁界応答の 2 ダイポール解析。日本生体磁気学会大会（東京）

10. 栗城真也，大城　理，竹内文也，村上新治，深津　亮，高畑直彦 (1993. 6) 脳磁界光 ON 反応の計測と解析。日本生体磁気学会大会（東京）

11. 栗城真也，大城　理，竹内文也，村上新治，深津　亮，高畑直彦 (1993. 6) 脳磁界によるヒト頭頂葉における視覚誘発神経活動の解析。非侵襲脳機能局在研究会（東京）

12. 土屋憲晃，小林哲生，栗城真也 (1993. 10) かな短期記憶におけるメモリセットサイズと反応時間の関係。電気関係学会北海道支部連合大会（札幌）

13. 大和田徹，加藤和夫，小林哲生，栗城真也 (1993. 10) 運動格子刺激により生じる視野闘争・融合間における脳波スペクトルの解析。電気関係学会北海道支部連合大会（札幌）

14. 白井直仁，小林哲生，栗城真也 (1993. 10) 脳磁界信号源推定におけるパラメーター探索法の効率化の検討。電気関係学会北海道支部連合大会（札幌）

15. 沖田善光，平田恵啓，小林哲生，栗城真也 (1993. 10) Brain Noise を考慮した CV 刺激誘発脳磁界信号源の動的推定。ME 学会北海道支部大会（札幌）

《生体機能検査室》

1．成瀬　達，軒原清史 (1993. 3) Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) のモルモット胆嚢収縮作用第79回日本消化器病学会総会（京都）

2．成瀬　達，尾崎　毅 (1993. 4) PACAP のモルモット胆嚢収縮作用。第70回日本生理学会大会（甲府）

3. Naruse S, Wei M, Ando E, Nokihara K, Ozaki T (1993. 8) The effect of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) on isolated guinea pig gallbladder. XXXII Congress of IUPS (Glasgow).

4. Naruse S, Nakamura T, Ando E, Nokihara K, Wray V (1993. 9) The effect of PACAP and VIP on gastrointestinal blood flow in conscious dogs. International Symposium of VIP, PACAP and Related Regulatory Peptides (Strasbourg)

5. Nokihara K, Naruse S, Wray V (1993. 9) Design, Synthesis and biological actions of PACAP-related peptides based on structures from NMR studies. International Symposium of VIP, PACAP and Related Regulatory Peptides (Strasbourg)

6. Naruse S, Sazi T, Ozaki T, Nokihara K, Wray V (1993. 10) The effect of PACAP and VIP on isolated guinea pig pulmonary artery. Gut Hormone 93 (Shizuoka)

7. Nakamura T, Naruse S, Wei M (1993. 10) The effect of calcitonin-gene-related peptide on gastrointestinal blood flow in conscious dogs. Gut Hormone 93 (Shizuoka)

8. Wei M, Naruse S, Nakamura T, Nokihara K, Ozaki T (1993. 10) The effect of pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) 38 on gallbladder smooth muscle in vitro. Gut Hormone 93 (Shizuoka)

9. Onaga T, Zabielski R, Kato S, Naruse S, Ozaki T (1993. 10) The inhibition of interdigestive periodic pancreatic secretion by PYY in dogs. Gut Hormone 93 (Shizuoka)

《組織培養標本室》

1. 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)

《磁気共鳴装置室》

1. Seo R, Koizuka I, Sano M, Matsunaga T, Seo Y, Murakami M & Watari H (1993. 2) High-re-

solution magnetic resonance imaging of the human inner ear. Presented at 16th midwinter research meeting Association for research in otolaryngology. (St. Petersburg, FL, USA)

2．平川和文，高田義弘，岡田修一，武井義明，吉崎和男，小田慶喜，岡本悌二 (1993. 2) ^{31}P-NMR スペクトルからみた持久性トレーニングの効果。日本体力医学会第 7 回近畿地方会（京都）

3．吉田敬義，亘　　弘 (1993. 4) 運動時の筋エネルギー代謝におよぼす低酸素吸入の影響。第70回日本生理学会大会（山梨）

4．吉田敬義，亘　　弘 (1993. 4) ^{31}P-MRS を用いた運動時の無機燐酸の動態について。体力科学 42: 332

5．吉田敬義，亘　　弘 (1993. 4) ^{31}P-MRS よりみたスポーツ選手の筋エネルギー代謝の特徴。第 3 回健康スポーツ医科学フォーラム

6．佐藤篤司，片岡　誠，桑原義之，正岡　昭，亘　　弘 (1993. 4) 上腸間膜動脈閉鎖・再灌流時の小腸エネルギー代謝の実験的検討—^{31}P-MRS 法による小腸モニタリングの可能性について—。第93回日本外科学会総会

7．佐藤篤司，片岡　誠，桑原義之，正岡　昭，亘　　弘 (1993. 7) 上腸間膜動脈閉鎖・再灌流時の小腸組織障害の非侵襲的モニタリングの可能性についての実験的検討— in vivo 小腸エネルギー代謝からのアプローチ。第42回日本消化器外科学会総会

8．Yoshida T & Watari H (1993. 8) Effect of hypoxia on muscle phosphate metabolism & intracellular pH by ^{31}P-MRS during progressive incremental exercise. 32nd Congress Int. Union Physiol Sci Abstract 284. 2 (Glasgow)

9．Watari H, Yoshida T & Tagawa K (1993. 8) Analysis of two signales of inorganic phosphate appeared during exercise & recovery oh human muscle by ^{31}P-NMR study. 32nd Congress Int Union Physiol Sci 284. 9 (Glasgow)

10. Yoshida T & Watari H (1993. 8) Inorganic phosphate peak splitting pattern during exercise is dependent on oxygen availability. 12th Ann Meet Soc Magn Reson Med (New York)

11. Hirakawa K, Yoshizaki K, Morimoto T & Watari H (1993. 8) Muscular Training and Change in Skeletal Muscle Metabolism in Human Studied by ^{31}P-NMR Spectoroscopy. 12th Ann Meet Soc Magn Reson Med (New York)

12. 平川和文，高田義弘，岡田修一，吉崎和男，森本武利，小田慶喜，岡本悌二 (1993. 9) ^{31}P-NMR スペクトルからみた筋トレーニングの効果。第48回日本体力医学会大会（徳島）

13. 吉田敬義，亘　弘 (1993. 9) ^{31}P-MRS による運動中の Pi ピークの分裂と筋線維タイプ動員の関連について。第85回近畿生理学談話会（大阪）

14. Yoshida T & Watari H (1993) Effect of hypoxia on muscle phosphorus metabolites during exercise by ^{31}P-MRS. Med SCI Sports Exer 25: S174

15. 吉田敬義，亘　弘 (1993) 高時間分解能 ^{31}P-MRS による運動中の燐化合物の動態と Pi ピークの分裂。日本運動生理学雑誌 1: 48

16. 吉田敬義，亘　弘 (1993) ^{31}P-MRS からみた Pi ピークの分裂状況と運動強度の関係体力科学 42: 585

17. 吉田敬義，亘　弘 (1993) ^{31}P-MRS による無機燐酸ピーク運動時の分裂について。運動生化学研究会第 6 回シンポジウム

18. 亘　弘，吉田敬義，市川　修 (1993) 骨格筋運動時における無機燐信号とこれに対する酸素吸入の影響。日本生化学雑誌

19. 吉田敬義，亘　弘 (1993) 運動時の ^{31}P-MRS の Pi ピークの分裂におよぼす酸素吸入の影響。日本体育学会第43回大会大会号

20. 吉田敬義，亘　弘 (1993) 運動時の ^{31}P-MRS の Pi ピーク分裂と筋 pH の動態について。第 8 回生理・生体工学シンポジウム

21. 神谷純司，吉田敬義，亘　弘 (1993) ランプ負荷運動による exhaustion 時の筋エネルギー代謝の ^{31}P-MRS による研究。第 6 回 AT 談話会

《超高圧電子顕微鏡室》

1. M. Taniguchi, N. Watanabe, S. Aoki, H. Kihara, S. Phansiri, T. Taniguchi and T. Arii (1993. 9) Comparative studies on cultured plant protoplasts using X-ray and optical microscopes and high voltage electron microscope, Int. Conf. on X-ray Microscopy (Moscow)

2. 谷口美恵子，依田　功，村松　聡，荒金宏臣，谷口　武，有井達夫，渡辺紀夫，青木貞雄，木原　裕 (1993. 10) 植物培養細胞の超高圧電子顕微鏡及びX線顕微鏡による観察。第31回生物物理学会（名古屋）

3. 有井達夫 (1993. 11) YAG 蛍光板による超高圧電顕 TV 像の強度と分解能。第8回東海電顕技術研究会（名古屋）

《動物実験施設》

1. Kuwahara A., Ozaki T., Mochizuki T. and Yanaihara N. (1993. 10) Modulation of guinea-pig ileal motility by CCK. The International Conference on Gut Hormone (Gut Hormon '93)(Sizuoka)

2. Naruse S., Sazi T., Wei M. and Ozaki T. (1993. 10) The effect of PACAP and VIP on isolated guinea-pig pulmonary artery. The International Conference on Gut Hormone (Gut Hormon '93)(Sizuoka)

3. Wei M., Naruse S., Nakamura T. and Ozaki T. (1993. 10) The effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) 38 on gallbladder smooth muscle in vitro. The International Conference on Gut Hormone (Gut Hormon '93)(Sizuoka)

4. Onaga T., Zabielski R., Kato S., Naruse S., and Ozaki T. (1993. 10) The inhibition of interdigestive periodic pancreatic secretion by PYY in dogs. The International Conference on Gut Hormone (Gut Hormon '93)(Sizuoka)

5. Kato K., Tsutsui I., Ozaki T. and Yamagishi S. (1993. 8) Gradual changes in contractile responses in the guinea-pig vas deferens. The XXXII International Congress of Physiological Sciences (Glasgow)

《江橋研究室》

1．江橋節郎 (1993. 3) From the relaxing factor to troponin 第18回生理研コンファレンス Calcium regulated cellular activities

2．江橋節郎 (1993. 5) Ca regulation 第22回ブラジル生化学及び分子生物学会総会講演（ブラジル）

3．江橋節郎 (1993. 8)「21世紀のライフサイエンス」文部省科学研究費補助金総合研究Aライフサイエンスの推進力としてのウイルス研究の方法に関する基礎的研究。拡大班会議（京都）

4．江橋節郎 (1993. 8)「国立研究所の発展にむけて」環境研セミナー（茨城）

5．江橋節郎 (1993. 11)「細胞レベルにおける心筋収縮の特性」第30回循環器のつどい。（名古屋）

【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）…… 198
2．平滑筋ミオニン軽鎖キナーゼのもつキナーゼ活性とレオトニン活性の識別
（小浜一弘他）…… 199
3．培養系を用いた神経細胞移動の解析（白尾智明他）…… 199
4．光学的計測法による海馬神経回路に関する研究（小幡邦彦他）…… 201
5．神経特異蛋白質 HPC-1 の機能の解析（赤川公朗他）…… 201
6．生体 LB 膜の構造と物性（下山雄平他）…… 203
7．^{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）…… 205
8．ミトコンドリア及びペルオキシソームのβ酸化酵素系の電子移動の比較
（三浦　洌他）…… 206
9．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）…… 208
10．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）…… 210
11．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）…… 212
12．膵腺房細胞内 Ca イオン動態に対するアラキドン酸由来メッセンジャーの
効果（浅田尚登他）…… 214
13．カエル心臓内神経節細胞におけるプリン作動性レセプターとシグナル
伝達機構（菅野隆浩他）…… 215
14．カテコルアミン分泌応答と細胞内遊離 Ca^{2+}
（藁科　彬他）…… 216
15．アルドステロンによる副腎皮質球状層細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の変化
（山口賢一他）…… 217
16．温熱処理後の膵腺房細胞の Ca^{2+} 動態の変化（近藤　隆他）…… 220
17．急性膵炎腺房細胞内の Ca^{2+} 動態について（岡田憲幸他）…… 221
18．消化管平滑筋細胞に対する神経ペプチドの作用機構に関する研究
（桑原厚和他）…… 225
19．バックグラウンドノイズレベルの聴覚系ニューロン活動への影響
（鎌田　勉他）…… 225

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
（石沢由美子他） …… 226
21. 聴覚中枢電気活動の光学的測定（橋本　亨他） …… 227
22. 神経の麻酔・変性現象とチャネルタンパク質の構造・相互作用の関係
（美宅成樹他） …… 228
23. 神経再生におけるグリアの役割（堀江秀典他） …… 229
24. 神経軸索に作用する成長促進および抑制因子（中山　孝他） …… 230
25. Na － Ca 交換輸送系の反応速度論的解析（大川和秋他） …… 231
26. 機械的刺激により上皮細胞により放出され，細胞内カルシウム増加を
起こす物質の同定（榎本浩一他） …… 231
27. イカ巨大神経軸索内外における局所麻酔薬作用動態の解析
（小栗顕二他） …… 232
28. 電気生理学的にみたモルモット精管平滑筋細胞の型（森元克士他） …… 233
29. 胚胞 mrp ポンプと Cl^- チャネル（竹口紀晃，大野　護他） …… 233
30. 心筋クロライド・チャネル制御に関する研究（堀江　稔他） …… 234
31. カーボン線維電極による開口放出の検討（丸山芳夫他） …… 235
32. ヒスタミンによる胃壁細胞膜表面積増加の分子機構（上田俊二他） …… 237
33. ヒトＰ－糖蛋白質のクロライドチャネル活性の生理的意義
（植田和光他） …… 238
34. 血管内皮細胞膜の機械的水透過係数 Lp（冨田　稔，福内靖男他） …… 239
35. 神経細胞の分化決定における遺伝子発現の解析（岡野栄之他） …… 241
36. PLP 遺伝子産物のオリゴデントロサイト分化因子としての機能解析
（中尾順治，植村慶一他） …… 242
37. レトロウイルスベクターによる遺伝子導入法の開発的研究
―細胞種特異的遺伝子発現と癌の遺伝子治療への応用（清水恵司他） … 243
38. Cytosne Deaminase の強制発現による 5FC 感受性株作成の試み
（中村秀次他） …… 244
39. 遺伝性ミエリン形成不全マウスの解析と脳内移植による
中枢神経系脱髄疾患の治療法の確立（山田正信他） …… 245
40. 大脳皮質形態成分の分子機構（小川正晴他） …… 246
41. 網膜内の色情報抽出における錐体視細胞間の相互作用とその意義
（日高　聡，橋本葉子他） …… 247
42. ミオシン ATPase 反応中間体の構造（田之倉優他） …… 248
43. 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―（下条信輔他） …… 250

44. 視床下核による随意性眼球運動制御機構の解析（松村　賢他） …… 251
45. 神経突起伸長の走行性のメカニズムに関する研究（谷藤　学他） …… 253
46. 培養プルキンエ細胞における長期可塑性と遺伝子発現（山森哲雄他） … 255
47. 長期・帆短期記憶に基づく運動制御への運動性連合野の関与
（児玉　亨他） …… 256
48. 運動関連領野の機能連関（嶋　啓節，丹治　順他） …… 256
49. サル視床腹側核群の線維連絡の解析（徳野博信他） …… 257
50. 神経回路網形成とグルタミン酸受容体（渡辺雅彦他） …… 257
51. リン脂質膜で出現するリップル構造の３次元構造解析（八田一郎他） … 260
52. 身体運動が消化管諸機能におよぼす影響（近藤孝晴他） …… 261
53. 大脳基底核の生理学的・解剖学的研究（南部　篤他） …… 262
54. 付随陰性電位変動 (CNV) の発現機序に関する研究（玄番央恵他） …… 265
55. 大腸の粘膜筋板における GRP 含有神経に関する研究（石川一志他） … 266
56. THE INHIBITION OF INTERDIGESTIVE PERIODIC PANCREATIC
SECRETION BY PYY IN DOGS（加藤清雄他） …… 268
57. 神経海馬回路におけるアルツハイマー病アミロイドタンパク質の
発現の解析（丸山　敬他） …… 270
58. 医学部学生実習としての生理学実験法の開発（小幡邦彦他） …… 271

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・教養課程化学）
小幡邦彦，杉浦全代，江橋節郎（生理研）

ヒトDMDでは遺伝子欠損によりジストロフィンを合成できないため，患者の筋細胞膜に何らかの欠陥があって筋萎縮が起こると考えられている。筋萎縮の機構を研究するうえで，ジストロフィンの機能を明らかにすることは重要な課題である。最近の研究により，ジストロフィンのカルボキシル末端側（C末端側）は細胞膜の糖蛋白質(DAG)と複合体を形成し膜を強化補強していることが示唆され，ジストロフィンのC端側の機能について生化学的研究が必要となった。さらに，ごく最近になって，Yaffeグループによりジストロフィンの C端側配列を含むアイソフォームが脳・肝で発見された。本研究ではC端側部分を含む「短いジストロフィン」を分離し，その生化学的性質を調べることを目的としている。

これまで，ブタ骨格筋およびウシ胃のホモジネートからデタージェントのない条件においてジストロフィンを抽出することを試みてきた結果，弱アルカリ性で，低イオン強度の場合にジストロフィン分画は遠心上清にくることが示された。この抽出溶解性は，ジストロフィン自身の溶解性によるのか，それとも，ホモジネート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結論できないが，ジストロフィンC端側は筋細胞膜のDAGと複合体を形成するという報告を参照にすると，ジストロフィン・DAG蛋白質複合体は弱アルカリ性の低イオン強度下で解離すると推定される。

マウスの脳，肝，脚筋，心筋およびウシの臀筋，胃について，ブタ骨格筋からのジストロフィン抽出と同様の操作をおこない，Yaffeグループが報告している「短いジストロフィン」が抽出同定されるかを調べた。抽出液についてジストロフィンの合成ペプチド断片に対するウサギ血清との反応を調べると，骨格筋および胃では，分子量100kDa以下で濃く染色される成分は認められなかった。これに対し，脳では70kDa成分が染色され，肝では80kDa成分が染色された。脳70kDa成分はmdxと正常マウスで同様に染色されるのに対して，肝70kDa成分はmdxと正常マウスで同様に染色されるのに対して，肝80kDa成分mdxより正常マウスの方が強く染色された。

骨格筋からジストロフィンを抽出するのと同様の操作で脳・肝から70～80kDa成分が抽出されたことから，これらの「短いジストロフィン」も非筋組織細胞膜のDAG類似分子に結合していることが示唆される。今後は，脳・肝から70～80kDa成分を分離する研究をすすめてゆきたい。

2．平滑筋ミオニン軽鎖キナーゼのもつキナーゼ活性とレオトニン活性の識別

小浜一弘，岡垣　荘，石川良樹（群馬大・医・薬理）
小幡邦彦（生理研）

平滑筋の収縮制御がCa・カルモジュリン系によっている事は研究者の意見の一致するところである。しかし，カルモジュリンがミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)活性を介しているのが，アクチンに結合するレオトニン活性を介しているかに関しては問題が残っている。しかし，MLCKにレオトニン活性を求める目的であっても，MLCKに本来的なキナーゼ能に妨害されてレオトニン活性を明確に検出できないうらみがあった。代表者らはin vitro motility assayを行い，後者を特異的に検出する事に成功した。これによるとアクチンとミオシンの相互作用を促進する効果の他に新しくそれを抑制する効果が発見された。本研究ではこれら2種の相反する作用がMLCKの分子のどこに局在するかにつきMLCKを限定分研することにより以下のような検討を加えた。

ニワトリ砂のうよりMLSKを得て，CNBrによりメチオニン・siteで限定分解を行った。これをSP－トヨパール650Mカラム，つづいてDEAE－トヨパール650Mカラムにかけ，SDS-PAGEに30kDaの断片を得た。この断片の部分アミノ酸配列を決めたところ，N末より2番目－213番目のものであり，キナーゼ活性部位は含まない事が判明した。

この断片はアクチン線維に結合することができ，Ca－カルモジュリンがこの結合を阻害した。一方，in vitro motility assayでは，この断片はアクチン線維のうごきを阻害し，Ca－カルモジュリンによって阻害が解除された。MLCK全体の分子では阻害が解除されるばかりでなく，Ca－カルモジュリンが促進作用まで発揮するのであるが，この促進作用は検出できなかった。

intact MLCKに於いては，カルモジュリンの結合する部位はキナーゼ活性部位の近くであることが知られているが，本データーはもうひとつの結合部位が存在する事を示している。カルモジュリン結合蛋白質類のアミノ酸配列の類似性から推定すると，CNBr断片のC末近くの部位が示唆されるが，今後，生化学的なうらづけが要求されよう。

3．培養系を用いた神経細胞移動の解析

白尾智明（群馬大・医・行動分析）
小林　聡（慶應大・医・生理）
井上　洋，甲賀英明（群馬大・医・脳神経外科）
小幡邦彦，古家園子（生理研）

移動中の神経細胞の細胞内機構を細胞骨格に注目して明らかにするために，小脳顆粒細胞の再

凝集塊を用いた培養系において細胞移動を再現し，この実験系を用いて，蛋白リン酸化酸素阻害剤の細胞移動に対する影響を解析した。

生後２日目のラット小脳より，単離小脳顆粒細胞を得，これを約12時間培養し，再凝集塊を形成させた。これをラミニン塗布カバーグラス上にて培養した。培地は，ホルモン添加無血清培地を用い，これに蛋白リン酸化酵素阻害剤 K252a (1-200nM) あるいは H-7 (20-200mM) を添加し，12時間培養後，再凝集塊からの突起進展と細胞移動を解析した。これまで報告されてきたようにラミニン塗布カバーグラス上では，再凝集塊からの突起進展とこれに伴う細胞移動が起こるが，再凝集塊からの突起進展は，K252a, H-7 添加時に，ともに濃度依存性に抑制された。また突起の長さの半分を越えて移動した細胞の割合を，migration index と定義し，これにより，突起進展の程度に関係なく，細胞移動の状態をあらわすことができた。コントロールに比べ，K252a 添加時では本指数が著明に低下し，突起進展に関わらず細胞移動が強く阻害されたことを示している。しかし，培地から K252a を除去すると，可逆性に突起進展と細胞移動が再開した。免疫細胞化学的検索によればコントロールにおいては，小型紡錘形の細胞が大部分を占め，これらは突起上に存在していた。やや大型で扁平な不正形の細胞も少数認められた。この大型の細胞は，細胞体が突起との接触を失っているものが多かった。小型紡錘形の細胞においては，F-actin と drebrin とは共に細胞膜近傍に局在していた。K252a を添加すると，１～２分間で，顆粒細胞の形態は大型化し，filopodia 様の突起を多数持った扁平不正形の細胞となった。この細胞では，F-actin は細胞質内に stress fiber 様に線維状に存在しており，また，drebrin は細胞質内にび慢性に存在していた。Filopodia 様突起には F-actin が存在したが，drebrin はその基部にのみ存在した。b-tubulin, MAP2, neurofilament に対する抗体を用いた免疫染色では，小型紡錘細胞から大型不正形細胞への変化において，これらの細胞骨格形の変化は明らかでなかった。コントロールにおいて大部分を占める小型紡錘形の細胞は，突起上に存在しており，移動中の細胞と考えられた。一方，大型不正形の細胞は，その細胞体が突起との接触を持たないものが多く，停止している細胞と思われた。これらの大型の細胞では，F-actin と drebrin が解離していたことから，drebrin 非結合型のアクチンフィラメントの出現が細胞移動の停止と関係あるのではないかと考えられた。

4．光学的計測法による海馬神経回路に関する研究

小幡邦彦（生理研）
谷藤　学（福井大・工）
関野祐子（東京都神経研）
赤池　忠（名大・医・生理）

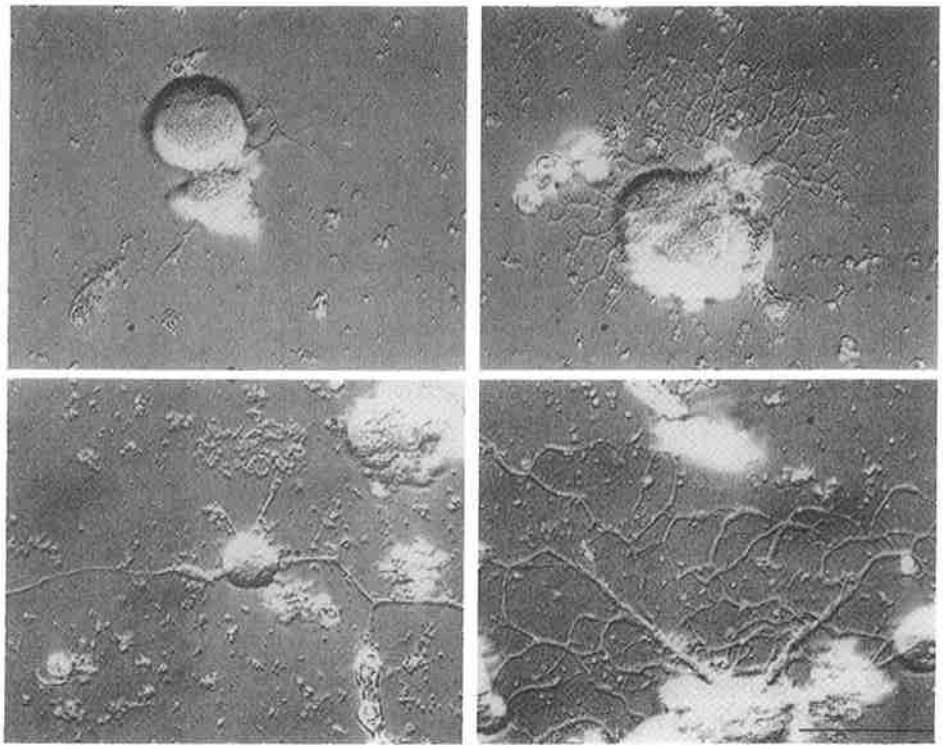
膜電位感受性色素を用いた光学的神経活動計測は従来の電気生理学的方法よりも広範な部位の活動を同時に記録できるので，活動伝播の解析だけでなく，組織学，神経化学的分析と組み合わせることより総合的な研究が期待できる。われわれはラット海馬のスライス標本を用いた神経活動による遺伝子発現の研究を行ってきたが，これを展開するため昨年度，光学計測システム（富士フィルムマイクロデバイス SD1001）を導入した。これを用いて，海馬内神経回路をなるべく保存して作成しスライスを膜電位感受性色素 RH482 (NK3630) で染めて計測し，あらたに CA2 から CA1 への二分した遅い信号伝播を見いだした。この成果は第23回北米神経科学大会（1993年11月，米国ワシントン市）で報告した。

ついで生体内で海馬表面からの計測を行う予備段階として，蛍光マクロ顕微鏡システムの開発，記録条件の設定糖を行いながら，共同研究者らが従来用いているラット小脳を対象として実験した。麻酔下ラットの小脳虫部表面を蛍光性膜電位感受性色素 RH795 で染め，近傍を刺激した場合の局所回路野活動と遠隔部を刺激して起こした経シナプス性活動を計測した。この結果は第71回日本生理学会（1994年３月，高松）で発表した。

5．神経特異蛋白質 HPC-1 の機能の解析

赤川公朗（杏林大・医・生理）
林　潤一（杏林大・医・高齢医）
小幡邦彦，山口和彦（生理研）

神経特異蛋白質 HPC-1 の生理的機能を明らかにする為，先ず mRNA に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド (AS) をもちいて以下の実験を行なった。HPC-1 は成熟した神経細胞で持続的に発現しているが，胎児期にはあまり存在しないので，成熟した２ヵ月齢ラットの脊髄後根神経節細胞を無血清培養し，AS を投与した。チュブリン結合蛋白質であるタウ蛋白質のセンスオリゴヌクレオチド (SS) を陰性コントロールとしてもちいた。その結果，AS を与えた培養神経細胞では培養24－36時間後には多くの細い突起 neurite が形成されてきた（図）。これを定量的に測定する為に多数培養細胞をビデオに記録した後，画像処理装置に取り込ませて，その突起の合計



アンチセンスオリゴヌクレオチド(AS)による発芽様現象の促進
2ヵ月齢ラットより得た脊髄後根神経節細胞の培養系にHPC-1 mRNAの翻訳開始領域付近に対する合成ASを添加した。左上：コントロール（培養24時間後)。タウ蛋白のSS(RT18)[18]添加。左下：コントロール（48時間後)。右上：15μM AS投与（24時間後)。右下：AS（48時間後）AS添加培養細胞では細かい分岐が増えている。バー＝50μm

した全長を測定した結果，AS群では2倍以上の長さがあることが分かった。ASは単に個々の神経線維を伸すのではなく，細胞体，神経線維からの多数の細突起の分岐，発芽を促した為に総計長が増したと考えられた。

次に抗HPC-1抗体の細胞内投与による機能阻害実験を試みた。ニワトリ胚の網膜explant cultureでは神経節細胞のaxotomyを行なうと，1時間以内に断端からの成長円錐の再生と突起伸張を観察する事ができるので再生の研究には有用な系である。この系を利用して抗体の軸索内投与を行ない，その効果を検討した。軸索内抗体投与には以下の方法を用いた。(1)微小ガラスピペットに抗体を詰めておき，連続的に先端より圧放出しておく。(2)顕微鏡下でピペット先端で神経節細胞のaxotomyを行なうと，断端周囲には高濃度の抗体が充満しているので，抗体は切断端より軸索内に入ると考えられる。(3)軸索がresealした後，タイムラプスビデオで連続記録を行なう。

抗体が実際に軸索内に流入することは抗体と共に蛍光ラベルしたBSAを混ぜておき，後でその細胞が蛍光ラベルされたことで確認した。その結果，ポリクロン抗体（ウサギ抗血清）を軸索内投与した場合，コントロールでは見られる成長円錐の再生が見られず，切断端より近位側の軸索では活発なsproutingが生ずる事が観察された（図3）。非免疫正常血清或いは，合成部分ペプチドに対するモノクロン抗体単独投与ではこの様な現象を認める事は出来ず，この現象はHPC-1抗血清により特異的に引き起こされていると考えられた。

これらの結果からHPC-1蛋白質は神経線維の発芽現象に深く関わる事が示された。

6．生体LB膜の構造と物性

松下　賢，下山雄平（北海道教育大・函館）
亘　　弘（生理研）

脂質超薄膜の2次元構造を明らかにすべく遷移金属イオンを付加した脂肪酸のLangmuir-Blodgett (LB) 膜を試作し，X線回折及びESRによる構造と物性の研究を行なった。LB膜の回折強度や面間隔は積層度に依存する。またVector-ESRにより交換相互作用による分子動力学が明らかになった。

【はじめに】

Langmuir-Blodgett (LB) 法は有機薄膜の作製法で下層液の表面に単分子膜を広げ基盤に膜を転移することを可能にした。この単分子膜は硝子ないしシリコン板に転移することができる。LB膜を形成するには成分分子は両親媒性でなければならない。それゆえ従来合成された両親媒性分子によるLB膜が試みられてきた[1]。本研究ではLB膜のX線回折による構造解析とESRによる動的構造について報告する。

【実験方法】

LB膜に用いた脂肪酸はステアリン酸 (CH_3 $(CH_2)_{16}COOH$) とアラキジン酸 (CH_3 $(CH_2)_{18}COOH$) の2種である。これらの脂肪酸をクロロホルムに溶解し0.5mM/lの濃度としたものを展開溶液とする。これらをLangmuir膜製造装置（協和界面科学製）で展開し，単分子膜を生成させる。X線回折とESR測定の試料作製では，Langmuir膜製造装置の水槽に下層液としてそれぞれ0.5mM/lの濃度とした塩化カドミウムと塩化マンガンを，また緩衝として0.5mM/lの炭酸水素ナトリウムを用いた。単分子膜を生成した後，表面圧を約30mN/m保った状態で，膜面に対して垂直方向にSiO_2基板を上下させ，基板表面に単分子膜を移し取る。SiO_2基板表面に移し取った約3.6㎠四方の膜をDiffractometerで回折角2°から20°までX線回折測定した。Vector-ESR測定は，日本電子のJES-FE1XG電子スピン共鳴装置にセカンドハーモニックス・ユニットとオートフェーズコントローラを付加したディジタルシステムを用いた。角度変化はゴニオメータ

によって行なった。

【結果】

ステアリン酸カドミウム膜1層と3層のX線回折パターンは，典型的な層構造を示す。成膜性が悪い場合はアルキル鎖が若干傾き面間隔は小さくなり，回折強度は小さくなる。下層液のpHが減少するに従いイオンの置換割合が増し累積層中の金属イオンが増加する。このため高度な層構造が形成され回折強度は大きくなる。つまり，主鎖は基板にたいして垂直に立つために面間隔も増加すると考えられる。

Mn-ArachidateのLB膜のESR信号では2つのシグナルが存在する。g＝3～4近辺に存在するものと，g＝2.0にブロードな信号が観測される。g＝2.0信号の肩にMnの超微細構造が見られた。高磁場側のg＝1.4のところにもMnの超微細構造が観られた。角度変化を行なうことによりg＝3～4のものはサンプル管に由来すると考えられる。g＝2.0はMnの近接化によるスピン-スピン相互作用による縮退した信号と考えられる。

高磁場側の挿入信号は回転角θ＝90°における信号である。これにより超微細構造が高周波側にも低周波側にも観測されることがわかった。このような特質は単結晶に埋め込まれたMn^{2+}イオンのESRシグナルに数多く見られるものであるが，2次元系のLB膜の場合，このようにはっきり観測されたのは珍しい例である。Pomerantz[2]らは，同じ系統のMn-Stearateで実験を行なっているが，Mnの超微細構造の観測結果は報告されていない。g＝2.5近辺のMnの超微細構造の角度変化は，2次元系の膜に特有の形をしており外部磁場と膜面の法線が90°を境として対象的な形をしている。これはMn-Arachidateが膜にほぼ垂直に配向しているが，ある傾斜角をもって分布していることを意味する。すなわち液晶モデルで考えれば脂肪酸分子が統計的平均方向即ちダイレクタにある傾斜角をもって分布するわけである。これが2つの瘤をもつ角度変化の原因である。これは一種の分岐現象と言ってもよい。理論的な角度曲線を求めるためにbest fittingを行なった。このfittingの結果から約30°の傾斜角が求められた。

【考察】

水面上単分子膜の凝集状態は表面圧のみならず，両親媒性分子の化学構造，下層液成分，pH，溶媒分子などの因子に依存する。特に単分子膜の分子運動状態が決定的影響を与える。このため累積層の前駆体である下層液上の単分子膜構造とその物性は重要である。偏光全反射スペクトルを利用した累積層の分子配向の研究によると，純粋なステアリン酸累積層ではアルキル鎖が基板に対して大きく傾いていると報告されている[3,4]。

Mnイオンは大まかにスピン-スピン相互作用している部分と超微細構造を保持している比較的diffuse分布するMnとに分類される。前者は極めて大きな広幅のスペクトルを与え，後者は，Mn^{2+}の6本線の信号を与える。両者とも顕著な角度変化を行なうことから，一様にLB膜中に共存し配向しているものと考えることができる。π-A曲線が得られた直鎖脂肪酸の断面積は2.0nm^2/Moleculeであり，1個のMnイオンで2個の脂肪酸イオンとイオン結合しているのでMnイオンは0.4nm^2の面積中にあり，面内のスピン-スピン相互作用はそれほど大きくないと思

われる。Mn^{2+}のESR信号のg値の角度変化より約30°の膜の法線方向からの傾斜がわかった。又，強いスピン-スピン相互作用による線幅の広幅化が観測され，この線幅も角度依存することが示された。線幅は0°と180°に極大を，magic angleに極小を与えることから，法線方向のMn-Mn相互作用が大きいことが予想される。膜面方向の線幅は最大ではないものの，ある程度の強度を与えることから，無視できぬMn-Mn相互作用があると考えられる。

【参考文献】

[1] T. Kajiyama, Y. Oishi, MEMBARANE, 17, 332 (1992)

[2] M. Pomerantz, Solid State Commun, 27, 1413 (1978)

[3] H. Kumeharab and S. Miyata, OME87-1, 1 (1987)

[4] K. Mizushima, T. Nakayama and M. Azuma, Jpn. J. Appl. Phys, 26, 772 (1987)

7．^{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，中村浩二，林　知也（岐阜大・医・第2生理）

加藤一夫（岐阜大・医・第1病理）

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)（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，pH 3.8のF型状態で，BPA分子内のGln-392とCys-435の間で1～2ヵ所加水分解を受け，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ルブミン(BMA)は，同様の条件で，12%でもゲル化しない。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_{IS} (HDO)) が大幅に短縮することが分かった。そこでT_{IS}を用いた交差緩和時間のイメージングの機構解明のための基礎研究として，T_{IS}(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%, pD 4.0, 0.10 M Cl^-) 中には高分子量の集合体が存在したが，BPA溶液(13.8%, pD 7.2, 0.10 M 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$\gamma H_2/2\pi = 10 \sim 69$Hzを用いて測定した。BMA溶液(9.6%, pD 4.0)での作用スペクトルは，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，BPA*-gel (8.9%, pD 4.0)の作用スペクトルは，f_2照射強度が弱いときは（γ

$H_2/2\pi$ = 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。さらに，タンパク質自身のプロトンから離れた部位，例えば -8.79, -13.00, -18.99 ppm を f_2 照射して求めた $1/T_{1S}$ (H_2O) vs タンパク質濃度 (W (%)) プロットでは，BPA*-gel では大きな勾配で増加したが，BPA 溶液 (pD 7.1 ; BPA は負荷電) の場合は 5 ～12％にわたって殆どゼロであった。

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の寄与によるものと考えられる。

8．ミトコンドリア及びペルオキシソームのβ酸化酵素系の電子移動の比較

三浦　洌，志賀　潔，仁科安三（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）

アシル CoA デヒドロゲナーゼは FAD を補酵素とするフラビン酵素でミトコンドリアマトリックスにおける脂肪酸のβ酸化の最初の反応を触媒する。本酵素には基質の炭素鎖の長さに対して特異性が異なる数種の酵素が存在する（短鎖，中鎖，長鎖のアシル CoA デヒドロゲナーゼなど)。基質の脱水素反応は酵素の glutamate 残基による α －プロトンの引き抜きとβ位の水素のハイドライドとしてのフラビンへの転移が協奏的に起こることが示されている。短鎖アシル CoA デヒドロゲナーゼ (SCAD) の反応中間体の共鳴ラマンスペクトルを測定し，本酵素の基質活性化の機構を検討した。SCAD は butyryl-CoA と反応する紫色をした反応中間体 (purple complex) を生ずる。この complex の 632.8nm 励起による共鳴ラマンスペクトルを図 1 に示す。基質由来のバンドの帰属のために，同位体でラベルした基質を用いた測定も行なった。1,615cm^{-1}のバンドは還元型フラビンのものであり，1,577，1,525cm^{-1}のバンドは crotonyl-CoA （butyryl-CoA の酸化生成物）のものである。1,577cm^{-1}のバンドは同位体シフトの結果より主に C(1)＝O の伸縮振動に由来することがわかる。このバンド位置は普通の C＝O 伸縮振動に見られる振動数 (1,600cm^{-1} 以上）に比べてかなり低波数にあり，C(1)＝O の二重結合性が相当に弱くなっていることが示唆される。そこで，水溶液中での crotonyl-CoA のラマンスペクトルを測定し，水溶液中と purple complex 中での crotonyl-CoA の構造を比較した。図 2 は結果を要約したものである。同位体効果の様子は似ており，purple complex に結合しているリガンドが crotonyl-CoA であることが確認された。水溶液中では 1,627cm^{-1}にみられる C(1)＝O の伸縮振動のバンドが，complex 中では 50cm^{-1}低波数シフトした 1,577cm^{-1}にみられる。これは，crotonyl-CoA の C(1)＝O と酵素との

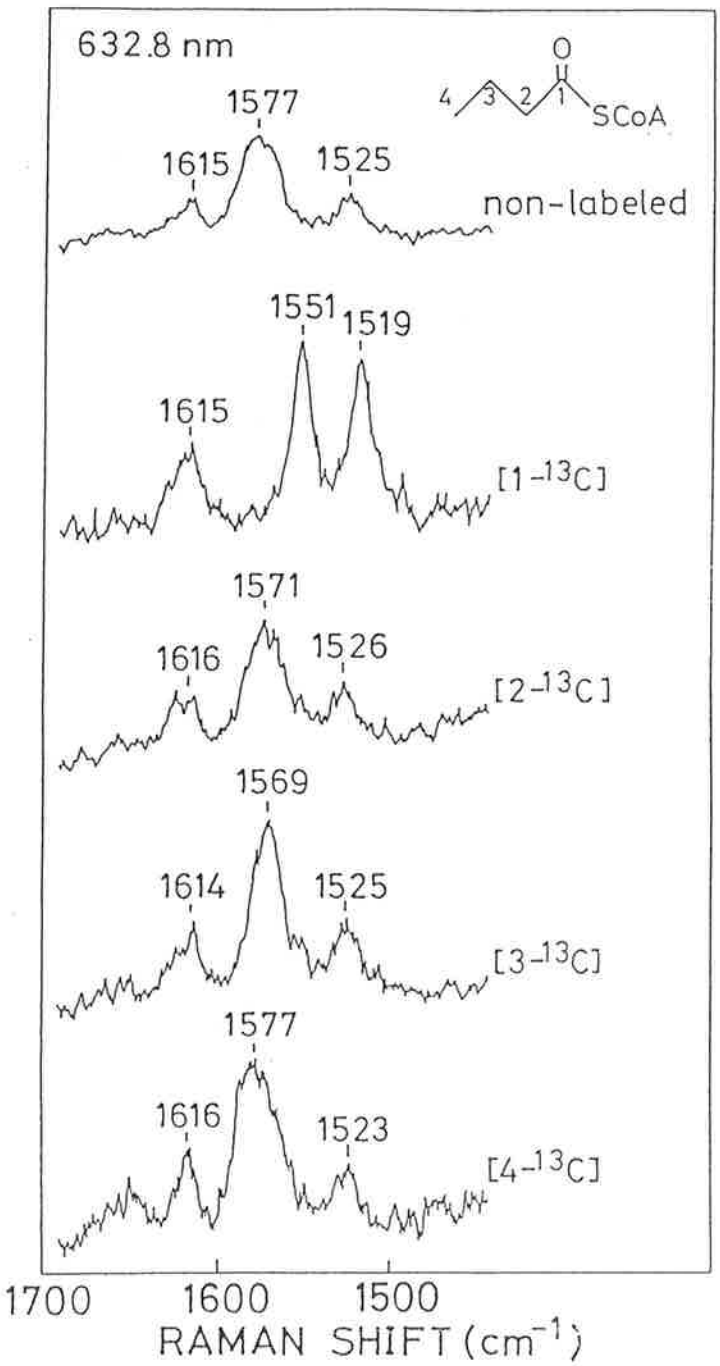


図1・短鎖アシル－CoAデヒドロゲナーゼとbutyryl-CoAとの反応で生ずるpurple complexの632.8nm励起による共鳴ラマンスペクトル。

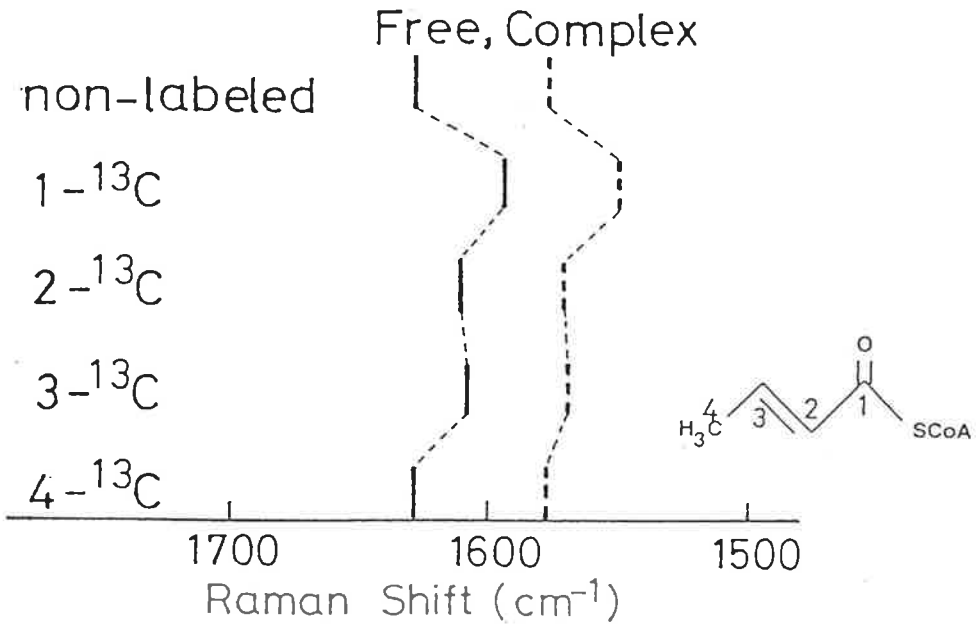


図2・ purple complex と水溶液中での crotonyl-CoA のラマンバンドの同位体シフトの比較。

間でかなり強い相互作用があることを示している。最近の Kim らのX線血漿構造解析によれば，C(1)＝Oと FAD のリビチル基の 2^1-OH とが水素結合しており，50cm^{-1}のシフトはこのような水素結合によるものと考えられる。C＝O伸縮振動の振動数とC＝Oの結合距離との経験的に得られている関係を利用すると，crotonyl-CoA は purple complex の中で10％ほど二重結合性が弱くなっていると見積もることができる。水溶液中に比べてかなり強い水素結合が存在していることになる。ここで考えた水素結合は酸化型酵素一基質複合体や遷移状態でも作用しているものと考えられる。この強い水素結合が基質を遷移状体での構造に向かって歪ませ，基質を活性化し反応性を高めているものと考えられる。

9．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，宮本　学，中張隆司，吉田秀世，相馬義郎（大阪医大，生理Ⅰ）
村上政隆，瀬尾芳輝（生理研）

複雑な生体システムの理解には分析的研究と結合的研究が必須である。これには実験レベル，

理論レベル，技術レベルおよびシミュレーション等の実用レベルの研究を必要とする。今年度の研究では実験レベルと理論レベルの研究において進展があった。生体システムを熱力学概念にする場合，消費散逸過程とパワー変換過程は，局所の各パワーの流入と蓄積，輸送および反応といった4種に分類できる。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という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する。従来有効パワー過程としてギブスの自由エネルギーを考えてきたが，この場合システムの温度，圧が均一でかつ外界のそれとほぼ等しいという厳しい条件を必要とした。

現実の動的システムは開放系であって，温度，圧，成分が不均一でかつ刻々と変化し，かつ外界のそれらと異なる。したがって釣合についてはギブズの自由エネルギー以外の，システムの温度，圧に条件を加えない熱力学ポテンシャルを探す必要がある。押田はこのようなポテンシャルとして環境媒体の温度，圧一定の条件下でシステムがなす最大仕事を表現するポテンシャル：エクセルギーが有用であることを示した。このエクセルギーへんか示す式はギブスが別途示している有効エネルギー変化の式と同じである。したがってシステムのエクセルギー変化は外部流入エンタルビーの項とエントロピーの項で示される。この関係から環境媒体の温度，圧一定の条件下で次のシステムの“パワー釣合式”を導くことができた。

$P_{ex} = dE/dt + \Phi$

ここではP_{ex}は実測可能な有効流入パワー，dE/dtはエクセルギー変化速度であり，Φは散逸関数である。これに保存的変換伝達パワーを考えると，この式は環境媒体の温度，圧一定の条件下のあらゆるレベル，あらゆる種類のシステムに適用可能となる。

回路網熱力学の結合枝グラフの記号法の結合枝は有効流入パワーを，容量体はエクセルギーを変化速度を，抵抗体はパワー散逸を，さら変換体は保存的変換伝達パワー過程を表現するものである。したがって，これに直列，並列の記号法を加えた結合枝グラフ法であらゆる動的システムの表現が原理的に可能となるとの結論を得た。

実用レベルの例として下記の膜輸送モデルのシュミレーションを報告してきた。

Imai, Y., Yoshida, H., Miyamoto, M., Nakahari, T. and Sohma, Y. (1993) Network simulation of transport system on frog skin. Abstracts of XXXII Congress of the International Union of Physiological Sciences, 179.3/p,

Sohma, Y., Argent, B. E., Gray, M. A. and Imai, Y. (1993) Mathematical analysis of ion transport in pancreatic duct cells.
Abstracts of XXXII Congress of the International Union of Physiological Science, 356.3/p

Imai, Y. and Sohma, Y. (1993) Understanding epithelial transport: the synthetic approach using network thermodynamics. J. Physiol., 459,. 306p

Sohma, Y., Argent, B. E., Gray, M. A. and Imai, Y. (1993) Computer model of pancreatic duct cells. J. Physiol., 467, 243p

10. 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（日大松戸歯）
村上政隆，瀬尾芳輝，石川　透（生理研）
吉村啓一（北大歯）

【目的】

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－分泌関連の一部が明らかにされた。その一方で，分泌を持続的に保持する機構は未だ明らかでない。例えば，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ず，用量を増すとこの傾向は強まり，分泌抑制が顕著になる。本研究は，この問題を解決するために，水分泌が持続するコリン刺激時の細胞内情報伝達機構を調べ，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らかにする事を目的としている。

初年度は，1）アセチルコリン 1μM 刺激では初期に 250-300μl/min-g 湿重量の大量分泌を起こした後，減少し，60分で 100μl/min-g，120分で 80-60μl/min-g に低下した。コリン 40mM の刺激では，90分まで 2000-250μl/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なること (Murakami et al., 1986, AJP 251, G84-89) を追試。2）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，動脈への正味の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。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。K流出機構は，アセチルコリンによる持続的分泌減少反応と直接対応しない事を示唆した。今年度は，従来のバッチ法に加え，単離腺房標本を二波長蛍光光度計内で perifusion する系を確立し，細胞内の Ca の変化を半定量的に追跡した。

【方法】

1）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，コラゲネース処理により腺房細胞の標本を作製した。2）バッチ法：Fura-2AM の負荷後，通常の石英キュベット内で攪拌しながら二波長蛍光法にて測定した。(バッチ法，杉谷，石川，村上)。コントロール液組成 (mM) は，Na＝95, NMDG＝50, K＝4.3, Mg＝1.0, Ca＝1.0 glucose＝5.0, HEPES＝10, Cl＝153.3 とし，コリン刺激は NMDG をコリンで置換した溶液を同量加え，コリン最終濃度 25mM で刺激した。アセチルコリン刺激は 10μM で行った。3）perifusion 法 [Yoshimura K & Nezu E, Jpn J Physiol, 41:443-459, 1991]：a）あらかじめ灌流液と混和した高分子ビーズ (Biogel) を石英ガラス先端に充填し，その上に単離腺房とビーズを混和した液を重畳する。ビーズ表面に細胞が固定され上から灌流液を流しても細胞は流出せず，腺房周囲を灌流液が還流する（吉村，村上)。b）Fura2-AM 5μM を灌流液に 5 分間加え細胞内に負荷し，その後コントロール液にて細胞外液の

Fura2-AM を15分間洗い流した後実験を行った。Fura2-AM を負荷し，洗い流す過程を連続的にモニター可能であるので，バックグラウンドの蛍光の測定が容易であり，細胞内と細胞外のコンバートメントからの相対的な蛍光量の推定ができる。4）灌流臓器レベルの蛍光測定 [Seo JT et al, Pflugers Arch 426: 75-82, 1994]：摘出顎下腺をキュベット内で灌流し，Fura2-AM 細胞に負荷し，40mM コリンと 1μM アセチルコリンによる細胞内 Ca 濃度の変化を測定した。蛍光測光は 340.38nm の 2 波長で励起光を試料に照射し，510nm で測光した。測定値は，上記 3，4 の方法ではバックグラウンドを差し引いた後，比をとった。1 の方法では，実験後 tritonX で可溶化し，EGTA を加え Ca 蛍光の校正をおこなった。

【結果と考察】

1）バッチ法にて顎下唾液腺細胞の細胞内 Ca 濃度を測定した。Ca 存在下，静止時細胞内 Ca 濃度は，54.9 ± 0.6nM。アセチルコリン 10μM 投与で急激に上昇し，3 秒で 100.4 ± 2.0nM のピーク値を取った後指数関数的に減少し，1 分には 73.6 ± 0.8nM まで低下した。コリン 25mM 投与でわずかに上昇し，3 秒で 63.6 ± 3nM の値を取り，つづく30秒間 64.5 ± 0.9nM のレベルを保った。アセチルコリン 10μM を重畳すると細胞内 Ca 濃度は急激に増加し，3 秒には 80.2 ± 4.1nM のピーク値をとりその後指数関数的に低下した。これらの減少は，コリン刺激による水分分泌の際は細胞内 Ca 上昇は低く調整され，プラトー値が維持されていることが示された。コリン刺激の濃度はバッチ法では 25mM が限界であり，高濃度の刺激は灌流系で行った。また，単離細胞のアセチルコリンに対する用量依存性は，10μM で最大の細胞収縮反応を得ているのでこの濃度を用いた。

細胞内で上昇する Ca の origin を Ca nominal free 実験により調べた。アセチルコリン 10μM 投与で上昇するピーク値は Ca nominal free による変化が少なく，ほとんどは細胞内の Ca store から動員されることが分かった。コリン 25mM 投与でのわずかな上昇は，Ca free でも同様に観察された。このことはコリン刺激でも細胞内の Ca store から動員されることを示している。

2）今回開発した蛍光測定用石英ガラスを用いた細胞灌流系は，吉村の開発した amylase 測定系の改良型であり，細胞の単離後一部を測定に，残りを半行して酸素加液で灌流すれば細胞の反応性は30分は保持されることが確認された。バッチ方式と異なり，酸素，基質を常に同じ濃度で系に与える事が可能であり，薬剤の洗い流しの効果を始め，血管灌流臓器でのみ可能であった多くの情報をこの系で得ることができる。アセチルコリン及びコリンに対する細胞内 Ca の変化を測定した結果，バッチ法と同様の結果を得た。

3）灌流顎下腺でアセチルコリン及びコリンに対する細胞内 Ca の変化を測定した結果，アセチルコリンでの反応は 1μM の濃度でも大きく，刺激中に減少する単離細胞と同様の時間経過を得た。コリンは 50mM の高濃度で刺激したが，細胞内 Ca 上昇は少なく，刺激中一定レベルを保ち単離細胞と同様の時間経過であった。単離細胞と灌流顎下腺で同様の結果が得られ，ふたつの実験系のそれぞれの利点を生かすことが可能になった。

今回の結果は，細胞内 Ca 濃度が低いレベルで持続することがコリン刺激で大量の水分分泌量

を持続的に維持するために必要であることを示した。細胞内 Ca 濃度の調節機構が次の課題になる。

11. 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）
葉原芳昭・菅野富夫（生理研）

副腎クロマフィン細胞はコリン作業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よく知られている。しかしながら，この受容体関連分泌機構が発育中のとの時期に発現ならびに完成するのかはよく解っていない。そこで今回の共同研究では，生後発育中のラットクロマフィン細胞においてニコチニックレセプターとムスカリックレセプターの発現とその成熟過程を細胞内カルシウムの変動を指標にして明らかにした。

実験には生後 0 日齢（出生時），3 日齢，1 週間，2 週間，3 週間そして 8 週間（成獣）の SD 系雄ラットを用い，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 10μM のニコチン (Nic) および 200μM ムスカリン様物質であるメサコリン (Mech) をそれぞれ作用させ，細胞内カルシウムの動態を調べた。またメサコリンは，ムスカリニックレセプターばかりでなく一部ニコチックレセプターにもアゴニストとして作用することが知られているのでブロッカーとして 10μM ヘキサメソニウム，10μM アトロピンを用いてその効果を調べた。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。

その結果は

(1) ニコチン刺激後の細胞内カルシウム濃度は全ての日齢のクロマフィン細胞において明確で高い変動値を示した（図 1A-F)。

(2) メサコリン刺激後の細胞内カルシウム濃度は生後 0 日，3 日齢のクロマフィン細胞では一般的に明確でないものや低い変動値を示した。生後 1 週から生後 8 週のクロマフィン細胞ではその変動は明確に高い値を示した（図 1A-F)。

(3) どの日齢においても，メサコリンとニコチンの両方に反応するクロマフィン細胞（図 1A, C, E）と，ニコチンにのみ反応する細胞（図 1B, D, F）の 2 種類が観察された。

(4) 細胞数ではメサコリンとニコチン両方に反応する細胞の方が，ニコチンのみに反応する細胞よりも多い傾向があった。

(5) ブロッカー試験によりメサコリン＋ヘキサメソニウムでもメサコリン単独刺激と同じ反応を示したが，アトロピンではメサコリンの反応が押さえられた。したがってクロマフィン細胞ではメサコリンはムスカリックレセプターのみに反応することがわかった。

今回の結果から，ラットクロマフィン細胞ではニコチニックレセプターを解する分泌機構は，

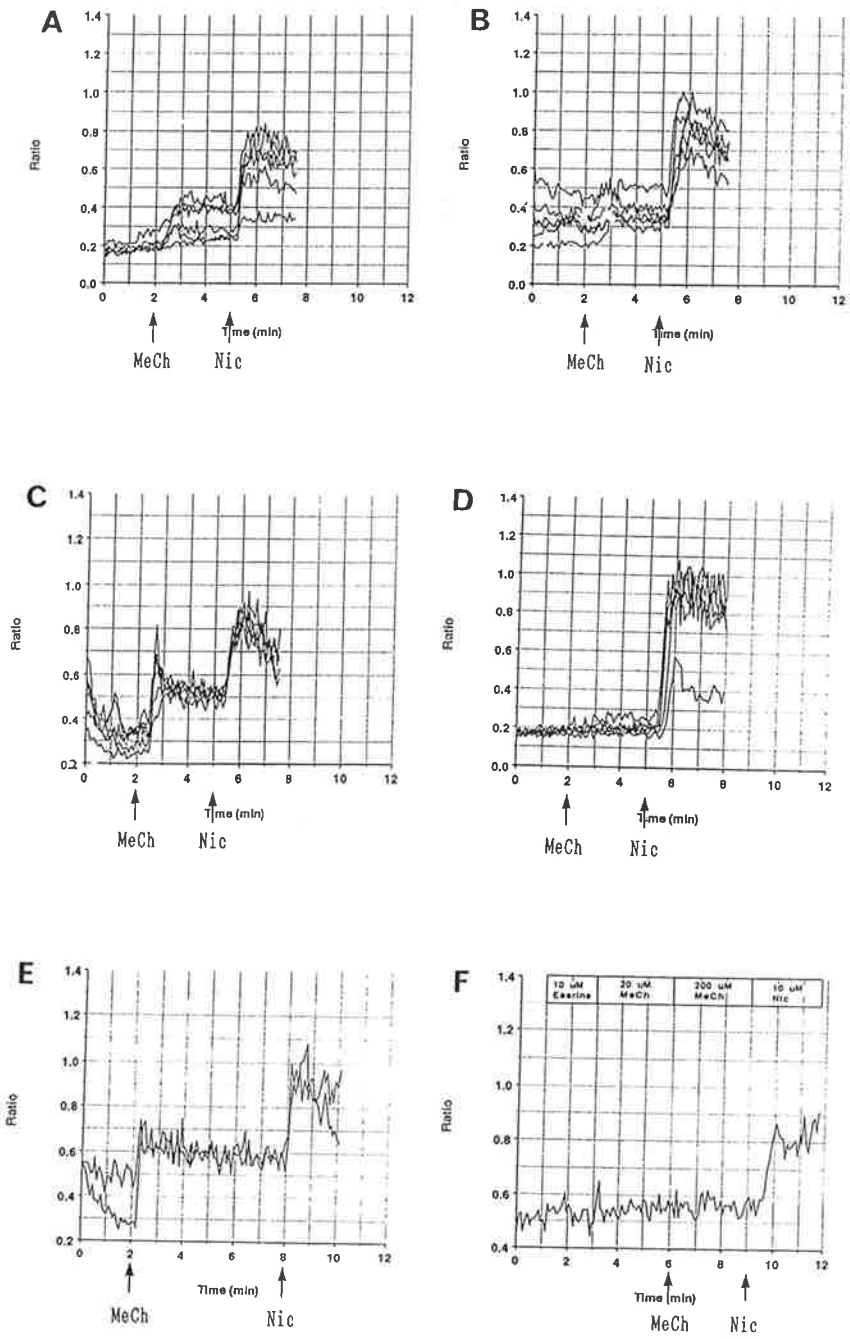


図1．ラット副腎クロマフィン細胞の細胞内カルシウム濃度の変化。
A, B：生後0日齢ラット　C, D：生後1週齢ラット　E, F：生後8週齢ラット
MeCh: 200μM メサコリン刺激，Nic: 10μM ニコチン刺激。

生後０日齢ですでに明確に発現，完成していた。しかしながらムスカリニックレセプターを介する分泌機構は生後０，３日齢ではまだ未熟で，生後１週でほぼ完成していた。またどの日齢においても，ニコチンとメサコリンの両方に反応する細胞とニコチンにのみ反応する細胞の２種類の細胞の存在が考えられた。

12. 膵腺房細胞内 Ca イオン動態に対するアラキドン酸由来メッセンジャーの効果

浅田尚登（北海道教育大・教育）
葉原芳昭，菅野富夫（生理研）

膵臓腺房細胞の分泌刺激物質の刺激に応じた細胞内 Ca プールから Ca イオン遊離は，一つには細胞膜脂質であるイノシトールりん脂質の代謝によってできるイノシトール三リン酸 (IP_3) により引き起こされると理解されている。イノシトールりん酸の生成とともにりん脂質の側鎖の分解に伴ってアラキドン酸 (AA) が生成され，その代謝産物であるプロスグランジン (PG) やロイコトリエン等が細胞自身やその近傍の細胞に何らかのメッセンジャーとして作用していることが示唆されている。実際，細胞外液への PG の添加が膵腺房からの酵素放出反応にたいして促進的，抑制的，無効である，など様々な報告がなされている。しかし，酵素放出のメッセンジャーである細胞内 Ca イオン濃度 ($[Ca^{2+}]_c$) への効果についてはほとんど報告がない。ここでは，ラット膵腺房からの酵素放出反応を抑制すると報告されているプロスタグランジン E_2(PGE_2)[1] を用いて，膵腺房細胞内の $[Ca^{2+}]$ 動態にたいする効果を調べた。

コラゲナーゼ単独消化により得たラット膵腺房標本を，倒立顕微鏡のステージ上で室温にて Hepes 緩衝 Ringer 液で表面灌流しておき，CCK-8 の持続刺激に応じた $[Ca^{2+}]_c$ 動態の PGE_2 前処置または添加による変化を fura-2 顕微蛍光測光法を用いて捕らせようとした。なお，CCK-8 濃度については 10pM ～ 100pM とし，PGE_2 濃度については１または 3μM とした。PGE_2 を単独で加えただけでは $[Ca^{2+}]_c$ に変化は認められず，さらに，低濃度の CCK-8 刺激に応じた $[Ca^{2+}]_c$ 振動，および高濃度刺激に応じた $[Ca^{2+}]_c$ 上昇のいずれにも，PGE_2 前処置，または添加による明らかな変化は認められなかった。これらの結果は，おそらく，PGE_2 が膵腺房細胞内の $[Ca^{2+}]$ 動態にはほとんど効果を持たないことを示している。しかし，AA については，最近，AA の添加が $[Ca^{2+}]_c$ 振動を引き起こすこと[2]，AA を細胞内で増やす処置が Ca^{2+} 遊離の抑制と Ca^{2+} くみ出しの活性化を介して $[Ca^{2+}]_c$ 依存性膜電流を抑制すること[3]が示されて，AA が腺房細胞内の $[Ca^{2+}]_c$ 変動の調節に直接関わっていることが示唆されいることから，AA 由来メッセンジャーの $[Ca^{2+}]_c$ への効果について未だ検討の余地があるものと思われる。

【文献】

１） Mössner, J., Secknus, R., Spiekerman, G. M. Sommer, c., Biernat, M., Bahnsen, H. & Fischbach,

W. Am. J. Physiol., 260, G711-G719 (1991)
2) Tsunoda, Y. & Owyang, C. Biochim. Biophys. Res. Commun., 194, 1194-1202 (1993)
3) Maruyama, Y. J. Physiol., 463, 729-746 (1993)

13. カエル心臓内神経節細胞におけるプリン作動性レセプターとシグナル伝達機構

菅野隆浩（福島県立医大）
大森行雄（旭川医大）
葉原芳昭，菅野富夫（生理研）

ATPは，両生類の心臓において負の変時作用があることが報告されている。また，培養されたラット副交感性心臓神経節細胞において，ATPはアセチルコリンとは異なった受容体チャンネルを介した興奮性の作用をもつことが報告されている(Fieber et al, J Physiol, 434: 239-256, 1991)。本研究では，カエルの副交感性の心臓内神経節細胞を用いて各種プリン作動性受容体に対する特異的アゴニストを用いて，カエル心臓内神経節の細胞における各受容体刺激の興奮性の特徴を細胞内カルシウム濃度を指標として決定することを目的とした。しかし，カエルからの心臓神経節細胞の分離を試みたが，細胞を確実に同定できるまでには至らなかった。そこで，細胞分離方法が確立されているラット副腎髄質細胞を用いた。同細胞ではすでに細胞外ATPの細胞内カルシウム濃度に対する効果が藁科らによって報告されているため，今回は，① muscarinic agonistであるbethanecholとmethacolineの作用の違いと② muscarinicおよびnicotinic受容体刺激に対する細胞内カルシウム濃度の反応に細胞間の違いが見られるか否か検討した。

ラットより副腎髄質細胞を分離した後，fura-2を細胞内へ取り込ませ，その蛍光反応を用いて，細胞内Ca^{2+}濃度の変化を測定した。細胞の入ったchamber内をmuscarinic agonistであるbethanechol (200μM) あるいはmethacoline (200μM) 溶液にて灌流しその効果を観察した後，nicotinic (10μM) にて，細胞の反応性が維持されていることを確認した。

bethanecholによって催起される細胞内Ca^{2+}の上昇はmethacolineによって催起されるそれに比較し小さかった。また，methacolineによる細胞内Ca^{2+}の上昇はhexamethoniumによってほとんど影響を受けず，atropineの追加投与によって刺激前のレベルにまで低下した。従って，その後の実験にはmuscarinic receptor agonistとしてmethacolineを用いておこなった。nicotineに反応した423細胞において22％の94細胞がmethacolineにほとんど反応しないことが解った。

以上のことから，ラット副腎髄質細胞に対しては，methacolineはmuscarinic作用がほとんどであること，methacolineとbethanecholとの間に薬理作用の相違が存在することが示唆された。また，副腎髄質細胞においては細胞によってmuscarinic agonistに対する反応性の違いが存在することが解った。今後心臓神経節細胞の分離を哺乳類を含めて試み，今回行ったアプローチ法を

応用して行きたいと考えている。

14. 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・医）
葉原芳昭，菅野富夫（生理研）

モルモット (guinea pig) 副腎髄質細胞を種々のレセプターアゴニストにより刺激した際の，細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変動の様式と，副腎灌流標本から得られる分泌応答の関係を検索した。また薬理的な処理がしれらの応答に及ぼす効果を調べ，刺激受容時の Ca^{2+} 動態と分泌の関係につき研究を行った。

【方法】

カテコルアミン分泌の計測は，摘出モルモット副腎を副腎静脈より逆向性に灌流し，灌流液を電気化学検出セルに直接導入することにより実時間連続測定を行った。$[Ca^{2+}]_i$ の計測は，副腎髄質をコラゲナーゼ処理し得られた細胞に Fura-2 を負荷し，デジタル画像解析法を適用した。

【結果と考察】

1） Nicotine (10μM) 以外に，ムスカリックなアゴニストである carbamy1-beta-methylcholine (BCh; 10μM), angiotensin II (AII; 100nM), bradykinin (BK; 100nM) による刺激で $[Ca^{2+}]_i$ 上昇と catecholamine (CA) 分泌応答が観測された。これらの刺激で，$[Ca^{2+}]_i$ レスポンスは持続的な上昇を示したが，分泌応答は脱感作傾向を示し，特に，AII ではレスポンスは一過性に終息した。この差異が，髄質細胞に元来存在する性状であるのか，細胞分離処理により誘発されたものかは今後明らかにする必要がある。

2）Ca^{2+} 無添加溶液中では BCh, AII, BK 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は 400nM 程度でピークに達し，2－3分で終了する小レスポンスを示した。従って，細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出は $[Ca^{2+}]_i$ 上昇に僅かに寄与するのみで，これらのG蛋白共役型のレセプター刺激においても大部分の Ca^{2+} は細胞外からの流入によることが示された。

3） BCh, AII, BK 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は nifedipne により抑制された。また，BCh による分泌は nifedipine (30μM) で55％抑制され，逆に Bay K 8644 (1μM) により 46% 増強された。このことは，電位依存性 L-型 Ca^{2+} チャネルが，ニコチニックレセプター刺激のみならず，G蛋白共役型のレセプターの刺激においても重要な役割を果たすことを示している。このレセプターと Ca^{2+} チャネルの間に介在する過程は現在不明であるが，細胞内メッセンジャーの賦活によりある種の K^+ チャネル（例えばMチャネル）が閉じ，脱分極が生じている可能性が指摘できる。

4） 一般にG蛋白共役型のレセプター刺激後の細胞内への Ca^{2+} 流入を遮断する薬剤として知られている SK&F 96365 (30μM) は，BCh, AII, BK 刺激による $[Ca^{2+}]_i$ を抑制し，BCh による分泌

の68%を抑制した。しかし，SK&F 96365 は nicotine や高 K^+ 溶液 (56mM) によって引き起こされる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇や分泌も効果的に抑制した。従って，この場合の SK&F 96365 による顕著な抑制効果は，細胞内情報伝達物質に仲介される Ca^{2+} 流入とL－型 Ca^{2+} チャネルを通る Ca^{2+} 流入の両者をともに阻害したためと考えられる。

15. アルドステロンによる副腎皮質球状層細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度の変化

山口賢一，藁科　彬（新潟大・医）
葉原芳昭，菅野富夫（生理研）

【目的】

副腎質球状層細胞からのアルドステロン (ALDO) 分泌の促進は，細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_c$) の増加によって媒介されることが知られている。我々は昨年度の研究で，ALDO 分泌の代表的刺激因子であるアンギオテンシン II (AII) とカリウムに応答した当該細胞内 $[Ca^{2+}]_c$ の上昇が，ALDO 自身を含むコルチコイドによって抑制されることを見いだし，オートクライン的分泌制御機構の存在を示唆した。本年度，コルチコイドに対する球状層細胞 $[Ca^{2+}]_c$ 反応を統計的に解析すること，加えて，内因性に生じる ALDO の役割を調べる目底で実験を行った。

【方法】

ラット副腎皮質から capsular tissue を剝離した。細断後，コラゲナーゼ処理し，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，$[Ca^{2+}]_c$ の変化を顕微鏡下の傾向測光 (F340/F380) で求めた。球状層細胞の同定は，Talt らの基準 (Proc. R. Soc. Lond. B., 185: 375-407, 1974) に従った。

【結果】

1．灌流液への AII(500pM)，または K^+ (10mM) の添加は，1分以内の潜時で $[Ca^{2+}]_c$ を急峻に増加させた（図1）。初期ピーク値の出現後，AII の場合は振動的な，K^+ の場合は比較的平滑なプラトー状態の Ca^{2+} 増加が 30 分以上持続した。

2. このプラトー期にデオキシコルチコステロン (DOC), ALDO，デキサメタゾン (DEX) を与えると (10μ-1mM), $[Ca^{2+}]_c$ は漸次低下し，数分後に最低の水準となった（図1）。コルチコイドの効果はいずれも容量依存的で，100μM 内外から出現し，0.5-1mM では前例 (n＝25) で著しい $[Ca^{2+}]_c$ の低下が認められた（表1）。コルチコイド (1mM) を灌流液から除いても，限られた観察時間（約10分）では，$[Ca^{2+}]_c$ は回復しなかった。

3．これらのステロイドは AII 又は K^+ 刺激非存在下の $[Ca^{2+}]_c$ を変えないか，あるいは僅かに低下させた（表1）。

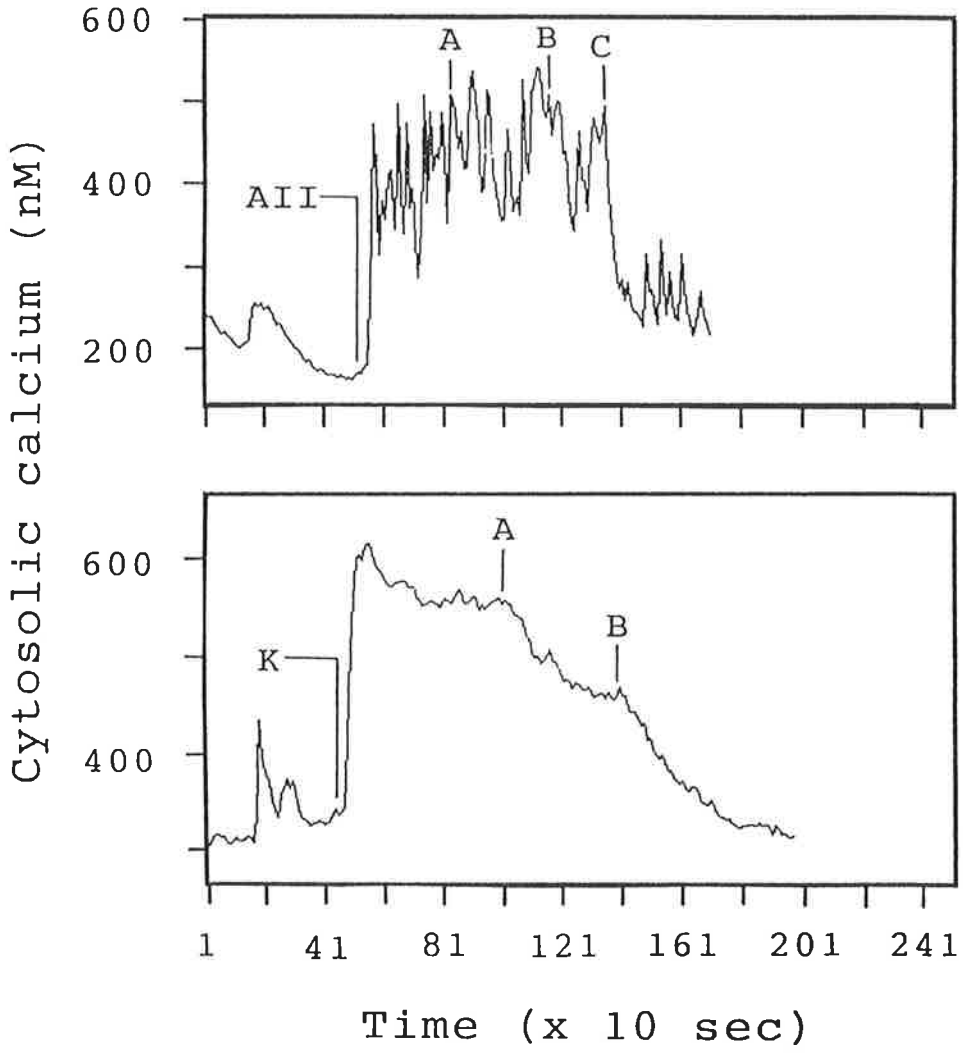


図1　アンギオテンシンII (AII) とカウムで惹起した副腎皮質球状層細胞の細胞内遊離カルシウム濃度の反応におよぼすアルドステロンの効果。
上図：細胞灌流液を図に示す時点で，0 (AII), 0.05 (A), 0.5 (B), 1 mM (C) のアルドステロンを含むAII 溶液 (500pM) に切り替えた。下図：細胞に 10mM のカリウム刺激 (K) とともに 0.5 (A), 1.0 mM (B) のアルドステロンを与えた。

4．チトクロム P450 阻害剤，2-methyl-1, 2-di-3-pyridyl-1-propanone （metyrapone: 0.1 または 0.5mM）の添加は，数分後から基礎レベルの $[Ca^{2+}]_c$ を漸増させた。AII 又は K^+ 刺激存在下で約10分間 metyrapone を作用させ後 DOC (1mM) を与えると，その $[Ca^{2+}]_c$ 低下作用が抑制された。

【論議】

1．我々は，球状層細胞の $[Ca^{2+}]_c$ に及ぼすコルチコイドの効果の観察を本年度も引続き繰り返し調べ，昨年報告したその $[Ca^{2+}]_c$ 減少作用を一層確かなものとした。

2．AII, K^+ 添加後の，ALDO 分泌活性の指標と見なし得る $[Ca^{2+}]_c$ の上昇が，ALDO によって抑圧されるとの結果は，このホルモンの分泌調節にオートクライン的機構が働くかも知れないことを示唆している。

3．ALDO への転換を metyrapone によって抑える条件下で DOC を与えると，その $[Ca^{2+}]_c$ 低下作用が部分的に阻害された。この結果は，DOC の効果の少なくとも一部分が，これから生じた ALDO によることを示唆している。しかし，metyrapone の不完全な抑制作用や，DEX の $[Ca^{2+}]_c$ 低下能を考慮すると，$[Ca^{2+}]_c$ 減少作用は，鉱質・糖質両コルチコイドに共通する属性であると言えよう。

4．コルチコイド生合成阻害剤，metyrapone が，非刺激下の $[Ca^{2+}]_c$ を高めたあとの結果は，内因性に生じるコルチコイドが緊張性に $[Ca^{2+}]_c$ 低下作用を営む可能性を示唆している。

表1　コルチコイドによる副腎皮質球状層細胞の細胞内遊離カルシウム濃度 $[Ca^{2+}]_c$ の減少。

刺激[a]	投与前値[b]	steroid	最低値[c]	時間[d]	N	P
AII (500pM)	719±131	DOC	259±53	439±173	5	<0.05
K^+ (10mM)	488±90	DOC	292±91	304±84	3	<0.05
な　し	263±22	DOC	240±38	430±76	5	ns
AII (500pM)	805±134	ALDO *	344±50	326±127	3	<0.05
K^+ (10mM)	650±48	ALDO *	403±40	443±57	4	<0.001
な　し	340±4	ALDO	254±8	404±29	4	<0.01
AII (500pM)	1048±103	DEX	444±89	379±75	6	<0.01
K^+ (10mM)	784±117	DEX	570±102	398±108	4	<0.05
な　し	168±74	DEX	133±47	463±72	4	ns

DOC は deoxycorticosterone を，ALDO は aldosterone を DEX は dexamethasone を表す。コルチコイドの濃度は，＊のみ0.5または1mM，残りはすべて1mM である。a：コルチコイド投与前に与えた ALDO 分泌刺激の種類。b：コルチコイド投与前の $[Ca^{2+}]_c$ 値 (nM)。c：コルチコイドによって惹起された $[Ca^{2+}]_c$ の最低値 (nM)。d：最低値出現までの時間 (sec)。値は平均± SEM。ns は $P > 0.05$ である。

16. 温熱処理後の膵腺房細胞の Ca^{2+} 動態の変化

近藤　隆（神戸大・医）
葉原芳昭，菅野富夫（生理研）

がん温熱療法が臨床に導入され，有効例が多く報告されているが，温熱による細胞致死および機能障害の機構は必ずしも明らかになっていない。今までの共同研究を通じて，温熱処理による培養主要細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加および温熱増感作用を有する各種カルシウム代謝阻害剤の併用効果について検討してきた。その結果，42℃あるいは44℃（1時間）の温熱処理は不可逆的に細胞内の Ca^{2+} 濃度を高めること，TMB-8，ベラパミル，ジルチアゼム，および W-7 は併用時にさらに細胞内 Ca^{2+} 濃度を高めること，またこれらは主に細胞外液からの Ca^{2+} 流入とその蓄積によることを示した。本年度は正常組織の生理機能に対する温熱処理の影響を検討することを目的とした。材料として分泌機能を有する膵腺房を選び，温熱処理後の腺房をカルバコール (CCh) で分泌刺激し，その後の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を生理機能の指標として調べた。8週令の雄 SD ラットの膵臓より腺房をコラゲナーゼ処理により単離し，fira-2AM を取り込ませた。37℃－45℃，1時間の温熱処理後，顕微蛍光画像解析装置により細胞内 Ca^{2+} 濃度を蛍光強度 340nm/380nm の比として測定し，その分布を調べた。温熱処理により腺房細胞内 Ca^{2+} 濃度は増加し，その分布はより不均一となった。温熱処理後も対照37℃処理群と同程度の細胞内 Ca^{2+} 濃度を示す腺房を選び CCh (3×10^{-7}M) 刺激後の時間的および空間的細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を調べた（緩衝液中の Ca^{2+} 濃度は 2.5mM)。その結果，42℃以上で CCh 刺激による Ca^{2+} 濃度の増加を示さない細胞が発現し，44℃以上では調べた全ての細胞で Ca^{2+} 濃度の増加は消失した。（図1）。Ca^{2+} 濃度の時間的変化について，腺房の基底側と腺腔側とで比較したが，特に差は認められなかった。これらの結果は44℃以上と以下の処理で CCh 刺激によるカルシウム応答は異なること，温熱処理後，細胞内 Ca^{2+} 濃度が正常に保たれていても温度依存性に生理機能障害が発現していることを示した。細胞外の Ca^{2+} の役割を調べるため，温熱細胞致死効果の増強効果が報告されている細胞外液 Ca^{2+} 濃度条件 (15mM) で41℃処理を行った。CCh 刺激による細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化の減少を期待したが，340nm/380nm 比は Ca^{2+} 濃度 2.5mM での処理に比べ 3.97±0.36と増加した。また，EGTA (1mM) を添加し緩衝液中の Ca^{2+} を除いた条件で44℃処理した時，340nm/380nm 比は0.18±0.06で Ca^{2+} 濃度 2.5mM での処理と比べて有意差はなく，防護効果は認められなかった。これらの結果は細胞外液の Ca^{2+} は温熱処理による生理機能障害に直接関与しないことを示唆する。なお，4℃および22℃の処理の場合は37℃処理群に比べて CCh 刺激後の 340nm/380nm 比の変化は増加傾向を示した。今後は，アミラーゼ放出および受容体結合に関する温熱処理の影響について検討したいと考えている。

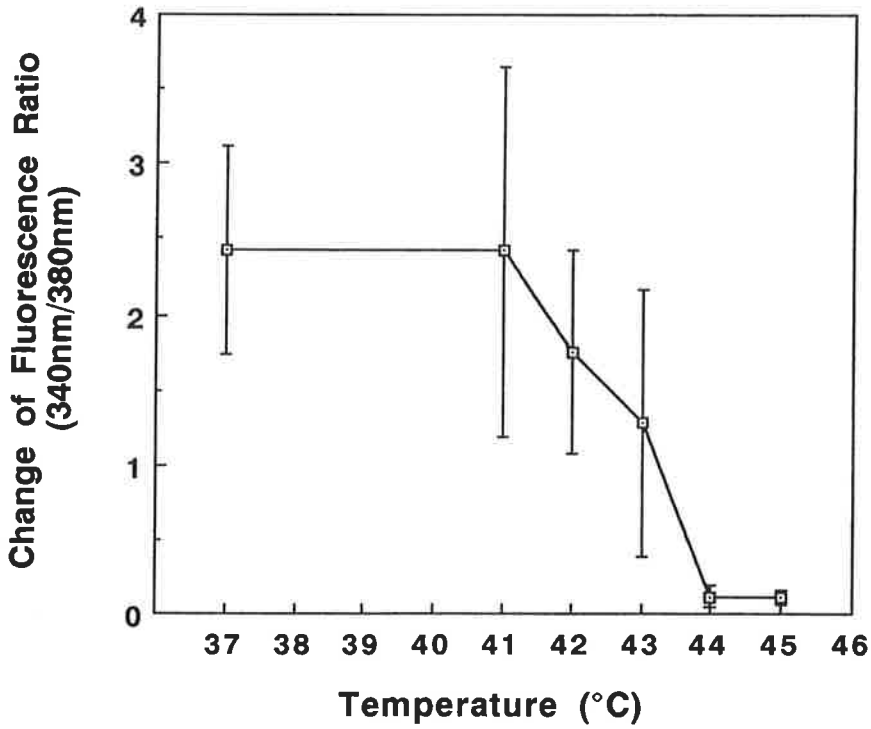


図1　CCh 刺激によるラット膵腺房細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化と腺房処理温度の関係

17. 急性膵炎腺房細胞内の Ca^{2+} 動態について

岡田憲幸，大塩学而，真辺忠夫，今村正之（京都大・医）
葉原芳昭，菅野富夫（生理研）

【目的と方法】

急性膵炎時の膵腺房細胞内では，消化酵素の分泌障害が生じ，酵素は細胞内に鬱滞する事が in vivo・in vitro での研究で知られている。即ち CCK などの agonist を投与しても膵管内への正常な酵素の分泌反応と著しく抑制されている。この抑制が，receptor activation から enzyme excretion までにおける signal transduction のどの部分で生じているかを検討するため，stimulus secretion coupling における細胞内遊離カルシウム動態に着目した。

コラゲナーゼ処理にて分離した膵腺房細胞に fura2 を load し，細胞内カルシウム動態を microspectrofluorometry で検討した。急性膵性モデルとして，choline deficient ethionine sup-

plemented diet (CDE diet) を雌マウスに投与し，24時間および48時間経過後それぞれ sacrifice した壊死性膵炎で，膵炎の程度を比較し，カルシウム動態を検討した。

【結果】

CDE diet 投与後24時間までは血清アミラーゼは上昇せず（図１），HE 染色でも膵の壊死は見られず正常膵と差がなかった。(図２－ａ)。分離した腺房細胞で光顕的に観察すると，zymogen granule は細胞内の apical side に集中しており鬱滞所見はみられなかったが（図３－ａ），CCK 刺激による in vitro での分泌は抑制されていた（図４)。この時点では細胞内カルシウム動態には変化が見られなかった (data not shown)。

CDE diet 投与後48時間までは，血清アミラーゼは上昇し（図１），HE 染色では約４割の膵組織は壊死に陥り，残存した腺房細胞内に vaculization が見られた（図２－ｂ)。比重遠沈で壊死組織を除去しつつ分解した腺房細胞は正常に比べ damage が強く，bleb formation も比較的多数見られた。分離された aclini すべてにおいて，zymogen granule は細胞の apical side に集中することなく basolateral membrance 側に鬱滞しており（図３－ｂ)，酵素の分泌障害を反映していた。また，in vitro での CCK 刺激によるアミラーゼ分泌反応は強く抑制されていた（図４)。しかし細胞内カルシウムを spatial and temporal に測定したところ，分離した acini は damage の強い細胞が多かったにもかかわらず，反応 pattern は正常細胞と同じでよく保たれていた。即ち生理的濃度である CCK 10pM （図５－１）では oscillation が，薬理的濃度である CCK100pM （図５－２）およびカルバコール 1μM （図５－３）では投与直後の急峻な上昇とそれに続く緩やかな下降という pattern が，正常マウス膵腺房細胞と同じでよく保たれていた。

【結語】

非常に強い炎症で，壊死にいたる前段階と思われる急性膵炎腺房細胞でも，細胞内カルシウム動態には変化が見られなかった。この膵炎モデルにおける酵素分泌障害は，receptor activation から intrancellular Ca^{2+} release までの step によるものではなく，それ以降の段階における障害が主原因であると考えられた。

１．岡田憲幸，大塩学而，真辺忠夫，今村正之，葉原芳昭，菅野富夫（1994）膵腺房細胞の amylase 分泌と細胞内カルシウム動態－ CDE 膵炎モデルと正常との比較－　第25回日本膵臓学会抄録集

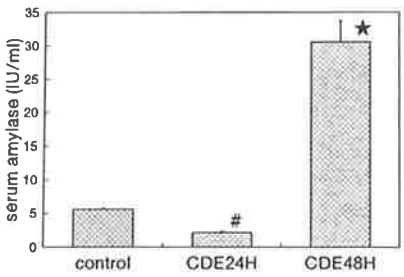


図1　血清アミラーゼ (mean ＋ SE)
CDE24H では低下
CDE48H では 6 倍の上昇を認めた

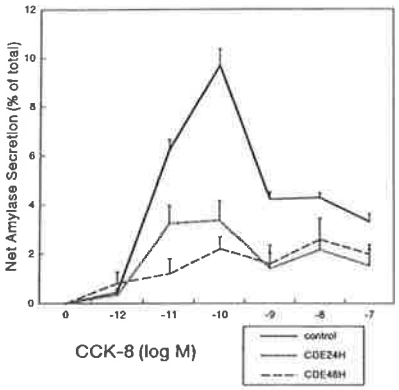


図4　in vitro amylase secretion
CDE48H では CCK に対する分泌反応は低下していた。

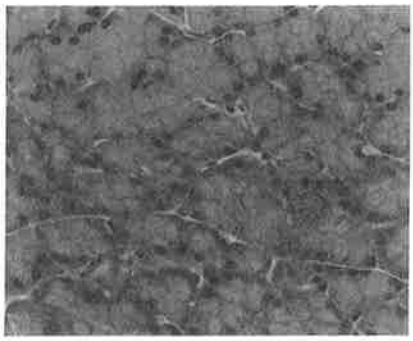


図2－a　CDE24H　膵 HE 染色
正常と変化なし

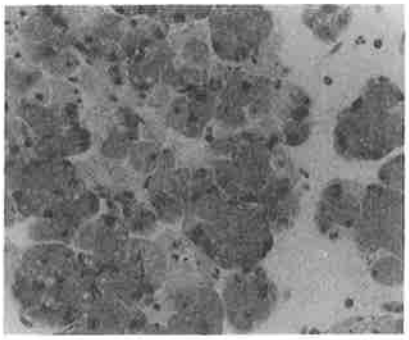


図2－b　CDE48H　膵 HE 染色
膵は部分的に壊死に陥り，細胞内 vacuolization が認められる。

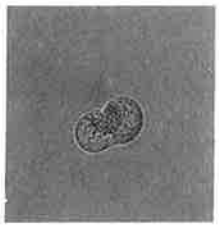


図3－a　CDE24H acini
正常と変化なし



図3－b　CDE24H acini
granule は鬱滞し clear な胞体は認められない。

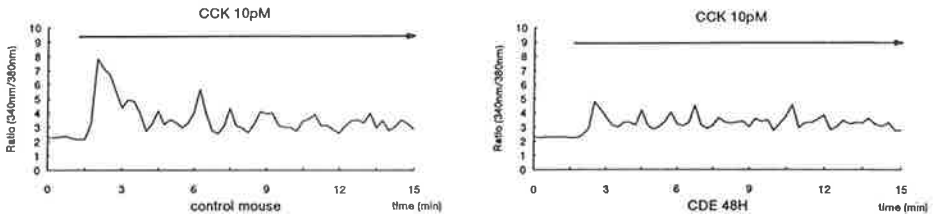


図５－１　CCK 10pM 持続刺激時　膵腺房細胞相カルシウム濃度 (Ratio)
正常マウス，CDE48H 投与ともに oscillation がみられた。

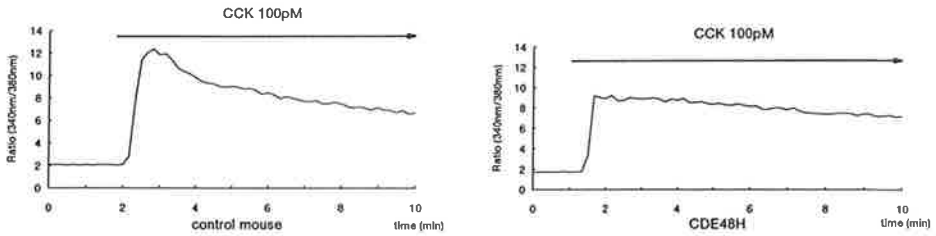


図５－２　CCK 100pM 持続刺激時　膵腺房細胞相カルシウム濃度 (Ratio)
正常マウス，CDE48H 投与ともに刺激開始後の急峻な上昇とゆるやかな下降を示した。

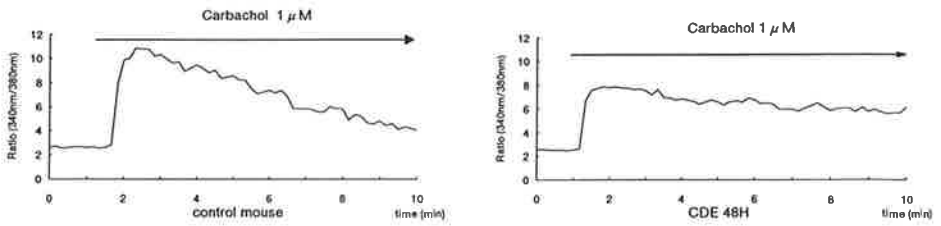


図５－３　Carbachol 1μM 持続刺激時　膵腺房細胞相カルシウム濃度 (Ratio)
正常マウス，CDE48H 投与ともに刺激開始後の急峻な上昇とゆるやかな下降を示した。

18. 消化管平滑筋細胞に対する神経ペプチドの作用機構に関する研究

桑原厚和（生理研）
鈴木秀作（鹿児島大・医）

【研究目的】

消化管運動の中でも食物輸送にとって最も重要な動動様式は，蠕動運動である。蠕動運動は，消化管壁を構成する縦走筋及び輪走筋の平滑筋活動が共調して働くことにより始めて発現する。このような蠕動運動は，基本的には消化管壁内に存在する壁内神経叢により制御されており，その制御機構に多くの神経ペプチドが伝達物質として関与している。しかしながら，消化管壁を構成する平滑筋に対する神経ペプチドの作用を細胞レベルで検討した研究はすくない。

本研究は，単一分離平滑筋細胞を用いて，パッチランプ法により消化管平滑筋細胞に対する神経ペプチドの作用機構を明らかにすることを目的とした。

本年度は，永田理恵子氏（生理学研・前技官）及び鈴木貴祐氏（受託大学院生）らの援助により，まずモルモット回腸から縦走筋及び輪走筋をそれぞれ分離して単離する方法を確立した。その後，筒井泉男氏及び加藤健一氏（生理研・生体膜）らとの共同研究によりモルモット回腸より単離した単一縦走筋細胞を用いて，ホールセルクランプ法により縦走筋細胞対するサブスタンスPのカルシウムチャネルに及ぼす効果を検討した。

10^{-9}M 以上のサブスタンスPを単一縦走筋細胞に適用することにより，一過性のカルシウム電流の増大と，それに続く電流の減少を観察した。これらの結果は，一過性の細胞内カルシウムの増大が，細胞膜カルシウムチャネルの活動に密接に関連していることを示唆している。

【Reference】

Tsutsuki, I., T., Kato, K., Kuwahara, A. and Ozaki, T. (1993) Effects of Substance P on the Ca^{2+} channel of Guinea-pig Intestinal Smooth Muscle Cells. Molecular Basis of Ion Channels and Receptors Involved in Nerve Excitation, Synaptic Transmission and Musxle Contraction. Abstract PII-2 (January 12-15, 1993, The Ibuka Memorial Hall Waseda University, Tokyo, JAPAN, The New York Academy of Sciences)

19. バックグラウンドノイズレベルの聴覚系ニューロン活動への影響

鎌田　勉，亀田和夫（北海道大・歯・生理）
山岸俊一（生理研）

聴覚系の神経生理学的実験は完全に騒音のない環境で行うことが望ましいけれども，通常はそ

のような環境はえられず，ある基準を満たした無響室ないし防音室において行われる。しかし完全に外部音および内部の反響を0にすることは難しく，実験にさしつかえない程度に外部音を遮断した防音室で実験されることが多い。そこで，このようなバックグラウンドノイズ条件の異なる環境が聴神経活動の記録にどのような影響があるのかについて検討しようとした。

実験にはスナネズミ生体雄4頭を使用した。聴神経活動の記録はガラス微小電極を用い，麻酔下で耳胞を開いて，正円窓から聴神経にアクセスして，記録した。刺激音として500-10000Hzの純音を用い，動物から30cm離して設置したスピーカーから開放系で刺激した。このような実験を北海道大学歯学部内の防音室および生理研無響室で行い，それぞれ20個のニューロン活動を記録した。記録された各ニューロンについてcharacteristic frequency, tuning curve, threshold, spontaneous activityを設定した。これらはそれぞれの場所において次のような数値となった。characteristic frequencyは1.7-10.6 kHz, 1.87-10.82 kHz, threshold最低20 dB SPL, 23 dB SPL, spontaneous activity平均67.65 ＋ 78.58 pulses/sec, 60.15 ＋ 47.03 pulses/sec。従って，この実験の限りでは，相違がみられなかった。しかし，これらの数値の化には麻酔深度などによって影響されるものもあり，このような微妙な実験環境の相違を調べるにはさらに注意深い実験コントロールが必要であると思われる。また本実験では行わなかったが，マスキング実験など他のパラメーターを検出することを行えば相違をみいだすこともできるかもしれないので，さらにそのような実験について検討する必要もあると思われた。

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

石沢由美子，土肥修司（岐阜大・医）
古家喜四夫，山岸俊一（生理研）

昨年に引き続き，ベンゾジアゼピン系薬物の，GABA受容体を介していない電気生理学的作用について，検討を行った。ベンゾジアゼピン系薬物は中枢神経系においてGABA受容体に作用し，麻酔作用を起こすと考えられているが，非GABA作用については明らかでなかった。培養神経細胞としては，dBcAMPによって分化させたNG108-15細胞を用いた。分化したこの細胞は典型的なNa^+, K^+, Ca^{2+}チャネルを持つがGABA受容体は発現しておらず，本研究に適している。パッチ電極を用いた全細胞電流記録の結果，ミダゾラム，ジアゼパムともに10-100μMの濃度でNa^+, K^+電流を抑制した。Ca^{2+}電流も同様に抑制された。fura-2を用いた細胞内Ca^{2+}測定の結果，10μMのミダゾラムは，High-K刺激によるCa^{2+}上昇（脱分極による）を抑制したが，ブラジキニンによるCa^{2+}上昇（細胞内Ca^{2+}の遊離によっている）には全く影響せず，電位依存性Ca^{2+}チャネルへの作用がCa^{2+}流入を抑制することが示された。これらの結果はベンゾジアゼピン系薬物の鎮静薬としての働きに非GABA作動性作用が関係している可能性を示

唆する。

21. 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。膜電位感受性色素による光学的測定法は，中枢活動の空間的・時間的分布の実験的研究に非常に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 ～ $1x10^{-3}$) を与えて，聴ニューロンを染色する。麻酔剤，筋弛緩剤を適宜与えて，光学的測定を始める。Xe ランプのパルス発光を光源として，干渉フィルタ (530 ± 30nm) 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，実体顕微鏡と冷却 CCD カメラ・システム（浜松フォトニクス）により観測する。画像メモリと画像処理ソフトウェア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，蛍光発光の瞬時空間パターンとしてとらえた。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面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。

聴覚刺激として実験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。Xe ランプのパルス発光を励起光源に用いたことにより，応答パターンの時間的推移を可視画像化することができるようになった。中枢活動の所在を示す島状の領域は，刺激開始後一定の潜時を経て現れ，時間の経過とともに空間的に移動するように見え，やがて消滅する有り様を観察することができるようになった。さらに，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。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が，この時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，刺激音との対応関係を個体間で共通な種固有の応答パターンとして特定するのは容易ではなかった。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，この方向へと研究を進めてい

る。また現状では微弱な中枢電気活動を観測対象としたとき，その可視画像化において応答画像S/Nが隘路となっているので，雑音の低減と信号成分の増大によりS/Nの向上を図り，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，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，局所的な活動の可視画像化を目指している。

22. 神経の麻酔・変性現象とチャネルタンパク質の構造・相互作用の関係

美宅成樹（東京農工大・工）
久木田文夫，山岸俊一（生理研）

生体膜は能動輸送，興奮性，受容など重要な生体機能を担っている。私たちはこれまでアルコールなどの特異的作用のない化学物質がナトリウムチャネルに対してどのような影響を及ぼすかということを詳細に調べてきた。その結果，濃度領域によって，可逆的変化としての麻酔現象と不可逆的変化としての変性現象について物理的相互作用のレベルで明らかにすることができた。つまり，膜内での水素結合がそれらの現象に本質的な役割を果していることが分かった。本研究では，さらにそれらの現象とタンパク質の立体構造との関係を明らかにすることを目的とした。

研究の背景としては3つのことがある。第1に，変性や麻酔の実験により，ナトリウムチャネルの安定性に極性の相互作用が本質的な役割を果していることが分かった。第2に，ナトリウムチャネルのアミノ酸配列が明らかになった。第3に，一般的に膜タンパク質における膜貫通領域の構造予測が可能になりつつある。この最後の膜タンパク質構造予測システムは共同研究者の一人(S. M.)が最近開発したもので，本研究の理論的側面はこのシステムを拡張することによって行う。また実験は，ジェネラルな麻酔現象が物理化学的な背景によって起こっているという考え方から，アルコールによる麻酔・変性現象や高濃度の尿素による部分変性などを行う。

結果をまとめると次のとおりである。

(1) アルコールの効果については，いずれの変性剤でもある濃度領域で急激に不可逆的に神経の興奮性が失われた。ペンタノールを加えるとイカ巨大神経の興奮は徐々に押さえられるが，10mM程度までは効果は完全に可逆的であり，麻酔作用が働いていると考えられる。しかし，ペンタノール濃度をさらに上げると電流－電圧特性から見て明かにイオンチャネルの変性が起こった。そこで，イオンチャネルに対するペンタノールの麻酔作用および変性キネテイクスを種々のペンタノールの濃度で詳細に調べたところ，その結果，麻酔作用にはタンパク質あたり数個のペンタノール分子が関与しており，変性現象にはさらに5ないし10個のペンタノール分子の結合が必須であることが示唆された。さらに，ペンタノール以外のアルコール（つまり，メタノール，エタノール，プロパノール，ブタノールなど）による変性実験（キネテイクスなど）と麻酔作用の実験を行った結果，ペンタノールで起こったことと全く同じことが他のアルコールでも起こっ

ていることが分かった。そして，アルコールによって異なる点は変化が起こるアルコール濃度が分配係数に反比例して変化しているということである。このことは膜内の相互作用が膜内への分配と膜内での極性相互作用によって決定されていることを示していた。

(2) 尿素の効果としては，ナトリウムチャネルと参照実験としてバクテリオロドプシンの実験を行った。ナトリウムチャネルでは約 3M の尿素でチャネル機能が失われ，一種の麻酔作用があることが分かった。これに対して，バクテリオロドプシンでは 8M 近い尿素を加えても，ほとんど安定性も機能も変化しなかった。この一つの説明は水相に突き出している部分が大きいと尿素の効果があり，そうでないと尿素はほとんど効果を示さないということである。

(3) ナトリウムチャネルの立体構造の予測を試みた。ここでは 3 つのことを仮定した。(1)膜タンパク質の膜内構造を安定化させる相互作用は極性の相互作用である。(2)膜貫通ヘリックスを単純化して，連続体の棒として考えても本質的な情報は失われない。(3)膜貫通ヘリックス配列予測の問題は一種のジグソーパズル問題である。この仮定を基にナトリウムチャネルの立体構造予測を行った結果，エネルギー的に有利な構造が一応構築できた。しかし，まだ膨大な可能な構造の全てを検討した結果の構造でないので，これに関しては今後さらに検討を加える必要がある。

23. 神経再生におけるグリアの役割

堀江秀典（横浜市大・医・生理）
高野雅彦（横浜市大・医・眼科）
久木田文夫・山岸俊一（生理研）

コラーゲンゲル 3 次元培養法を導入することにより成熟・老化ラットやマウスから末梢・中枢神経組織を摘出し，器官培養を行い神経再生を促進する因子の解析を行うことが可能になった。末梢神経組織として脊髄後根神経節 (DRG) を用い，酵素にて単離された感覚神経細胞の神経再生から神経線維を伴った脊髄後根神経節の神経線維の切断端からの神経再生にいたるまでの 5 種類の培養系を確立した。一方，中枢神経系組織としては成熟ラットより網膜を摘出し，細片化して器官培養を行った。器官培養系は生体に最も近い in vitro 系で，肝細胞分泌因子，サイトカイン類，NGF ファミリーの神経再生に及ぼす効果を検討することにより，生体内での各因子の作用機序を明らかにすることが出来るのではないかと期待される。

NGF は単離された感覚神経細胞に対し，神経再生促進効果を示すが，高純度の神経細胞を 3 次元的に集合させ構成する神経細胞の数を増加させるとその促進効果が増強され，胎生期の神経組織に対するのと同様の強い促進効果を示した。NGF は神経細胞に直接作用し神経再生促進効果を発現する。一方，肝細胞分泌神経再生促進因子は神経細胞には直接作用せず，神経線維を伴った DRG の神経線維の切断端からの神経再生を促進する。サイトカイン類では IL-1β と IL-6 が肝

細胞分泌因子と同様に神経線維を伴ったDRGに対し神経再生促進作用を示し，神経細胞そのものには直接作用しなかった。これらの因子は神経細胞を取り巻く細胞に作用し，神経再生を促進する因子を分泌させ神経再生を行っていると考えられる。以上の結果より末梢神経組織の神経再生において神経を取り巻くグリア細胞等が重要な働きをしていることが考えられる。また肝細胞分泌因子は網膜からの神経再生促進をすることから，中枢神経系における神経再生においても重要な役割を果たしていると考えられる。この因子は網膜のグリア細胞に作用し，神経再生を促進させているのではないかと推察される。

現在末梢神経系の神経細胞を取り巻くシュワン細胞，線維芽細胞，神経周膜細胞の分離培養に成功しており，それらの細胞の膜電流をホールセルクランプ法により記録できるようにシステムを組でいるところである。感覚神経細胞に関しては測定システムが出来上がり，色々なイオンの膜電流が記録できている。今後シュワン細胞をはじめとする神経を取り巻く細胞の神経再生促進因子を作用させたときの膜電流変化を測定し，細胞内の各種の成長因子のmRNAの発現の変化の測定と併せてその作用機序を解明する計画である。

24. 神経軸索に作用する成長促進および抑制因子

中山　孝（横浜市大・医）
古家園子・山岸俊一（生理研）

初代培養した鶏胚網膜から伸展してくる視神経線維に作用し，その成長を促進する接着因子のスクリーニングをおこなった。高感度ビデオカメラと画像処理装置，またタイム・ラップスビデオレコーダーを組み合わせることにより因子活性の測定を半定量的に行えるようになった。培養の基質として細胞外接着因子であるラット由来のラミニンやコラーゲンを用いた時に比べ，鶏胚網膜から調整した基底膜成分を基質に用いた時の方が数倍促進活性が強い事が明らかとなった。活性成分の抽出および可溶化を試みたところ，SDS等の界面活性剤や尿素等では抽出できず，塩酸グアニジン等の強いカオトロビックイオンでのみ抽出が可能であった。現在抽出成分の再構成と，抽出成分に対するモノクローナル抗体の作製を行っており，鶏胚網膜基底膜に存在する新たな細胞外接着因子の同定を進めている。

25. Na － Ca 交換輸送系の反応速度論的解析

大川和秋（大阪大・理・生物）
筒井泉雄，山岸俊一（生理研）

神経細胞にとって欠かすことのできない Ca 排出メカニズムの１つである，Na － Ca 交換輸送系について，電位依存性 Ca 排出機構を詳細に解明する目的で実験をおこなった。この Na － Ca 交換輸送電流は，心筋での Na － Ca 交換輸送で見られるのと同様に，La などの３価のカチオンに感受性をもつ電流として測定される。イカの巨大神経を細胞内灌流して電位固定し，イオン性電流とエネルギー依存性電流を種々の阻害剤で抑制し，エネルギー非依存的な Na 依存性 Ca 電流を測定した。静止膜電位での電流量は通常の Na ポンプ電流の約1/2～1/5程度で，電流は S 字型で-100mV 付近で既に飽和状態の外向き電流として記録された。この電流の電圧依存特性を幾つか反応速度論的モデルを立てメカニズム解明を試みた結果，この交換輸送系はイオンの輸送時に荷電を１つもつ輸送モデルで，うまくシミュレートできることが判明し，結果から Na － Ca 交換輸送の起動力（逆転電位）が約-200mV であることが予想され，通常の静止電位付近 (-70mV) では脱分極の程度によらず安定して Na を細胞内に取り込み Ca を放出し定常的な細胞内 Ca 濃度の低下に貢献していることが示唆された。

26. 機械的刺激により上皮細胞により放出され，細胞内カルシウム増加を起こす物質の同定

榎本浩一（島根医大・生理）
古家喜四夫，山岸俊一（生理研）

われわれは培養した乳腺上皮細胞のコロニーの細胞をガラス棒で機械的に刺激すると細胞内カルシウムの上昇が起こり，その反応が隣接する細胞に波のように伝搬していく現象を分析している。同様の現象が線維芽細胞，グリア，マクロファージでも観察されている。機械的刺激を受けた細胞から何らかの物質が細胞外に放出され，それが隣接する細胞のカルシウム上昇を起こしていることはすでに報告した。乳腺細胞をピペッティングした上清には刺激物質が含まれていたので，その物質を分析した。活性物質に対する細胞の反応は fura-2 蛍光法で計測した。

上清中の活性物質として ATP が考えられたので，ATP の濃度をルシフェリン／ルシフェラーゼで計測した。ATP の濃度は 0.88 ± 1.00μM だったが，同濃度の ATP でカルウシム上昇を起こした後，上清を投与すると再度反応が得られた。したがって，上清には ATP 以外の物質も含まれていると結論した。

上清のUVスペクトルは260nm付近に吸収極大があり，核酸化合物の存在が考えられた。上清の活性はホスホジエステラーゼ，ピロホスファターゼで処理すると完全に失活した。上清分画をHPLCにかけると多数の物質からなる複雑なパターンが得られた。ホスホジエステラーゼ処理により新たに出てきたピークを既知物質とスパイキングし，UMPとAMPを同定した。上清に含まれる活性物質はUTP, UDP, ADPおよびATPと考えられたので，HPLCで定量した。UTP, UDPの濃度はそれぞれ72 ± 0.48, 0.75 ± 0.43μMであった。ADPは存在しなかった。UTP, UDP, ATPの混合で，上清に対する反応と同程度の反応が得られた。

抗癌剤のスラミンはP2型プリン受容体を拮抗阻害する。乳腺細胞はUTP, UDPにもよく反応するので，受容体はP2U型と考えられる。スラミンは機械刺激で起こるカルシウム波の広がりを強く抑制した。UTP, UDP, ATPおよび上清の反応もスラミンで抑制された。

機械刺激により細胞からUTP, UDP, ATPの混合物が細胞外に放出され，それが隣接する細胞のP2U型プリン受容体を介してカルシウム上昇を起こしていると結論した。

27. イカ巨大神経軸索内外における局所麻酔薬作用動態の解析

小栗顕二，木下博之（香川医大）
佐竹　弘（徳島大・工）
大川和秋（大阪大・理・生物）
筒井泉雄，山岸俊一（生理研）

細胞に対する麻酔薬の効果を知る上で細胞内にどれだけ麻酔薬が入ってきて作用しているかを知ることは極めて重要である。局所麻酔薬を細胞外から作用させたとき，細胞膜に溶けこんでからどの程度細胞内へ速やかに溶けこみ作用し，また除去後細胞内からどの程度の速度で出ていくかという局所麻酔薬の動態は現在まで不明であった。今回，局所麻酔感受性電極を試作しイカの巨大軸索に挿入することによって細胞外より与えた局所麻酔薬の細胞内への浸透を直接的に測定することが可能となり，局所麻酔薬の持つ荷電が局所麻酔薬の細胞内への浸透や麻酔効果にどのような作用機序で関与しているか，また細胞内で局所麻酔薬がどのように働き細胞の興奮性を押さえるかを測定した。局所麻酔薬の一種であるリドカインは，神経外より投与したとき，約3分ほどでその細胞外濃度の1/10ほどが細胞内に速やかに入る。局所麻酔薬の細胞への浸透は，細胞外pH（リドカインの荷電状態）によって大きく変化し，荷電されているほうが細胞内へ浸透しやすいことが判明した。また神経の興奮性は局所麻酔薬の作用により悉無的(all-or-none)に失われることも判明した。細胞内に入った局所麻酔薬がどのような作用機序で麻酔効果を発生させるのかについてはこれからの課題である。

28. 電気生理学的にみたモルモット精管平滑筋細胞の型

森元克士（尚絅短大・用事教育科）
久木田文夫，山岸俊一（生理研）

精管は精嚢側と睾丸側では異なっていることが知られている。またその収縮反応も精嚢側と睾丸側では異なっていることが知られている。そこで精管を構成している平滑筋の膜電流レベルでの応答型を単離平滑筋細胞にホールセル型のパッチクランプを適用することによって調べた。睾丸側1/3の精管をコラーゲナーゼ処理し，平滑筋細胞を得た。環状筋と縦走筋の区別は行わなかったが，得られた細胞群は形態的に大型のものと小型のものの2群に分けられた。今回の実験には大型の細胞を用いた。膜電流は膜電位依存性のCa電流(ICa)，外向き整流型K電流(IK)，2型のCa依存性K電流(IKCa, IKTC a)及び過分極で活性化されるK電流(IA)が観察された。全ての電流成分に付いて検索できた31個の細胞についてみると，細胞それぞれの個性が強く，明確なタイプに分類することは出来なかったが，IKcaが優位な細胞群，IAが優位な細胞群などの特徴的な細胞群を認めることが出来た。一方，全ての電流成分が平均して良く観察される細胞群や，全ての電流成分が微弱にしか存在しない細胞群はわずかに存在したのみで，上記の様な個性的な細胞群は細胞単離の際に発生したダメージによると考えるよりは，精管を構成している平滑筋にはいくつかの異なった膜電位応答を示す細胞群が存在すると考える方が理にかなっていると思われる。

29. 胚胞 mrp ポンプと Cl^- チャネル

大野　護，酒井秀記，浅野真司，竹口紀晃（富山医薬大・薬）
岡田泰伸（生理研）

肺がんは，治療に対する感受性の違いから小細胞がんと非小細胞がんの2つに大別される。肺小細胞がんの治癒は困難であり，薬や放射線を用いて治療した後に再発する細胞が，これらの治療に対して抵抗性となる。実際，小細胞がん患者の治療後の細胞から樹立した培養株がいずれも放射線抵抗性や薬物抵抗性を示すことが報告されている。

この薬物抵抗性の原因として，最近注目されてきたのがmrp (multidrug resistance-associated protein) である。mrpは，これまで報告されている多剤薬物排除ポンプ(mdr)と性質を異にする。mdrはガン化した細胞に過剰に発現するほか，肝，腎，腸などの正常細胞にも発現するが，mrpはこれらの臓器には存在せず肺胞に存在する。またmdrは免疫抑制剤のサイクロスポリンによって阻害されるはずが，mrpは阻害を受けない。したがってmrpは，mdrよりも更に強力な細胞内異物排除ポンプであると考えられる。

これまでにmdrはポンプ機能のほかに，細胞容積調節を司るCl^-チャンネル機能もあわせもつことが報告されているが，mrpにおけるイオン輸送機構の研究は行われていない。そこで本研究では，多くの種類のヒト小細胞がん培養細胞の電気生理学的性質を調べ，mrpとの機能的関連を調べることを目的とした。

現在，各細胞株の性質をスクリーニング中であるが，静止膜電位が細胞株によって大きく異なる（－20～－80mV）という興味深い結果が得られている。また，ホールセル電流記録からも整流作用の異なる数種類のCl^-電流が記録されており，薬剤感受性や細胞容積調節機能との関連について検討中である。

30. 心筋クロライド・チャネル制御に関する研究

堀江　稔，湯月洋介（京都大・医・第三内科）
富永真琴，挾間章博，岡田泰伸（生理研）

心筋クロライド・チャネル電流は1989年になり初めて単一細胞において発見され，その後すくなくとも四種類の異なるクロライド電流が心筋に存在することが明らかとなってきた。最初，報告されたクロライド電流を運ぶチャネルは，細胞内cAMPにより制御され，上皮細胞に多く発現するCystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulatorとして当初，同定されたクロライド・チャネルと類似することが電気生理学あるいは遺伝子工学的手法を用い解明された。心筋においてこのクロライド・チャネルは，交感神経活性化にともない増加しカルシウム電流のcounterpartとしての外向き電流を運び心機能調節に大きな役割を果たしている。今回の共同研究では単離モルモット心室筋細胞をパッチクランプ法に供し，このタイプの心筋クロライド・チャネル活性化を観察した。現在，このチャネルの特異性阻害剤が報告されていないので，とくにブロッカーについて検討した。その結果，古典的なクロライド輸送の阻害薬であるDIDSなどは，0.1mMでも，このタイプのクロライド・チャネルを抑制しないのに対し，一般にATP感受性カリウムチャネルの阻害薬として知られるglibenclamideが，～30μMのIC_{50}で抑制することが明らかとなった。実験はパッチ電極を用いたconventional whole-cell clampで，細胞内外の陽イオン電流を種々の阻害剤やイオン置換法により極力除外することにより陰イオンであるクロライド電流のみを記録できる条件を設定した。βアドレナリン受容体刺激やアデニレートサイクレースを直接的に活性化し細胞内cAMPを増加するforskolinを投与すると時間非依存性のクロライド・チャネル電流が活性化された。またピペット内にcAMP (1mM)を充填しておくことにより直接，電流を活性化することができた。細胞外からglibenclamideを投与するとこれらの方法で活性化されたすべてのクロライド・チャネル電流は濃度依存的に抑制できた。さらにinorganic phosphate analogのVO_4をピペット内にあらかじめ充填しておき，forskolinを用いてチャネル

の燐酸化を図ると，このクロライド・チャネルは，その活性化がもはやA-kinaseによる燐酸化やATPの結合に依存しない，いわゆるopen lockの状態になった。glibenclamideは，この状態のチャネルに対しても同様に～30μMのIC_{50}で抑制を示したので，open-channel blockerとして直接チャンネル蛋白に作用していることが示唆された。これらの内容はまとめて英文誌に投稿中である。

31. カーボン線維電極による開口放出の検討

丸山芳夫，猪岡　元，富田行成（自治医大）
岡田泰伸，挾間章博（生理研）
寺川　進（浜松医大）
遠藤　泰（京都線維大）
三輪正人（藤田保健衛生大・医）

分泌細胞において開口放出（エクソサイトージス）を経時的にモニターする方法に，分泌内容物を測定する方法と分泌顆粒の膜融合を膜表面積の増加（膜容量の増加）として評価する方法が知られている。後者は単一分泌細胞に適用され，カルシウムイオンおよびGTP結合蛋白等の細胞内二次メッセンジャーとの関連を研究する上で有効であった。本共同研究では，単一分泌細胞に適用可能でありかつ実験手技上簡便を旨とする分泌内容物モニター法を開発し，その分解能が量子的開口放出過程を識別しうるに充分であることを示した。

Ⅰ．測定原理

容易に酸化されうる分泌内容物（カテコーラミン，セロトニン等）は，正電圧界の存在下酸化電流を発生する。例えば，副腎髄質細胞，肥満細胞等上記内容物を分泌顆粒に含む細胞の近傍に正電圧を印加し，かつ電流を同時に計測する電極があれば，それらの生ずる酸化電流をモニターすることで，開口放出過程を評価しうる。直径6.5μmのカーボン線維電極を電流・電圧変換器に接続し，細胞近傍への接近，電極の正電位固定および電流（酸化電流）計測を実現した。

Ⅱ．カーボン線維電極の作成

通常の径1.5mmガラス管に直径6.5μmの単一カーボン線維を挿入し，通常の電極プラーを用いて線維を電極先端に固定する。先端を適当な所で折り，折りくちをアルコールランプの炎に数回通しガラスを適宜融解して線維ガラス先端にしっかりと固定する。線維に触れないようにシルガード ガラス先端に塗布し，先端を上にしてオーブンで焼く。この時点での電極抵抗は40－200GΩにも達し，実際の電極有効部位の狭小化が考えられる。

Ⅲ．セロトニンを用いた電流校正

600mVの正電圧を印可し，カーボン電極先端にセロトニンを付加したところ，0.1μMが分解

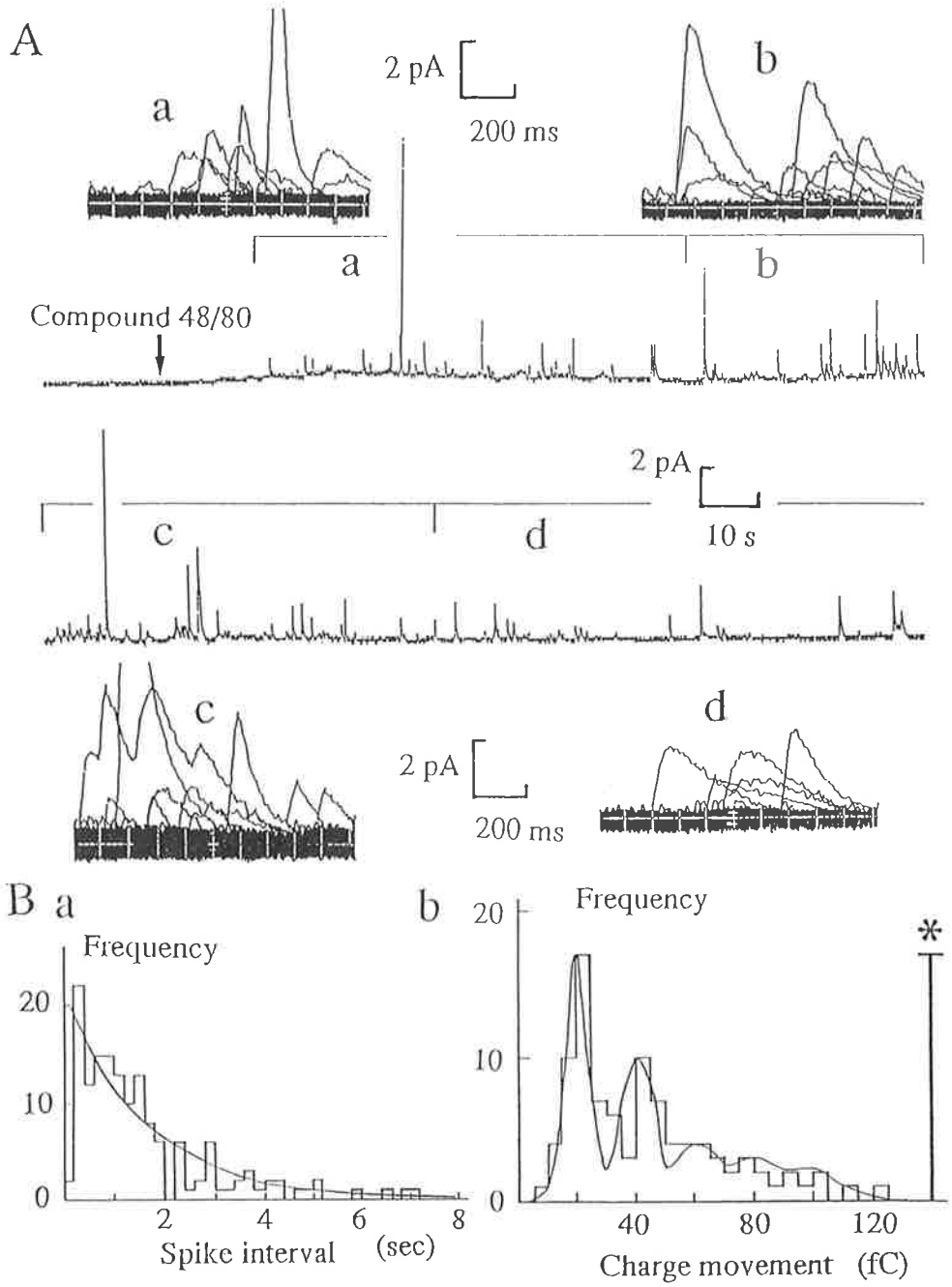


図1。ラット肥満細胞からのセロトニン酸化電流の計測。カーボン電極先端は600mV に固定し，細胞に接触している。倒立顕微鏡上の灌流槽を11℃に保持し，compound48/80 (10μg/ml) を近傍のガラス管より細胞に投与した。電位固定および電流計測には，パッチクランプ用増幅器を転用した。

能の限界であり，電流容量曲線はロジスチック曲線を示した。

Ⅳ．ラット腹腔内肥満細胞でのセロトニン開口放出

量子性放出をみるため実験かんきょう11℃に設定し，カーボン電極先端を単一肥満細胞に接触させた。細胞を compound48/80 (10μg/ml) で刺激すると，図1のごとく一過性の電流応答が数十秒にわたり散見される。個々の電流スパイクインターバルの頻度は単一指数曲線で近似され，かつそれらの電荷移動頻度は多ガウス分布によりおおむね近似しえた。このことは，顆粒放出過程がいわゆるポワッソン型の量子放出によることを示唆している。カリウム脱分極によるクロマフィン細胞からの酸化電流も同様な放出特性を示した。このように，同カーボン電極の有効性およびその適用範囲を確立した。

32. ヒスタミンによる胃壁細胞膜表面積増加の分子機構

上田俊二，鍛冶田英俊，立田　浩，細川雅也，富永正幸（京都大・医）
岡田泰伸（生理研）

モルモット胃より単離した壁細胞やラット胃の培養壁細胞にパッチクランプ法を適用し，これまでいくつかの K^+ チャネルや Cl^- チャネルの存在を明らかにした。(Ueda et al., '89 BBA; Sakaki et al., '89 Pflugers Arch.; Kotera et al., '91 J. Membr. Biol.)。また酸分泌刺激後に管腔側膜に Cl^- チャネルが発現することを見いだした。また酸分泌刺激時には H, K-ATPase （H, K 交換ポンプ）も細胞内小胞膜より管腔側膜へ転座・動員されることが知られており，その際に「小胞膜－管腔側形質膜融合」が重要な役割を果たすことが示唆されてきたが，いまだにそれに対する直接的証拠は提出されて来なかった。この融合エベントを単一細胞レベルでリアルタイムに直接的に計測するために私達が開発した膜容量測定法は，たとえ膜電流・膜コンダクタンス・膜平衡電位が大きく変化してもそれらとは独立してエキソサイトシスによる膜容量変化をリアルタイムで測定することを可能とした。今回これを用いて「小胞膜－形質膜融合」過程を直接的にかつ経時的に観察しようとした。その結果，私達は，膜容量測定法によりこの証明を単一細胞レベルで行うことに成功した。その後，このエキソサイトシステムもまた細胞内 Ca^{2+} に強い依存性を示すこと，そしてＡキナーゼの活性化によりエキソサイトシス誘導が可能であることを明らかにした (Hashimoto et al., '92 Pflugers Arch.)。一方，ER で合成された蛋白質の特定膜への選別輸送はいくつかの膜融合過程より成立している。その融合先が形質膜である場合，膜融合ステップはエキソサイトシスの形で終了する。最近，小胞膜輸送のステップの分子機構の多くが明らかにされた。とくに「小胞膜－形質膜融合」への低分子量Ｇ蛋白 (Rab) が，細胞内小胞膜輸送を制御することが明らかにされた (Takai et al, '92) ことは特筆に値する。その中でも Rab3A は regulated secretion を制御していることが示唆されている。(Matsui et al, '88, JBC)。また活性型 Rab3A の標的

蛋白質である Rabphilin-3A が同定されている (Shirataki et al, '92 BBRC) これらの蛋白がエキソサイトシスの最終ステップである「小胞膜－形質膜融合」にどの様に関与しているかについては，生化学的にかなり明らかにされたが，細胞生理学的には未だ研究がされていなかった。そこで我々は Rab3A を直接細胞内にパッチピペットから注入するための予備実験を行った。その結果本実験系の基本である安定したパッチクランプ全細胞記録法が Rab3A の精製過程で混入する detergent で著しく障害される事が判明した。そのため detergent を使わずに精製可能な Rab3A 結合蛋白 Rabphilin3A を細胞内に注入することにより，「分泌小胞膜－形質膜融合」に対する Rab3A の関与を明らかとすることにした。精製した Rabphilin3A はパッチピペット溶液内においてもその活性を持っている事が確認されており，これからの研究の進展が期待される。

33. ヒトＰ－糖蛋白質のクロライドチャネル活性の生理的意義

植田和光，佐伯　徹，木岡紀幸，駒野　徹（京都大・農）
老木成稔，挾間章博，岡田泰伸（生理研）

Ｐ－糖蛋白質は，種々の抗癌剤を細胞害へ能動輸送するポンプであり，癌の多剤耐性に深く関係している。また副腎，腎尿再管，小腸，血液脳関門，胎盤などにおいて本来発現しているため，それらの組織において重要な生理的機能を持つと考えられている。しかしＰ糖蛋白質の生理的役割に関しては未解明の点が多い。最近，Ｐ－糖蛋白質は容積依存 Cl^- チャネルとしても機能し，細胞の容積調節に関与する可能性が示唆された。Ｐ糖蛋白質と構造が類似した CFTR は cAMP 依存性 Cl^- チャンネルであり，Ｐ糖蛋白質と CFTR がラットの小腸などにおいて組織特異的あるいは時期特異的に相補し合うように発現していることも報告されている。本研究は，Ｐ糖蛋白質の生理機能とくに Cl^- チャネル活性の生理的意義を明かにするとともに，Ｐ糖蛋白質のトランスポーター活性とチャネル活性の機能的協関を解明しようとするものである。

本年度は，ヒトＰ－糖蛋白質遺伝子 *(MDR1)* を腎臓上皮細胞由来培養細胞中で発現させ，種々の基質の経細胞輸送を測定することによってＰ蛋白質の生理的基質を明かにするとともに，試験管内で転写合成した *MDR1*RNA をアフリカツメガエル卵母細胞中に導入し，Cl^- 電流が生じるかを検討した。

経細胞輸送系によって，前年度までに明かになっていたコルチゾールなどのステロイドホルモン以外に種々の耐性克服剤もＰ糖蛋白質によって輸送されることが明かになった。さらに，試験管内で転写合成した *MDR1*RNA をアフリカツメガエル卵母細胞中に導入した結果，低張刺激下で活性化される Cl^- 電流が観察された。この電流はコントロールの卵母細胞では観察されなかった。これらの結果は，Ｐ糖蛋白質が副腎，妊娠中の胎盤におけるステロイド分泌，尿細管における有害物排泄などにおいてポンプとして働いているだけでなく，小腸上皮などにおいて細胞容積

調節のための Cl^- チャネルとしても機能している可能性を示唆している。岡田らは，小腸上皮に存在する Cl^- チャネルに対して細胞内 Mg^{2+} がオプンチャネロッカーとして働くことを最近見いだした。この Mg^{2+} ブロック現象は，P糖蛋白質が岡田らの発見した容積依存性 Cl^- チャネルと同一の分子か検討する上で有用なツールとなる。現在，P糖蛋白質の Mg^{2+} との相互作用が期待できるアミノ酸に置換を導入し，容積依存性 Cl^- チャネルの性質の変化を検討している。さらに種々の変異を遺伝子光学的に導入し，薬剤輸送活性およびチャネル活性に与える影響を解析することによって，トランスポーター活性とチャネル活性の機能的協関およびその生理的意義が解明できると考えている。

34. 血管内皮細胞膜の機械的水透過係数 Lp

冨田　稔，福内靖男（慶應大・医・神経内科）
寺川　進（浜松医大）

【目的】

脳虚血急性期にはグリア細胞の膨化がみられる。この際に脳血管内皮細胞間の tight junction は開いていないとされ[1]，浮腫水の移動は内皮細胞膜あるいは "enocytosis" を介すると考えざるを得ない。そこで培養血管内皮細胞膜の機械的透過係数 Lp の測定を試みた。

【理論】

測定原理はすでに報告した[2]。すなわち細胞を低浸透圧液に曝すと膨化する。細胞膜を介する volume flow は，$J = L_P(\sigma_i \Delta \Pi_i - \sigma_{pr} \Delta \Pi_{pr})$ と表わすことができる[3]。ここに i はイオン，pr は蛋白質，Π_{pr} は膠質浸透圧である。細胞は極端な低浸透圧状態では容積調節機序が破壊され，小イオンが膜を通過するようになる（$\sigma_i = 0.124$）[2]。その際には Π_{pr} (213 mmHg) と $\sigma_i \Delta \Pi_i$ (373.9 mmHg) の大きさ 586.9 mmHg が細胞内への水の移動を決める。かくて細胞を蒸留水に曝し，その時間的容積（ΔV）変化と表面積 (A) を測定すれば Lp が計算できる[2]。ここでは球形の膨化を仮定しその直径を D とすると，$\Delta V/A$ は $(1/6)\pi((D+\Delta D)^3 - D^3)/\pi(D+\Delta D/2)^2 = D\Delta D/2(D+\Delta D)$ から計算できる[2]。

【方法】

内皮細胞として培養臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた。HUVEC を VEC 顕微鏡により細胞灌流液を蒸留水に切り替えた際の細胞膨化を録画，ビデオ画像を一定時間間隔に playback, D を計測して膨化の速度を測定（Excel, Avionics，東京）した (n=5)。

【結果】

HUVEC は confluent に生育し，辺縁で重畳した（図1：上左写真)。細胞を蒸留水に曝すと辺縁部において ruffling が起こり，filopodia がまず球形に膨らみ始めた（図1：上中央右上写真)。

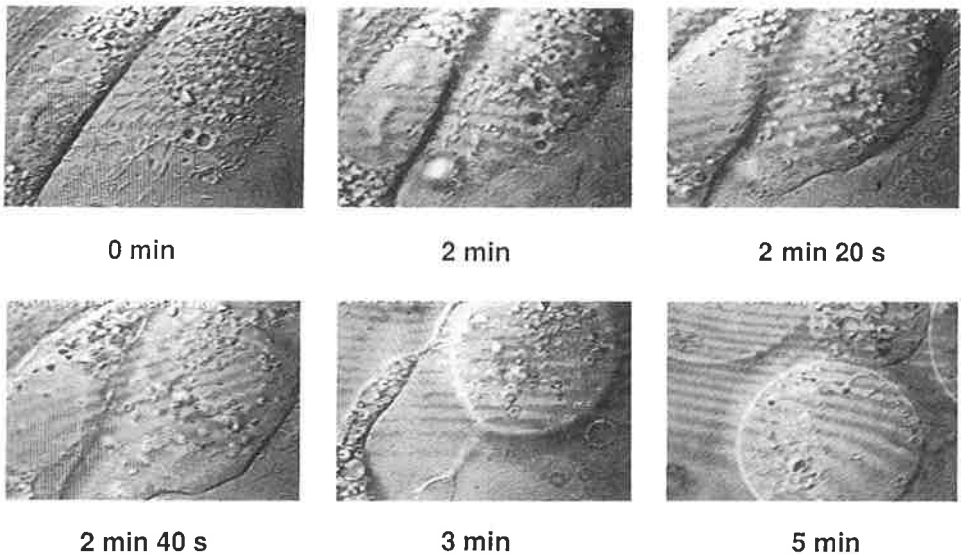


図１．培養臍帯上皮細胞 (HUVEC) を蒸留水に曝露した際の細胞膨化（説明本文参照）。

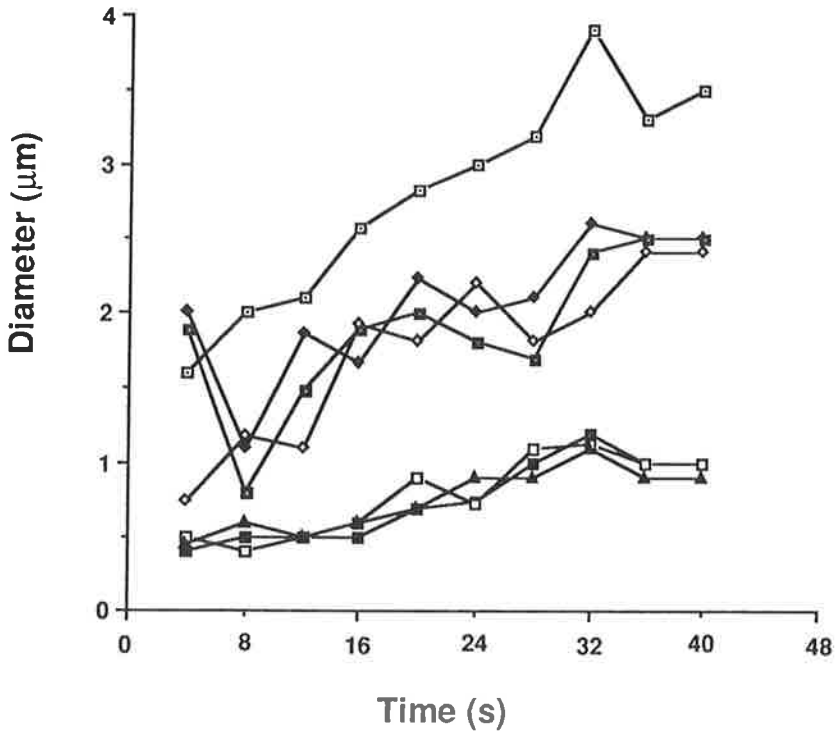


図２．HUVEC を蒸留水に曝露した際の経時的変化（説明本文参照）。

この球は徐々に大きくなった（図１：下左，中央写真）。図２に直径変化を時間にたいしてプロットとしたグラフを示す。最大勾配から Lp = (2.2 ± 0.6) x10^{-9}cm/s. mmHg または (0.17 ± 0.04) x10^{-4}μm/s. cmH_2O と計算された。その後細胞本体は膨化，床から剝離し，球形（図１：下右写真）となり，細胞表面には villi 様の構造が出現して粘着性が増加した。細胞は 11.1 ± 1.3μm (n＝5) の最大径（弾性限界8.5±1.8分）に達したあと破裂した（10.2±1.6分）。細胞全体としての Lp は (0.3 ± 0.04) x10^{-5}μm/s. cmH_2O であった。

【考案およびまとめ】

HUVEC 辺縁部 plasma membrane の薄い部分の細胞膜の Lp が filopodia と同じと見なすと，周辺部の Lp はすでに報告したグリア細胞膜の Lp, 1.7x10^{-4}μm/s. cmH_2O (2) よりは小さいが，Michel らの腸間膜毛細血管の値[5]とはほぼ一致した。しかし細胞全体としてはかなり低い値を示した。これは平坦な細胞が剝離に時間とエネルギーが費やされ，計算上過小評価されたためと思われる。

【文献】

(1) Klatzo, I.: Involvement of tissue factors in the mechanism of brain edema development. In: Brain Edema. Mchedlishvili, G., et al., eds., Akademiai Kiado, Budapest, 1986, pp 150-236

(2) Tomita, M., et al. The mechanical filtration coefficient (Lp) of the cell membrane of cultured glioma cells (C6). Acta Neurochir., Suppl. 51: 11-13, 1990.

(3) Tomita, M., Gotoh, F.: Cascade of Cell Swelling-Thermodynamic Potential Discharge of Brain Cells After Membrane Injury. Am. J. Physiol. 262: H603-H610, 1992.

(4) Tomita, M., et al.: Colloid osmotic pressure of cat brain homogenate separated from autogeneous CSF by a copper ferrocyanide membrane. Brain Res 474: 165-173, 1988.

(5) Michel, C. C.,: Filtration coefficiens and osmotic reflection coefficients of the cells of single frog mesenteric capillaries. J. Physiol. 309: 341-355, 1980.

35. 神経細胞の分化決定における遺伝子発現の解析

岡野栄之，御子柴克彦，井上貴文，古市貞一（東大・医科研）
仲嶋一範（理研・筑波センター）

我々は，神経系における転写後の遺伝子発現を調節していると考えられる神経細胞特異的 RNA 結合性蛋白質をコードする musashi 遺伝子を，シヨウジョウバエ神経系に異常を有する変異体のスクリーニングにより同定することに成功している。loss-of-function type の musashi 変異体においては，成虫の外感覚器を構成する細胞群 (Neuron, Glia, Tricogen, Tormogen) の発生過程における運命決定における異常が観察された。即ち，Neuron と Glia の前駆細胞 (Neuron Glia

Progenitor; NGP) が Tricogen と Tormogen の前駆細胞 (Socket Shaft Precusor; SSP) に形質転換していることが明らかとなった。従って，ショウジョウバエ musashi 遺伝子産物は，RNA 結合蛋白質として，post-transcriptional level において下流遺伝子群の発現を調節することにより，神経発生過程における細胞の運命決定を制御していると考えられた。更に我々は，より複雑で高次の神経系を有する哺乳類における musashi 遺伝子ファミリーの役割を明らかにするために，musashi 遺伝子のマウス相同分子 (mouse-musashi) の単離にも成功しており，これも神経系特異的な RNA 結合性蛋白質をコードする事を明らかした。mouse-musashi 遺伝子産物は，神経系の未分化幹細胞において発現しており，ショウジョウバエの相同分子の類似性により，これも，哺乳類神経発生過程における細胞の運命決定を制御していると考えられた。又，本分子の RNA 結合能の証明についても成功しており，今後１．本遺伝子のジーン・ターゲッティングによる loss-of-function 型の表現型の解析，２．P19 あるいは PC12 細胞等の神経細胞へ分化誘導可能な細胞株における本遺伝子産物の overexpression の細胞分化・運命決定における効果の検討，３．下流標的遺伝子の同定をおこなって行きたい。

36. PLP 遺伝子産物のオリゴデントロサイト分化因子としての機能解析

中尾純治，植村慶一（慶應大・生理）
山田真久，鹿川哲史，池中一裕（生理研）

ミエリンプロテオリピド蛋白質 (PLP) および PLP 遺伝子のオルタナテイブスプライシング産物である DM-20 は，中枢神経系のミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトに特異的に発現し，ミエリン膜の安定化に関与すると考えられていた。しかし，PLP 遺伝子に突然変異を持つジンピーマウスは，ミエリン形成以前の胎生期にオリゴデンドロサイトの分化異常を示す。また，池中らは PCR 法を用いて DM-20 がグリア細胞の分化時期に相当する胎仔期においても，DM-20mRNA が一過性に産生されることを見い出しており，これらのことから DM-20 にはミエリン形成以外の作用もあることが示唆された。さらに，ジンピーマウスのオリゴデンドロサイトが正常マウスのアストロサイトの培養上清で延命することも報告されており，アストロサイトの初代培養細胞に DM-20 が発現していることを考え合わせると PLP 遺伝子産物が，オリゴデンドロサイトの分化促進因子として機能しているものと予想された。

すでに池中らによって神経系由来の株化細胞の多くに DM-20mRNA が産出されていることを見い出されていた。今回それらの株化細胞のうち，特に多量の DM-20 を産出しているマウスオリゴデンデンドログリオーマ G26，マウスメラノーマ B16，ラットニューロブラストーマ B104 の培養上清にオリゴデンドロサイトの分化を促進する液性因子が放出されているが，この活性は DM-20 を発現していない NIH-3T3 細胞の培養上清には見られないことを明らかにした。そこで

このオリゴデンドロサイト分化促進因子とPLP遺伝子発現の因果関係をより明確にするために，PLPまたはDM-20cDNAをレトロウィルスベクターを用いてNIH-3T3細胞にさせ，オリゴデンドロサイトの分化促進作用を検討した。これらのPLPまたはDM-20cDNAを導入したNIH-3T3形質転換細胞の培養上清を濃縮，透析した試料をオリゴデンドロサイトの前駆細胞が多く存在する胎生17日目マウスの初代培養系に添加したところ，オリゴデンドロサイトのマーカーであるGalC陽性数の増加を示した。以上のことからPLP遺伝子産物もしくはその修飾産物がオリゴデンドロサイトの分化を促進する因子の産出に機能していることが明らかとなった。今後この液性因子の実態やその作用機序の詳細について検討を加えていく予定である。

37. レトロウイルスベクターによる遺伝子導入法の開発的研究 —細胞種特異的遺伝子発現と癌の遺伝子治療への応用

清水恵司，宮尾泰慶，田村和義，早川　徹（大阪大・医・脳神経外科）
山田正信（大阪府成人病センター）
田村雅一，池中一裕（生理研）

脳腫瘍の10数％を占める多発性神経膠芽腫（グリオブラストーマ）は，手術に続く放射線，化学および免疫療法などの集学的治療にもかかわらず患者の余命は1年余りで，既存の治療法を選択する限り，今後も飛躍的な治療成績の改善は望めそうにない極めて悪性な腫瘍である。最近レトロウイルスを用いた遺伝子治療がアデノシンデアミナーゼ欠損の患者に施行され，その治療効果と安全性が確認されるに至り，その適応性を悪性腫瘍にも求められ，米国ではグリオブラストーマ患者に対して，すでに十数例の臨床実験(clinical experiment)が行われたと伝えられている。正常成人脳細胞に主に非分裂細胞より構成され，こうした環境下に発生するグリオーマ細胞に対し，レトロウイルスベクターを用いた遺伝子療法は極めて合理的であると考えられる。しかしながら，現在用いられているレトロウイルスベクターは，SV40やモロニー白血病ウイルス(MoMLV)のlong terminal repeat (LTR)などの非特異的プロモーターで殺菌胞遺伝子を制御しており，従来の化学療法と同じく他臓器に障害を起こす危険性がある。例えこのベクターを腫瘍切除腔などの局所に投与しても，腫瘍の増大で破壊された血液脳関門を通って全身体循環に入り，他臓器の正常分裂細胞に発現され，障害が生ずる可能性が高い。そこでグリオーマ細胞特異的なプロモーターで殺細胞遺伝子を制御できれば，非常に有効かつ安定性の高い治療方法が可能と考えられる。グリオーマ細胞特異的プロモーターの候補として，アストロサイトで特異的発現を示すグリア線維性酸性蛋白(GFAP)，オリゴデンドロサイトで特異的発現を示すミエリン塩基性蛋白(MBP)とミエリンプロテオリッピド蛋白(PLP)などの遺伝子のプロモーターをまず最初に検討した。殺細胞能を有する遺伝子として，Herpes simplex virus type Ⅰの Thymidine kinase (HTK)

遺伝子をグリオーマ細胞に導入発現させ，グアニンのアナログであるガンシクロビル (GCV) で治療することを計画した。各プロモーターにおける遺伝子導入効率とその特異的発現性を調べる目的で，HTK 遺伝子の代わりに E. coli の β-galactosidase (β-gal) 遺伝子である lac Z 遺伝子をマーカー遺伝子として用いた。MoMLV の LTR の間にネオマイシン耐性遺伝子 (Neo^R) と lac Z 遺伝子を組み込み，lac Z 遺伝子を制御する目的で上記 3 種のグリア特異的プロモーターをその上流に組み込んだベクターを作製した。コントロールとして，MoMLV の LTR で lac Z 遺伝子を制御する BAG スベクターを用いた。これら各ベクターをリン酸カルシウム法を用いて，パッケージング細胞である Φ 2 細胞に導入し，さらに G418 にてクローニングを行い，コロニー形成の高い Φ 2 細胞培養上清を実験に用いた。これらウイルス粒子含有液をグリオーマ細胞 (RSV-M)，線維芽細胞 (NIH-3T3) 及びリンパ腫細胞 (A20-2J) の各培養液中に 8μg/ml のポリブレンと共に 4 － 5 時間培養した。48時間後培養細胞を固定し，X-gal にて染色し，青色を呈した細胞数で各細胞におけるプロモーター活性を示した。その結果，コントロールである BAG ベクターは，すべての培養細胞において強い活性を示した。一方，GFAP, MBP, および PLP の各プロモーターは，グリオーマ細胞のみ活性を示した。そして，MBP プロモーターが GFPA や PLP のプロモーターより 3 － 5 倍強く，BAG ベクターの LTR と同等の活性を示した。次に，MBP のプロモーターで HTK 遺伝子を制御するレトロウイルスベクターを作製し，前述の各培養細胞にこのベクターを導入したのち GCV による治療を試みた。RSV-M マウスグリオーマ細胞は，125nM の GCV 濃度で約80％が傷害され，250nM の GCV 濃度でほぼ100％細胞傷害が認められた。一方，NIH-3T3 マウス線維芽細胞や A20-2J マウスリンパ腫細胞は，1000nM の GCV 濃度でもほぼ100％細胞が生存していた。以上の結果よりグリア特異的プロモータで殺細胞遺伝子を制御するレトロウイルスベクターは，正常分裂細胞を傷害しない程度の GCV でグリオーマ細胞を特異的に傷害でき，今後，グリオブラストーマに対する新しい治療法に発展する可能性が示唆された。

38. Cytosne Deaminase の強制発現による 5FC 感受性株作成の試み

中村秀次（大阪大・医）
池中一裕（生理研）

CYTOSINE DEAMINASE （以下 CD）遺伝子は，真菌，細菌には存在するが動物細胞には存在しない。CD 蛋白は，CYTOSINE を URACIL に変換する酵素であり，5FC を 5FU に変換し得る。この CD 遺伝子を強制発現させることにより 5FC 投与による選択的な殺細胞効果が期待できる。そこで，我々は CD 強制発現による 5FC 感受性株の作成を目指し以下の実験を行った。遺伝子導入ベクターとして retrovirus を使用した。外来遺伝子として lac Z 遺伝子を組み込んだ retrovirus をプサイ 2 細胞を用いて作成し，ラットの肝癌細胞株に感染させ lac Z 遺伝子の発現を X-

GAL 染色にて観察した。この retrovirus vector の系を用いて肝癌細胞に外来遺伝子を導入，発現出来得る事を確認した。現在，CD 遺伝子のクローニングを行っており，この CD 遺伝子を上記 retrovirus vector の系を用いて遺伝導入し，CD 蛋白の強制発現株の作成を試みる。

39. 遺伝性ミエリン形成不全マウスの解析と脳内移植による中枢神経系脱髄疾患の治療法の確立

山田正信（大阪成人病セ・脳神経外科）
清水恵司（大阪大・医・脳神経外科）
池中一裕・鹿川哲史（生理研）

脳内細胞移植の手法を用いて，中枢神経系のミエリン形成細胞であるオリゴデンドロサイトの分化，成熟，および変性の機序を明らかにし，更に，現代有効な治療方法のない中枢神経系脱髄疾患に対して，脳内移植を用いた治療法のモデルを確立することを目的とし，以下の実験を行った。MBP プロモーター制御下に lac Z 遺伝子を発現するトランジェニックマウス（MBP-lacZ マウス）由来の ED16 胎児全脳細胞を蛍光色素である fast blue にて標識した後，正常マウス (newborn, adult) および MBP 欠損ミエリン形成不全マウスである shiverer (newborn, adult) の脳内に移植し，両者の脳内環境下におけるオリゴデンドロサイト前駆細胞の分化，成熟過程を X-gal による呈色反応を指標として比較検討した。

移植後 1 週間目には，いずれのマウスにおいても，蛍光標識された移植細胞は host 脳内に認められたのがミエリン形成や X-gal 陽性細胞は殆ど認められなかった。移植後 2 週間目になっても，蛍光標識細胞は存在するものの明らかなミエリン形成は認められず，また，X-gal 陽性細胞もごくわずかしか検出されなかった。この様に shiverer マウスにおいても有意なミエリン形成や MBP プロモーターの活性化が認められないことより，移植細胞自身にその原因があると考えられた。最近の報告によると，purified 0-2A progenitor cells の移植により広範囲の remyelination がみとめられること (Groves, A. K., 1993) また，移植細胞中の ODC progenitor の割合を高めることにより，myelination も広範囲にみられ，移植細胞に含まれる細胞の種類が大きく関与する (Pfeiffer, S. E., 1993) 等の報告があり，今回の移植細胞中に含まれる ODC progenitor cell の割合が低かったことが主因と考えられる。最近，免疫組織化学の結果，ED16 前後においては，ODCprogenitor cell は脳内の特定の領域に分布していることを示唆する結果を得ており，今後 donor cell として，brain stem や corpus callosum といった ODC progenitor cell の豊富な部位より選択的に細胞を調製し，移植実験を行う予定である。

40. 大脳皮質形態成分の分子機構

小川正晴（高知医大・生理）
池中一裕（生理研）

ほ乳動物の大脳皮質は，ニューロンが表層部から脳室側へと6層になって配列する層構造を持つ。この場合，機能・形態上ならびに発生時期が一致するニューロン群が特定の層に配座している。この様な層構造は発達に伴って段階的に形成される。まず最初のニューロン層として preplate が表層部に現れ，この層は発達して第1層の Cajal-Retzius neurons と第6層下の subplate neurons となる。この preplate に後ほど発生してくる neuroblasts が侵入して cortical plate を形成し，発達して第2～第6層が出来て来る。この際に，早く発生したニューロンほど深層部に位置する inside-out の配列になることが知られている。一方突然変異種のリーラーマウスでは，ほぼすべての皮質ニューロンが正常マウスと同じ時間軸で現れるが，第2層から第6層にかけてのニューロンの配列がほぼ逆転する層構造が形成されてくる。我々は先に，リーラーマウスにおいて，①正常マウスと一致して新皮質に preplate が形成されてくること，②次の cortical plate が形成されてくる段階で最初の異常形態が現れてくること，③ preplate と cortical plate 間の細胞－細胞間認識（反応）に異常があることを確認してきた。今回，リーラーマウスでは，この preplate と cortical plate 間の細胞間認識を仲介する特異物質が欠損している，即ちリーラー遺伝子産物が同物質に関係する，と予想し，この物質を免疫学的に同定することを試みた。即ち，正常マウス (wild-type or heterozygous) とリーラー (homozygous) マウス間で，一方の大脳組織を免疫源として allogeneic に認識される物質が存在するや否や検討した。その結果，次のような性質を持つモノクローナル抗体 (CR-50) を取り出した。①正常マウスに有って，リーラーに無い物質を認識する。②正常マウスの preplate の構成員である Cajal-Retzius neurons の細胞質およびその表面に特異的に結合する。③遊離大脳皮質細胞を reaggregation culture した場合，正常マウスとリーラーではそれぞれに特異な細胞集合が形成されるが，この抗体の存在によって正常細胞の集合形成がリーラータイプのものになる。④リーラーマウスにおいては，大脳以外にも，小脳，海馬，オリーブ核，あるいは嗅球といった組織において形態異常が認められているが，この抗体は正常マウスのこれらの部位の特定ニューロン群と反応する。従って CR-50 antigen が①リーラー遺伝子産物と直接ないし間接的に関係していること，②中枢神経系におけるニューロンの配座決定に関与している興味ある物質であることが予想される。

41. 網膜内の色情報抽出における錐体視細胞間の相互作用とその意義

日高　聡，橋本葉子（東京女子医大・第一生理）
林　孝彰，大塚輝彌（生理研）

網膜における色弁別の神経機構を解析する上で，視細胞錐体間の信号伝達様式を調べることは必要である。これまでの電気生理学実験は視細胞間の相互作用の存在を示し，そこには電気的シナプス又は化学的シナプスの介在を示唆した。高度な色弁別を有する硬骨魚，ウグイの網膜では視細胞錐体が規則的なモザイク配列を示し，複合錐体と単一錐体が交互に畝状に配列している。顕微分光学的な測定はこの網膜上で赤・緑・青と紫外感受性錐体がの存在を同定した（Hárosi と Hashimoto, '83）ので，ウグイの網膜の規則的な色感受性錐体の配列部位は錐体視細胞間のシナプス伝達の解析に適した材料である。今回の実験は，各色感受性錐体視細胞の細胞形態の同定に焦点を合わせた。細胞内染色法を用いて規則的配列上の各錐体視細胞を標識した後に，錐体の細胞形態を調べた。

実験にはウグイの剝離網膜標本を用い，杆体の外節部を機械的に除去した網膜に Lucifer Yellow と Neurobiotin との細胞内注入法（日高と橋本，'93）を適用した。網膜上の錐体視細胞を顕微鏡下でその規則的な配列様式から識別し，ガラス管微小電極のマイクロマニュピュレーションによって細胞内標識した。網膜組織を化学固定し，Lucifer Yellow の標識を蛍光顕微鏡下で確認した後，レーザー共焦点顕微鏡 (Zeiss, LSM 310) 下で錐体視細胞の 3 次元形態を調べた。組織化学的処理を経て，biotin の局在を DAB 反応から検出した。標識錐体の細胞形態を詳しく調べるため，網膜縦方向と水平方向のそれぞれの 60μm 切片を作製した。

ウグイ網膜の規則的なモザイク配列部にある錐体視細胞の中で，複合錐体の長錐体と短錐体，および単一錐体を標識した。どの種類の錐体視細胞も外節から内節部，細胞体を経て軸索終末部まで細胞内マーカーは充填できたので，これまでの顕微鏡分光学的な測定に供せられた視細胞（Hárosi と Hashimoto, '86）に対応する，各々の色感受性錐体の 3 次元形態が同定できた。今回の実験から，特に各々の錐体の軸索終末部の形態が明らかになった。網膜縦方向切片上の観察から，注入したどの錐体の軸索もその内節部より内層に向かってまっすぐに降りており，複合錐体と単一錐体の間で，また複合錐体の長錐体と短錐体の間では決してお互いに交叉することはなかった。この観察は，これまでの我々のウグイ網膜のゴルジ鍍銀法による錐体視細胞の解析結果に一致した。網膜水平方向の切片が標識した錐体の軸索終末部を含んでいる場合は，外網状層おける標識軸索終末の配列位置が同定できた。これまでの解析から錐体の軸索終末部も錐体の外節部や内節部に同等な配列様式を示すことがわかっているので，今回の実験から複合錐体の長錐体と短錐体および単一錐体のそれぞれの軸索終末部の形態とその配列位置が判明した。それらの配列位置はこれまでの推定が正しかったことを示した。また，biotin はどの錐体でも数本の telodendria を標識した。しかし，biotin の反応産物は注入した錐体以外では認められなかったの

で，biotin が錐体間のギャップ結合を通り抜ける（Hidaka 等，'93）ことを示すことはできなかった。ウグイ網膜の錐体の内節部や細胞体そして軸索引終末の間で電子顕微鏡レベルの解析からはギャップ結合は見つかっていないので，錐体視細胞間のシナプス結合の部位は telodendria 以外には可能性はない。今回のウグイ網膜での解析では telodendria を介する錐体間カップリングは同定できなかったが，最近カメでその存在が示された（Firsov と Green, '94）。我々の標本の作り方には改善の余地があるので，今後さらに解析を進める必要がある。

【引用文献】

Hárosi F. I. and Hashimoto Y. (1983) Science, 222: 1021-1023

日高　聡，橋本葉子 (1993) 日本生理学雑誌，55: 241-254

Hidaka S., Maehara M., Umino O., LU Y. snd Hashimoto Y. (1993) NeuroReport, 5: 29-32

Firosov M. L. and Green D. G. (1994) Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci., Supple, 35: 2123

42. ミオシン ATPase 反応中間体の構造

田之倉　優，村松知成（東大・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の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，ADP の加水分解に伴うミオシンの高次構造の変化，とくに反応中間状態におけるミオシンの高次構造を解明することが重要である。本研究では，ミオシン ATPase の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。

ミオシンはトリ砂嚢平滑筋から抽出し (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。得られたトリ砂嚢平滑筋ミオシン SI 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。S1 の調製条件を種々検討したが，重鎖が切断されていない S1 は未だ得られていない。重鎖が切断されていない S1 を得るべく，今後さらに検討を行う必要がある。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, 0.3 M 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

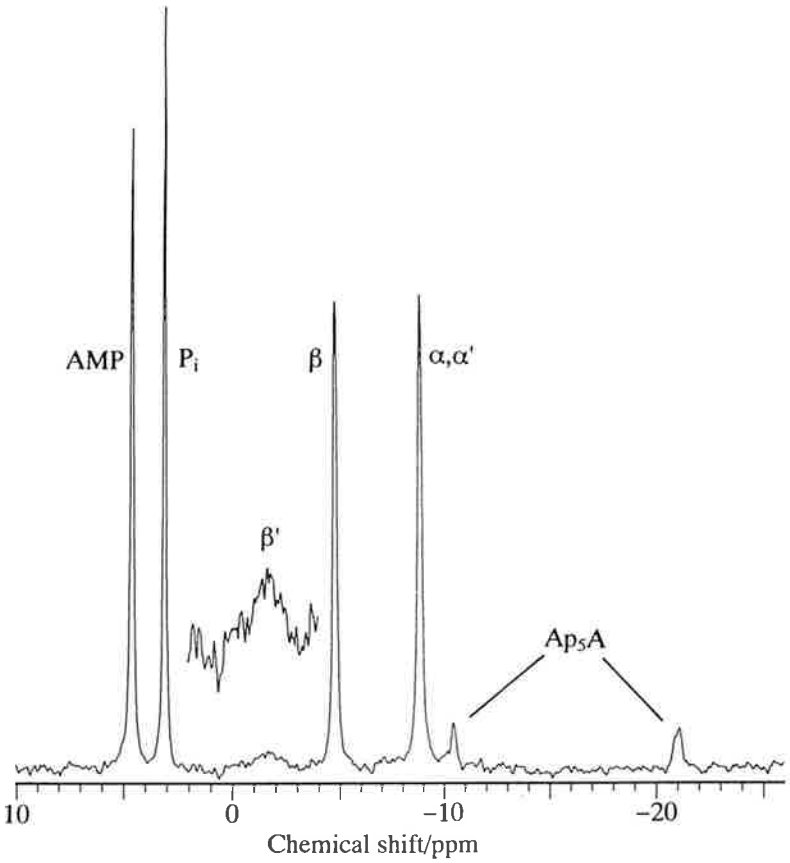


図1．トリ砂のう平滑筋ミオシンS1の25℃における202MHz ^{31}P NMRスペクトル。測定には，0.58mM S1, 1.16mM ADP, 0.3 M KCl, 10mM $MgCl_2$, 2mM DTT, 40μM Ap_5A, 50mM Imidazole/HCl (pH7.0) を含む重水溶液を用いた。スペクトルは，30,000回の積算（60° パルス，4.0秒間隔）により，LB = 20Hzのウインドウをかけて得られた。化学シフトは85% H_3PO_4 を外部基準として表した。シグナルはそれぞれの燐原子に帰属される：αとβ，それぞれ遊離のADPのαおよびβリン酸：α'とβ'，それぞれS1と複合体を形成したADPのαおよびβリン酸。Ap_5Aは，試料に混入したmyokinaseに対する阻害剤である。AMPと無機リン酸 (P_i) は，Ap_5Aを加えたにも関わらず測定中に生成した。

試みたが，複合体のシグナルは観測されなかった。一方図1に示すように，GE Omega 500 NMR分光計を用いて測定した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た。162MHzではS1-ADP複合体シグナルの磁場依存性によりシグナルが観測されないという可能性があるので，現在240MHzの ^{31}P NMRスペクトルを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

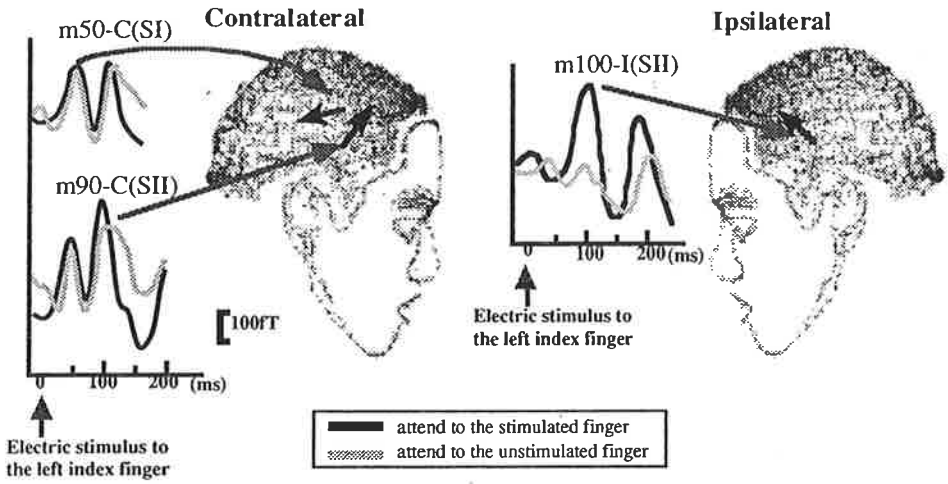
のシグナルが観測されやすい条件が見つけられる可能性もあるので，温度依存性についても検討する。今後，平滑筋ミオシン S1-ADP 複合体の ^{31}P NMR スペクトルの温度依存性と磁場依存性を測定して，再現性良く複合体シグナルが観測される条件を確立し，平滑筋ミオシン S1 における ATPase 反応中間体の構造を明らかにしていきたい。

43. 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—

下条信輔，竹市博臣（東京大・教養・心理学）
藤田昌彦，町沢朗彦，青木三奈，皆川双葉，小川　正
（郵政省通信総合研究所信号処理研究室）
彦坂興秀，宮内　哲（生理研）
福田秀樹（労働省産業医学総合研究所）

【研究成果】

視覚以外のモダリティにおける注意のメカニズムを検討するために，多チャネル SQUID を用いて，自発的注意が体性感覚刺激（人差し指への電気刺激，強度：閾値の1.5倍，加算回数：500回）による誘発脳磁場に及ぼす効果を調べた。Attend 条件では電気刺激が呈示される人差し指に注意を向け，Ignore 条件ではもう一方の手の人差し指に注意を向けさせた。対側の体性感覚野では潜時 50ms で第一次体性感覚野 (SI)，潜時 100ms で第二次体性感覚野 (SII) に等価電流 dipole を持つ成分が出現し，前者は Attend 条件と Ignore 条件で全く違いを認めなかった。後者は自発的注意により若干の増強を示した。同側の体性感覚野では，自発的注意により，潜時 90 ～ 110ms，第二次体性感覚野に等価電流 dipole をもつ成分が顕著な振幅の増大を示した。体性感覚の自発的注意に，第二次体性感覚野が強く関与していることが示唆された。



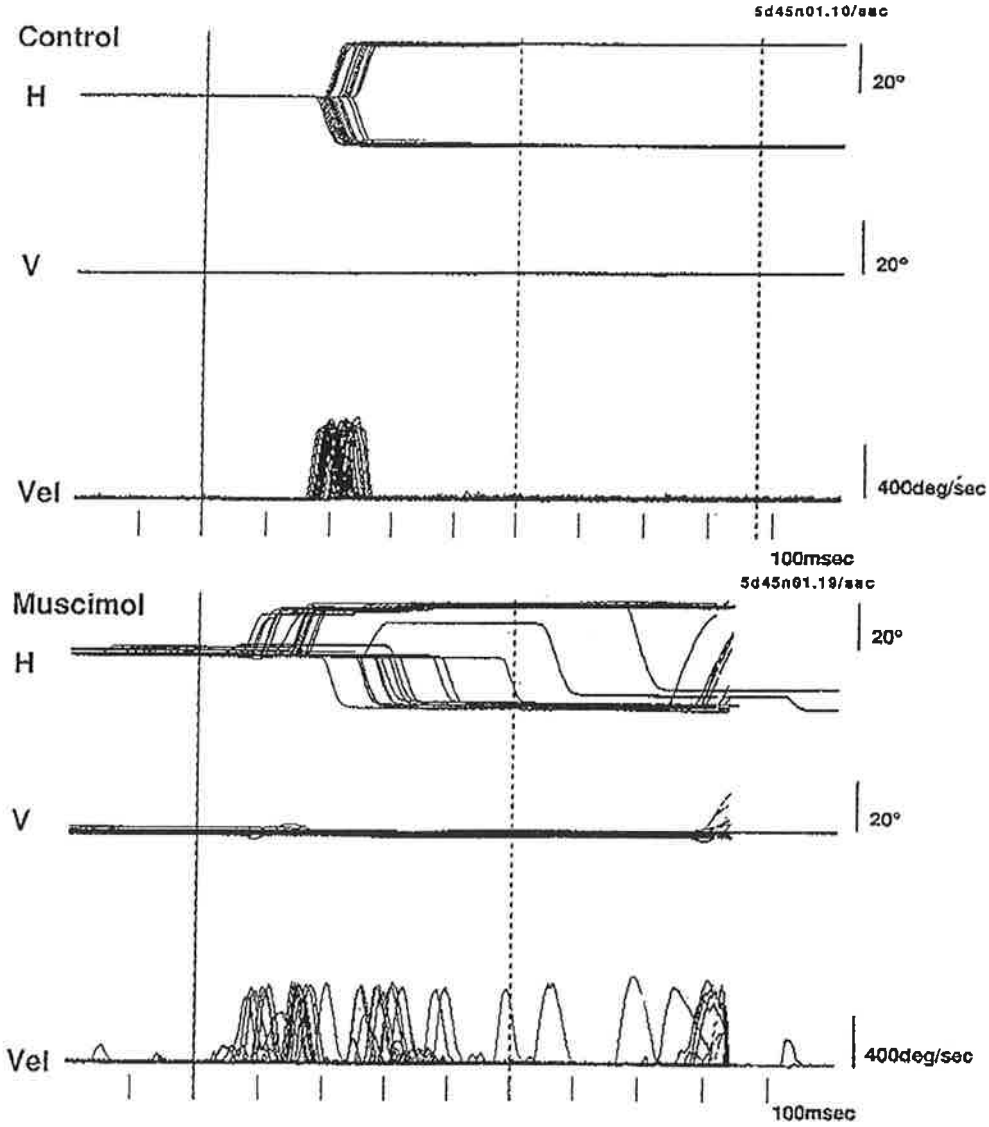
44. 視床下核による随意性眼球運動制御機構の解析

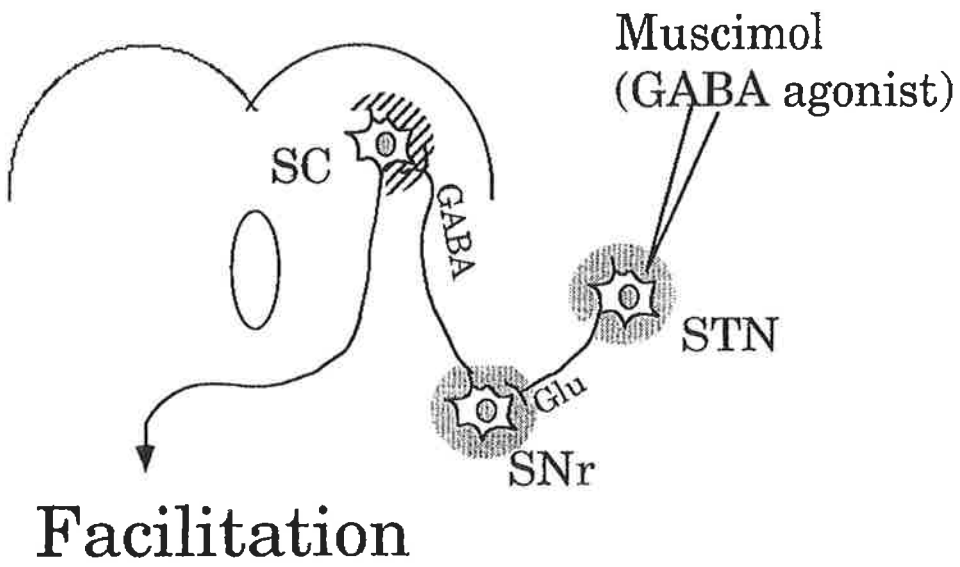
松村　賢（群馬大・医・脳神経外科）
小島　淳（順天堂大・医）

我々はいままで，大脳基底核による随意性眼球運動制御機構を解析してきた。すなわち，尾状核より黒質網様部を経て上丘へ至る系を明らかにした。あらたに，視床下核においても，サッケード課題に伴いその細胞発火頻度を増加させるニューロンが見られる事を報告した。このことは，視床下核の眼球運動への関与を示唆するが，視床下核の破壊実験での眼球運動の評価はされていない。

本研究では，視床下核内へムシモールの微量注入を行い記録した眼球運動を分析した。サッケード課題を訓練したサルの一側視床下核にムシモールを微量注入した(1.0ug/ml)。眼球運動は，地場サーチコイル法にて記録した。

ムシモールの視床下核内注入数分後より，対側上下肢に不規則な不随意運動が出現した。対側へのサッケードは潜時が短縮し，同側へのサッケードは潜時が延長した（図１）。　視床下核は，黒質網様部へグルタメートによる興奮性投射を持っており，黒質網様部の高頻度発火を指示していると考えられる。視床下核機能の低下は，黒質網様部細胞発火の減少を起こす。これは，上丘細胞を脱抑制することとなり，対側へのサッケードが容易に起こってしまう結果となると推論できる（図２）。


5d45n01.10/sec
Control
H
20°
V
20°
Vel
400deg/sec
100msec
5d45n01.19/sec
Muscimol
H
20°
V
20°
Vel
400deg/sec
100msec



45. 神経突起伸長の走行性のメカニズムに関する研究

山崎秀樹，谷藤　学（福井大・教育・工）
小幡邦彦，山口和彦（生理研）

神経細胞が突起を伸ばして標的となる細胞を見いだすメカニズムの一つとして，特定の誘引（あるいは忌避）物質の濃度勾配にしたがって神経突起が伸長する機構が考えられている。しかし，濃度勾配検出のメカニズムについては明らかではない。Bonhoeffer 等は，神経突起先端のグロースコーンの部分部分での微小な濃度差を検出していると考えているが，この仮説では，数 um の大きさのグロースコーンの両端に生じるごく僅かな濃度差を検出するような高精度の細胞内メカニズムを必要とすることになり，あまり現実的ではない。この仮説に対して，神経突起先端の動態に２つのモード，すなわち，一定の方向に伸長するモードとランダムな方向に方向を転換するモードの２つがあることを仮定し，濃度に依存してこの２つのモードをとる確率が変化すると考えると，僅かな空間的な濃度差の検出機構を仮定せずに濃度依存的な突起伸長が説明できる。我々は，この仮説の妥当性を検討するため，様々な一様な濃度の元での神経突起伸長の観察を行った。ニワトリ胚より得た脊髄交感神経節 (DRG) 細胞を24時間培養し，40倍の正立ノマルスキー顕微鏡を用いて，神経突起の観察を行った。誘引物質には NGF (1-12.0 ng/ml) を用いた。また，カメラにより神経突起を撮影しコンピュータに取り込むことによって定量的な解析を行った。まず

NGF が誘引物質としての作用を持つことを確認するために，細胞の近傍に 100ng/ml の NGF を含む溶液を充填したキャピラリーの先端を近づけることによって，NGF の濃度勾配を形成した。その結果，神経突起は伸長方向をキャピラリーの方向に向けるのが観測された。次に，一定濃度の NGF 存在下での神経突起の伸長を経時的に観測し，その速度とひとつのグロースコーンから出るマイクロスパイクの総長（マイクロスパイクの長さ×本数）の変動幅（標準偏差）を計測した。その結果，培養液中の NGF 濃度が高くなると突起伸長の速度が早くなるのに対して（図１），マイクロスパイクの長さの変動幅はむしろ少なくなること（図２）が明らかとなった。また，濃度依存的な突起伸長を阻害すると考えられるサイトカラシン B (0.1ug/ml) を添加すると，このような NGF 濃度に依存した変化は消失した。（図１，図２）。マイクロスパイクの長さ，数の変動の大きな状態が方向転換の可能なモードに対応していると考えると，NGF 濃度が低いときは突起伸長の方向転換が高頻度で起こるためあまり伸長せず，一方，NGF 濃度が高くなると一定方向へ伸長する傾向があるため，平均として，神経突起が NGF 濃度の高い方へ伸長するという先の考え方を指示する結果である。

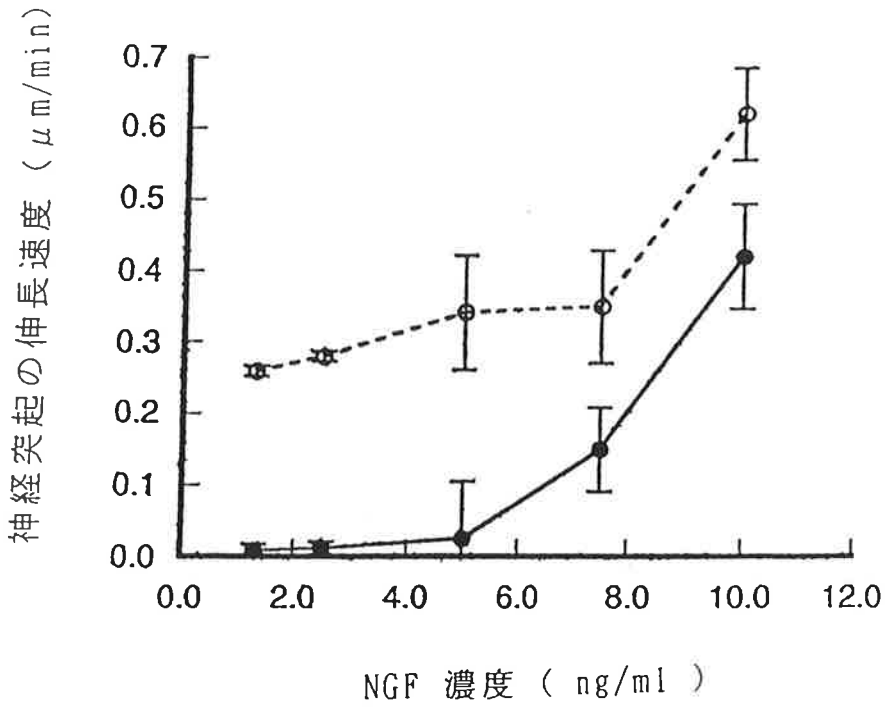


図１　神経突起伸長速度の NGF 濃度依存性・実線，コントロール・点線，0.1μg/ml　サイトカラシンB存在下。

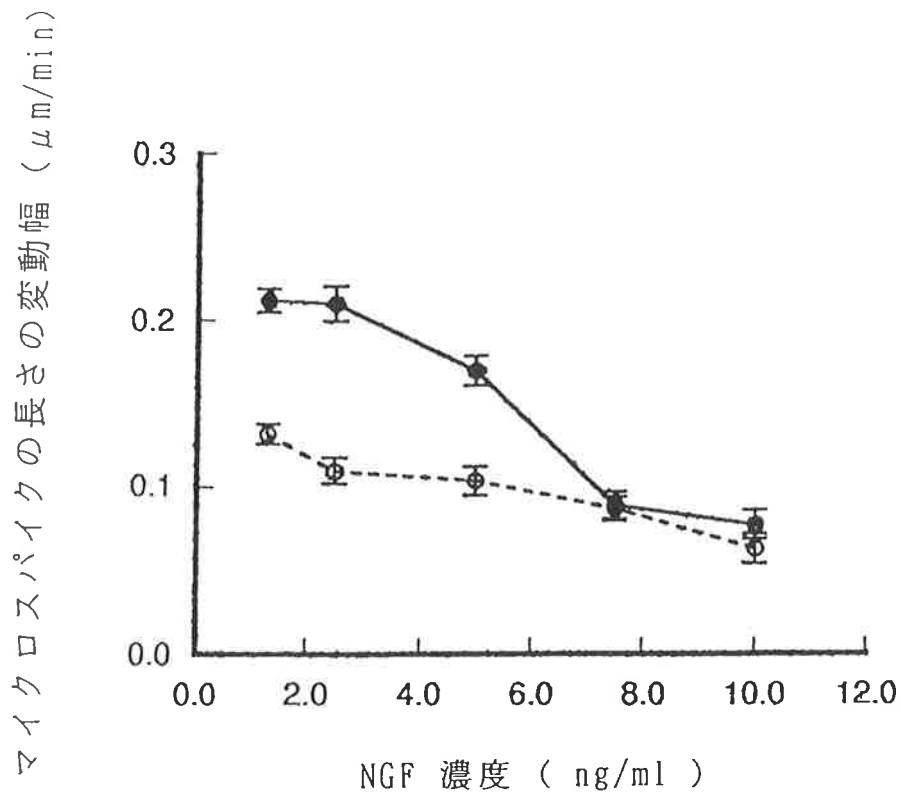


図2　マイクロスパイクの長さの変動幅の NGF 濃度依存性・実線，点線は図1に同じ。

46. 培養プルキンエ細胞における長期可塑性と遺伝子発現

山森哲雄，矢野良治（理研・フロンティア）
小幡邦彦，山口和彦（生理研）

本研究は，培養プルキンエ細胞を用いて長期抑圧下 (LTD) での遺伝子発現を調べようとしたものである。伊藤正男らによって，1982年に LTD の存在が証明されて以来，麻酔した動物，及びスライス条件下での LTD は，海馬の LTP と共によく調べられている。従来，LTP は，海馬に特異的であり，LTD は，小脳に特異的であるとされていたが，最近，両者とも LTP/LTD の状態をとりうり，それがカルシウムの動的変化によって，調節されている可能性が示唆されている。更に，小脳 LTD でその役割が知られている cGMP などの二次メッセンジャー系が海馬の LTP でも似た役割を担っていることも示唆されており，この点でも，両者の共通性がうかがえる。もし，両者に共通性があるならば，小脳はその整然とした構造から，分子レベルでの研究を進めるうえで，利点があると考えられる。最近，平野，Linden 等によって，培養系でも LTD を起こすことが可能になったので，我々は，LTD 条件下での遺伝子発現の変化を調べることによって，小脳

長期記憶成立の分子的機構を解明しようとして本共同研究を企画した。共同研究期間内に達成したのは，1）プルキンエ細胞の培養条件の確立，2）種々の薬理学的条件下での最初期遺伝子(IEG)の発現パターンの変化を調べ，スライスで報告したIEGの変化(Nakazawa, K., Karachot, L., Nakabeppu, Y. and Yamamori, T. Neuroreport, 4, 1275-1278, 1993)を培養条件下で基本的に確認した。Liondenらによって確立された培養プルキンエ細胞でのLTD条件下でこれを確認することは，現在，進行中である。従って，本共同研究によってLTDと遺伝子発現の連関を調べる一つの基礎ができたと考えている。

47. 長期・帆短期記憶に基づく運動制御への運動性連合野の関与

児玉　亨（東京都神経研）
稲瀬正彦（生理研）

記憶に基づいて運動を行う際に，大脳基底核系と運動性連合野とは重要な役割を果たす，と考えられている。両者の機能的なつながりを明らかにするためには以下の実験を行った。まず，遅延型GO/NOGO課題を遂行中のサル被殻から，課題に関連した神経細胞活動を記録した。記録終了後，順行性標識物質のWGA-HRPを補足運動野へ注入し，組織学的に被殻内で補足運動野から入力をうける領域を同定した。

被殻では，神経細胞活動を活動時期を基に解析すると，手がかり刺激直後の活動，遅延期の活動，反応期の活動，報酬期の活動などがみられた。また，試行選択性からみると，GO試行のみ，NOGO試行のみ，およびGO/NOGO両試行で活動する細胞が見られた。これら各種の被殻神経細胞のうち，補足運動野からの入力を直接受けているのはどの細胞であるか，現在，組織学的に検討中である。

48. 運動関連領野の機能連関

嶋　啓節（東北大・医・第2生理）
丹治　順（生理研；東北大・医・第2生理）

大脳皮質の運動関連諸領野の機能連関を調べる目的で，複数の運動を順次遂行する際の補足運動野と一次運動野の細胞活動を記録し，比較検討した。すなわち，上肢を使って押す，引く，回すという3つの動作を種々の順序で遂行しているサルの2つの領野から，神経細胞活動を記録した。動作の順序は，まず視覚的に教示し，引き続いて覚えた順序に基づいて動作を遂行させた。

補足運動野では，記憶に基づいて定められた順番で運動を行う際に，ある特定の動作から次の動作を行う際に（たとえば押す→引く），行う順序に依存して待機期間中に特異的な活動を示す神経細胞が多数見られた。一方，一次運動野では，待機期間中あるいは運動遂行時の活動に順序依存性は認められなかった。このような補足運動野の神経細胞活動は，日常よく行われるような一連の動作を制御する神経機構を解明するための重要な手がかりとなる。

49. サル視床腹側核群の線維連絡の解析

徳野博信（京都大・医・高次脳形態）
稲瀬正彦（生理研）

サル視床腹側核群の入出力関係を調べるために，順行性にも逆行性にも輸送される標識物質である WGA-HRP (Horseradish peroxidase conjugared to wheat germ agglutinin) の視床内注入を試みた。注入に先だって細胞外記録および微小電流刺激をおこない，視床後外側腹側核吻側部 (VPLo) のなかでも上肢の運動に関係が深いと考えられる部分を同定した。実際の注入にはガラス電極を用い電気泳動法による微量注入を行なった。現在までの実験においては，順行性，逆行性標識ともに標識像は観察されていない。これは注入があまりに微細であったことが原因と考えられる。今後注入時のパラメーターの調整や，他の方法，たとえば圧力式微量注入装置による注入を検討する必要があると考えられた。

50. 神経回路網形成とグルタミン酸受容体

渡辺雅彦，高山千利，市川量一，永島雅文
井上　馨，井上芳郎（北海道大・医・解剖学第一）

グルタミン酸は，中枢神経系における主要な興奮性神経伝達物質であり，N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体チャネルはグルタミン酸受容体を構成する主要なサブタイプの１つである。NMDA 受容体チャネルは，記憶や学習の基盤と考えられている活動依存性のシナプス可塑性や，一過性虚血やてんかん重積発作により生ずる神経細胞壊死にも関与している。また，発達期の脳では，幼若期に受容した感覚刺激がその後の神経行動学的パターンの形成を促す経験依存性のシナプス可塑性や，脳の形成発達にも深く関与していることが知られている。最近の分子生物学的研究により，このチャネルを構成する５種のサブユニット遺伝子が単離され，それぞれのサブユニットが異なる電気生理学的・薬理学的特性を有していることが明らかになった。神経の発達過

程に伴い多様な機能的役割を果たすNMDA受容体チャネルの分子機構を解明する目的で，各サブユニット遺伝子の神経系内発現分布とその発達変化をIN SITUハイブリダイゼーション法により解析した（図1）。

ζ1サブユニットmRNAは，胎生期より成熟期に至るまでの中枢および末梢神経系の各領域において広範に発現する。これに対して，4種のεサブユニットの遺伝子発現は，中枢神経系の分化・成熟に伴いそれぞれ特徴的な空間的発現分布と時間的変動様式を示す。ε1サブユニットmRNAは，生後海馬領域に発現を開始し，生後21日までに中枢神経系の各領域に広範な発現を示すようになる。これに対して，ε2サブユニットmRNAの発現シグナルは，胎生期から新生児期の中枢神経系内の全ての領域に観察されるが，生後14日以降の成熟過程において，前脳を除くほとんどの領域は発現を停止する。ε3サブユニットmRNAは，生後発達過程とともに小脳顆粒細胞に顕著な発現を示すようになる。ε4サブユニットmRNAは，胎生期から新生児期の間脳・脳幹・脊髄に強く発現するが，以後の成熟過程においてその発現レベルは著しく低下する。

以上の所見は，NMDA受容体チャネル複合体のサブユニット構成が，εサブユニットを軸として，生後発達過程においてダイナミックに変動することを示唆している。このサブユニット再編成の結果，発現サブユニットの分子種に関して領域差に乏しい胎児型受容体から神経領域や細胞種により異なるパターンを有する成熟型受容体へと移行することになる。しかも，εサブユニットmRNAの分布様式や変動様式は，従来より知られているNMDA受容体チャネルの薬理学的特性や電気生理学的特性の空間的・時間的異質性と一致していることは興味深い。ゆえに，異なった機能的特性を有するεサブユニットの分子多形性とその異なる時間的・空間的発現特異性が，生体内におけるNMDA受容体チャネルの機能的多様性を生み出しているものと考えられる。

神経支配の開始により筋細胞に発現するアセチルコリン受容体のサブユニット構成が変化し，これに伴いこの受容体のチャネル特性と筋細胞内分布が変化する事実は広く知られている。今後，神経可塑性の形成機構を知るうえで，発達期の中枢神経系に起こるNMDA受容体のサブユニット再編成過程がどのようなメカニズムにより生ずるのかを解析することが重要であろうと思われる。

【文献】

WATANABE et al. NeuroReport (1992) 3: 1138-1140

J. Comp. Neurol (1993) 338: 377-390

Neurosci Lett (1994) 165: 183-186

Brain Res (1994) 634: 328-332

J Comp Neurol (1994 in press)

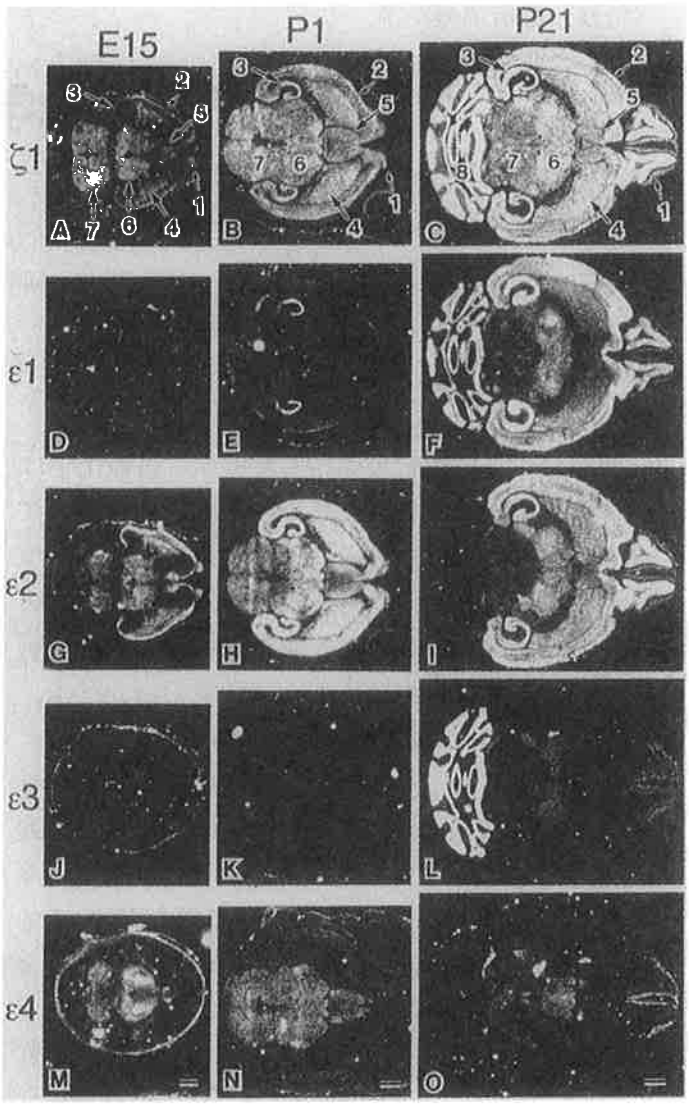


図1　発達過程のマウス脳における NMDA 型グルタミン酸受容体チャネルサブユニットの遺伝子発現変化。胎生15日 (E15), 生日 (P1), 生後21日 (P21) の脳水平断切片を，ζ 1 (A-C), ε 1 (D-F), ε 2 (G-I), ε 3 (J-L), ε 4 (M-O) の各サブユニット mRNA に特異的な45塩基長のオリゴヌクレオチドプローブを用いて反応を行った。1．嗅球；2．大脳皮質；3．海馬；4．線条体；5．中隔；6．視床；7．中脳；8．小脳。スケールバーは 1mm

51. リン脂質膜で出現するリップル構造の3次元構造解析

八田一郎（名古屋大・工）
有井達夫（生理研）

リン脂質膜に現れるリップル構造は，波長については以前から多くの報告があるが，それに比べ，振幅についての情報はあまりない。そこで我々はフリーズフラクチャ法によるレプリカ作製をし，それを用いて走査型トンネル顕微鏡によってリップルの三次元構造の観察を試みた。

試料はジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)，ジミリストイルホスファチジルコリン(DMPC)，およびそれぞれのコレステロール混合系を用いた。各試料を適温に保ち，液化フレオンで急速凍結をした後，フリーズエッチング装置(BAF400B, Baltzers AG)で，試料の割断，白金ーカーボンによるシャドウイング，カーボン膜の蒸着を行い，レプリカを作製した。透過型電子顕微鏡でリップル構造の有無を確認した後に，STM (Nanoscope Ⅱ)による観察を行った。

図1は10mol% コレステロール/DMPCについて得られたSTM像である。一般に，コレステロールを含む系では，通常よりリップル周期が拡がることが知られている。STM像でも，20～30nmの周期が観測され，純粋なDMPCのリップル周期である約13nmよりも長くなっている。このことは，微視的相分離によって，リップル中に平らな縞状部分ができるためであると考えられている。図1ではリップルの山に相当する溝が平行に並び，その他はなだらかな面が広がっていることから，これを示唆しているものと思われる。

ところで図1には，リップル構造の他に，直接約3nm以上の粒子が全面的に散らばって見える。これはシャドウイングの際のPt-Cの蒸着粒子であると考えられる。これに対し，リップルの高さも同程度であると言われており，この像はリップルの形態を正確に反映するものとはいえない。これを解決し，リップルの形の詳細な検討を行うためには，蒸着用材料にタンタルータングステンを用い，解像度を上げること，また，真空度を約10^{-8}Torrにまで上げて，蒸着粒子の直径をできるだけ小さくすることが必要である。

STMでの観察において，探針の先端の形状が得られるデータに大きく影響する。今回の実験では，白金ーイリジウムの線を斜めにカットしたもの，あるいはそれを塩化カルシウム水溶液中で電解研磨したものを探針に用いたが，リップル形状を正確に表した像は得られなかった。通常の探針では，先端の直径は約100nmであることがわかっている。このような条件下で，周期約15nmを示すリップル構造を観察し，正確な形状を把握するのは難しい。最近では，探針の先端径を小さくする手法がいくつか開発されており，それらを用いてより鋭い探針の作製法を検討する必要もあると思われる。

今後は，以上の2つの点に配慮し，STM観察を行う必要がある。

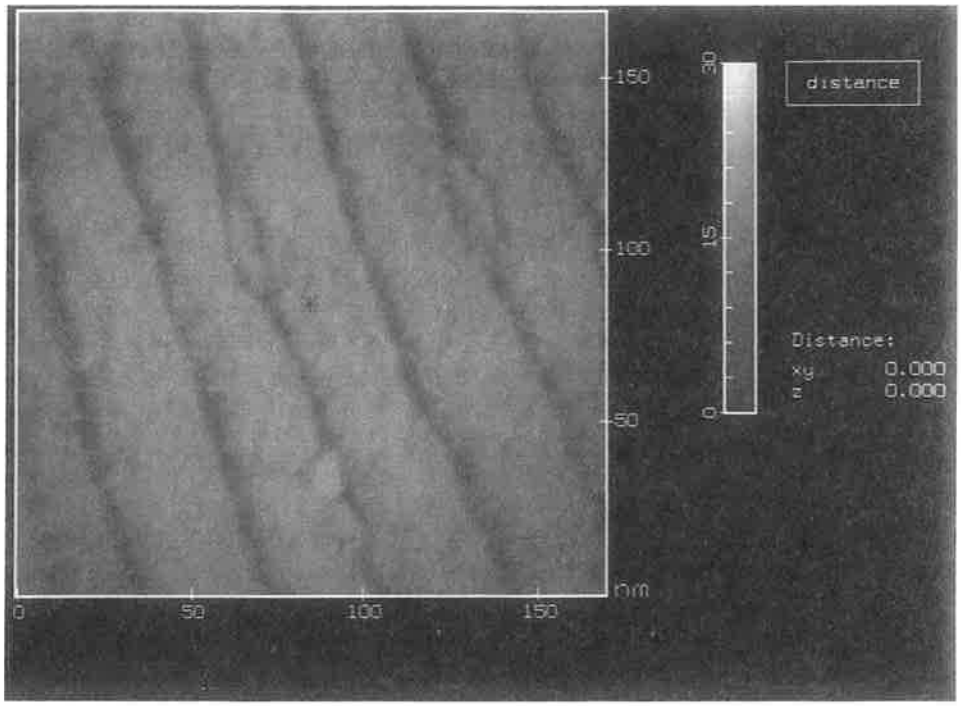


図1　10mol% コレステロール/DMPC におけるリップル構造

52. 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）

現在までに得られた結果をまとめると，

1．胃酸およびペプシン分泌　イヌの Heidenhain pouch では，空腹時の酸分泌およびペプシン分泌は運動（Vmax の60－70%）によって影響を受けなかった。食後の Heidenhain pouch からの酸分泌は食後1時間目までは安静時と差がなかったが，2時間目に入ると有意に減少した。食後の Heidenhain pouch からのペプシン分泌は運動の有無に関わらず減少し，運動の影響はなかった。

2．胃排出　液体食を用いて胃排出を測定した。運動によって胃排出は有意に遅延した。特に食後60分および90分で有意であった。

3．胃十二指腸運動　空腹時のイヌの上部消化管には，約120分毎に強い収縮波が出現する(MMC)。MMC は運動中には出現しなかった。しかし，運動中止後には運動に関わり無く，予期

された時刻に MMC が出現した。運動は胃運動の平均 Frequency とか Amplitude に影響を与えなかったが，十二指腸の平均 Frequency および Amplitude を増加させた。

4．血中 gastrin　食後15分で頂値に達した。これは運動の有無によって変わらなかった。

5．大腸運動　2頭で大腸瘻を造設した。運動により大腸の内圧は上昇し，イヌは排便した。しかし，コントロールの大腸運動が十分検討されないまま1頭は死亡，1頭では大腸瘻が閉鎖したため，結論は得られなかった。

6．ヒトに於ける検討　人では胃内 pH は運動時に高い傾向を示した。また，胃運動は身体運動により Amplitude が増加する傾向を示した。また，血中 gastrin は頂値が非運動時には60分であったが，運動時には15分と食後早期に上昇する傾向がみられた。マラソン選手を対象に血中 motilin を測定したが，運動による影響はなかった。

7．運動継続の影響　運動を継続して行っている人を対象に小腸通過時間，大腸通過時間，全消化管通過時間を測定した。大腸通過時間は運動継続により有意に短縮したが，小腸通過時間に影響はなかった。

以上，身体運動は消化管諸機能に種々の影響を及ぼすことが明らかとなった。

文献

1）Liu F, Kondo T, Toda Y: Brief physical inactivity prolongs colonic transit time in elderly active men. Int J Sports Med 14: 465-467, 1993.

2）Kondo T, Naruse S, Hayakawa T, Shibata T: Effect of exercise on gastroduodenal functions in untrained dog. Int J Sports Med 15: 186-191, 1994

53. 大脳基底核の生理学的・解剖学的研究

南部　篤，松崎竜一（生理研）
陣内皓之祐（滋賀医大・第一生理）
高田昌彦（京都大医・高次脳形態）

大脳基底核の機能および解剖については，不明のことが多いが，近年，線条体－淡蒼球内節あるいは黒質網様部からなる直接路と，線条体－淡蒼球外節－視床下核－淡蒼球内節あるいは黒質網様部からなる間接路の2つに分けて考えようという提案がなされている。この様な神経回路で，どのような情報処理がなされているかについては，それぞれの核で神経活動がどのように変化していくのか，順を追って観察する必要がある。特に，入出力を同定したニューロンの神経活動を捉えることが重要であるという観点から，あらかじめ刺激電極を様々な大脳皮質領野，小脳核，淡蒼球，尾状核，被殻などに埋め込んでおいたサルを用い，覚醒下に，視床，淡蒼球から単一ニューロン活動の記録を行い，ニューロンの入出力を同定すると同時に，様々なタスクを与え，課題と

の関連を調べたところ，次のような結果を得た。

1．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，運動野投射ニューロンは，VLo 核に存在した[1]。

2．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，上肢の運動に関連して活動を変化させ，そのうちの約1/3が筋電図変化に先行していた。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，両者の間に差を見い出せなかった[2]。

3．このような運動に関連した活動は，淡蒼球尾腹側の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[3]，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，筋電図変化に先行して発射活動を変化させた[4]。

4．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 核に存在した[5]。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[6]。

5．このような持続的な発射活動や，課題の手がかりとなる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[4]。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[3]。

以上の結果は，大脳皮質－線条体－淡蒼球－視床－大脳皮質投射が，少なくとも2つのループ回路から成り立っていることを示唆する[7]（図参照）。(a)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。(b)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。

今後は，このよう電気生理学的な実験を発展させると同時に，解剖学的手法も組み合わせて，大脳基底核の機能に迫りたいと考えている。

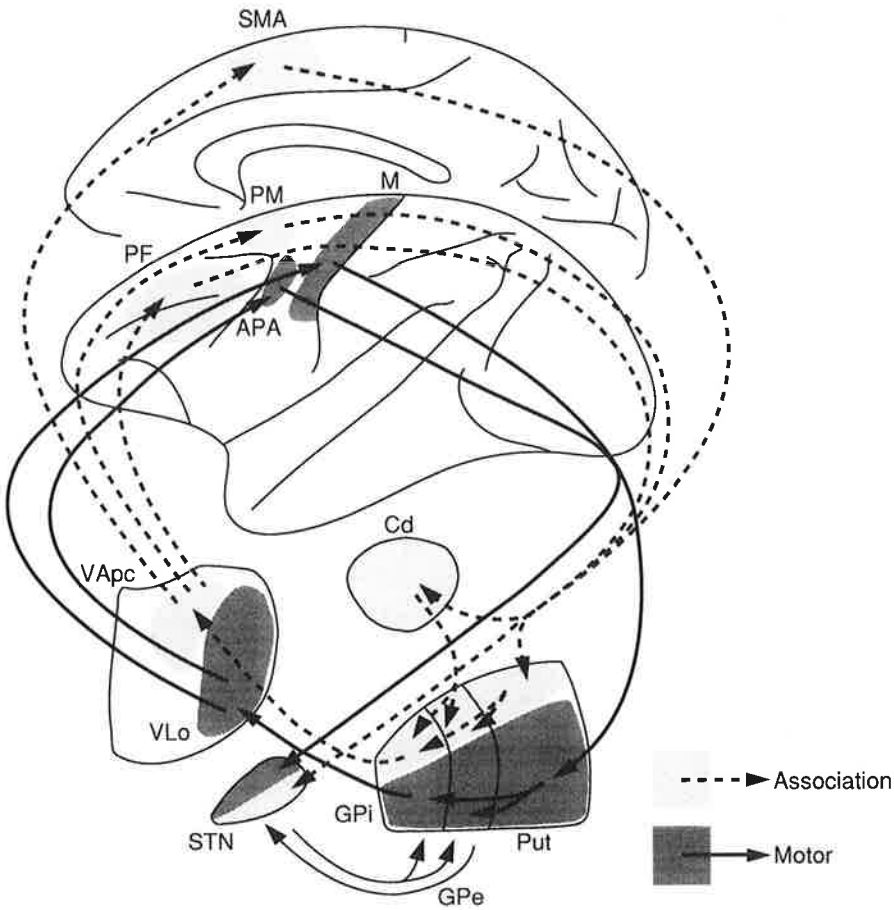
【参考文献】

1）Nambu A, Yoshida S, Jinnai K (1988) Projection on the motor cortex of thalamic neurons with pallidal input in the monkey. Exp Brain Res 71: 658-662

2）Nambu A, Yoshida S, Jinnai K (1991) Movement-related activity of thalamic neurons with input from the globus pallidus and projection to the motor cortex in the monkey. Exp Brain Res 84: 279-284

3）Yoshida S, Nambu A, Jinnai K (1993) The distribution of the globus pallidus neurons with input from various cortical areas in the monkeys. Brain Res 611: 170-174

4) Nambu A, Yoshida S, Jinnai K (1991) Discharge patterns of pallidal neurons with input from various cortical areas during movement in the monkey. Brain Res 519: 183-191
5) Jinnai K, Nambu A, Tanibuchi I, Yoshida S (1993) Cerebello- and pallido-thalamic pathways to area 6 and 4 in the monkeys. Stereotactic and Functional Neurosurgery 60: 70-79
6) Jinnai K, Nambu A, Yoshida S, Tanibuchi I (1993) The two separate circuits through the basal ganglia concerning the preparatory or execution processes of motor control. In Role of the Cerebellum and Basal Ganglia in Voluntary Movement. eds by Mano N, Hamada I,DeLong MR, pp 153-161, Elsevier, Amsterdam
7) Nambu A, Yoshida S, Tanibuchi I, Jinnai K (1993) Movement-related activity in the pallido-thalamo-cortical loop. Biomed Res 14 Suppl 1: 31-35



大脳基底核を巡る2つのループ回路(Association loop と Motor loop)を破線と薄い影，および実線と濃い影で，模式的に示す。

54. 付随陰性電位変動(CNV)の発現機序に関する研究

玄番央恵（関西医大・生理）
佐々木和夫，南部　篤，松崎竜一，久宝真一，遠本　徹（生理研）

ヒトの頭皮上から記録される付随陰性電位変動(CNV; contingent negative variation)は予期，意欲，注意などの脳機能を反映するように考えられてきた脳緩電位であるが，未だその出現部位は不明である。ヒトおよびサルにおいて種々の方法を駆使してCNVを誘発，記録，分析し，CNVの出現部位と生理学的意義の解明を試みた。

サルに一定間隔（1秒）の対刺激（予告刺激と命令刺激）を5.0-10.0sの不規則な時間間隔で与え，命令刺激に応じて手によるレバー上げ運動を行う（CNV課題）ように訓練した。刺激には音または光を用いた。サルの前頭連合野，運動前野，補足運動野，運動野，体性感覚野，頭頂連合野，後頭連合野の多くの皮質部位の，それぞれ皮質表面と2.0-3.0mm深層に記録用電極を慢性的に設置した。サルにCNV課題を行わせ，記録用電極を用い，不関電極（耳の後ろの頭蓋骨に設置）に対して皮質フィールド電位を記録し，加算平均法を用いて分析して，CNVの出現する皮質部位および電気生理学的特性を研究した。

1）予告－命令刺激が光－光の場合。本課題に習熟した9頭のサルは命令刺激後，約130-220msという，命令刺激だけを与えた場合より短い反応潜時で運動した。両側大脳半球の前頭連合野，運動前野，補足運動野において，予告刺激後に出現し，命令刺激開始まで持続する表面陰性－深部陽性の持続型緩電位が得られた。一方運動野，体性感覚野では，持続型緩電位より遅れて出現し，命令刺激開始に向かって徐々に増大する表面陰性－深部陽性の漸増型緩電位が得られた。これらの緩電位は錐体細胞の尖端樹状突起の表層部に生じた興奮性シナプス後電位であると考えられ，ヒトのCNVに相当する電位であると推論される。上記の緩電位の中，前頭連合野，運動前野，補足運動野に出現する持続型電位は命令刺激に対する予期，期待と関連しているように考えられ，運動野，体性感覚野で記録される漸増型緩電位は自発性運動に先行して出現する運動準備電位に類似しているように考えられる。

2）予告－命令刺激が音－音の場合。本課題に習熟した3頭のサルは，命令刺激後約300-350msという，命令刺激だけを与えた場合とほぼ同様の反応潜時で運動した。前頭連合野，運動前野，補足運動野において持続型緩電位が得られたが，視覚刺激の場合に比べ，電位の振幅は小さく，出現範囲も限られていた。運動野，体性感覚野においてCNV様電位は記録されなかった。これはサルが音刺激より光刺激に対し感受性が高いことを示唆するのかも知れない。

ヒトにCNV課題を行わせて頭皮上から脳電位と脳磁場を計測し，CNVの電流双極子の推定を試みた。さらに実験を重ね一層詳細な知見を得て，本研究を達成したい。

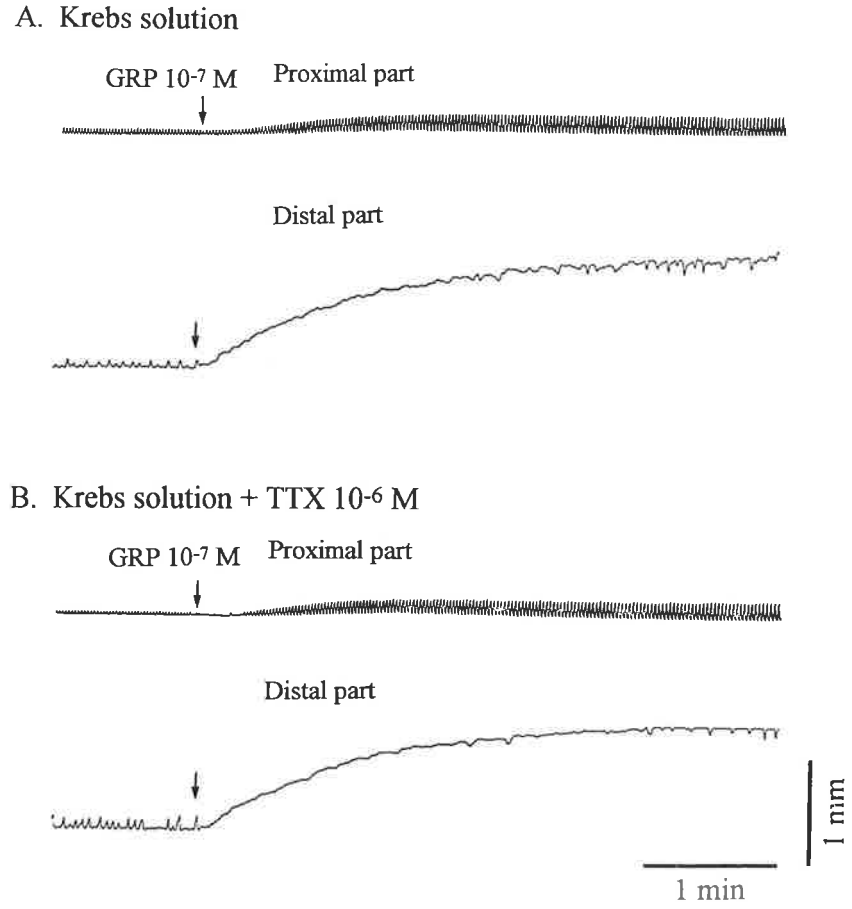
55. 大腸の粘膜筋板における GRP 含有神経に関する研究

石川一志（旭川医大）
尾崎　毅（生理研）

粘膜筋板は消化管に普遍的に存在するにもかかわらず，あまり注目されずに今日に至っている。それでも，最近の５年間に幾つかの研究がなされ，少しずつその実態が明らかにされつつある。著者らは，本組織の機能解明のためには，様々な角度からの基礎的研究が不可欠と考え，初めに本組織の運動を調節している神経に関する研究を行うこととした。実験材料として，粘膜筋板が良く発達しているモルモットの近位結腸を用い，条片標本を作製して灌流実験を行うと共に，免疫組織化学的手法を併用して研究を進めた。その結果，コリン作動性神経および tachykinin 含有神経，とりわけ neurokinin A (NK-A) 含有神経は本組織の運動を昂進し，アドレナリン作動性神経および calcitonin gene-related peptide (CGRP) 含有神経は本組織の運動を抑制する可能性を示した。

今年度は，以上のような研究の一環として，gastrin releasing peptide (GRP) を含む神経がモルモット近位結腸の粘膜筋板の運動に関与している可能性について検討した。実験方法は，昨年度までの共同研究と同様に，条片標本を恒温灌流槽内で灌流し，粘膜筋板の等張性収縮を記録した。Krebs 液のみで灌流した場合，律動的で小さな自発収縮を示したが，GRP を灌流液中に加えると次第に収縮は増大した。収縮は GRP 添加後数分で最大となり，その後長時間持続した（図Ａ）。この収縮増大効果は GRP 10^{-8}-10^{-6}M で濃度依存性に増大した。近位結腸の近位部（盲腸との境界から３－４㎝の部位）と遠位部（遠位結腸まで５－６㎝の部位）では収縮パターンの違いがあり，近位部では原則として phasic な，遠位部では tonic な収縮が見られた。これは，両部位における平滑筋の性状の相違によるものと考えられるが，詳細は不明である。さらに，GRP に対する感受性には両部位で大きな相違があり，遠位部でより大きな反応が引き起こされた（図Ａ）。一方，イヌの近位結腸の粘膜筋板では，GRP は substance P 含有神経を介して収縮を引き起こすことが報告されたが（文献１），モルモットの近位結腸では，GRP に対する粘膜筋板の反応は TTX によってほとんど影響を受けず，直接効果であると考えられる（図Ｂ）。免疫組織化学的には GRP 含有神経が本組織に分布することが報告されており（文献２），今回の結果と考えあわせると，GRP 含有神経がモルモット近位結腸の粘膜筋板の運動に関与している可能性が高い。

（文献１）Angel F, Go VLW, Szurszewski JH (1984) *J Physiol 357: 93-108*
（文献２）Messenger JP (1993) *Arch Histol Cytol 56: 459-473*



モルモット近位結腸の粘膜筋板条片標本に及ぼす GRP の効果。A：Krebs 液で灌流し，10^{-7}M の GRP を作用させたときの（矢印）粘膜筋板の収縮。近位部（盲腸に近い部位，上段）と遠位部（遠位結腸に近い部位，下段）で収縮のパターンおよび反応の大きさが異なることに注意。B：Krebs 液で灌流し，10^{-6}M TTX の存在下で10^{-7}M の GRP を作用させたときの（矢印）粘膜筋板の収縮。TTX により GRP に対する粘膜筋板の反応は近位部（上段），遠位部（下段）共ほとんど影響を受けない。

56. THE INHIBITION OF INTERDIGESTIVE PERIODIC PANCREATIC SECRETION BY PYY IN DOGS

Romuald Zabielski, Takenori Onaga, Seiyu Kato
(Department of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University)
Satoru Naruse, Tsuyoshi Ozaki (National Institute for Physiological Sciences)

Peptide YY (PYY) was shown previously to inhibit pancreatic exocrine secretion in dogs. The objective of this study was to characterize the influence of PYY on interdigestive periodic pancreatic secretion (PPS) and the periodic secretion stimulated with secretin (50 ng/kg/h) in conscious dogs. An infusion of PYY (400 pmol/kg/h) was started 30 min after pancreatic secretory peak associated with phase III of duodenal migrating motor complex (MMC) and was continued for 2h (a period exceeding the length of usual PPS cycle). Infusion of PYY failed to affect the asecretory phase of unstimulated PPS significantly (juice flow and output of bicarbonate, protein and amylase). A decrease in the asecretory phase of secretin-stimulated PPS by PYY was also not significant. The secretory phases of both unstimulated and secretin-stimulated PPS were abolished by PYY infusion (figure). Duodenal phase III came around the ending of PYY infusion, though secretory phase of PPS reappeared no sooner than a 90 min after infusion. In conclusion, PYY may inhibit secretory phase of PPS by reducing interdigestive periodic activity of the pancreas associated with duodenal MMC.

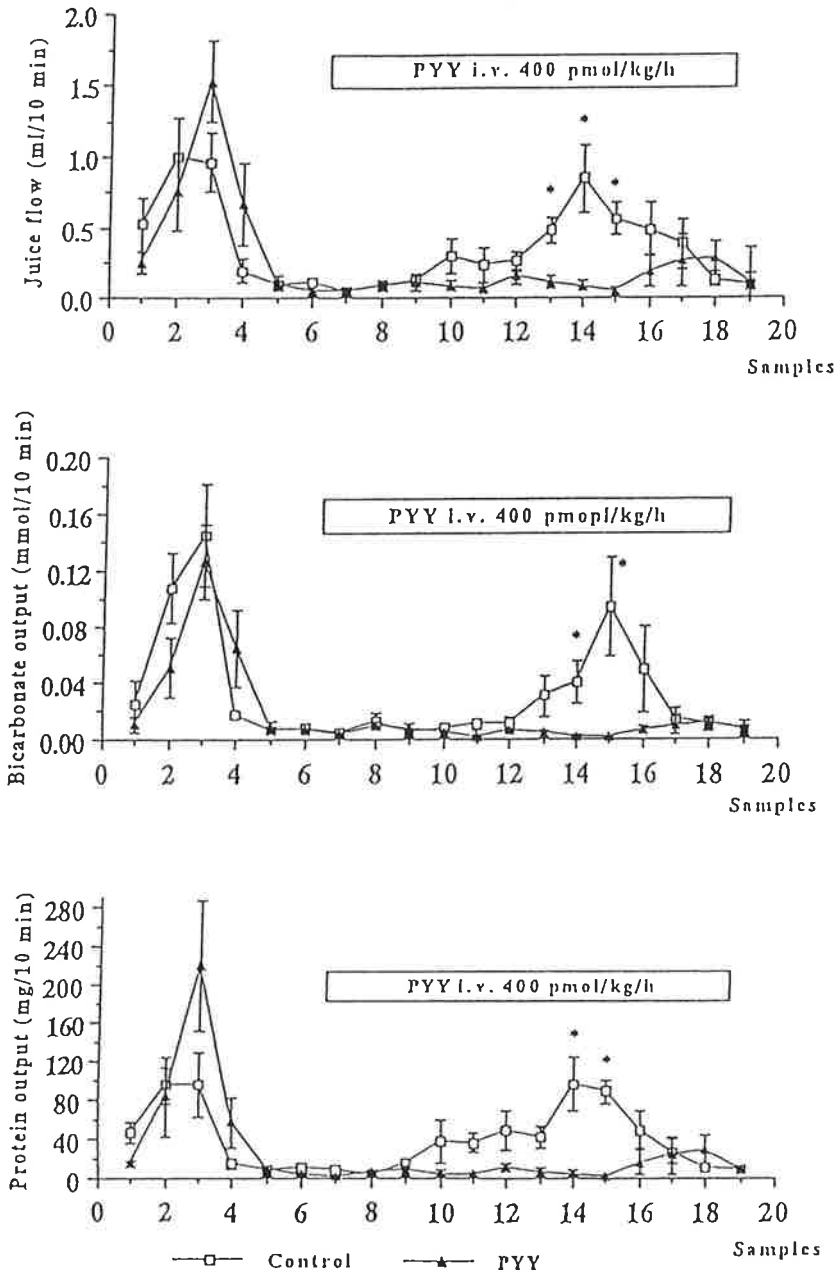


Figure The effect of PYY on interdigestive periodic pancreatic secretion (mean ± S.E.M). Asterisk indicate significant difference ($P < 0.05$) between control (□) and PYY (▲)-inhibited secretion.

57. 神経海馬回路におけるアルツハイマー病アミロイドタンパク質の発現の解析

丸山　敬（東京都臨床研・遺伝情報）
小幡邦彦（生理研）

高齢者の痴呆の原因としてアルツハイマー病(AD)が注目されている。この疾患には，細胞内に出現する神経原線維変化と細胞外の老人斑という明瞭な形態的病理学的変化がある。これらが痴呆の直接の原因であるかは，確定されていないが，老人斑の周囲には著しい神経変性が観察されることや，老人斑がADに比較的特異的に観察される病理変化であることなどから，老人斑の出現が一義的な現象であるとの考えがある。老人斑の主成分はアミノ酸40数個のタンパク質（β/A4タンパク質：β/A4）である。クローニングの結果から，β/A4は前駆体（アミロイド前駆体：APP）に由来することが明らかとった。APPは正常な神経細胞にも存在するために，ADでは，なんらかの代謝異常によってβ/A4が蓄積してくると考えられる。

まずAPPの代謝を詳細に検討するのに必要な抗血清の作成を行った。β/A4部位と，そのC末側で膜貫通領域直後のペプチドを合成しウサギに注射することによって，それぞれの部位に特異的で，免疫沈降に信用できる抗血清が得られた。

APPは神経細胞では極く僅かしか発現されていないので，培養細胞で遺伝子導入によるcDNAの発現を応用した。サル腎臓線維芽細胞由来のCOS細胞でAPP全長を発現させたところ，すでに報告されているようにαセクレターゼによる分泌系が主な代謝経路であり，β/A4の生成は観察されなかった。培養上清には比較的高濃度のAPPのN末側断片（nexin Ⅱ類似断片）が確認された。APP分子のうちβ/A4以下C末側100個のペプチド(C100)を発現させたところ，γセクレターゼによりβ/A4の生成が観察された。こうしてnexin Ⅱとβ/A4を含んだ試料を比較的容易に調整することが可能になった。

ラット海馬スライスは神経回路のモデルとして研究が進められている。とくに長期増強は記憶の機構として注目されている。ADの主症状は記憶障害である。本研究によりnexin Ⅱ型APP断片やβ/A4断片が比較的容易に調整できるようになった。AD関連物質が海馬スライスの電気活動に及ぼすを検討することが可能になり，ADの病因の解明に有用であることが期待される。

58. 医学部学生実習としての生理学実験法の開発

小幡邦彦，池中一裕，月田承一郎（生理研）
栗原　敏（慈恵医大・生理）
高田明和（浜松医大・生理）
樋口　隆（高知医大・生理）
長嶋和郎（北海道大・医・病理）

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け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6大学から17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　神経細胞の培養とパッチクランプ法
2　神経発生における遺伝子発現
3　細胞間接着装置と細胞骨格
4　動物学習の解析と神経化学的基盤
5　随意運動と骨格筋エネルギー代謝
6　運動の中枢性制御機構
7　高次脳機能の非浸襲的研究

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．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）　… 278
2．生体組織内の水構造及びエネルギー代謝の研究（惠良聖一他）　…… 281
3．MRIによるラット脊髄圧迫の研究（松井宣夫，福岡宗良他）　…… 282
4．小腸虚血・再灌流時の小腸エネルギー代謝の検討
（正岡　昭，木村昌弘他）　…… 284
5．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）　…… 285
6．核磁気共鳴法による細胞内水・電解質の動的挙動の解析：
自己シールド型高磁場勾配コイルによる細胞内
Naイオン分子並進拡散運動の測定（瀬尾芳輝他）　…… 287
7．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(2)―
（瀬尾芳輝，渡部徳子他）　…… 288
8．MRS/MRI法によるヒト骨格筋のエネルギー代謝の研究
―筋パワートレーニングが骨格筋エネルギー代謝に及ぼす影響―
（森本武利他）　…… 289
9．サル大脳皮質連合野の機能地図作成のための基礎実験（三上章允他）　… 292
10．磁気共鳴法による脳機能代謝画像の研究（成瀬昭二他）　…… 293
11．椎間板圧迫時の粘弾性変形に伴う水分子の動態のNMRによる解析
（日下義章他）　…… 297
12．MRIによる内耳病変の検出。Functional MRIによる脳内嗅覚応答野の
画像化（肥塚　泉他）　…… 300
13．^{31}P-MRSの連続測定による運動時の無機燐酸ピークの動態
（吉田敬義他）　…… 302
14．NMRによる含フッ素薬品体内動態の無浸襲追跡
（亀井（金沢）洋子他）　…… 304
15．第10回磁気共鳴装置共同利用実験ワークショップ
（代表者　村上政隆）　…… 307
（1993年10月25日～10月28日）

16. 第11回磁気共鳴装置共同利用実験ワークショップ
（代表者　村上政隆）　…… 312
（1994年３月９日～３月10日）

磁気共鳴装置室

【概要】

磁気共鳴とは，水素原子，ナトリウム原子等の核スピンが磁場中で特定周波数のラジオ波を吸収し，放出する現象であり，磁気共鳴画像装置(MRI & MRS)は，磁場勾配や高周波の位相を用い測定試料の特定部位の原子核の量やその動的性質を画像及びスペクトルとして測定できる。1986―87年度に本装置を導入設置後，1988年度は装置の立ち上げ調整，1989年度には公募共同利用研究を開始した。1993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13課題が採択され実施された。

1993年度の磁気共鳴画像装置の利用状況の内訳は，使用者グループは13，共同利用実験等227日，修理調整等22日であった。また，磁気共鳴装置のスペクトル／画像データのバックアップと所内外の汎用パソコンへも転送できるようハードデスク，光磁気デスク，汎用パソコンを導入し，通信システムを整備した。

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10回ワークショップは，1993年10月25―28日，〃細胞内外ナトリウムの分子環境〃のテーマで，細胞内外のナトリウムイオンの動態解析を軸に，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，医学生物学の研究者のみならず，物理工学の若手研究者を中心にテルアビブ大学（イスラエル）の G. Navon, UCSC (USA) の T. Schleich，テキサス大学ダラス校(USA)の A. D. Sherry，クイーンズランド大学（オーストラリア）の Z. H. Endre，モナシュ大学（オーストラリア）の B. P. Shehan，セントアンドリュース大学（連合王国）の F. G. Riddle，ユトレヒト大学（オランダ）の C. J. A. van Echteld らを含み，７ケ国より17名，国内30名の研究者の参加を得て４日間の日程で行われた。

第11回ワークショップは1993年３月９―10日に行われ，1993年度の共同利用実験の成果が報告され，1994年度共同利用実験研究者（所外32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，今後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 Kevin McCully (Medical College of Pennsylvania)，平川和文（神戸大学，教養部），吉田敬義（大阪大学，健康体育部）を招聘し，「in vivo P-31 NMR のヒト運動生理への応用」について，また，Eiichi Fukushima (Lovelace Institutes)，巨瀬勝美（筑波大学，物理工学系）に「流れの NMR」について講演していただいた。

1．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，泰羅雅登，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）

ニホンザルの大脳皮質の形態は個体差が大きい。そのため，ある特定の領域からニューロン活動を記録するとき，その位置をはじめから特定することが難しく，また，正確な記録部位は実験終了後に脳の組織標本を作るまで確認できない。磁気共鳴装置を用いれば高解像度の脳の断層像を作る事ができるが，これまでの方法では撮影時にサルの頭を適当な位置に固定するため，断層像の座標軸と電極刺入方向を合わせることができなかった。ニューロンの記録実験で広く用いられている脳定位固定装置は眼窩下縁と左右の外耳道を含む面が水平になるように動物の頭部を固

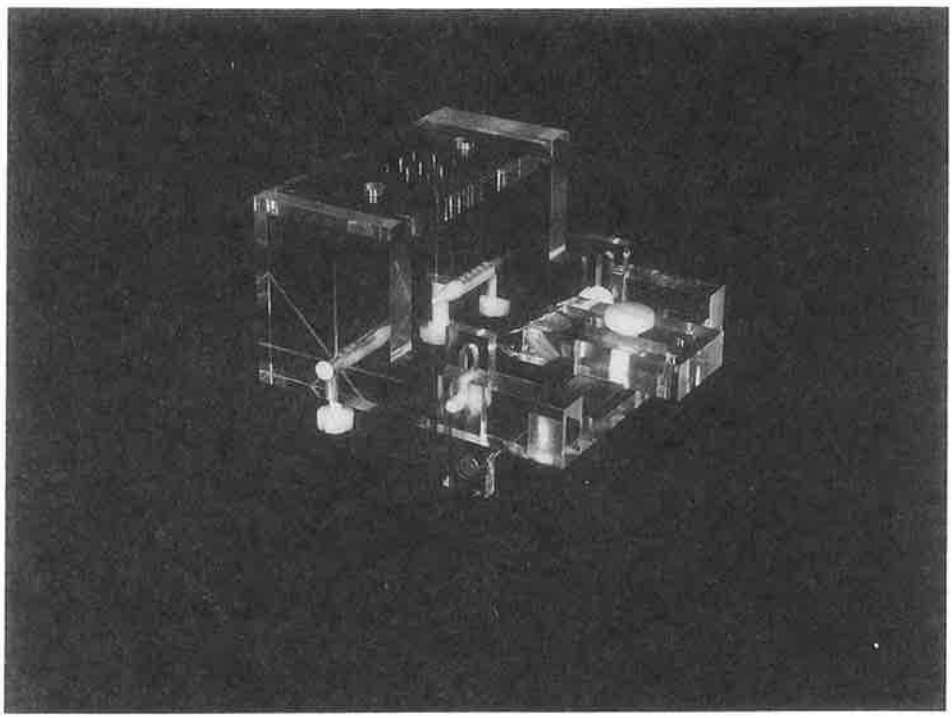


写真１　MRI 撮影用脳定位固定装置
イヤーバー，眼窩固定用アタッチメント，マウスピースがネジどめされている。
フレームの右側面に放射状の溝があり，これにワセリンをみたす。頭頂部にはテフロンチューブを差し込む穴が見える。

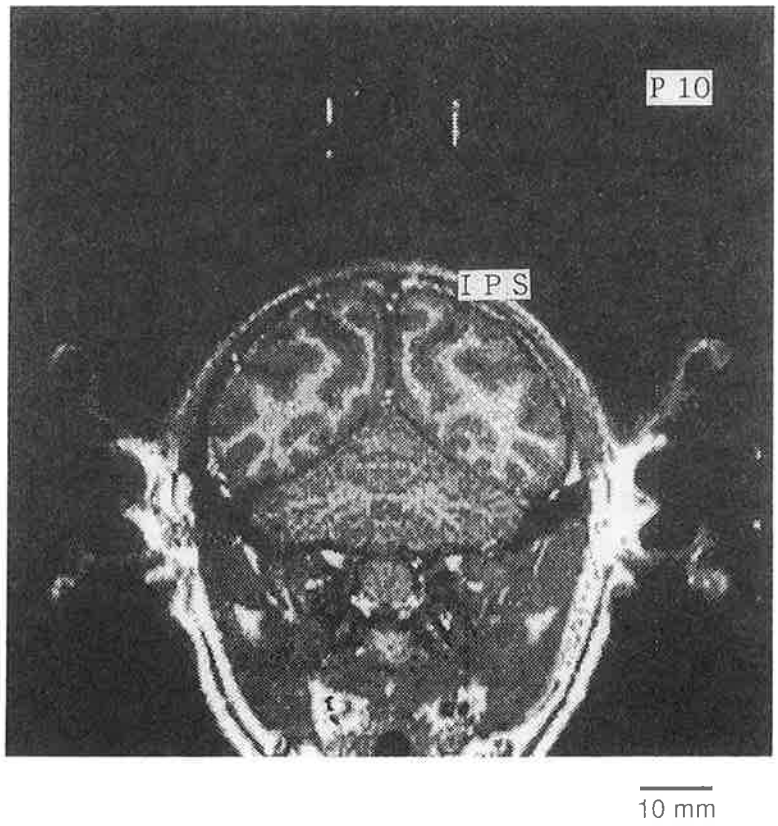


図1　脳定位固定装置を用いて撮影したP: 10でのニホンザルのMRI断層像
頭頂部の正中から左右1cmの所にワセリンを満たしたテフロンチューブの像が見える。
右側には水平方向と45度の溝が点として写っている。IPS（頭頂間溝）が深部では複雑に折れ曲がっていることに注意。

定する装置で，これを用いて電極を定位的に刺入している。したがって，頭部の磁気共鳴像の撮影時にサルの頭を脳定位固定装置に準じて固定できれば，定位的脳地図をつくることができ，定位的記録方法を組み合わせることで，記録実験中に記録部位の確認ができるようになる。

初期には頭部固定用のデルリン製のボルトをアクリルねじとデンタルセメントで頭に固定し，これを使って撮影時に頭部を定位的に固定した。しかし，この方法では事前にサルの手術が必要あり，また，デルリン製のボルトの強度が十分でなく後のニューロンの記録実験に支障をきたすことがわかった。

そこで新たにアクリル製の磁気共鳴装置用脳定位固定装置を開発した（写真1）。基本的には記録実験用の脳定位固定装置と同様な構造で，ヘルメット型のフレームとこれにサルを固定する

ための左右のイヤーバー，眼窩下縁を押さえるアタッチメントおよびマウスピースからできている。この装置自体は，コイル中央部にセットしたアタッチメントにネジで水平に固定される。さらに断層写真上に基準点が写るように，フレームの右側の壁に AP: 0 を中心として，水平，垂直および45度の放射状に溝が切ってあり，ワセリンを満たしてある。また，頭頂部には AP: 0 の正中部を中心に，前後左右それぞれ 1cm の位置にワセリンを満たしたテフロンチューブを差し込む穴をあけてある。この装置を用いた方法は以前と比べて事前の手術が必要でなく，また，サルだけでなく，ネコ等の小動物の定位的撮影にも応用できるなど汎用性が高い。

図 1 はこの固定装置を用いて撮影した P: 10 付近の断層像である。頭頂部の正中から左右 1cm のところにワセリンを満たしたチューブの像が強くでており，この断層像が P: 10 付近の像であることをしめしている。また，前後の傾きや，水平回転が無いことも両側のチューブが明瞭に現れていることで確認できる。さらに，図の右側に水平方向の溝および45度方向の溝がやはり強く現れており，その間隔からこの像が P: 10 付近のものであることがやはり確認できる。実際に我々は図中 IPS で示される，頭頂間溝の深部の折れ曲がったあたりからニューロン活動を記録しており，この断層像はきわめて有用な情報を与えてくれる。

2．生体組織内の水構造及びエネルギー代謝の研究

惠良聖一，中村浩二，林　知也（岐阜大・医・第２生理）
加藤一夫（同・第１病理）
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，360 MHz ^{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，この T_{IS} を用いて交差緩和時間イメージング法を開発した。今回は MR イメージング用のファントムとして，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種々の SCL_S 内の水の T_1 値を，2.1 T の MRI 装置により測定した。

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 glycerol 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%）等を使用した。

T_1 測定には，IRSE 法 (T_R - 180° - T_I - 90° - T_E/2 - 180° - T_E/2 - acquisition) を用いた。繰り返し時間 (T_R) は，測定する合成高分子ゲル内の水の T_1 値の５倍以上（７秒）になるように設定した。反転時間 (T_I) を10，20，30，40，50，60，80，100，200，400，800，1000，1400，1800，2000ミリ秒とし，エコー時間 (T_E) を30ミリ秒として，種々の異なった含水量をもつ合成高分子ゲルを撮像した。

それぞれの反転時間より得られた合成高分子ゲルの画像に対して，それぞれの画像データから ROI 測定データを得，それを正規化して各画像における強度値とした。さらに，それぞれの反転時間における正規化値を反転時間に対して半対数プロットを行い，T_1 値を得ようとしたが，いずれの場合もプロットの直線性が思わしくなく，その結果，含水量の異なった合成高分子内の水の正確な T_1 値を MR イメージングより得ることは困難であった。

3．MRIによるラット脊髄圧迫の研究

福岡宗良，泉田　誠，大塚隆信，藤吉文規，松井宣夫（名古屋市大・医・整形外科）
加藤泰治（名古屋市大・分子医研）
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，ラット脊髄圧迫モデルの圧迫の形態と麻痺について調べてきたが，さらに脊髄内部の変化について，MRIを用いて非侵襲的に調べ，病理組織との関連を明らかにする。

【方法】

これまでは354A腫瘍によるモデルを用い実験を行ってきたが，今回はWistar系7週令のラットの下位胸椎部を椎弓切除後，ラミナリアの小片を硬膜外に置き，脊髄圧迫モデルを作成した。このうちA群：硬膜背側部分の椎弓を完全に切除しラミナリアを置いたもの，B群：硬膜背側部分の椎弓を可動性がでるまで薄く削り，その上にラミナリアを置いたもの，A群，B群とも術後経時的にMRIを用いて脊髄を観察し，病理組織と比較検討を試みた。MRI撮像条件は，T1強調像としてTR500msec/TE30msec, T2強調像としてTR2000msec/TE80msecを用いた。MRIで観察後最終的に屠殺し，脊髄のHE標本を作製しMRI画像と比較検討を試みた。

【結果】

A群では15匹中4匹が麻痺をきたし，B群では7匹中全てが麻痺をきたした。A群で術後8週間以上（1匹のみ4週間）MRIで経時的に観察可能であったのは15匹中6匹で，このうち半数の3匹に麻痺を認めた。MRI矢状断像による脊髄の最大圧迫率は，麻痺を認めた3匹では47～71%（平均58%），麻痺を認めなかった3匹では35～40%（平均38%）であり，麻痺を認めた3匹ではT2強調像で脊髄圧迫部周辺にいずれも高輝度変化（1匹は高輝度と低輝度が混在）を認めた。T1強調像で輝度変化を認めたものはなかった。B群では7匹中1匹を除いた6匹が術後11週間以上観察可能で，MRI矢状断像による脊髄の最大圧迫率は，33～81%（平均59%）であった。6匹全てにT2強調像で脊髄圧迫部周辺に高輝度変化を認め，このうち3匹ではT1強調像で同部が低輝度に描出された。

病理組織では，A群，B群ともに，T2強調像で脊髄圧迫部周辺に高輝度変化を呈したものでは，同部の白質に海面状変化が強く，空胞を多数認め，灰白質の神経細胞の萎縮，脱落も輝度変化のないものに比しより高度な傾向がみられた。脊髄圧迫部周辺にT2強調像で高輝度，T1強調像で低輝度変化を認めたものでは，圧迫部白質後索の空胞変化が強く，なかには空胞が巨大となり白質が変性破壊され，一部後角部分にも変性が及んでいるものもあった。しかし後索の変性が高度でも灰白質前角細胞の変化はごく軽度のものも存在した。

【問題点】

このモデルでは，ラミナリアが水分を吸収して膨張することを利用した漸増圧迫ではあるが，手術で硬膜外にラミナリアを設置してから麻痺を呈するまでが短期間であること。

4．小腸虚血・再灌流時の小腸エネルギー代謝の検討

木村昌弘，桑原義之，佐藤篤司，片岡　誠，正岡　昭（名古屋市大・医・第二外科）
亘　　弘（生理研）

高齢者人口の増加，心疾患の有病率の増加などに伴い，急性上腸間膜動脈閉塞症の発生率の増加が認められる。しかし，診断および有効な治療の確立には至っていないのが現状である。

平成４年度より佐藤らが小腸虚血・再灌流時の小腸エネルギー代謝の変動を 31P-MRS 法と HPLC 法を対比し，31P-MRS 法が急性上腸間膜動脈閉塞・再灌流時の小腸虚血障害のモニタリング法として有用である事を証明した。

そこで，平成５年度より 31P-MRS 法を用い小腸虚血・再灌流障害における Ca^{2+} の動きに着目し Ca 拮抗薬 (verapamil) の効果を検討した。

【方法】

６週齢 Wistar 系雄性ラットを用い上腸間膜動脈を30分間閉塞した後，再灌流した。verapamil の効果を A 群：対照群 (n ＝ 8)，B 群： verapamil (0.3mg/kg) 虚血前投与群 (n ＝ 8)，C 群：verapamil (0.3mg/kg) 再灌流10分時投与群 (n ＝ 8) とした。

【成績】

虚血前値の β ATP 値を100％とすると虚血後30分では A 群32.5±9.2％，B 群：46.9±8.2％，C 群：32.7±7.6％と B 群において有意に β ATP の低下が抑制された。再灌流後150分では A 群：51.4±14.0％，B 群：71.3±14.9％，C 群：71.1±9.2％と A 群に比較し B 群，C 群で有意に β ATP の回復が認められた。Pi, pH に関しても再灌流後の回復は良好であった。

【まとめ】

小腸虚血・再灌流障害に対し verapamil は虚血前および再灌流直前投与においても有効であった。その機序として虚血・再灌流時の Ca^{2+} の細胞内流入の抑制が示唆された。

5．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）

【目的】

アンモニウム—パルス法は細胞内 pH を人工的に変化させ，細胞内 pH 調節機構を研究する方法として従来より用いられてきた。しかし，N-14 NMR 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), 20 mM NH_4Cl を灌流すると，細胞内 NH_4^+ 量は急速に 50 mmol/l ICF まで増加し，さらに緩やかに 70 mmol/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 recovery 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。

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。本共同研究の目的は，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。Inversion recovery NMR 法は細胞内 K 量を測定するとともに，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。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）20 mM NH_4Cl を灌流 (2ml/min) すると，流出後の K 濃度は 4.4 mM 急速に上昇し初期 1—2 分でピーク値 (5 mM) を示した。その後低下し，約 4—5 分でプラトー (4.55-4.6 mM) となり，15—20分でさらに低下し30分でほぼ流出は停止した (4.4 mM)。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 1 mM は，初期ピーク値，プラトー値共に増加させ (peak 5.5 mM, plateau 4.8 mM), 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 μ M は，K 流出に対し有意な変化を起こさなかった (peak 5 mM, plateau 4.6 mM) 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 (1 mM) は K 流出の初期ピークを抑制した (4.7-4.8 mM)。plateau はやや増加した (4.7 mM)。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，0 mM Ca の灌流液で灌流し細胞外の Ca を除去し，さらに細胞内 Ca ストアを枯渇させるために，1 μ M acetylcholine で刺激した。その上で 1 mM

ouabain を添加し，20 mM NH_4Cl を灌流した。0 mM Ca では K 流出の初期ピークは抑制された (4.7 mM) が，plateau 値は抑制されなかった (4.7-4.8 mM)。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。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。核磁気共鳴法の医学／生理学分野における最大の利点は，材料の構築を変えることなく原子，分子レベルの量的計測が可能な点である。近年の分子生物学的手法の浸透により輸送の各素子の抽出精製が進み，現在，水，電解質輸送の解析は各輸送体たんぱくのアミノ酸一次構造配列を検討する段階に達した。この時点で重要なのは複数の素子が組み合わさった状態でどのように協調的に輸送体の活性が調節されるかであろう。核磁気共鳴法最大の利点はここに生きると予測される。

6．核磁気共鳴法による細胞内水・電解質の動的挙動の解析：自己シールド型高磁場勾配コイルによる細胞内 Na イオン分子並進拡散運動の測定

瀬尾芳輝，大河原浩，村上政隆（生理研）

磁場勾配核磁気共鳴法は分子の並進拡散運動を研究する方法として従来より用いられてきた。RI トレーサー法等とくらべ，平衡状態での運動を全く測定試料に触れずに測定できる利点がある。

スピン・エコーパルス磁場勾配法（PFG 法：d-90-t1-d-t2-180-t1-d-t2-acquire）では，測定されるエコー信号の大きさ (M) と分子拡散係数 (D) との関係は，

$$M = Mo \exp [-\gamma^2 D \delta^2 g^2 (\Delta - 1/3 \ \delta)]$$

となる。ここで，γ は磁気回転比，δ は磁場勾配パルスの幅，g は磁場勾配パルスの強度，Δ は磁場勾配パルスの間隔であり，(Δ -1/3 δ) は拡散時間とよばれる。よって，Na-23, K-39, Cl-35 等のように，小さい磁気回転比をもち，かつ緩和時間の短い核種の測定は極めてむずかしく，生体系での測定はほとんど行われていなかった。H-1 核に比べて，Na-23 核は磁気回転比で1/4，緩和時間で1/10であるので，H-1 核同等の測定には，約13倍の強度の磁場勾配パルス強度が必要とされる。

本研究に用いた自己シールド型高磁場勾配コイルは，ブルカー社，Zick, Gross 両博士の協力により開発され，10ミリ径の試料に 500G/cm の磁場勾配を加えることができる。また，パルスの切り替による渦電流は極めて小さくなっており，600G/cm の磁場勾配パルスのあとでも，約１ミリ秒で95％以上の信号の回復がみられた。パルスの切り替時間については，まだ短縮の余地があり，今後の課題である。

測定システム全体の評価には，ポリアクリルアミドゲルのメチル基の信号を用いた。同メチル基は，ゲルの格子に固定されているため，本来的に並進拡散運動はおこなわない（$10^{-11}cm^2/sec$ 以下），ただし，回転運動が自由なために，比較的線幅が小さく測定しやすい。拡散時間74ミリ秒の測定で$10^{-8}cm^2/sec$ 以下の値が得られ，通常の低分子の拡散測定（$10^{-6}cm^2/sec$ 程度）には十分な性能を有していることを確認した。

イヌ赤血球を生理食塩水で洗浄後，5mM ジィスプロシウムトリポリ燐酸／ 157mM Na^+ 溶液に浮遊させた。Na-23 PFG NMR 測定には，MSL-100 分光器と自己シールド型高磁場勾配コイルに自作の10ミリ径 Na-23 用 RF コイルを用いた。拡散時間10ミリ秒の測定で，細胞内の Na^+ イオンの拡散速度は，0.13 $10^{-5}cm^2/sec$ と細胞外の Na^+ イオンの拡散速度の約1/5であった。また，拡散時間を短くすると細胞内の Na^+ イオンの拡散速度は大きくなる傾向をしめした。以上より，細胞内における Na^+ イオンの並進運動は，細胞外に比べて，大きく制限されていることが明かとなった。今後，制限拡散の要因について明かにしていく予定である。

7．核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(2)—

渡部徳子，大塚章宏（東京水産大・水産学）
瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘（生理研）

高分子ゲルの性質は，高分子と溶媒分子の間の相互作用，溶媒分子の運動性，高分子鎖の運動性，及び高分子のネットワークによって形成されたゲルの微細構造等に影響される。本研究では，種々の濃度のデキストラン水溶液及びセファデックスゲル中の水の並進拡散を PFGSTE-NMR を用いて測定し，ゾル及びゲル中の水の運動性について調べ，ゲルについては，ゲル構造を表す種々のパラメータを制限拡散の結果から計算することを目的とした。

【方法】

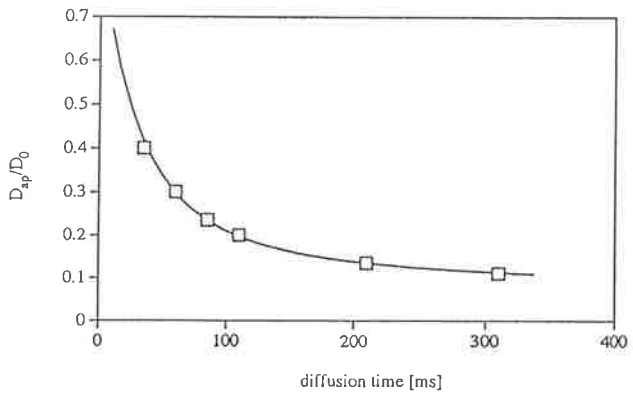
外径 5mm の NMR 用サンプル管に，種々の濃度のデキストラン水溶液 (T10, T40, T70, T500) 及び種々の水分含量のセファデックスゲル (G15, G25, G50) を調製した。拡散係数の測定は，1H 共鳴周波数 100MHz の NMR 装置 (Bruker MSL 100) を用い，パルス磁場勾配法（Stimulated Echo Pulse Sequence 使用）によって行った。

【結果と考察】

セファデックス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た。セファデックスゲル中の水について，見かけの自己拡散係数の値が拡散時間の増加に伴って減少する，いわゆる制限拡散が観察された。

デキストラン水溶液においても高濃度であれば，ゾル状態であってもわずかな制限拡散が認められた。本研究では，大きな磁場勾配を用いて，広い範囲の拡散時間にわたる測定を行ったために，ゾル状態においても制限拡散を観察することができた。

測定された見かけの拡散係数から，理論式とのフィッティング（図）によって，ゲルのミクロ構造を推定するための構造パラメータを計算した。なお，水の拡散ばかりでなく，高分子鎖の拡散（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。



8．MRS/MRI 法によるヒト骨格筋のエネルギー代謝の研究
—筋パワートレーニングが骨格筋エネルギー代謝に及ぼす影響—

森本武利，能勢　博，早野尚志（京都府立医大・第一生理）
吉崎和男（徳島大・医・第一生理）
平川和文（神戸大・発達科学部）
亘　　弘（生理研）

【目的】

筋の酸化能力は有酸素的トレーニングによって改善され，^{31}P-NMR スペクトルからは最大下作業時の Pi/PCr の減少および細胞内 pH の上昇として評価される。一方，筋トレーニングが無酸素的エネルギー代謝に及ぼす影響は，まだ十分検討されていない。そこで本研究では，強い運動負荷による筋パワートレーニングが作業成績及び骨格筋エネルギー代謝に及ぼす影響を，^{31}P-NMR スペクトルから検討した。

【研究方法】

健康な成人男性５名（年齢27±６歳）を被験者とし，疲労困憊に至る最大反復回数10回前後の強い負荷の肘屈曲運動トレーニングを１日４±１セット，週４±１日の頻度で５週間行わせた。トレーニング前後に等速性肘屈曲運動時の力—速度関係の測定と，最大筋力の17％負荷強度（30回／分の反復回数）による５分間の動的肘屈曲有酸素テスト，及び50％最大筋力負荷強度（肘角度90度）による疲労困憊に至るまでの最大静的肘屈曲無酸素テストを行い，^{31}P-NMR スペクトルを測定した。得られたスペクトルから，Pi/PCr 比と Pi の化学シフト値より筋細胞内 pH を算出した。

【結果及び考察】

５週間の筋パワートレーニングの結果，等速性肘屈曲運動時の筋出力は有意に増加した（図１）。また，無酸素テストの持続時間（172±40秒から256±82秒，$p < 0.05$）も有意な増加を示し，トレーニングによる無酸素的作業成績の改善が認められた。

筋エネルギー代謝面に関しては，有酸素テストではいずれの燐酸化合物おいても有意な変化は認められず，トレーニングによる筋の酸化能力改善は認められなかった。この結果は，本トレーニングへの参加筋は，負荷強度から速筋線維と考えられ，有酸素テスト時の参加筋と考えられる遅筋線維がトレーニングされなかったことによると考えられる。一方，無酸素テストでは，Pi/PCr および筋細胞内 pH には，有酸素テストと同様有意な変化は見られなかったが，トレーニング後 %PCr において有意な高値が認められた（図２）。無酸素テストにおける %PCr の高値は，持続時間の延長および持続時間と %PCr 値の間に有意な正の相関が認められたことから，解糖系能力の向上あるいはクレアチン・キナーゼ酵素活性の改善による PCr 再合成能の増加が推察される。また，安静時筋細胞内 pH がトレーニング後有意な高値を示した（7.09±0.02から7.11±

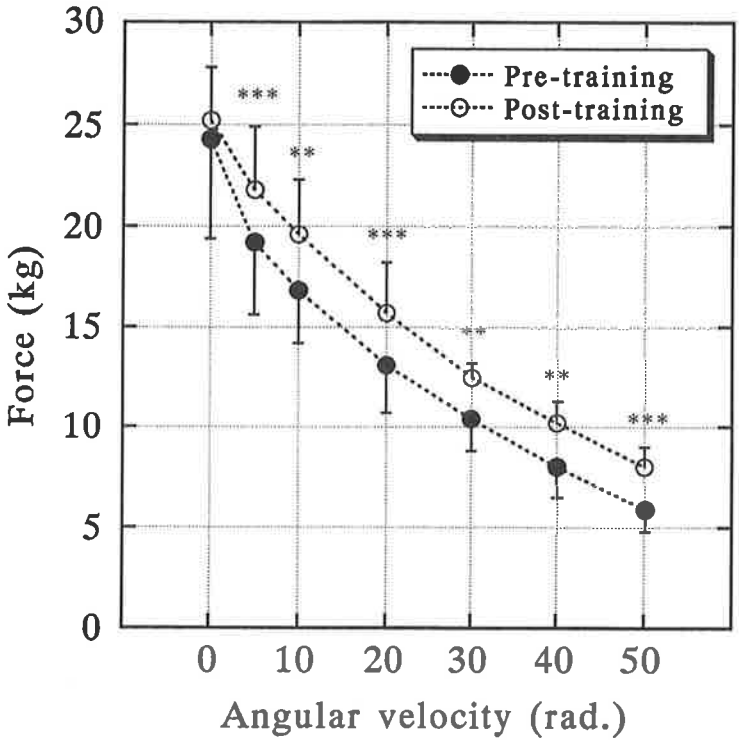


図1　トレーニングによる等速性肘屈曲運動時の力—速度関係の変化。

0.02) ことから，ATP-PCr 系エネルギー含量の増加の可能性も推測される。以上，筋パワートレーニングの筋エネルギー代謝への影響として，解糖系エネルギー供給能の向上，クレアチン・キナーゼ活性の改善，及び ATP-PCr 系エネルギー含量の増加が考えられる。

なお上記の他に，ヒト骨格筋のクレアチン・キナーゼ反応を測定するために ^{31}P-NMR 飽和移動法を開発・検討した。すなわち，ホモ・ゲーテッド照射を可能とするためのハードウェアの改良ならびにソフトウェアの作成，照射強度などの測定条件を定めるための基礎的実験を行った。さらに，筋細胞内ミオグロビンの脱酸素化による磁化率の変化を ^{1}H-MRI 画像に反映させることを目的に，ヒト腕の断層像のスピン・エコー像ならびにフィールド・エコー像の測定法について基礎的実験を行った。

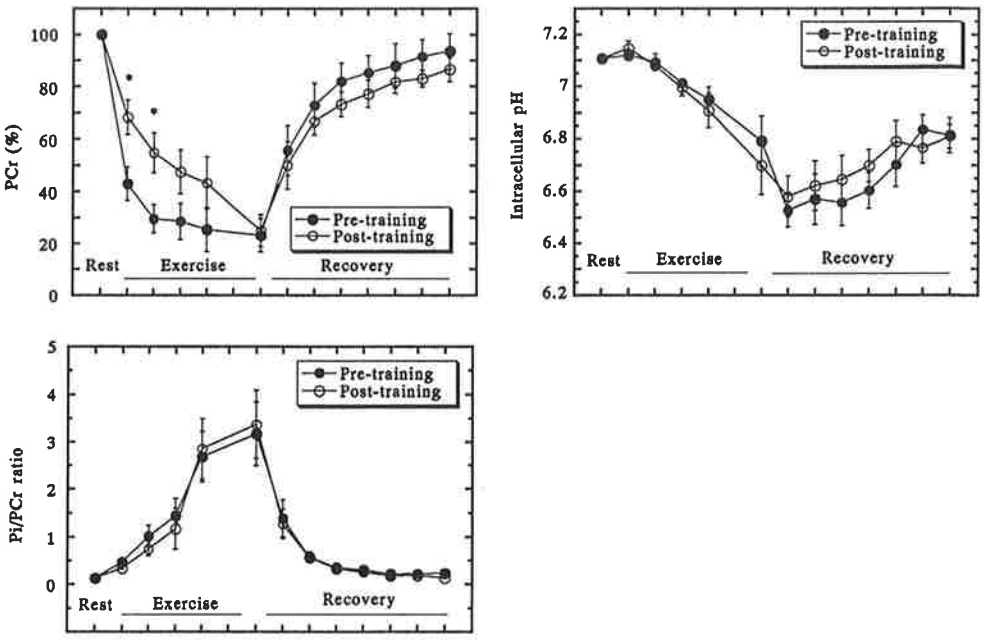
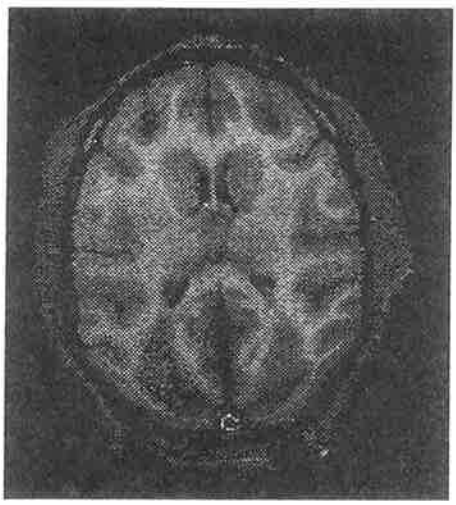


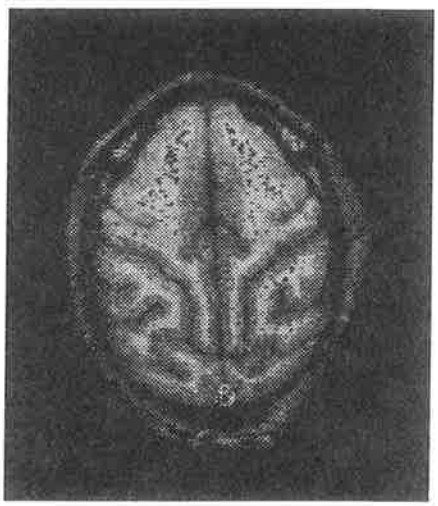
図 2　無酸素テストにおける PCr, Pi/PCr 比及び筋細胞内 pH のトレーニング前後の比較。各プロットは平均値と標準誤差を示す。星印は有意差検定の結果（*：$p < 0.05$）を示す。

9．サル大脳皮質連合野の機能地図作成のための基礎実験

三上章允，久保田競，澤口俊之，中村克樹（京大・霊長類・行動神経）

ポジトロン・エミッション・トモグラフィー (PET) の普及にともなって，ヒトの脳の機能地図作成の試みが進んでいる。しかし，ヒトでの研究は，同じ被検者で繰り返しテストできないため，異なる被検者のデータを加算平均することが多く信頼性に欠ける面がある。また，ニューロン活動の記録，脳の微小破壊の効果のテスト，詳細な組織学的研究などはヒトでは困難であるため，PET で得られた研究成果をさらに詳細な研究へと発展させることがむずかしい。このような理由で，動物，特にサルでの PET を用いた研究が不可欠と考えられる。われわれは，平成５年度より学習課題遂行中のサルの脳内の活性部位をマッピングするために PET を用いた研究をおこなっている。PET による研究では，PET で鮮明な形態情報を得られないため，磁気共鳴イメージング装置 (MRI) を用いて形態画像を得，MRI の画像と PET の画像を重ね合わせて活動部位を同定する必要がある。この目的のために，生理学研究所の MRI を用いて，PET で機能計測する予定のサルの形態画像を取得した。脳液浸標本を用いたテスト試行の後，２頭のサルで鮮明な脳画像を記録できた。PET のデータは平成６年11月の米国神経科学会大会で発表すべく現在準備中であるが，まだ，ここに発表できない。





10. 磁気共鳴法による脳機能代謝画像の研究

成瀬昭二，堀川義治，田中忠蔵，樋口敏宏，梅田雅弘（京都府立医大・脳神経外科）
成瀬昭二，古谷誠一（京都府立医大・放射線科）
瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘（生理研）

Ⅰ．目的および方法

1.5 T 臨床用磁気共鳴 (MR) 装置で以下のように脳の機能や代謝の画像解析を可能にした。(1) ^{1}H と ^{31}P の 2 核種の化学シフト画像法 (Chemical Shift Imaging; CSI) による，multi-voxel MR Spectroscopy (MRS) 測定と代謝物質の分布図（代謝画像)。(2)高速撮像による拡散強調画像 (Diffusion Weighted Imaging)。(3)超高速 dynamic MRI による脳血管床の画像化。(4)内因性物質を指標とした非侵襲的な脳の活性部位の画像化 (Functional MR Imaging: FMRI)。これには T2 susceptibility を強調して撮像する gradient echo 法で multi-slice 画像を得た。賦活は運動，光刺激，知覚刺激，想像 (Imagination) による高次脳機能，を検討し，病態への応用を試みた。本年度は CSI と FMRI の結果を示す。

Ⅱ．結果

(1) CSI: ^{1}H-CSI では 1.5 ml voxel 256個から N-acetyl aspartate (NAA), Creatine (Cr), Choline (Cho) の分解能のよいスペクトルと明瞭な代謝画像が得られた（図１)。脳腫瘍では NAA と Cr の低下，Cho の増高が認められ，悪性腫瘍ほど乳酸が多く検出された。また，腫瘍に特異的な代謝物質 (glycine) も認められた。乳児期から小児にかけて，発達につれて NAA の増加が認められた。Alzheimer 病の早期では，側頭葉皮質で NAA の低下が認められた。NAA の低下の程度から脳機能障害の程度が推測され得た。^{31}P-CSI では 36ml の64個の voxel の MRS が測定され，脳腫瘍では ATP, PCr の低下，PME, Pi の増高が認められた。

(2) FMRI ：指の動きによる運動賦活では直後から反対側大脳の運動皮質野で信号強度が５－８％増加し，賦活前後の差分画像でも高信号域として表された（図２)。また，multi-slice の差分画像を MIP 処理を行うと賦活部分が立体的に描出できた。光刺激では，５－６％の信号増加が両側後頭葉で認められた。知覚刺激の成功率は現在のところ約30％である。指の運動の想像にて，運動野での信号増加と差分画像での描出ができ，高次の脳機能の検討が可能であると考えられた。さらに病態応用では，脳腫瘍で術前に腫瘍と運動野との関係が明瞭になった。また，FMRI の信号増加部位と MR Angiography との対比を行ったところ，活性部位は小静脈が主で，周囲の脳実質も僅かに信号に寄与していた。現在の FMRI では20秒位毎の内在性の変化を空間分解能の良い画像で捉えられるが，今後の装置の改良にて１秒以下の画像化も可能であり，新しい脳機能画像解析法になり得る。

Ⅲ．結論

本研究にて，通常の臨床用装置に MR 法の持つ分析法としての機能を付加しえた結果，非侵襲

的な脳機能代謝画像解析が行えることが示された。今後の装置，方法の発展にてより詳細にMR法による非侵襲的脳代謝機能画像の測定が可能になると考えられる。また，装置のコストや普及程度から考えても，これら方法は多くの施設で用いられるという大きな期待が持てる。

追記：なお，CSI法はシーメンス旭メディテック社，宮崎敏幸氏，山本徹氏との共同研究にて，FMRIは島津製作所医用機器事業部応用技術課，清水公治氏，武尾和浩氏との共同研究にて得られたデータである。

Ⅳ．文献

1．成瀬昭二：磁気共鳴スペクトロスコピー(MRS)法のヒト脳への適用。神経化学レビュー 6: 190-204, 1992

2．成瀬昭二ら：^{1}H 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．古谷誠一ら：^{1}H-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

4．古谷誠一ら：3D-CSI法による Multi-voxel ^{1}H-MRSの開発と脳腫瘍への適用。日医放誌 51: 836-838, 1991

5．成瀬昭二，堀川義治，田中忠蔵：MRIによる脳の機能画像。神経内科 39: 487-496, 1993.

6．成瀬昭二，田中忠蔵：脳の MR Functional Imaging ：臨床応用の可能性：映像情報 25: 35-42, 1994.

7．T. Ebisu, S. Naruse, Y. Horikawa, et al: Discrimination between different types of white matter edema with diffusion-weighted MR imaging. JMRI 3: 863-868, 1993.

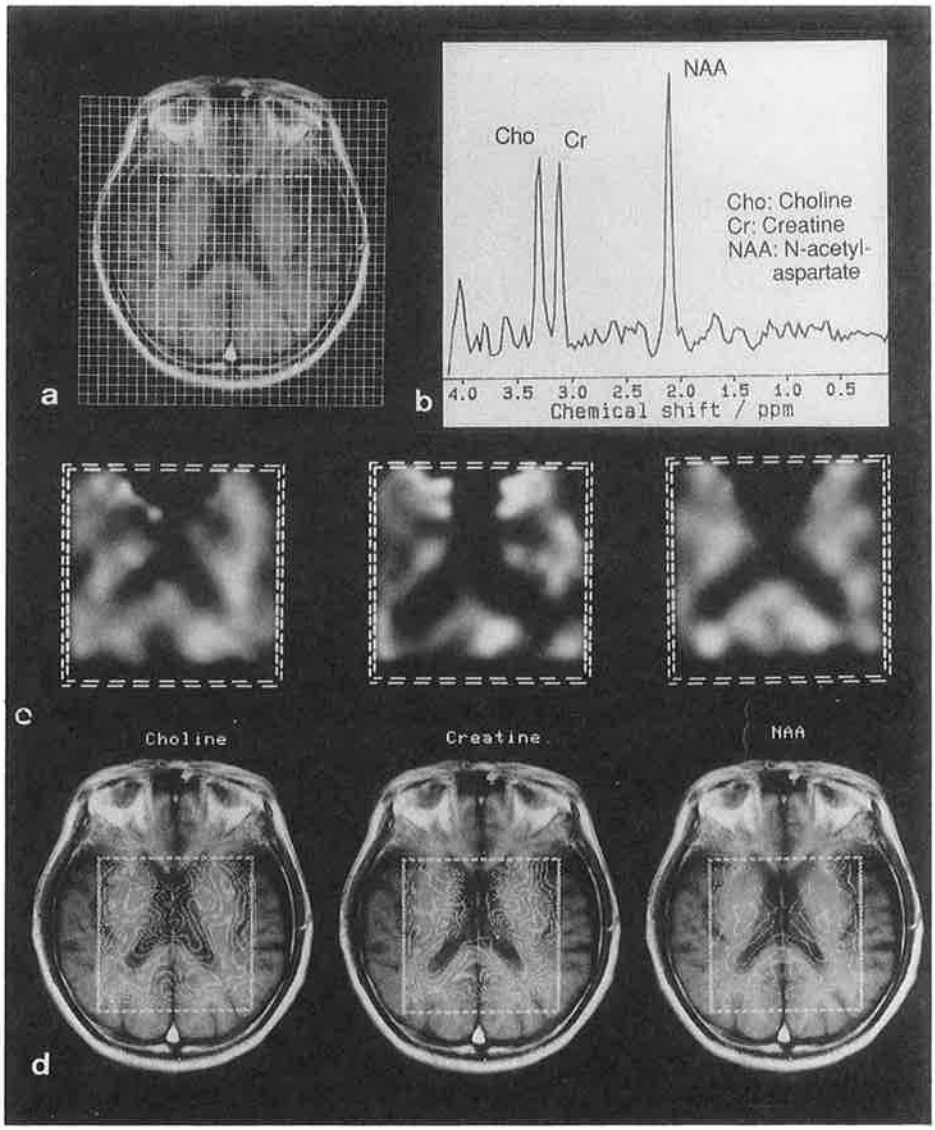

a
b
NAA
Cho
Cr
Cho: Choline
Cr: Creatine
NAA: N-acetyl-aspartate
4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5
Chemical shift / ppm
c
Choline
Creatine
NAA
d

図 1

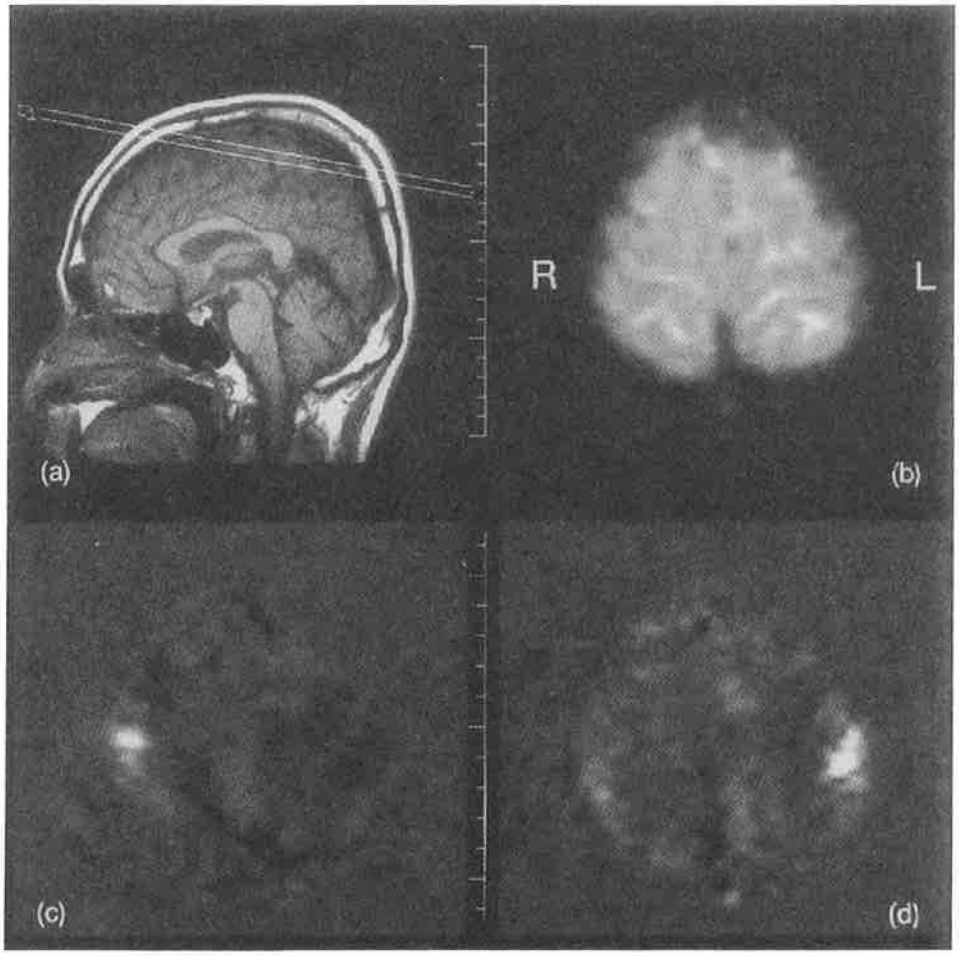


図 2

11. 椎間板圧迫時の粘弾性変形に伴う水分子の動態の NMR による解析

日下義章，藤岡幹浩，植村　理（京都府立医大・整形外科）
村上政隆，瀬尾芳輝，亘　　弘（生理研）

【目的】

椎間板組織は脊柱の可撓性を高め，脊柱に負荷される様々な力を吸収する役割を果たす。これは椎間板が有する粘弾性と，それによる応力緩和による。荷重により椎間板の基質高分子間に多量に含まれる水分子は椎間板内を移動する。この水分子の移動は椎間板の荷重エネルギーの吸収，すなわち応力緩和に大きく関与し，変性に伴う椎間板の機能不全には水分子の動態の変化が大きく関与するものと考える。

MRI を用いることにより非破壊的に椎間板の形態と椎間板内の水分子動態を同時に観察することが可能である。本研究では椎間板へ垂直方向の圧迫を加えつつ MRI により経時的な水分子の動態を観察し，同時に MR 画像より椎間板の厚みの減少を測定して時間―歪み曲線から椎間板の粘性および弾性係数を求める。以上より，圧迫条件下の椎間板における水分子の動態と力学的特性の関係を明らかにする。

【研究方法】

実験材料

成牛尾椎椎間板，そして剖検時に得られる正常および種々の変性度を有するヒト腰椎椎間板を実験材料とした。

実験方法

椎間板の圧迫には我々の考案した硬質プラスチック製の圧迫試験装置を用い，脊柱長軸方向に 30-100kg の荷重を加えた。MRI 装置として日立製 MRI (2.0 Tesla) を使用し，荷重負荷前，負荷中に spin echo 像および T1 計算画像を経時的に得た。

spin echo 像は解剖学的解像力に優れているので，これより椎間板高を計測した。得られた椎間板高の変位曲線から，圧迫時の椎間板の時間－歪み曲線を得た。この曲線を 2 個のばね成分および 1 個のダッシュポット成分から成る three-parameter-solid model にてカーブフィッティングによる解析を行い粘性係数，弾性係数を算出した。

我々はすでに髄核の T1 緩和時間と水分含有率が正の相関を示すことを明らかにしているため，T1 計算画像より椎間板内の水分含有率の分布を測定した。

圧迫解除後のヒト椎間板は横切し，変性度を Lewin の分類に従い肉眼的に決定した。

【研究結果および考察】

圧迫下の水分子動態は変性度により異なった。成牛尾椎および変性の軽度なヒト腰椎椎間板では圧迫初期に髄核中央の T1 値が延長し，水分子が一過性に集中することが明らかになった。中等度に変性した椎間板では髄核の T1 値は単調に短縮した。これは変性による髄核の保水能力の

低下，線維輪の断裂のため圧迫にて容易に水分子が髄核外に流出するためと考えた。高度変性椎間板は水分子の移動は小さかった（図１）。

時間―歪み曲線は three-parameter-solid model でよく近似された。T1 値の経時的変化から得た上昇率（Δ T1 ＝（最大値―初期値）／初期値）は粘性係数と有意な相関を示した（図２）。これは椎間板内水分子動態が粘弾性変形に影響することを示唆する。水分子動態と粘弾性変形の相関については今後さらに詳細な解析を要すと考える。

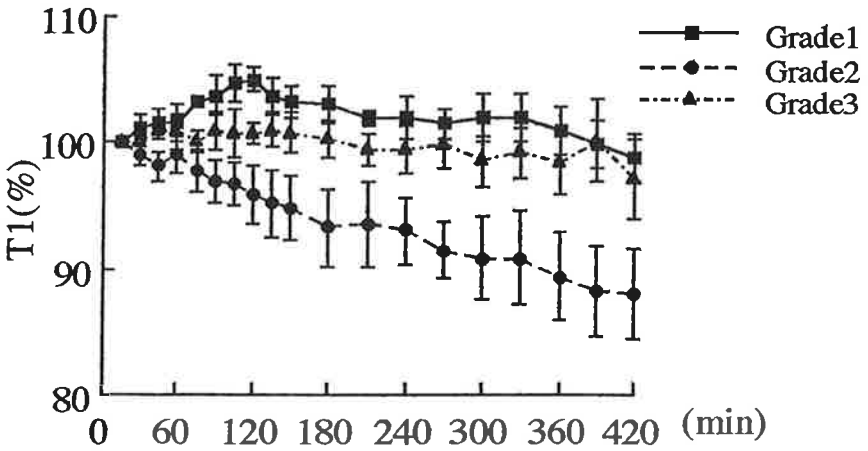


図１．100kg を負荷した時の T1 値の経時的変化
（開始時の値を100％とする。）

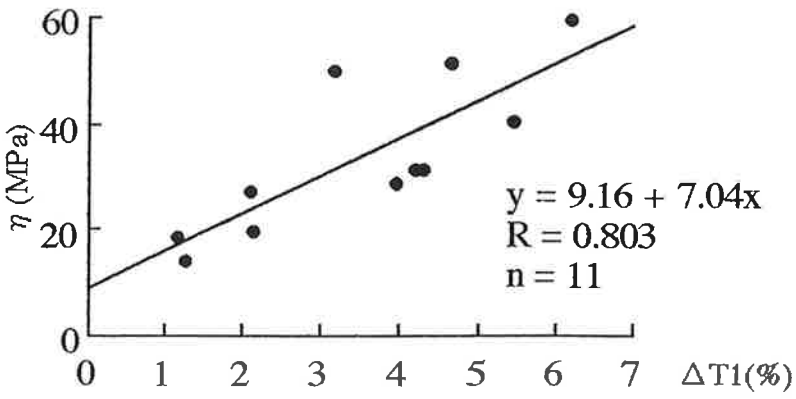


図２．η（粘性係数）とΔ T1 （T1 の上昇率）の相関

学会報告

Mikami Y. Kusaka Y. Morita Y. Uemura O. Chatani K. Hase H. Hirasawa Y. Tanaka C. (1993. 2) MRI Analysis of Water Molecule Kinetics during and after Compression of Interverte-bral Discs. The 39th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (San Francisco, USA)

三上靖夫，日下義章，植村　理，森田康司，長谷　斉，平澤泰介，田中忠蔵 (1993. 6) MRI を用いた椎間板内水分子の動態解析，第22回日本脊椎外科学会（富山）

植村　理，日下義章，三上靖夫，森田康司，長谷　斉，平澤泰介，森本武利，田中忠蔵 (1993. 9) 圧迫時の正常および変性椎間板内水分子動態の MRI を用いた解析，第21回日本磁気共鳴医学会（筑波）

植村　理，日下義章，三上靖夫，長谷　斉，平澤泰介，森本武利，田中忠蔵 (1993. 10) 圧迫時の正常および変性ヒト腰椎椎間板内水分子の動態の MRI を用いた解析，第 8 回日本整形外科学会基礎学術集会（松本）

三上靖夫，日下義章，植村　理，森田康司，長谷　斉，平澤泰介，田中忠蔵 (1993. 10) MRI を用いた椎間板線維輪の役割に関する研究，第 8 回日本整形外科学会基礎学術集会（松本）

12. MRIによる内耳病変の検出
Functional MRIによる脳内嗅覚応答野の画像化

肥塚　泉，瀬尾　律，久保　武（大阪大・医・耳鼻咽喉科）
瀬尾芳輝，村上政隆，亘　　弘（生理研）

【緒言】

我々はボランティアを対象とした，MRIによる内耳微細構造の撮影およびFunctional MRIによる脳内嗅覚応答野の画像化を行っている。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，また一部の被験者においてはライスネル膜の描出に成功した。本年度は，前者のMRIによる内耳病変の検出という課題については再現性を確認したのみにとどまったので，後者のFunctional MRIによる脳内嗅覚応答野の画像化について報告する。

【対象および方法】

正常成人5名を対象とした。パスルシーケンスはInversion Recovery (IR)(TI＝1100 ms, TR＝3500ms, TE＝42ms)を用いた。スライス厚は10mmとした。マトリックスは64×128，スキャン回数は1回とした。次に示す方法で嗅覚刺激によるFunctional MRIを行った。

撮影(1)→静注（生理食塩水2ml）→撮影(2)→静注（アリナミン注射液2ml）→撮影(3)

撮影(2)の画像から—撮影(1)の画像を引き算したものをコントロール，撮影(3)の画像から撮影(1)の画像を引き算したものをアクティブとした。

【結果】

図1に結果を示す。嗅覚刺激により，嗅覚中枢である梨状皮質，眼窩前頭皮質の血流増加が認められた。

【考察】

近年，functional MRI (F-MRI)を用いる事により，脳内における情報処理過程を非侵襲的に視覚化する事が可能となった。我々は，嗅覚刺激に伴う脳内の活動の変化をF-MRIを用いて検討した。その結果，嗅覚刺激により，嗅覚中枢である梨状皮質，眼窩前頭皮質の血流の増加が認められた。嗅細胞群がニオイによって刺激されるとまず第1次嗅覚中枢である嗅球に入り，そこで情報が処理されて次に第2次嗅覚中枢である嗅皮質と呼ばれる古い脳に終わる。ここには梨状皮質，扁桃核，外嗅核，嗅結節，嗅内野という細胞集団がある。梨状皮質と扁桃核からでた信号は2つに別れ，視床の下方にある無名質やマイネルト核（第3次中枢）を経由して前頭前野（新皮質）の腹側部にあたる眼窩前頭皮質の外側後部(LPOF)に終わるものと，視床の背内側核に終わり，そこから出て眼窩前頭皮質の中央後部(CPOF)に終わるものと2系統が証明されている。今回我々が行ったFunctional MRIを用いた検討でも，人においてこれらの部位にほぼ一致した部位に，血流の増加が認められた。今後は人においても非侵襲的かつ他覚的に嗅覚を評価する事が可能になると思われる。

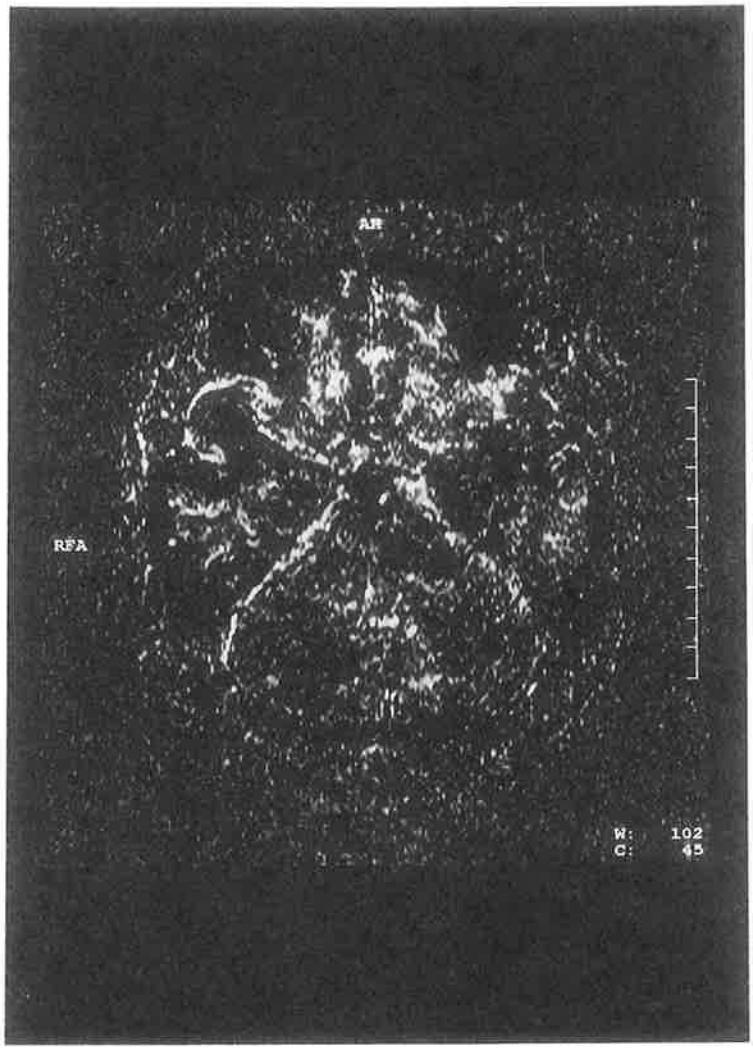


図1　ボランティアより得られた嗅覚刺激による functional-MRI
嗅覚刺激により，嗅覚中枢である梨状皮質，眼窩前頭皮質の血流増加が認められた。

13. ^{31}P-MRSの連続測定による運動時の無機燐酸ピークの動態

吉田敬義（大阪大・健康体育部）
亘　　弘（生理研）

【序】

核磁気共鳴装置が運動中の燐酸代謝を明らかにするために用いられてきているが，燐の緩和時間が比較的長いために測定の時間分解能を向上することができず，せいぜい1分毎の測定が一般的であった。そこで^{31}P-MRS測定時間分解能を向上させてPiピークの分裂パターンを利用して運動中の無機燐酸の分裂状態を検討した。

【方法】

各種運動負荷を行った時の^{31}P-MRSの測定を5秒毎に連続的に行い，そのデータを一旦コンピューターにストアした。その後，時間経過に対するスペクトラを重ね合せてそれぞれの燐化合物のピークの運動による変化の等高線処理及びその疑似カラー表示を行った。また，PCrとPiの化学シフトから筋細胞内のpHを求めた。

【結果と考察】

図1は本研究から得られた^{31}P-MRSの1例を示している。運動を開始すると，Piピークの高さが急激に増加することがわかる。その後，運動開始後60から90秒位たってからPiピークの右側が膨らんでくることがわかる。運動の経過にともないこの膨らみは元のPiピークの位置よりアシドーシス側でピークを形成するようになり，その結果運動中にPiピークは2本に分裂した。運動強度が増加するに従って後から生じたPiピークの高さの方がより高くなった。運動を中止すると，最初から存在していたPiピークは急激に減少するが，運動中に遅れて出現した右側のPiピークの変化は時間的に遅く運動終了3分後でも明確に存在していた。言い換えれば，運動開始時においても終了時においても分裂したPiピークのうち左側のPiピークは時間的に速い変化を示し，右側のPiピークは遅いタイムコースを示した。さらに，運動中に分裂したPiピークのそれぞれの化学シフトからpHの値を算出すると，左側のPiピークのpH値は右側のPiピークのpH値よりも高いのでhigh-pH piピークである。一方，運動開始後遅れて出現したPiピークのpHは比較的アシドーシス側に位置しているのでこのPiピークはlow-pH Piピークであるといえる。言い換えれば，この現象は運動中に筋細胞内にpHの不均一な分布が存在することを意味し，low-pHではそのタイムコースは遅い。

人の骨格筋には速筋線維と遅筋線維とが混在している。遅筋線維はミトコンドリア密度や毛細血管密度が豊富で，酸化的酵素活性も高い。一般にPCr分解には筋サルコメアのクレアチン燐酸キナーゼやミオシンATPaseが主に働き，PCr合成系は主にミトコンドリアのクレアチン燐酸キナーゼと有酸素的能力に依存している。安静時や軽い運動強度のときには主に有酸素的代謝によるエネルギー供給がなされているのでPiピークは遅筋線維由来のものである。したがって，

ATP 合成のために酸化的燐酸化が働く。ここで安静時の速筋線維の Pi ピークの高さは遅筋線維よりも小さく，時によっては見えないこともある。運動強度が高く激しくなると有酸素的代謝機構だけでは運動のエネルギー需要を賄えなくなるので解糖系による代謝も参画するようになる。その結果，乳酸が産生されて筋細胞内 pH は低下する。つまり，運動強度が低いときには遅筋線維内での代謝で十分であったものが，運動強度の増加によって速筋線維内の代謝も必要とするようになり，そこで PCr 分解によって得られる Pi も速筋線維由来のものが出現するようになったと考えられる。

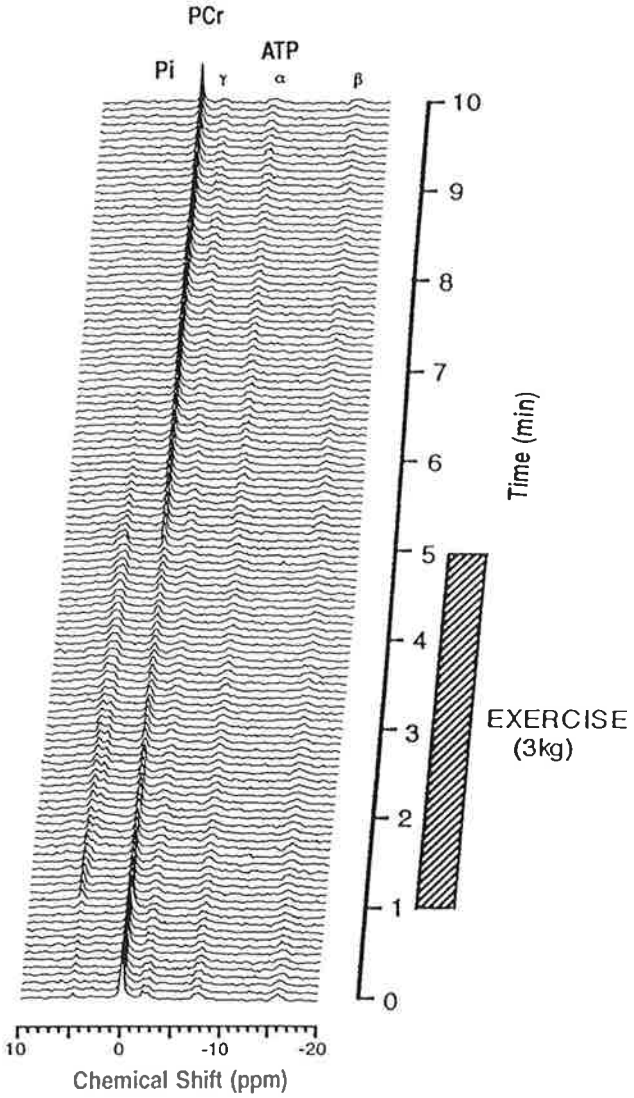


図 1　運動時および回復時の ^{31}P-MRS の連続測定

14. NMRによる含フッ素薬品体内動態の無浸襲追跡

亀井（金沢）洋子，馬屋原慶子，新村俊幸（九州大・薬学）
亘　　弘，村上政隆，瀬尾芳輝（生理研）

【研究の目的】

医薬品の体内動態における個人差の存在は薬品投与計画作製上重要な問題点であるが，臨床薬学の現場において現在活用されている情報は血中濃度，尿排出などである。採血による血中濃度モニタの重要性はいうまでもないが，長期投与薬での無侵襲モニタは待望される課題である。NMRは体内の化合物の量のみならずその生化学変化の無侵襲測定に適し，なおかつこれらの画像表示も可能な方法である。従ってこれを標的部位における薬品動態モニタ手段として早急に開発すべきものと考える。本研究はNMR測定核の中でも検出感度が高く，内在性物質の妨害が少ないフッ素(^{19}F)を用い，NMRによる医薬品の無侵襲動態追跡法の検討を行う。なお，本年度は糖代謝活性測定標識化合物である2―デオキシ―2―フルオロ―D―グルコース(FDG)を主として用いた。また，制がん剤である5―フルオロウラシルおよびそのプロドラッグのin vivo追跡も併せて行った。

【実験】

がんにおけるFDGの代謝追跡：実験にはマウスを用い，主として腹水がんとしたMH134腫瘍（C3Hマウス）における動態を①in vivo NMR測定，②摘出細胞，③その水抽出物のNMRスペクトルの3種類の測定で比較検討した。なお，①と③はJEOL GSX-270 (6.3 T)による測定であり，②はさらにFX-100 (2.3 T)で定量を行った。

【結果と考察】

1．グルコースのフッ素標識体の一つである2―デオキシ―2―フルオロ―D―グルコース(FDG)を投与したマウスの腫瘍において2日以上にわたる代謝物の保持が確認された。これは他の健常臓器における標識化合物の排出より有意に遅い。

2．FDGの長時間保持と代謝物分布を検討した結果，1－2日経過後のがんにおいてはFDGからFDG-6-リン酸，2―デオキシ-2-フルオロ-D-マンノース(FDM)-6-リン酸を経て生成したFDMのヌクレオチド体が代謝物の大部分を占めていることが示され，これが長時間保持を担う物質であることが明かになった。図1

3．以上のことが肝臓がん，2種類の肉腫および腺腫において共通であることを確認した。すなわち，FDG代謝物の長時間保持と圧倒的なNDP-FDM生成は腫瘍特有の現象であることが示された。

4．担がんマウスのin vivo NMR測定によってNDP-FDMの生成と経時的な増加を追跡できた。この結果は摘出細胞での定量結果とよく一致し，in vivo NMR測定による動態追跡が信頼できるデータを提供することが示された。図2

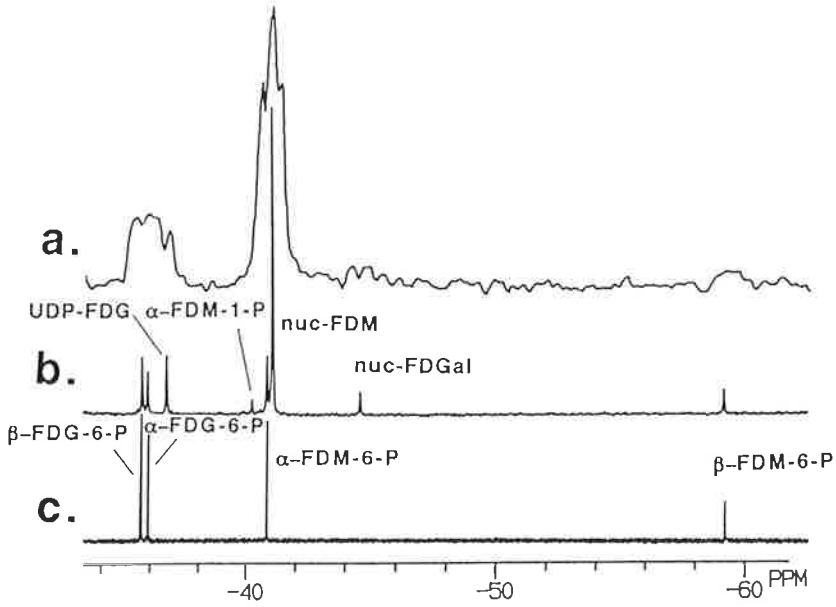


図1 ^{19}F NMR Spectra of FDG Metabolites
a. Ascites Hepatoma (100 mg/kg, 24h, 93 MHz)
b. Water Extracts of a ($\{^1H\}$ 254 MHz)
c. Equilibrium Mixture of FDG-6-P + FDM-6-P ($\{^1H\}$ 254 MHz)

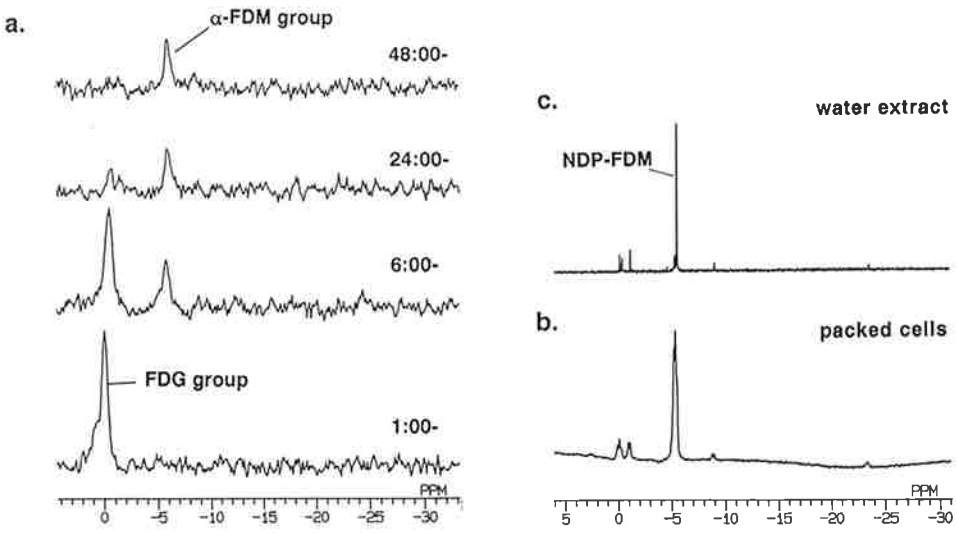


図2 ^{19}F NMR spectra of in vivo 30 m measurement of a FDG injected mouse anesthetized with halothane at about 1, 6, 24 and 48 h (a) after FDG injection. ^{19}F NMR spectra of packed ascitic cells (b) and water extracts (c).

FDG の特徴的代謝の無侵襲 NMR 追跡により小動物のがん診断が可能であることを示した。薬品評価研究において動物実験は不可欠であるが，小動物でのがんの無侵襲診断は現状では非常に困難であると聞く。本法はこの点で利用価値が高い。なお，この結果の画像表示は平成 6 年度の課題といえる。

2．発表論文および研究報告

b）学会報告

Kanazawa Y, Yamada M, Umayahara K, Masuda K, and Yamashita T, (1993-5) The Mechanism of FDG Retention in Heart and Tumor, Presented at the International Symposium on Clinical PET in Oncology, (仙台).

Kanazawa Y, Yamada M, Umayahara K, Masuda K, Yamashita T (1993-8) ^{19}F NMR Study of 2-Deoxy-2-fluoro-D-glucose Metabolites beyond FDG-6-P and FDM-6-P in Tumors, Presented at the 12th Annual Meeting of the Society of Magnetic Resonance in Medicine, (New York).

Shinmura T, Umayahara K, Kanazawa Y, Yamada M, Masuda K, Yamashita T, (1993-10) A New Biochemical Principle of 19F NMR Tumor Imaging: A Unique Metabolite of FDG, Presented at the International Workshop on MRI & S （岡崎）

馬屋原慶子，金沢洋子，増田康治，(1993-9) フッ素糖代謝を用いた腫瘍戸正常組織の評価—UDP-FDGal の生成—。第21回日本磁気共鳴医学会大会，シンポジウム「医学—生物学における ^{19}F-NMR」（つくば）

金沢洋子，馬屋原慶子，山田真由美，新村俊幸，増田康治，山下恒雄 (1993-9) 腫瘍における FDG の集積— F 化合物長時間保持と nuc-FDM 生成との相関—。第21回日本磁気共鳴医学会大会（つくば）

新村俊幸，馬屋原慶子，金沢洋子，増田康治 (1994-3) ^{19}F NMR による腫瘍細胞内代謝物の非侵襲測定。日本薬学会第114年会（東京）

金沢洋子 (1994-3) NMR による代謝の測定，シンポジウム「生体計測と情報構築」。日本薬学会第114年会（東京）

田中章博，前田　稔，馬屋原慶子，金沢洋子，増田康治，原田平輝志 (1994-3) 糖代謝機能診断薬としての ^{18}F 標識フルオロフルクトースの担がんマウスによる基礎的検討。日本薬学会第114年会（東京）

第10回核磁気共鳴装置共同利用実験ワークショップ

(1993. 10.25-10. 28)

核磁気共鳴法による細胞内，細胞外 Na の分子環境の解明

1) Multiple Quantum Filtered NMR Spectroscopy: A New Tool for the Study of Quadrupolar Nuclei in Biological Systems.

G. Navon (Tel Aviv University, Israel)

2) Nutation NMR on the Compound Semiconductor GaAs and GaAs

T. Erata, H. Nakamura & A. Tasaki (University of Tsukuba)

3) The Effect of Macromolecular Crowding on Quadrupolar Ion Relaxation Behavior: Illustrations from the Ocular Lens.

T. Schleich, A. Stevens, P. Paschalis & J. M. Rydzewski (University of California, Santa Cruz)

4) New NMR Techniques for Spin-3/2 and Spin-5/2 Nuclei in Biological Systems.

R. Kemp-Harper & S. Wimperis (University of Oxford, UK)

5) Lineshape Analysis of Double Quantum Filtered NMR Spectra of ^{23}Na in Systems with Anisotropic Motion.

U. Eliav & G. Navon (Tel Aviv University)

6) Multiple-Quantum NMR Studies on the Mobile Ion in Solid State Electrolytes.

H. Yamada, T. Erata & A. Tasaki (University of Tsukuba)

7) Organized discussion "Theoretical Basis of Relaxation"

S. Wimperis (University of Oxford)

8) Relaxographic Analyses of ^{23}Na and $^{1}H_2O$ Magnetic Resonances: Simulations and Results.

J. -H. Lee, C. Labadie & C. S. Springer Jr. (University of New York at Stony Brook)

9) Multiple Quantum Filtered NMR Spectroscopy as a Probe for the Nature of the Binding Sites of Na^+ and K^+ in Red Blood Cells and Cartilage.

H. Shinar, T. Knubovets, U. Eliav & G. Navon (Tel Aviv University)

10) Anisotropic Motion of Na^+ in Red Blood Cells and its Location.

Y. Seo (National Institute for Physiological Sciences)

11) Molecular Models for Interpreting ^{23}Na Relaxation.

C. S. Springer Jr. & W. D. Rooney (University of California, San Francisco)

12) Organized Discussion "Molecular Environment of the Intracellular Na^+"

Y. Seo (National Institute for Physiological Sciences)

13) $TmDOTP^{5-}$ as an in vivo ^{23}Na Shift Reagent.

A. D. Sherry, C. R. Malloy, N. B. Butwell, N. Bansal & Z. -F. Xia (University of Texas)

14) Monitoring Hypoxic Injury in the Isolated Perfused Rat Kidney with ^{23}Na NMR.

Z. H. Endre (University of Queensland)

15) ^{31}P and ^{23}Na NMR Studies on the Metabolism of Ischemic kidney.

S. Yokono, M. Ueki, S. Taie & K. Ogli (Kagawa Medical School)

16) Ion Transport Studied by NMR Spectroscopy.

F. G. Riddell, J. Bramham, H. M. Bueger & Z. Zhou (University of St. Andrews)

17) Organized Discussion "Chemical Shift Reagents"

Z. H. Endre (University of Queensland)

18) NMR Relaxation of ^{7}Li Nuclei in Concentrated Aqueous Solutions of Some Lithium Salts: LiCl, LiBr and LiSCN.

T. Hasebe (University of Fukushima)

19) Calcium-43 NMR Studies of Small Calcium-Binding Proteins.

T. Hiraoki, K. Nitta, Y. Ke, T. Drakenberg, J. M. Aramini & H. J. Vogel (Hokkaido University)

20) Oxygen-17 Is a Great Tracer: Mapping Cerebral Oxygen Consumption and Blood Flow with Oxygen-17 and Fluorine-19 Magnetic Resonance Imaging.

J. J. Pekar (National Institute of Health)

21) The Use of Dietary Loading of ^{133}Cs as a Probe of the Intra-and Extracellular Environment in Rat Tissues.

B. P. Shehan, R. M. Wellard, W. R. Adam & D. J. Craik (Monash University)

22) Organized Discussion "Other Quadrupole Nuclei"

J. J. Pekar (National Institute of Health)

23) Role of Na^{+} Homeostasis in the Pathophysiology of the Heart.

M. M. Pike, C. S. Luo, S. Yanagida, P. G. Anderson & G. M. Pohost

(University of Alabama at Birmingham)

24) Quantification of Sarcolemmal Na^{+} -Transport in Rat Hearts by ^{23}Na MRS.

C. J. A. van Echteld, J. G. van Emous, J. H. M. Schreur & T. J. C. Ruigrok

(University Hospital Utrecht)

25) Contribution of Transporters to Total Na^{+} Handling during Secretion by Rat Mandibular Salivary Gland.

M. Murakami, T. Ishikawa & Y. Seo (National Institute for Physiological Sciences)

26) Organized Discussion "Quantification of the Intracellular Na^{+} in vivo"

W. D. Rooney (University of California, San Francisco)

P1 Multiple-Quantum NMR Studies on the Mobile Ion in Solid State Electrolytes.

H. Yamada, T. Erata & A. Tasaki (University of Tsukuba)

P2 Diffusional Behavior of Water in Polysaccharide Gels by PFGSTENMR.

T. Watanabe & A. Ohtsuka (Tokyo University of Marine Sciences)

P3 ^{1}H-NMR Study on Histamine Secretion and Lactate Production in Mast Cells.

K. Yoshizaki, N. Arizono, T. Hayano, H. Ito & H. Watari (University of Tokushima, Japan)

P4 A New Biochemical Principle of ^{19}F NMR Tumor Imaging: A Unique Metabolite of FDG.

T. Shinmura, K. Umayahara, Y. Kanazawa, M. Yamada, K. Masuda & T. Yamashita (Kyushu University, Japan)

P5 ^{1}H-NMR Studies on the Molten-Globule State of Ovalbumin.

M. Sogami, S. Era, A. Takasaki, K. Kuwata, T. Kajihara, K. Ejiri, K. Nakamura, T. Koseki & E. Doi (Fujita Health University, Japan)

P6 Structural Transition of Human Serum Albumin in the Acidic Region: the N > F and F > E Transitions.

S. Era, M. Sogami, A. Takasaki, K. Kuwata, K. Ejiri, T. Kajihara, K. Nakamura & H. Watari (Gifu University, Japan)

P7 Intermolecular Cross-Relaxation in Bovine Plasma Albumin Gel and Solution States: Basic Studies on the Magnetization Transfer Contrast (MTC) Imaging.

M. Sogami, S. Era, A. Takasaki, K. Kuwata, T. Erata, A. Tasaki, K. Kato, K. Ejiri, T. Kajihara, K. Nakamura & H. Watari (Fujita Health University, Japan)

P8 Intermolecular Cross-Relaxation Phenomena in Blood: Basic Studies on MR-Angiography under the Magnetization Transfer..

A. Takasaki, M. Sogami, S. Era, N. Uyesaka, K. Kato, K. Nakamura, K. Ejiri, T. Kajihara, S. Hasegawa, K. Ohashi & M. Itoh (Fujita Health University, Japan)

P9 Cross-Relaxation Studies on the State of Water in Synthetic Copolymer Gels: Basic Studies on the Phantom for Magnetic Resonance Imaging.

S. Era, M. Sogami, K. Nakamura & A. Takasaki (Gifu University, Japan)

P10 Comparative ^{1}H-NMR Studies on the State of Water in Intact and Scratched Mouse Lenses.

K. Nakamura, S. Era, M.Sogami & A. Takasaki (Gifu University, Japan)

【討論参加者】

U. Eliav （テルアビブ大学), Z. H. Endre （クイーンズランド大), T. Erata （筑波大・物理), T. Hasebe （福島大・教育), T. Hiraoki （北海道大・応物), M. Laughlin (NIH), J. -H. Lee (SUNY), G. Navon （テルアビブ大学), J. J. Pekar (NIH), M. M. Pike （アラバマ大バーミンガム校), E. G. Riddell （St アンドリュース大), W. D. Rooney (UCSF), T. Schleich (UCSC), B. P. Shehan （モナシュ大), A. D. Sherry （テキサス大ダラス校), H. Shinar （テルアビブ大学), C. J. A. van Echteld （ユトレヒト大), S. Wimperis （オクスフォード大), R. Ishima （新技団永山プロジェ

クト），T. Hayashi, S. Era, K. Nakamura （岐阜大・医），T. Hayano （京都府医大），Y. Kanazawa, T. Shinmura （九州大・薬），S. Yokono, M. Ueki （香川医大），H. Kusuoka, T. Kaminaga （大阪大・医），H. Yamada （筑波大・物理），T. Watanabe （東京水産大），M. Sogami, A. Takasaki, K. Ejiri, T. Kajihara （藤田保衛大），K. Yoshizaki （徳島大），A. Uyesaka （日本医大），S. Shimokawa （北海道大・工），Y. Seo, M. Murakami, T. Ishikawa, O. Ichikawa, H. Okawara, M. Takagi （生理研）

【概要】

人間をはじめとする高等動物の栄養摂取，老廃物の排泄機構は全て上皮性の細胞の物質輸送を介して行われる。上皮膜組織は一層に配列した上皮細胞からなり，血管側から管腔側へ或はその逆方向へと物質を運んでいる。これら物質は，細胞内のナトリウム，カリウムイオンが作り出す電気化学勾配を利用して，輸送されていると考えられている。しかしながら，細胞内外における基本電解質 (Na, K) の分子的環境についての知見は乏しく，コップの塩水のナトリウムと細胞内のナトリウムとが具体的にどのくらい違っているのか，ナトリウムイオンを輸送するイオンチャンネルとイオン自身との相互作用点等について全く解っていない。近年，ナトリウム，カリウムイオンの分子運動を直接測定できる核磁気共鳴法による研究成果が集まりつつある。本ワークショップは，細胞内外のナトリウムイオンの分子的環境についての解析を軸に，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とした。

生理学研究所磁気共鳴装置共同利用実験グループ主催で第1回国際ワークショップ（1990. 2., 外国人参加者5名，国内参加者50名）第2回国際ワークショップ（1991. 11., 外国人参加者20名，国内参加者60名）を開催，1）共通の四極子緩和理論にもとづくデータの測定，解析方法，2）イオンの存在区画の同定への多量子フィルター法の有用性，3）磁気緩和モデルの解析戦術が討議され，共通の認識のもとに新たな国際共同研究が生まれた。その中から，昨年細胞内でのナトリウムイオンの分子環境の解明への大きなブレークスルーがテルアビブ大のグループによってなされ，早急な研究成果の集約と普遍化の作業が必要となっている。今回のワークショップはニューヨーク州立大学，マンチェスター大学，テルアヴイブ大学との共同研究プロジェクトをもとに磁気共鳴装置共同利用実験グループの主催で第3回国際ワークショップ”核磁気共鳴法による細胞内，細胞外 Na の分子環境”として，医学生物学及び物理工学の若手研究者を中心に6ケ国より15名，国内35名の参加を得，10月25—28日の4日間の日程で行われた。

ワークショップでは，1）四極子磁気共鳴緩和理論，2）細胞内でのナトリウムイオンの分子環境，3）化学シフト剤の開発と摘要，4）カリウム・リチウム・セシウム・カルシウムイオン等の磁気共鳴緩和，5）in vivo 系での電解質生理活動の解析の5テーマについて，講演20演題，ポスター12件の発表・討論がおこなわれた。今回の新しい試みとして，上記の5テーマについて各々3～4講演をおこなった後，各々のトピックスについて集中討議をおこなった。

1）四極子磁気共鳴緩和理論により，S. Wimperis らにより予測されていた生体組織内におい

て非均一な静電磁場勾配を受けているナトリウムイオン（“結合”したナトリウムイオン）の存在が初めて，U. Eliav, H. Shinar, Y. Seo 等によって測定・報告された。S. Wimperis らにより多量子磁気共鳴緩和理論をさらに拡張し，“結合”したナトリウムイオンの磁気緩和パラメータを選択的に測定できる新しい測定手法 (J-B NMR) が提起された。

2）細胞内でのナトリウムイオンの分子環境については，1987年，J. Pekar, S. Wimperis らによって提唱された多量子磁気共鳴法により，過去数年間で飛躍的に研究がすすんだ。今回，さらに，赤血球や軟骨組織内に局在する“結合”したナトリウムイオンの分子環境について，H. Shinar, Y. Seo 等によって報告された。特に，“結合”したナトリウムイオンの Na-23 NMR スペクトルの表示方法と，定量的取扱について，議論が集中した。この点については，継続した議論が必要である。

3）1982年，M. Pike, R. Gupta 等によって開発された化学シフト剤は，従来不可能であった細胞内外のナトリウムイオンを区別できる画期的な方法であった。その後細胞内外の分離能力や細胞毒性などの面でなかなか新しい化合物が見つけられなかった。1992年，A. D. Sherry 等によって，新たに Tm (DOTP) という化合物が開発された。従来の化学シフト剤に比べ，極めて高い細胞内外の分離能力をもち，in vivo での使用に耐え得る低毒性を示し有用性が認められた。

4）カリウム・リチウム・セシウム・カルシウムイオン等の他の四極子核種について，単結晶から生体レベルまでの研究成果の報告を T. Hasebe, T. Hiraoki, P. Shehan らから受けた。ナトリウムイオンによって得られた成果をこれらの核種についても摘要出来るか否か，磁気共鳴緩和の測定の重要性が認識された。

5）in vivo 系での電解質生理活動について，腎臓，心臓，唾液腺について，Z. Endre, M. Pike, M. Murakami らから報告をうけた。磁気共鳴法は，本質的に非破壊計測方法であり，医学生理学研究の手段として高い注目をあびている。一方，in vivo 系での定量測定については，未だに未整理な点が多く指摘され，今後の研究をすすめる上でも避けて通ることは出来ず，この点については，継続した議論が必要である。

本研究領域は，極めて重要な領域であるが，一方極めて難解な領域であるために，研究者の数が少なく，磁気共鳴・物理化学関係の学会においても集中した討論セッションがもうけられない。その意味でも，このワークショップの存在意義は大きく，今回の会合中にもいくつもの共同研究の打ち合せがおこなわれ，今後の共同研究の発展と 2 年後の再会を約した。約30演題の発表抄録は本（114ページ）にまとめられ，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収録する。関連研究室にはできるだけ送付したが，必要であれば連絡いただきたい。財政的には，生理研磁気共鳴装置室ワークショップ開催費を中心に，文部省科学研究費，British Counsil の援助，また大幸財団，日本ブルカー，日製産業名古屋支店の協力を得て，開催することができた。ここにあらためて深謝します。

第11回核磁気共鳴装置共同利用実験ワークショップ

(1994. 3. 9-3. 10)

教育講演 A. in vivo P-31 NMR のヒト運動生理への応用

1) The use of metabolic recovery after exercise to measure oxidative capacity.

K. McCully (Medical College of Pennsylvania)

2) The changes in skeltal muscle metabolism with aerobic and power training studied by ^{31}P-NMR spectroscopy

K. Hirakawa (Kobe University)

3) 31P-MRS study of the time course of energy metabolism and intracellular pH during exercise and recovery

T. Yoshida (Osaka University)

教育講演 B. 流れの NMR

4) Development of a real-time MR image-reconstruction system for unsteady fluid flow

K. Kose (Tsukuba University)

5) Recent flow measurements by NMR

E. Fukushima (Lovelace Institute)

【概要】

1993年度の共同利用実験成果を検討し,1994年度の実験研究計画を打ち合せるため,第11回ワークショップを1994年3月9—10日の両日第11回ワークショップを行った。1993年度及び1994年度共同利用実験研究者（所外32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，今後の装置改善等について打ち合せが行われた。また，新規に共同利用実験に参加される研究者に，安全教育，MRI 及び MRS 測定等の基本実習を行った。本ワークショップでは，教育講演として，Drs Kevin McCully (Medical College of Pennsylvania)，平川和文（神戸大学，教養部），吉田敬義（大阪大学，健康体育部）を招聘し，「in vivo P-31 NMR のヒト運動生理への応用」について，また，Eiichi Fukushima (Lovelace Institutes)，巨瀬勝美（筑波大学，物理工学系）に「流れの NMR」について講演していただいた。また，共同利用実験報告は各研究グループのレポートを参照されたい。

【討論参加者】

K. McCully （ペンシルバニア医大），平川和文（神戸大・教養），吉田敬義（大阪大・保健体育），巨瀬勝美（筑波大・物理工），E. Fukushima （ラブレス研究所），曽我美勝，高崎昭彦，江尻和

隆（藤田保衛大），泰羅雅登（日本大・医），加藤一夫（稲沢市民病院），大塚章宏（東京水産大），林　義裕（徳島大），恵良聖一，中村浩二，林　知也（岐阜大・医），横野　諭，植木正明（香川医大），神谷純司，巽　英明（大阪大・保健体育），松波謙一（岐阜大・医），森川茂弘（滋賀医大），石川　誠，小原潤也（大塚製薬徳島研），高橋則人，新原寿志（明治鍼灸大），中村克樹（京都大霊長研），木村昌弘，桑原義之，佐藤篤司，福岡宗良（名古屋市大・医），日下義章，成瀬昭二（京都府医大），金沢洋子（九州大・薬），亘　　弘，村上政隆，瀬尾芳輝（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．ZIO 法染色細胞の解析（小室輝昌他）…… 318
2．色感受性錐体視細胞末端のシナプス構造の三次元形態の解析
　（日高　聡他）…… 319
3．糸球体における内皮細胞とメサンギウム細胞の接着様式(追手　巍他) … 321
4．血管内皮細胞の透過性に及ぼす血行力学の影響（吉田洋二他）…… 322
5．巨大単細胞体における配偶子形成の立体解析（石川依久子）…… 323
6．*Haptoglossa heterospora* の gun cell の超高圧電顕的研究（犀川　稔他）… 324
7．培養細胞全載固定組織化学的染色標本及び無固定新鮮培養細胞標本の
　超高圧電子顕微鏡による観察（永田哲士他）…… 326
8．植物培養細胞中のアクチン線維の超高圧電顕ステレオ観察
　（谷口美恵子他）…… 329
9．胃壁細胞の tobulo-vesicular system の立体構造とその変化
　（野田　亨）…… 330
10．分泌腺及び肝細胞の細胞骨格系と酸性化小器官の超高圧電子顕微鏡観察
　（佐々木貞雄他）…… 331
11．培養グリオーマ細胞の細胞骨格に及ぼす各種成長因子，サイトカインの
　影響に関する免疫電顕立体観察（峠本勝司他）…… 333
12．肝細胞ネマトライソゾームの形態と機能に関する研究（荒木伸一他）… 335
13．中枢神経系ニューロン・グリアの三次元構造解析（小坂俊夫他）…… 337
14．聴覚閾値の変化過程における蝸牛有毛細胞の構造的変化
　（野田坂佳伸他）…… 338
15．YAG-TV 撮像系による電子強度測定精度に関する研究
　（一海孝光他）…… 339
16．海産魚網視細胞の神経結合（桜井泰憲他）…… 340

1．ZIO 法染色細胞の解析

小室輝昌，周　徳山，石川浩一（早稲田大・人間科学）

【目的及び方法】

Maillet (1959) による ZIO 法 (Zinc iodide-Osmic acid stain) は Potassium iodide-Osmic acid stain (Champy 1913) の改良法として広く使用されているが，原法がアドレナリン作動性神経に特異的親和性を持つと信じられた所から，これに共染する interstital cells of Cajal (ICC) も交感神経系に属する細胞と考えられてきた。その後，これらの染色法によって種々の部位の非神経性細胞の染まる事が明かとなってきたが，“ある非神経性の細胞”が染まる理由については説明されていない。

ところで，ICC の細胞学的性質については Cajal (1893, 1911) の記載以来，異論が多く，未だに定説を見るに至っていないが，消化管運動におけるペースメーカーとしての仮説 (Thuneberg 1982) が注目を集めており，改めて，その細胞学的同定が望まれる所である。

この点，ICC を染めるとされる ZIO 法では，オスミウム酸を使用するため電子密度の高い沈殿物を生成すると共に微細構造の保存にも優れ，同一試料を光学及び電子顕微鏡観察に供する事が可能であり，ICC の解析に有効な染色法と考えられるが，その染色特性については是非とも吟味しておく必要がある。

そこで本研究ではモルモット小腸を材料として ZIO 染色を施し，深部筋神経叢を含む筋層の全載伸展標本を作製，光学顕微鏡にて観察後エポキシ樹脂に包埋，厚切切片 (0.5-3μm) を作製して超高圧電子顕微鏡 (H-1250M) で観察した。

【結果及び考察】

モルモット小腸深部筋神経叢は輪走筋の最内層部に位置し，主に輪走筋と平行して走る神経束とこれを連絡する線維とから構成される。この神経叢には三型の間質性細胞 (gap junction-rich, glycogen-rich and fibroblast-like cells) の随伴することが，超薄切片による観察から判明しているが (Zhou & Komuro 1992ab), ZIO 染色伸展標本では，神経束の側面に位置して紡錘型の細胞が多数認められる。電子顕微鏡下に観察すると，無髄神経束は高い電子密度の連続する varicosities として観察され，これに密接する ZIO 陽性細胞は細胞体に続く一次突起を神経束に沿って伸ばし，神経叢の吻合点では分岐し方向を変えて走る神経束に沿って，更に突起を伸ばす像が観察される。

立体組み写真により両者の関係をみると，細胞突起は，往々，神経束を全体として包み込むが，シュワン細胞のように線維束を仕切る突起を作ることは無い。また，この細胞の周辺には ZIO に未染の細胞を認める事が出来るが，それらのものでは核の円形のものが多い。今回の観察では ZIO 染色の強さ（電子密度）により細胞小器官等の充分な解析は困難であったが，細胞突起の形状，神経線維との関係等から，ZIO 陽性細胞は少なくとも多くの fibroblast-like cells を含むもの

と推定された。切片の厚さや染色反応時間の調節により，今後，更に詳細な検討を加えたいと考えている。

2．色感受性錐体視細胞末端のシナプス構造の三次元形態の解析

日高　聡，橋本葉子（東京女子医大・第一生理）

【目的】

網膜における色弁別の神経機構を調べるために我々はこれまで錐体視細胞の細胞形態の解析を行ってきた。超高圧電子顕微鏡の高い電子線透過能と高分解能を利用して，5μm の厚切り切片上でゴルジ法で鍍銀された錐体視細胞の三次元形態を解析した。ゴルジ鍍銀標本は超高圧電子顕微鏡下で観察する時に高い電子線密度を有するので，十分に微細形態は観察できたが，鍍銀された色感受性錐体の種類の同定が不十分であった。そこで今回，高度な色弁別能を有するウグイの網膜上で規則的な配列を示す錐体視細胞を微小電極による細胞内注入法で標識して，その細胞形態の解析を試みた。

【方法】

実験には硬骨魚コイ科ウグイ *(Tribolodon hakonensis)* の剝離網膜標本を用い，錐体視細胞に Lucifer Yellow と Neurobiotin との細胞内注入法（日高と橋本，'93）を適用した。杆体の外節部を機械的に除去した標本上で，その規則的な配列様式から錐体視細胞を識別し，顕微鏡下で細胞内標識した。錐体の標識を Lucifer Yellow の蛍光から確認した後，アルデヒド固定を経て，biotin の標識を avidin-biotin 反応後，DAB による発色から同定した。DAB 反応時に，反応産物のコントラストを増強するために Ni^{2+} と Co^{2+} を添加した (Adams, '81)。電子顕微鏡下での標本の電子線密度の増大を目的として，脱水過程で重クロム酸カリウムと酢酸ウランとリンタングステン酸による三重のブロック染色（日高と橋本，'93）を施した。エポキシ樹脂包埋標本から，厚さ 7μm の切片を作製し，超高圧電子顕微鏡下で 1000kV で解析した。

【結果と結論】

Biotin が錐体視細胞の外節から内節部を経て軸索末端まで十分に充填された複合錐体の長錐体の注入例の光学顕微鏡像を図 1 に示す。軸索は内節の細胞体より網膜内層に向かってまっすぐに下降している。軸索終末から telodendria の発生が見られる。図 1 で観察した切片から厚さ 7μm の切片を作製して，光学顕微鏡に対応する超高圧電子顕微鏡での観察像を図 2 に示す。Biotin 標識された今回の標本は超高圧電子顕微鏡像として充分な電子線密度を有している。軸索終末部の形態がよくわかり，光学顕微鏡で見られた telodendria の数と走行が同定できる。ブロック染色は標識錐体以外の非標識構造物の観察をも可能にし，標識錐体に接触した複合錐体の短錐体の内節部 (G) が認められる。今回の実験から，我々の標本は超高圧電子顕微鏡下で充分に微細形態の

同定が可能であることがわかった。我々のこれまでのゴルジ鍍銀像では軸索終末部からのtelodendriaの発生は同定できなかったが，今回用いた細胞内標識法はその存在を明瞭に示すことができたので，我々が開発した方法は視細胞を初めとしてかなり細い突起を有する神経細胞の三次元形態の解析に有効な方法である。

【引用文献】

Adams J. C. (1981) J. Histochem. Cytochem., 29: 775

日高　聡，橋本葉子 (1993) 日本生理学雑誌，55: 241-254

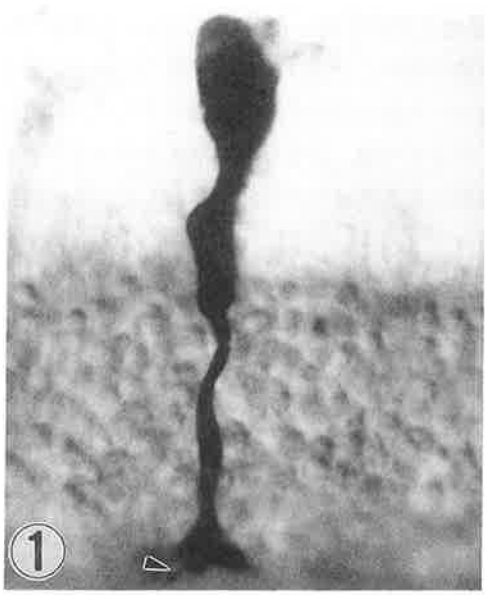


図1：ウグイ網膜の複合錐体の長錐体の光学顕微鏡像
Neurobiotin 標識標本の厚さ 60μm 切片での観察

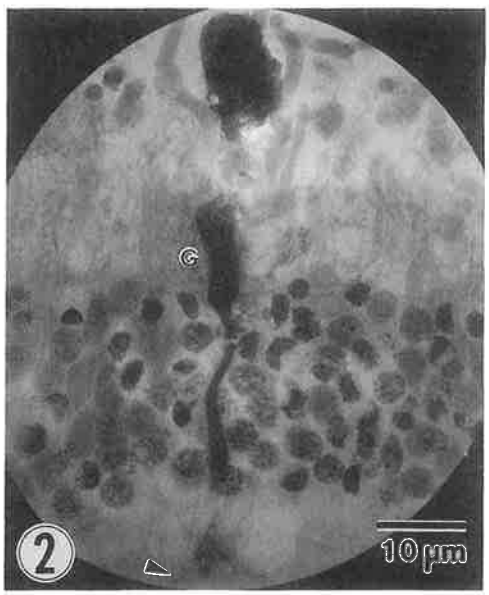


図2：図1で示した同一細胞の超高圧電子顕微鏡像
厚さ 7μm 切片上の 1000kV での観察。矢頭は錐体の軸索終末部より発生した telodendria を示す。G は標識錐体に接触した複合錐体の短錐体を示す。コイ科の硬骨魚類では複合錐体は長錐体と短錐体からなる。

3．糸球体における内皮細胞とメサンギウム細胞の接着様式

追手　巍，森岡哲夫（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。本年度も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，細胞間の種差をなくすため前年度とは異なり，同種ラット大動脈由来の培養血管内皮細胞を使用した。またメッシュ上での培養及び標本作製，観察時までの，培養細胞の変形を避けるため固定，包埋後に比較的厚い切片を作製し，検索した。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免疫組織化学的に検討した。

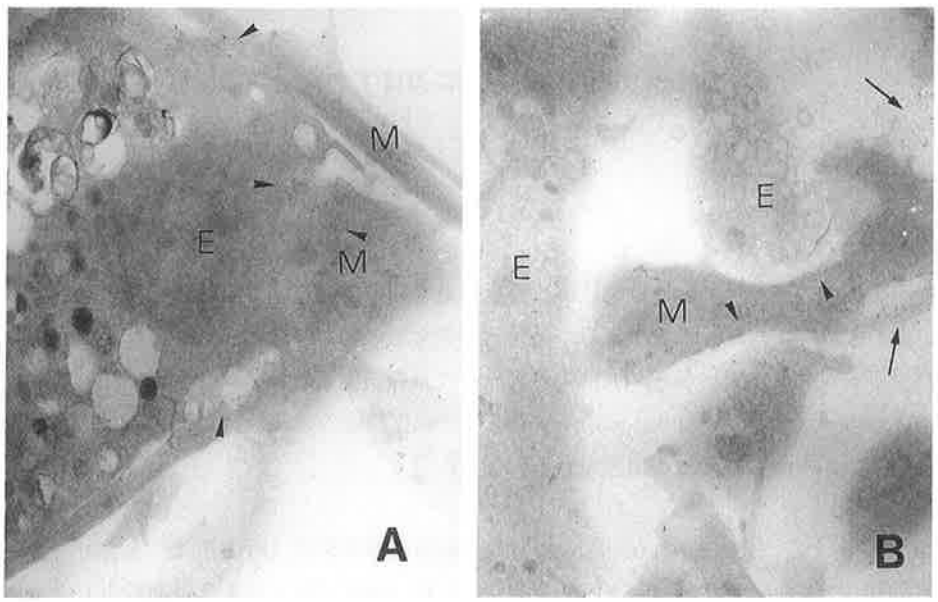


図1．血管内皮細胞と混合培養したラット・メサンギウム細胞の単クローン抗体との反応性．
E：内皮細胞，M：メサンギウム細胞．
A：金コロイド法によるラット・メサンギウム細胞と単クローン抗体，1-22-3 抗体との反応性。× 30,000
B：同法によるラット・メサンギウム細胞と単クローン抗体，OX-7 抗体との反応性。× 23,000

【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。ラット・血管内皮細胞の培養法：フィブロネクチンをコートした培養皿上に胸部大動脈を切り出し primary culture を行う。出現した内皮細胞を含むコロニーを集め，クローニングし，内皮細胞源とした。メサンギウム細胞，内皮細胞ともに継代５代までの細胞を実験に供した。免疫染色（金コロイド法）後，固定，エポン包埋し，1μm の切片を作製，超高圧電子顕微鏡で平面及び傾斜観察した。使用した抗血清は，ウサギ抗ー第８因子，上述の 1-22-3 マウス単クローン抗体および 1-22-3 抗体と関連した抗原 (Thy-1) を認識する市販の単クローン抗体，OX-7 である。

【結論および考察】

１）２種類の単クローン抗体，1-22-3 と OX-7 はメサンギウム細胞表面と反応するが，内皮細胞には特異性を認めない（図１，A, B)。２）1-22-3 抗体は主に両細胞の接着部位近辺に局在していた（図１ A, arrow head)。３）OX-7 抗体は両細胞の接触する部位だけでなく，他の細胞表面部位や，細胞外と思われる部位にも局在していた（図１ B, arrow head, arrow)。以上のことから，内皮細胞と接触するメサンギウム細胞表面に特異な抗原構造が存在する可能性が示唆された。また，このような細胞接着部位を検索するのに超高圧電子顕微鏡は大きな武器となることも再確認された。

４．血管内皮細胞の透過性に及ぼす血行力学の影響

吉田洋二，王　　速，舒　　強（山梨医大・第一病理）
有井達夫（生理研）

動脈内皮細胞の透過性の亢進は粥状硬化発生の最早期像と言われている。その透過性は様々な因子によってコントロールされているが，粥状硬化発生の局在性を考慮した時に，血行力学的因子の作用を重視せざるを得ない。血液中の大分子物質の内皮透過経路は受容体依存性，非依存性 vesicular pathway と paracellular pathway である。内皮細胞の透過性に及ぼす血行力学的因子の影響を明らかにするために，本研究を行った。

【材料と方法】

白色ウサギ（雄，体重 2.0-3.0kg）６羽の腹大動脈に60％狭窄（断面積比）を作り，２週後より，高脂肪食（1%cholesterol と 5%lard を含む RC-4）100g／羽／日を２週間投与した。飼育期間終了後，屠殺２時間前に 2%Evans' blue を 1ml/kg 静注し，緩衝液加中性フォルマリン水で灌流固定した。大動脈を摘出して，さらに SudanIV 染色を行い，狭窄部の脂質沈着，アルブミンの沈着を調べた。vesicular pathway を見るために，屠殺４分前に，HRP (TypeII, 100g/kg, pH7.2) を４羽に静注し，深麻酔下に 2.5% glutaraldehyde/0.1M phosphate buffer (pH7.4, PB) を

灌流固定した（灌流圧約 110 mmHg），腹大動脈の狭窄部を中心に 4cm の範囲にわたって摘出し，DAB で発色後，1%OsO_4 で後固定した。Epon812 に包埋した試料を 0.5, 1μm 厚に薄切り，ウラン・鉛染色を施し，H-1250M 型超高圧電子顕微鏡 (HITACHI) で観察した。

【結果】

正常対照群の腹大動脈内皮面に脂質沈着はなく，電顕的に内皮細胞内に HRP で標識された vesicle や内皮細胞間接合部は少なかった。

実験群腹大動脈の狭窄部位（高ずり応力領域）は Evans' blue で染まったが，SudanIV では染まらなかった。その部分の内皮細胞は細長く，細胞質内に細胞骨格は良く発達し，filament 状の stress fiber は細胞の基底側に細胞膜と平行に走っていた。HRP を含む vesicle の数は少なく，内皮細胞間接合部には tight junction が多く見られた。狭窄部位から約 2mm の遠位の拡張部位（低ずり応力領域）は Evans' blue 染色は陰性で，SudanIV 染色は強く染まった。その部位の内皮細胞には HRP 陽性の vesicle が増え，細胞質の内腔面から基底面まで分散していたが，vesicle の融合や channel の形成は明らかでなかった。細胞間接合部の tight junction は減少し，HRP の透過は亢進した。

【まとめ】

本研究によって，血流ずり応力により内皮細胞の透過性が変化することが明らかとなった。すなわち，高ずり応力領域では，vesicular transport が低下し，細胞間には tight junction が形成され，paracellular pathway も減弱する。一方，低ずり応力領域では，vesicular transport が亢進し，tight junction の形成は低下し，paracellular pathway は亢進した。内皮細胞の透過性に影響を及ぼす血流ずり応力の作用機序を明らかにすることは今後の問題である。

5．巨大単細胞体における配偶子形成の立体解析

石川依久子（東京学芸大・生物）

Valonia ventricosa は球状の多核緑藻で巨大な液胞をもち，原形質は薄層をなして細胞壁下にひろがっている。原形質層は一層に配置された無数の葉緑体と液胞側に均等分布した核で占められている。生殖にあたり，この原形質は約30時間の内に，同調的に無数の遊走細胞（配偶子または遊走子）に変化する。

この遊走細胞形成は，多核性の原形質が一つ一つの核を含む均等な領域に分割され，新たな鞭毛や眼点が形成され，動的な単細胞体へと変化する極めてダイナミックな過程である。

本研究では，*V. ventricosa* の遊走細胞形成過程を経時的に，かつ原形質全体の動態として捉えることを目的とし，超高圧電子顕微鏡 (H-1250M) を含む各種顕微鏡を用いて三次元的視点で観察を行なった。

遊走細胞形成は原形質層に小さな透明斑が現われることから始まり，約２日後から原形質全体に，一様な濃淡が現われる。この濃淡は原形質層の凝集によるもので，凝集が進むにつれて原形質層は網目状になり，網目は更に凝集を増し，細くなる。網目状斑紋の現われる時点ですべての核は同調的に核分裂を開始し，網目が十分細くなった18時間後には，すべての核が分裂を終了する。この核分裂は核膜内で進行し，中心体周辺で形成されて核内に侵入する微小管と核膜内で形成された微小管の両者によって娘核が分離されるものと観察された。

核分裂が終了すると，極域にあった中心体は凝集して原形質下に移動して鞭毛基部に変わるらしい。核と原形質塊表層との間に鞭毛基部が発達し，原形質塊の表層の随所に鞭毛が形成される。それぞれの鞭毛基部付近から，多数の微小管が放射状に広がり，鞭毛基部を頂端として原形質塊は多数の隆起を生じる。一方，このステージの原形質塊にはゴルジ体由来とみられる小胞が多数見られ，小胞の蓄積によって随所に陥入を生じ，陥入の進行にともなって原形質が分割されていくことが示唆された。鞭毛基部周辺に生じた放射状微小管は，鞭毛基部とその直下にある核，更にその後方に数個の葉緑体を一括し，遊走細胞へと形態変化する。

概して植物細胞は動物細胞に比して細胞内構造はきわめて複雑である。葉緑体をはじめとして液胞や多種顆粒が細胞の可視的観察を困難にさせる。本研究においても，超高圧電顕用の細胞厚切り切片がかならずしも有利な結果をもたらさなかった。今回は超薄連続切片の電顕像を補足して解析を行なったが，今後，植物細胞の観察のためには技術的な工夫と改善が必要であることを実感した。

6．*Haptoglossa heterospora* の gun cell の超高圧電顕的研究

犀川政稔（東京学芸大・生物）
有井達夫（生理研）

Haptoglossa 属は「舌で触れる」という意味をもった卵菌綱クサリフクロカビ目の菌類で，センチュウとワムシと，まれにクマムシにも寄生する。いままで，*H. heterospora* (Drechsler, 1940), *H. zoospora* (Davidson and Barron, 1973), *H. mirabilis* (Barron, 1980), *H. humicola* (Barron, 1981), *H. intermedia* (Barron, 1989) の５種が記載された。Drechsler (1940) は，先端の細い舌の形をした胞子がこれらの動物に触れることによって寄生すると考えたが，実際は，胞子は触れた瞬間感染体の sporidium を撃ち込むという。そのため彼は胞子を gun cell と呼んでいる。

Gun cell の微細構造は Robb and Barron (1982) と Robb and Lee (1986a, b) が報告した。彼らによると，ワムシ寄生種の *H. mirabilis* の gun cell では先端から基部に向かって太さ 0.2μm のチューブが伸びており，チューブの最先端部には「プラグ」が，そのすぐ後方には「弾丸」と呼ばれる構造が詰まっている。gun cell がワムシと接触すると，まずプラグがはずれ，続いて弾丸

がとび出すしくみである。そのときチューブは内外が反転し，細胞基部にある核とそのまわりの細胞質とがsporidiumとなって，弾丸に続いてとび出すのである。しかし彼らの超薄切片像を見ると，ワムシ体内には，撃ち込まれたsporidiumが見られるものの弾丸やチューブは見あたらない。

本研究ではセンチュウ寄生種である*H. heterospora*を用い，感染初期の様子を調査した。センチュウ寄生種の場合にはgun cellから撃ち出されたsporidiumは2層のクチクラの中間にとどまることが知られている(Drechsler, 1940; Davidson and Barron, 1973)。そこでセンチュウを厚さ約0.3μmの切片として超高圧電顕観察した(Figs. 1, 2)。その結果，クチクラ間のsporidiumのまわりには無数の，直径3-7 nmほどの微粒子が充満していることがわかった（Fig. 2，＊印)。しかし，チューブの痕跡のような構造は確認されたが（Fig. 1，矢印）sporidiumと同数撃ち込まれているはずの「弾丸」はまったく存在しなかった。このことから*H. heterospora*の弾丸は，solidなものではなく，「撃ち込まれた？」直後2層のクチクラ間に，おもに微粒子となって分散したものと思われる。チューブもきわめて速やかに分解するものと思われる。

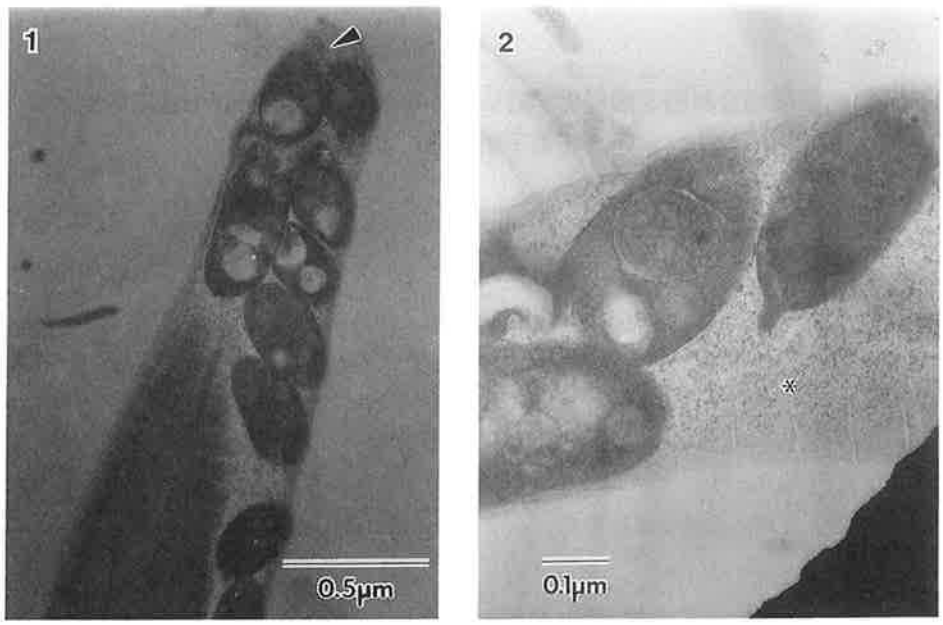


Fig. 1. Sporidia of *Haptoglossa heterospora* in the space between outer and inner layers of nematode cuticle. Arrowhead shows a degrading injection tube.

Fig. 2. Sporidia of *Haptoglossa heterospora* in a granular matrix (*) of the space between two layers of nematode cuticle.

References

Barron, G. L. 1980. A new *Haptoglossa* attacking rotifers by rapid injection of an infective sporidium. Mycologia 72: 1186-1194.

Barron, G. L. 1981. Two new fungal parasites of bdelloid rotifers. Can. J. Bot. 59: 1449-1455.

Barron, G. L. 1989. Host range studies for *Haptoglossa* and a new species, *Haptoglossa intermedia*. Can. J. Bot. 67: 1645-1648.

Davidson, J. G. N. and Barron, G. L. 1973. Nematophagous fungi: *Haptoglossa*. Can. J. Bot. 51: 1317-1323.

Drechsler, C. 1940. Three fungi destructive to free-living terricolous nematodes. J. Wash. Acad. Sci. 30: 240-254.

Robb, J. and Barron, G. L. 1982. Nature's ballistic missile. Science 218: 1221-1222.

Robb, J. and Lee, B. 1986a. Developmental sequence of the attack apparatus of *Haptoglossa mirabilis*. Protoplasma 135: 102-111.

Robb, J. and Lee, B. 1986b. Ultrastructure of mature and fired gun cells of *Haptoglossa mirabilis*. Can. J. Bot. 64: 1935-1947.

7．培養細胞全載固定組織化学的染色標本及び無固定新鮮培養細胞標本の超高圧電子顕微鏡による観察

永田哲士，臼田信光（信州大・医）
有井達夫（生理研）

細胞を電顕メッシュの上に培養し，固定，組織化学的反応，臨界点乾燥して，培養細胞全載標本を作製し，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，培養肝細胞の Catalase, AcPase, G-6-Pase 反応による飲作用小胞[1)]，ペルオキシゾーム[2)3)]，ゴルジ装置[4)]，水解小体[5)]，小胞体[6)]等について報告した。今回は RI 標識した培養細胞全載標本を radioautography した結果について述べる。

【材料及び方法】

成熟雄 Sprague-Dawley ラットの肝臓をコラーゲナーゼ灌流法で分離し，電顕メッシュに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，Leibowitz L-15 培養液に分散して，初代培養を行って得られた培養肝細胞を用いた。細胞培養48時間後に，培養液を交換し，0.5mM bezafibrate を加え，さらに24時間培養して，^{14}C-bezafibrate (Boehringer Mannheim, Germany, 2.83MBq/ng) を 3.7MBq/ml 含有する培養液で10分―1時間培養したのち，緩衝 2% paraformaldehyde (pH 7.2) で前固定，DAB 反応を行い，1％四酸化オスミウムで

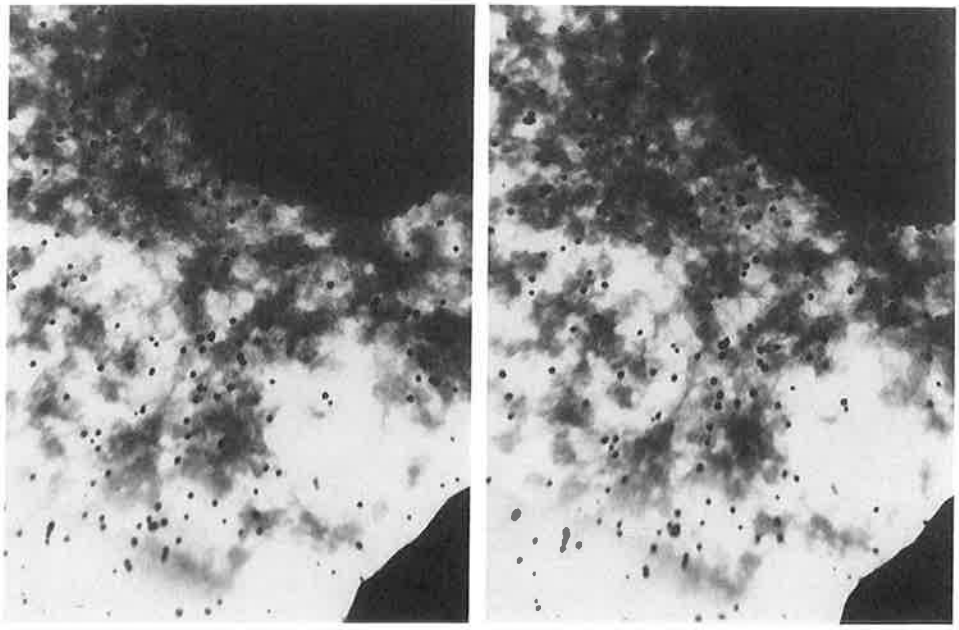


図１．ラット肝細胞培養全載標本。bezafibrate 添加培養24時間の後，^{14}C-bezafibrate で10分間標識，緩衝 2% paraformaldehyde 前固定，DAB 反応を行い，１％四酸化オスミウムで後固定，臨界点乾燥，radioautography を行った後，日立 H-1250M 型電子顕微鏡（生理研，1000kV）で観察し，立体写真撮影，ステレオペアを作製した。× 2,800

１時間後固定，臨界点乾燥，Konica NR-H2 を wire-loop 法により湿性適用して，露出，現像，定着，電子染色の後，日立 H-1250M 型電子顕微鏡（生理研，1000kV）で観察し，立体写真撮影，ステレオペアを作製した。対照としては，bezafibrate を加えないで培養した細胞に ^{14}C-bezafibrate で標識し，以後上記と同様に radioautography を行った。

【結果及び考察】

超高圧電顕により全載標本を観察すると，bezafibrate 添加群では円形の DAB 陽性顆粒が多数認められ，ペルオキシゾームに相当すると考えられ，その周辺の細胞質基質及び小胞体に高電子密度の銀粒子が観察された。銀粒子の局在は，核にはなく，細胞質ではペルオキシゾームの上には少なく，細胞質基質及び小胞体に多く認められた。細胞質における銀粒子数は標識10分では少なく（図１），60分で増加した（図２）。ステレオペアで立対視すると，銀粒子が細胞体の表面で，小胞体の上に局在している様子が，観察された。一方，対照群ではペルオキシゾームが少なく，銀粒子もわずかであった。これらの結果は，ペルオキシゾーム増殖剤による，ペルオキシゾームの増殖が，小胞体と関係していることを示唆している。

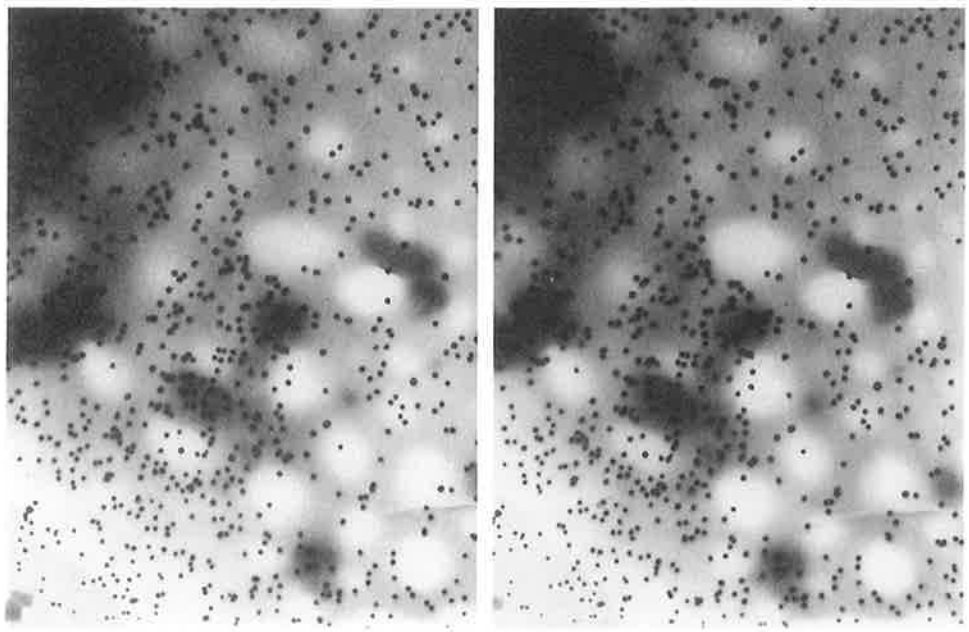


図２．ラット肝細胞培養全載標本。bezafibrate 添加培養24時間の後，^{14}C-bezafibrate で60分間標識，緩衝 2% paraformaldehyde 前固定，DAB 反応を行い，１％四酸化オスミウムで後固定，臨界点乾燥，radioautography を行った後，日立 H-1250M 型電子顕微鏡（生理研，1000kV）で観察し，立体写真撮影，ステレオペアを作製した。× 3,700

【結論】

培養細胞全載標本に radioautography を行い，超高圧電子顕微鏡で観察して，細胞小器官と銀粒子を立体視することができ，銀粒子と細胞との三次元的位置関係を明らかにすることが可能であった。

【文献】

1）Nagata, T. et al.: Proc. XIth Internat. Cong. Electron Microsc. 2: 1183-1184, 1986.

2）Nagata, T. et al.: J. Clin. Electron Microsc. 20: 681-682, 1987.

3）永田哲士他：生理研年報 9: 473-474, 1988.

4）Nagata, T. et al.: Proc. XIIth Internat. Cong. Electron Microsc. 2: 184-185, 1990.

5）永田哲士他：生理研年報 13: 283-285, 1992.

6）永田哲士他：生理研年報 14: 286-288, 1993.

8．植物培養細胞中のアクチン線維の超高圧電顕ステレオ観察

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）

植物培養細胞のプロトプラストにパルス電場を与えると細胞融合が誘起される。この細胞融合過程や細胞運動にアクチンフィラメントが関与していることを前回報告した(1)。今回は，ダイズ(Glycine max L. Merr)の培養細胞からプロトプラストを調製しグルタールアルデヒドで固定した切片試料(0.1-1μm)を用いて超高圧電子顕微鏡によるステレオ観察を行なった。これと平行して生きたまま，或いは固定した切片試料を用いてX線顕微鏡によるその場観察を行い電顕像とX線像を比較検討した（2－4）。

（A）超高圧電子顕微鏡観察は固定し切片試料を用いて1MeVの超高圧電子顕微鏡(H-1250M)に回転ステージを取り付けて，直接倍率250倍から10万倍でステレオ観察した。融合直後のプロトプラストを傾斜角度は±8°または±16°でステレオ電顕像として撮影した。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。アクチンと類似の線維が顆粒の回りを取り囲んで3次元的にネット状に局在しているのが立体観察された。

（B）X線顕微鏡観察—分子研のUVSORビームライン8Aにゾーンプレートで集光しMCP-SITカメラで受光する結像型X線顕微鏡を設置し，波長4.6nm, 5.6nmで結像させた。波長分解能は$\lambda / \Delta\lambda = 100$で水を含み生きているプロトプラストを像倍率176で捕らえることが出来た。

（C）超高圧電子顕微鏡とX線顕微鏡像の比較—細胞融合過程におけるプロトプラストをグルタールアルデヒドで固定しウラン染色した切片試料を比較観察した。葉緑体中に際だって強く染色されている澱粉粒を両透過像とも良く観察できた。また水銀染色もかなり有効でプロトプラスト内の細胞核や核中の仁をはっきり捉える事が出来，これは厚切片試料を用いた超高圧電子顕微鏡による立体観察に適していると思われる。

【文献】

(1) 谷口美恵子，谷口　武，有井達夫：生理研年報 14: 304-306, 1993.

(2) M. Taniguchi, I. Yoda, A. Muramatu, H. Aragane, T. Taniguchi, T. Arii, N. Watanabe, S. Aoki, H. Kihara: Comparative studies on cultured plant protoplasts using X-ray and high voltage electron microscope. Int. Conf. on X-ray Microscopy (Moscow, September. 1993).

(3) 谷口美恵子，依田　功，村松　聡，荒金宏臣，谷口　武，有井達夫，渡辺紀夫，青木貞夫，木原　裕：植物培養細胞の超高圧電子顕微鏡及びX線顕微鏡による観察．第31回生物物理学会報告

(4) 谷口美恵子，渡辺紀夫，青木貞夫，木原　裕，Salak Phansiri，谷口　武，有井達夫：植物培養細胞のX線顕微鏡及び超高圧電子顕微鏡による比較観察．文部省科学研究　重点領域

9．胃壁細胞の tobulo-vesicular system の立体構造とその変化

野田　亨（京大・医・解剖第二）

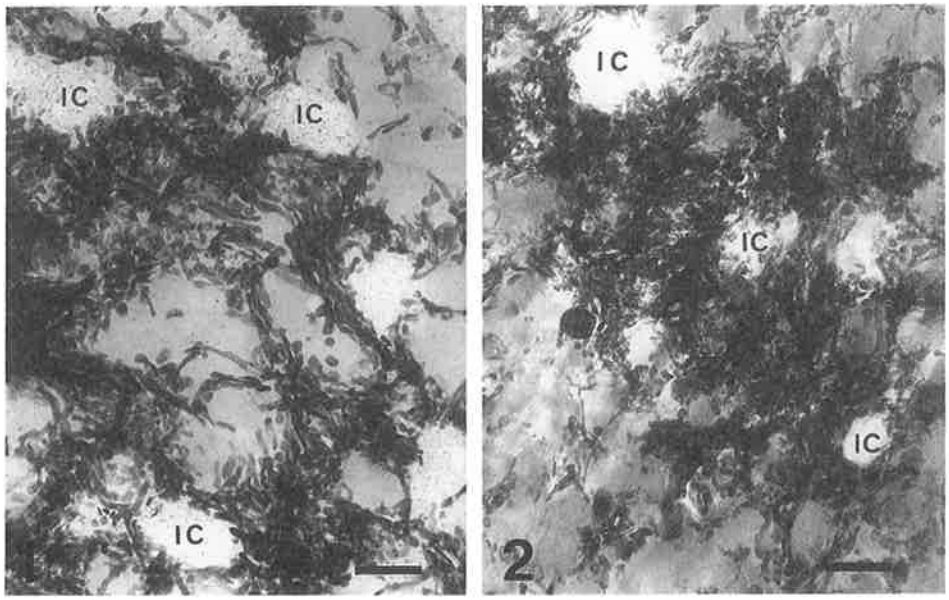
ラット胃壁細胞の細胞質には tubulo-vesicular system と呼ばれる小胞―小管状構造が存在し，胃酸分泌刺激によって，一般の分泌細胞の頂上膜に相当する細胞内分泌細管を形成する膜との間の構造的移行が示唆されているが，形態的に不明な点も少なくない。今回，我々は，ラット胃壁細胞の tubulo-vesicular system の形状を解明する目的で細胞化学的に可視化した同構造の立体観察を試みた。さらにアドリアマイシン (1mg/100g) を投与したラットの胃壁細胞における tubulo-vesicular system の形態変化も観察した。

正常およびアドリアマイシン (1mg/100g) を腹腔投与したラットを投与後24時間に胃を固定し，ヨウ化亜鉛オスミウム液に組織片を一晩，浸漬して後固定と染色を同時に行なった。酢酸ウランでブロック染色を行った後，脱水，包埋し，この試料の 1μm の厚切り切片を作製し，超高圧電顕 (H-1250M) で観察した。併せて，通常の電顕を用いた超薄切片による観察も行った。

ヨウ化亜鉛オスミウム (ZIO) 染色により，正常壁細胞の細胞質には多数の径 100nm 前後の高電子密度の小管構造が観察され，これらの構造は所謂，tubulo-vesicular system を成すものと考えられた。多くの小管構造に観察される高電子密度反応産物の沈着は小管全体を描出しているが，その断面を示す部分では，反応産物は必ずしも内腔には見られず，小管を形成する膜のみに観察されることから，切片の透過像では内部が高電子密度に観察される小管も，少なくともその一部は，実際には，単に小管の膜のみに反応産物が存在していると考えられた。一方，細胞内分泌細管内腔に存在する微絨毛には反応産物の沈着は観察されず，tubulo-vesicle と形質膜の形態的連続性は観察されなかった。

1μm 厚切片では所謂，tubulo-vesicle は小胞の集合というよりはむしろ，かなり長く延びた小管状の束として細胞内分泌細管の周囲の細胞質に集中し，それを取り巻くように走行していた（図－1）。

アドリアマイシン (1mg/100g) を腹腔投与したラットの胃壁細胞では ZIO 染色で高電子密度に観察された tubulo-vesicle は正常ラットのそれより小管の長さが短くなり，多数の様々なサイズの小胞が細胞内分泌細管の周囲の細胞質に密集しており，この傾向が HVEM によって，より顕著に観察された（図－2）。



図－１：ZIO 染色を行った正常ラットの胃壁細胞。
所謂，tubulo-vesicular system と思われる高電子密度に染色された小管の束が細胞内分泌細管 (IC) 周囲の細胞質に観察される。Bar ＝ 1μm

図－２：ZIO 染色を行ったアドリアマイシン投与後24時間のラット胃壁細胞。
正常細胞で観察された小管より，やや短縮したものや様々なサイズの小胞が細胞内分泌細管 (IC) 周囲の細胞質に集中している。Bar ＝ 1μm

10. 分泌腺及び肝細胞の細胞骨格系と酸性化小器官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）

酸性化細胞内小器官に集積する DAMP （DNP を弱塩基化したもの）を用いたペルオキシダーゼ免疫電子顕微鏡法を施した外分泌腺細胞，および肝細胞の厚い切片を超高圧電子顕微鏡で立体的に観察し，分泌における H^+ と細胞骨格の関与について検討した。

【方法】

後部絹糸腺，ブタ膵外分泌腺や肝に DAMP を取り込ませた後，その一部の試料に H^+ 勾配を

軽減させると言われているモネンシンを投与し，軽く前固定を行った後，抗 DNP モノクローナル抗体（マウス IgE）を作用させ，その後 HRP 標識抗 IgE 抗体（ヤギ IgG）を反応させた。DAB 反応を行った後，オスミウム酸で後固定を施し，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 1-3μm 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。

【結果と考察】

後部絹糸腺細胞の基底側細胞質の厚切り切片の立体観察では，基底側より腺腔側に向かう幾条もの微小管によるフィブロイン分泌顆粒の細胞内輸送系（放射状微小管系）が核周辺部に観察される。この細胞骨格系は微小管とそれと接する形で存在する分泌顆粒とミトコンドリアから構成されるが，特にこの分泌果粒に HRP の反応産物を認めた。（図 1）従って後部絹糸腺細胞の分泌顆粒は顆粒内が高い形で H^+濃度勾配を有していると考えられる。またモネンシンを作用させた絹糸腺細胞では，このような分泌顆粒の反応産物は認められなかった。（電顕写真省略）モネンシン投与の後部絹糸腺細胞では分泌顆粒の細胞内輸送は阻止されることがラヂオオートグラフィーを用いた実験より明らかにされているので，モネンシンが減少させると考えられる分泌顆粒の H^+勾配が微小管に沿っての分泌顆粒の細胞内輸送に関与する事が示唆された。他の外分泌腺細胞における本超高圧電顕法による立体観察は現在なお続行中である。

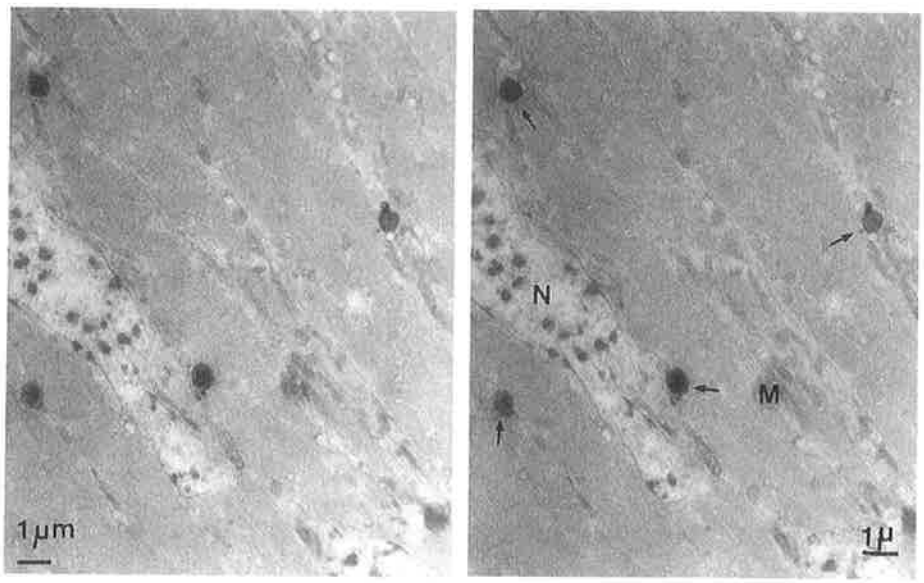


図 1：正常後部絹糸腺細胞。× 3,900
N，核　M，ミトコンドリア　矢印，HRP 反応産物陽性のフィブロイン分泌顆粒

11. 培養グリオーマ細胞の細胞骨格に及ぼす各種成長因子サイトカインの影響に関する免疫電顕立体観察（継続）

峠本勝司（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】

TGF-β, IL-1, Tumor Necrosing Factor (TNF) が，培養グリオーマ細胞の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】

前年度と同様の条件で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 TGF-β （Oncogene 社）を 1μg/ml, 10μg/ml の濃度で24，48時間作用 IL-1 (CBC), Tumor Necrosing Factor α (TNF-α) (HBL) を 1ng/ml, 10ng/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 TGF-β receptor，抗 TNFmonoclonal antibody を，他は培養細胞を Triton-X 処理後中間系フィラメントの内 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】

共に無血清培地で突起を長く延ばした U-251, U-87MG 細胞に TGF-β （Oncogene 社）を 1μg/ml, 10μg/ml の濃度で24時間作用させると共に増殖能が高まり，10μg/ml の濃度ではコロニー状に細胞が集まる傾向が認められた（S 期細胞の増加を flowcytometer で確認）。核は heterochromatin に富み，細胞質には dense core vesicle が多数認められた。細胞増加後に IL-1 を添加した培地での観察では（～48時間）明らかな形態変化が認められなかったが，GFAP フィラメントは bundle 形成がやや少ない傾向を認めた。一方 TNF-α 1ng/ml の添加により24時間で発育抑制が認められ特に 10ng/ml の濃度で24時間培養では細胞壊死が認められた。細胞膜の破壊と細胞凝集が散見され，Ruffle は殆ど認めなかった。この時点の細胞骨格は GFAP, Vimentin 共に中間系フィラメントの量は少なく走行はばらばらで正常で見られる bundle の形成も殆ど認めなかった (Fig. 1)。抗 TNFmonoclonal antibody を用いた免疫電顕では金コロイドは細胞膜表面に cluster 状に認める傾向が認められた (Fig. 2)。細胞発育抑制に働くと考えられる factor のうち特に TNF は作用が強く Cytocidal に作用すると考えられる。細胞表面の receptor は diffuse でなく cluster 状に分布する傾向があるように思われたがさらに時間的経過をおって発現の増減についても検討を要すると思われた。

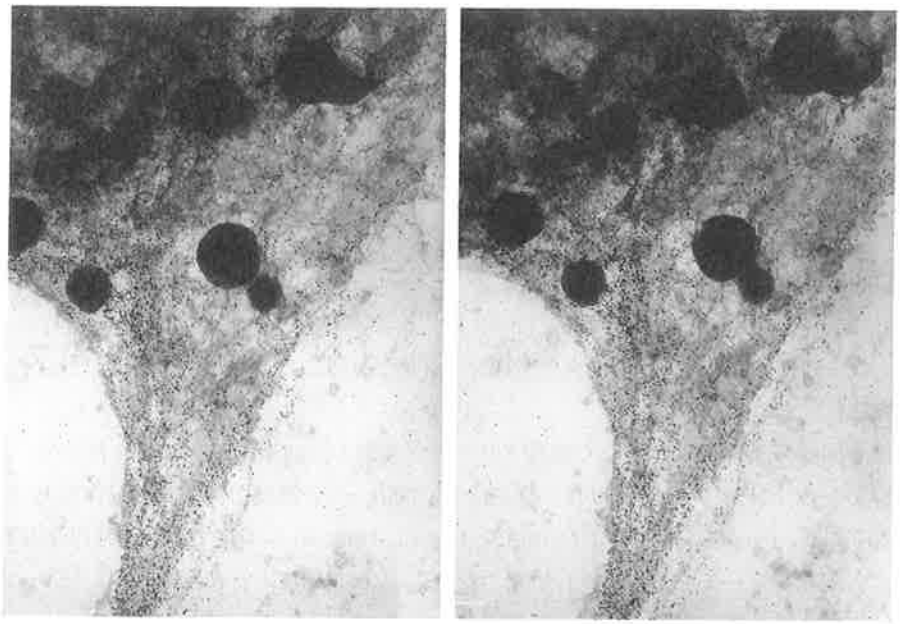


Figure 1 (× 20,000)
Stereo-pair of high voltage electronmicrograph of U-251 MG cell treated with TNF. Intermediate filaments of GFAP labeled with gold colloid particles are irregularly arranged in the cytoplasm.

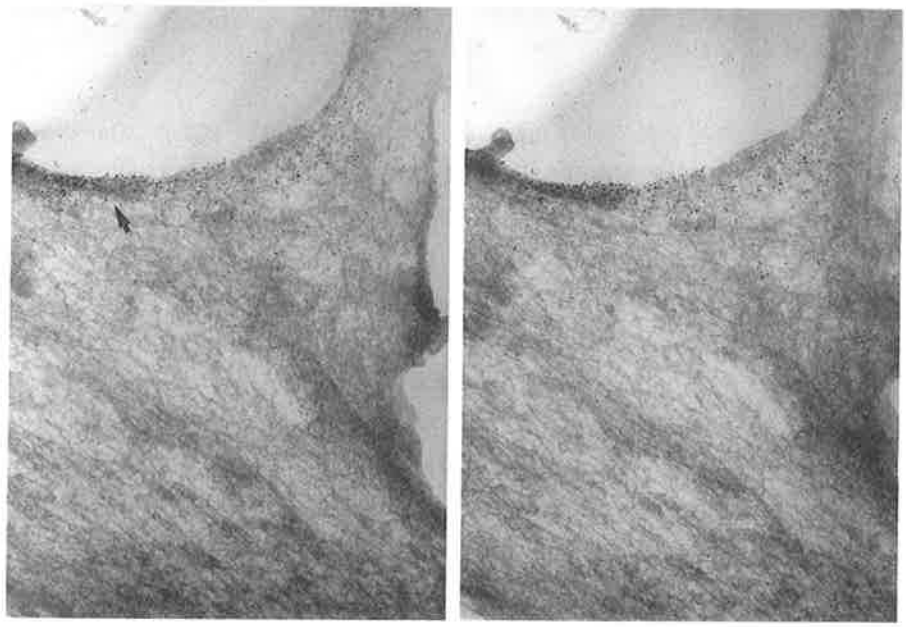


Figure 2 (× 19,000)
Stereo-pair of high voltage electronmicrograph of U-251 MG cell treated with TNF. TNF receptors, labeled with gold particles, seem to form cluster-like arrangement on the cell surface (Arrow).

12. 肝細胞ネマトライソゾームの形態と機能に関する研究

荒木伸一，高島庸一郎（愛媛大・医・解剖第一）
有井達夫（生理研）

肝細胞のライソゾームには，毛細胆管周辺の球状ライソゾームと類洞側細胞膜直下から毛細胆管周辺に向かって伸びる細長形のライソゾーム（ネマトライソゾーム）が存在することが超高圧電顕の観察で明らかとなった。そこで，これら二種のライソゾームの性質および機能が異なるのかどうかを明らかにする目的で，超高圧電顕によるライソゾームの形状，大きさの測定に基づき超薄切片上の酸性ホスファターゼ(ACPase)陽性区画を画像解析によって球状ライソゾームとネマトライソゾームに分別し，これら2種のライソゾームに含まれるカテプシンDの量を免疫細胞化学的に比較した。

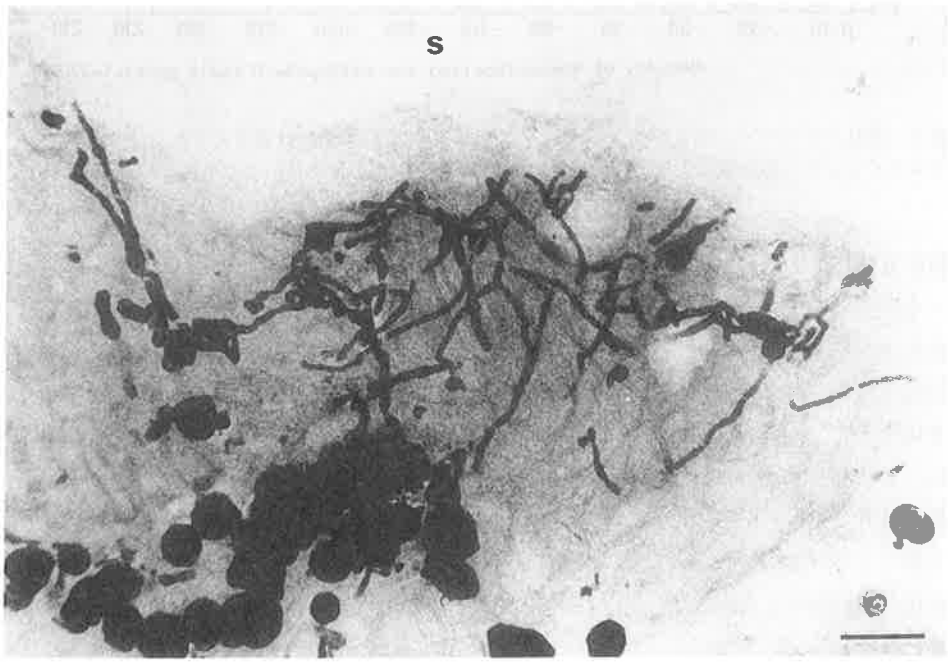


写真1．ラット肝細胞のライソゾーム形状と分布。
ACPaseを検出した肝組織を4μm厚の樹脂切片とし，超高圧電顕で観察した。直径0.4-1.0μmの球状ライソゾームは，毛細胆管周辺に限局し，直径70-100nmのネマトライソゾームは，類洞側細胞膜直下から毛細胆管周辺へ伸びる。S：類洞　スケールは1μm

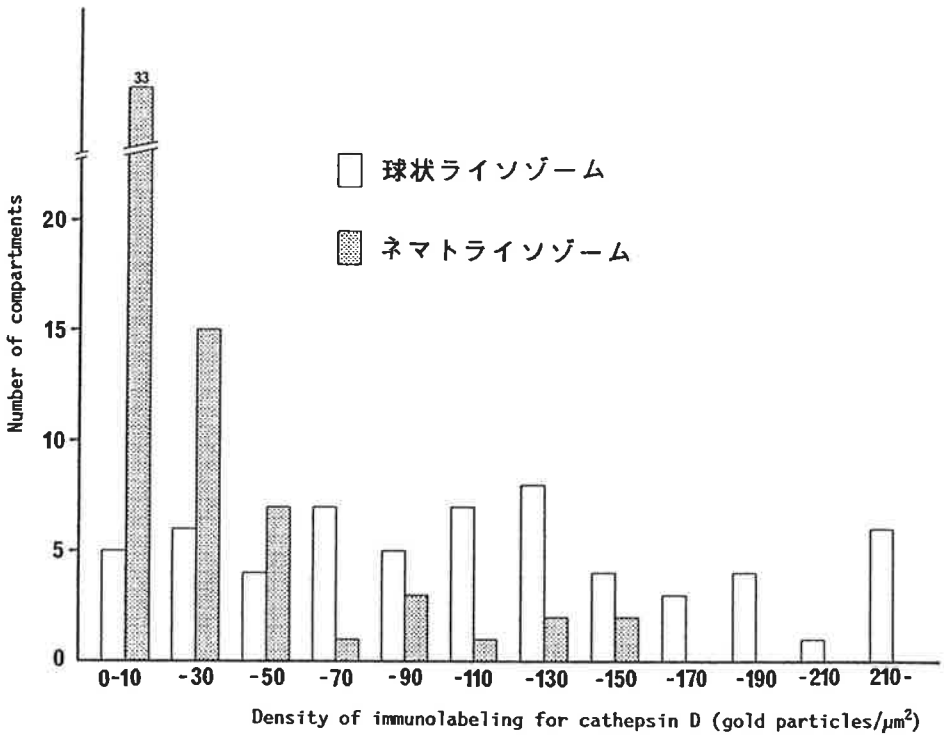


図1．球状ライソゾームおよびネマトライソゾーム内のカテプシンD量を示すヒストグラム。ネマトライソゾームの半数以上は，ごく少量のカテプシンDしか含まないことが判る。

【材料と方法】

ラット肝を2%PFA＋0.1%GLAで灌流固定，ACPase活性をセリウム法ないし鉛法で酵素組織細胞化学的に検出し，これをSpurr樹脂及びLR White樹脂に包埋した。4μm厚Spurr樹脂切片は超高圧電顕で観察し，ライソゾームの大きさ，形状を測定した。LR Whiteに包埋した試料は超薄切片とし，post-embedding immunogold法でカテプシンDを免疫電顕的に観察，撮影した。さらに，この電顕写真上でACPase陽性の区画を画像解析し，形状指数(SI)＝（最大長）$^2\pi/4$×面積により，SI≦1.5を球状ライソゾーム，SI≧2.5をネマトライソゾームとした。形状指数により分類したライソゾーム群において単位面積当たりのカテプシンD量（金コロイド粒子数）を定量化し統計学的に比較した。

【結果と考察】

超高圧電顕による観察から，球状ライソゾームは径0.4-1.0μmの範囲にあり，ネマトライソゾームは径70-100nm，長さ数μmであることがわかる（写真1）。これら2種のライソゾームはともにACPase活性を示しているが，カテプシンDの局在を免疫電顕により観察すると，ネマトライソゾーム内のカテプシンDは，球状ライソゾームに比べ少ないようであった。画像解析に

よるライソゾームの分類とカテプシンDの定量の結果，ネマトライソゾームのカテプシンDは，球状ライソゾームの約1/4であることが判った（図1）。このことは，ネマトライソゾームと球状ライソゾームの機能状態が異なっていることを示しており，ネマトライソゾームは，むしろ後期エンドソームに近い性質を持っているのではないかと推察される。しかし，ネマトライソゾームと後期エンドソームが全く同一か否かは結論が得られておらず，また，ネマトライソゾームの一部には多量のカテプシンDを有しているものもあり，これが別種のものかどうかも今後さらに検討を要する問題である。現在，アシアロ糖蛋白受容体やトランスフェリン受容体の抗体を用いてこれらの問題について解析を進めている。

13. 中枢神経系ニューロン・グリアの三次元構造解析

小坂俊夫，樋田一徳，藤丸靖明，任　嘉謙（九州大・医・解剖）
藤瀬　昇（熊本大・医・解剖）
有井達夫（生理研）

中枢神経系を構成するニューロンおよびグリア細胞の三次元構造を解析するためGolgi鍍銀標本および免疫染色標本を超高圧電子顕微鏡で立体観察した。Golgi鍍銀標本は従来のrapid Golgi methodで染色し，エポン包埋したブロックから厚さ100μmの切片を加熱しながらスライディングミクロトームにて作成した。これらの100μm厚の切片を再包埋し更にダイヤモンドナイフで5μm厚切片を作成した。本年度は嗅球，大脳辺縁系(hippocampus, subicular complex, entorhinal cortex)のニューロンの観察を進めた。特に，光学顕微鏡の解像力では解析不可能な複雑さを示すCA3 pyramidal cellおよびhilar mossy cell樹状突起のmossy terminalsシナプス標的部の観察を進め，超高圧電子顕微鏡以外の方法では得ることができない三次元構造の詳細が明かにできつつある。

一方，免疫染色標本は通常のpre-embedding-ABC法にて作成したが，HRP基質DABにニッケル，コバルトを加えて反応させコントラストを増加させた。Golgi鍍銀標本と同様に3-5μm厚切片を作成し1000kVで観察したが，現在までのところこのような免疫染色標本でもGolgi鍍銀標本に比較してはるかにコントラストが低く，解析に用いることができるほどの良好な像はまだ得られていない。最終的な像質を改善するためには免疫染色標本作成について更に検討する必要がある。

14. 聴覚閾値の変化過程における蝸牛有毛細胞の構造的変化

野田坂佳仲（北海道大・歯・中研）
鎌田　勉，亀田和夫（北海道大・歯・生理）
米澤　敏，東海林隆次郎（愛知県コロニー発達障害研究所）
丹治　順（生理研）

実験は計画当初スナネズミを使用するとしていたが，マウスを使用した。突然変異マウスの中に聴器に広範な異常を生ずるものがあり，それを正常マウスと比較して，出生後の聴覚閾値の変化に伴う有毛細胞の形態を電子顕微鏡観察した。すなわち東海林らが発見したBusマウスは多動を特徴とする行動異常を有し，さらに米澤らが形態学的に検討した結果，蝸牛コルチ器に異常があることが明らかになった。この異常は生後10日前後より顕著となり，それ以前は形態学的には正常にみえる。鎌田らがABRの記録により，聴覚系の機能的な検討を行ったところ，正常マウス（KYF系）および聴器が光顕では正常とおもわれるBusヘテロマウスでは生後9ないし10日目よりABR反応が見られるのに対し，Busホモマウスでは生後0日より20日ないしそれ以降に至ってもABR反応は見られず，聾のままであることが推測された。

そこで，上記3系のマウスの蝸牛有毛細胞を生後0，10，15日令について電子顕微鏡によって観察した。生後各令マウスを屠殺後，蝸牛部分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）により通法に従って固定し，必要な場合には0.5M EDTAにて脱灰して，包埋し，切片を作成して，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。

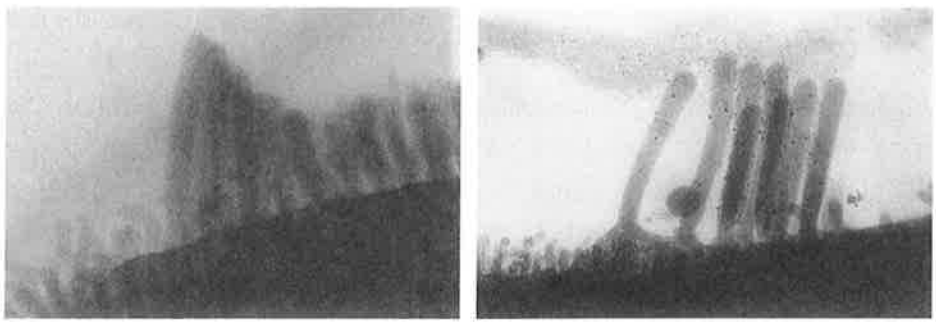


図1．マウスの蝸牛外有毛細胞聴毛　左：正常マウス（KYF系）生後0日目。右：Busホモマウス生後10日目。正常に比べて聴毛の数も少なく，配列も乱れていることが見られる。倍率は13,000培

その結果，正常およびBusヘテロでは各令とも内・外有毛細胞が観察された。しかしBusホモでは生後0日では正常と同じであるが，生後10日以降では有毛細胞の聴毛はその数が減少し，配列も乱れていた。コルチ器全体にわたる聴毛の配列異常についてはさらに走査型電顕により観察中であるが，有毛細胞の細胞体の微細構造の異常の有無については透過性電顕にて精査している。成体では昨年報告したBusホモにおいて外有毛細胞の聴毛が欠落し，内有毛細胞では残存する例もあるが，さらに検討すると，その残存の程度にはいろいろなものがあることがわかった。この点をさらに検討している。図1に正常（KYF系）マウス生後0日目およびBusホモマウス生後10日目の外有毛細胞聴毛を示す。

15. YAG-TV撮像系における電子強度測定精度に関する研究

一海孝光（愛知県立芸大）
神谷芳弘（豊田工大）

超高圧電子顕微鏡を用いてタンパク質アクチンの結晶の回折像を写真撮影するとともに，YAG-TV撮像系によって観察した。アクチンは兎の骨格筋から抽出した。超高圧電子顕微鏡は電子線の透過力が強く厚みのあるアクチン結晶[1,2]の観測に適していると考えられる。従来G－アクチン溶液中にはフィラメントはなく，モノマー状態のアクチンサブユニットのみが存在すると考えられていた[3]。従ってG－アクチン溶液を超遠心して得られる沈殿物は変性して重合できなくなったアクチンが会合したものであるとして捨てられて来た。しかし詳しく調べてみるとこのアクチンは立派に重合する。そして結晶を作り易い性質を持っている。フィラメントの配向方向を整えることにより，はっきりとした回折像が得られると予測される。現在規則性のある回折スポットが得られるようサンプルの調製を進めている。

アクチンフィラメントは構造変化を起こし易く，それとともに結晶構造も変化する。そのため短時間に回折像を記録する必要がある。感度の高い撮像系を使うことによりこのことは可能になる。

REFERENCES

1．Taniguchi, M. and Kamiya, Y. (1993) Nuclear Instruments and Methods 208, 541-544
2．一海孝光，近藤博司 (1993) 生物物理　第31回年会予講集 2H1100
3．Ikkai, T. and Kondo, H. (1993) 11th International Biophysics Congress, Hungary, Absracts B1.9

16. 海産魚網膜視細胞の神経結合

桜井泰憲，平野　穣（北大・水産・北洋研）

海産魚は表層から1,000mの深海までに生息し，その視覚系は異なる光環境に適応して様々に分化している。また，成長に伴う光環境の変化に応じて特定の錐体視細胞が消滅するなど，興味ある事実がこれまで数多く報告されてきた。本研究は光環境と色覚神経系の関連を明らかにするため，海産魚網膜の錐体の分化を免疫組織化学的に解析した。

表層魚としては沿岸岩礁域に棲むアイナメ，外洋の表層を回遊するマイワシ，サンマ，マサバ，さらに中層魚として100m以深に棲むタイ，タラの6種類の硬骨魚を採集した。これらの魚類の錐体の種類と分布を識別するため，Johnson (1994) らによって解読されたキンギョ網膜の錐体オプシンの一部を抗原とし，マウス及びウサギに免疫して得た抗体を用いた。

硬骨魚の錐体の配列はAli (1976) により，単一錐体と複合錐体が列状に並ぶ列型 (row type) と複合錐体が格子状の配列を示す格子型 (square type) の2種類に大別されている。今回，調べた魚では表層，中層に関わりなくこの両者の配列が見られた。すなわち，マイワシとタイの錐体は列型配列，アイナメ，サンマ，マサバ，タラの錐体は格子型配列を示した。一方，錐体の種類に関しては，表層魚と中層魚とで大きな違いが見られた。アイナメ，サンマ，マサバなどの表層魚には3種の錐体があった。複合錐体は赤及び緑錐体からなり，単一錐体は青錐体であった。中層魚のタイとタラには2種類の錐体のみが認められた。複合錐体は相同の錐体から成るいわゆる双子錐体 (twin cone) を呈しており，その両者とも緑錐体であった。単一錐体は表層魚と同様に青錐体であった。

これらの結果から，表層魚は赤，緑，青の3種類の錐体を有して3色の識別が可能であると考えられ，中層魚では赤錐体が欠如しているため，緑青光の識別のみが可能であると結論された。海中のスペクトル分布は，水が長波長光を吸収するため深さによって大きく異なる。海中100mのスペクトルは400から550nmの範囲の青緑光に限られている。この深さに生息する魚類に赤錐体が欠如している今回の結果は光環境との密接な関連を示していた。

海中ではさらに光エネルギーが大きく減衰する。例えば450nmの単色光は100mの海中で海面の$1/10^8$となる。そこで中層魚では錐体の感度を上げるため，杵体で既に報告されている視細胞間結合の存在が予想されるが，今回の解析ではこれを支持する所見は得られなかった。今後は本研究成果をさらに発展させこの構造を明らかにしたい。

【 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．随意運動に関する脳磁場計測（柴崎　浩他）　…… 344
2．ヒト頭頂葉における視空間認知構成機能の MEG による非侵襲的計測
（村上新治他）　…… 345

1．随意運動に関する脳磁場計測

柴崎　浩，長峯　隆，池田昭夫（京大・医・脳病態生理）
佐々木和夫，南部　篤，松崎竜一
Riitta Salmelin, Matti Kajola, Riitta Hari
(Helsinki University of Technology, Low Temperature Laboratory)

随意運動の発動に関する脳皮質のより詳細な空間的時間的情報を非侵襲的に得るために，脳磁図記録による検討を加えた。

手指の急速な伸展運動を５－10秒間に１回の自分のペースで行なわせ，筋電図をトリガーとして脳磁場及び脳電場を逆向性に同時加算平均して記録した。これまでに我々は当施設で直径12cmの範囲を蔽う37channel磁束計を用いて，頭部全体を蔽う為に時間間隔を設けて４カ所よりの記録採取を行なってきたが，試行毎に変化の大きい徐波成分を主として扱っている為，今回は頭部全体を１回で蔽う事のできるHelsinki University of Technologyの122channel磁束計記録との比較検討を行なった。（各々正常被験者５名での記録）

両施設でほぼ同様の波形を得る事ができており，少なくとも４つの成分を同定しえた。運動に先行する緩徐な外向き磁場(readiness field: RF)を運動対側側頭野で，内向き磁場を頭頂部に認め，その開始は生理研の記録で２秒前，Helsinkiでは１秒前であった。この緩徐磁場は運動開始後30-50msecに頂点(motor field: MF)を形成し，極性をかえて約100msec, 200msecでそれぞれ次の頂点(movement evoked field Ⅰ: MEF Ⅰ, movement evoked field Ⅱ: MEF Ⅱ)を認めた。この中で運動に先行する成分は個人差が認められた。即ち，脳電図記録では運動に先行する成分のBereitschaftspotential (BP), negative slope (NS') ともに全例同様の傾向を示したにもかかわらず，Helsinkiの記録で，１例でほとんど磁場変動RFを認める事ができず，１例では両側の運動野にほぼ対称性のRFを認めた。これに比し，MEF ⅠはMFと反対の磁場分布を示し，両施設共に対側運動感覚野附近にその活動源を同定する事ができた。運動同側のRF成分に関してはこれまでも論議の的であり，当施設での記録では明らかなRF成分は認められていなかったが，これは機種の相違によるものではなく個人差に帰する事ができるものと思われる。同時に検討した背景脳磁場の同期では，運動前３秒より両側運動野近傍で活動の減衰が認められた。以上より，運動準備に関して両側運動野近傍の２つの電流源を少なくとも想定できる。３つ目と目される補足運動野の活動に関しては，今回の記録では明らかな反応は認められず，今後の検討を要する。MEF Ⅰは運動開始直後の成分であり，信号同期が良好であり，活動源推定が容易であるものと推定される。以上，運動準備，その処理に関する両側運動野の役割の相違の一端を明らかにする事ができた。

2．ヒト頭頂葉における視空間認知構成機能のMEGによる非侵襲的計測

村上新治，藤井　充，深津　亮（札幌医大・医）
栗城真也

ヒト頭頂葉の障害者の示す視空間の認知構成障害の臨床症状から推察される視空間認知構成機能については，その高次機能ゆえヒトでの研究におもねることが大だが非侵襲的研究はむつかしく，不明な点が多い。しかしながら視空間認知に関する視覚情報処理については，霊長類による実験で頭頂葉7a野の神経細胞が網膜視覚情報と眼球位置情報の両方の刺激に応答すること，視覚入力に対する運動に先行して発火する視覚運動型の神経活動が報告されている。前年度我々は視覚刺激に対する脳磁界応答を非侵襲的計測方法のSQUIDを用いて測定し，その応答信号源を推定しヒト頭頂葉－頭頂間溝にあることを報告した(Murakami, Kuriki et al, 1993 Neuroscience Res.)。今回はヒト頭頂葉を対象に網膜視覚情報と眼球位置情報の組み合わせによる視空間認知にいたる情報統合機能を解明するために，非侵襲的計測手段としてSQUIDをもちいたMEGで頭頂葉の視覚－眼球位置刺激に対する応答を測定した。

正常成人5人を被験者として磁気シールドルームで坐位にて特殊ホルダーを顔面に装着して頭部を固定した。視覚刺激として固視点（常時点燈）と視覚刺激点（点滅）を被験者の眼前50cmに中心から左右に3度毎に置いた緑色LEDを用いて行い，この2つを組み合わせて，＃1眼球位置固定で視覚刺激点をかえる網膜入力変更型，＃2固視点と視覚刺激点距離を一定に双方を同時に同方向にかえる眼球位置入力変更型，＃3視覚刺激点を固定し固視点をかえる絶対位置入力型，の実験をおこなった。その誘発磁界応答を視覚刺激点のある視野と対側の頭頂葉を中心に37－チャンネルSQUIDをもちいて各実験セットの視覚刺激のLED点燈に合わせて256回加算平均を行って記録した。そして，電流双極子解析からその反応活動源をもとめ被験者の頭部にマークをつけた頭部MRI画像に合わせて脳内位置の推定をおこなった。

視覚刺激に対する応答脳磁界は90-120msec（第一成分），120-170msec（第二成分），180-220msec（第三成分）の潜時に双極性磁界分布が観察され，各被験者において第二成分に比較的安定した双極子性の磁界分布がみられた。第二成分においては電流双極子の向きはおおよそ一定しており各被験者においても同様の結果が得られた。実験＃1，2においては第二成分は共に若干の変動は示すものの大きな変化はみられなかった。しかし実験＃3では各成分ともに変動した。一方電流双極子解析から求めた活動源とその向きは，頭頂葉皮質下深部でやや内側寄りで方向には一定の特徴はみいだせなかった。したがって，今回の結果は網膜，眼球位置情報について頭頂葉深部に応答源をしめしたものの，各局在性については言及するまでにいたらなかった。

【研　究　会　報　告】

研究会報告

〔目　　次〕

1．第４回海馬研究会―海馬の構造・機能・病態生理―（代表者：岡田安弘）
（1993年11月19日～11月20日）　…… 351

2．NMR の細胞及び分子生理学研究への応用（代表者：曽我美勝）
（1993年12月20日～12月21日）　…… 362

3．エネルギー代謝と細胞内シグナル（代表者：菅野富夫）
（1993年６月17日～６月18日）　…… 373

4．膵臓を中心とした臓器相関（代表者：菅野富夫）
（1993年９月16日～９月17日）　…… 392

5．クロム親和細胞：分泌現象の神経性調節（代表者：小林　繁）
（1993年９月９日～９月10日）　…… 398

6．大脳皮質視覚領の機能と形態の特異性（代表者：谷口郁雄）
（1993年11月17日～11月18日）　…… 411

7．第13回睡眠促進物質研究会（代表者：井上昌次郎）
（1993年11月30日～12月１日）　…… 417

8．生理学実験手技に関する研究会（代表者：栗原　敏）
（1993年８月24日～26日）　…… 425

9．内外受容器のブドウ糖分子識別ならびに反応発現機構（代表者：北里　宏）
（1993年12月13日～12月14日）　…… 426

10．ギャップ結合細胞間連絡の生理学的役割に関する総合的研究（代表者：菅野義信）
（1994年２月７日～２月８日）　…… 434

11．神経伝達調節機構解析の戦略（代表者：吉岡　享）
（1993年９月16日～９月18日）　…… 446

12．GABA, Glycine レセプター・Cl チャネル（代表者：赤池紀生）
（1994年３月１日～３月３日）　…… 448

13．消化器の機能及びその調節機構（代表者：鈴木裕一）
（1993年10月28日～10月29日）　…… 453

14．上皮性 Cl^- チャネル研究の新展開（代表者：竹口紀晃）
（1994年３月１日～３月３日）　…… 464

15．Ca^{2+} シグナリングと細胞機能制御機構（代表者：宮崎俊一）
（1993年９月29日～９月30日）　…… 473

16. 分泌・吸収上皮における輸送の分子機構とその制御（代表者：藤本　守）
（1994年１月18日～１月19日） …… 481
17. 虚血再灌流障害と活性酸素：心筋細胞から生体心まで（代表者：有田　真）
（1993年10月22日～10月23日） …… 492
18. 分子神経生物学の進歩（代表者：池中一裕）
（1993年11月19日～11月20日） …… 506
19. ニューロンとグリアの相互作用（代表者：村上富士夫）
（1993年７月８日～７月９日） …… 514
20. 筋蛋白の分子機構とその構造（代表者：月田承一郎）
（1994年２月25日～２月26日） …… 522
21. 網膜神経回路の機能分化と視神経再生の生理学的・分子生物学的研究
（代表者：斎藤建彦）
（1993年８月19日～８月21日） …… 530
22. 生殖細胞分化と受精におよぼす蛋白（代表者：永野俊雄）
（1993年５月14日～５月15日） …… 552

1．第4回海馬研究会―海馬の構造・機能・病態生理―

1993年11月19日～20日
代表者：岡田安弘（神戸大・医・第一生理）
世話人：小幡邦彦

(1) アンモン角錐体細胞樹状突起の形態解析
石塚典生（東京都神経研）

(2) 興奮性神経回路と抑制性神経回路の接点
玉巻伸章（福井医大・解剖）

(3) 正常およびリラーマウスの海馬歯状回形成過程における細胞移動と接着因子の発現
湯浅茂樹，川村光毅（慶應大・医・解剖）

(4) 脳虚血抵抗性について―培養神経細胞と幼若および成熟砂ネズミを用いて―
佐藤　潔，新井　一，（順天堂大・医・脳神経外科）

(5) 海馬CA1選択的両側性神経細胞死の機序
茂野　卓（埼玉医大・総合医療センター）

(6) 無酸素，無グルコース条件下におけるラット脳発達時のエネルギー代謝と神経活動―海馬切片を用いた研究
岡田安弘，鍋谷まこと，（神戸大・医・第一生理）

(7) 無グルコース条件下の海馬切片の神経活動
岡田安弘，高田俊宏（神戸大・医・第一生理）

(8) 海馬虚血性選択的細胞死におけるグルタミン酸―カルシウムの役割
片岡喜由，三谷　章（愛媛大・医・第一生理）

(9) 虚血海馬スライス標本を用いたCA1錐体細胞のEPSCの解析
坪川　宏（自治医大・第一生理）

(10) 虚血脳の海馬におけるシナプス小胞蛋白動態
宮澤隆仁（防衛医大・脳神経外科）

(11) カイニン酸全身投与による弱齢ラット海馬CA1障害
小幡邦彦（生理研）

(12) トリメチル錫による海馬CA3障害―学習障害とけいれん感受性の変化について―
加藤進昌（滋賀医大・精神医学）

(13) 海馬体の場所ニューロン応答性と行動
小野武年（富山医薬大・医・第二生理）

(14) 海馬シナプスの長期増強形成への電位依存性カルシウムチャネルの関与
加藤宏司，伊藤憲一（山形大・医・第二生理）

⑮　神経伝達物質による苔状線維シナプス LTP の調節機構

佐藤公道，金子周司（京大・薬・分子作用制御）

【討論参加者】

岡田安弘，川村光毅，湯浅茂樹，石塚典生，伊藤憲一，片岡喜由，三谷　章，佐藤公道，金子周司，小野武年，西条寿夫，茂野　卓，宮本昌志，坪川　宏，宮澤隆仁，加藤　裕，玉巻伸章，加藤進昌，赤川公朗，高田俊宏，石川晶三，鍋谷まこと，金谷貴子，佐藤　潔，新井　一，宮嶋雅一，川合述史，丸山　敬，小幡邦彦

第 4 回海馬研究会報告書

岡田安弘

海馬の構造，機能，病態生理に関する研究成果を informal な形で討論しあう本海馬研究会は，本年で第 4 回を迎え内容的にも充実し，ミクロからマクロの広い分野にわたる研究について意見が交換できた。

機能と結びつけた海馬のシナプス結合，神経回路網に関する形態学的な側面については石塚，玉巻，湯浅，川村らの優れた研究成果の発表があった。虚血，低酸素，低グルコース時あるいはカイニン酸処理における海馬の機能変化や細胞死，さらに虚血時の海馬のグルタミン酸，Ca^{++} の動態と細胞障害についても議論された。すなわち宮沢らのシナプス小脳における蛋白動態から，坪川らのパッチクランプを用いたイオン流に関する研究，岡田や新井らの脳発達時の海馬切片を用いたエネルギー代謝と神経機能との研究，片岡らの虚血時の海馬におけるグルタミン酸や Ca^{++} 動態と細胞障害，あるいは虚血時の in vivo における茂野や新井らの研究，さらに小幡らのカイニン酸による海馬障害に関する発表と討論が行われた。また，海馬の学習と長期増強 (LTP) の神経機能に関する研究として伊藤，佐藤，加藤らの発表の他，サルを用いた海馬ニューロンの応答と行動など広い範囲にわたる自由な討論がなされた。このように海馬という一つの主題に多くの立場から光りをあてることは，今後の基礎－臨床にわたる広い分野の共同研究の試金石ともなるものである。

(1) アンモン角錐体細胞樹状突起の形態解析

石塚典生（東京都神経研・神経細胞生物）

ラット海馬のスライス標本を用い，アンモン角錐体細胞にHRP細胞内染色を行い，樹状突起の分岐様式，突起長，各層への突起分布量を測定した。

アンモン角錐体細胞は頂上樹状突起の分岐様式，分布域と細胞体の大きさから大細胞性のCA2/3群と小細胞性のCA1に大別される。各錐体細胞の平均樹状突起長（細胞体平均面積）は，CA1で13,424μm (193μm^2)，CA2では15,406μm (524μm^2)，CA3では12,482μm (459μm^2)であった。CA3の突起長は，細胞体の位置によって大きく異なる。総突起長と上昇層の部分突起長は海馬采付着部位で最大となり，CA2あるいは歯状回に近づくにつれ漸減する。分子層への樹状突起分布量はCA2で最も多く，歯状回に近いほど少ない。歯状回門に隣接する細胞では，分子層へ樹状突起を全く出さない細胞も見られた。透明層への樹状突起分布量は歯状回側で最も多く，CA2に近いほど分布量は減少し，CA2では苔状線維を受ける棘状瘤を欠く。放線層への樹状突起分布量は位置による差が認められない。以上のことから，CA2/3錐体細胞は分子層と透明層では逆方向の樹状突起分布勾配が，また上昇層には海馬采付着部を中心にして両方向へ漸減する分布勾配が在ることが判った。このことは，各層へ特異的に分布する嗅内野，歯状回，内側中隔核からの入力受容量にも同様の勾配が在ることが示唆される。

(2) 興奮性神経回路と抑制性神経回路の接点

玉巻伸章（福井医大・解剖）

中枢神経系において情報を処理するに際し，抑制性神経細胞が特異的に抑制性神経細胞に結合する調節様式が次々と明らかになってきている。この様な抑制性神経回路と興奮性神経回路の接点の数量的解析は，神経間結合の可塑的変化の実体が，何であるかを推察するに際し，非常に重要な示唆を与えるものである。今回は，海馬錐体細胞が抑制性神経細胞と結合する際を調べてみると，約90%が一個のシナプスによっていた。

(3) 正常およびリーラーマウスの海馬歯状回形成過程における細胞移動と接着因子の発現

湯浅茂樹，川村光毅（慶應大・医・解剖）

マウス海馬原基の歯状回形成過程において，歯状回を構成する細胞が脳室面神経上皮から発生し層形成部位へ移動する様式を明らかにした。これをもとにして，細胞移動の機構に関して細胞接着因子の発現と放射状グリアの突起の配列に注目して解析を行った。さらに皮質形成過程に遺伝的障害があるリーラーマウスの歯状回形成異常について，正常発生過程との比較を行った。

胎生後期に側脳室内側部の海馬采近傍の神経上皮から発生した細胞は，軟膜下の実質内を移動し歯状回形成部位へ分布した。胎生15—18日の細胞移動が活発な時期に，移動経路上に配列する放射状グリアの突起上に，neuron-glia 間の接着因子である tenascin の発現が認められた。また，glial fibrillary acidic protein (GFAP) 免疫反応陽性の放射状グリアの突起は，胎生17日より海馬原基内に認められるようになった。GFAP 免疫陽性の突起は，はじめ軟膜下実質内の細胞移動経路に配列していたが，発生が進むにつれ歯状回形成部位において，顆粒細胞の分布に対応した放射状の配列を示すようになった。電顕的にも，移動細胞とグリアの突起との接触が認められた。

これに対し，リーラーマウスの海馬原基では，細胞移動経路上の tenascin 免疫陽性の放射状グリアの突起に形成異常が認められ，歯状回形成部位においても GFAP 免疫陽性のグリアの突起の放射状の配列は形成されなかった。tenascin の発現は正常発生過程では生後消退したが，リーラーマウスでは生後も発現が持続していた。

以上の所見より，歯状回を形成する細胞の移動には，tenascin を発現した放射状グリアの突起との接触による誘導機構が関与し，歯状回層構造の形成にもグリアの突起配列による枠組みの形成が重要な役割を果たしていると考えられる。そして，リーラーマウスでは，グリアの突起形成ならびに接着因子発現の異常により歯状回形成異常が引き起こされると推測される。

(4) 脳虚血抵抗性について —培養神経細胞と幼若および成熟砂ネズミを用いて—

新井　一，佐藤　潔（順天堂大・医・脳神経外科）

培養海馬神経細胞を用いた in vitro 神経細胞障害モデルと幼若および成熟砂ネズミの両側頸動脈閉塞 (BLCO) モデルを用いて，虚血性神経細胞障害の成立機序とその予防に関する基礎的事項について検討した。その結果，(1)低酸素・無グルコースあるいはグルタミン酸負荷は，培養神経細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇とそれに続く細胞死を惹起した。Ca 拮抗剤の添加は，細胞内 Ca^{2+} 濃

度の上昇と神経細胞障害の発現を抑制したが，培養液の低温化はこれらを抑制することはなかった。(2)脳血流量測定の結果，幼若砂ネズミの BLCO は成熟動物におけると同様に，前脳虚血をもたらすことが確認された。生後 2 週齢の砂ネズミでは，30分間の BLCO を行っても海馬 CA1 領域の神経細胞壊死をみることはなく，幼若動物脳が虚血耐性を有することが明らかとなった。今後は，上記の実験結果をふまえ，幼若脳が有する虚血耐性のメカニズムの解明を試みる。

(5) 海馬 CA1 選択的両側性神経細胞死の機序

茂野　卓（埼玉医大・総合医療センター・脳神経外科）
宮本昌志，石田美知子，篠崎温彦（東京都臨床研究所・薬理）

【目的】

海馬 CA1 神経細胞死の発生機構に迫るべく，グルタミン酸受容体を中心とした分子レベルでの情報を，海馬興奮性神経回路網の理解に結び付けることを試みた。

【方法】

(1)ラット CA1, CA3 あるいは大脳皮質に NMDA あるいは NMDA 受容体アゴニスト L-CCG-IV を注入し細胞死の発生分布をみた。(2)両側 CA1 に脳波電極を設置し，一側 CA1 に NMDA 受容体アゴニストを注入して脳波および動物行動を観察した。

【結果】

(1) L-CCG-IV, 50nmole/μl は選択的 CA1 細胞死を起こした。(2)一側 CA1 に注入したにもかかわらず，細胞死は両側性に見られた。(3)脳梁および背側海馬交連をあらかじめ切断した後に L-CCG-IV を一側 CA1 に注入すると，細胞死は両側性に抑制された。(4)海馬脳波は L-CCG-IV 注入数分後注入側 CA1 で棘波が見られ，その後対側 CA1 に棘波が伝搬した。ラットは間代性痙攣を示した。(5)脳梁および背側海馬交連切断後は棘波の形成は見られず，痙攣も無かった。(6) NMDA を用いて同様の検索を行った。10nmole/μl の CA1 注入で痙攣が生じるが，非致死的であった。30nmole 以上は用量依存性に致死的であった。L-CCG-IV の場合と異なり，CA1 細胞死は注入側でのみみられた。また脳梁および背側海馬交連の切断によってもこの細胞死は抑制されなかった。

【結論】

選択的 CA1 細胞死の理解には，興奮性アミノ酸による局所細胞の分子レベルでの応答と興奮性神経回路網のかかわりが重要である。L-CCG-IV は NMDA 型受容体以外の受容体に作用している可能性とともに，対側 CA1 への興奮伝搬に特異な作用をしていると考えられる。

(6) 無酸素，無グルコース条件下におけるラット脳発達時のエネルギー代謝と神経活動—海馬切片を用いた研究

鍋谷まこと，岡田安弘（神戸大・医・第一生理）

ラット発達時脳及び成熟脳の海馬切片を作成し無酸素，無グルコース条件下におけるエネルギー代謝と神経機能の相関につき検討した。すなわち生後4，7，10日目，および成熟脳の海馬切片の酸素消費を測定する一方，切片のATP，クレアチニンリン酸(CrP)，乳酸濃度を測定した。また神経機能の指標としてCA1野，CA3野から記録されるシナプス電位（集合電位；PS）を記録した。

海馬切片の酸素消費率(ΔO2)は4日目，7日目，10日目，成熟脳でそれぞれ0.13, 0.24, 0.47, 0.80 (mmol/gDNA/min)あり，酸素消費率から算出されるエネルギー産生率はそれぞれ0.39, 0.72, 1.41, 1.18 (mmoles/gDNA/min)であった。エネルギー消費率(-P)は4日目，7日目，10日目，成熟脳でそれぞれ1.09, 2.93, 3.42, 4.75 (mmoles/gDNA/min)であった。成熟ラット脳ではエネルギー消費率と酸素消費率から算出されるエネルギー産生率とはほぼ一致しているが，幼若ラット脳ではエネルギー消費率が酸素によるエネルギー産生率をはるかに上回っている。これは脳の発達とともにエネルギー産生が嫌気的代謝から好気的代謝に移行して行く過程を数量的に表示している。

また無酸素，無グルコース条件下での脳発達段階における海馬切片のATP, CrPレベルの減少およびPSの減少，消失経過の関係から次のことが明らかになった。

1．成熟ラット脳では神経活動の面からは酸素とグルコース両方に強く依存している。

2．幼若脳ではエネルギー代謝と神経活動ともに無酸素に対し極めて強い抵抗性を持つ。

3．幼若脳において無グルコース条件下ではATPレベルが高く維持されていてもシナプス電位が消失する。これはグルコースが単にエネルギー産生の基質としての役割だけでなくシナプス伝達そのものに何らかの重要な役割を担っていることを示唆している。

(7) 無グルコース条件下の海馬切片の神経活動

高田俊宏，岡田安弘（神戸大・医・第一生理）

成熟モルモット海馬切片を用いて灌流液のグルコース(10mM)を除去した時及びグルコースをピルビン酸や乳酸で置換した時の神経活動の変化と切片ATP，クレアチンリン酸(CrP)濃度との相関について検討した。神経活動としては苔状線維を刺激し，CA3野錐体細胞層で得られる場の誘発電位及び錐体細胞内記録で得られるシナプス電位を指標とした。灌流液からグルコースを

除去すると約10分後にIPSP, 20分後にスパイク発射, そしてそれに続いてEPSPの消失を認めた。静止膜電位はグルコース除去後一過性に過分極するが, スパイク発射やシナプス電位が消失した後（グルコース除去後25～30分で）脱分極しはじめた。その時点で海馬切片のATPはもとの80%に, CrPは70%に減少していた。次に灌流液のグルコース除去と同時にグルコースをピルビン酸(5mM), 乳酸(5mM)などで置換した。いづれの場合にも無グルコース条件下に観察されたようにシナプス電位, スパイク電位, 静止膜電位は同様の時間経過で変化した。しかしATP, CrPには何の減少もなくグルコース除去前と同じ濃度に保たれていた。

これらの事実によってグルコースが切片のATPやCrPなどの高エネルギーリン酸のエネルギー源として作用しているだけでなく, シナプス電位の維持に直接的な作用を有している可能性が示唆された。

(8) 海馬虚血性選択的細胞死におけるグルタミン酸—カルシウムの役割

片岡喜由, 三谷　章（愛媛大・医・第一生理）

ヒトの一過性脳虚血発作の後などに特定の脳領域において選択的に観察される虚血性遅発神経細胞死の発生過程におけるグルタミン酸及びカルシウムイオンの働きについて検討した。短時間の虚血中に放出される大量のグルタミン酸は虚血脳領域全体において観察され細胞死発生の領域選択性を説明し得ない。一方, そのグルタミン酸に呼応して虚血中発生する細胞内カルシウム濃度上昇は虚血に対して特に脆弱である海馬CA1野などにおいて領域選択的に観察された。この虚血中濃度上昇したカルシウムイオンは血流再開後速やかに減少するが, その後CA1細胞ではグルタミン酸に反応して起こる細胞内カルシウムイオン濃度上昇が増強している。この結果は, 虚血中流入したカルシウムイオンによりグルタミン酸受容体のリン酸化が促進され, その受容機能が変化し, CA1細胞は血流再開後一時的に機能を回復するものの, 伝達物質として生理レベルで放出されるグルタミン酸に対して過度の細胞内カルシウムイオン流入を招く状態が虚血後長時間に亙って発生している可能性を示しており, このことが虚血性遅発神経細胞死の発生の一因となっているかもしれない。

(9) 虚血海馬スライス標本を用いたCA1錐体細胞のEPSCの解析

坪川　宏, 川合述史（自治医大・第一生理）

海馬CA1野の錐体細胞は, 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，興奮性シナプス後電流(EPSC)の性質を解析した。その結果，虚血後の細胞のEPSCは主に非NMDA型受容体の活性化による電流で，その持続は健常細胞に比べて長いことが解った。細胞外の種々のイオンの濃度を換えてEPSCに及ぼす影響を調べたところ，細胞外及び細胞内Ca^{2+}濃度を下げると持続が短くなった。さらに自発性EPSCの振幅や頻度を調べたところ健常細胞と有意な差がなかった。これらのことから虚血後のCA1野錐体細胞の長いEPSCはシナプス後膜の障害を反映しており，非NMDA型受容体の活性化によるCa^{2+}の流入があることが示唆された。

(10) 虚血脳の海馬におけるシナプス小胞蛋白動態

宮澤隆仁（防衛医大・脳神経外科）
佐藤　潔（順天堂大・医・脳神経外科）
小幡邦彦（生理研）

一過性の全脳虚血後，遅発性神経細胞壊死を来たした海馬CA1 sectorにおいて，シナプス後部である神経細胞が消失した後でも多数のシナプス小胞を含んだシナプス前終末が残存することが知られている。この度，ジャービルの5分間の全前脳虚血後の海馬におけるシナプス小胞蛋白の免疫染色を行い，経時的に検索した。その結果，再開通10分目に海馬CA1 sectorにシナプス小胞蛋白の斑点状染色像を認めた。再開通1日目には，神経細胞が保たれているにもかかわらず，海馬全域に染色性の減弱を認めた。再開通4日目以降には，神経細胞壊死が存在するにもかかわらず，染色性は海馬全域で保たれていた。以上より，シナプス小胞蛋白の免疫染色性が遅発性神経細胞壊死成熟過程の早期から変化することが明らかとなった。また，stratum lacunosum moleculareでは特にその変化が顕著であった。再開通早期には，蛋白合成が全脳で低下しており，CA1 sectorの神経細胞が発射するスパイクの頻度が増加している。これらの事実を考え合わせると，遅発性神経細胞壊死発現のメカニズムとして再開通早期からシナプス小胞のturnoverと蛋白合成が深く関係し，シナプスでの神経伝達異常を招いていると思われる。

(11) カイニン酸全身投与による弱齢ラット海馬CA1障害

小幡邦彦（生理研）

興奮性毒素であるカイニン酸を側脳室内や海馬組織内に投与すると海馬CA3錐体細胞が傷害

される。全身投与した場合の傷害はCA1やCA3などと報告が一致しない。またMorris水迷路学習が海馬の破壊で障害されることを発見したMorris, O'Keefeの研究やこれが除去する海馬の範囲に依存するという最近のAndersenらの研究は傷害後2週間以内に行われており，それ以後の変化は調べられていない。これらの点を明らかにするため，生後5週のウイスター系雄ラットにカイニン酸を皮下注射してけいれんを起こさせ，その後1－10週にわたって，2，3の行動学的実験および海馬の組織学的検索を行った。

けいれんの持続が3時間以内のときは，錐体細胞の脱落はCA1領域に限られた。Morris水迷路学習（水面下プラットホームへの逃避）はけいれん後2週間は障害されるが，1－2か月後では正常であった。

(12) トリメチル錫による海馬CA3障害
—学習障害とけいれん感受性の変化について—

加藤進昌，増井　晃，石田展弥，金井裕彦，定松美幸，中洲庸子
（滋賀医大・精神医学教室・脳神経外科）
犬伏俊郎（分子神経生物学研究センター）
赤池雅司，堤　俊輔（ヘキストジャパン医薬総合研究所）

有機錫の一種であるトリメチル錫のラットへの経口投与によって，海馬CA3/4錐体細胞が選択的に脱落することから，海馬機能を検討する良いモデルになることを示した。同ラットの症状のうち，1）学習障害，2）けいれん閾値の低下に注目し，その特徴を検討した。1）空間記憶障害は，アセチルコリン起始核である胎児中隔核の移植によって一部改善すること，2）pentetrazolによる全身けいれん閾値が低下し，その病態にグルタミン酸受容体のうち，non-NMDA型が関与していると推測されることを報告した。さらに，海馬への入力系である内嗅領野のソマトスタチン，ニューロペプチドY含量が増加していること，c-fosの発現も対照群に比べ海馬で著増しており，これは海馬深部脳波の所見とよく一致することから，同ラットの症状発現には，海馬興奮性の異常亢進がある可能性に言及した。最後に，海馬の形態的異常を非侵襲的に追う手段として，MRI画像の応用例を提示した。

(13) 海馬体の場所ニューロン応答性と行動

小野武年（富山医薬大・医・第二生理）

われわれは，すでにサル海馬体には，課題，空間（方向），場所，およびそれらの種々の組み合わせに応答するニューロンが存在することを報告している。本研究では，さらに，同一の海馬体ニューロンで，居場所の違いにより物体の意味（それぞれの物体がGoまたはNogo反応に対応）が変化する複合条件課題（場所依存性Go/Nogo課題：場所－物体－行動の連合記憶課題），および居場所の違いにかかわらず物体の意味が一定である単純条件課題（場所非依存性Go/Nogo課題：単純物体識別課題）に対する応答性を比較解析した。その結果，サルの海馬体には，場所の認知期に識別的に応答するニューロン（場所識別ニューロン）や複合条件課題にだけ選択的に応答する種々のニューロンが存在することが明らかになった。さらに，外界の手掛かり刺激の一つであるテーブルを移動させると，場所識別ニューロンの応答が消失し，サルの課題遂行も障害されたが，サルが新しい環境を学習するにつれてその応答も回復した。以上のことから海馬体の機能について考察する。

(14) 海馬シナプスの長期増強形成への電位依存性カルシウムチャネルの関与

加藤宏司（山形大・医・第二生理）

海馬シナプスの長期増強(LTP)の形成には，NMDA受容体の活性化が重要であると考えられている。NMDA受容体結合チャネルを介して，細胞内のカルシウムの増大がおこり，その後の生化学的過程を経てシナプスが強化されるとされている。このカルシウム増大をもたらすプロセスとしては，この他に電位依存性カルシウムチャネルの可能性があるが，ほとんど検討されていない。そこで，電位依存性カルシウムチャネルのうち，TとP型のチャネル阻害剤（Niおよびω-AgaIV）を用いて，LTP形成に対する関与を調べた。LTPの程度は，それぞれの阻害剤の存在下で，コントロールの約60％であった。Lタイプは LTP形成に影響を及ぼさないと報告されているが，この結果から，TおよびPタイプは LTP形成に関与していると結論した。

(15) 神経伝達物質による苔状線維シナプス LTP の調節機構

佐藤公道，金子周司（京大・薬・分子作用制御，薬理）

海馬苔状線維－CA3 錐体細胞シナプスにおける長期増強現象 (LTP) は，海馬の他の興奮性シナプスとは異なり，シナプス後膜における脱分極，GTP 結合タンパク質の活性化，細胞質の Ca^{2+} 濃度上昇のいずれの阻害によっても影響されず，シナプス前性に発現すると考えられる。この苔状線維 LTP はある種の中枢作用薬によって影響されやすい。スライス標本に適用したソマトスタチンは LTP をさらに増強する。海馬ソマトスタチンを枯渇させた動物から作成したスライスでは LTP の増大率は小さい。また，アセチルコリンはムスカリン性 M_2 レセプターを介して LTP の抑制を，反対に M_1 レセプターを介して促進を引き起こす。海馬アセチルコリンニューロンを破壊した動物のスライス標本では LTP が小さく，この標本へのカルバコール適用によって，LTP は増大する。以上の結果は，苔状線維 LTP の発現が数種の内在性神経伝達物質によって調節されていることを示唆している。

2．NMR の細胞及び分子生理学研究への応用

1993年12月20日～21日

代表者：曽我美勝（藤田保衛大）

世話人：亘　　弘，村上政隆，瀬尾芳輝

(1) アクトミオシン系での分子間力測定――モータータンパク質ミオシンはなぜそんなに柔らかいのか

須田　斎（東海大・開発工・生物工）

(2) NMR 及び TDR 法による細胞周期における水の測定

梅原利宏，富永靖徳（お茶の水女子大・理・物理）

神崎　稔（東海大・短大）

新屋敷直木，真下　悟（東海大・理・物理）

(3) 細胞周期進行に伴う細胞容積調節速度の変化

高橋　章，池原敏孝，細川敬子，宮本博司，山口久雄（徳島大・医・１生理）

(4) トレハロースを含むイースト菌細胞内の水の緩和挙動

櫻井　実，河合秀敏，井上義夫（東工大・生命理工）

日野明寛，小林昭一（食総研）

(5) ウシ血漿アルブミンの溶液，ゲル状態における分子間交差緩和現象――MTC の基礎的研究

曽我美勝，高橋昭彦，江尻和隆，梶原孝彦（藤田保衛大・総医研・分子生理）

惠良聖一，中村浩二（岐阜大・医・２生理）

加藤一夫（稲沢市民病院・中検）

亘　　弘（生理研）

(6) 合成高分子ゲル及びマウス水晶体内の水性状の研究

惠良聖一，中村浩二（岐阜大・医・２生理）

高崎昭彦，曽我美勝（藤田保衛大・総医研・分子生理）

(7) Heinz 小体形成赤血球の分子間交差緩和現象と変形能

上坂伸宏（日本医大・１生理）

長谷川節雄（３内科）

曽我美勝，高崎昭彦（藤田保衛大・総医研・分子生理）

加藤一夫（稲沢市民病院・中検）

中村浩二，惠良聖一（岐阜大・医・２生理）

(8) タンパク質の圧縮率から何がわかるか

月向邦彦（名古屋大・農・応用生物）

(9) ヘモグロビンの構造及び配位子結合反応に及ぼす圧力効果

森島　績（京都大・工・分子工学）

(10) ^{1}H-NMR の感度を利用したラット脳内 ^{13}C 標識化合物の追跡

犬伏俊郎，森川茂広（滋賀医大・分子神経）

(11) NMR によるモルテングロビュール状タンパク質の特性化（疎水クラスターに注目して）

清水昭夫，池口雅道，須貝新太郎（創価大・工・生物工）

(12) 中性子ラジオグラフィーの生体への応用

加藤一夫（稲沢市民病院・中検）

松本元一（名古屋大・工）

(13) ポリマレイン酸塩の相分離

川口正剛，伊藤浩一（豊橋技科大・物質工学）

南方　陽（浜松医大・物理）

(14) ^{31}P-MRS を用いた腫瘍細胞の代謝に関する検討——ホローファイバー式灌流培養方法を用いて

四方卓磨，沢田　淳（京都府医大・小児内科）

西川弘恭（明治鍼灸大・生理）

(15) マスト細胞の分泌顆粒に結合したヒスタミンの NMR による検出

吉崎和男（徳島大・医・１生理）

有薗直樹（京都府医大・医動物）

早野尚志（小児内科）

亘　　弘（生理研）

(16) 並進拡散の測定による糖質ゲルの構造解析

渡部徳子，大塚章宏（東京水産大・水産・化）

(17) 水和熱力学量におけるエンタルピー・エントロピー相殺効果

曽田邦嗣（長岡技科大・生物系）

(18) 計算機シュミレーションで見た非電解質分子周囲の水和構造

中西浩一郎，田中秀樹（京都大・工・工化）

【討論参加者】

○曽我美勝，高崎昭彦，江尻和隆，梶原孝彦（藤田保衛大・総医研），犬伏俊郎，森川茂広（滋賀医大），惠良聖一（岐阜大・医），西川弘恭（明治鍼灸大），四方卓磨（京都府立医大），上坂伸宏（日本医大），須田　斎（東海大・開発工），渡部徳子，大塚章宏（東京水産大），吉崎和男，高橋　章（徳島大・医），加藤一夫（稲沢市民病院），松本元一（名古屋大・工），森島　績（京都大・工），月向邦彦（名古屋大・農），桜井　実（東京工大・生命理工），須貝信太郎（創価大・工），中西浩一郎（京都大・工），南方　陽（浜松医大），野村浩康，香田　忍（名古屋大・工），

曽田邦嗣（長岡技科大），梅原利宏（お茶の水女大・理），福崎　稔（東海大短大），栗田太作（東海大・医），新屋敷直木（東海大学・理），亘　　弘，村上政隆，瀬尾芳輝

(1) アクトミオシン系での分子間力測定
（モーター蛋白質ミオシンは，なぜそんなに柔らかいのか？）

須田　斎（東海大・開発工・生物工）

運動性蛋白質であるミオシンとアクチン間の力をその表面間間隔を関数として相互作用力を測定することを最終目的として，表面間力測定装置 (ANUTECH, LTD. Mark4) を用いて実験を行っている。そして，静電相互作用や疎水相互作用力が力発生にどのように関与しているのかを明らかにすると共に，ATP 加水分解時での各素反応との関連を明らかにしたいと考えている。

現在，第1段階として，マイカ表面でのタンパク質吸着特性並びにその応用としてウサギ骨格筋より単離精製されたミオシン重鎖のヤング率の測定を行っている。その結果，蛋白を楕円体近似したとき，時間とともに短軸方向から長軸方向に拡散して行くことが観察された。また，ヤング率は長軸方向におよそ $40\times10^{7}N/m^{2}$，短軸方向でおよそ $7\times10^{7}N/m^{2}$ を得た。ゴムの値がおよそ $0.5\times10^{7}N/m^{2}$ および金属類の値$10^{10}\sim{}^{11}N/m^{2}$ を考えるとこの蛋白質は，如何に柔らかいかが理解できる。

講演では，上記報告に加え，表面間力測定装置を開発した Israelachivili らの研究を水の構造を念頭において概観してみる予定です。

(2) NMR 及び TDR 法による細胞周期における水の測定

梅原利宏，富永靖徳（お茶の水女子大・理）
神崎　稔（東海大短大）
新屋敷直木，真下　悟（東海大・理）

細胞の活動と同期した生体水の動態を調べることを目的として，細胞周期における水の変化を NMR による緩和時間および拡散係数さらに TDR 法による誘電緩和時間測定をおこなった。S 期同調した Hela 細胞の時間変化を水プロトンの NMR で測定したところ，T_1, T_2 および拡散係数がおよそ4～6時間で延長し，誘電測定では自由水の増加が観測された。このとき，カウンターイオンの緩和強度は減少するが，その後元の値にもどる。また最も低い緩和過程は細胞周期に同期して増加しその後減少する。これらは物質の構造変化を反映することから，細胞内の生体高分

子の構造に大きな変化が起きていることが示唆される。以上のことから，NMR では生体水の並進運動を含めた運動性の変化，誘電測定では細胞内の自由水および細胞の構造変化を反映した結果が得られることが示された。

(3) 細胞周期進行に伴う細胞容積調節速度の変化

高橋　章，池原敏孝，細川敬子，宮本博司，山口久雄（徳島大・医・第一生理）

浮遊状態の HeLa cells を 172 mosmol/kg H_2O の低張溶液に曝露すると急激に細胞容積が増加する。その後徐々に細胞容積が減少する現象 regulatory volume decrease (RVD) が起こる。この RVD は 1 mM quinine または 10μM BAPTA-AM と 1mM EGTA の同時添加により阻害される。本研究は，M 期選択的細胞同調法を用いて同調培養を行い，RVD の細胞容積の変化率を 1/V dV/dt で示した。この変化率は，２つの成分に分けることができた。一つは初期の速い成分でもう一つはその後の遅い成分であった。速い成分は quinine または BAPTA-AM と EGTA の同時添加により強く阻害された。quinine-sensitive, EGTA plus BAPTA-AM-sensitive の変化率は M 期及び早期 G1 期で最も大きく S 期付近で最も小さかった。これらは，細胞周期の進行に伴い RVD の機構が変化することを示している。またこの変化は Ca^{2+}-dependent K^+ permeability の細胞周期に伴う変化に基づいている事が示唆された。

(4) トレハロースを含むイースト菌細胞内の水の緩和挙動

櫻井　実，河合秀敏，井上義夫（東工大・生命理工）
小林昭一，日野明寛（食総研）

凍結や乾燥によるストレスから細胞を護る働きをするといわれているトレハロースに着目し，その作用機構をイースト菌や DPPC モデル膜を用いて調べた。ここでは，トレハロースを蓄えているイースト菌とそれをほとんど持ってないイースト菌を調製し，それぞれの細胞内の水の緩和時間を ^{1}H-NMR により測定した。同様な実験を DPPC 膜についても行った。これらより緩和時間と含水量の関係および細胞内水の緩和時間分布などについて解析した。その結果，細胞内には T_2 値 5ms, 50ms 程度の２種類の水が存在することが判明した。これらは，それぞれ結合水，中間水に帰属される。本実験で得られた最も興味ある事実は，トレハロースの有無により，これら２種類の水の比率が大きく変化することである。すなわち，トレハロース無しの菌体においては，結合水と中間水の比はほぼ１：１であるが，この糖を含む菌体中では８：２程度まで結合水が増

大する。この結果より，トレハロースが存在すると細胞膜は乾燥状態に置かれても十分な結合水を保持していると推定される。そのため細胞はストレスから護られるのであろう。

(5) ウシ血漿アルブミンの溶液，ゲル状態における分子間交差緩和現象 ―― MTC の基礎的研究――

曽我美勝，高橋昭彦，江尻和隆，梶原孝彦（藤田保衛大・総医研・分子生理）
惠良聖一，中村浩二（岐阜大・医・２生理）
加藤一夫（稲沢市民病院・中検）
亘　　弘（生理研）

ウシ血漿アルブミン (BPA) の溶液→ゲル (BPA*-gel) 変換により T_1 (HDO), T_2 (HDO)，特にタンパク質より水への分子間交差緩和時間 (T_{IS} (HDO)) が大幅に減少する。MTC イメージングの基礎的研究として以下の研究を進めた。

［1］ゲルの ^{1}H-NMR スペクトルを Lorentz 型吸収線に成分わけすると，溶液スペクトルに似た成分と，～ 1.70 ppm が最大で，半値幅～ 1900Hz の成分が観測された。これはゲル中の BPA* 集合体によるのだろう。［2］タンパク質プロトンを f_2 照射し，Akasaka (1981, 1983) のインバージョン・リカバリ法を用い T_{IS} (HDO) を求めた。BPA*-gel の $1/T_{IS}$ (HDO) vs タンパク質濃度 (W (%)) は，溶液に比べ，非常に勾配が大きい。特に，オフ・レゾナンス照射，例えば -8.79 ($\gamma H_2/2\pi$ ～ 69 Hz), -13.00, -18.99 ppm ($\gamma H_2/2\pi$ ～107Hz) を照射して求めた $1/T_{IS}$ (HDO) vs W (%) において BPA*-gel の場合，大きな勾配で増加するが，BPA 溶液 (pD 7.1) は，勾配がほぼゼロであった。オフ・レゾナンス照射による水への飽和移動において，結合水量の寄与以外に，BPA*-gel のような巨大分子集合体 (megalomolecule) が存在し，このため水分子へ能率よく飽和移動するのだろう。

(6) 合成高分子ゲル及びマウス水晶体内の水性状の研究

惠良聖一，中村浩二（岐阜大・医・第二生理）
高崎昭彦，曽我美勝（藤田保衛大・総医研・分子生理）

合成鎖状高分子ゲルの組成を種々に変化させることによって得られる，含水量の異なったゲル内の水性状について，500MHz ^{1}H-NMR により，T_1 と交差緩和時間 (T_{IS}) を測定し，マウス水晶体の結果と比較研究した。

種々のゲルとして，N-viny1-2-pyrrolidone (N-VP) と methyl methacrylate (MMA) とのコポリマー，2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) と grycerol methacrylate (GMA) とのコポリマー，HEMA と N-VP とのコポリマー，GMA, N-VP と MMA とのコポリマーを用いた。マウス水晶体は，2，4，8 週齢を対象とした。T_{IS} (H_2O) は，7.13または-4.00 p. p. m. を f_2 照射して求めた。

$1/T_1$ と乾燥重量 (W (%)) とのプロットでは，いずれのゲルでもマウス水晶体の結果と同様の傾向を示した。一方，$1/T_{IS}$ と W (%) とのプロットでは，7.13と-4.00 p. p. m. を f_2 照射したいずれのプロットにおいてもマウス水晶体の結果に良く一致したゲルは，HEMA-GMA のコポリマーと HEMA-N-VP のコポリマーであった。

これらのことから，マウス水晶体の結果と良く一致した合成鎖状高分子ゲル内の水の存在状態は，NMR 的にみて生体組織内のそれに類似していることが示唆された。

(7) Heinz 小体形成赤血球の分子間交差緩和現象と変形能

上坂伸宏（日本医大・1 生理）
曽我美勝，高崎昭彦（藤田保衛大・総医研・分子生理）
長谷川節雄（同 3 内科）
加藤一夫（稲沢市民病院・中検）
中村浩二，恵良聖一（岐阜大・医・2 生理）

ヘモグロビン (Hb) 分子のアミノ酸置換によって，Hb が酸化変性して細胞内に沈澱凝集体（Heinz 小体）を形成し，溶血性貧血を呈する疾患を不安定 Hb 症という。この様な赤血球の変形能低下は，だれもが予想することであるが，低下はないという報告があり，少なからぬ混乱が生じていたが，我々が独自に開発した定量的測定法によって，顕著な変形能低下を確認した (Biorheology **30**, 275, 1993)。Heinz 小体形成赤血球の変形能は，その Hb 分子の物理化学的状態に大きく依存する。我々は核磁気共鳴法によって，Heinz 小体形成（Hb 凝集体の大きさ）に依存して，分子間交差緩和時間 (T_{IS}) が著しく短縮すること，しかも，従来のスピン格子緩和時間 (T_1) では，それを鋭敏に検出し得ないことを，見出した。即ち，T_{IS} の測定は，Hb-Hb 相互作用，とりわけ，Hb 分子凝集体の検出に鋭敏である事が判明した。従って，T_{IS} の測定は，不安定 Hb 症はもとより，多くの異常 Hb 症の病態生理に関する分子論的研究に有効であると思われる。

(8) タンパク質の圧縮率から何がわかるか

月向邦彦（名古屋大・農）

タンパク質の立体構造の固さや flexibility が構造因子や機能発現にどのように関わっているかは，タンパク質物理化学の重要な研究課題となっている。我々はこれらの性質が直接圧縮率に反映されることに着目し，水溶液中での超音波音速と密度の精密測定をとおして約30種の球状タンパク質の断熱圧縮率を決定し，構造および機能との相関を調べた。その結果，タンパク質分子内には２～５％の cavity が存在し，体積のゆらぎは全体積の0.3％程度であること，圧縮率は部分比容が大きいほど大きく，疎水性やヘリックス含量・アミノ酸組成などの構造因子や，安定性・プロテアーゼ消化性・起泡性などの性質と相関があることがわかった。また，圧縮率はタンパク質の圧力変性の機構解明に重要な知見を与えることがわかった。これらの結果を中心に，X 線結晶解析の結果とも比較しながら，圧縮率法によるタンパク質の構造・ flexibility・機能相関の研究の現状を紹介する。

(9) ヘモグロビンの構造及び配位子結合反応に及ぼす圧力効果

森島　績（京都大・工・分子工学）

高圧下におけるフラッシュホトリシス法の手法をもちいて光解離した配位子（酸素および一酸化炭素）と R および T 状態ヘモグロビンとの再結合反応について，その圧力依存性を比較，検討した。その結果，R 状態と T 状態では常圧における反応速度が異なるだけでなく，その圧力依存性にも大きな違いがあることを見いだした。そして，この圧力依存性の違いから R 状態と T 状態での違いはヘム鉄と配位子との結合形成過程により制御されていることが分かった。また，ヘモグロビンの単離したα鎖とβ鎖への配位子結合速度に対する圧力効果から，配位子結合反応に伴う体積変化を見積り，その結果，配位子が蛋白質内部を移動する過程は体積が増加することを示し，αβ鎖の配位子結合過程において蛋白質の動的な構造変化があることを示唆した。

(10) ^{1}H-NMR の感度を利用したラット脳内 ^{13}C 標識化合物の追跡

犬伏俊郎，森川茂廣（滋賀医大・分子神経生物学研究センター）

NMR における ^{13}C 標識法は広範な有機代謝産物を網羅し，その標識物質の時間的，並びに化

学的消長が無侵襲で追跡できることから，様々な生理，病理学的応用が展開されている。しかし，^{13}C 核の NMR 感度が低いため，生体中の挙動を追跡するためには，その標識化合物の大量投与や，長時間の測定を余儀なくされる。そこで我々は，生体内での ^{13}C 標識化合物をより効率良く検出するために，^{13}C 核に直結した ^{1}H 核の NMR 信号を多量子遷移にて選択的に検出することから間接的に ^{13}C 核の情報を得る方法を採用し生体への応用を試みた。これにより，^{13}C 核の直接検出に比べ ^{1}H 核の高感度性と比較的短い緩和時間から早い繰り返し測定が可能となり測定時間が短縮でき，生体 NMR による ^{13}C 標識法としての可能性が期待される。

(11) NMR によるモルテングロビュール状タンパク質の特性化 (疎水クラスターに注目して)

清水昭夫，池口雅道，須貝新太郎（創価大・工・生物工学）

タンパク質の特殊形態として最近注目されているモルテングロビュール (MG) 形態の概念，その性質の特長，生体内での存在意義等について，我々が研究してきた乳糖合成酵素のサブユニット α-ラクトアルブミンを例にとり解説し，ついでその最近の研究結果を NH の同位元素交換，NMR のデータにより紹介する。特に天然状に存在する二次構造，及び疎水性残基で作られるクラスター構造が MG 状で如何に変化するか二次元 NMR で我々や Dobson 等の得た結果を詳説する。それに依ると一部のヘリックス構造及び疎水クラスターが MG 状に残っているが，後者は必ずしも天然状と同一ではなく，この事はタンパク質の階層的折れ畳みを否定する。さらに MG 状の尿素による unfolding curve は各サイトで一致せず，この事は又 MG の新しい形態の特性化である事を強調する。

(12) 中性子ラジオグラフィーの生体への応用

加藤一夫（稲沢市民病院）
松本元一（名古屋大・工）
岩田　仁（愛知県がんセンター）

中性子の水に対する断面積は非常に大きく，生体内の水構造の解析には NMR とともに中性子が有用であると考えられる。生体内における水構造の解析の基礎として，今回雄 4 週令 ddY マウス，BALB/C マウス及び雄 2 カ月令 F344 ラットを用いての中性子ラジオグラフィーによる撮像を試みた。BALB/C マウスには肺に腫瘍を発生させるため 0.2 mmol N-nitrosomorpholine を飲

料水として20週間投与し，投与開始後40週または75週に使用した。日本原子力研究所JRR-3M研究用原子炉の熱中性子ラジオグラフィー装置No. 2（東海村，茨城県）を使用し，麻酔下でX線用フィルムまたはVHSビデオテープに撮影した。

透亮像として，四肢及び尾の皮質骨，気管，肺，胃内及び腸管のガスが認められた。軟骨，骨髄及び心臓は中性子散乱吸収がみられた。N-nitoroso-morpholine投与開始後75週のマウスでは肺腫瘍が明瞭に認められた。ビデオ撮影では肺の拡張収縮，及び心臓の拡張収縮が明瞭に認められた。

(13) ポリマレイン酸塩の相分離

川口正剛，伊藤浩一（豊橋技科大・物質工学）
南方　陽（浜松医大・物理）

ポリマレイン酸(PMA)水溶液はNaOH, KOH等の1価塩基で中和すると完全中和以前に相分離を起こし，NaCl, KCl等の塩添加で更に促進される。本研究では主にPMA-NaOH-NaCl系について，その臨界中和度α_τを種々の対イオン系で高分子濃度(C_P)，塩濃度(C_S)を変えて測定した。その結果α_τはC_S一定下ではC_Pと共に急減し，臨界塩濃度C_Sはα_τ一定下ではC_Pと共にほぼ直線的に減少した。この現象は1価イオンの吸着が非常に強く，且つ解離基－対イオン複合体$-COO^-Na^+$の溶媒和の低下によるもので，site-binding modelを用いて解析できる。相分離は$-COO^-Na^+$の含量が$C_P\gamma$を越えると起こることが導かれ，γの値は無塩系で0.58であり，添加塩濃度と共に減少する。α_τとC_P, C_Sの関係式を導き，実験値と比較した。また低中和度での高溶解性は単量体マレイン酸の溶解度によるものと理解されることを，マレイン酸，フマル酸の溶解度の中和度依存性を実測して示した。

(15) マスト細胞の分泌顆粒に結合したヒスタミンのNMRによる検出

吉崎和男（徳島大・医・第一生理）
有薗直樹（京府医大・医動物）
早野尚志（京府医大・小児内科）
亘　　弘（生理研）

ラット腹腔から得たマスト細胞の^{1}H-NMRスペクトルにはヒスタミンが半選択的スピン励起法で検出できる。その共鳴線は線幅が広く，しかも選択的水飽和法では検出が困難であった。このことはスピン拡散が生じたことを示唆している。すなわち，ヒスタミンと分泌顆粒の基質プロ

トンの磁気的な相互作用の相関時間が共鳴周波数の逆数（10^{-8}秒）よりも長く，交差緩和が緩和の主たる要因になっており，マスト細胞内のヒスタミンは回転ならびに並進拡散が制限された，いわゆる結合状態であると考えられる。つぎに，ヒスタミンが分泌顆粒内に含まれるヘパリンと結合している可能性について検討した。ヒスタミン溶液にヘパリンを加えても線幅は増加せず，寒天に結合したヘパリン溶液と混合すると，その線幅は増加した。しかし，選択的水飽和法でヒスタミンの共鳴線は検出でき，ヒスタミンがヘパリンと結合状態にあるとの直接的な証拠は得られなかった。

(16) PFGNMR（パルス磁場勾配 NMR）法によるゲル構造の解析 ——拡散現象からみたゾル—ゲル転移にともなう構造変化——

渡部徳子（東京水産大）

近年，生体内のタンパク質の機能の発現や細胞認識などとの関連で，水溶性多糖類のゾルあるいはゲル状態における構造の解明が重要視されており，「糖鎖工学」という新しい学問分野が展開されている。水溶性ポリサッカライドのゲル構造に関しては，熱測定や粘弾性の測定などマクロな視点からの物理量で議論されてきた。NMR の様なミクロな視点からの研究は主として緩和時間を探り針として行われてきたが，ゾルーゲル転移点の確認以上の情報は得られていない。本研究では溶媒である水の拡散現象を測定することにより，ゾルゲル転移にともなう水構造の変化と高分子鎖が形成する三次元編み目構造の変化を明らかにするとともに，ゾルーゲル転移の過程における構造変化の機構を解明した。多糖類としてはデキストランを選び，ゾル状態，共有結合により化学的に架橋されたゲル状態，及び陽イオンにより架橋されたゲル状態における構造上の特質について議論する。

(17) “水和・変性熱力学量におけるエンタルピー・エントロピー相殺効果”

曽田邦嗣（長岡技術大・生物系）

近年，蛋白分子の立体構造安定性やアミノ酸置換に伴うその変化の分子機構の研究が活発に為されている。安定性の尺度は，溶媒としての水の寄与も含んだ天然変性状両態間の自由エネルギー差であり，それはＨとＳの寄与からなる。本論文では，これらの熱力学量の分子論的な内容を考える上で重要な，エンタルピー・エントロピー (HS) 相殺則について論ずる。先ず，(1)疎水効果に特有の負の移相エントロピーは，所謂 iceberg 形成では説明できないことを述べる。次いで，

(2)非極性溶質周辺の水和水の再配置に伴う水分子間相互作用の変化の H, S への寄与は互いに相殺し，自由エネルギー変化には寄与しないことを示す。これらに基づいて，(3)溶解熱力学量の温度依存性に関して新しい解釈を提案する。次に，(4)蛋白分子のアミノ酸置換に伴う変性熱力学量の変化の一般的な表式を与え，これと，油谷等による実験データに基づいて，(5)変性熱力学量における HS 相殺効果の物理的意味を論ずる。

(18) 計算機シミュレーションでみた非電解質分子周囲の水和構造

中西浩一郎，田中秀樹（京都大・工）

計算機シミュレーションは，分子集団系について，妥当な分子間ポテンシャル関数で相互作用する分子の挙動を調べる方法で，古典系においては分子動力学 (MD) とモンテカルロ (MC) の何れかの方法による計算がすでに広く行われている。最近では蛋白分子の周囲の水の状態，ミセルの構造など複雑で大きい分子について計算が試みられている。

分子間ポテンシャルについては，Lennard-Jones のような単純なモデルはそのままは使えず，量子化学計算の結果を利用するか（例えば水に対する MCY ポテンシャル），それを原子又は原子集団に割りつけて，それらのみから成る任意の分子に利用できるよう一般化するか（TIPS, OPLS など）した上用いるかの何れかによることが多い。その際仮定するポテンシャルの関数形にも任意性がある。

MD や MC 計算の結果はモデルに大きく左右されるが，計算される量のうち構造（動径分布関数等）＞エネルギー＞圧力の順序で正確さが異なる。又，自由エネルギーの計算はさらに困難である。そこで，構造に関する情報で結果の差が微細でないものについては最も信頼がおけるものと思われる。

このような観点からわれわれはこれまで水溶液のうち典型的と思われる無極性分子(Ar など)，t-ブチルアルコール（TBA，両性分子）及び尿素（親水性分子）を溶質としたものについて MD/MC 計算を行ってきた。

この講演では主として TBA と尿素分子周囲の水和構造に関する計算結果を紹介する。両者とも希薄水溶液中で自己会合を生じるが，前者では疎水性相互作用が，後者では水素結合が大きな役割を演じていることが明確に立証されている。

3．エネルギー代謝と細胞内シグナル

1993年 6 月17日～18日
代表者：菅野富夫
世話人：菅野富夫

(1) SOD 分子設計と活性酸素代謝制御

井上正康（大阪市大・医）

(2) Inhibition titration による家兎70％肝切除モデルにおけるミトコンドリア酸化的リン酸化の代謝調節分析

井ノ本琢也，田中　明，森　重人，陳　孟鳳，佐藤文平，柳父宣治，
徳家敦夫，鍛　利幸，小澤和恵（京大・医）

(3) 肝カローンとしてのアクビチンA

安田　宏，峯　徹哉，小島　至（群大・内分泌研）

(4) 肝非実質細胞からの eicosanoid 産生を介する肝 glycogen 分解応答（Ⅱ）

浜田美雪，森山光章，木村和宏，塩田昌一，太田光明，菅野　司（大阪府大・農）

(5) コエンザイム Q（還元型）の抗酸化作用—α-トコフェロールとの比較—

山田一夫，松浦達也，川崎　尚（広島大・医）

(6) 真菌代謝産物ワートマンニンによるホスファチジルイノシトール３－キナーゼの阻害

櫨木　修（東大・薬）
宇井理生（東大・理化学研）

(7) アデノシン (A_1) 受容体を介したホスホリパーゼ A_2 (PLA_2) 活性調節

岡島史和，七五三木聰，近藤洋一（群大・内分泌研）

(8) リン酸化インスリン様成長因子受容体 (IGF-1R) と PI3-kinase の src homology (SH) 2domain との結合

山本恭平，田村　泰，吉田　尚（千葉大・医）
D. Altschuler, E. G. Lapetina（Burroughs Wellcome 研）

(9) 膵腺房細胞分泌反応に及ぼすクロロブタノールの作用

葉原芳昭，菅野富夫（生理研）

(10) ホスホリボシルピロリン酸合成酵素の結合蛋白質による調節

橘　正道，喜多和子，石嶌純男，石塚俊治（千葉大・医）

(11) 交感神経によるグルコース輸送促進機構の解析—褐色脂肪初代培養系の確立—

志水泰武，Kielar Danuta，箕越靖彦，嶋津　孝（愛媛大・医）

(12) 本態性高血圧患者におけるインスリン注入時の臓器別インスリンシグナル

池淵元祥，鈴木正昭，則岡美保子，横田千晶，池田佳代子，
篠崎一哉，原納　優（国立循環器病セ）

(13) 虚血時の心筋代謝に対する無マグネシウム灌流の影響

仲澤幹雄，時　安雲，石橋隆治，今井昭一（新潟大・医）

(14) ラット脳灌流標本の作製とその分光学的性質

稲垣隆史，田村　守（北大・電子科学研）

(15) ホローファイバー式培養法による生きた神経芽腫細胞の ^{31}P-NMR スペクトル

四方卓磨，衣笠昭彦，沢田　淳（京都府医大）
西方弘恭（明治鍼灸大）

(16) v-src による形質転換 NIH-3T3 細胞におけるアデニル酸シクラーゼ系の変化

徳光幸子，秋保　啓，野村靖幸（北大・薬）

(17) 近赤外線酸素モニターを用いた精神分裂病の前頭部の酸素代謝および血液動態の検討

岡田文彦（北大・保険管理セ）
徳光幸子（北大・薬）
星　祥子，田村　守（北大・電子科学研）

【討論参加者】

菅野富夫（北大・獣医，生理研），井上正康（大阪市大・医），井ノ本琢也，田中　明（京大・医），安田　宏（東大・医），小島　至（群大・内分泌研），塩田昌一，菅野　司（大阪府大・農），山田一夫（広島大・医），櫨木　修（東大・薬），宇井理生（東大・理化学研），近藤洋一，岡島史和，七五三木聰（群大・内分泌研），山本恭平（千葉大・医），葉原芳昭（生理研），橘　正道，石嶌純夫（千葉大・医），志水泰武（愛媛大・医），池淵元祥，原納　優（国立循環器病セ），仲澤幹雄，今井昭一（新潟大・医），田村　守（北大・電子科学研），四方卓磨，衣笠昭彦（京都府医大），岡田太郎，櫨木　薫（東大・薬），アブダル・ア，モハメド・ア（群大・内分泌研），佐藤分平（京大・医），森山光章（大阪府大・農），井上文夫，木崎善郎（京都府医大），三輪直人（日本シェーリング），堀江　透（エーザイ），金岡　毅（福岡大・医），梶山泰生（都臨床医学総合研）

【研究会概要】

生体のエネルギー代謝とその調節機構を主として組織・器官レベルで研究することに共通の興味をもった研究者と，組織・器官を破壊することなしに主に光学的方法によって測定する研究機器を開発しつつあった研究者とが，それぞれの研究領域の境界を超えて研究を推進することを目的として，15年前から毎年１回，「代謝コロキュウム」という研究会を開催し，発表と自由な討論を続けてきた。今回は，生体の統合機能に関心をもつ生理学者との交流を期待して生理学研究所研究会として開催され，その内容は次のように要約されよう。

①細胞内レベルの研究として生理活性物質としてのフリーラジカル，細胞内の酸化的燐酸化と解糖系によるATP産生の調節機構の最新の研究動向。②肝臓の再生を引き起こす原因物質（カローン）がアクチビンAであろうとする考えを支持する結果。③細胞内情報伝達系としてのホスファチジルイノシトール回転の最近の研究発展。④増殖・成長因子の作用発現機構。⑤膵腺房の分泌反応。⑥ホスホリボシルピロリン酸合成酵素の結合蛋白質による調節。⑦インシュリン作用の臓器特異性シグナル。⑧心臓と脳の灌流標本による臓器レベルでのエネルギー代謝研究の進展。⑨褐色脂肪組織と神経芽腫細胞の培養標本による代謝研究の発展。

これらの発表を中心に，細胞内，細胞，組織，器官，個体の各レベルでの代謝調節とそれらの相互関係について，活発な討論が行われた。

(1) SOD分子設計と活性酸素代謝制御

井上正康（大阪市大・医）

ヒトをはじめとする好気性多細胞生物は，発生，増殖，成長，そして個体の死にいたる様々な過程を機能高分子の正確なネットワークにより演出している。この多彩な生命機構を維持するには莫大なエネルギーを要するが，その確保は多量の酸素を利用する酸化的ぱ酸化に依存している。この効率良いエネルギー転換機構を獲得したことが好気性生物の爆発的な繁栄を可能にしたと考えられる。しかし，生命を支えるこの酸素が体内で活性化されて生じる活性酸素・フリーラジカルは多くの生体分子や細胞機能を破壊しうる。一方，白血球の殺菌作用やアラキドン酸代謝に見られるごとく，生物は活性酸素やフリーラジカルをも生理的代謝機構に組み込み，その生存能力を強化している。したがって，生命機構を維持するために，必要な場所では活性酸素やフリーラジカルを産生し，これが存在してはならない部位では確実に消去無毒化する区画制御機構が不可欠な要因となっている。事実，全ての生物は活性酸素が発生する細胞内局所に各種のスカベンジャーや消去酵素を有し，細胞毒性を発現することなく酸素分子種を代謝利用している。しかし，細胞機能が破壊される各種の疾患では，これらの防御能を上回る量の活性酸素やフリーラジカルが発生して非特異的に生命機構を破壊し，しばしば重篤な病態を誘起する。このことが，活性酸素やフリーラジカルが多彩な疾患に関与する理由である。したがって，活性酸素やフリーラジカルを個体レベルで有効に代謝制御することが可能となれば，各種疾患に対する広範かつ基本的な対処療法を確立できると思われる。一般に，活性酸素やフリーラジカルは寿命が短く，それらが生じた局所で生体成分と速やかに反応するため，その生理機能の解析と毒性軽減には，それらが生じた組織細胞局所で特異的かつ定量的に代謝制御することが必要である。試験管内で活性酸素やフリーラジカルの毒性を軽減するスカベンジャーは多く知られているが，残念なことに，その不安定さや不都合な生体内挙動の故に個体レベルの代謝制御に利用できる物は少ない。本総会で

は，活性酸素消去系の区画制御機構，Superoxide Radical を特異的に分解する SOD の分子設計と体内挙動制御，及び部位特異的な活性酸素代謝制御について述べ，各種疾患における活性酸素の意義を考察する。また，生理活性分子としてのフリーラジカルの側面にも言及し，生命機構の維持に不可欠な要因としての活性酸素代謝の新たな問題を提起したい。

(2) Inhibitor titration による家兎70%肝切除モデルに於けるミトコンドリア酸化的リン酸化の代謝調節分析

井ノ本琢也，田中　明，森　重人，陳　孟鳳，佐藤文平，
柳父宣治，徳家敦夫，鍛　利幸，小澤和恵（京大・医）

【目的】

肝切除後の肝再生には，DNA 合成，タンパク合成等の代謝反応がさかんに行われる必要があり，そのエネルギー源である ATP の消費の増大がみられる。このような ATP の需要の増大に対し，肝ミトコンドリアは酸化的リン酸化による ATP の合成を亢進することにより代償する。酸化的リン酸化はいくつかの段階にて構成されているが，今回我々は家兎肝ミトコンドリア酸化的リン酸化より７つの段階 (glutamate dehydrogenase, Complex Ⅰ,Ⅲ,Ⅳ, ATP synthetase, ATP-ADP translocase, Pi carrie) を選び，Kacser と Burns らの提唱した代謝調節分析理論を用いて各段階の相対的重要度すなわちフラックス調節係数が肝再生時にどのように変化するかを調べた。

【方法】

体重 2Kg の家兎をシャム（S 群），70%肝切除群（H 群）に分けそれぞれ24時間後に肝ミトコンドリアを分離した。State3 呼吸を，グルタミン酸を基質としてポーラログラフィーにて測定した。さらに Complex Ⅰ,Ⅲ,Ⅳ, ATP synthetase, ATP-ADP translocase, Pi carrier の特異的阻害剤である rotenone, antimycin, cyanide, oligomycin, atractyloside, mersaryl を用いて，state3 の titration curve を作成した。フラックス調節係数は titration curve の阻害剤＝０での傾きと100%阻害に必要な最小の阻害剤の量より算出した。また glutamate dehydrogenase のフラックス調節係数は，summation theorem を用いて算出した。ミトコンドリア呼吸酵素量は分光光度計にて測定した。

【結果】

State3 呼吸，RC 比，phosphorylation rate は S 群でそれぞれ 29.2 ± 2.8 nanoatom O/min/mg, 5.0 ± 0.3, 70.4 ± 6.5 nanoatom O/min/mg, H 群では49.8±2.2，7.4±0.4，124.0±4.1と，ミトコンドリア呼吸速度は H 群で著明に亢進した。フラックス調節係数は S 群，H 群でそれぞれ Complex Ⅰ0.317 ± 0.009, 0 ± 0,Ⅲ0 ± 0, 0.139 ± 0.016,Ⅳ0.236 ± 0.052, 0.093 ± 0.033, ATP synthetase 0 ± 0, 0.209 ± 0.045, ATP-ADP translocase 0 ± 0, 0.266 ± 0.006, Pi carrier 0 ± 0, 0.164 ± 0.03, glutamate dehydrogenase 0.447, 0.129 であった。ミトコンドリア呼吸酵

素量は，S群で，cytochrome aa3 98.0 ± 14.6 μmol/mg protein, b 103.6 ± 13.3 μmol/mg protien, c + c1 210.6±24.6 μmol/mg protein，H群ではそれぞれ86.9±8.0，93.4±2.5，187.9±8.9とH群で多少の減少は見られたものの，有意差は認められなかった。

【結語】

家兎70％肝切除モデルにおける肝再生に伴い，肝ミトコンドリアの呼吸速度は著明に増大する。この呼吸速度の増大は肝ミトコンドリア酸化的リン酸化の律速段階の変化をきたす。つまり，正常肝では glutamate dehydrogenase, Complex Ⅰ,Ⅳ律速段階であるのに対し，再生肝ではこれら3つの速度が増すことにより相対的に速度が減少した Complex Ⅲ, ATP synthetase, ATP-ADP translocase, Pi carrier が律速段階になる。即ち肝切除後の再生肝に於ける，酸化的リン酸化による ATP 合成の亢進は，各段階が同等に亢進されるのではなく，それぞれが別個に調節されて発現し，その結果律速段階が変化する。さらに Complex Ⅳ の反応速度が増加するにもかかわらず，呼吸酵素量の増加が見られないことより，それらの調節は酵素の量的変化ではなく，酵素の質的変化によりなされている可能性が考えられる。

(3) 肝カローンとしてのアクチビン A

安田　宏，峯　徹哉（東大・医）
小島　至（群大・内分泌研）

肝臓は再生能力の大きい臓器である。例えばラットに70％の肝切除を行うと残存肝は速やかに増殖を開始し数日後には元の体積まで再生する。このような肝再生の機構は古くから興味がもたれ様々な研究がなされ，また様々な仮説が提出されてきた。「肝に再生を起こす原因物質」として想定されたカローン (chalone) もその様な想像上のオートクリン増殖抑制因子である。「カローン」学説によれば，臓器の組織量はその中で作られる増殖抑制物質カローンにより調節され十分量のカローンが存在する場合増殖は停止している。肝切除により臓器量が減ると臓器内のカローン濃度が減少するため肝細胞は増殖を開始する。やがて組織量が回復するとカローン濃度も上昇し増殖が停止するというものである。この幻のカローンを求めて多くの研究者が肝細胞由来の増殖抑制因子を追い求めてきた。1986年に分子量2万5千の蛋白を精製したという報告があったもののその実体は不明であった。

我々は TGF-β 遺伝子ファミリーに属するアクチビン A が培養肝細胞の増殖を強力に抑制することを昨年の代謝コロキウムで報告した。その後の検討から①アクチビン A が培養肝細胞で産生されること，②増殖刺激を受けた肝細胞は G_1 中～後期にアクチビン A を産生・放出すること，③内因性のアクチビン A 作用をフォリスタチンによってブロックすると肝細胞の DNA 合成はさらに増加すること，④肝部分切除後アクチビン A の mRNA は一旦減少しその後24時間後にピー

クに達することが明らかになった。

以上の結果からアクチビンAは肝カローン様の作用をもつ因子であると考えられる。

(4) 肝非実質細胞からのeicosanoid産生を介する肝glycogen分解応答（Ⅱ）

浜田美雪，森山光章，木村和弘，塩田昌一，太田光明，菅野　司（大阪府大・農）

我々は第14回当コロキウムにおいて，肝非実質細胞（特にKupffer細胞）の貧食はprostaglandin (PG) 産生を，mannose受容体の刺激はpeptide leukotriene (LT) を，血小板活性化因子 (PAF) はPGとLTを同時に産生しglycogen分解を促進させることを報告した。今回，Kupffer細胞の種々の刺激による異なったeicosanoid産生の調節を肝臓灌流法を用い理解することを研究目的とした。得られた結果は貧食によるPG産生はプロテインキナーゼとCa^{2+}によりホスホリパーゼとアラキドン酸カスケードの両段階で調節されることを示唆した。

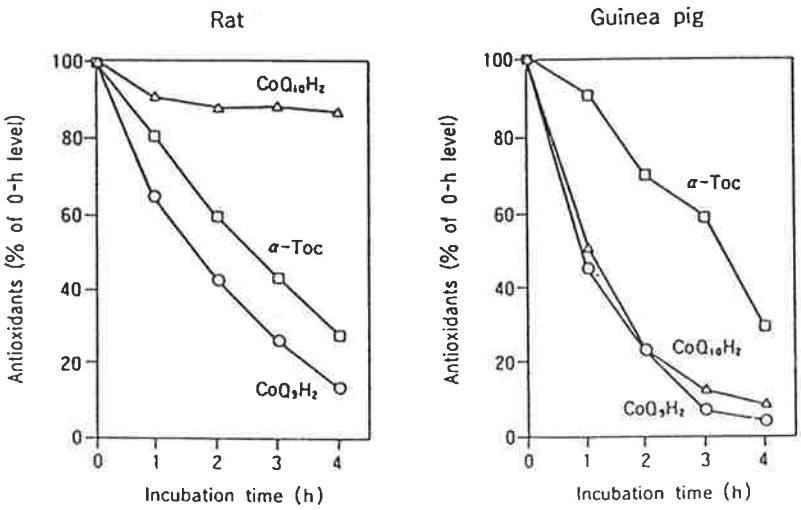
(5) コエンザイムQ（還元型）の抗酸化作用—α-トコフェロールとの比較—

山田一夫，松浦達也，川崎　尚（広島大・医）

コエンザイムQ (CoQ) の主な生理作用は，ミトコンドリアの電子伝達系の成分としてATP生成に重要な役割を果たしていることである。最近注目されている他の重要な生理作用は，生体内で抗酸化物質として機能することである。CoQ同族体 (CoQn) の還元型 ($CoQnH_2$) とα-トコフェロール (α-Toc) は，脂質ペルオキシラジカル ($LOO^{\cdot}$) の消去により抗酸化作用を示すと考えられている。しかし，哺乳類各臓器に異なる含有比で共存するCoQ_9とCoQ_{10}との生理作用上の違いの有無，さらに共存するα-Tocとの抗酸化作用上の相互関係（$CoQnH_2$がα-Tocとは独立して直接抗酸化作用を示す。あるいはα-Tocの再生を介する間接的なもの）については不明な点が多い。

ラット肝 (CoQ_9: CoQ_{10} = 6:1) およびモルモット肝 (CoQ_9: CoQ_{10} = 1: 5) の分離肝細胞に水溶性ラジカル発生剤である2，2′－アゾビス（2－アミジノプロパン）ジヒドロクロリド (AAPH) で障害を誘導し，抗酸化作用を示す結果減少する内在性$CoQnH_2$, α-Tocの変動を調べた。その結果，内在性CoQ_9H_2は含有量の異なる細胞においても共通して強い抗酸化作用を示すが，$CoQ_{10}H_2$は主としてCoQ_{10}を多く含む細胞において抗酸化作用を示すことが明らかになった。

上記両分離肝細胞に共存するα-Tocは，AAPHにより$CoQnH_2$と独立して消費された。さらにV. E欠ラット肝細胞 (α-Toc: $CoQnH_2$ = 1: 30) においても同様にCoQ_9H_2とα-Tocは平行して消費され，$CoQnH_2$はα-Tocと独立して抗酸化作用を示す結果を得た。



以上の結果は $CoQnH_2$ が α-Toc とその生体膜での存在部位，細胞内局在を異にすること，あるいは酸化障害の発生部位，酸化障害の種類との関連により，α-Toc と独立してともに抗酸化作用を示すと考える。

【文献】

1） Matura, T. et al., Biochim. Biophys. Acta, 1123: 309-315 (1992)

2） Matura, T. et al., Biochim. Biophys. Acta, 1127: 277-283 (1992)

(6) 真菌代謝産物ワートマンニンによるホスファチジルイノシトール3 —キナーゼの阻害

櫨木　修（東大・薬）

宇井理生（東大・理化学研）

真菌代謝産物 wortmannin は好中球の活性酸素産生を強く抑制する薬物として古くから知られていたが，その作用点は長い間不明であった。最近になって，wortmannin で前処理した細胞では走化性因子 fMLP 受容体刺激時のホスホリパーゼ D (PLD) の活性化が抑えられていることが明らかになり，PLD によって産生されるホスファチジン酸 (PA) あるいはその代謝産物であるジアシルグリセロールの蓄積抑制が活性酸素産生阻害の機構と考えられるようになった。しかし，wortmannin が PLD の酸素活性を直接阻害するという結果は得られておらず，細胞をホルボールエステルなどで刺激した後の PLD 活性の上昇は wortmannin の影響を受けない。私たちは wort-

mannin の作用点をより明らかにすることを目標に検討を行った結果，この薬物がホスファチジルイノシトール (PI)3 キナーゼの強力な阻害薬であることを見出したので紹介する。

好中球を ^{32}Pi でラベルした後 fMLP で刺激すると，PI-3, 4, 5 ―トリスリン酸 (PIP_3) への ^{32}P の取り込みが増大した。PIP_3 の産生は細胞を wortmannin で前処理すると強く阻害され，IC_{50} 値（約 50nM）は活性酸素産生の抑制を指標とした場合とほぼ一致した。このとき，fMLP は PA への ^{32}P の取り込みも増大させるが，これは wortmannin による影響を受けない。細胞内において PIP_3 は PI-4, 5-P_2 から PI3 キナーゼによって産生されると予想されることから，好中球の細胞質から PI3 キナーゼを部分精製して wortmannin の作用を検討したところ，好中球に存在する３種のアイソザイムの全てが阻害されることが判った。wortmannin による阻害は ATP に非競合的であり，PI, PI-4-P, PI-4, 5-P_2 の何れを基質としたときにもほぼ同じ IC_{50} 値（約 5nM）を示した。PI4 キナーゼは 1μM という高濃度で20％抑制された。

wortmannin は，インスリン受容体刺激に対する細胞応答にも強力な作用を示す。脂肪細胞のグルコースの取り込みに対するインスリンの促進作用は，0.1μM wortmannin の添加により完全に消失した。また，カテコラミン刺激によるリポリシスの亢進は影響を受けないが，これに対するインスリンの抑制作用は消失した。このとき，細胞膜画分中の PI3 キナーゼ活性はインスリンの濃度依存的に増大し wortmannin により阻害されたが，インスリン受容体／チロシンキナーゼの自己リン酸化やその細胞内基質である IRS-1 のリン酸化には変化が認められなかった。

PI3 キナーゼは，ことに増殖因子の受容体と相互作用する性質から注目を集めている酵素であるが，今回の検討結果は好中球や脂肪細胞の機能調節においてもこの酵素が何らかの役割を果たしている可能性を示すものである。PI3 キナーゼには現在のところ有用な阻害薬は知られていない。細胞レベルでも強力に作用する wortmannin は，今後，PI3 キナーゼによる細胞機能調節の検討に有効に用いうるものと期待している。

(7) アデノシン (A_1) 受容体を介したホスホリパーゼ A_2 (PLA_2) 活性調節

岡島史和，七五三木聰，近藤洋一（群大・内分泌研）

A_1 受容体は通常，百日咳毒素感受性 G 蛋白質 (Gi) に連関して，cAMP 抑制応答を仲介するが Ca^{2+} 系応答（ホスホリパーゼ (PL) C, A_2 ならびに Ca^{2+} 動員など）を仲介しない。しかし，我々は甲状腺細胞においてアデノシンが Ca^{2+} 動員性アゴニスト（ノルエピネフリン (α_1), P_2 プリン作動性アゴニスト）の共存下ではこれらのアゴニストによる PLC の活性化，Ca^{2+} 動員を増強することを見出した。この際，アデノシンは著明なアラキドン酸 (AA) 放出活性を示す。今回，このアデノシンによる AA 放出活性化機構の解析を試みた。

その結果，(1)アデノシンはノルエピネフリン，P_2 アゴニストによる AA 放出を高めるだけで

なく Ca^{2+} イオノフォア，細胞内 Ca^{2+} 動員物質 thapsigargin による AA 放出をも高めた。(2)この AA 放出にはホスファチジルコリンの減少，リゾレシチンの産生が伴っており PLA_2 の活性化を反映していると考えられる。(3)イオノフォア，thapsigargin で細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇するが，アデノシンはこの Ca^{2+} 濃度には影響を与えない。(4)カルモジュリン阻害剤はイオノフォア，thapsigargin による PLA_2 活性化のみならずアデノシンによる増強作用をも抑制した。(5)アデノシン作用は A_1 受容体アゴニストで観察され百日咳毒素前処理で消失した。

このように，単独では PLA_2 を活性化しないアデノシンでも細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることにより PLA_2 活性化作用を発揮できることを見出した。Ca^{2+} はおそらくカルモジュリンを介し PLA_2 の活性化を導くが，これだけでは不完全で，この”準活性型 PLA_2”に対し A_1 受容体－ Gi 系が作用を発揮し得るものと考えられる。したがって Ca^{2+} 動員性アゴニストの共存下で A_1 受容体－ Gi 系の活性化は

(1) PLC-Ca^{2+} 系とのクロストークによる Ca^{2+} 動員の増加。

(2) Ca^{2+} の作用部位である PLA_2 系の活性化。

という 2 つのプロセスに作用する結果，著しい AA 放出能を発揮できるものと結論される。

(8) リン酸化インスリン様成長因子受容体 (IGF-1R) と Phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) の src homology (SH) 2 domain との結合

山本恭平，田村　泰，吉田　尚（千葉大・医）
D. Altschuler, E. G. Lapetina （Burroughs Wellcome 研）

【はじめに】

PI 3-kinase は Phospholipase C を中心とする従来の PI 代謝系と異なり，イノシトール環の 3 位をリン酸化する酵素である。この酵素は血小板由来増殖因子受容体をはじめとする増殖因子受容体に結合することが知られているが，今回我々は PI 3-kinase の SH2 domain がリン酸化された IGF-1 R に結合することを見いだしたので報告する。

【方法】

IGF-1 R はヒト IGF-1 R を大量に発現した LISN C4 細胞より IGF-1 R に対するモノクローナル抗体である α-IR3 を用いて免疫沈降法により精製された。PI 3-kinase のサブユニットである P85 とその各部分である SH3 domain, break point cluster region (BCR), SH2 domain および GTPase activating protein (GAP) の SH2 domain, $pp60^{src}$ の SH2 domain は，glutatione S-transferase (GST) との融合蛋白として大腸菌に発現させ精製した。LISN C4 細胞をデタージェントで溶解した細胞溶液を，PI 3-kinase 活性の供給源として用い，上述の GST 融合蛋白とともに IGF-

1 R とインキュベートした後洗浄し，IGF-1 R に結合した PI kinas 活性を，既報のごとく測定した。生成された Phosphatidylinositol monophosphate は薄層クロマトグラフィーにより分離した後，オートラジオグラフィーを行った。

【結果および考察】

LISN C4 細胞溶液由来の PI 3-kinase 活性は，in vitro でチロシン自己リン酸化された IGF-1 R に結合した。p85 (1 ～ 100nM) の添加はこの結合を用量依存性に抑制したが，GST は影響を与えなかった。次に p85 のどの部分が結合を抑制しているか調べる為に，SH3, BCR および SH2 の各 domain を用いて同様の実験を行ったところ，p85 と SH2 domain のみ PI 3-kinase 活性の結合を抑制した。PI 3-kinase 活性測定後，その一部を SDS PAGE により分離し，オートラジオグラフィーにてリン酸化された蛋白を検出したところ，p85 と SH2 domain を加えたサンプルには各々 p85 と SH2 domain の分子量に一致する蛋白のリン酸化が認められた。LISN C4 細胞溶液のみ，あるいは SH3 domain, BCR, GST を加えたサンプルには，110kD と 85kD の蛋白のリン酸化が認められた。これより p85 の SH2 部分が PI 3-kinase 活性の結合を抑制していること，p85 および SH2 domain は IGF-1 R に結合しリン酸化されること，さらに 85kD, 110kD のリン酸化蛋白については，その存在が PI 3-kinase 活性と一致することから LISN C4 細胞中の内因性 PI 3-kinase のサブユニットがリン酸化された可能性があることが考えられる。次に PI 3-kinase の SH2 domain の代わりに GAP, $pp60^{src}$ の SH2 domain を用いて，PI 3-kinase 活性の IGF-1 R への結合に対する影響を調べたところ，$pp60^{src}$ の SH2 domain は影響を与えなかったが，GAP の SH2 domain は高濃度にて結合を抑制した。これより p85, GAP, $pp60^{src}$ の各々の SH2 domain は，リン酸化 IGF-1 R に対し異なる親和性を持つ事が明らかとなった。

【まとめ】

in vitro において p85 の SH2 domain は，リン酸化 IGF-1 R と結合することにより，細胞溶液由来の PI 3-kinase 活性の IGF-1 R への結合を抑制すると考えられた。GAP あるいは $pp60^{src}$ の SH2 domain は，各々リン酸化 IGF-1 R に対して，p85 の SH2 domain と異なる親和性を有していた。

(9) Dual effects of chlorobutanol on secretory response and intracellular Ca^{2+} dynamics in isolated pancreatic acini of the rat*

Y. Habara and T. Kanno （生理研）

1. The effects of chlorobutanol, a widely used drug preservative, on exocrine response and intracellular Ca^{2+} dynamics were examined in isolated rat pancreatic acini of the rat.

2. Chlorobutanol (1 mg ml^{-1}) markedly inhibited the secretory response to cholecystokinin

octapeptide (CCK-8), carbamylcholine chloride (carbachol), or sodium fluoride, a direct G-protein activator. However, chlorobutanol itself induced a maximal release of amylase when the dose was increased to 4 mg ml^{-1}.

3. An oscillatory fluctuation of cytoplasmic Ca^{2+} concentration, $[Ca^{2+}]_c$, induced by 5 pM CCK-8 or 0.3 μM carbachol was totally abolished in the presence of 1 mg ml^{-1} chlorobutanol.

4. A biphasic change in $[Ca^{2+}]_c$ induced by 100 pM CCK-8, a rapid rise followed by a gradual decay, was transformed to an oscillatory fluctuation by the preservative.

5. Chlorobutanol inhibited 13 pM [^{125}I] -CCK-8 or 0.5 nM [^{3}H] -methylscopolamine chloride binding to the acinar cells in a dose-dependent manner.

6. These results indicate that chlorobutanol produces discernible pharmacological effects on the secretory response in rat pancreatic acinar cells through changes in Ca^{2+} dynamics. Possible sites of action could be at a binding process of secretagogues to their receptors, at an activation process of a G-protein located in the plasma membrane, or at the processes following G-protein activation. However, the possibility that the preservative may distort the Ca^{2+} -transport function of the plasma membrane or the membrane of intracellular organella, especially Ca^{2+} -sequestering pools, cannot be excluded.

* Br. J. Pharmacol. (1993) 109: 685-692

(10) ホスホリボシルピロリン酸合成酵素の結合蛋白質による調節

橘　正道，喜多和子，石嶌純男，石塚俊治（千葉大・医）

ホスホリボシルピロリン酸 (PRPP) は，ヌクレオチド・核酸の糖部分の供与体であるが，さらにプリン合成経路の律速基質であり，かつピリミジン合成系初段酵素の強力な活性化因子として，両経路を連動制御する役割をもつ。この物質の個体レベルでの挙動に関する疑問から，すでに解決ずみとされていた PRPP 合成酵素（反応：ATP + R5P → PRPP + AMP）をあえて再検討することになった。まず予想外なことに，本酵素には 2 種類のサブユニットが存在し（PRS Ⅰと PRS Ⅱ），各々別々の遺伝子にコードされることが判った。これらは互いに相同性は高いが調節的性質や組織での mRNA 発現量は異なっている。さらに，ラット肝ではこれら触媒サブユニットに他の蛋白質成分 (39 kDa, 41 kDa) が結合していることが示唆された。通常の非変性条件下ではこの集合体は解離せず，1 M $MgCl_2$ 存在下にのみ部分的な解離が見られた。また，39 kDa 蛋白質には活性抑制作用があり，負の調節因子である可能性が示唆された。

上の成績に基づき，結合蛋白質の構造と性質，触媒サブユニットへの作用解明を目指して，39 kDa 蛋白質の cDNA クローニングを行った。SDS 電気泳動で単離した 39 kDa 蛋白質のペプ

チド断片のアミノ酸配列をしらべると，驚くべきことに触媒サブユニットの部分配列と高い相同性を有していた。この配列を基にMOPAC法によりプローブを作り，ラット肝cDNAライブラリーから本蛋白質をコードするクローンを得た。現在部分塩基配列を明らかにしたところであるが，このクローンは39 kDa結合蛋白質のほぼ全領域をコードすると考えられる。今後結合蛋白質による核酸前駆体合成の新たな調節機構について解析する予定である。

(11) 交感神経によるグルコース輸送促進機構の解析
—褐色脂肪初代培養系の確立—

志水泰武，Kielar Danuta，箕越靖彦，嶋津　孝（愛媛大・医）

褐色脂肪組織(brown adipose tissue; BAT)は，化学的熱産生のための特異的部位であり，寒冷暴露時の非ふるえ熱産生や過食時に余剰のエネルギーを浪費するための熱産生を行っている。我々は，これまでBATに分布する交感神経を直接電気的に刺激すると，グルコースの取り込みが促進することを見い出し，インシュリンとは別に，交感神経系によって促進されるグルコース輸送系が存在することを明らかにした。また，そのメカニズムをin vivoにおいて解析したところ，インシュリンの作用機構とは異なり，グルコーストランスポーター(GLUT)が細胞膜上へ移行することによるのではなく，GLUT自体の活性化に基づくことが示唆された。しかしながら，より詳細に細胞内シグナル伝達系や分子機構の解析を進めるためには，in vivoの実験系では限界があり，in vitroの実験系が要求される。そこで，BATの初代培養系が交感神経によるグルコース輸送促進機構の解析に活用できるか否かを検討した。

生後24時間以内の新生ラットの肩甲間BATより分離した脂肪前駆細胞を，インシュリンとT3を含むDMEMで約1週間培養し，脂肪滴を貯留した細胞を用いた。まず，前駆細胞が，褐色脂肪細胞に分化した指標として，BATに特異的なミトコンドリア蛋白質であるサーモゲニンの発現を調べた。通常のシャーレで培養した細胞では検出されなかったが，シャーレをコラーゲンでコートすることによりサーモゲニンが発現し，BATの分化に細胞外マトリックスの存在が必要であることが示された。

次に，グルコース取り込み速度を，非代謝性グルコース誘導体である2-deoxy glucose (2DG)を用いて測定し，インシュリン及びノルエピネフリンの作用を調べた。その結果，インシュリン及びノルエピネフリンによる促進効果が発現するためには，細胞外マトリックスの存在だけでなく，予め細胞にデキサメサゾンを作用させておく必要があることが明かとなった。すなわち，デキサメサゾンの添加量に依存して，インシュリン刺激に応答する筋／脂肪型GLUT (GLUT4)を発現させること，並びにそれに伴ってインシュリンやノルエピネフリンによるグルコース輸送促進作用が惹起されることを見い出した。これらの結果から，BATの初代培養系は，糖輸送促進

機構の解析に有効であると考えられる。

(12) 本態性高血圧患者におけるインスリン注入時の臓器別インスリンシグナル

池淵元祥，鈴木正昭，則岡美保子，横田千晶，池田佳代子，
篠崎一哉，原納　優（国立循環器病セ）

【目的】

本態性高血圧患者におけるインスリンシグナル伝達を臓器（筋肉，脂肪細胞，血管内皮細胞，血小板）別に検討した。

【方法】

非糖尿病本態性高血圧患者76人並び健者10人におけるインスリン応答性を SSPG 法を用いてブドウ糖，分枝鎖アミノ酸 (BCAA), TG, FFA，ケトン体，PAI-1, t-PA, PGI_2, PGE_2，血清 K, FENa, FEK, epinephrine (E), norepinephrine (NE)，血小板 (PLT) 細胞内 Ca^{2+} について検討した。

【結果】

1）本態性高血圧患者で糖代謝に対するインスリン感受性は低下しており，SSPG 値は収縮期血圧並びに平均血圧と正の相関を示した。

2）BCAA, TG, FFA，ケトン体，PAI-1，血清 K は，インスリン注入（50～60μU/ml）下で有意に減少し，また BCAA, FFA，血清 K の低下度は SSPG 値とそれぞれ負の相関を認めた。

3）本態性高血圧患者における PLT 細胞内 Ca^{2+}（Collagen 刺激前後）は，対照群に比し有意に高値であり，Collagen 刺激後 PLT 細胞内 Ca^{2+} はインスリン注入により両群で有意な減少を認めた。

4）PGI_2, PGE_2, NE, E, FENa はインスリン負荷により変化を認めなかった。

【結語】

本態性高血圧患者において，糖代謝とともに血清 K 並びにアミノ酸，脂肪酸代謝にもインスリン応答不全の存在が示唆された。今回用いたインスリン濃度では，昇圧作用は認めず，むしろインスリン作用不全が昇圧的に作用している可能性を示唆したい。

(13) 虚血時の心筋代謝に対する無マグネシウム灌流の影響

仲澤幹雄，時　安雲，石橋隆治，今井昭一（新潟大・医）

虚血による心筋代謝障害の保護は虚血性心疾患の治療，あるいは心臓外科手術における心筋保

護さらに心臓移植での心臓保存との関連で重要な問題であり，従来より多くの研究がなされている。虚血心筋障害とマグネシウムイオンとの関係についての研究で，高濃度マグネシウムが心筋障害を軽減するという報告がある一方，高濃度マグネシウムは心筋障害を増悪させ，無マグネシウム灌流が障害軽減に良いと言う研究もある。そこで，虚血時の心筋代謝に対する無マグネシウム灌流の影響を ^{31}P-NMR を用いて検討した。

【方法】

ラット摘出心灌流標本を使用して実験を行った。灌流液は100％酸素で酸素化した HEPES 緩衝生理的塩類溶液を使用した(pH7.4)。正常灌流液（MG 群）のマグネシウム濃度は 1.2mM であり，無マグネシウム液（MGO 群）は正常灌流液からマグネシウムを除いたものを使用した。75cm の定圧灌流から 0.2ml/min の定流量灌流（正常灌流の約２％）にすることで虚血に導入した。リンの NMR は日本電子 FX270 を使用し45°パスル，0.5秒おきの取り込みで600回（５分）の積算を行い，細胞内 pH, CP および ATP の変化を経時的に記録した。

【結果および考察】

MG および MG0 群ともに，虚血に導入すると細胞内 pH は速やかに低下し虚血10分までは同様に進行したが，MG 群では虚血時間が長くなるにつれて徐々に低下し虚血60分で6.62±0.08となった。MG0 群では25分以降緩徐に増加し虚血60分では6.92±0.04となり，虚血30分以降 MG 群に比べ有為に高値であった。MG 群で，CP は虚血直後でほぼ45％程度まで減少し虚血期間中この値を保っていたのに対して，MG0 群では虚血直後は MG 群と差は認められなかったが10分以降高値を示した。ATP 値には両群間に大きな差を認めなかった。虚血60分後に再灌流すると CP は両群において虚血前値に速やかに復した。MG 群では再灌流による ATP の回復は認められなかったが，MG0 群では部分的ではあるが回復傾向にあった。心機能面では，虚血により拡張終期圧は上昇するが，MG0 群ではその増加は少なく，再灌流による回復も良好であった。以上の結果は無マグネシウム液での灌流が虚血による代謝変化を改善することを示唆している。以前より我々は，虚血直前の心機能が虚血中の代謝変化あるいは障害を決定すると報告してきたが，虚血前の LVP は MG0 群の方が MG 群より高く，心機能が今回の結果の原因とは考えられない。これは虚血後短時間の変化には両群に差がないことからも示唆される。MG0 群での変化が虚血30分前後から認められるので，何等かの代謝的な変化を介するものと思われる。

⑭　ラット脳灌流標本の作製とその分光学的性質

稲垣隆史（生体機能研・循環器病セ）
田村　守（北大・電子科学研）

人工血液 (FC-43) を用いた摘出ラット脳灌流標本の作製を試みた。ラットを麻酔後，人工呼吸

下で，総頸動脈にカニュレーションを行い，95％酸素で飽和されたFC-43を用い，定圧灌流を行った。頭部を身体から切り離し，シールドされた固定台に置き，分光学的測定及び脳波の測定を行った。麻酔正常ラットとほぼ同様な自発脳波が灌流開始後4～6時間にわたって記録できた。酸素消費速度は正常ラットとほぼ同じであった。Flash光に対するevoked responseも観察された。テンカン誘発剤により，典型的な脳波の出現が見られ。酸素消費の増大とチトクロームオキシダーゼの還元へのシフトが見られた。以上のことより，今回作製した灌流脳標本は種々の生化学的・神経科学的研究に有用だと結論した。

(15) ホローファイバー式培養法による生きた神経芽腫細胞の ^{31}P-NMR スペクトル

四方卓磨，衣笠昭彦，沢田　淳（京都府医大）
西川弘恭（明治鍼灸大）

核磁気共鳴(Nuclear Magnetic Resonance: NMR)法は細胞を破壊することなくその生理状態や代謝を知ることができる。NMRスペクトル(NMR Spectroscopy: MRS)の腫瘍に対する臨床応用が期待されている[1]が，実験動物の腫瘍も含め *in vivo* ではスペクトルに影響する因子が多数存在する。実験条件を自由に設定できる培養系でMRS測定が可能になれば基礎研究に有用である[1,2]。我々はホローファイバー(hollow fiber: HF)による培養方法で神経芽腫細胞の ^{31}P-MRSを測定した。さらに2-deoxyglucose[3](2DG)負荷によるスペクトルの経時的変化を検討した。

【材料と方法】

細胞はヒト神経芽腫細胞株KP-N-RTBM1[4]を用いた。HFはミニヴィタファイバー[3]（Amicon社）を用いた。これは中空糸が500本で構成され，膜面積は約300cm^2，中空糸外空間(extracapillary space: ECS)は約7ml，分画分子量は30000である。Day 0: ECSに約1×10^{8}個の細胞を注入し，3時間後より中空糸内空間(intracapillary space: ICS)の培地の循環を開始した(25ml/min)。Day 2: ECSの培地の循環を開始した(8ml/hr)。Day 10: ^{31}P-MRSの測定は培養条件を維持しつつ行った。MRS装置はCSIⅡ（GE社，4.7テスラ）で，ループコイル(20mmφ)を装着した^{31}P用の自家製プローブを用いた。測定条件はパルス繰り返し時間2.0秒，60°パルス，積算回数3000回とした。測定時間は2hrであった。

さらに培地に2DGを加え（濃度：20mM），経時的にMRSを測定した（培地のグルコース濃度：20mM）。

【結果】

培養により得られたスペクトルにおいて，PME（ホスホモノエステル），ATP（アデノシン三リン酸）のα-P（リン酸），β-P，γ-Pのピークがみられた。Piのピークは培地中の無機リンによる信号であった。PCr, PDE（ホスホジエステル）の信号は認められなかった。

2DG 負荷後のスペクトルでは，β-P は減少し Pi は増加した。また PME は増加し14～16hr で最大となった。

【考察】

得られたスペクトルでは PME は高く PCr は認められず，腫瘍組織での in vivo MRS と同様の傾向[1]であった。また本細胞には Pi はほとんどないと考えられた。ADP（アデノシン二リン酸）の信号に相当するγ-P とβ-P の信号強度の差もほとんどみられなかった。以上より本実験系での培養環境は良好であると考えられた。

2DG は細胞内でリン酸化され 2DG-6-phosphate (2DG-6P) となり解糖系代謝を阻止する[3]。3^1P-MRS では 2DG-6P のピークは PME ピークに含まれる[3]。本系では 2DG-6P の蓄積により PME が増加し，ATP を示すβ-P が減少する過程を観察することが可能であった。Pi の増加は ATP 産生低下による細胞内無機リンの増加を示すと考えられた。

【文献】

1）Daly, P. F. and Cohen, J. S. Cancer Res. 49: 770-779, 1989.

2）Gillies, R. J. et al. Rev. Magn. Reson. Med. 1: 155-179: 1986.

3）Karczmar, G. S. et al. Cancer Res. 52: 71-76, 1992.

4）Sugimoto, T. et al. Cancer Res. 46: 4765-4769, 1986.

(16) v-*src* による形質転換 NIH-3T3 細胞におけるアデニル酸シクラーゼ系の変化

徳光幸子，秋保　啓，野村靖幸（北大・薬）

ラウス肉腫ウイルス (RSV) の癌遺伝子 (v-*src*) の産物である $pp60^{v\text{-}src}$ や種々の増殖因子の受容体が，チロシンキナーゼ活性を有することが見いだされ，細胞増殖の調節に対して蛋白質チロシン残基のリン酸化の関与が注目されている。今回，我々は RSV によって形質転換した NIH-3T3 線維芽細胞を用い，細胞内情報伝達系の一つであるアデニル酸シクラーゼ (AC) 系に対する $pp60^{v\text{-}src}$ の作用を調べた。

【結果および考察】

v-*src* 形質転換細胞におけるβアドレナリン受容体：無傷細胞において，βアゴニストのイソプロテレノール (Isp) による cAMP 生成量は NORMAL では130倍に増加するのに対して，TRANSFORMANT では35倍にしか増加しなかった。一方，AC を直接活性化するフォルスコリンによる cAMP 生成量には NORMAL, TRANSFORMANT ともに差は認められなかった。しかし，コレラ毒素存在下でのフォルスコリンによる cAMP 生成は TRANSFORMANT で減弱していた。これらのことから，TRANSFORMANT では $pp60^{v\text{-}src}$ は AC 系触媒蛋白質には作用しておらず，β受容体－GTP 結合蛋白質に影響を及ぼしている可能性が示唆された。そこで，粗細胞膜を用い，

β受容体アンタゴニストの[^{125}I] ICYPの結合量からScatchard解析を行った，両細胞膜の間でKd値には差は認められず，Bmax値がTRANSFORMANTで著しく減少していた。さらに，細胞膜にATPを添加しpp60^{v-src}によるリン酸化が起こっている条件下で同様に受容体結合能を測定したところ，同様に両者のKd値には差はなく，Bmax値が減少していた。したがって，TRANSFORMANTにおいて，β受容体刺激によるcAMP生成低下の原因はβ受容体数の減少にあると推定した。

v-*src*形質転換細胞におけるGTP結合蛋白質：粗細胞膜においても，無傷細胞においてと同様にフォルスコリンの作用には両者間で差はなかったが，Isp依存性のAC活性はTRANSFORMANTで低下しており，この低下は細胞膜を抗pp60^{v-src}抗体処理すると一部回復した。次にGTPγS添加によるAC活性をNORMAL, TRANSFORMANTで比較したところTRANSFORMANTで低下しており，この低下もまた抗pp60^{v-src}抗体処理によって完全に回復した。一方，百日咳毒素処理してG_iの機能を消失させた細胞膜でのAC活性はNORMALとTRANSFORMANTとの間で差は認められず，TRANSFORMANTにおいてはpp60^{v-src}はG_iには作用していないと思われる。以上のことから，pp60^{v-src}はG_sに作用しG_sの共役機能を低下させていることが示唆された。[γ-^{32}P] ATPによる膜蛋白質のリン酸化：pp60^{v-src}によるG_sの機能低下はpp60^{v-src}がG_sをリン酸化するためと推定した。そこで膜標品に[γ-^{32}P] ATPを加えてリン酸化後，抗リン酸化チロシン抗体で免疫沈降させ，SDS-PAGEで分画したところ，TRANSFORMANTではNORMALに比べチロシンリン酸化蛋白質が多数観察され，v-*sre*遺伝子が発現していることが確認された。さらにTRANSFORMANTにおいてのみG_sのαサブユニットに相当する46 kDaにチロシンリン酸化蛋白質のバンドが認められた。これらの蛋白質のバンドは抗pp60^{v-src}抗体処理によって消失した。このことよりα_sがpp60^{v-src}の基質になっていることが示唆された。そこで，膜標品を[^{32}P] ATPでリン酸化後，GTP-agaroseを加えて結合するリン酸化蛋白質を解析したところ，TRANSFORMANTにおいてのみ46 kDaにリン酸化蛋白質のバンドが認められた。このバンドもまた，抗pp60^{src}抗体処理によって消失した。さらに，[^{32}P] ATPでリン酸化した細胞膜を抗α_s抗体処理してSDS-PAGEで分画すると，α_s画分である46 kDaにリン酸化蛋白質が認められた。G_iのαサブユニットの41 kDaの蛋白質はリン酸化されていなかった。

v-*src*形質転換NIH-3T3線維芽細胞において，v-*src*形質転換NIH-3T3線維芽細胞は正常細胞に比べ，Isoによるc AMP生成能が減弱していた。これはβアドレナリン受容体の数の減少とG_sの機能の低下によると結論した。このG_sの機能の低下はpp60^{v-src}がα_sサブユニットのチロシン残基をリン酸化するためと推定した。

(17) 近赤外線酸素モニターを用いた精神分裂病の前頭部の酸素代謝および血液動態の検討

岡田文彦（北大・保健管理セ）
徳光幸子（北大・薬）
星　祥子，田村　守（北大・電子科学研）

精神分裂病の症候のいくつかは脳の異なった領域間の機能的結合における欠陥の結果として発現すると考えられてきた[1,2]。また，大脳の両半球間の結合が不充分である証拠として大脳梁の病理的所見，すなわち，剖検脳で精神分裂病の脳梁は対照群より厚いと報告された[3,4]。さらに，MRI を用いた検討では，精神分裂病の脳梁前部が肥大している，あるいは，性差が認められるなどの報告があった[5,6]。両半球間が関連した機能における何らかの異常についての報告も視覚，聴覚，触覚に関して少なからぬ報告がある[1,2,7-9]。PET を用いた検討でも精神分裂病の脳血流量，グルコース利用率および酸素消費率に左右差があることが報告された[10-12]。しかし，リアルタイムにごく短い時間（数秒あるいはそれ以下）で，脳の代謝は神経活動に伴う血液動態に相関していると思われるが，この関係を正確に測定することが困難であった。最近，近赤外線のスペクトロホトメトリーを用いて脳の血液動態を上記の条件を満たして的確に検討しうることが田村らにより報告された[13]。われわれは本法を用いて精神分裂病の病態を検討することを試みているが，精神運動機能を探る一方法として鏡映描写作業中の脳内酸素代謝と血液動態を２台のスペクトロメトリーをそれぞれ左右の前頭部に装着することにより検討し，本疾患に特有と思われる所見をみいだしたので報告する。

【方法】

精神分裂病の診断は DSMIII-R にもとずき，複数の精神科医によりなされた。本法の安全性については充分に説明し，インフォームドコンセントをえられた症例についてのみ検査が行われた。男22例，女16例，平均年齢約30才であった。対照群は健康な男女38人で性，年齢を一致させた。なお，疾患群，対照群ともに全例右利きであった。鏡に写った星形を模写する作業（鏡映描写テスト：MDT）の最中に両側の前頭部に装着された光源より照射されたレイザー光（三種の波長：780, 805, 830nm）が反射光として導出されるが，田村らにより次の式よりコンピュウターにて逐次計算され，その変化が記録される[13]。(1)$\Delta\ [HbO_2] = -3.0\ \Delta\ OD_{805} + 3.0\ \Delta\ OD_{830}$ (2)$\Delta\ [Hb] = 1.6\ \Delta\ OD_{780} - 2.8\ \Delta\ OD_{805} + 1.2\ \Delta\ OD_{830}$ (3)$\Delta\ [TotalHb] = \Delta\ [HbO_2] + \Delta\ [Hb]$

【結果】

正常対照群では MDT の最中に２群の反応パターンが認められた。すなわち，(1)優位脳反応パターン：酸素化ヘモグロビン [HbO_2] は両側の前頭部で増加し，脱酸素化ヘモグロビン [Hb] は減少するが，脳血液量は優位脳である左側でのみ増加した（男：13／22，女：４／16）。(2)両側脳反応パターン：[HbO_2] と [Hb] の変化は(1)と同様であるが，脳血液量も両側脳で増加した（男：

8／22，女：11／16)。したがって，(1)は男で多く，(2)は女で多い。残りの男女各1例は無反応パターンを示した。一方，精神分裂病では正常で認められる優位脳反応パターンがまったく認められず，17例45％で左右両半球の一方で脳血液量が減少し，左右両半球がバラバラに反応するパターンを示した（非制御パターン)。また，16例42％は両側脳反応パターンを示し，5例13％が無反応パターンを示した。

【考察】

正常対照群ではMDTのような作業を集中して行うと左右の脳半球は一定の制御されたシステムにしたがって，酸素代謝と血液動態の反応を示すと考えられる。血液量の変化には優位脳反応パターンと両側脳反応パターンとがみとめられ，男では前者が多く，女では後者が多かった。この傾向は左利きではより顕著であった[11]。一方，精神分裂病では優位脳反応パターンのような充分に制御された片側性パターンを示す例は1例も認められず，左右両半球が制御されていないパターンを示す場合（非制御パターン）が約半数をしめた。本研究で検討した患者群はBleulerの精神分裂病の基本症状の中で連合の弛緩を示すものが多く，与えられた作業を遂行する際に左右両半球が充分な制御のもとに作動しないため非制御パターンを示すものと思われる。すなわち，本法を用いて精神分裂病の基本的症候を的確に捉えることが可能となると思われる。

【文献】

(1) Beamont, L G, Diamond, SJ: Br J Psychiatry, 123, 661, 1973
(2) Dimond, SJ, et al: J Abnorm Psychol, 89, 505, 1980
(3) Rosenthal, R, Bigelow, LB: Br J Psychiatry, 121, 259, 1972
(4) Bigelow, LB, et al: Br J Psychiatry, 142, 284, 1983
(5) Nasrallah, HA, et al: Biol Psychiatry, 21, 274, 1986
(6) Uematsu, M, Kaiya, H: Schizo Res, 1, 391, 1988
(7) Eaton, EM, et al: Psychiat Res, 1, 315, 1979
(8) Green, P: J Abnorm Psychol, 87, 472, 1978
(9) Carr, SA: Br J Psychiatry, 136, 53, 1980
(10) Gur, RE, et al: Arch Gen Psychiatry, 40, 1250, 1983
(11) Kling, AS, et al: Am J Psychiatry, 143, 175, 1986
(12) Wiesel, FA, et al: Acta Psychiatr Scand, 76, 628, 1987
(13) Hazeki, O, Tamura, M: J Appl Physiol, 64, 796, 1988
(14) Okada, F, et al: Brain Res, 601, 337, 1993

4．膵臓を中心とした臓器相関

1993年9月16日～17日
代表者：菅野富夫
世話人：菅野富夫，葉原芳昭

(1) 膵内分泌腺・外分泌腺の細胞間結合の構造と機能：胎生期発達を中心に
山本正夫（広島大・医）

(2) 膵外分泌を調節するCCKとアセチルコリンの作用；プロカインによる分別
菅野富夫，葉原芳昭（生理研）
池井暢浩（大塚製薬）

(3) 生理的分泌反応にIP_3とカルシウム動員は無関係か
葉原芳昭，菅野富夫（生理研）

(4) 温熱処理による細胞致死効果と細胞内カルシウムイオン濃度の変化
近藤　隆（神戸大・医）他

(5) 膵内のNO (nitric oxide) 含有神経— VIPとの共存—
下瀬川徹，鹿志村純也（東北大・医）

(6) 膵管閉塞膵炎モデルにおける膵外分泌機能について
大塩学而，岡田憲行（京大・医）

(7) 急性膵炎の臓器障害機構における腹腔マクロファージの関与
竹山宣典（神戸大・医）

(8) 副腎皮質ホルモン分泌調節機構における細胞内カルシウムイオン動態の意義
山口賢一（新潟大・医）他

(9) Taurocholic acidによる胆汁うっ滞モデルに対するセクレチンの効果
福本陽平（山口大・医）

【討論参加者】

菅野富夫，葉原芳昭（生理研），山本正夫（広島大・医），近藤　隆（神戸大・医），下瀬川徹，鹿志村純也（東北大・医），大塩学而，岡田憲幸（京大・医），竹山宣典（神戸大・医），山口賢一（新潟大・医），福本陽平（山口大・医）

【研究会概要】

膵臓は，その大部分を構成する外分泌腺と島状に散在する内分泌腺から構成されている。外分泌腺の分泌を調節する主な生理的刺激は，消化酵素分泌反応を刺激するコレシストキニン・パンクレオザイミン(CCK)と迷走神経の伝達物質であるアセチルコリンと，膵液分泌反応を刺激する

セクレチンと迷走神経の第2の伝達物質であるVIP（血管作動性ペプチド）である。これら刺激は，長期的には腺細胞を肥大・増殖させる栄養効果や，血流変動効果も引き起こす。さらに，交感神経やNOを伝達物質とする神経，種々のホルモン，成長因子，血管内皮細胞因子などを介して他の臓器との機能相関を保持している。膵島ホルモンも，膵島門脈系と傍分泌とを介して，膵外分泌機能に短期，中期および長期にわたる効果を現している。これらの効果発現の細胞レベルでの機構の多くは，効果発現の場となる標的細胞表面にある，各刺激とその特異的受容体との結合，G蛋白による情報増幅と細胞内情報伝達物質を介して発現するものと考えられている。膵島B細胞の生理的刺激であるぶどう糖が受容体を介さず細胞内ATP産生を介してインシュリン放出を引き起こす（代謝説）機構は，一見，例外であるように考えられるが，甲状腺ホルモンやステロイドホルモンの細胞内受容体を考慮すれば，情報伝達系としては系統発生では早期から働いている機構であろうと考えられる。

上記の臓器相関に加えて，膵外分泌腺を構成する細胞間でも，膵島を構成する細胞間でもギャップ結合を介して低分子物質の交換が行われており，隣接細胞間相関が正常機能を保持している。

(1) 膵内分泌腺・外分泌腺の細胞間結合の構造と機能：胎生期発達を中心に

山本正夫（広島大・医）

膵内外分泌腺の細胞間結合装置はTight Junction (TJ), Intermediate Junction (ID), Desmosome (D) とGap Junction (GJ) からなる。膵外分泌部の導管系および腺房中心細胞はTJ, IJ, Dをもつが GJをもたない，腺房細胞はTJ, IJ, Dとよく発達したGJをもつ。それに対し，膵内分泌細胞は細片化した小型のTJ, IJ, D, GJを持つのみで前者と大きく異なる。胎生13－16日目膵原器は発達中の膵内分泌部と未分化な上皮細胞からなるが，胎生17日目未分化な膵上皮細胞から腺房細胞が分化する。これらの時期TJ, IJ, Dは概ね成体と同じであるが，GJは腺房細胞の分化に一致して出現し，Cell Compartmentを形成する。また急速なGJ蛋白の産生によりより大型の前駆GJ粒子が散在性，六角形配列そして通常のGJ粒子と，その粒子直径と配列を変えGJを完成させる。以上の結果はGJが細胞分化に重要な関与をもつことを示唆するものと考える。

(2) 膵外分泌を調節するCCKとアセチルコリンの作用；プロカインによる分別

菅野富夫，葉原芳昭（生理研）
池井暢浩（大塚製薬）

膵外分泌を調節する主な生理的刺激は，CCKとアセチルコリンである。局所麻酔剤，プロカイン(0.03-10mM)は，カルバコール刺激によるラット遊離膵腺房標本からのアミラーゼ分泌を抑制した。カルバコール用量とアミラーゼ分泌量との間の用量－反応に及ぼすプロカイン濃度の影響を定量的に解析して，プロカインがアセチルコリンとその受容体との結合を競合的に抑制し，このときのプロカインの親和定数は5.00＋0.08であることを明かにした。さらに，受容体結合実験の結果に基づき，プロカインがムスカリン受容体リガンドとその受容体との結合を競合的に抑制することを示し，このときのプロカインの結合定数を4.63＋0.10と算定した。プロカインは，3μM カルバコール刺激よって引き起こされる2相性細胞内カルシウムイオン濃度変動を，0.3μM カルバコール単独刺激によって引き起こされる振動性濃度変動に変えた。プロカイン(0.3-3mM)は，CCK-8刺激によるラット遊離膵腺房標本の細胞内カルシウムイオン濃度変動とアミラーゼ分泌反応にたいしては僅かの抑制を引き起こすにとどまった。

(3) 生理的分泌反応にIP_3とカルシウム動員は無関係か

葉原芳昭，菅野富夫（生理研）

CCK-8刺激で釣り鐘型の用量—分泌反応曲線が得られるが，上昇相でIP_3産生は認められず，下降相ではじめてIP_3産生が始まる。CCK誘導体のCCK-JMV-180は高濃度でも分泌抑制を起こさないが，この時IP_3産生も認められない。CCK-JMV-180による細胞内Ca^{2+}変動はPLC抑制薬で抑制されない。分泌刺激物質は高濃度で発癌遺伝子を発現させるが，CCK-JMV-180にはその作用は認められない。酸性線維芽細胞成長因子は細胞内Ca^{2+}を動かし，分泌も引き起こすが，用量－反応曲線の下降相に相当する分泌量しか惹起しない。細胞内Ca^{2+}が細胞障害に関係するという報告がある。

ラット膵腺房細胞のCCKリセプターは3種類に区別される。生理的濃度範囲の分泌刺激物質で活性化される低親和性リセプターは用量－反応曲線の上昇相に関係し，この時IP_3産生もCa^{2+}遊離も起こらないが，基底膜側－腺腔側勾配をもたらすCa^{2+}流入が持続的に発現する。高濃度の分泌刺激物質で活性化される超低親和生リセプターは用量－反応曲線の下降相に関係し，IP_3産生とCa^{2+}遊離が引き起こされる。Ca^{2+}遊離は細胞増殖や発癌遺伝子の発現および細胞障害に結びつくと考えられる。

(4) 温熱処理による細胞致死効果と細胞内カルシウムイオン濃度の変化

近藤　隆（神戸大・医）
葉原芳昭，菅野富夫（生理研）

培養腫瘍細胞における温熱ストレスによる細胞障害と細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化の関連について検討した。細胞外液 Ca^{2+} を除いてマウス乳癌 FM3A 細胞を温熱処理（42℃あるいは44℃）すると細胞内 Ca^{2+} 濃度は増加したが，細胞内 Ca^{2+} 遊離阻害剤である TMB-8 存在下ではこの増加は抑制された。一方，増殖培地中で温熱処理と TMB-8 を併用すると温熱細胞致死効果が増強されるとともに細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加した。これは主に Ca^{2+} 流入の増加に起因した。同様に温熱ストレス下ではカルシウムチャンネル遮断剤であるベラパミルおよびジルチアゼムも温熱処理と併用すると，温熱細胞致死効果が増強されるとともに Ca^{2+} 濃度が増加した。これらの結果は Ca 代謝阻害剤による温熱細胞致死効果の増強には細胞外 Ca^{2+} の流入とこれによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が関係することを示唆する。

(5) 膵内の NO (nitric oxide) 含有神経— VIP との共存—

下瀬川徹，鹿志村純也（東北大・医）

＊膵での NO 産生の可能性を探るため，NO 合成酵素の指標として，NADPH-diaphorase に対する組織化学法を用いて，その局在を検討した。また，vasoactive intestinal palypeptide (VIP) との共存についても検討を加えた。＊ Diaphorase 活性は，ラット，モルモット，イヌ，ヒトいずれの膵組織でも，神経と血管内皮に局在した。Diaphorase 陽性神経線維は主に外分泌部にび慢性に分布しており，膵内神経節細胞体には diaphorase の強い活性が認められた。神経線維の分布には，動物種により多少の相異が観察された。VIP 様免疫活性は，神経線維及び神経細胞体で，diaphorase 活性と共存した。＊以上の結果は，NO が膵内の神経と血管内皮で産生され，神経伝達物質あるいは EDRF として作用する可能性を形態学的に示唆し，cotransmither としての VIP との協調についても今後検討が必要と考えられた。

(6) 膵管閉塞膵炎モデルにおける膵外分泌機能について

大塩学而，岡田憲幸（京大・医）

ラット膵管（共通管）を閉塞し，急性浮腫性膵炎を作成し，この時の膵外分泌機能を in vivo と in vitro において検討した。共通管から採取した膵液のアミラーゼとリパーゼ値は，pancreatic-biliary diversion および CCK-8 の投与により著明に上昇した。しかし，6時間の膵管閉塞モデルではアミラーゼとリパーゼの分泌の上昇は著しく抑制された。また，これらのモデルより作成された膵腺房細胞を使った分泌試験では，CCK8 刺激によるアミラーゼ分泌は膵管閉塞モデルでは著しく抑制された。Calcium ionophore A23187 および phorbol myristate acetate による刺激においてもアミラーゼ分泌は膵管閉塞モデルでは著しく抑制された。以上より，ラット膵管閉塞モデルにおいては，膵外分泌機能は抑制されており，その機序としては hormon-receptor binding，細胞内カルシウムの上昇，protein kinase C activation 機構よりもさらに分泌過程の先の部分の障害と考えられた。

(7) 急性膵炎の臓器障害機構における腹腔マクロファージの関与

竹山宜典（神戸大・医）

急性膵炎時の腹腔マクロファージの動態につき実験的・臨床的に検討した。軽症膵炎モデルであるラット・セルレイン膵炎において腹腔マクロファージが活性化されていることを確認し，腫瘍壊死因子 (TNF-α) 分泌反応における lipopolysacchride 感受性がっ著明に亢進していることも見いだした。さらに，重症急性膵炎患者から採取した腹腔マクロファージの活性化現象も確認した。一方，重症急性膵炎モデルであるラット・DCA 膵炎の腹水上清中にラット初代培養肝細胞に対する障害活性を見いだした。この活性は臨床材料にも同様に認められた。さらに，これら両者の腹水中には高濃度の TGF-β が存在しており，TGF-β に対する特異抗体がこれらの肝細胞障害活性を用量依存的に阻害することを見いだした。以上の結果から，急性膵炎時には腹腔マクロファージが活性化されており，そこに LPS などの刺激が加わると大量のサイトカインを放出し，サイトカインカスケードによる過剰反応を介して臓器障害をもたらすと考えられた。さらに，大量に腹水中に放出された TGF-β が直接的に遠隔臓器を障害する可能性も示唆され，急性膵炎重症化機構における腹腔マクロファージの重要性が示唆された。

(8) 副腎皮質ホルモン分泌調節機構における細胞内カルシウムイオン動態の意義

山口賢一，藁科　彬（新潟大・医）
葉原芳昭，菅野富夫（生理研）

電解質コルチコイドであるアルドステロン (Aldo) の，副腎皮質球状層細胞からの分泌に，細胞内遊離カルシウム濃度 ($[Ca^{2+}]_c$) の増加が必須であることは，以下の諸事実によって示唆されている。(1) Aldo 分泌の主要な生理的因子であるアンギオテンシンⅡ (AⅡ) や K^+ イオンの増加による分泌反応は，細胞外液中の Ca^{2+} 除去や，lanthanum, nifedipine, verapamil 等の Ca^{2+} 阻害薬で抑制される。(2) AⅡや K^+ による $[Ca^{2+}]_c$ 上昇反応と Aldo 分泌反応の間には強い相関がある。(3)細胞膜を Ca^{2+} が自由に通過できるようにした状態で，外液中の Ca^{2+} 濃度を上げて $[Ca^{2+}]_c$ を高めると，これだけで Aldo 分泌反応が惹起される。

従って，“Aldo 分泌が，分泌された Aldo 自体による feedback (autocrine) 調節を受けるのか否か” と言う，ホルモン測定上からは検討困難な問題も，$[Ca^{2+}]_c$ を指標にすることで追求できる。従来 Aldo 分泌については long loop feedback 的調節が知られるのみであったが，今回この方法によって始めて，Aldo 自身を含む corticosteroids が Aldo 分泌を抑制する可能性が示唆された。

(9) Taurocholic acid による胆汁うっ滞モデルに対するセクレチンの効果

福本陽平（山口大・医）

セクレチンは胆管上皮細胞からの胆汁分泌を促進させ，肝細胞には作用しないと考えられている。しかし，胆汁うっ滞症においてセクレチンは治療効果を有することから，ラットに taurocholic acid (TCA) を過量に投与して胆汁うっ滞を起こさせ，セクレチンの有効性を検討した。セクレチンとしてセクレパンを0.25あるいは 0.50 units/min/kg 量を持続注入し，同時に TCA を投与量を増しながら持続的に静注した。対照群にはセクレパンに代えて生食水を投与した。対照群では TCA の最大排泄量 (1.2umol/min/100g) を越えるところで胆汁分泌量は減少したのに対して，実験群では有意差をもって上昇し，同時に胆汁中の総胆汁酸，重炭酸の排泄量も増加した。また，実験終了時の血中胆汁酸分画を液クロで分析したところ，血中 TCA 値も実験群で有意に減少した。この結果，胆汁うっ滞性病変では肝からの胆汁酸分泌にセクレチンが関与する可能性が示唆された。

5．クロム親和細胞：分泌現象の神経性調節

1993年9月9日～10日
代表者：小林　繁
世話人：菅野富夫，寺川　進

(1) ラット副腎髄質細胞の分泌応答における細胞内 Ca^{2+} ストアの関与
藁科　彬（新潟大・医）

(2) PC-12 細胞を用いた co-culture system ：神経終末と varicosity の形成
遠藤泰久，武井延之，尾垣広幸（京都工繊大）

(3) 細胞分化とカルシウム結合蛋白質
駒田拓也，田中利男（三重大・医）

(4) クロム親和細胞の開口放出におけるミオシン軽鎖キナーゼの役割
熊倉鴻之助，笹木君仁，今泉美佳（上智大・生命研）
櫻井　隆，中村清二，野々村禎昭（東大・医）
松田　譲（協和発酵・東京研）

(5) 副腎髄質クロム親和細胞における開口放出と細胞骨格構造変化，アドセパリン（74kDa 蛋白質）とアクチンフィラメント
櫻井　隆，中村清二，野々村禎昭（東大・医）

(6) クロマフィン細胞における分泌量調節の機構：リクルート膜仮説
寺川　進（浜松医大）
熊倉鴻之助（上智大・生命研）

(7) 個々の肥満細胞の脱顆粒の解析
秀　和泉（広島大・薬）

(8) クロム親和細胞の刺激・放出連関，SK & F96365 による解析
Busik Julia，葉原芳昭，菅野富夫（生理研）

(9) カテコールアミン生合成および分泌の調節機序におけるカムキナーゼⅡの役割
柳原延章（産業医大）

(10) 分泌顆粒に存在する NAP-22 の生化学的解析
前川昌平（東京大・理，精神・神経セ）
中村　俊（精神・神経セ）

(11) シナプトタグミンを欠失した PC12 細胞からのアセチルコリンの放出
笠井陽子，根本康夫，高橋正身（三菱化成・生命）

(12) 耳下腺 26kDa 蛋白質の修飾
杉谷博士，横山三紀，横山紀子（日大・松戸歯）

⑬ 神経終末分泌とニューロン回路網の synchronous oscillation 活動

黒田洋一郎，小林和夫（都神経研）

⑭ PC-12 細胞での ATP-誘発電流および細胞内 Ca 濃度上昇に対する，アデノシンによる G 蛋白依存性 dual-modulation

井上和秀（国立衛試）

G. Burnstock （ロンドン大学）

⑮ 培養新生シナプスを用いての伝達物質放出機構の解析

持田澄子，小林春雄（東京医大）

⑯ マウス副腎髄質の S-100 蛋白免疫陽性細胞と除神経によるその変化

飯野　哲，小林　繁（名古屋大・医）

【討論参加者】

小林　繁（名大・医），藁科　彬（新潟大・医），遠藤泰久（京都工繊大），駒田拓也，田中利男（三重大・医），熊倉鴻之助（上智大・生命研），桜井　隆，中村清二（東大・医），寺川　進（浜松医大），秀　和泉（広島大・薬），Busik Julis （生理研，総合大学院），葉原芳昭（生理研），菅野富夫（北大・獣医，生理研），柳原延章（産業医大），前川昌平（東大・理，精神・神経セ），笠井陽子，根本康夫，高橋正身（三菱化成・生命研），杉谷博士（日大・松戸歯），黒田洋一郎，小林和夫（都神経研），井上和秀（国立衛試），持田澄子，小林春男（東京医大），飯野　哲（名古屋大・医）

(1)　ラット副腎髄質細胞の分泌応答における細胞内 Ca^{2+} ストアの関与

藁科　彬（新潟大・医）

ラット灌流副腎髄質細胞の各種レセプター刺激に伴うカテコルアミン分泌の電気化学検出による測定と細胞内遊離 Ca^{2+} 濃度（$[Ca^{2+}]_i$）変動の蛍光色素法による計測から，分泌における細胞内 Ca^{2+} ストアの関与につき解析した。ムスカリン，ブラジキニン，ヒスタミンなどのレセプター刺激による分泌は，刺激初期の 2 － 3 分間にみられる一過性応答と刺激期間中持続する応答の 2 成分よりなる。外液 Ca^{2+} に対する依存性から，前者は細胞内ストアからの Ca^{2+} 遊離，後者は細胞外からの Ca^{2+} 流入に起因する応答と考えられた。外液 Ca^{2+} の不在のもとでは，上記のレセプター刺激により，その初期に，短時間で終息する鋭い $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が生じた。このレセプター刺激による応答は，カフェインによる分泌を抑える TMB-8 で影響されず，レセプター刺激後に産生される細胞内情報伝達物質（イノシトール 3 リン酸であると思われる）による Ca^{2+} 遊離によると考えられた。一方，TMB-8 は，正常外液中ではレセプター刺激による分泌の初期成

分を抑制し，低 Ca^{2+} 外液中では，初期相も含めほとんど全ての応答を消失させた。次に，外液低 pH (7.0-6.4) により，レセプター刺激と類似の二相性パターンをもつ分泌が誘導されたが，この初期相もやはり TMB-8 により強く抑制された。しかし，低 pH 刺激では，細胞内情報伝達物質による $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は認められなかった。以上の結果から，細胞内情報伝達物質による Ca^{2+} 遊離はそれ自身では，細胞膜近傍で，分泌を惹起するに十分な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を与えず，カフェイン感受性ストアの Ca^{2+} 遊離，細胞外からの Ca^{2+} 流入との協同を得てはじめて顕著な分泌応答につながるものと考えられる。一方，細胞内情報伝達物質を産生しない低 pH 刺激の場合でも，カフェイン感受性ストアは，Ca^{2+} 流入を引金とする Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release を引き起こし，分泌応に関与すると考えられる。

(2) PC-12 細胞を用いた co-culture system ：神経終末と varicosity の形成

遠藤泰久，武井延之，尾垣広幸（京都工繊大）

PC-12 細胞の co-culture 系を用い末梢自律神経系終末部の構築を試みている。その目的は①末梢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。高 K^+，Ca^{2+} やアセチルコリン刺激で non-synaptic な顆粒放出が見られる。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。そこで，この co-culture system に Schwann 細胞を導入し，その影響を形態学的に調べた。Schwann 細胞は，ラット座骨神経由来の初代培養系を用いた。この培養系には，Schwann 以外に Fibroblast がかなり多数含まれる。両者は形態的に容易に判別できるが，確認のために S-100 protein の免疫染色により Schwann 細胞の同定を行った。

Schwann 細胞との co-culture 系では，NGF を添加しなくても PC-12 は突起を伸長し，標的細胞として培養した insulinoma 細胞塊に突起を進入させた。Schwann 細胞は培養基質に用いた再構成 collagen gel 上で，非常に細長い紡錘形を呈し，しばしば長軸を同一方向にして配列する傾向がみられた。Schwann と PC-12 の突起との親和性は高く，走査電顕で観察すると，両者の突起が接触して走行している。透過電顕では，PC-12 の突起を Schwann の細胞突起が包み込んでいる状態もみられた。insulinoma 細胞塊の中においても，Schwann に包まれた PC-12 の突起がみられた。

PC-12 co-culture 系に Schwann を導入することにより，より生体に近い構造が構築可能である

ことが示された。Schwann 細胞は PC-12 細胞の突起伸長効果をもつとともに，その走行パターンにも影響を与えており，末梢自律神経系終末部の構築に重要な要素であることが示された。

(3) 細胞分化とカルシウム結合蛋白質

駒田拓也，田中利男（三重大・医）

カルシウムイオンが細胞の分化や増殖に深く関与していることはよく知られているが，その作用機序としてカルモデュリンや S100 蛋白質ファミリーなどのカルシウム結合蛋白質の関与が考えられている。最近，我々は新しい S100 蛋白質ファミリー (S100C) を分離精製し，cDNA クローニングにより全一次構造を決定した (FEBS Lett. 295 (1991) 93-96)。そこで今回は，PC12 cell の NGF による分化誘導や LLC-PK1 cell の同調培養により細胞分化，細胞周期における S100C の役割を解析した。PC12 cell が分化誘導されると初めて S100C の発現を認めた。しかしその発現時期は特徴があり，NGF 処理後 4 日目に mRNA レベルおよび蛋白質レベルの著しい上昇が明らかにされた。従来より，NGF による PC12 cell の分化において，42C, 42A, annexinII などの誘導が報告されているが，これらはすべて，分化過程の比較的早期に認められる。すなわち，S100C は PC12 cell の分化過程の後期に発現され，従来報告されているカルシウム結合蛋白質群とはその役割が異なると思われる。また，S100C は，LLC-PK1 cell の Starvation Method による G0 期同調培養にてその発現量が増加し，血清添加刺激による G0 期から S 期への細胞周期進展に伴い著明な減少を認めた。つまり，S100C が G0 期において発現の増加する唯一の S100 蛋白質であることが示された。これらの結果より S100C は，細胞周期依存性発現において他の S100 蛋白質ファミリーにはない特徴を示し，独自の役割が示唆された。

(4) クロム親和細胞の開口放出におけるミオシン軽鎖キナーゼの役割

熊倉鴻之助，笹木君仁，今泉美佳（上智大・生命研）
櫻井　隆，中村清二，野々村禎昭（東大・医）
松田　譲（協和発酵・東京研）

最近，クロマフィン細胞の Ca^{2+} 依存性開口放出は Ca^{2+} 感受性と MgATP 要求性が異なる 2 段階の反応系からなるツーステップによると示唆されている。第 1 ステップは Ca^{2+} で促進される MgATP 依存性のプライミング・ステップであり，第 2 ステップは MgATP 非依存的で Ca^{2+} により直ちに引き起こされる開口過程である。ここでは，顆粒の状態にはすでに第 1 ステップによっ

て放出部位にプライミングされ終えた顆粒のプール（プールBまたはプライムド・プール）と，まだプライミングを受けていないプール（プールA）が存在すると考えられている。Ca^{2+}濃度を急激に上昇させた時の高透過性細胞（leaky 細胞）からのCA放出のタイム・コースでは，まずプールBからのCa^{2+}依存性・ATP非依存性開口反応による速い放出が起こり，次いで第1ステップによりプールAからプールBにプライムまたは移行された顆粒からの放出が持続する。この2相の放出の前者は，Ca^{2+} 100μMで引き起こされ2分以内に終了するATP非依存性の放出として，また後者はCa^{2+} 10μMでATP存在下6分以上持続する放出として測定できる。

これまで我々はクロマフィン細胞からの開口放出に至るCa^{2+}依存性機構にMLCKが重要な一過程として関与することを示してきたが，さらにこのMLCKの役割をツーステップ・モデルにおいて明確にするため，ジギトニン処理により膜の透過性を高めた牛副腎髄質クロマフィン細胞を用いてMLCKの特異的阻害剤，Wortmannin及び活性阻害ペプチド，SM-1がそれぞれATP依存性とATP非依存性のカテコールアミン(CA)放出に及ぼす影響を検討した。細胞のジギトニン処理中にATPを添加しておくと，プライミング効果によりその後に添加したCa^{2+} 100μMで引き起こされるATP非依存性CA放出が増大するが，ジギトニン処理前にあらかじめWortmannin 10μMで前処理しておくと，このATPプライミング効果は打ち消された。またSM-1を370μMの濃度でジギトニンbufferに加え処理すると，Ca^{2+} 10μMによるATP依存性の放出は顕著な阻害を受けるが，ATP非依存性の放出は全く影響を受けなかった。これらの結果からMLCKは，ツーステップ・モデルにおけるATP依存性プライミング機構に必須と考えられる。また，ミオシンⅡの細胞内局在がアクチン・フィラメントの局在と良く一致することから，MLCKによって調節されるアクチン－ミオシン結合が重要な役割を持つと推察される。

(5) 副腎髄質クロム親和細胞における開口放出と細胞骨格構造変化 —アドセバリン（74kDa蛋白質）とアクチンフィラメント

櫻井　隆，中村清二，野々村禎昭（東大・医）

副腎髄質クロム親和細胞において細胞膜直下のアクチンフィラメントは開口放出の制御に関与していると考えられており，その構造変化が開口放出部位と一致して放出に先だって起こることが報告されている。我々はこの構造変化を引き起こす因子の候補として新しいカルシウム依存性アクチンフィラメント切断蛋白質（アドセバリン）をウシ副腎髄質より精製し，in vitroでのアクチンに対する作用・カルシウム依存性・リン脂質結合性をアドセバリンのドメイン構造と対応させながら検討してきた。アドセバリンは同様の活性をもつゲルゾリンと同じく生理的なカルシウム濃度で活性化されてアクチンフィラメントを切断し，その作用はイノシトールリン脂質により抑制されることが報告されている。また，特異的な抗体を用いた組織・細胞分布の検討では，

ゲルゾリンが広範囲の組織に存在するのに対してアドセバリンは副腎髄質，甲状腺，松果体，下垂体等の分泌組織・細胞に存在していることが明かとなった。さらに初代培養クロム親和細胞においてはアドセバリンはアクチンフィラメント同様細胞膜近傍に局在しており刺激によりアクチンフィラメントと同じ部位で局在変化を起こすことが観察された。

このようにアドセバリンは分泌細胞において分泌刺激時にアクチンフィラメント構造の変化を引き起こす因子の候補として有力なものと考えられるが，遺伝子の発現制御によりin vivoでのアドセバリンの作用を検討することを目的としてウシアドセバリンcDNAのクローニングを行った。この結果アドセバリンはアミノ酸レベルでゲルゾリンと60％同一であり，ゲルゾリンファミリーに属するアクチン切断蛋白質であると考えられる。現在，PC12にウシアドセバリンcDNAを強制発現させた細胞クローンを得たところであり，アドセバリンの発現レベルとアクチンフィラメント構造変化の関連及び分泌の変化を解析する予定である。

(6) クロマフィン細胞における分泌量調節の機構：リクルート膜仮説

寺川　進（浜松医大）
熊倉鴻之助（上智大・生命研）

副腎髄質のクロマフィン細胞を初代培養し，突起先端に形成された神経終末に起こるエキソサイトーシス反応を，ビデオ強化式の微分干渉顕微鏡下に１万２千倍の倍率で観察した。終末が他の細胞と接触することなく単独に在る場合は，エキソサイトーシス反応は終末の比較的広い領域にランダムに起きた。それぞれのエキソサイトーシスは単独反応で，Ω形の消失過程が速かった。これに対して，終末が他の細胞に接着している場合には，エキソサイトーシスは細胞間の接着面近傍に多く起きた。これとともに，エキソサイトーシス反応した顆粒の膨大化やΩ形の消失過程の遅延が起こり，残っているΩ形へ次の顆粒のエキソサイトーシス反応が継続して起こり，Ω形はかえって成長して１～2μmの大きさの陥没腔になり，さらに，多数のエキソサイトーシス反応がこの陥没腔に向かって起こるのが観察された。このように反応にフォーカスができる場合とそうでないときとのエキソサイトーシス頻度を単位面積あたり比較すると，前者は後者の10倍程度高いことがわかった。従って，何らかの栄養性因子によって狭い領域に反応が集中し分泌量の増大がもたらされる機構として，顆粒の膨大化とΩ形の消失速度の低下があると考えられる。陥没腔を形成する膜は，細胞深部の顆粒にエキソサイトーシス反応の場を与え，これらの顆粒をリクルートするので，リクルート膜とよび，これによって単位面積当りのエキソサイトーシス頻度が上昇するという考えをリクルート膜仮説とよぶことを提唱したい。

(7) 個々の肥満細胞の脱顆粒の解析

秀　和泉（広島大・医）

Sub-optimal の刺激で sub-maximal な分泌反応が生じる際の個々の肥満細胞の脱顆粒をフローサイトメトリーにより解析した。

肥満細胞からの分泌反応（%）は上清中に放出された hexosaminidase 活性より算出し，個々の細胞の脱顆粒はレーザー光線照射時の側方散乱光 (90°LS) により測定した。膜透過性細胞に GTP-γS と共に Ca^{2+} を導入し，あるいは無傷細胞に ionomycin で Ca^{2+} を取り込ませ約50%の分泌反応が生じた細胞集団には，最大の脱顆粒を起こした細胞と全く反応していない細胞がほぼ同数認められた。対照的に，phospholipase C を活性化し細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位から Ca^{2+} 動員を引き起こす compound48/80 で刺激した場合，すべての細胞が濃度依存的に部分的脱顆粒を起こすことが示された。

以上の結果から，個々の肥満細胞は Ca^{2+} に対する固有の閾値を持っており細胞内 Ca^{2+} 濃度が持続的に上昇してその閾値を満たすと，その細胞は一気に可能な限りの顆粒を放出する，すなわちこの反応は all-or-none であることが明かとなった。それに対し，細胞表面の受容体刺激では個々の細胞が部分的な脱顆粒を生じる。この場合，細胞内 Ca^{2+} の上昇は一過性であり，また C キナーゼ系の活性化など開口分泌の上流で様々な調節機構が働きうる。従って，本来 Ca^{2+} 結合蛋白質の活性化により細胞レベルで all-or-none の反応を起こす脱顆粒は，細胞表面の受容体刺激による Ca^{2+} 動態および更に何らかの情報伝達を介する機序によって顆粒レベルの調節を受ける可能性が示唆された。

(8) クロム親和細胞の刺激―放出連関，SK & F96365 による解析

Busik, Julia，葉原芳昭，菅野富夫（生理研）

細胞質カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_c$) が，副腎髄質クロム親和細胞の刺激－放出連関の細胞内シグナルとして重要な役割を演じていることは，広く認められている。$[Ca^{2+}]_c$ 上昇を引き起こす機構を解析するために，我々は，新しく開発された SK & F96365 を採用した。ラットから遊離した膵腺房標本に Fura-2 を取り込ませ，$[Ca^{2+}]_c$ 変動を持続的に記録した。これら標本の77%は自発的な $[Ca^{2+}]_c$ スパイク群が発生し，これらのスパイク群は細胞外液 Ca^{2+} の除去および 50μM SK & F96365 によって抑制された。Mn^{2+} クエンチング法によって得られた結果は，これらスパイクの発生は細胞内 Ca 貯蔵部位からの Ca^{2+} 遊離によるもので，遊離後，直ちに細胞外液から貯蔵部位へ Ca^{2+} が供給されることを示している。高 K^+ 液刺激（電位依存性 Ca^{2+} チャ

ネルが開く）および10μMニコチン刺激（ニコチ様受容体活性化）によって引き起こされる$[Ca^{2+}]_c$上昇は，細胞外液からのCa^{2+}流入によることを示す結果を得た。200μMメサコリン刺激（ムスカリン様受容体活性化）によって引き起こされる$[Ca^{2+}]_c$上昇は次の3相から構成されている。①細胞内Ca貯蔵部位からのCa^{2+}遊離によるもので，②それに続いて細胞外液から貯蔵部位へCa^{2+}が供給され，続いて③細胞外液からのCa^{2+}流入が持続する。

(9) カテコールアミン生合成及び分泌におけるカムキナーゼⅡの役割

柳原延章（産業医大）

Ca^{2+}／カルモジュリン依存性プロティンキナーゼⅡ（カムキナーゼⅡ）はその広範囲な基質特異性から，刺激に対応した細胞内Ca^{2+}の作用を伝達する重要な酵素と考えられる。

今回カテコールアミン生合成及び分泌におけるカムキナーゼⅡの役割を調べる目的で，ウシ副腎髄質細胞からこの酵素の分離・精製を試みた。(1)副腎髄質細胞の上清分画からDEAE-cellulose，カルモジュリンアフィニィティー及びSephacry1S-300カラムクロマトグラフィーによりカムキナーゼⅡを部分精製した。(2)このカムキナーゼⅡは抗ラット脳カムキナーゼⅡ抗体により免疫沈降した。又(3)カムキナーゼⅡはチロシン水酸化酵素や，クロマフィン顆粒膜に存在するいくつかの蛋白をリン酸化した。一方(4)培養副腎髄質細胞をアセチルコリン(ACh)で刺激すると，その細胞上清中のカムキナーゼⅡ活性（Ca^{2+}-independent活性）が増加した。この時AChによるカムキナーゼⅡの活性化は，そのタイムコース及び用量－作用曲線においてカテコールアミン分泌及びチロシン水酸化酵素の活性化のそれらと非常によく似ていた。

以上のことより副腎髄質細胞を刺激すると，カムキナーゼⅡの活性化が生じ，それがカテコールアミン分泌及び生合成の促進を引き起こす可能性が示唆された。

(10) 分泌顆粒に存在するNAP-22の生化学的解析

前川昌平，中村　俊（東大・理，精神・神経セ）

NAP-22は演者らによってラット脳より精製された酸性の膜結合性蛋白質であり脳神経組織に多く発現している。cDNAクローニングの結果はこの蛋白質が極めて親水性に富み疎水性領域を有しないことを示した。一方飯野らによる組織染色の結果はこの蛋白質がシナプス部特にシナプス小胞とシナプス前膜に局在することを明らかにし，細胞分画の結果もこの蛋白質が膜画分に存在することを示した。即ち，NAP-22はなんらかの翻訳後修飾をう受け膜に移行すると考えられ

たので今回この可能性について検討した。

脳より精製した，NAP-22 のN端がブロックされているという知見とアミノ酸配列の検討の結果，N端へのミリスチル酸付加の可能性が考えられた。そこでバキュロウイルスと昆虫培養細胞を用いた発現系でこの可能性を検討した。この発現系では NAP-22 は膜画分と共に可溶性画分にも発現がみられ脳組織の場合と異なっていた。膜画分の NAP-22 には確かにミリスチル酸の取り込みが見られたが可溶性画分の NAP-22 にもわずかながらミリスチル酸の付加が観察された。即ちミリスチル酸の付加は，NAP-22 の膜移行の必要条件ではあるが充分条件では無いと考えられる。NAP-22 のN端部分には塩基性アミノ酸残基のクラスターが存在するので細胞膜の酸性リン脂質との作用が考えられる。実際この部分を除去した改変体を大腸菌に発現させフォスファチジルセリンリポソームとの結合をみると除去によりリポソームとの結合能が低下することが分かった。

これらの知見より NAP-22 はN端部分で疎水性相互作用とイオン性相互作用の双方で膜成分と結合していると考えている。

(11) シナプトタグミンを欠失した PC12 細胞からのアセチルコリンの放出

笠井陽子，根本康夫，高橋正身（三菱化成・生命研）

シナプトタグミンはシナプス小胞膜，内分泌細胞の分泌顆粒膜に発現している分泌顆粒蛋白のひとつで神経伝達物質の遊離に重要な役割を果たしていると考えられている。これまでに，私どもはシナプトタグミンを欠失した PC12 変異細胞を分離して，Ca 依存性のカテコールアミン分泌にはシナプトタグミンが必須ではないことを示した。しかし PC12 細胞ではカテコールアミンは有芯顆粒に貯蔵されているため，それとは生合成の課程や蛋白組成が異なる，アセチルコリンを貯蔵するシナプス様小胞の開口放出にシナプトタグミンが関与しているか否かは明かではなかった。今回この問題を明らかにするためにアセチルコリン合成活性の高いシナプトタグミン欠失細胞を作り，アセチルコリン分泌能を調べた。この目的のために(1)アセチルコリン含量の多い PC12 細胞株に自然発生的に生じた欠失細胞を single cell cloning によって単離する。(2)以前確立したアセチルコリン含量の少ない欠失細胞にコリンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を恒常的に形質導入するという二つの異なる方法を用いて変異細胞を得たが，そのいずれの欠失細胞においても脱分極刺激で Ca 依存的なアセチルコリン分泌が引き起こされた。これらの結果から，シナプトタグミンは有芯顆粒のみならずシナプス様小胞の Ca 依存性開口放出にも必須ではなく，なんらかの制御的役割を果たしている可能性が高いと考えられる。

(12) 耳下腺 26kDa タンパク質の修飾

杉谷博士，横山三紀，横山紀子（日大・松戸歯）

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細胞内 cyclic AMP (cAMP) 濃度が上昇し，引き続いてアミラーゼの開口放出が惹起される。cAMP は10万 g 沈渣画分に存在する 26kDa タンパク質をリン酸化するが，このタンパク質がアデニリル化による修飾を受けることを検討した。さらにこの 26kDa タンパク質の脱リン酸化についても検討した。

【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 cAMP 存在下で [γ-^{32}P] ATP または [α-^{32}P] ATP と加温したのちホモジナイズし，その10万 g 沈渣画分を分離し，ラベルされたタンパク質を SDS-PAGE で分離した。

【結果】

26kDa タンパク質は [α-^{32}P] ATP を用いても，また [γ-^{32}P] ATP を用いても標識された。しかし，[α-^{32}P] ATP で標識された 26kDa タンパク質をヘビ毒ホスホジエステラーゼ処理すると，[^{32}P] AMP が遊離された。また [2, 8-^{3}H] ATP を用いた場合，約 26kDa の分子種が標識された。これらの結果から，26kDa タンパク質がリン酸化とアデニリル化の両修飾を受けることが示唆された。

リン酸化された 26kDa タンパク質の脱リン酸化については，オカダ酸に非感受性であった。また Mg^{2+} 要求性を示した。さらに recombinant 2C タンパク質脱リン酸化酵素の添加により，26kDa タンパク質の脱リン酸化は促進された。これらの結果より，26kDa タンパク質の脱リン酸化はホスファターゼ 2C により調節されていることが考えられた。

(13) 神経終末分泌とニューロン回路網の synchronous oscillation 活動

黒田洋一郎，小林和夫（都神経研）

記憶が保持されている大脳皮質連合野や海馬のニューロン回路の実体については，まだまだ不明の点が多い。Singer らは大脳皮質視覚領において同じ情報処理に携わる距離的に離れたニューロンの発火が synchronous oscillation を示すことを報告し，脳内ニューロン回路の基本的性質として注目された。

我々は大脳皮質や海馬の初代培養系で多数のシナプスを形成させる条件を見つけ，遺伝情報などに基づき in vitro で自己組織化されたニューロン回路網をつくらせることに成功した。

この大脳皮質ニューロン回路網のニューロン中の Ca^{2+} 濃度を fura-2 を用いた同時多点観察装

置を使って観察したところ，その上昇は synchronous oscillation を示した。この時のニューロンの電気活動を whole-cell putch clamp 法などで解析したところ，シナプス形成の指標となる Ca^{2+} の一過性の上昇の synchronous oscillation は，予想された通り，シナプス結合を介した多数のニューロンの同期した発火によっていることが解った。同期発火のメカニズムとして考えられる自発発火を起こす特定のペースメーカー・ニューロンは見いだされなかった。一方，発火と発火の間に，自発的な不規則な微小興奮性シナプス電流が不規則に観察され，これが多数の興奮性シナプス入力を受けているニューロンで確率的に conversion を起こし，これによる発火がシナプス結合している回路網全体に拡がることが考えられた。神経終末からの伝達物質分泌を抑制するアデノシン化合物の添加によってもこの発火の synchronous oscillation は阻止された。皮質ニューロン神経終末における自発的な伝達物質分泌が，系全体の synchronous oscillation を引き起こす可能性が示唆された。

(14) PC12 細胞での ATP 誘発電流および細胞内 Ca 濃度上昇に対する，アデノシンによる G 蛋白依存性 dual-modulation

井上和秀（国立衛試）
Geoffrey Burnstock （ロンドン大）

外液 ATP によって誘発される内向き電流および細胞内 Ca 濃度 ([Ca] i) 上昇に対する ATP 代謝物アデノシンによる dual-modulation について PC12 細胞を用いて検討した。

アデノシンは，30μMATP 誘発電流を，低濃度（< 1μM）では抑制し，高濃度（< 10μM）では増大した。これらの作用はともに百日咳毒素 (PTX, 2ng/ml, 20h) 処理，およびガラス電極内への GDPβS (500μM) 添加により完全に消失したことから，PTX 感受性 GTP 結合蛋白を介することが推察された。しかし，アデノシンによる抑制作用は蛋白質リン酸化酵素阻害剤 K-252a (1μM) 電極内添加により消失したが，増強作用は K-252a によりまったく影響を受けなかったことから，両者は互いに異なるメカニズムで ATP・カチオンチャネルを制御していると考えられる。

ATP はカチオンチャネルを活性化し，そこからの Ca 流入を促し，[Ca] i 上昇を引き起こし，その結果ドーパミンの放出を起こす (News Physiol. Sci., 7, 56-59, 1992)。このように，アデノシンによるカチオンチャネル変調作用は [Ca] i 上昇にも影響を及ぼしうる。実際，アデノシンは，ATP 誘発電流に対する作用とまったく同様，30μMATP による [Ca] i 上昇を低濃度（< 1μM）では抑制し，高濃度 (100μM) では増大し，これらの作用はともに百日咳毒素 (PTX, 2ng/ml, 20h) 処理により消失した。

以上，ATP 代謝物アデノシンは，PTX 感受性 GTP 結合蛋白を介し，ATP によるカチオンチャネルの活性化を低濃度（< 1μM）では抑制し，高濃度（< 10μM）では増大し，結果として

ATPによる[Ca]i上昇を制御する。これらATP-アデノシンクロストークは，黒田の提唱するシナプス形成メカニズム "central facilitasion lateral inhibition" を考察する上で興味深い。

(15) 培養新生シナプスを用いての伝達物質放出機構の解析

持田澄子，小林春雄（東京医大）

幼若ラット（生後7日）の上頸交感神経節細胞を単離し培養すると，培養3～4週間で隣接する細胞の60～80％にコリン作動性シナプスが形成されることが電気生理学的手法を用いて確認される。これまでに，神経終末からの伝達物質放出に関与する生体制御因子として生化学的に単離されている蛋白の局在を，シナプス小胞蛋白の一つであるsynaptophysinの免疫蛍光染色法によって確認される存在部位と比較して，このシナプス前終末に存在することを確認した上で，その機能を電気生理学的手法によって解析することを試みた。

1）シナプス小胞のdocking蛋白と考えられている終末膜のω-conotoxinに感受性のあるカルシウム・チャネルに結合したsyntaxinの抗体をシナプス前細胞に直接導入すると伝達物質放出が阻害された。

2）ミオシンの抗体はシナプス前終末にミオシンが限局して存在することを示し，シナプス前細胞に導入したミオシン抗体，ミオシン軽鎖キナーゼ阻害ペプチド，その特異的阻害剤は伝達物質放出を抑制した。

このように，細胞体が大きく，シナプス部位までの距離が短いモデル・シナプスを形成させ，そのシナプス前細胞に抗体など分子量の大きな物質を直接導入する方法を用いることによって，今まで困難であったシナプス終末内での伝達物質放出制御蛋白の機能解析が可能となった。

(16) マウス副腎髄質のS-100蛋白質免疫陽性細胞と除神経によるその変化

飯野　哲，小林　繁（名古屋大・医）

マウス副腎髄質ではS-100蛋白質は支持細胞とシュワン細胞にある。S-100蛋白質免疫陽性細胞は神経線維を包む。クロム親和細胞についてはアドレナリン細胞よりもノルアドレナリン細胞を密に取り巻いている。S-100蛋白質免疫陽性細胞と神経の機能的相互関係を調べる目的で副腎髄質に入る神経を切除し，形態変化を免疫組織化学的に観察した。

除神経を行った副腎髄質髄質では神経線維は術後2日目から消失しはじめた。S-100蛋白質免疫陽性細胞は4日目から変化しはじめた。副腎髄質内で束をなしていた神経線維の周りのシュワ

ン細胞の免疫活性は低下あるいは消失した。クロム親和細胞を囲んでいた支持細胞の免疫活性も低下した。支持細胞の核周囲部には免疫活性は残るが，細胞質突起からは免疫活性が低下した。正常副腎髄質で観察される支持細胞同士の作る網目構造は不明瞭となった。これらの変化は術後7－14日目に最も顕著だった。その後次第に免疫活性は回復した。これと同時に神経線維も髄質内に入り込むようになった。術後30日目でほぼ対照副腎髄質と変わらないS-100蛋白質免疫陽性細胞が観察できた。

マウス副腎髄質では，シュワン細胞と支持細胞のS-100蛋白質免疫活性は神経依存性であった。除神経で免疫活性は低下し，神経の再生で再び増加したと考えられる。

6．大脳皮質聴覚領の機能と形態の特異性

1993年11月17日～18日
代表者：谷口郁雄（東京医歯大・難研）
世話人：山岸俊一

(1) 光学的計測法による聴覚野の機能構築の解析
堀川順生，細川　浩，谷口郁雄（東医歯大・難研）

(2) ニホンザルの聴覚野ニューロンの機能的性質
力丸　裕（理研国際フロンティア）

(3) SQUID による聴覚中枢の機能的解析
林　　実（NTT 基礎研）

(4) 言語処理の機能構築，PET による解析
岩田　誠（東大医）

(5) 体性感覚の階層的処理
岩村吉晃（東邦大・医）

(6) 空間認知と空間言語
泰羅雅登，酒田英夫（日本大・医）

(7) 1次聴覚皮質からの情報の収斂と発散
小島久幸，He Jufang（理研国際フロンティア）

(8) 哺乳類聴覚野の比較解剖
工藤　基（金沢大・医）

(9) トリの聴覚―発声機構と学習
斎藤　望（獨協医大）

(10) チンパンジーの聴覚認知
小嶋祥三，橋彌和秀（京大・霊長研）

【参加者】

岩村吉晃，泰羅雅登，岩田　誠，力丸　裕，斎藤　望，橋本　享，堀川順生，谷口郁雄，工藤基，小島久幸，亀田和夫，森　浩一，青木　清，林　　実，小嶋祥三，筧　一彦，鎌田　勉，矢島幸雄，田中康夫，村田計一，棚橋汀路，宇野宏幸，He Jufang，浅沼　厚，平原達也，宇野　彰，細川　浩，服部　琢，橋彌和秀，山岸俊一

【研究会概要】

大脳聴覚皮質の機能を探る目的で，分野および研究方法の異なる研究者が集って学際的な研究

会を開催した。この研究会では，主題として特に次の3点に注目した。(1)聴覚とは異なるモダリティの感覚系で明らかにされている機能的構造や処理様式が，そのアナロジーとして聴覚系でも認められるかどうか，(2)哺乳類とトリのように，異なる種の間での聴覚皮質の機能と構造の比較，(3)微小電極法でこれまでに得られた皮質の機能と構造に関するデータと，光学的計測法や脳磁図，PET などの新しい手法によって得られたデータとの比較。研究会での報告は，哺乳類聴覚皮質の機能構築の解析や，体性感覚皮質での階層的処理，頭頂連合野の空間認知，トリの発声機構と学習など聴覚系とは異なる感覚系や運動系にもわたり，研究手法も光学的計測法，SQUID, PET，微小電極法，解剖学的手法および心理学的手法と多岐にわたっている。また，サルにおける聴覚認知機構やヒトの聴覚中枢および言語処理の機能構築についての報告があり，活発な討論が行われた。

(1) 光学的計測法による聴覚野の機能構築の解析

堀川順生，細川　浩，谷口郁雄（東京医歯大・難研・聴覚情報）

光学的計測法には神経活動の時空間的パターンをリアルタイムで計測することができるという利点がある。我々は，電位感受性色素 (RH795) と 12x12 チャンネルのフォトダイオードアレイを用いて，モルモットの聴覚皮質の活動を in vivo で，光学的に計測した。今回は次の4点に関する実験結果について報告する。(1)複数の領域での純音に対する周波数局在 (tonotopic organization)，(2) FM 音に対する聴覚皮質活動の時空間的パターン，(3)聴覚皮質における両耳性活動の時空間的パターン，(4)光学的な神経応答に対する $GABA_A$ 阻害剤や NMDA 型および non-NMDA 型拮抗阻害剤の影響。この光学的方法を用いて初めて，時間的に変化する聴覚皮質の活動部位が画像として捉えられた。この時間の要素は，聴覚系の特徴である時系列入力の処理機構を考える上で重要な意味をもつと思われる。

(2) ニホンザルの聴覚野ニューロンの機能的性質：トノトピー VS. 時間的反応パターン，場所ピッチ VS. 時間ピッチ

力丸　裕（理研・国際フロンティア）

ニホンザルの一次聴覚野 (AI) ニューロンの反応をホワイトノイズ・バーストとトーン・バーストを刺激音として笑気麻酔下で調べた。AI ニューロンは，1）域値レベルで前後方向にトノトピシティーを示し，2）域値上レベルでは刺激の周波数や強さによって複雑な反応パターンを

示し，3）多くの場合継続型，あるいはポーザー型の反応で，オン型反応は殆ど示さなかった。本結果は一つのAIニューロンが異なった周波数に異なった時間的反応パターンで反応する，即ち，異なった周波数が異なった時間区間にコードされる可能性を示唆している。次に，時間ピッチ（ミッシング・ファンダメンタル）と場所ピッチとの聴覚中枢での統合の有無を低周波音とその高調波を用いて調べた。この結果，低周波領域のAIニューロンでは既に時間ピッチが場所ピッチと統合されている事が判明した。AIのユニット活動と聴性誘発脳磁場を含む聴性誘発反応との関係についても検討した。

(3) SQUIDによる聴覚中枢の機能的解析

林　　実（NTT基礎研究所）

聴覚中枢の機能を解明する様々な手法の1つに，高い時間分解能を有する脳磁界計測がある。聴覚誘発磁界計測から得られる情報に，磁界反応からの時間情報と等価電流双極子からの空間情報がある。これまでの実験結果で，時間情報からは，単音節や連続音節の時系列信号に対して，子音から母音に推移する変化時点と聴覚誘発磁界M100成分とは明確な対応関係があることを明らかにした。また空間情報からは，母音及び純音に対する聴覚誘発磁界M100成分は，左右側頭部で非対称な反応を示し，その等価電流双極子の推定位置は，両側頭部共時間の推移とともに前方斜下に移動し，その間母音は純音よりも浅い位置に推定されたことを明らかにした。聴覚誘発磁界の解析により聴覚中枢の活動時間や活動部位が推定できるが，聴覚情報処理機能に踏み込んで論ずるには，他の研究手法による結果との比較検討が不可欠である。

(4) 言語処理の機能構築，PETによる解析

岩田　誠（東京大・医・神経内科）

言語の脳機能についての最も実りある研究成果は，局所脳損傷による言語機能障害，すなわち失語症の研究から得られてきた。近年，画像診断技術の発達によって，病理解剖を待つことなく容易に病変部位を確定することができるようになり，多くの貴重な所見が得られるに至った。一方，正常者の脳活動の観察も重要な研究方法である。これには様々な方法があるが，現在広く行われているのは，半減期の短い$H_2{}^{15}O$-PETスキャンによるactivation studyである。特定の言語活動を行っている間にbolus injectionしたポジトロン核種の脳内分布を観察することによって各領域の局所脳血流量を測定し，その活動を営む間に賦活された大脳領域を同定するという方法で

ある。今回は，我々が行ってきた日本語の読みの神経機構についての $H_2{}^{15}O$-PET スキャンによる activation stydy の結果について紹介したい。

(5) 体性感覚の階層的処理

岩村吉晃（東邦大・医・第一生理）

手からの体性感覚情報は，1）手に触れた物体の認識，2）手の触運動遂行に重要である。体性感覚野での情報処理には階層構造があって，単純から複雑への受容野特性の変化がみられるが，情報処理の道筋には少なくとも二つの系統があり，ひとつは物体を操作する手の動きをコントロールし，他は対象の特徴を抽出するものである。ふたつのシステムはともに3野の提供する初期情報に依存していて，1野から2野にかけて分布し，その分布は空間的にかならずしも分離していないので，視覚連合野のように明確な独立領野としては存在しない。おそらくたがいに連携しつつしかし独立の情報処理過程として存在しているのであろう。この2つのシステムの提供する情報にもとずき，運動野を介して手の運動のコントロールが，そしておそらく頭頂連合野で，より高次の触物体の認識がおこなわれると考えられる。

(6) 空間認知と空間言語

泰羅雅登，酒田英夫（日本大・医・第一生理）

最近の頭頂連合野とその周辺の神経生理学的研究によって空間的知覚現象に対応するニューロン活動が記録されている。そしてその様な知覚関連ニューロンの活動は例えば運動視に関しては近づく，離れる，右に回る，左に回るというように言葉で置き換えられるようなかなり抽象化された情報を表している場合が多い。最近手の操作運動に関連した頭頂連合野ニューロンの活動を調べているうちに球，円柱，立方体などいくつかの基本型のどれか一つの視覚的に反応する細胞や長い棒やプレートの特定の傾きに選択的に反応する細胞が発見された。これらのニューロン活動が表すのは縦，横，斜めなど言葉で表現できる情報である。従って頭頂連合野のニューロン群は，3次元物体の空間的特徴を言語で置き換え可能なレベルまで圧縮して表現していると見ることができる。

(7) 1次聴覚皮質からの情報の収斂と発散

小島久幸，He Jufang（理化学研究所・国際フロンティア）

動物の音声は単一の周波数から成りたっているのではなく，複数の周波数が組み合わさった複合音である。等周波数帯はこのような複合音の処理に如何に関与しているのであろうか。本研究では形態学的手法を用いて一次聴覚皮質およびその周辺聴覚皮質での複合音処理に関与するであろう機能構造を探った。即ち聴覚皮質内で異なる最適周波数を表す複数の小領域から由来する投射がどのように関与しているかについて調べた。

PHA-Lとバイオサイチンをネコ一次聴覚皮質の異なる周波数を表す2個の等周波数帯の小領域に注入した。異なる発色反応をおこない両注入部位から由来する神経繊維を区別した。1次聴覚皮質では両繊維の分布はほぼ背腹方向に投射し殆ど重複しなかったが，シルビウス上溝に近接するDorsal Zoneにおいて著しい重複がみられた。従いこの領域において1次聴覚皮質由来の情報の収斂がおこっていると考えられる。

(8) 哺乳類聴覚野の比較解剖

工藤　基（金沢大・医・第3解剖）

哺乳類の大脳皮質聴覚野は，動物種差がきわめて大きい。また，種々の技術的困難性から現在までに得られている知見はまだ少なく，種間の相同関係も決し難い。歴史的には聴覚生理学領域では，実験動物としてネコが最もよく使われてきたが，ヒト聴覚野の動物モデルとして適当かどうかはおおいに疑問がある。音声交信をする霊長類モデルとして好適のマーモセット（新世界サル）を用いた，同一個体聴覚野のマッピングと神経線維連絡の研究結果をまず示す。次に哺乳類の原型（プロトタイプ）として，原始有袋類3種，Didelphis（北米産オポッサム），Monodelphis（中南米産オポッサム）およびDasyurus（オーストラリア産フクロネコ）の視床終脳機構に共通してみられる神経解剖学的所見から，新皮質聴覚野の進化的起源を考察する。なお，これらの研究は，フロリダ州立大学のBruce Masterton, Karen Glendeningメルボルン　モナッシュ大学のLindsay Aitkin, Dexter Irvine, John Nelson等の諸氏との国際共同プロジェクトによりおこなわれた。

(9) トリの聴覚—発声機構と学習

斎藤　望（獨協医大・第二生理）

ある種の鳴鳥類は外界から与えられた歌モデルを学習する。この行動はヒトが言語学習するのに類似しているので，ヒトの言語学習の，モデルとして興味深い。この観点から鳴鳥類の歌学習について述べる。

鳴鳥類が音声学習する場合，外界からの歌モデルを脳内に鋳型(template)として内在化する。その後一定期間経過してから鋳型に照合して自らの発声パターンを調整する。歌モデルについての好みがあり，種に偏向したモデルのみを入力する：①初めの段階で，受け入れるモデルを選択するためのレベルと：②そのモデルを精密に模写するレベルがある。２つのレベルによって音声モデルは知覚される。この２つのレベルは脳内発声中枢核群のうち２つの核に機能分化され，聴覚情報は並列処理されて歌学習すると仮定される。その２核は聴覚反応に大きな差がみられ，また行動学的にもそれらの核が聴覚認識に関係していることが実証され，上述の仮定と矛盾がない。

(10) チンパンジーの聴覚認知

小嶋祥三，橋彌和秀（京大・霊長研・行動神経）

一般にヒト以外の霊長類では，ボノボを除くと，聴覚認知の研究が遅れている。その最大の理由は音響刺激に基づく反応の分化，とくにYes/No型の分化が困難な点にある。今回はこの問題に，チンパンジーにおける聴覚－視覚のモダリティ間マッチングを検討することにより接近した。見本刺激は音をだす様々な物体の音，テスト刺激はその物体の映像である。見本刺激は初めは実際の音や録音した音を使用した。テスト刺激の映像はレイザーディスクよりモニターに提示した。２肢選択の形をとったが，反応はモニターに装備されたタッチ・パネルにより検出した。１頭のチンパンジーで，まず音のでる物体－物体間のマッチングを行い，モダリティの比較，訓練方法の検討，音の類似性の影響などを調べた。また短期的な記憶を検討した後に，録音した音響刺激を用いて人－物体間のマッチングを調べた。音響刺激だけでそれを生成したものが人か物かが分かるかを検討した。

7．第13回睡眠促進物質研究会

1993年11月30日～12月１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) 睡眠研究の組織化についての提案(1)

井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

(2) レム睡眠生成における大域的脱抑制仮説について

山本光璋，中尾光之，水谷好成，児玉　亨（東北大・情報科学研究科，東京都神経研）

(3) 脳幹のアセチルコリンニューロンは覚醒系としても働くか？―感覚刺激に対する応答による解析

香山雪彦，小山純生（福島県立医大）

(4) ラット視束前野の睡眠関連ニューロンへのノルアドレナリンの作用

大坂寿雅，松村人志，早石　修（大阪バイオサイエンス研）

(5) ラット視床下部スライスニューロンの自発放電におよぼすビタミン B_{12} の効果

本多和樹，孫　久榮，池田真行，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

(6) ウリジン受容体結合活性からみた睡眠機構における視床の役割

木村敏行，小川祐美子，高橋藤代，渡辺和人，近藤繁美，山本郁男（北陸大・薬，日水製薬）

(7) FGF の記憶促進と老化脳制御

大村　裕（日本臓器製薬・生物活性研）

(8) プロスタグランジン D_2 の睡眠促進作用に関する作用部位について

松村人志，中島智子，大坂寿雅，川瀬隊子，久保悦子，佐藤伸介，サチ・スリ・カンタ，早石　修（大阪バイオサイエンス研）

(9) ウイルス感染によって増加する睡眠の分子機構解析

木村昌由美（東京医歯大・医用器材研）

(10) ラット概日活動に対するビタミン B_{12}（メチルコバラミン）のリズム修飾作用

池田真行，本多和樹，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

(11) Sleep in female cycling rats

張　士青，木村昌由美，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

(12) 睡眠研究の組織化についての提案(2)

全出席者

【参加者】

池田真行，井上昌次郎，木村昌由美，張　士青，本多和樹（東京医歯大・医用器材研），尾崎　毅，山岸俊一，ほか３名（生理研），大坂寿雅，松村人志（大阪バイオサイエンス研），木村敏行，山本郁男（北陸大・薬），神山　潤，長谷川毅（東京医歯大・医），大村　裕（日本臓器製薬・生物活性研），岡野善郎（久留米大・医），加藤進昌（滋賀医大），香山雪彦（福島県立医大），児玉亨（東京都神経研），塩見浩人（福山大・薬），仁科秀則（東大・医），山本光璋（東北大・情報科学研究科）

【研究会の概要】

今年度も前年度とほぼ同じ規模の集会となり，常連の出席者に加えて，２名の新人の参加があった。今回の研究発表の特徴は，睡眠物質の作用部位を脳内の局所的な神経構造と関連づけて解析した研究がふえたこと，睡眠時のニューロン活動を時系列として実験的あるいは数理的に解析する試みが成功したこと，ウイルス感染，発情周期，体温リズムのような巨視レベルの生体機能，あるいは，レセプター機構のような微視レベルの生体機能と睡眠物質といったヴァラエティに富むテーマが紹介されたことであろう。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職員会館２階特別室で開催して好評であった。

(1)　睡眠研究の組織化についての提案(1)(2)

井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

睡眠促進物質研究会は今年度で第13回を数えた。そのうち初期の研究会は，睡眠促進物質SPSの探究に関する作戦会議の機能を果たした。つづく一時期は，ぞくぞくと登場した睡眠物質候補に共通する基本的な特性を解明したり，各分野の研究者が情報を交換し共同研究を摸索したりする場を提供した。その結果，わが国は世界有数の睡眠物質研究のメッカとなった。こうして，これまでこの研究会は，この分野の脳科学を支える重要な役割を果たしたのである。では，これからこの研究会が未来に向かって演じるべき役割は何であろうか。その現実的な解答として，文部省重点領域研究に応募するための母体となるのはいかがであろうか。このような趣旨の提案をしたところ，参加者全員の同意が得られた。

(2) レム睡眠生成における大域的脱抑制仮説について

山本光璋，中尾光之，水谷好成（東北大・情報科学研究科）
児玉　亨（東京都神経研）

われわれは，中脳網様体，視床腹側基底核，大脳皮質体性感覚野，海馬等における単一ニューロン活動のスペクトル構造が，ノンレム睡眠からレム睡眠への遷移にさいし，白色雑音様から1/f様に変化する現象を見いだした。PCPAを用いたセロトニンの枯渇実験と，セロトニンの作動薬及びアセチルコリンの拮抗薬の投与実験により，この現象の背景にセロトニン系からの脱抑制とコリン系による活性化現象が存在するという作業仮説を立てた。そこで，セロトニン系を模擬した抑制性の共通入力とコリン系を模擬した互いに独立なランダムノイズ入力を持つ，多数ニューロン素子の相互結合型ニューラルネットワークモデルの時間発展のスペクトル構造を調べてみた。その結果，共通の抑制性入力を大から小へと変化させると，スペクトルが白色雑音様から1/f様に変化することを認めた。またこのさい，ランダムノイズの分散を適当な大きさに保つことが必要であることも示された。以上により，ニューラルネットワーク上では作業仮説を肯定する結果が得られた。

(3) 脳幹のアセチルコリンニューロンは覚醒系としても働くか？
—感覚刺激に対する応答による解析

香山雪彦，小山純生（福島県立医大）

40年以上前に覚醒を維持する神経機構として上行性網様体賦活系説が提唱されたが，明確な証拠のないままこの系はアセチルコリン(ACh)を伝達物質として働くと考えられた。一方，脳幹のAChニューロンは逆説睡眠の神経機構として働いている可能性が示された。外背側被蓋核などのAChニューロンの自発活動の睡眠覚醒にともなう変化を観察することにより，後者は証明されたが，AChニューロンは均質な細胞群ではないため，このことは前者を否定することにはならない。そこでわれわれは，スパイクの形と記録場所で同定されたAChニューロンの感覚刺激に対する反応を覚醒ラットで記録することにより前者の可能性を調べた。これらのニューロンの2/3は，その睡眠覚醒にかかわる性質にかかわらず相動性反応を示し，その反応は刺激の繰り返しにより減弱するものが多かった。これらは新奇刺激による覚醒レベルの一時的な上昇にかかわるものと考えられる。

(4) ラット視束前野の睡眠関連ニューロンへのノルアドレナリンの作用

大坂寿雅，松村人志，早石　修（大阪バイオサイエンス研）

視束前野にノルアドレナリンを注入すると覚醒する。この機序を調べるためにラット睡眠関連ニューロンに対するノルアドレナリン作動薬の効果を多連微小ピペット法で調べた。ノルアドレナリン(1mM)の投与によって，8個の睡眠時活動ニューロンのうち5個が抑制され，残りの3個は反応しなかった。α_2作動薬のクロニジンの投与によって，7個の睡眠時活動ニューロンのうち5個が抑制され，残りの2個は反応しなかった。α_1作動薬のメトキサミンやβ作動薬のイソプロテレノールによって影響された睡眠時活動ニューロンはなかった。25個の睡眠覚醒に相関のないニューロンのうち15個はノルアドレナリンを投与しても反応せず，5個は抑制され，また興奮した細胞も5個あった。抑制反応はα_2受容体を介しており，興奮反応はα_1受容体を介していることが示唆された。これらの結果から，視束前野に注入されたノルアドレナリンはα_2受容体を介して睡眠時活動ニューロンを抑制することにより覚醒を促すことが示唆された。

(5) ラット視床下部スライスニューロンにおよぼすビタミン B_{12} の効果

本多和樹，孫　久榮，池田真行，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研）

ビタミンB_{12}（メコバラミン，VB_{12}）を雄ラットの脳室内に暗期連続注入すると，睡眠-覚醒および体温リズムを修飾する効果があることをわれわれは既に報告している。そこで，本研究ではVB_{12}の脳内作用機構を理解する目的で，ニューロンの自発発火活動にたいする効果をラット視床下部スライス標本を用いて調べた。記録した49個のニューロンのうち，約20％はVB_{12}によって自発発火活動が抑制され，約30％は促進された。残りのニューロンにはVB_{12}投与による変化がほとんどなかった。VB_{12}によって抑制されたニューロンの約半数は視交叉上核(SCN)に，残りの半数は広く内側視束前野(MPOA)に分布していた。VB_{12}によって促進されたニューロンの約67％はMPOAに分布していた。したがってVB_{12}はSCNおよびMPOAに存在するニューロンに直接作用することが明らかとなり，VB_{12}の睡眠-覚醒あるいは体温リズムへの修飾作用に，視床下部の神経機構が何らかの役割をもつ可能性が示唆された。

(6) ウリジン受容体結合活性からみた睡眠機構における視床の役割

木村敏行，小川祐美子，高橋藤代，渡辺和人，山本郁男（北陸大・薬）
近藤繁美（日水製薬）

ウリジンは睡眠促進物質であり，その誘導体の N^3-フェナシルウリジンはマウス脳室内投与で催眠作用を発現させる。これまでわれわれは，ウリジン誘導体の催眠作用発現メカニズムを解明する目的で受容体結合実験を行ってきた。その結果，催眠作用発現に一部 GABA-ベンゾジアゼピン受容体複合体および 5-HT 受容体が関与することを示唆した。しかしながら，N^3-フェナシルウリジンの GABA-ベンゾジアゼピン受容体複合体，5-HT 受容体に対する親和性は低いことから，その他の作用部位，すなわちウリジン受容体の存在が想定され，[^{3}H] ウリジンをリガンドとして，ウシ大脳皮質シナプス膜に対する結合能を報告してきた。今回，ウシ視床シナプス膜を用いて [^{3}H] ウリジンの結合量を測定し，その存在を確かめた。[^{3}H] ウリジン 1 － 40nM をウシ視床シナプス膜 0.2 － 0.4mg protein，取込み阻害剤のジピリダモール 100μM 存在下，4℃，5 分間インキュベート，反応液を遠心法により分離した。沈澱したタンパクは NCS Tissue Solubilizer により可溶化し，液体シンチレーションカウンターにより放射能を測定した。[^{3}H] ウリジンは視床シナプス膜へ用量依存的に結合し，その結合量は大脳皮質シナプス膜に比べて有意に高かった。この結果は，シナプス膜上にウリジンに結合する部位があり，とくに視床で高い結合量が認められたことより，この部位がウリジンおよびウリジン誘導体の中枢抑制作用に関連しているものと推測される。従来，5-HT と睡眠との関係が報告されているのでウリジン受容体が睡眠において何らかの役割をはたしている可能性が推測される。

(7) FGF の記憶促進と老化脳制御

大村　裕（日本臓器製薬・生物活性研）

摂食により上衣細胞から放出された酸性線維芽細胞成長因子 (aFGF) は，脳実質を拡散して海馬に到達し，このニューロンに aFGF 受容器を介して取り込まれ，学習記憶を促進させる。SAM (senescence-accelerated mouse) P-8 は生後 1 か月から種々の身体的老化症状を現わすと同時に学習記憶能力も低下し始め，時間の経過とともに増悪して行く。生後 3 週間目から，aFGF を 1 週 1 回皮下投与 (7μg (0.5nmol)/kg) し，9 カ月間継続した。学習記憶に関しては，受動回避学習および Morris 水迷路学習による，情動および空間記憶のテストをそれぞれ毎月 1 回実施した（♂10匹，♀10匹）。i）aFGF 投与の P-8 は雌雄共に 9 カ月間有意に学習記憶が促進された。これは対照の非老促進マウス R-8 に対する記憶促進効果と同じであった。これに対し，P-8 に生

理塩水 (BSA) 投与群では記憶障害状態を維持した。ii）抗 choline acetyltransferase (CAT) 抗体による免疫組織学的検索では内側中隔のコリン作動性ニューロン数は，P-8 で15％の有意の減少に対し，aFGF 群は R-8 と同程度であった。ニューロン内 CAT 濃度は，P-8 の aFGF 投与群 (n = 1179) は R-8 群の 1 に比し平均 0.67% level, BSA 群 (n = 892) では平均 0.47% level で，BSA 群で CAT 濃度は有意に低下した。これに対しマイナート核内 CAT ニューロン数および CAT 濃度には変化はなかった。iii）海馬内および大脳皮質内ムスカリン受容器密度は，aFGF 群で BSA 群に比し有意に高かった。NMDA 受容器密度は，海馬内で aFGF 群が BSA 群に比し高いが，有意ではなかった。しかし皮質内では aFGF 投与群は BSA 群に比し有意に高かった。iv）脳全体の MA0-B 活性は P-8 で，BSA 群は aFGF 群に比し有意に高かった。v）aFGF の分画，aFGF1-15 の CSF 中濃度。ラットに aFGF (7μg/kg) 皮下投与13時間後，CSF 中の aFGF1-15 濃度は約10倍と有意に増加した。以上の結果から，aFGF は内側中隔内コリン作動性ニューロンの活動を正常の方向に回復させることによって，記憶障害を完全に正常化していることが判明した。これによって海馬ニューロンのムスカリン受容器濃度も正常方向に向かい，中隔-海馬の記憶回路が正常化したため記憶低下を阻止できたのである。

(8) プロスタグランジン D_2 の睡眠促進作用に関する作用部位について

松村人志，中島智子，大坂寿雅，川瀬隊子，久保悦子，佐藤伸介，
サチ・スリ・カンタ，早石　修（大阪バイオサイエンス研究所）

プロスタグランジン (PG) D_2 の睡眠促進作用に関する作用部位を，無麻酔・無拘束ラットにおいて，脳内への PGD_2 の投与実験により求めた。PGD_2 投与はラットの活動期である夜間に行った（23時―05時）。投与法としては，マイクロダイアリシス法と持続微量注入法を用いた。正中の部位以外は両側投与を行った。マイクロダイアリシス法では，視束前野からさらに吻側の前脳基底部への投与で，また持続微量注入法においては，脳室内投与のみならず，脳底部への投与でも睡眠量の増加がみられた。とくに，前脳基底部の視束前野よりやや吻側部の脳底に持続注入した際に，際立った睡眠促進作用が見られ，徐波睡眠量は日中の睡眠と同等量にまで増加，逆説睡眠も遅れて増加がみられた。これらの結果から，PGD_2 の睡眠促進作用に関する作用部位は，視束前野より吻側の前脳基底部の，とりわけ腹側部に存在していることが示唆された。

(9) ウイルス感染によって増加する睡眠の分子機構解析

木村昌由美（東京医歯大・医用器材研）

われわれは体験的にも風邪をひくと眠気が増加することを知っている。しかしこの生理・病理的現象は，つい最近まで実験的には不明であった。家兎を用いた動物モデルで，マウスのインフルエンザウイルスを静注接種すると発熱をともなったノンレム睡眠の増加がみられた。この過剰睡眠が有意に示されるまでには約4時間の潜時があり，ウイルスが体内で複製を始めることが必要であるらしい。インフルエンザウイルスがホスト細胞内で繁殖するには，ゲノムである単鎖RNAが2重鎖RNAに複製される。一方ホスト側はインターフェロン(IFN)などのサイトカインを産生してウイルスの繁殖を抑制しようとするが，このさいのサイトカインが介在因子となり中枢に作用しノンレム睡眠を誘発するのであろう。IFN誘発能を有する2重鎖RNAの前処理によってインフルエンザウイルスに対する不感応期が誘導されることからも，繁殖中の副産物がウイルス感染中の睡眠変動に起因すると推定される。

(10) ラット概日活動に対するビタミン B_{12}（メチルコバラミン）のリズム修飾作用

池田真行，本多和樹，井上昌次郎（東京医歯大・医用器材研・制御機器部門）

ビタミン B_{12}（メチルコバラミン）は，人間の睡眠覚醒リズム障害において有効な治療効果を持つことが報告されている。しかしその作用機構に関する知見はほとんどない。今回，ビタミン B_{12} の時計機構への作用を明らかにするため，恒明条件下の3つの異なった概日時刻(CT12-15, CT18-21, CT0-3)においてビタミン B_{12} (30 nmol/30μl/3h)をラットの第三脳室内に連続的に投与する実験を試み，投与後の睡眠および脳温リズムにみられる変化を観察した。その結果，活動期での投与(CT12-15, CT18-21)後に限って，徐波睡眠および逆説睡眠の有意な増加が観察された。またすべての時刻の投与後，約10日間の脳温の自由継続リズムが投与前10日間と比べて遅延することが明らかにされた。これらのことは，ビタミン B_{12} が直接的あるいは間接的に体内時計機構に作用したことを示唆するが，その作用機序の解釈については，今後の研究を待たねばならない。

(11) SLEEP IN FEMALE CYCLING RATS

Shiqing Zhang, Mayumi Kimura and Shojiro Inoué
(Inst. Med. Dent. Eng., Tokyo Med. Dent. Univ.)

Although it is known that women have much severe sleep disorders than men across all age ranges, relationships between gonadotrophic hormones and sleep in women are still unclear. The present study analyzed changes in sleep pattern of normally cycling rats. Female adult Sprague-Dawley rats (n=5, 200-300g) implanted with electrodes for recording electroencephalogram (EEG), electromyogram (EMG) and brain temperature were used. Continuous recordings were performed after surgical recovery during 2 consecutive estrous cycles (L:D=12:12, light period: 08.00-21.00 h). There were no changes in sleep during light period across estrous stages. However during the nocturnal period of proestrous-estrous stage, paradoxical sleep was almost completely suppressed and slow wave sleep was considerably reduced. Diminished sleep during proestrous-estrous night may coincide with high peaks of gonadotrophic hormones and elevated locomotor activity which are related to sexual behaviors.

8．生理学実験手技に関する研究会

1993年 8 月24日～26日

代表者：栗原　敏（東京慈恵医大・生理）

世話人：山岸俊一

講　　義

(1) パッチクランプ法講義

岡田泰伸（生理研）

(2) 組織培養法講義

池中一裕（生理研）

(3) 細胞内 Ca 光学的測定法講義

小西真人（東京慈恵医大・生理）

実　　技

(1) パッチクランプ法実技

岡田泰伸，挟間章博，富永真琴，石川　透，古家喜四夫

筒井泉雄，山口和彦，山岸俊一（生理研）

(2) 組織培養法実技

池中一裕，古家園子，小幡邦彦（生理研）

(3) 腺房細胞を対象とした細胞内 Ca の光学的測定法

栗原　敏，小西真人（東京慈恵医大・生理）

葉原芳昭（生理研）

第 4 回目の研究会として実施したが，受講者は20名の参加であった。参加者からは大変意義のある良い企画であったという感想が寄せられた。後日，実技を研究に取り入れ始めた研究者から更に詳しい実験手技に関する問い合わせも見受けられた。

9．内外受容器のブドウ糖分子識別ならびに反応発現機構

1993年12月13日～14日
代表者：北里　宏（滋賀医大・生理）
世話人：山岸俊一

(1) 膵β細胞の spike-burst の持続時間を決定する因子
北里　宏，何　莉萍，服部政憲，丁　維光（滋賀医大・生理）

(2) 膵β細胞の電気的活動，細胞内 pH，細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼす細胞外 Na^{+} の影響
服部政憲，何　莉萍，丁　維光，北里　宏（滋賀医大・生理）

(3) 膵β細胞のグルコース代謝依存性 Ca^{2+} ポンプとその生理的意義
矢田俊彦（鹿児島大・生理）

(4) インスリン分泌細胞の ATP 感受性 K^{+} チャネルに対する α_2-拮抗薬の作用
泉井　亮，大根田絹子，大根田昭，福士靖江，西山明徳（東北大・生理，内科）

(5) 膵グルカゴン分泌の自律神経性調節
斉藤真理，田中克明，井上修二（横浜市大・内科）

(6) 細胞内糖欠乏状態によって誘発される視床下部神経ヒスタミンの活性化とその生理的意義
坂田利家（大分医大・内科）

(7) 内在性満腹物質 aFGF の記憶促進作用
大村　裕（日本臓器製薬・生物活性科学研）

(8) 味蕾における Met-Enk-8 の免疫組織化学
吉江紀夫（日本歯大・口腔解剖）
藤田恒夫，金澤寛明（新潟大・解剖）

(9) 味神経切断による甘味応答
外崎肇一，三輪晃成（朝日大・口腔生理）

(10) 迷走神経背側核ニューロンのブドウ糖に対する応答性
小林　基，足立　明（岡山大・生理）

(11) 腸管グルコレセプターと門脈グルコースセンサーに及ぼすグルマリン効果の差異
新島　旭（新潟大・生理）

(12) 粗ギムネマ抽出物の長期経口投与でみられる実験的糖尿病マウスの血糖値，インスリン値に及ぼす改善効果
加藤達生，三好美智夫，日地康武（鳥取大・生理）

(13) ナトリウム・グルコース共輸送体のアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた研究
挾間章博（生理研）

⑭　グリセルアルデヒドの生化学

三輪一智，奥田　潤（名城大・臨床生化学）

⑮　ブドウ糖によインスリン分泌の分子機構と糖尿病におけるその異常

清野　裕，石田　均（京都大・臨床代謝栄養学）

【参加者】

○北里　宏（滋賀医科大・生理），泉井　亮（東北大・生理），新島　旭（新潟大・生理），藤田恒夫，金澤寛明（新潟大・解剖），吉江紀夫（日本歯科大・口腔解剖），井上修二，田中克明（横浜市立大・内科），斎藤真理（横須賀共済病院），挾間章博，富永真琴，岡田泰伸（生理研），奥田　潤，三輪一智，豊田行康，田口忠緒（名城大・臨床生化学），外崎肇一，三輪晃成（朝日大・口腔生理），丁　維光，服部政憲，久保田真吾，何　莉萍，瀧川智子（滋賀医大・生理），清野裕，石田　均（京都大・臨床代謝栄養学），大村　裕（日本臓器製薬・生物活性科学研），足立明（岡山大・生理），日地康武，井元敏明（鳥取大・生理），坂田利家（大分医大・内科），矢田俊彦，濱川典章（鹿児島大・生理）

【研究会概要】

グルコースの吸収および血糖値の調節は生体のエネルギー代謝の観点から非常に重要な機能である。今回の研究会においては，味蕾の免疫組織化学から中枢神経系の神経細胞のグルコースに対する反応および膵島における液性ならびに神経性調節に到る領域の最新の話題を取り上げるとともに，特にグルコース輸送系の分子生物学的機構と膵β細胞の insulin 放出調節機構に重点をおき，エネルギー代謝調節に関する研究分野の発展を目指したものとした。この研究会を通じて遺伝子工学的手法と容量性電流測定の組み合わせ，あるいは細胞内 Ca^{2+} 濃度と細胞の電気的活動の測定といった２つ以上の技法を用いて問題の解決をはかる方向はより明確となった。各研究者はそれぞれの得意の技法を持ち，得意の研究領域を抱えていることから，この研究会は各研究者の得意の分野を生かした協同研究を進めるきっかけとなったと思われる。

(1)　膵β細胞の spike-burst の持続時間を決定する因子

北里　宏，何　莉萍，服部政憲，丁　維光（滋賀医大・生理）

glucose を与えた場合に起こる脱分極の機構に関しては，細胞内 ATP 濃度の上昇が ATP-sensitive K^+ channel の開確率を低下させることによるという見解に研究者の意見は一致しているが，spike-burst を終わらせる再分極の機構はいまだ十分に明らかにされていない。われわれは細胞外から Ca^{2+} を取り去ったときに spike が連続して発生する現象に注目して，spike-burst の持続

時間を決定する因子の解明を試みた。

実験の結果は次のことを示していた。正常な溶液中では Ca^{2+} spike 発生と共に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し，Na^{+}/Ca^{2+} 交換輸送を介して細胞内 Na^{+} 濃度が上昇し，細胞内 Na^{+} 濃度の上昇が Na^{+}/K^{+}-pump における ATP 消費速度を上昇させ，ATP level の低下をきたし，ATP-level の低下によって ATP-sensitive K^{+} channel が開き，再分極する。したがって，ATP 合成速度が低い場合には spike-burst の持続時間は短くなり，逆に ATP 合成速度が高い場合には silent phase は短くなり，spike-burst の持続時間は長くなる。

(2) 膵β細胞の電気的活動，細胞内 pH，細胞内 Ca^{2+} 濃度に及ぼす細胞外 Na^{+} の影響

服部政憲，何　莉萍，丁　維光，北里　宏（滋賀医大・第2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し，連続した spike を発生することが知られている。今回私たちはこうした電気的活動の変化と細胞内のイオン濃度の変化との関係を明らかにするために細胞内 pH と細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定した。

①細胞内 pH は glucose 濃度を 2.8-22.2mM の範囲で変化させてもほとんど一定であった。

②β細胞が spike-burst を繰り返し発射しているときに細胞外液の NaCl を Tris-HCl 及び LiCl で置換し，細胞外 Na^{+} 濃度を下げると膜電位は脱分極方向に移動し，spike-train を認めるようになった。細胞内 Ca^{2+} 濃度もいずれの場合も持続的に上昇した。しかし，細胞内 pH は一定の傾向を示さなかった。

こうした結果よりβ細胞の電気的活動が細胞内 pH の変化を介するものでないことが示唆された。

③細胞外の Ca^{2+} を取り去ると細胞内 Ca^{2+} 濃度も徐々に低下した。

④細胞外液に amiloride を加えると細胞内 pH は徐々に低下し，細胞内 Ca^{2+} 濃度も resting level に低下した。

⑤細胞外液に ouabain を加えるとβ細胞は脱分極し細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇した。

これらの結果よりβ細胞のイオン輸送において Na^{+}/Ca^{2+} 輸送は細胞内 Ca^{2+} 濃度を下げるために重要な役割を担っているように思われた。また，Na^{+}/K^{+}-pump の活性の変化による細胞内 ATP 濃度の変化が電気的活動の変化をきたすという考えを支持するものである。

(4) インスリン分泌細胞のATP感受性K^+チャネルに対するα_2-拮抗薬の作用

泉井　亮，福士靖江，西山明徳（東北大・医・第一生理）
大根田絹子（第三内科）
大根田昭（保健管理センター）

マウス単一β細胞の膜電位を-40mVに固定すると（Patch-clamp whole cell法），時間の経過にともなって（細胞内ATP濃度の低下），外向きK^+電流が増大し一定値になった。ここで1mM Tolbutamideを投与すると，K^+電流は著明に減少した(K_{ATP})。細胞外に投与したYohimbineおよびMidaglizoleもK_{ATP}電流を抑制し，その効果を，K_{ATP}をほぼ完全に抑制するといわれる1mM Tolbutamideによる抑制効果との相対値で表すと，10μMではおよそ20% (Y), 22% (M), 100μMでは50%，32%，200μMでは76%，52%であった。GDP-βSはこれらの効果を修飾しなかった。Inside-out modeでK_{ATP}チャネル電流を記録し，細胞膜内側よりYohimbineを投与すると，100μMでおよそ50%，チャネルの開口率を低下させた。一方，100μM Midaglizole はK_{ATP}チャネルの活性をほぼ完全に抑制した。α_2拮抗薬が直接作用することでK_{ATP}チャネルを抑制すること，Imidazole-α_2拮抗薬の結合部位は，K_{ATP}チャネルの細胞内ドメインに存在することが示唆される。

(5) 膵グルカゴン分泌の自律神経性調節

斉藤真理（横須賀共済病院）
田中克明，井上修二（横浜市大・医・第3内科）

実験1；ラットに各種adrenergic blockerを前投与した後，拘束ストレスを負荷したときのグルカゴン分泌を経時的に検討した。α_2-receptorを介して，グルカゴン分泌は有意に促進され，反対にβ_2-receptorを介して，分泌が抑制傾向に調節されていた。

実験2；各種adrenergic agonist及び，各種adrenergic blockerを投与することにより，グルカゴン分泌のadrenergic modulationについて検討を加えた。epinephrine, clonidine (α_2 agonist)の投与により，グルカゴン分泌は促進され，phentolamine (α blocker), Yohimbine (α_2 blocker)を前投与すると，その分泌は完全に抑制された。

膵グルカゴン分泌の自律神経性調節は主にadrenergic α_2 receptorを介してなされていることが示唆された。

(8) 味蕾における Met-Enk-8 の免疫組織化学

吉江紀夫（日本歯科大・新潟大・歯・第二口腔解剖）
藤田恒夫，金澤寛明（新潟大・医・第三解剖）

味覚を受容する味細胞は，感受した情報をシナプスを介して神経に伝達する。味細胞の細胞質には暗調小胞（直径 70-200nm）が多数存在し，それらはまたシナプスの近傍に集積する。モルモットの有郭乳頭において味蕾を基本味物質で刺激すると，味細胞のシナプスから暗調小胞が開口放出され，したがってこの小胞は味細胞の興奮を神経に伝える伝達物質を含んでいると考えられる。また，味刺激に反応するこの暗調小胞は生理活性ペプチドを含むニューロンやパラニューロンの小胞に類似するので，味細胞の伝達物質もペプチドであることが強く示唆される。

ラット，マウス，モルモットおよびネコの有郭乳頭の味蕾を用いて生理活性ペプチドの免疫組織化学をおこなった。その結果，全種類の味蕾に Met-enkephalin-Arg-Gly-Leu (Met-Enk-8) 陽性の細胞が認められた。これらの細胞は紡錘形で，主に味蕾の辺縁に分布し，ラットとモルモットでは神経特異エノラーゼ (NSE) にも陽性反応を示した。モルモットにおいて，NSE 陽性細胞は味細胞であることがすでに確認されているので，Met-Enk-8 陽性細胞を味細胞と同定した。

味細胞の伝達物質として，アドレナリンやアセチルコリンが想定されてきたが，これまでの組織化学的研究はそれに否定的である。本研究は，これらの古典的伝達物質に代わりペプチドによる味覚伝達を提唱する。

(9) 味神経切断による甘味応答

外崎肇一，三輪晃成（朝日大・歯・口腔生理）

味情報は主に鼓索神経（舌前2/3）舌咽神経（舌後1/3）によって中枢に送られている。しかし，1939年に各々の神経を切断しても行動学的観察では塩味受容には差のないことが報告されている。本報告では鼓索，舌咽神経の一方もしくは両方を両側性に切断した際のマウス味受容行動を術後86日迄，二瓶法によって観察した。その結果，両神経を両側性に切断しても食塩受容行動には各種食塩濃度でも差の生じないことが確認されたが，蔗糖受容に関しては通常の濃度では差は生じないが，0.0125M 以下では両側性に鼓索神経を切断されたものでは蔗糖を拒否するという結果が得られた（正常のマウスでは 0.0125M 蔗糖の方を多く飲む）。以上のことより，特に低濃度の甘味受容には鼓索神経経由の味情報が重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

(10) 迷走神経背側核ニューロンのブドウ糖に対する応答性

小橋　基，足立　明（岡山大・歯・生理）

内外の糖受容器からの求心性入力によって，自律神経系の最終共通路である迷走神経背側核の節前ニューロンが反射性に興奮あるいは抑制をうけることは良く知られているが，背側核ニューロンから神経応答を記録した研究は少ない。そこで今回，われわれは迷走神経胃枝および腹腔枝の単発電気刺激にたいして逆行性応答を示すニューロンをまず同定し，それらのニューロンがブドウ糖の門脈および頸静脈内投与にたいしてどのように応答するか，また，多連微小電極法によるブドウ糖の局所投与にたいしてはどのように応答するかを調べた。ブドウ糖の門脈および頸静脈内投与によって放電頻度の減少するニューロンと増加するニューロンが認められた。ともに，潜時が非常に長く数分を要した。これらのニューロンのあるものはブドウ糖の局所投与にたいしても応答するものが存在した。シナプスの安全率を高めるために役立っていると想像されるが，その機能およびブドウ糖受容機構については今後さらに追求する。

(11) 腸管グルコレセプターと門脈グルコースセンサーに及ぼすグルマリン効果の差異

新島　旭（新潟大・医・名誉教授）

グルマリンはラットでグルコースなど甘味刺激により鼓索神経でみられる反応を抑制する物質として知られている。いっぽう腸管および門脈にはグルコース感受装置が存在することが報告されている。ウイスター系ラットを使用しこれらのグルコース感受装置へのグルコース刺激に対するグルマリンの効果を観察したので報告する。腸管グルコレセプターの実検では迷走神経腹腔枝を切断し末梢側よりフィラメントを分離し求心性活動を観察し腸管にグルコースを注入した場合よく反応するものを使用する。このようなフィラメントで観察すると等張グルコース液５分間の腸管灌流で10分以上つづく求心性活動の亢進がみられた。グルマリン (20μg/ml) を 3ml 腸管内に注入して10分後のグルコース腸管内投与は無効であった。

迷走神経肝臓枝の求心性活動はグルコースの門脈内投与により抑制されることがしられている。門脈グルコースセンサーの働きである。この抑制はあらかじめ門脈内にグルマリン (20μg/ml) 0.2ml を注入しておいても不変であった。

以上の観察からラットで腸管グルコースセンサーの働きは味覚甘味受容器と同様にグルマリンによって阻害されるが，門脈グルコースセンサーには阻害はみられないことがわかった。コーヂング機構の差異―前者は受容体を介し後者は求心性神経終末のグルコース代謝機構を介する―によるのであろう。

(12) 粗ギムネマ抽出物の長期経口投与でみられる実験的糖尿病マウスの血糖値，インスリン値に及ぼす改善効果

加藤達生，三好美智夫，日地康武（鳥取大・医・第1生理）

ガガイモ科の植物ギムネマ・シルベスタはヒト甘味感覚の抑制物質ギムネマ酸を含むことが以前より知られている。当教室の急性実験で，ギムネマ酸はこれ以外にグルコース吸収抑制作用，う蝕性細菌 *S. mutans* の歯垢形成抑制作用を持つことが明かとなった。一方，ギムネマ・シルベスタが全体として消化吸収に及ぼす影響は未知の点が多い。この度，Streptozotocin (STZ) 誘発糖尿病マウスに対してギムネマ・シルベスタ水抽出物 (GS-W) を慢性投与したところ，非空腹時平均血糖値は非投与群に比べて有意に低下した。一方，血清インスリン値は GS-W 投与群が非投与群の約2倍であり，糖尿病状態で活性が上昇した Sucrase 活性および Maltase 活性は正常近くまで低下した。また，糖尿病状態で活性が上昇する肝臓 Glucose-6-phosphatase 活性も低下してほぼ正常になり，肝臓からの糖放出抑制が推測された。GS-W の非空腹時血糖値低下作用は GS-W 含有の幾つかの物質が各々の効果をもたらしているものと推察している。

(13) ナトリウム・グルコース共輸送体のアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた研究

挾間章博（生理研）

ナトリウムグルコース共輸送体の cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し輸送体蛋白を細胞膜に発現させ，2本刺膜電位固定法により電気生理学的実験を行った。細胞外ナトリウム存在で膜電位を-50mV に固定し脱分極パルス及び過分極パルスを与えると特に脱分極側で著明な一過性外向電流が得られた。また脱分極パルスを切ると一過性内向電流が流れ，外向電流と内向電流によって運ばれる電荷の総和は一致した。

細胞外低ナトリウム条件下では脱分極側の一過性電流は減少し過分極側の一過性電流が増大した。またグルコース投与により定常ナトリウム電流は増大したのに対し，一過性電流は減少した。またフロリジンによりこの一過性電流は抑制された。この一過性電流は，輸送体に結合しているナトリウムの遊離と構造変化に伴う電荷の移動によってもたらされると考えられる。

⑭ グリセルアルデヒドの生化学

三輪一智，奥田　潤（名城大・薬）

D-グリセルアルデヒド(GA)は三炭糖であり，環状構造にはなり得ないため，直鎖状構造のままで存在する。そのため，他の単糖に比べ，グリケーションや自動酸化による組織障害を引き起こしやすい。

GAを単離ラット膵島に作用させると，グルコキナーゼが不活性化されるとともにグルコース刺激インスリン分泌が低下した。さらに，未処理の膵島ではα-D-グルコースの方がβ-D-グルコースより有意にインスリン分泌能が高いのに対し，GA処理膵島では両アノマー間の分泌能に差が見られなくなった。NIDDMモデルラットでも同様なアノマー優位性の消失が見られることが報告されているが，その現象に膵島内でのGAの蓄積が関与している可能性がある。

正常およびストレプトゾトシン糖尿病ラットの水晶体中のGA量を測定したところ，それぞれ1.4±0.2（平均値± SD, n = 6）および20 ± 1.6 pmol/mg 湿重量であった。糖尿病ラット水晶体では正常時の約14倍になっており，このGAの蓄積が糖尿病性白内障の発症に関与する可能性がある。

10. ギャップ結合細胞間連絡の生理学的役割に関する統合的研究

1994年2月7日～8日

代表者：菅野義信（広島大・歯・口腔生理）

世話人：亘　　弘，山岸俊一

(1) 凍結割断レプリカを用いたギャップ結合蛋白コネクシンの免疫染色について

藤本　和（京都大・医・大学院・生体構造医学）

(2) ラット肝臓における Phenobarbital のギャップ結合細胞間連絡阻害作用の経時的変化

田中三菜，伊藤聖一，吉武　彬（住友化学工業・生物環境科学研）

(3) モルモット肝ギャップ結合における構成蛋白 Cx32, Cx26 の分布パターン

倉岡晃夫，山中一郎，柴田洋三郎（九州大・医・第二解剖）

(4) Isolated perfused rat liver にみられた gap junction 構成蛋白 Cx26 の発現変化

小島　隆，望月洋一（札幌医大・医・癌研病理）

澤田典均，小山田正人，森　道夫（札幌医大・医・第二病理）

(5) 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 の発現の維持

松本　明（順天堂大・医・第二解剖）

(6) 膵島β細胞内 Ca^{2+} オシレーションとその細胞間連絡による調節

矢田俊彦，浜川典章，小田浩之（鹿児島大・医・第一生理）

(7) ギャップ結合細胞間連絡の過去と未来

菅野義信（広島大・歯・口腔生理）

(8) ヒト食道癌細胞株におけるコネクシンの発現と機能の異常

小山田ゆみ子，小山田正人，森　道夫（札幌医大・第二病理）

山崎　洋（WHO 国際癌研究機関）

(9) 胃癌，胃腺腫におけるギャップ結合の免疫組織化学的検討

藤木和彦，山中昭良，田村裕子，大草敏史（東京医歯大・医・第一内科）

(10) 胃生検組織における Connexin の発現

峯　徹哉，秋元公彦，安田　宏（東京大・医・第四内科）

(11) 培養ウサギ胃上皮細胞におけるギャップ結合を介する細胞間コミュニケーションの adrenergic β receptor による制御機構

上田房雄，亀田幸明，柴田芳久（日本新薬・創薬第二研究部）

(12) 胎生期小腸の絨毛形成とギャップ結合

山本正夫，片岡勝子（広島大・医・第二解剖）

(13) 卵胞果粒層細胞にみられるアポトーシスとギャップ結合

渡辺　皓，外崎　昭（山形大・医・第一解剖）

⑭ ラット子宮における Gap junctions の形成過程について

松岡由希子，松木智子，塚本卓治（佐賀大・農・生化学）
池田雅彦（佐賀医科大・医・産婦人科）

⑮ 心筋における興奮伝導と gap junction ― heptanol の影響からの検討―

今永一成（福岡大・医・第一生理）

⑯ 心筋における興奮伝導の異方向性

外山淳治，李　鍾国（名古屋大・環境医学研・循環器）

⑰ コネキシン等の遺伝子発現からみた虹彩から網膜に至る色素上皮細胞の性質の違い

児玉隆治，飯尾明生，餅井　真，江口吾朗（基生研・形態形成）

⑱ ニトロプルシッド Na による網膜 rod 水平細胞間ギャップ結合の制御

山田雅弘（電総研・分子機能）
荒川鏡子，斉藤建彦（筑波大・生物科学）

⑲ アラキドン酸および NO による網膜水平細胞間ギャップ結合の制御

宮地栄一，西川千恵子（藤田保健衛生大・医・生理）

⑳ ギャップ結合を介した網膜双極細胞ネットワーク，およびその機能

海野　修（東邦大・理・情報科学）
前原通代，日高　聡，橋本葉子（東京女子医科大・第一生理）
北　重夫（東京女子医科大・総研電顕室）

【参加者】

○菅野義信，柴　芳樹，広野　力，杉田　誠，張　文穎（広島大・歯），小山田正人（札幌医大），小島　隆（札幌医大・癌研），小山田ゆみ子（札幌医大），外崎　昭，渡辺　皓，酒井伸嘉，高橋一広（山形大・医），山田雅弘（電総研），峯　徹哉（東京大・医／医科研），大草敏史，藤木和彦，山中昭良（東京医科大），松本　明（順天堂大・医），橋本葉子（東京女子医大），海野　修（東邦大・理），外山淳治，李　鍾国（名古屋大・環境医研），宮地栄一（藤田保衛大・医），明坂年隆（朝日大・歯），小川和朗，藤本　和（京都大・医），上田房雄，亀田幸明，加藤文敬（日本新薬），伊藤聖一，田中三菜（住友化学・生物環境科研），立野知世（新技団・吉里再生機構），片岡勝子，山本正夫（広島大・医），柴田洋三郎，倉岡晃夫，稲井哲一朗，山中一郎（九州大・医），今永一成（福岡大・医），池田雅彦（佐賀医大），塚本卓治，松岡由希子（佐賀大・農），矢田俊彦（鹿児島大・医），伏木信次，西村裕美，木下周子（京都府立医大・脳血管系老研センター），太田英彦（杏林大・保健），斉藤正人（札幌医大），杉江茂幸（岐阜大・医），児玉隆治（基生研）

【研究会概要】

ギャップ結合の構成蛋白質コネキシンは，現在少なくとも12種類が発見されている。同種のコネキシンは，動物の種差による構造の差異はあまりなく，むしろ臓器によって，発現するコネキ

シンの種類が異なっていることが多い，臓器・組織の機能が異なるように，異種のコネキシンで構成されたギャップ結合の機能も異なる。ギャップ結合の生理学的役割は，心筋，子宮などの平滑筋，網膜神経細胞間等では興奮の電気的伝達であるが，肝臓では再生機能と，唾液腺や膵臓では分泌機能と関連があるらしい。一般的には，細胞の増殖・分化・発癌とも関係があるらしい。本研究会では，幅広い専門分野の研究者達がそれぞれの立場から，ギャップ結合の生理学的役割の解明を目指して行った研究と，蛋白合成後の膜への組み込みの様相と分布様式，不要のコネクソンの細胞内への取り込みの過程等の解明を目指して行った形態学的研究の成果を発表した。2日間の開催期間中，約50名が参加し，活発な討論が行われた。1日目の夜には岡崎国立共同研究機構内の職員会館2階で，懇親会を開催し，親睦を深め，種々の情報交換に役立てた。

(1) 凍結割断レプリカを用いたギャップ結合蛋白コネクシンの免疫染色について

藤本　和（京都大・医・大学院・生体構造医学）

我々は，細胞膜の真表面（細胞外ならびに細胞質側表面）の巨分子構造を観察するための方法として fracture-flip あるいは fracture-flip/Triton 法を開発し，種々の細胞や細胞内小器官の膜表面の構造を報告した。一連の研究から，凍結割断で露出，カーボン蒸着された membrane half は物理的に安定しており，Triton のような界面活性剤では可溶化されないこと，細胞膜内の蛋白質の免疫原性や酵素活性のような生物学的活性の保持に優れていることが明らかになった。この結果から，我々は以下の手順によって，少なくとも，P-面に露出されたギャップ結合の膜内粒子（コネクソン）をコネクシン抗体によって免疫染色することが理論的には可能であると考えた：1．試料を急速凍結，2．常法に従い凍結割断ならびに白金－カーボン蒸着を行う，3．Triton-100 あるいは SDS 等の界面活性剤で凍結割断されていない形質膜と細胞質を可溶化した後に，露出したコネクソンの細胞質側を抗体で免疫染色する。本研究会においては，実際の手技と，肝細胞形質膜上におけるギャップ結合構成蛋白質コネクシンの免疫局在を呈示する。

(2) ラット肝臓における Phenobarbital のギャップ結合細胞間連絡阻害作用の経時的変化について

田中三菜，伊藤聖一，吉武　彬（住友化学工業㈱・生物環境科学研究所）

前回，肝発癌プロモーターである DDT を連続経口投与したラット肝臓における，ギャップ結合細胞間連絡 (GJIC) 阻害作用の経時的変化について報告した。今回，同様に肝発癌プロモーター

である Phenobarbital をラットに連続経口投与し，0，1，2，4，6 週目における肝臓の GJIC の機能と Cx32 の発現様式について，in vivo/vitro 色素注入法と，Cx32 抗体の蛍光抗体染色により調べた。

その結果，Phenobarbital を投与したラット肝臓においては，投与 1 週から 6 週にわたり，GJIC 阻害作用が認められた。また，細胞 1 個当りの Cx32 蛋白の蛍光スポット数の減少及びスポットの小型化が認められ，DDT 投与時とは異なる動態を示した。

なお，この他 Cx26 の蛍光抗体染色の結果についても報告する予定。

(3) モルモット肝ギャップ結合における構成蛋白 Cx32, Cx26 の分布パターン

倉岡晃夫，山中一郎，柴田洋三郎（九州大・医・第二解剖）

肝臓ギャップ結合斑にはコネキシン (Cx) 32 と Cx26 という二種類の構成蛋白が共存している。我々は Cx26 が優位を占めるモルモット肝ギャップ結合につき，Cx32 が優位なラット肝との比較においてこれら二種類の Cx の局在パターンを検討してきた。各々に特異的な抗体を用いた組織レベルの二重染色では両種において Cx26 は必ず Cx32 と同一のギャップ結合斑中に共存していた。また急速凍結ディープエッチレプリカ法を応用した分離肝ギャップ結合膜レベルの免疫電顕法ではこれらは互いに区分けされず，ランダムに混在した分布パターンをとっていた。さらにコネクソン粒子 (hemichannel) レベルで Cx32 と Cx26 との混在の有無を明らかにするため，dodecyl maltoside などの界面活性剤処理により分離肝ギャップ結合膜から単一コネクソン粒子を単離し，急速凍結ディープエッチレプリカ法（マイカ細片法）による形態分析やアフィニティークロマトグラフィーなどを用いた生化学的手法によって単一粒子の分子構成を検討した。

(4) Isolated perfused rat liver にみられた gap junction 構成蛋白 Cx26 の発現変化

小島　隆，望月洋一（札幌医大・医・がん研病理）
澤田典均，小山田正人，森　道夫（札幌医大・医・第二病理）

正常成熟ラット肝では gap junction の主要構成蛋白としてコネクシン 32 (Cx32) と 26 (Cx26) が発現されている。Cx32 が小葉全体に分布するに比べて，Cx26 は，門脈域の肝細胞にのみ局在するが，その意義および機能は明かではない。今回我々は，生理的門脈流量による isolated perfused liver において，灌流30分以内に，Cx26 が小葉全体の肝細胞に出現することをみいだした。この変化は，Western blot, Northern blot 解析で蛋白量および mRNA 量の変化が認められな

いことから，posttranslational に調節されているものと考えられた。また同時に adherence junction に局在する E-cadherin の変化をもともなっていた。小葉中心域の肝細胞における Cx26 の発現は，灌流液への cytochalasin B, brefeldin A, staurosporine の添加により抑制されたが，Ca 濃度には非依存的であった。更に門脈域の肝細胞における Cx26 陽性 spot の大きさも灌流によって明かに増大した。いずれの場合も Cx32 の発現には変化がみられなかった。以上からこの system は，肝臓における Cx26 の調節機構の解析だけでなく，細胞膜蛋白質の posttranslational な調節機構の解明にも有用と考えられる。

(5) 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 の発現の維持

松本　明（順天堂大・医・第二解剖）

雄ラット腰髄の球海線体脊髄核 (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・ハイブリダイゼイション法によって，SNB 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。去勢ラットの SNB 運動ニューロンにおけるハイブリダイゼイションのシグナル量は対照群のそれより有意に減少した。去勢後 4 週間テストステロンを処理するとそれは対照群のレベルと有意な差はなかった。昨年の報告では，去勢後 2 日間のテストステロン処理でシグナルの発現量が対照群のレベルに回復した。これらの結果は，アンドロゲンがギャップ結合蛋白 mRNA の発現量を短期的に増大し，増大した発現量を長期的に維持していることを示唆している。

(6) 膵島β細胞内 Ca^{2+} オシレーションとその細胞間連絡による調節

矢田俊彦，浜川典章，小田浩之（鹿児島大・医・第一生理）

膵島 β 細胞内 Ca^{2+} はグルコース刺激に対して初期の減少と後続する増加を示し，増加相はしばしばオシレーションを伴う。単一 β 細胞レベルでは，約半数の細胞が 16.7mM グルコース刺激に対し Ca^{2+} オシレーションを示し，その振動数は 1/2-5min であり，リズムの乱れがしばしば観測された。数個の β 細胞から成る cluster 中の細胞はより高頻度に Ca^{2+} オシレーションを示し，そのリズムは整い振動数は増加した。Cluster のなかには，いつも始めに変化を示すペースメーカー的細胞とオシレーションの細胞間伝ぱんが観測された。オシレーション室温（27℃），電位

依存性 Ca チャンネル阻害剤 nitrendipine で阻害されたので，グルコース代謝により作られる未同定分子もしくは脱分極がギャップ結合を介して移動しオシレーションの同調と増強に寄与している機構が示唆される。

(7) ギャップ結合細胞間連絡の過去と未来

菅野義信（広島大・歯・口腔生理）

動植物を問わず，多細胞生物の細胞もすべて細胞は細胞膜に覆われ，細胞膜が破られると，細胞は破壊され，死滅してしまう。今世紀始めの Schleiden, Schwann による細胞独立説はあまりにも偉大であった。更にホルモン他の液性調整，神経の発達してくる動物での神経統制による多細胞の機能調節にも細胞独立説は微動だにしなかった。

しかし電気生理学は電流が細胞から細胞へと直接に漏洩することを示してしまった。他面，一部1925年に記載のあった細胞間の色素移動も無害の蛍光色素で着実に追試された。もはや細胞と細胞の間には大きさに制限はあるものの直接の物質交流が存在することはまぎれもない事実である。今やこの細胞間チャネルの分子構造も明らかにされている。種差より臓器に特有な分子構造は臓器の細胞の機能に大きく依存していると思われる。分子構造の微妙な差異と機能の特徴，蛋白合成の命令過程と膜へのはめ込みの仕組，癌化での消失等，将来への興味はつきない。

(8) ヒト食道癌細胞株におけるコネクシンの発現と機能の異常

小山田ゆみ子，小山田正人，森　道夫（札幌医大・第二病理）
山崎　洋（WHO 国際癌研究機関）

今回我々は 7 種類のヒト食道癌細胞株を用いて Gap junction intercellular communication (GJIC) capacity とコネクシン26，32，43の発現，それらの遺伝子の構造変化の有無について検討を行ったので報告する。正常ヒト食道組織では，Cx26, Cx43 が発現していたが，食道癌細胞株ではその発現が mRNA レベルでも蛋白レベルでも著しく低下したり，消失していた。Cx32 は，正常ヒト食道組織でも，どの食道癌細胞株にも発現していなかった。食道癌細胞株の GJIC は比較的低く，平均で10数個であったが，GJIC の有意に高かった 2 細胞株 (TE-3, TE-9) でのみ Cx26, Cx43 の coexpression が保たれていた。GJIC がほとんど認められなかった細胞株 (TE-10) を含めた，7 細胞株全てで，Cx32, 43 の遺伝子の大きな deletion, rearrangement は認められず，食道癌細胞株の Cx 発現の低下，消失は，大きな deletion, rearrangement によるものではないことが明かになっ

た。また，E-Cadherin は全ての細胞株で発現しており，E-cadherin の欠損が GJIC の欠如の原因と考えられる細胞株は認められなかった。これらの細胞株について，軟寒天培地での増殖能やヌードマウスでの造腫瘍性などの悪性形質の発現とコネクシンの発現の相関についても検討を行ったので合わせて報告する。

(9) 胃癌，胃腺腫におけるギャップ結合の免疫組織化学的検討

藤木和彦，山中昭良，田村裕子，大草敏史（東京医歯大・医・第一内科）

胃癌 7 例，胃腺腫 2 例の腫瘍部位および遠隔部位より採取した生検組織の新鮮凍結切片を作製し，抗コネクシン 32 (Cx32) モノクローナル抗体を用い，酵素抗体法（ABC 法）にて染色し，その出現の有無について検討した。胃癌患者に於ける Cx32 は，癌病変部で出現が見られなかった（0/7.0%）のに対し，遠隔胃体部で100%（7/7），遠隔幽門部で43%（3/7）と出現が認められた。胃腺腫患者においては，腺腫部で 1 例（1/2），遠隔胃体部で 1 例と Cx32 の出現が見られたが，遠隔幽門部では 2 例とも認められなかった。今回の検討で，コネクシン32染色スポットが，遠隔部，とくに胃体部上皮で全例に見られ，胃癌上皮で全く認められなかったことから，胃癌組織で特異的にギャップ結合が消失している可能性が示唆された。また，Cx26 や Cx43 での検討も追加報告する予定である。

(10) 胃生検組織における Connexin の発現

峯　徹哉，秋元公彦，安田　宏（東京大・医・第四内科）

我々は胃粘膜の細胞集団としてウサギ胎児の胃粘膜より作製した cultured rabbit gastric epithelial cells を用いて Gap junction を介する intercellular communication の作用機序を明らかにしてきた。

しかし，人胃粘膜細胞では明らかにされていない。その前の予備検討として我々は人胃粘膜における connexin の発現を検討した。従来では，immunohistochemistry で行われた報告はあるが，定量性に問題があると思われる。今回，ウサギ抗 connexin 32 抗体を用い，ウェスタンブロットで胃癌患における connexin 32 の発現を検討した。

(11) 培養ウサギ胃上皮細胞におけるギャップ結合を介する細胞間コミュニケーションの adrenergic β receptor による制御機構

上田房雄，亀田幸明，柴田芳久（日本新薬㈱・創薬第二研究部）

培養ウサギ胃上皮細胞を用いて Lucifer Yellow の細胞内注入法により isoproterenol (ISO) のギャップ結合を介する細胞間コミュニケーション (GJIC) に対する効果と cAMP に対する効果を検討した。ISO は10^{-6}M で cAMP 含量を持続的に著明に増加させたが，10^{-6}M による GJIC の増強効果には再現性が認められず，安定した GJIC 増強効果は10^{-5}M によって認められ，それは一過性の作用であった。この ISO の GJIC 増強効果はβ受容体拮抗薬 propranolol によって拮抗された。ISO は IBMX あるいは forskolin によって GJIC が既に増強されている細胞では，GJIC を抑制した。この ISO の IBMX 処置細胞における GJIC 抑制効果も propranolol によって拮抗された。ISO の GJIC 増強効果は Na/H 交換反応の抑制薬である amiloride および K/H 交換刺激薬である nigericin の前処置によって消失した。以上の結果から，ISO はβ受容体を介して，静止状態では GJIC を増強するが，その作用は cAMP を介するものではなく，Na/H 交換反応刺激による細胞内 pH 上昇によるものと考えられた。一方，既に GJIC が亢進した細胞におけるβ受容体を介する GJIC 抑制作用は phospholipase C 活性化の可能性が考えられた。以上の如く，β受容体はその多機能シグナリングによって細胞の状態に応じた GJIC の修飾を行うことが判明した。

(12) 胎生期小腸の絨毛形成とギャップ結合

山本正夫，片岡勝子（広島大・医・第二解剖）

ラット小腸の絨毛原器は急速に変化する一連の細胞の再配置を介して作られる。胎生14—17日小腸の内腔は急速に増殖した未分化な上皮細胞によって埋め尽くされほぼ閉塞する。未分化上皮細胞は不規則に重層し多列上皮様の配列をなしている。この上皮細胞塊の中央には狭窄した内腔があり，周囲の細胞は閉鎖結合によって連結されている。この時期の後半，内腔からかなり離れた上皮細胞間に多数の孤立腺腔が出現する。これは隣接した上皮細胞の外側面に閉鎖斑が形成され，その後閉鎖斑内に多数の微絨毛を持った孤立腺腔が形成され，さらにこの周囲の細胞の増殖により拡大し，互いに癒合し，本来の腸管腔に連絡するという過程をへて大小不同の絨毛原器を形成する。ギャップ結合はこの過程の閉鎖斑や孤立腺腔を取り巻く閉鎖帯に付属して出現し，閉鎖帯から離れると急速に拡大する。このような変化とギャップ結合の関係はこれまで報告してきた吸収上皮細胞の分化にギャップ結合が関係するばかりではなく，絨毛原器の形成ような細胞の配置を大きく変える組織の形態形成のレベルでも関係する可能性がある。

⑬ 卵胞果粒層細胞にみられるアポトーシスとギャップ結合

渡辺　皓，外崎　昭（山形大・医・第一解剖）

卵胞果粒層細胞のギャップ結合(GJ)は，卵胞成熟に伴い著しい形態変動を示し，排卵直前には大部分のGJが細胞内に取込まれる。また，卵胞は様々な成熟過程で閉鎖卵胞として退化消滅するが，この卵胞閉鎖はアポトーシス（細胞自滅）によるものと考えられている。本研究では，マウス卵胞におけるアポトーシスの発現とGJの関連性について形態学的に調べた結果を報告する。

アポトーシス発現初期の果粒層細胞は，核酸の断裂による核の濃縮を示すが，正常隣接細胞との間にGJの形成が認められた。アポトーシスの進行に伴い，核のみならず細胞質の濃縮化も進み細胞骨格構造が不明瞭となり，GJは正常の隣接細胞にのみ取込まれた。正常細胞間のGJは両方向性に取込まれるが，アポトーシスに陥った細胞がGJを取込まないのは，取込み機構の主役を演じるアクチンに変化が起ったためと考えられる。

アポトーシスに対するPMSGおよびhCGの影響についても合せて報告する。

⑭ ラット子宮における Gap junctions の形成過程について

松岡由希子，松木智子，塚本卓治（佐賀大・農）
池田雅彦（佐賀医大・産婦人科）

ラット子宮平滑筋においては，分娩の直前にGap junction (GJ)が急速に形成され分娩後に減少することから，陣痛の発来や分娩に関与する可能性が考えられている。そこで，GJ形成過程を明らかにする目的で，1．去勢後のエストロゲン投与　2．早産誘発ラット　3．in vitroにおけるGJ形成に対する子宮内膜の関与　4．分娩中における子宮のGJ分布と平滑筋活動について，形態計測，免疫組織化学，イムノブロッティング，筋電図等の方法で検討した。その結果，1．エストロゲン投与によりconnexinが発現した。2．早産時にもconnexinが増加した。3．GJの増加は子宮内膜を剥離することで抑制された。4．分娩途中において，ほとんど蠕動運動の見られない卵管側（子宮上部）に比べ，蠕動運動が見られる頸管側の子宮下部にGJが多く観察された。以上の結果より，子宮平滑筋におけるGJ形成の調節には，エストロゲン等の全身的な要因だけでなく，子宮内膜や平滑筋収縮などの局所的な因子も関与しているものと考えられた。

⑮ 心筋における興奮伝導と gap junction ― heptanol の影響からの検討―

今永一成（福岡大・医・生理学第一）

心筋では，興奮伝導の様式が gap junction の電気的抵抗に依存していることは多くの研究結果により強く示唆されている。従って，心臓の部位による興奮伝導速度，興奮伝導の安全率や空間常数（λ）の差は，gap junction の数，面積の差に起因するものと考えられる。

Heptanol は心筋や他の組織において，gap junction チャネルを閉鎖し抵抗を高めることが示されている。今回，heptanol（0.5～3mM, Vmax にほとんど影響なく伝導速度を抑制する濃度）の，心室細胞間，心房細胞間，洞房結節細胞間および洞房結節細胞－心房細胞間の伝導への影響を観察した。この結果，特に洞房結節細胞－心房細胞（従属細胞）間では他の部位に影響を与えない程の低濃度で，しかも短時間で伝導障害が招来することを認めた。このことは，洞房結節細胞－心房細胞（従属細胞）間では gap junction の数，面積共に小さく，この部での興奮伝導の安全率が小さいことを示唆する。

⑯ 心筋における興奮伝導の異方向性

外山淳治，李　鍾国（名古屋大・環境医学研究所・循環器部門）

心筋組織における興奮伝導には異方向性があり，心筋線維方向（縦方向）の伝導速度は横方向のそれに比べ２～３倍速い。この成因として縦方向の細胞間結合が横方向のそれに比べ密であるとの仮説はあるが，未だそれは証明されていない。

本研究ではモルモット右室乳頭筋標本について縦方向と横方向伝導時の細胞膜活動電位を記録し，膜電位とその一次微分値の関係（位相面図）を heptanol 投与下における興奮伝導抑制下の位相面と比較した。Hodgkin-Huxley 型の Na 電流モデルを組み込んだ心筋膜電流モデルをギャップ結合により連結した一次元離散ケーブルモデルにてコンピュータシミュレーションしたところ，ケーブルの能動と受動特性を生理学的な許容範囲で変化させても実験で得られた位相面を再現することは不可能であった。

(17) コネキシン等の遺伝子発現からみた虹彩から網膜に至る色素上皮細胞の性質の違い

児玉隆治，飯尾明生，餅井　真，江口吾朗（基生研・形態形成）

網膜の最外層には，色素顆粒を多量に含んだ単層上皮細胞が存在する。個体発生上の起源をたどれば，眼杯に由来する二層の細胞層のうち外側のものが虹彩から網膜まで連続した色素上皮となる。これに対して内側の層は虹彩では色素を持っているが，そのすぐ後ろの毛様体部分では色素を失い，そしてさらに網膜部分では重層化して複雑な神経性網膜をつくる。内側の細胞層が多様な分化を示すのに対して，外側の細胞層はどこも一見均一な単層上皮細胞にみえる。ところがコネキシン43分子の発現を in situ ハイブリダイゼーションで調べると，網膜色素上皮よりも虹彩色素上皮で強い発現が見られる。これに対して私たちのグループが単離した pP344 遺伝子は，網膜色素上皮だけで発現が見られる。これらの遺伝子発現の部域差は，各々の細胞を培養条件に移すことで失われるらしい。このような方法で明らかになる色素上皮細胞の場所による性質の違いを，色素上皮細胞の分化転換現象とあわせて検討したい。

(18) ニトロプルシッド Na による網膜 rod 水平細胞間ギャップ結合の制御

山田雅弘（電総研・分子機能）
荒川鏡子，斉藤建彦（筑波大・生物科学）

網膜のすべての神経細胞の受容野は，ほぼ円形と考えられており細胞の樹状突起よりはるかに広いが，それは細胞間のギャップ結合を介した電気的結合によっている。網膜の水平細胞の受容野は，従来ドーパミンの作用で狭くなることが知られており，ドーパミンが水平細胞内の cAMP の増加を引き起こしギャップ結合を閉じ受容野を狭くさせる。錐体視細胞入力型の H1 水平細胞において，細胞内に L アルギニンを注入すると一酸化窒素 (NO) 合成酵素により NO が発生し，グアニレイトシクラーゼを活性化して cGMP を上昇させる。このことを利用して Miyachi ら（1990）は，注入した蛍光色素の拡散を阻止し入力抵抗を増大させることから cGMP もギャップ結合を閉じることを示した。今回，rod 入力型水平細胞においても同様に cGMP による受容野の減少を確認したので報告する。2 時間以上暗順応したコイの剝離網膜を Ringer 液で灌流し，ガラス微小電極で細胞内電位の記録を行った。細長いスリット光刺激に対する応答振幅は，スリット光が記録電極から遠ざかるにつれて指数関数的に減衰し，$\exp(-x/\lambda)$ で表せる。空間定数 λ は，受容野の大きさに相当する。細胞内で NO を発生することが知られているニトロプルシッド Na を含む Ringer で灌流すると空間定数は，顕著に減衰した。このことから rod 入力水平細胞の

ギャップ結合は，NOを介したcGMPによって閉じることが判明した。

(19) アラキドン酸およびNOによる網膜水平細胞間ギャップ結合の制御

宮地栄一，西川千恵子（藤田保健衛生大・医・生理）

網膜の水平細胞ではdopamine/cAMP pathwayにより受容野が縮小し，水平細胞間ギャップ結合が遮断されることが知られている。われわれはコイとカメの網膜においてcAMPと同様にcGMPの細胞内注入も水平細胞の受容野縮小と細胞入力抵抗増加そしてLucifer Yellowの隣接水平細胞への拡散阻止を生じることを観察した。NO (nitric oxide) はcytosolic guanylate cyclaseを活性化すると考えられているが，NOの前駆体であるL-アルギニンの水平細胞内注入も著明なギャップ結合遮断効果を示した。また，アラキドン酸の注入も著明にギャップ結合を遮断した。L-アルギニンとアラキドン酸の遮断効果はguanylate cyclase阻害剤の同時注入によりそれぞれ抑制された。アラキドン酸の効果はlipoxygenase阻害剤の同時注入でも抑制された。これらの結果は水平細胞においてNOおよびアラキドン酸のlipoxygenase代謝産物がcytosolic guanylate cyclaseを活性化し水平細胞内cGMPを増加させギャップ結合を制御していることを強く示唆する。

(20) ギャップ結合を介した網膜双極細胞ネットワーク，およびその機能

海野　修（東邦大・理・情報科学）
前原通代，日高　聡，橋本葉子（東京女子医大・第一生理）
北　重夫（東京女子医大・総研電顕）

網膜では6種類の神経細胞が回路網を形成し，外界からの視覚情報の処理を行っている。神経細胞間では化学シナプスに加え，電気シナプスも数多く見られる。網膜の双極細胞同士も電気的に結合していることを示唆する研究は報告されていた。しかしながら，電気的結合の有力な証拠となる色素などの拡散が，双極細胞間では見られず，また，電気的に結合していてもその機能については全く不明であった。今回，魚類網膜で双極細胞間の結合を調べ，これらの疑問に対する答えも含め下記の結果を得た。① Lucifer Yellowおよびbiocytinは双極細胞間を拡散する。②ギャップ結合は隣接する双極細胞の軸索間および樹状突起間で見られる。③結合している個々の双極細胞は異なった数の視細胞と結合している。この結果は，個々の双極細胞は異なった大きさの入力を受けていることを示唆している。④電気的結合は入力信号のばらつきを平均化し，外界からの光信号に対して個々の双極細胞が同じ様に応答するように機能している可能性がある。

11. 神経伝達調節機構解析の戦略

1993年9月16日～18日
代表者：吉岡　亨
世話人：濱　　清，池中一裕

(1) マウスの小脳発生における細胞移動とシナプス形成
湯浅茂樹（慶應大・医）

(2) 蛋白質分解反応を空間的に捕捉する
西道隆臣（東京都臨床研）

(3) シナプス小胞における伝達物質の濃縮機構と神経遮断薬との相互作用
森山芳則（大阪大・産研）

(4) ミオシン，アクチン及びアクチン結合蛋白による開口放出の制御
中村清二（東大・医）

(5) C キナーゼの主要基質タンパク質 MARCKS の構造と機能
谷口寿章（藤田保健衛生大）

(6) カルシウムにより誘発される小脳プルキンエ細胞 GABA 作動抑制性シナプスの長期増強
狩野方伸（自治医大・生理）

(7) 神経性クロライドチャンネル制御の新局面
徳富直史（熊本大・医）

(8) 脳特異的 14kDa タンパク質のリン酸化反応及び脳内分布について
中条茂男（昭和大・薬）

【討論参加者】

吉岡　亨（早稲田大・人間科学），湯浅茂樹（慶應大・医），阿部輝雄（新潟大・医），西道隆臣（東京都臨床研），関野祐子（東京都神経研），徳富直史（熊本大・医），中村清二，桐野　豊（東大・医），中条茂男（昭和大・薬），谷口寿章（藤田保健衛生大），森山芳則（大阪大・産研），狩野方伸，川合述史（自治医大・生理），工藤佳久，高橋正身（三菱生命研），濱　　清，池中一裕（生理研）

【研究会概要】

脳の機能解明には広範囲の研究分野の共同体制が必要であることは言うまでもない。しかし，現実には分野を越えた研究者が互いの専門語を理解し，同じレベルで討論し，解決すべき問題点を共に定めて解明してゆくことは容易なことではない。このような難点を克服するために本シンポジウムではこれまでのように，聴衆にそのテーマについてのトレンディな総説を提供すること

を目的としなかった。なによりこれからの我が国の神経科学研究を担って行くべき若い研究者達が分野を越えて集い，互いに自由に討論する場をもうけることを第一の目的とした。したがってこの場はその研究の意義や今後を主張する場であった。また，他の研究者の研究成果や実験仮説に対するきたんのない批評をしあうことを主な目的とした。講演者は現在自らが実験を行っている若手に限られ，一つ一つの講演について十分な討論を行った。従って，一講演者の持ち時間は通常の講演とは異なり約2時間を予定し，講演の途中で質問をはさむことを歓迎した。

今回は「神経伝達調節機構解析の戦略」をテーマとしてメンバーを募った。本シンポジウムの目的から，この中にはクローン細胞系，神経細胞の初代培養，スライス培養などの培養系を用いた研究法，Gene targetting などの gene manipulation を利用した人工的 mutant animal を用いた研究法に加えて，分子生物学的な受容体やチャンネルの発現やその調節機構の解析，伝達物質遊離機構の解析までの広い分野からシンポゾストを選択した。

12. GABA, Glycine レセプター・ Cl^- チャネル

1994年3月1日～3日
代表者：赤池紀扶（九州大・医）
世話人：岡田泰伸

(1) 内因性ステロイドによる $GABA_A$ 受容体サブタイプを通るイオン電流の修飾
新貝鉚蔵，小栗栖太郎，平　秀晴（岩手大・工・情報工）（岩手大・農・応用生物）
(2) 小脳プルキンエ細胞 GABA 作動性抑制性シナプスの長期増強
狩野方伸（自治医大・第1生理）
(3) 大脳皮質と線状体の3種類の GABA 作動性介在細胞
窪田芳之，川口泰雄（理化学研・ B-MCRC 運動回路網）
(4) モルモット前頭前野 Cl 依存性電位の自発性発火頻度に与える影響
田中永一郎，東　英穂，山上竜也（久留米大・医・第1生理）
(5) 副交感神経節における GABA 受容体機能
片岡泰文，丹羽正美，山上樹三裕，谷山紘太郎（長崎大・医・第2薬理）
(6) ヒゲ刺激によって誘発されたバレル皮質での GABA の放出と取り込み
城川哲也，小川哲朗（秋田大・医・第1生理）
(7) グリシン受容体チャネルの機能と修飾
赤木宏行（群馬大・医・薬理）
(8) 抑制性シナプス伝達を媒介するグリシン受容体クロライドチャネル
高橋智幸，籾山明子（東京大・医・脳研生理）（京都大・医・生理）
(9) グラミシジン穿孔パッチ方法による抑制性アミノ酸受容体応答の研究
赤池紀扶（九州大・医・第2生理）

【討論参加者】

新貝鉚蔵，小栗栖太郎（岩手大・工・情報工），平　秀晴（岩手大・農・応用生物），狩野方伸（自治医大・第1生理），窪田芳之，川口泰雄（理化学研・ B-MCRC 運動回路網），田中永一郎，東英穂，山上竜也（久留米大・医・第1生理），片岡泰文，丹羽正美，山上樹三裕，谷山紘太郎（長崎大・医・第2生理），城川哲也，小川哲朗（秋田大・医・第1生理），赤木宏行（群馬大・医・薬理），高橋智幸（東京大・医・脳研生理），籾山明子（京都大・医・生理），岡田泰伸，老木成稔，富永真琴，挾間章博（生理研），○赤池紀扶（九州大・医・第2生理）

【研究会概要】

$GABA_A$ ならびに glycine レセプター・ Cl^- チャネル複合体に関する解剖学，生理，薬理学，生

化学ならびに分子生物学的研究の発展は目覚ましく，研究成果も確実に実を結びつつある。本年度の研究会は，他の生理研研究会も含めて第19回生理研カンファレンスとの共同発表会で，全ての発表は英語にて口演とポスターの両形式で行われた。その中にあって本研究会メンバーは9テーマ（1．カエル卵母細胞の $GABA_A$ 受容器への内因性ステロイドの効果。2．$GABA_A$ 受容器の up-regulation。3．3種類の GABA 作動性介在細胞。4．GABA による自発性発火の制御。5．副交感神経節における GABA 受容器の特性。6．バレル内での GABA 放出と取り込みについて。7．グリシン受容体チャネル機能の修飾。8．脊髄グリシン応答の特性。9．正常細胞内 Cl^- 濃度での GABA やグリシン応答の記録。）について討論，問題点を検討した。

(1) 内因性ステロイドによる $GABA_A$ 受容体サブタイプを通るイオン電流の修飾

新貝鉚蔵，小栗栖太郎（岩手大・工・情報工学科）
平　秀晴（同農・応用生物学科）

ニワトリ網膜より抽出したメッセンジャー RNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し，発現した $GABA_A$ 受容体に対する内因性ステロイド 3α-hydroxy-5α-pregnan-20-one (3α-OH-DHP) 及び 5α-pregunene-3α, 21-diol-20-one (THDOC) の作用を電位固定法で研究した。10μM GABA を与えた場合，3α-OH-DHP と THDOC (0.01-10μM) はほぼ同等に GABA の反応を増大させた。0.3-10μM GABA による反応は，10μM bicuculline によって減少し，pentobarbital 又は diazepam によって増大した。0.3-1μM GABA による膜イオン電流は $GABA_A$ 受容体の性質を示し，ウシや人間の網膜の $GABA_C$ 受容体や ρ1 サブユニットに特有な反応はなかった。ニワトリ網膜の $GABA_A$ 受容体が脳の受容体に似ていることはトリ網膜の神経回路と関係があるかも知れない。

(2) 小脳プルキンエ細胞 GABA 作動性抑制性シナプスの長期増強

狩野方伸（自治医大・第一生理）

シナプス可塑性は記憶や学習の基盤であると考えられているが，従来の研究はほとんどグルタミン酸作動性興奮性シナプスの可塑性に限られていた。私たちは最近，小脳プルキンエ細胞の GABA 作動性抑制性シナプスに長期増強が生ずることを発見した。これはプルキンエ細胞の電位依存性 Ca^{++} チャネル活性化による一過性 Ca^{++} 上昇が引金になることが Ca^{++} メージング法により明らかにされた。また，外部から与えた GABA に対するプルキンエ細胞の反応が，IPSC の増大と平行して増強されることから，シナプス後膜の $GABA_A$ 受容体機能の up-regulation が

長期増強の主因であると結論された。この長期増強は，staurosporine, calmidazolium, KN62, calmodulin-binding domain のいずれによっても阻害された。したがって Ca^{++} /Calmodulin -dependent protein kinase Ⅱがその発現に関与することが示唆される。

(3) 大脳皮質と線状体の3種類の GABA 作動性介在細胞

窪田芳之，川口泰雄（理化学研究所・ B-MCRC 運動回路網）

GABA 作動性である大脳皮質の介在細胞である非錐体細胞や線状体の介在細胞には，これまで多様な神経化学物質が存在することが報告され，含有する物質の違いからそれぞれいくつかのサブタイプに分類されている。本研究では，大脳皮質と線状体の介在細胞の類似性をラットを使い免疫組織化学法により検討した。その結果，大脳皮質の非錐体細胞は，パルブアルブミン，ソマトスタチン，カルレチニンをそれぞれ含有する3種類のサブタイプに分類されること，また，線状体の介在細胞も大脳皮質の非錐体細胞のサブタイプと同様の化学物質を含有する3種類のサブタイプに分類されることが示された。以上の事から，大脳皮質と線状体は，性質の異なる，少なくとも3種類のサブタイプの抑制型の介在細胞によりそれぞれ類似した制御を受けていると推測される。

(4) モルモット前頭前野 Cl 依存性電位の自発性発火頻度に与える影響

田中永一郎，東　英穂，山上竜也（久留米大・医・第一生理）

モルモット大脳スライス標本の前頭前野第5層錐体細胞は膜を脱分極させると規則的自発性発火を生じ，活動電位後脱分極電位は Ca 依存性 Cl 電流によって，近傍刺激による fast IPSP は GABA 受容体を介する Cl 電流によって発生することが判明した。前者は自発性発火頻度を増加させ，後者は減少させた。さらに bicucullin (0.5～10μM)，2-hydroxy-saclofen (100μM)，低 Cl (43mM) 灌流液は自発性発火頻度を上昇させたが，bicucullin 長期投与は epileptiform discharge を発生させた。一方，SITS (250μM), strychnine (3μM) は自発性発火頻度に有意な影響を与えなかった。以上の結果は，スライス標本でも interneuron からの GABA 自発性放出が錐体細胞の自発性発火をコントロールしていることを示唆した。

(5) 副交感神経節における GABA 受容体機能

片岡泰文，丹羽正美，山上樹三裕，谷山紘太郎（長崎大・医・第二薬理）

GABA は哺乳動物の腸管において神経伝達物質としてのほとんどの規準をみたしており，また膀胱においても示唆されている。腸管においては，GABA 受容体はコリン作動性神経と GABA 作動性神経にあり，コリン作動性神経上の $GABA_A$ 受容体はアセチルコリン (ACh) 遊離に対して促進的に，$GABA_B$ 受容体は抑制的に作用する。GABA 遊離に対して抑制的に作用する GABA 作動性神経上の自己受容体は $GABA_A$ 受容体であり，中枢の GABA 作動性神経の自己受容体（$GABA_B$ 受容体）とは異なる。膀胱においては，$GABA_A$ 受容体は腸管の場合とは逆に ACh 遊離に対して抑制的に作用する。また，腸管と同様に GABA 遊離に対して抑制的に作用する $GABA_A$ 受容体も存在する。

(6) ヒゲ刺激によって誘発されたバレル皮質での GABA の放出と取り込み

城川哲也，小川哲朗（秋田大・医・第一生理）

ラットなどのげっし類の一次体性感覚野では，顔面の一本のヒゲからの入力とそれにのみ応答するニューロンの集団が“バレル”と呼ばれる構造を形成している。ヒゲからの入力によって，バレル内の GABA ニューロンから GABA がどのように放出されるのかを調べるために，ラットのヒゲを刺激し，バレル内での GABA 濃度の変化をマイクロダイアリシス法を用いて測定した。機械的刺激を受けたヒゲに対応するバレルで有意な GABA の増加 ($80\pm56\%$, $n=8$) がみられ，それは TTX 存在下で完全に抑制された。また隣接するバレルでは，刺激に依存した GABA 濃度の減少が見られた。これらの結果は，1）ヒゲ刺激による GABA の放出がバレル内でおこり，2）同時に，隣接するバレルで GABA の取り込みがおこることを示唆した。

(7) グリシン受容体チャネルの機能と修飾

赤木宏行（群馬大・医・薬理）

グリシン受容体 Cl チャネルを構成する主要なサブユニット $\alpha1$, $\alpha2$ をコードする cDNA をラット脊髄 cDNA ライブラリーから単離した。両者は，アミノ酸配列において71％の相同性を示した。ノーザンブロット解析および in situ hybridization 解析の結果，$\alpha1$ は成熟期動物の脊髄に多く含

まれるのに対し，α2 は胎児／幼若期の組織に特異的に存在することが明らかになった。アフリカツメガエル卵母細胞に発現させたαサブユニットの単一集合体(α1 or α2 homomeric receptor)はともに機能的な Cl^- チャネルを構成するが，両者の channel kinetics には違いがみられた。グリシン受容体チャネルの機能は細胞外に Zn^{2+} (0.1−10μM) を存在させることで著しく増強され，また細胞内のタンパクキナーゼ C を活性化させることによりに抑制されることが示された。

(8) 抑制性シナプス伝達を媒介するグリシン受容体クロライドチャネル

高橋智幸（東京大・医・脳研生理）
籾山明子（京都大・医・生理）

脊髄の抑制性シナプス伝達を担うグリシン受容体チャネルをスライス・パッチクランプ法により解析した。このチャネルは，複数コンダクタンス状態での開口を示し，平均開口時間は，抑制性シナプス電流の下降時定数とほぼ一致した。生後発達に伴い，チャネル開口時間が短縮し，これと平行して抑制性シナプス電流の下降時間が短縮した。幼若，成熟型αサブユニットをコードする cRNA により，グリシン受容体をツメガエル卵母細胞に発現させ，チャネルの性質を比較した結果，成熟型受容体チャネルの開口時間は幼若型受容体のそれよりも著しく短いことが明かとなった。個体発生途上でαサブユニットのスイッチは抑制シナプス応答時間の短縮をもたらすと結論される。

(9) グラミシジン穿孔パッチ法による抑制性アミノ酸受容体応答の研究

赤池紀扶（九州大・医・第二生理）

中枢神経細胞の細胞内 Cl^- 濃度はどのくらいなのだろうか？そして，生理的条件下の細胞内 Cl^- 濃度ではどのような GABA やグリシン応答が惹起されるのであろうか？この問題を解決するため，一価の陽イオンのみに透過性を有するイオノフォアであるグラミシジンを用いた新しい穿孔パッチクランプ法を開発した。本法により，①細胞内 Cl^- 濃度の測定が可能となった。その結果，中枢神経細胞でも細胞内 Cl^- 濃度の脳部位差が存在することが明かとなった。②従来のパッチクランプ法では拮抗剤を用いないと区別できなかった EPSC や IPSC を，それぞれ内向きならびに外向き電流として簡単に記録できるようになった。③本法はスライスパッチ標本にも利用できる。④ GABA 応答が 0mV 以上の脱分極側電位で膜電位依存性の外向き整流を発生することがわかった。

13. 消化器の機能及びその調節機構

1993年10月28日～10月29日

代表者：鈴木裕一（静岡県立大・食品栄養科学・栄養生理）

世話人：尾崎　毅

(1) 消化管の食物成分認識機構：消化管の脂肪酸受容

伏木　亨（京都大・農・食品工学）

(2) ヒスタミン H2 受容体の脱感作について

菅野健太郎（東京大・保健センター）

(3) ウナギの腸管より抽出したソマトスタチンとその作用

安藤正昭（広島大・総合科学）

(4) M3 ムスカリン性アセチルコリン受容体の情報伝達

梶村昌良（浜松医大・医・内科）

(5) 小腸二糖類水解酵素の発現調節機構

合田敏尚（静岡県立大・食品栄養科学）

(6) フロリジンの経口摂取によるラット小腸二糖類水解酵素活性と Na－グルコース共輸送担体の調節

南　久則（徳島大・医・病態栄養）

(7) Gastrin による増殖作用機序

木下芳一（神戸大・医・老年科）

(8) 短鎖脂肪酸の腸上皮細胞増殖促進作用

坂田　隆（石巻専修大・理工）

(9) 小腸吸収細胞の電位作動性Kチャネル：その性質と不活性化促進因子

岡田泰伸（生理研）

(10) The effect of short-chain fatty acid on cell volume, membrane currents and electrolyte transport in the rat colon

Martin Diener（Zurich 大・獣生理学研）

(11) 腸上皮のアポトーシス

岩永敏彦（新潟大・医・解剖）

(12) 小腸絨毛上皮下繊維芽細胞とエンドセリン

古家園子（生理研）

(13) 消化管運動ペースメーカー細胞に関する形態学的考察

小室輝昌（早稲田大・人間科学）

(14) 先天性 aganglionosis ラット結腸における壁外性神経終末と close contact を有する腸上皮下 fibroblast 様細胞

長浜真人（愛知県コロニー研究所）

(15) PACAP による消化管血流の調節

成瀬　達（名古屋大・医・第２内科）

(16) プロトンポンプ阻害剤による阻害機構は薬物の些細な構造の違いにより大きく異なる

竹口紀晃（富山医薬大・薬学・薬物生理）

(17) 短鎖脂肪酸吸収における陰イオン交換輸送の役割

矢島高二（明治乳業㈱中央研究所）

(18) 大腸上皮の H^+ ポンプ

鈴木裕一（静岡県立大・食品栄養科学）

【討論参加者】

坂田　隆（石巻専修大・理工），南　久則（徳島大・医・病態栄養），伏木　亨，新谷隆史，高橋信之（京都大・農学部），木下芳一（神戸大・医・老人科），小坂信二，加地雅人（香川医大・付属病院薬剤部），竹口紀晃，Martin Diener（富山医薬大・薬学・薬物生理），矢島高二，小嶋槙（明治乳業㈱中央研究所），小室輝昌，周　徳山（早稲田大・人間科学），岩永敏彦，星　　治（新潟大・医・解剖），菅野健太郎（東京大・保健センター），安藤正昭，上坂敏弘（広島大・総合科学），合田敏尚，鈴木裕一，林　久由，今村千晴，丸山美智子（静岡県立大・食品栄養科学・栄養生理），長浜真人（愛知県コロニー研究所），梶村昌良（浜松医大・医），成瀬　達（名古屋大・医・第２内科），岡田泰伸，古家園子，尾崎　毅（生理研）

(1) 消化管の食物成分認識機構：消化管の脂肪酸受容

伏木　亨（京都大・農・食品工学）
新谷隆史，高橋信之，小寺　智，杉本悦郎（同・教室栄養化学）

（要旨）

脂肪酸による消化管ホルモン分泌の機構を明らかにする目的で，小腸培養細胞を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を指標にして検討したところ，脂肪酸の炭素鎖長とともに末端のカルボキシル基を認識する機構の存在が推定された。このカルボキシル基認識機構はグルタミン酸受容体と特異性が類似している。

(2) ヒスタミン H2 受容体の脱感作について

菅野健太郎，福嶋康之（東京大・保健センター・第3内科）

酸分泌刺激物質のなかで最も重要と考えられるヒスタミンの壁細胞膜受容体は薬理学的には H2 サブクラスに分類されているが，最近ヒスタミン H2 受容体遺伝子が Gantz らによってクローニングされ，7回膜を貫通し，G蛋白質と共役するペプチドアミン型受容体ファミリーに属し，β受容体と近縁の受容体であることが明らかにされた。しかし，この受容体機能の調節や情報伝達機構の詳細についてはまだ十分に検討されているとはいえない。我々は Gantz らの発表した塩基配列に基づいて，H2 受容体を PCR 法でクローニングし，これを CHO 細胞に発現させ脱感作の機構について検討したので報告する。H2 受容体を発現させた CHO 細胞をヒスタミンで刺激後，再度ヒスタミン刺激を加えると，細胞およびその膜での cAMP 産生は明らかに低下しいわゆる脱感作現象が観察された。この際 H2 アンタゴニストであるチオチジンの最大結合数の低下が認められたがその親和性には変化がなくしかもヒスタミン H2 受容体抗体で認識されるヒスタミン H2 受容体蛋白量の変化も明らかでなかった。以上の結果は脱感作に伴って受容体 Sequestration が起きていることを示唆している。

(3) ウナギの腸管より抽出したソマトスタチンとその作用

上坂敏弘，安藤正昭（広島大・総合科学）

海水ウナギの腸の経上皮電位を上昇させる物質として，四種類のソマトスタチンをウナギの腸管の抽出物より単離・精製した。その内の二種類は既に Conlon 等（1988）によってヨーロッパウナギの膵臓から精製された eSS-25 Ⅱと eSS-25 Ⅰと同一であった。残りの二種類は eSS-25 Ⅱと eSS-25 ⅠのC端14アミノ酸残基からなるものであった (eSS-14 Ⅱ, eSS-14 Ⅰ)。これら四種類はいずれも短絡電流を増大させるが，一番低濃度で効くのは eSS-25 Ⅱであり，eSS-25 Ⅰ＞ eSS-14 Ⅱの順番であった。eSS-25 Ⅱが eSS-14 Ⅱより強力であることから，ウナギの腸ではN端の11残基がソマトスタチンの活性を高めるのに必要であると考えられる。その他にも哺乳類のソマトスタチン (SS-25, SS-14) の効果を調べ，構造活性関係を議論する。eSS-25 Ⅱは海水ウナギの腸の NaCl 及び水の輸送も高めるが，その作用は TTX やヨヒンビンでブロックされない。このことはソマトスタチンが神経の興奮や，アドレナリンの放出を促すことによって作用してはいないことを示している。多分，直接上皮細胞に作用して，アセチルコリンやセロトニンによって水の吸収が抑えられるのを防いでいるのであろう。

(4) M3 ムスカリン性アセチルコリン受容体の情報伝達

梶村昌良（浜松医大・医・内科）

(5) 小腸二糖類水解酵素の発現調節機構

合田敏尚（静岡県立大・食品栄養科学）

【要約】

小腸吸収細胞の微絨毛膜に発現する二糖類水解酵素の活性は食事要因によって速やかに変動する。その変動にかかわる因子やその変動の機構について，本研究では，sucrase-isomaltase (SI) 複合体と lactase-phlorizin hydrolase (LPH) 複合体を中心に検討した。あらかじめ低糖質食を摂取させたラットにショ糖を含む高糖質食をポリエチレン管を用いて胃内に強制投与すると，投与の12時間後には空腸のスクラーゼ活性やラクターゼ活性が増大するとともに，SImRNA と LPHmRNA が増大した。従って，糖質の摂取は SI と LPH を翻訳前のレベルで共通の機構で調節するものと推察される。

さらに，糖質摂取量が同じであっても，摂取する脂質の種類によっても SI と LPH の酵素活性は変動し，長鎖脂肪食を摂取したラットでは，中鎖脂肪食を摂取したラットよりも酵素活性が低くなった。この長鎖脂肪による酵素活性の減少は，主に酵素タンパク質１分子あたりの酵素活性の減少によるものであり，脂質の摂取は細胞内の前駆体のプロセシングならびに微絨毛膜での分解速度を修飾しているものと推察された。

以上のように，小腸吸収細胞の二糖類水解酵素の活性は，糖質と脂質の両方によって翻訳前と翻訳後の複数の機構で調節されるものと考えられる。

(6) フロリジンの経口摂取によるラット小腸二糖類水解酵素活性と Na-グルコース共輸送担体の調節

南　久則，宮本賢一，武田英二（徳島大・医・病態栄養学）

小腸における二糖類水解酵素活性 (DS) と，ナトリウム依存性グルコース吸収担体 (SGLT) の調節機序を解明するため，グルコース吸収の特異的阻害剤であるフロリジン (PHZ) を添加した食餌

でラットを飼育した時の，DS 活性と SGLT の変動を観察した。

低スターチ食(LS 食，スターチ含量10カロリー%)，あるいは LS 食に PHZ を添加した食餌(PHZ 食，0.1%－0.9%，w/w) でラットを飼育した後，空腸 DS 活性と SGLT を測定した。さらに，スクラーゼ，ラクターゼおよび SGLT の mRNA 量の変動を測定した。

食餌への PHZ の添加により，小腸 DS 活性は投与量あるいは時間に依存的に上昇した。PHZ の構成成分であるフロレチンには誘導効果が観察されなかった。刷子縁膜 への ^{3}H-PHZ の結合数より SGLT 数を測定すると，PHZ 食群で SGLT 数が LS 食群と比較して有意に増加していた。PHZ の DS 活性と SGLT に対する誘導効果は，食餌中の炭水化物の量に依存し，無糖質食に PHZ を添加したときには，両者ともに影響しなかった。ノザンブロット解析の結果，PHZ によるスクラーゼ，ラクターゼおよび SGLT 誘導はそれぞれ対応する mRNA 量を PHZ 添加食群では，対照群に比べ mRNA の発現量は増加していた。

以上のことは，食餌中に添加したフロリジンは，転写レベルの調節を介して DS と SGLT を誘導することを示している。

(7) Gastrin による増殖作用機序

木下芳一（神戸大・医・老年科）

〔**目的**〕CCK-B／ガストリン受容体は，胃癌，肺癌，膵癌，大腸癌など多くの癌細胞で発現がみられる。最近，私達は，ヒト CCK-B／ガストリン受容体 cDNA をクローン化し，受容体を介する細胞増殖促進作用を明らかにした。今回，本受容体 cDNA を NIH 3T3 細胞に導入・発現させ，その細胞内信号伝達機構を解析した。

〔**結果**〕CCK およびガストリンは，ヒト CCK-B／ガストリン受容体発現細胞の [^{3}H] チミジンの取り込みを促進させるとともに，c-fos および，c-myc 遺伝子発現を誘導した。これらのペプチドは，イノシトールリン酸産生を亢進し，細胞内 Ca^{2+} を上昇させるのみならず，$p125^{FAK}$ (FOCAL ADHESI ON KINASE) および MAP キナーゼなど細胞質内蛋白のチロシンリン酸化を誘導した。また，リン酸化により，MAP キナーゼ活性が著明に上昇した。

〔**結論**〕G 蛋白共役型受容体である CCK-B／ガストリン受容体は細胞増殖促進作用を有し，チロシンキナーゼ型増殖因子受容体の細胞内信号伝達系とクロストークの存在が示唆された。

(8) 短鎖脂肪酸の腸上皮細胞増殖促進作用

坂田　隆（石巻専修大・理工）

大腸内での短鎖脂肪酸生成が低下するような条件では，腸上皮細胞の増殖も低下している。そこで，回腸瘻孔ラットで短鎖脂肪酸の腸上皮細胞の増殖に対する作用を調べた。短鎖脂肪酸を大腸内に注入すると，小腸や大腸の上皮細胞増殖が刺激された。この作用は用量依存性で，作用の強さは酪酸〈プロピオン酸〉酢酸であった。この作用は全身的な刺激伝達作用に媒介され，求心性の伝達は自律神経系により，遠心性の伝達は血管系を介する。

(9) 小腸吸収細胞の電位作動性Kチャネル：その性質と不活性化促進因子

立田　浩，辻　和良，岡田泰伸（生理研）

モルモット上部小腸の絨毛上部より単離した刷子縁構造をもった吸収上皮細胞の基底側壁細胞膜にパッチクランプ法を適用したところ，-45mV 以上の脱分極で活性化される電位作動性 K^+ チャネルの存在を見いだした。この単一チャネル伝導度は約 8.5pS であり，速やかに活性化されたのちに緩やかに不活性化された。このアンサンブル電流と同様の K^+ 電流がホールセルクランプ法でも観察されたのでその性質を詳細に調べた。この時間依存性不活性化過程は，キニン，ベラパミール，ニフェジピン，アラキドン酸，細胞外高 Ca^{2+} で著しく促進された。しかもこれらはすべて，定常不活性化曲線を左（負電位）側へシフトさせた。これらはすべて細胞外からしか効かぬので，細胞外より本チャネルの不活性化ゲートに影響をあたえるものと考えられた。このチャネルの生理学的意義についても議論する。

(10) The effect of short-chain fatty acids on cell volume, membrane currents and electrolyte transport in the rat colon.

Martin Diener, Institute for Veterinary Physiology, University Zurich, Switzerland

Short-chain fatty acids are potent stimulators of Na^+ and Cl^- absorption in the colon. In order to characterize the mechanism underlying this stimulation, the effect of butyrate on cell volume and membrane potential of isolated crypts and on electrolyte transport across the intact mucosa of the rat distal colon was studied.

Butyrate induced a concentration-dependent increase in the diameter of isolated crypts, i. e. it caused a swelling of the crypt cells. Swelling was most pronounced at the upper third of the crypt, i. e. at the position, where the more differentiated cells are located. The increase in crypt diameter was completely suppressed by amiloride, indicating that it is caused by activation of the Na^+/H^+ exchanger. Swelling induced by butyrate was followed by a regulatory volume decrease. This volume regulation was suppressed by K^+ and Cl^- channel blockers. A lipoxygenase inhibitor, NDGA, and a leukotriene D_4 receptor blocker, SK&F 104353, also inhibited volume regulation.

Whole-cell patch-clamp recordings revealed that butyrate induced a reversible membrane depolarization of about 15 mV. The effect of butyrate was dependent on the presence of Cl^-. The depolarization was associated with an increase in membrane Cl^- conductance, which was caused by the activation of basolateral Cl^- channels as shown by cell-attached recordings. The butyrate-induced depolarization was inhibited by NDGA and by SK&F 104353 suggesting that a lipoxygenase metabolite mediates the activation of the volume-sensitive Cl^- channels. Conversely, leukotriene D_4 mimicked the effect of butyrate.

In order to answer the question, whether volume-sensitive basolateral Cl^- channels are involved in the stimulation of Cl^- absorption across the intact epithelium by short-chain fatty acids, Ussing chamber experiments were performed. Butyrate induced a decrease in short-circuit current, which was dependent on the presence of Cl^-. Simultaneoulsy it caused a stimulation of the mucosa to serosa fluxes of Na^+ and Cl^-. This stimulation was completely prevented by a Cl^- channel blocker or a lipoxygenase inhibitor. Thus, the opening of volume-sensitive basolateral Cl^- channels is essential for the stimulation of Cl^- absorption by short-chain fatty acids.

(11) 腸上皮のアポトーシス

岩永敏彦（新潟大・医・解剖）

わずか2，3日の寿命しかもたない腸の上皮細胞は，アポトーシス apoptosis と呼ばれる細胞の自然死 programmed cell death の格好のモデルとなるはずであるが，絨毛先端での細胞死の機序は不明である。モルモットとラットを比較しながら，腸絨毛先端での細胞の死に方を観察した。モルモットの絨毛では，上皮細胞は細胞障害性の強い large granular lymphocyte (LGL) によって攻撃される結果アポトーシスが起こること，その後の細胞成分（アポトーシス小体）は固有層のマクロファージに処理されることがわかった。ラットでは，上皮内のリンパ球は上皮細胞のアポトーシスに関与しておらず，アポトーシスの典型的な像は管腔内に剝離してから現れた。リンパ球依存性の細胞死がモルモットでみられ，ラットではみられないことはどのように説明できるの

か。これらの現象は腸管バリヤーにどのような影響を与えるのか。

(12) 小腸絨毛上皮下線維芽細胞とエンドセリン

古家園子（生理研）

小腸絨毛上皮下でネットワークを形成している線維芽細胞（筋線維芽細胞）は，星状でアクチンに富み，毛細血管や平滑筋に突起を伸ばしている。毛細血管の収縮弛緩や血管，神経，平滑筋との間の情報伝達に何らかの役割を担っているのではないかと古くから推測されてきたが，実体は不明であった。私達は強力な血管作働物質であるエンドセリンがこれらの線維芽細胞に特異的に結合することを電顕オートラジオグラフィーにて明らかにしてきた。次にこの線維芽細胞の培養法を確立し，種々の血管作働物質や神経伝達物質に対する細胞の反応を Fura-2 による細胞内 Ca 測定法にて測定を行った。筋線維芽細胞は，セロトニン，サブスタンスP，ブラジキニン，アンギオテンシンⅡ，エンドセリン－1，エンドセリン－3などにより，細胞内 Ca 濃度が一過性に上昇し，時として Ca 振動が見られた。また，筋線維芽細胞は血清を含む培養液中ではフラットな形態を示すが，dBcAMP により星状へ変化し，エンドセリンにより星状からフラットに変化した。これらの形態変化は Ca イオン除去液中でも起こり，また，BAPTA を取り込ませた細胞でも形態変化は誘起されることから，筋線維芽細胞の形態変化は細胞内 cAMP 濃度に依存し，カルシウム非依存性であることが明らかになった。また，この形態変化の過程を免疫組織化学にて観察すると，F-アクチンが星状では脱重合していた。

また，培養筋線維芽細胞を抗原として，モノクローナル抗体を作製すると，脳のアストロサイトや腸管筋層の介在細胞が染まる抗体が多数，得られた。この様に，筋線維芽細胞は，形態変化の機構や各種の生理活性物質に対する反応，免疫学的性質が，脳におけるアストロサイトと非常に類似していることが明らかになった。

(13) 消化管運動ペースメーカー細胞に関する形態学的考察

小室輝昌，周　徳山（早稲田大・人間科学）

消化管運動のペースメーカーとして，非神経，非筋の特殊な細胞，いわゆるカハールの介在細胞 (interstitial cell of Cajal) が注目されつつあるが，その機能的特性を示す形態学的証明はもちろん，細胞学的同定に当たっても，未だ研究者間の一致した意見を見ていない。

本講演では，材料としてラット，モルモットの小腸を用い，当該細胞の主張されている筋層間

神経叢，深部筋神経叢，輪層筋組織内の各部位における間質性細胞について広く検索し，それらの細胞全体の形状，微細構造，細胞骨格蛋白等の特徴を明かにし，その機能的性格を推量する手がかりを得る事に努め，Cajal の原著に記載された細胞の同定を試みた。

(14) 先天性 aganglionosis ラット結腸における壁外性神経終末と close contact を有する腸上皮下 fibroblast 様細胞

長浜真人（愛知県コロニー研究所）

先天性 aganglionosis ラット下部消化管粘膜固有層内に増生する壁外性神経線維は上皮基底膜直下に密着・伸展した粗面小胞体に富む fibroblast 様細胞に close contact しているのが多数認められた。この所見は神経節細胞という標的を失った壁外性神経線維が直接 fibroblast 様細胞を標的の一部としているとも思われるものであった。上皮下 fibroblast 様細胞と神経終末の極めて近い close contact の所見は神経と上皮下 fibroblast 様細胞との特定の関係を意味するものと示唆された。

(15) PACAP による消化管血流の調節

成瀬　達（名古屋大・医・第２内科）

PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) は視床下部より単離された VIP と類似の構造を有する神経ペプチドであり，PACAP38 と PACAP27 の２つの分子型が存在する。PACAP は中枢神経系のみならず消化管の神経系にも存在しており，消化管における生理的役割が注目されている。本研究では無麻酔犬を用いて，胃および小腸の血流に対する PACAP の作用を VIP と比較検討した。

方法：エーテル麻酔下にてビーグル犬５頭に胃瘻ならびに十二指腸瘻を造設した。超音波トランジットタイム血流計のプローブを左胃動脈および上腸間膜動脈に装着し，大腿動脈にテレメトリー用の血圧トランスデューサーを挿入した。術後回復期を置いた後，意識下にて PACAP および VIP を経静脈的に投与し，胃および小腸の血流と血圧を連続的に測定した。

成績：左胃動脈および上腸間膜動脈血流の基礎値は，それぞれ22± 4，142±20㎖／分であった。PACAP38, PACAP27 および VIP の静脈内投与 (5, 10, 25, 50, 100pmol/kg) により，心拍数と左胃動脈血流は用量依存性に増加し，血圧は用量依存性に低下した。PACAP38 と PACAP27 の胃血流増加作用（400％）は VIP よりはるかに強力であったが，両者間には差が無かった。

PACAP38 の心拍数および左胃動脈血流の増加作用は，PACAP27 ならびに VIP の作用より長く持続した。いずれのペプチドも上腸間膜動脈血流増加作用は弱く（40%），PACAP と VIP の力価に差を認めなかった。

結論： PACAP は VIP より強力なイヌの胃血管拡張作用を有するが，小腸血管に対する作用は弱く，VIP と同等である。胃血管ならびに心拍数に対する PACAP38 の作用時間は PACAP27 より長い。

(16) プロトンポンプ阻害剤による阻害機構は薬物の些細な構造の違いにより大きく異なる

竹口紀晃，森井孫俊，富山愛隆（富山医薬大・薬・薬物生理）

オメプラゾールは胃プロトンポンプ阻害剤としてよく知られているが，ポンプの生化学的反応機構に及ぼす影響についてはほとんどわかっていない。可逆的結合に対しての阻害形式論がまずもって適用できない。我々はオメプラゾールや E3810 を非可逆的特異的にポンプに結合させ，ポンプのコンフォーメションに与える影響，部分反応に与える影響を調べた。両者の化学構造は少ししか変わらないのに，これらの影響は顕著に異なった (J Biol Chem, October, 1993)。オメプラゾールと E3810 の in vivo の効果は酸分泌抑制時間に差があり，前者はポンプの de novo 合成により再開するが，後者はより早く回復し阻害剤が外れることも再開に寄与する。これら阻害剤より脂溶性の高いランソプラゾールの場合，ポンプに対する結合量は 3 倍あると報告されている。その結果，より複雑な影響をポンプの細胞内輸送に与えている。

(17) 短鎖脂肪酸吸収における陰イオン交換輸送の役割

矢島高二（明治乳業㈱中央研究所）

Summary

大腸粘膜からのプロピオン酸吸収におけるプロピオン酸－ HCO_3 のアニオン交換輸送の役割についてモルモット盲腸と遠位部結腸を用いて検討した。粘膜側のプロピオン酸 (10mM) により HCO_3 分泌が盲腸および遠位部結腸において促進された。盲腸および遠位部結腸の HCO_3 分泌は炭酸脱水素酵素の抑制薬であるエトキシゾラマイドにより部分的に抑制された。アニオン交換輸送に依存した HCO_3 分泌は盲腸および遠位部結腸（ウワバイン存在下）で各々1.4および 1.0μmol/cm^2/h と計算された。一方，プロピオン酸の粘膜側から漿膜側へのフラックスは各々

1.0および1.1μmol/cm^2/hであった。モルモット大腸粘膜からの短鎖脂肪酸吸収に短鎖脂肪酸とHCO_3のアニオン交換輸送が役割を果たしていることがしめされた。

(18) 大腸上皮のプロトンポンプ

鈴木裕一（静岡県立大・食品栄養科学・栄養生理）

大腸（遠位部）粘膜上皮細胞の管腔側膜には，H, K-ATPaseが存在している。このATPaseに対応すると思われるcDNAをモルモット大腸粘膜から得たライブラリーよりクローニングしたところ，Na, K-ATPaseとも，胃のH, K-ATPaseとも60%のホモロジーを持つP-型のイオン輸送ATPaseであることが示された。このATPaseは，管腔内へH^+を放出し大腸内を酸性化すると同時に，Kの吸収にも預かっている。これらの働きがスムースに進行するためには，代謝との結合，細胞内pH調節，イオンチャネルの関与等の問題も関わってくる。これらの点も検討した。

14. 上皮性 Cl^- チャネル研究の新展開

1994年3月1日～3日

代表者：竹口紀晃（富山医薬大）

世話人：岡田泰伸，老木成稔

(1) 胃 H^+, K^+-ATPase の機能の一部としての頂端膜 Cl^- チャネル

竹口紀晃，富山愛隆，大鹿元也，浅野真司，森井孫俊（富山医薬大・薬・薬物生理）

(2) ヒト小腸上皮細胞の容積調節性 Cl^- チャネルの性質

岡田泰伸（生理研）

(3) ヒト上皮細胞における容積調節性クロライドチャネルのマグネシウムと ATP 依存性

老木成稔，久保町子，岡田泰伸（生理研）

(4) 腎におけるクロライドチャネルのクローニング

佐々木成，内田信一，丸茂文昭（東京医歯大・医・第二内科）

(5) cAMP による腎近位尿細管基底側膜の Cl コンダクタンス

関　常司，谷口茂夫，上床　周，鈴木慶二，黒川　清（東京大・医・第一内科）

(6) 尿細管系球体調節機構における管腔内 Cl^- 濃度及び Ca^{2+} 濃度の役割

成瀬正浩，井上武明，中山眞人，佐藤辰男（熊大・医・第三内科）

黒川　清（東京大・医・第一内科）

(7) 細いヘンレ上行脚の Cl コンダクタンスの調節

今井　正（自治医大・薬理）

(8) 機能性 Cl^- チャネルの開口放出による発現はありえるか？

丸山芳夫（自治医大・生理）

(9) ウサギ腎近位尿細管培養細胞における低浸透圧誘発クロライド電流の遅い活性化

河原克雅（千葉大・医・第二生理）

(10) エンドセリンによるモルモット胃壁細胞の Cl チャンネルの活性

鍛冶田英俊，白方祐子，小寺　徹，上田俊二（京大・医・第一内科）

岡田泰伸（生理研）

(11) 経細胞輸送系を用いたヒト P 糖蛋白質の多剤輸送機構の解析

植田和光，佐伯　徹，駒野　徹（京大・農・農化）

平井みどり，谷川原祐介，堀　了平（京大・医・病院薬剤部）

(12) 胃酸分泌細胞基底側膜の Cl^- チャネルの新規 GTP γ S 依存性調節機構

酒井秀紀，竹口紀晃（富山医薬大・薬・薬物生理）

(13) 腎遠位尿細管上皮培養細胞 (A6) における抗利尿ホルモン (ADH) の Cl channel 活性化機構

丸中良典，遠田秀起（トロント大・医・小児病研）

(14) 胎児肺胞細胞における Na 再吸収の細胞内 Cl による調節機構

丸中良典，中張隆司，遠田秀起（トロント大・医・小児病研）

(15) 腎遠位尿細管上皮培養細胞 (A6) における抗利尿ホルモン (ADH) の whole cell Cl conductance 活性化の細胞内 free Ca 及び Cl 濃度依存性

中張隆司，丸中良典（トロント大・医・小児病研）

【討論参加者】

○竹口紀晃（富山医薬大・薬），今井　正（自治医大），佐々木成（東京医歯大・医），藤本　守（大阪医大），丸山芳夫（自治医大），河原克雅（千葉大・医），酒井秀紀（富山医薬大・薬），植田和光（京大・農），鈴木裕一（静岡大・食品栄養），老木成稔，富永真琴，挾間章博，石川　透（生理研），鍛治田英俊（京大・医），森　禎章（大阪医大），関　常司（東大・医），上田俊二（京大・医），丸茂文昭（東京医歯大・医），小寺　徹（京大・医），小寺邦彦（大阪医大），森井孫俊，浅野真司（富山医薬大・薬），萩原暢子（大阪医大），林　久由（静岡大・食品栄養），斉藤禎隆（岩手病院），竹口美津穂，柿木文平（富山医薬大・薬），成瀬正浩（熊本大・医），丸中良典（トロント大），内田信一（東京医歯大・医），白方祐子（京大・医），佐伯　徹，木野孝一（京大・農），岡田泰伸（生理研）

【研究会概要】

上皮性 Cl^- チャネルの遺伝子に欠損ないし変異がおきると，チャネルの性質の異常がおきたり，チャネルの生合成後の細胞内輸送に異常がおきる。この例はチャネルの研究が電気生理学的手法のみならず，細胞生物学，分子生物学手法をも必要とすることを語る。この研究会には，わが国において Cl^- チャネルを電気生理学，細胞生物学，分子生物学の立場から研究している研究者が参加した。胃，腸，腎，膵，肺などの各種臓器における多様な機能を有する Cl^- チャネルが発表・討議の対象になった。能動輸送ポンプ分子中に併せて Cl^- チャネルが存在する例が報告された。多剤薬物排除ポンプ中における Cl^- チャネルがそれ自身容積調節性のチャネルであるのかあるいは他の容積調節性のチャネルを調節するのかが問題になった。遺伝子を細胞株に発現させるとき，調節するチャネルと調節されるチャネルの両者の量的関係次第でその関係は異なる可能性があり，現在発表されている data から得られている結論は最終的なものと言えないとの討論がなされた。また細胞内の ATP や Mg^{2+} 濃度といった因子によってもイオンチャネルの機能は調節されていることが発表された。外来的な遺伝子導入という手段に頼らずに，各種臓器細胞におけるポンプーイオンチャネル，イオンチャネルーイオンチャネル間の相互作用をその細胞における内外環境下で解明することが要求されている。新たにわが国でクローニングされた Cl^- チャネルについて発表があった。その生理学的意義はこれから解明される段階にある。他方，腎，肺，膵における Cl^- チャネルの細胞内因子（cAMP, Ca^{2+}, Cl^-, pH，キナーゼ，スーパオキサイド）や細胞外因子（ADH ホルモン，エンドセリン）による調節機構についても発表があった。刺激によ

るチャネルの細胞内プールより細胞分泌膜中への移行の可能性の検討がなされた。それらの詳細は各発表の講演要旨にゆずる。

(1) 胃 H^+, K^+-ATPase の機能の一部としての頂端膜 Cl^- チャネル

竹口紀晃，富山愛隆，大鹿元也，浅野真司，森井孫俊（富山医薬大・薬・薬物生理）

胃 H^+, K^+-ATPase には，K^+ と H^+ の対向的能動輸送機構以外に Cl^- のチャネルが同一分子中に存在するとの主張を我々は行ってきた。この Cl^- チャネルは化学的に S-S 結合により開くことができる。その主張の主要根拠は胃 H^+, K^+-ATPase の ATPase 活性を阻害すると同時に Cl^- チャネルのオープニングを阻害する単クローン抗体を開発し得たことにある。今回あらたに，H^+, K^+-ATPase のコンフォーメーションに依存して S-S 結合によるオープニングが調節されることがわかった。即ち，H^+, K^+-ATPase は E1 及び E2 と区別される異なるコンフォーメーションを取りうる。E2 状態では Cl^- チャネルはオープニングしないことがわかった。このことは Cl^- チャネルが H^+, K^+-ATPase の分子中に存在することを示す新たな証拠となる。

(2) ヒト小腸上皮細胞の容積調節性 Cl^- チャネルの性質

岡田泰伸，久保町子，老木成稔
富永真琴，挾間章博，森島　繁（生理研）

低張負荷をうけたヒト小腸上皮細胞 (Intestine 407) は，浸透圧性細胞膨張を強いられた後に次第に元の容積へと復帰する。この容積調節は，K^+ チャネルと Cl^- チャネルの活性化による KCl 流出により達成される。今回は，この容積調節性 Cl^- チャネルの性質を調べた。このチャネルは中等度の単位コンダクタンス（約 50 pS at + 100 mV）をもち，外向き整流性を示した。+ 50 mV 以上の陽電圧によって時間依存性の不活性化を示すという特徴を持つ。このチャネル活性は，各種キナーゼ阻害剤やフォスファターゼ阻害剤ではなんら影響を受けないこと，細胞内 ATP の存在が不可欠であるが，ATP は水解される必要はないこと，そして細胞内 Mg^{2+} はむしろ濃度依存性にチャネル活性を抑制することなどが明かとなった。

(3) ヒト上皮細胞における容積調節性クロライドチャネルのマグネシウムとATP依存性

老木成稔，久保町子，岡田泰伸（生理研）

ヒト小腸上皮細胞（Inteshue 407細胞）容積調節性クロライドチャネルの細胞内調節因子について，電気生理学的に全細胞記録法によって検討した。このチャネルの活性化には細胞内ATPは不可欠である。細胞内遊離マグネシウム濃度を一定にしてATP濃度を上昇させることによってクロライド電流は増大した。解離定数は20μMであった。一方，遊離ATP濃度を一定にして遊離マグネシウム濃度を上昇させるとクロライド電流は減少した。遊離ATP濃度が0.1mMのときのマグネシウム解離定数は2mMであった。解離定数は遊離ATP濃度によって変化した。

以上の実験結果から，このクロライドチャネルに対するATPとマグネシウムの結合様式とチャネル活性に対する効果をモデル解析した。チャネルの活性化に関わるのはマグネシウム結合ATPではなく，遊離ATPであることが判明した。またマグネシウムイオンがチャネルに結合して引き起こすチャネル抑制効果は，遊離ATPの結合と競合することが明らかになった。

(4) 腎におけるクロライドチャネルのクローニング

佐々木成，内田信一，丸茂文昭（東京医歯大・医・第2内科）

近年電位依存性のクロライドチャネルのファミリーがクローニングされた。我々も腎臓に存在するこのファミリーのメンバーを3個クローニングしたので報告する。PCRクローニング法を用い，ClC-K_1, ClC-K_2, ClC-3と名付けたクローンを取ることが出来た。ClC-K_1, ClC-K_2は腎臓のみに発現しており，両者はアミノ酸レベルで約80％の相同性があった。ClC-3は他のメンバーとの相同性は低く，約25％であった。ClC-3は多くの臓器に発現しており，特に中枢神経系（嗅球，海馬，小脳など）での発現が興味深った。これらの3種のチャネルはアフリカツメガエル卵での発現実験で，機能が確認された。今後これらのチャネルの生理的意義，クロライドチャネルの構造と機能の関係などについて検討を進める予定である。

(5) cAMP による腎近位尿細管基底側膜の Cl コンダクタンス

関　常司，谷口茂夫，上床　周，鈴木慶二，黒川　清（東京大・第一内科）

我々はウサギの腎近位尿細管基底側膜に Cl コンダクタンスが存在することを示したが，今回このコンダクタンスの調節機構を微小電極により調べた。

ウサギの単離尿細管を用いて溶液の K 濃度を変化させると細胞内の Cl 濃度は電位依存性に変化するが，この細胞内 Cl 濃度の変化は cAMP により増幅された。細胞内 Ca 濃度の上昇や PKC 活性化はこの細胞内 Cl 濃度の変化に影響を与えなかった。一方，溶液の Cl 除去による起電性の反応も cAMP により増幅され，またこの反応は Cl チャネル阻害剤により抑制された。以上よりこの Cl コンダクタンスは cAMP により活性化され，細胞内 Ca 濃度の上昇や PKC 活性化は直接影響しないことが示された。

(6) 尿細管系球体調節機構における管腔内 Cl^- 濃度及び Ca^{2+} 濃度の役割

成瀬正浩，井上武明，中山眞人，佐藤辰男（熊本大・第 3 内科）
黒川　清（東京大・第 1 内科）

【目的】

マクラデンサ細胞（MD 細胞）のイオン輸送特性を明らかにする。

【方法】

家兎腎より MD 細胞を含む尿細管を糸球体を付けたままの形で単離，灌流し，管腔内の Cl^- 濃度及び Ca^{2+} 濃度変化時の MD 血管側膜電位 (Vb) 及び細胞内 Ca^{2+} 濃度を観察した。

【結果】

管腔内の Cl^- 濃度並びに Ca^{2+} 濃度の減少は MD-Vb を過分極させた。また MD 細胞内 Ca^{2+} 濃度は管腔内 Ca^{2+} 濃度に平行して変化した。さらに，血管側の低 Cl^- 液灌流実験から管腔内の Ca^{2+} 濃度が血管側の Cl^- コンダクタンスに影響を及ぼしていることが分かった。

【総括】

MD 細胞では，管腔内 Ca^{2+} 濃度変化によって血管側 Cl^- 輸送が影響を受ける。従って，管腔内 Cl^- 濃度同様 Ca^{2+} 濃度変化もまた尿細管－糸球体調節機構を修飾する可能性がある。

(7) 細いヘンレ上行脚の Cl コンダクタンスの調節

今井　正（自治医大・薬理学）

細いヘンレ上行脚 (ATL) は腎髄質対向流を介する尿濃縮機構に重要な役割りを果している。ATL は水透過性が低く，中等度の尿素透過性があり，NaCl 透過性が高い。特に Cl 透過性は著しく高い。この Cl 輸送機序としては①輸送飽和がある，②Ussing のフラックス比が単純受動輸送に合わない，③Br, I, SCN 等により抑制される，④各種陰イオン輸送阻害薬，特に Cl チャネル阻害薬 NPPB によって阻害される等の傍証から，Cl チャネルの存在が考えられる。Cl コンダクタンス (G_{Cl}) は Cl ＝ Br ＞＞ I ＝ F のハロゲン透過選択性があり，また pH に依存性があり，酸性 pH で抑制される。また Ca 依存性があり Ca によって G_{Cl} が高くなる。2 つの異なった機能の SH 部位を持ち，一般の SH 阻害薬は非可能逆的に G_{Cl} を抑制するのに対して，NEM はこれに加えて，可逆的促進作用を示す。

(8) 機能性 Cl^- チャネルの開口放出による発現はありえるか？

丸山芳夫（自治医大・生理）

単一膵腺房細胞でのアゴニスト誘発性膜容量 (C) および膜コンダクタンス増加 (G) をパッチクランプ位相計測法により同時計測し，それらの時間経過を比較した。アセチルコリンおよび A23187 刺激に対し，C は常に G に遅れて増加しまた C は G の時間経過に影響しなかった。以上，同細胞においては，開口放出による機能性イオンチャネルの膜への埋め込みはない，と結論した。

(9) ウサギ腎近位尿細管培養細胞における低浸透圧誘発クロライド電流の遅い活性化

河原克雅（千葉大・医・第二生理）

ウサギ腎近位尿細管培養細胞は，細胞外 Ca 依存性の細胞容積調節能 (RVD) を有していた。低浸透圧液による細胞膨化時に活性化する，カリウム電流とクロライド電流を，パッチクランプ法を用いて解析した。最初に，電流固定法で細胞膜電位を記録すると，低浸透圧により一過性に過分極し，ついで脱分極した。パッチ電極内の Cl イオンを gluconate イオンにおきかえると，二次的な脱分極は観察されなかった。Cl 電流の活性化は，K 電流の活性化に比し，定常状態に達するまでの時間経過が遅かった。K 電流の92.2％は Ca 依存性で，Cl 電流のそれは54％であった。

遅い時間経過で活性化するCl電流が，RVDの時関経過を決定すると考えられた。

(10) エンドセリンによるモルモット胃壁細胞のClチャンネルの活性

鍛治田英俊，白方祐子，小寺　徹，上田俊二（京都大・第一内科）
岡田泰伸（生理研）

モルモット胃壁細胞Cl電流へのエンドセリンの効果についてパッチクランプ法を用いて検討した。細胞外にエンドセリン1を投与するとCl電流は増加した。増加した電流は電位依存性がみられず，細胞外のCl濃度を減少させると平衡電位はNernstの式に一致して右に移動した。NPPBの投与により増加した電流は減少し，陰イオンの選択性はI＞Br＞Cl＞Fで Eisenman 1であった。増加する電流はETA受容体拮抗剤には抑制されずETB受容体拮抗剤に抑制され，ETB受容体アゴニストで同様に電流が増加したことからETB受容体を介する反応と考えられた。

(11) 経細胞輸送系を用いたヒトP糖蛋白質の多剤輸送機構の解析

植田和光，佐伯　徹，駒野　徹（京大・農・農化）
平井みどり，谷川原祐介，堀　了平（医・病院薬剤部）

P糖蛋白質は，種々の抗癌剤をATP加水分解に依存して，細胞内から外へ能動的に排出するトランスポータとして機能するだけでなく，容量依存クロライドチャネルとしても機能する特異な膜蛋白である。P糖蛋白質のトランスポータとしての機能をより詳細に解析するため，ヒト*MDR1* cDNAをブタ腎上皮細胞由来培養細胞に導入し，頂側膜特異的に発現させることによって，経細胞輸送測定系を確立した。この実験系によって，P糖蛋白質が，腎臓，副腎，妊娠中の胎盤において薬物あるいはステロイドのトランスポータとして重要な機能をはたしていることが示唆された。さらに，P糖蛋白質の阻害剤の多くが，それら自身，P糖蛋白質によって輸送されることが明らかになった。

(12) 胃酸分泌細胞基底側膜の Cl^- チャネルの新規 GTP γ S 依存性調節機構

酒井秀紀，竹口紀晃（富山医薬大・薬・薬物生理学）

ウサギ胃酸分泌細胞基底側膜にはコンダクタンスの非常に小さい Cl^- チャネル (0.3pS) が多数存在している。この Cl^- チャネルは膜電位形成に寄与することで，細胞のハウスキーピング的役割を担っている。また，このチャネルの活動は PGE_2 によって活性化され，GTP γ S によって抑制される。今回，GTP γ S によるチャネル抑制機構についての研究を行った。ホールセル記録で GTP γ S の効果は細胞内に superoxide dismutase を加えることにより消失した。また，細胞内に lumazine と xanthine oxidase を加え，人為的に superoxide (O_2^-) を発生させるとチャネルの活動が抑制された。さらに蛍光法で細胞内 GTP γ S が活性酸素の発生を促進することを見い出した。従って GTP γ S によるチャネル抑制機構に O_2^- がメッセンジャーとして寄与いるものと考えられた。

(13) 腎遠位尿細管上皮培養細胞 (A6) における抗利尿ホルモン (ADH) の Cl channel 活性化機構

丸中良典，遠田秀起（トロント大・医・小児病院研，医科学研究所）

A6 細胞管腔側膜には，3 & 8pS の single channel conducatnce を持つ Cl channel が存在することは既に報告した (Am. J. Physiol., **258**: C352, 1990; J. Gen. Physiol, **95**: 773,1990)。一方，ADH が，A6 細胞において Cl 輸送を促進することも知られているが，その channel level での調節機構に関しては，不明であった。今回，我々は，パッチクランプ法を用い，以下のことを明らかにした。ADH は，3pS channel の細胞内 Ca に対する感受性100倍程度高めることにより，内向き conductance を増大させ，またその開口確率を増大させ，一方，8pS channel の数を増大させ，これらにより，管腔側膜の Cl conductance を上昇させた。これらの知見は，ADH が 3pS channel の開口確率と conductance の増大及び 8pS channel の数の増大をもたらすことにより，管腔側膜の Cl conductance を上昇させ，Cl 輸送を促進させることを示唆するものである。

⑭ 胎児肺胞細胞における Na 再吸収の細胞内 Cl による調節機構

丸中良典，中張隆司，遠田秀起（トロント大・医・小児病院研，医科学研究所）

胎児肺胞内は，上皮細胞の能動的 Cl 分泌により，Cl を豊富に含む溶液で満たされている。この溶液は，肺胞内部より肺細胞に陽圧をかけることにより，肺細胞増殖に重要な働きをしている。一方，この溶液は，非選択性カチオンチャネル (NSCC) の活性化を通じて，分娩時に再吸収される。この NSCC の活性化は，カテコラミン刺激によるが，その作用機序は不明であった。今回，我々は，パッチクランプ法を用い，以下の事を明らかにした。カテコラミンは，胎児肺胞細胞に存在する NSCC を修飾し，Ca に対する反応性を高め，生理的 $[Ca]_i$ において，NSCC 活性の細胞内 Cl に対する依存性を発現させ，一方，細胞容積を減少させ $[Cl]_i$ を減じることにより，この NSCC の活性を高める。これらの知見は，細胞容積及び細胞内 [Cl] がカテコラミン作用の細胞内情報伝達機構に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

⑮ 腎遠位尿細管上皮培養細胞 (A6) における抗利尿ホルモン (ADH) の whole cell Cl conductance 活性化の細胞内 free Ca 及び Cl 濃度依存性

中張隆司，丸中良典（トロント大・医・小児病院研，医科学研究所）

A6 細胞において，経細胞的に Cl が輸送されていることが知られ，また ADH による促進作用も報告されている。しかし，その詳細については，未だに不明な点が多い。今回，我々は，whole cell clamp 法を用い，ADH の whole cell Cl conductance の増大作用の細胞内 free Ca 及び Cl 濃度依存性を調べた。細胞内 free Ca 濃度を 1 nM に固定し細胞内 Cl 濃度が 80 mM 以下の時は，ADH による一過性の Cl conductance 増大作用が観察され，細胞内 Cl 濃度減少と共に ADH による Cl conductance 増大作用は大きくなった。また，この ADH による Cl conductance の一過性の増大は，細胞内 free Ca 濃度に依存し，細胞内 free Ca 濃度を 100 nM に増大させることにより，basal Cl conductance が上昇し，ADH による Cl conductance 上昇は観察し得なかった。これらのことにより，A6 細胞の ADH による Cl conductance 増大作用は，細胞内 free Ca 及び Cl 濃度の両者により制御されていることが判明した。

15. Ca^{2+}シグナリングと細胞機能制御機構

1993年9月29日～30日

代表者：宮崎俊一（東京女子医大・第二生理）

世話人：岡田泰伸

(1) シナプス前終末Ca^{2+}動態と伝達物質放出の制御

八尾　寛（京大・医・第一生理）

(2) 神経細胞死とカルシウム

小倉明彦（三菱化成生命研・脳神経科学部）

(3) Na^{+}-H^{+}交換輸送系のCa^{2+}による調節

若林繁夫，重川宗一（循環器病センター・循環分子生理部）

(4) イノシトール3リン酸受容体とCa^{2+}シグナル伝達

古市貞一（東大・医科研・化学研究部）

(5) Ca^{2+}とイノシトール3リン酸と細胞内Ca^{2+}動員

飯野正光（東大・医・第二薬理）

(6) イノシトール3リン酸レセプターとCa^{2+}波・Ca^{2+}振動

宮崎俊一，白川英樹，白石浩一，本多祥子（東京女子医大・第二生理）

(7) 顎下腺細胞のCa^{2+}シグナリング

泉井　亮，福士靖江，張　　偉，西山明徳（東北大・医・第一生理）

(8) 平滑筋収縮反応のカルポニンによる調節機構

三野照正，中　充子，田中利男（三重大・医・薬理）

(9) 細胞容積調節機構とCa^{2+}及びMg^{2+}

岡田泰伸，挾間章博，久保町子，三輪晃子，老木成稔（生理研）

(10) 刺激－分泌連関とCa^{2+}シグナル

菅野富夫，葉原芳昭，Julio Busik（生理研）

(11) 乳腺上皮細胞におけるCa^{2+}シグナリング

古家喜四夫（生理研）

榎本浩一（島根医大・生理）

(12) Ca^{2+}シグナルとエクソサイトーシス／エンドサイトーシス

丸山芳夫（自治医大・第二生理）

(13) 血小板由来成長因子の増殖促進作用とCa^{2+}

小島　至，最上秀夫（群馬大・内分泌研・細胞制御部）

⑭ 酵母を用いた Ca^{2+} シグナルの分子遺伝学的解析

飯田秀利，小野智子，奥村万樹子（基生研・細胞増殖）

【討論参加者】

八尾　寛，片岡洋祐（京大・医・第一生理），小倉明彦（三菱化成生命研・脳神経科学部），若林繁夫，重川宗一（循環器病センター・循環分子生理部），古市貞一，宮脇敦史，吉川文生，古玉大介，門川俊明（東大・医科研・化学研究部），飯野正光，山澤徳志子，廣瀬謙造（東大・医・第二薬理），○宮崎俊一，白川英樹，白石浩一，本多祥子（東京女子医大・第二生理），泉井　亮（東北大・医・第一生理），田中利男，向井　淳（三重大・医・薬理），岡田泰伸，挾間章博，久保町子，三輪晃子，老木成稔，富永真琴，山本　隆，樫原康博，菅野富夫，葉原芳昭，Julia Busik，山岸俊一，古家喜四夫（生理研），榎本浩一（島根医大・生理），丸山芳夫（自治医大・第二生理），小島　至（群馬大・内分泌研・細胞制御部），飯田秀利（基生研・細胞増殖），寺川　進（浜松医大）

【研究会概要】

種々の重要な細胞機能を制御する細胞内 Ca^{2+} イオンを共通テーマとして，いろいろな研究領域の研究者が集まり，情報交換を行った。内容的には，Ca^{2+} 動員機序につき，細胞膜の Ca^{2+} 透過性チャネルと小胞体膜の Ca^{2+} 遊離チャネルの分子構造と機能との関連，Ca^{2+} の時間的・空間的動態がテーマとなった。また対象になった Ca^{2+} 制御性細胞過程については，Ca^{2+} による細胞膜イオン透過性・イオン輸送およびその調節，小胞体からの Ca^{2+} 遊離の調節，筋収縮，エキソサイトーシス・エンドサイトーシス，シナプス伝達，受精，細胞増殖，細胞容積の調節，細胞死など多岐にわたり，他の領域の興味深い情報を得，大いに刺激となった。会は自由な討論を時間をとってできるように配慮し，非常に活発な質疑応答がなされた。また，懇親会をふくめ，これまで交流がなかった研究室の人々，若手研究者の交流ができた点でも有意義であった。

(1) シナプス前終末 Ca^{2+} 動態と伝達物質放出の制御

八尾　寛（京大・医・第一生理）

ニワトリ胚毛様体神経節の杯状シナプス前終末に fura-2-dextran を取り込ませ，二波長蛍光測光法によりシナプス前終末内 Ca^{2+} 濃度を測定した。終末内 Ca^{2+} 濃度は，活動電位に伴い上昇することが認められた。終末全体の空間平均の Ca^{2+} 濃度の上昇は細胞外の Ca^{2+} に依存した。シナプス前終末からの伝達物質の放出はアデノシン A_1 受容体により抑制される。アデノシン A_1 受容体は活動電位に伴う終末内 Ca^{2+} 上昇を抑制した。Ca^{2+} を Ba^{2+} に置換してもアデノシンによる抑制が認められることから，Ca^{2+} 流入が抑制されたものと判定した。ω-コノトキシン処

理後においてはCa^{2+}流入の抑制が認められないことから，A_1受容体はω-コノトキシン感受性Ca^{2+}チャネルを選択的に抑制することが明らかになった。

(2) 神経細胞死とカルシウム

小倉明彦（三菱化成生命研・脳神経科学部）

海馬神経細胞は短時間の虚血によって変性する。その機構を解析する目的で培養細胞は好適な系である。虚血時に起こる大量のグルタミン酸放出を模擬する意味で，グルタミン酸を短時間投与すると，培養海馬神経細胞は細胞死に陥る。この細胞死は外液のCa濃度に依存する。Ca流入阻害剤やCaキレータの投与によって軽減する，実測した細胞内Ca濃度上昇の規模と平行する，などの事実から，細胞内Ca濃度の異常な上昇によって契機されることが明らかになった。神経細胞内にはcalbindin (CB)などの内在性Ca結合蛋白がある。免疫化学的手法とCa顕微定量法とを併用して検討すると，海馬細胞のCBの多寡とCa排出効率の高低とに平行性が見られた。現在，非神経細胞にCBのcDNAを導入してCa動態を観察し，Ca結合蛋白とCa排出および細胞死防御との因果関係を検索中である。

(3) Na^+-H^+交換輸送系のCa^{2+}による調節

若林繁夫，重川宗一（循環器病センター・循環分子生理部）

Na^+/H^+交換輸送体の調節における細胞内Ca^{2+} (Ca_i^{2+})の役割を明らかにするため，カルモヂュリン(CaM)と輸送体との相互作用を検討した。その結果，1）輸送体はCa^{2+}依存的にCaMに強く結合すること，2）細胞質ドメインの中間（アミノ酸636—690)にCaMに対する高親和性（A領域）あるいは中間的親和性（B領域）を持つ二つの結合部位が存在することがわかった。線維芽細胞で発現させたA領域へのCaM結合能を失った変異タンパク質は，1）無刺激下でもH^+感受性増加により恒常的に活性化状態にあること，3）トロンビンおよび高浸透圧刺激による長期の細胞内アルカリ化の阻害を示すことがわかった。以上の結果は，A領域が“pHセンサー”に対して"autoinhibitory"ドメインとして機能しており，種々の細胞外シグナルによる輸送全体の活性化が，Ca結合によりこの阻害が解除されることによって起こることを強く示唆する。

(4) イノシトール3リン酸受容体と Ca^{2+}シグナル伝達

古市貞一（東大・医科研・化学研究部）

イノシトール3リン酸(IP_3)は，細胞内のCa^{2+}貯蔵部位（小胞体など）に存在するIP_3受容体に作用してCa^{2+}動員を誘導する。IP_3受容体（2749アミノ酸）は，カルボキシル末端近傍で，小胞体膜を6回貫通してCa^{2+}チャネルを形成する。IP_3受容体複合体（ホモ4量体）は，各サブユニットの長い細胞質領域のアミノ末端側650アミノ酸内でリガンドであるIP_3と結合する。この結合が複合体の構造変化をもたらしてCa^{2+}チャネルポアを開口すると考えられる。このIP_3誘導Ca^{2+}動員はCa^{2+}濃度，カルモデュリン，各種キナーゼによって調節されているらしい。IP_3受容体には，alternative，スプラシイシングが起こる領域が2箇所存在し，組織特異的に発現調節されている。現在までに遺伝子レベルで異なる3種類のIP_3受容体タイプが報告され，形質膜IP_3受容体の存在が示唆されている。このようなIP_3受容体ファミリーが異なった受容体，チャネル活性をもつ可能性があり，多様な生命現象にIP_3/Ca^{2+}シグナルが関与していると思われる。

(5) Ca^{2+}とイノシトール3リン酸と細胞内Ca^{2+}動員

飯野正光（東大・医・第二薬理）

イノシトール三燐酸(IP_3)によるCa^{2+}放出は，0.1から1μMのCa^{2+}によって二相性の促進と抑制を受けることを我々は平滑筋標本を用いて示した。このようなCa^{2+}依存性は，リアノジン受容体の機能であるCa^{2+}によるCa^{2+}放出(CICR)機構と相同であり，IP_3受容体の機能は，IP_3要求性CICR機構と言える。Ca^{2+}制御のキネティックスを調べるため，ケージドCa^{2+}によって急速にCa^{2+}濃度を上昇させると，時間遅れなくCa^{2+}放出速度は増加した。Ca^{2+}による促進機構がCa^{2+}放出に正帰還をかける結果，Ca^{2+}放出とIP_3濃度の間には強い協同性が生じる。画像解析法により単離平滑筋細胞内Ca^{2+}濃度分布を調べると，Ca^{2+}放出は波として細胞全体に伝播していた。この機序にIP_3によるCa^{2+}の感受性が関与していることが示された。この結果，アゴニスト濃度とCa^{2+}放出の関係にも強い協同性があり，個々の細胞は全か無かの反応をするという意外な事実が明らかになった。

(6) イノシトール3リン酸レセプターと Ca^{2+}波・Ca^{2+}振動

宮崎俊一，白川英樹，白石浩一，本多祥子（東京女子医大・第二生理）

受精時の卵で，精子付着部位から細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加し，全体に伝播する（Ca^{2+}波）。哺乳動物卵では一過性の Ca^{2+} 増加が繰り返し起こる（Ca^{2+}振動）。マウス IP_3 受容体 (IP_3R) に対する単クローン抗体 18A10 が IP_3R を介する Ca^{2+} 遊離 (IP_3R-induced Ca^{2+} release, IICR) を抑制することを利用して，ハムスター受精卵では IICR が Ca^{2+} 増加の開始も，伝播も，振動においても本質的な役割を果たしていることを実証した。細胞内に注入した Ca^{2+} によって Ca^{2+} 遊離がおこる (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR) が，リアノジン受容体は検出できない。従って，飯野らによる Ca^{2+} による IICR の感作作用が自己再生的な過程を形成し，Ca^{2+}波と Ca^{2+}振動の基礎になると考えられる。Ca^{2+} を遊離した小胞体への Ca^{2+} の供給には，細胞外からの Ca^{2+} 流入が必須であるが，その経路の候補として IP_1 依存性 Ca^{2+} チャネルを示唆する結果を得た。また，精子一卵結合から IP_3 産生に至るシグナル伝達機構について検索した。

(7) 顎下腺細胞の Ca^{2+} シグナリング

泉井　亮，福士靖江，張　　偉，西山明徳（東北大・医・第一生理）

顎下腺腺房細胞での Ca^{2+} 振動の発生機序に IP_3 がどのように関与するかを明らかにするため，caged IP_3 を試み，紫外線照射で得られる Ca^{2+} 依存性膜電位を記録した。一回の紫外線照射 (500μs, 50 ～ 200joule) に対して，一つの Ca^{2+} 依存性 Cl^- 電流スパイクが発生し，この大きさは照射の強さに相関した。照射をくりかえすと，ACh 刺激で得られる Ca^{2+} 振動と類似した振動が再現された。一方 Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流もスパイク状に記録されたが，このピークは Cl^- 電流よりも 1 ～ 2 秒遅れた。振動の発生には IP_3 活性が持続する必要があること，IP_3 は振動を発生する Ca^{2+} pool に直接作用すること，そこは Cl^- チャネルに近接すること，などが示唆される。

(8) 平滑筋収縮反応のカルポニンによる調節機構

三野照正，中　充子，田中利男（三重大・医・薬理）

平滑筋収縮応答のカルシウム調節機構として，カルシウム－カルモデュリン依存性ミオシン軽鎖リン酸化反応が知られている。しかし，細胞内カルシウム濃度やミオシン軽鎖リン酸化量と平

滑筋収縮応答の関係は，種々の条件により変化することが明らかになり，カルシウム感受性として注目されてきた。そこで，ミオシン軽鎖リン酸化反応以外のカルシウム感受性制御機構として，プロテインキナーゼCによるカルポニンのリン酸化反応について検討した。さらに，プロテインホスファターゼ（タイプ1，2A）によるカルポニンの脱リン酸化反応を解析した。その結果，カルポニンのリン酸化－脱リン酸化反応が，平滑筋収縮応答におけるカルシウム感受性制御機構として重要な役割を果たしていることが示唆された。

(9) 細胞容積調節機構と Ca^{2+}及び Mg^{2+}

岡田泰伸，挟間章博，久保町子，三輪晃子，老木成稔（生理研）

殆どの細胞は，低浸透環境におかれて細胞膨張が強いられても，やがて元の体積へと復帰するという細胞容積調節を持っている。これは，細胞外への水流出を駆動するKとClの流出によって達成され，上皮細胞の場合は K^+チャネルと Cl^-チャネルの開口に基づく。浸透圧性膨張時には細胞内 Ca^{2+}濃度の増大が見られ，これによって K^+チャネルが活性化される。一方，Cl^-チャネルは Ca^{2+}とは無関係であり，むしろ細胞内 Mg^{2+}濃度に依存する。細胞内 Mg^{2+}は低濃度であるほど活性化は促進された。

(10) 刺激—分泌連関と Ca^{2+}シグナル

菅野富夫，葉原芳昭，Julia Busik（生理研）

ラット膵外分泌腺をコラゲナーゼ処理を行い，遊離腺房標本を作成し，生理的刺激であるコレシストキニンオクタペプチド(CCK-8)あるいはAChで持続的に刺激し，fura-2を用いて細胞内カルシウム濃度($[Ca^{2+}]_i$)変化を記録した。同様の条件でアミラーゼ放出を測定し，$[Ca^{2+}]_i$の変化と比較した。生理的濃度(10μM)以下のCCK-8あるいはそれに相当するAChで刺激すると，まず腺房細胞の細胞膜基底側直下から $[Ca^{2+}]_i$が上昇し，$[Ca^{2+}]_i$振動が記録され，酵素原顆粒に富む（粗面小胞体の少ない）腺腔側に伝播すると $[Ca^{2+}]_i$振動は減衰した。基底側で記録される $[Ca^{2+}]_i$振動の積分値と，腺腔側の減衰振動の積分値はほぼ等しかった。同一腺房を構成する隣接する腺房細胞からは，ほぼ同一の頻度であり数秒以上遅延した $[Ca^{2+}]_i$振動が記録された。これら $[Ca^{2+}]_i$振動の総和が，緩やかに立ち上がり刺激中持続する分泌反応を引き起こすものと考えられる。

(11) 乳腺上皮細胞における Ca^{2+} シグナリング

古家喜四夫（生理研）
榎本浩一（島根医大・生理）

培養乳腺上皮細胞（マウス初代培養及び樹立株癌細胞）は機械的刺激によって細胞内 Ca^{2+} が増大し，その Ca^{2+} シグナルは周りの細胞へ伝播 (10μm/s) する。この伝播は物理的に離れたコロニー間でも起こる事から，液性情報によっていると考えられる。乳腺の培養細胞をピペッティングした上清液には，細胞内 Ca^{2+} を増大させる物質が含まれており，その物質の精製，同定を行った。活性物質は 260nm に吸収を持ち，phosphodiesterase や pilophosphatase 処理で失活したため，燐酸化ヌクレオチドと予想された。HPLC の結果，活性成分として ATP, UTP, UDP（各約 1μM）の存在が確認された。機械的刺激によってこれらの物質が放出され，周りの細胞のプリン受容体 (P_{2U}) を活性化することによって Ca^{2+} 波が伝播していくと考えられる。また乳腺上皮細胞は静止状態においても細胞への Ca^{2+} 流入が顕著である。Mn^{2+} による fura-2 の消光を用いて，Ca^{2+} 流入過程の定量的な解析を行った。その結果，この Ca^{2+} 流入経路は，thapsigargin による Ca^{2+} ストアの枯渇によって活性化される経路と同じであり，オカダ酸処理によってブロックされることから phosphatase がこの流入経路の活性維持に関与している事が示唆された。

(12) Ca^{2+} シグナルとエクソサイトージス

丸山芳夫（自治医大・第二生理）

単一膵腺腺房細胞に whole-cell clamp を基本とした位相計測法を適用し，アゴニストによる膜容量および膜コンダクタンスの増加を記録した。空間的な Ca 分布と膜容量の増加応答の経時相関を解析すると，膜容量の増加はアゴニストによる初発の Ca 増加が管腔側膜近傍で起こるとした場合によく説明される。それを確かめるため，共焦点レーザー顕微鏡により Ca 分布を調べたところ，従来の報告のように Ca の初発応答は管腔側にて起こることが認められた。こうした膜容量・Ca 分布相関は，アセチルコリンおよびイノシトール三リン酸により同様に認められた。Ca の管腔側におけるスパイク状放出は，膜容量の増加すなわちエクソサイトージスを直接誘発し得た。膜容量応答の立ち上がり相はジクモイド状であった。Ca スパイクの経過に伴い，そうした立ち上がりは徐々に遅れ，それは分泌顆粒の移行遅延と考えられた。拡散と Ca の排除を仮定し，反応の拡散方程式への当てはめを試みたところ，管腔側での Ca スパイクおよびその短距離拡散は，膜容量増加のジグモイド状立ち上がり応答をよく説明しえた。膜容量応答の Ca 依存性を調べると，初発反応の立ち上がりは相当に速く，管腔側での 0.2-0.3μM の平均 Ca 濃度上昇

にて充分であろうと推測された。

(13) 血小板由来成長因子の増殖促進作用と Ca^{2+}

小島　至，最上秀夫（群馬大・内分泌研・細胞制御部）

血小板由来成長因子 (PDGF) は血管平滑筋細胞の増殖を促進する強力な増殖因子である。PDGF は細胞内で多くの反応を惹起するが，その１つに細胞内 Ca^{2+} 動態の変化がある。特に PDGF は持続的な Ca^{2+} 流入増加を起こす。この作用は少なくとも PDGF 投与後８時間は持続する。PDGF は電位非依存性の Ca^{2+} 流入経路，恐らくはチャネルを活性化して Ca^{2+} 流入を増加させる。この Ca^{2+} 流入は増殖の促進には必須で，Ca^{2+} 流入をブロックすると平滑筋細胞は G_1 期のプログレッションを停止し，DNA 合成はおこらない。

(14) 酵母を用いた Ca^{2+} シグナルの分子遺伝学的解析

飯田秀利，小野智子，奥村万樹子（基生研・細胞増殖）

Ca^{2+} シグナルの発生，受容および伝達のカスケードを分子レベルで明らかにすることを目的として，それらに欠損をもつと予想される突然変異株群 *(mid)* を単離し，５つの相補性グループ *(mid1 ～ mid5)* に分類した。mid1 と mid3 株は Ca^{2+} の流入に欠損をもつことを明らかにした。一方，mid2, mid4 および mid5 株は Ca^{2+} の流入が正常なので，Ca^{2+} シグナルの受容または伝達に欠損をもつと考えられる。これらの予想と一致して，遺伝子の解析から，MID1 遺伝子産物は動物細胞のイオンチャネルの膜貫通ドメインに類似した配列をもち，MID2 遺伝子産物は α-ラクトアルブミンの Ca^{2+} 結合域に類似した配列をもつことを明らかにした。また分子遺伝学的解析により，確かに MID2 遺伝子産物は MID1 遺伝子産物の下流ではたらくことを明らかにした。

16. 分泌・吸収上皮における輸送の分子機構とその制御

1994年1月18日～19日

代表者：藤本　守（大阪医大）

世話人：岡田泰伸

(1) 急性腎不全ウサギ腎ネフロンにおけるエンドセリン分泌：免疫組織化学的検討を主体にして

丸茂文昭（東京医歯大・医・第二内科）

(2) エンドセリンB受容体を介する胃酸分泌細胞の Cl^- チャネル活性化応答

鍛治田英俊，白方祐子，小寺　徹，上田俊二（京都大・医・内科）

岡田泰伸（生理研）

(3) ヒト大腸における分泌吸収機能の研究

鈴木裕一，板坂　哲，亀山仁一，鞍掛彰秀，金子健也，佐野知子，

道源瑞紀，林　久由（静岡県立大・食品栄養科学部・生理）

(4) ラット顎下腺単離小胞体標本によるカフェイン誘発性 Ca^{2+} 放出

小沢輝高，西山明徳（東北大・医・第一生理）

(5) 顎下腺腺房細胞の IP_3 による Ca^{2+} 放出と Ca^{2+} 依存性膜電流

泉井　亮，張　　偉，福士靖江，林　　曦，西山明徳（東北大・医・第一生理）

(6) 顎下腺腺房細胞の Ca^{2+} 放出経路と流入経路：Sr^{2+} は Ca^{2+} を代用するか

福士靖江，泉井　亮，小沢輝高，張　　偉，林　　曦，西山明徳（東北大・医・第一生理）

(7) ラット唾液腺における分泌刺激時の細胞内負荷 calcein の挙動

杉田　誠，柴　芳樹，菅野義信（広島大・歯・口腔生理）

(8) カルシウムシグナル制御の二重構造：膵腺腺房細胞でのアラキドン酸とC-キナーゼ

丸山芳夫（自治医大・生理）

(9) Thapsigargin 誘導体を用いた SERCA (SR/ER Ca^{2+} -ATPase) アイソフォームに対する阻害

浅野真司，Jonathan Lytton（ハーバード大・医）

(10) 単離食用蛙腎近位尿細管細胞に出現した K^+ チャネルの解析

森　禎章，萩原暢子，窪田隆裕，小寺邦彦，藤本　守（大阪医大・第二生理）

(11) Asymmetrical Ba^{2+} -block of maxi-K^+ channels on human fetal vas deferens epithelial cells.

Y. Sohma (Dept Physiol, Osaka Med Coll)

A. Harris, C. J. C. Wardle (Inst Molecular Medicine, Univ Oxford UK)

M. A. Gray, B. E. Argent (Dept Physiol Sci, Univ Newcastle upon Tyne UK)

(12) 膵β細胞のイオン環境と ATP-sensitive K^+ channel 活動

北里　宏，丁　維光，服部政憲，何　莉萍（滋賀医大・第二生理）

(13) ラット灌流顎下腺におけるカルシウム依存性血管側外向きKイオン輸送

石川　透，村上政隆，瀬尾芳輝（生理研）

(14) 分泌持続期における唾液腺Na輸送体の寄与

村上政隆，瀬尾芳輝，石川　透（生理研）

(15) ナトリウム・ミオイノシトール共輸送体の電気生理学的研究

挾間章博（生理研）

E. M. Wright（UCLA・生理）

(16) 内耳血管条辺縁細胞のイオンチャネル

竹内俊二，入交昭彦（高知医大・第二生理）

(17) Simultaneous recording of intracellular calcium and stretch-activated channel current in A6 cells.

河原克雅（千葉大・医・第二生理）

(18) パルス磁場勾配法による細胞内制限拡散の解析

瀬尾芳輝，石川　透，村上政隆（生理研）

ウテ　アンマ（マックスプランク研究所）

【討論参加者】

○藤本　守，小寺邦彦，萩原暢子，森　禎章（大阪医大），岡田泰伸，挾間章博，老木成稔，富永真琴，山岸俊一，村上政隆，瀬尾芳輝，石川　透（生理研），鍛治田英俊，上田俊二（京都大・医），今井雄介，相馬義郎（大阪医大），北里　宏，丁　維光（滋賀医大），泉井　亮，小沢輝高，福士靖江（東北大・医），竹口紀晃，浅野真司（富山医薬大），菅野義信，杉田　誠（広島大・歯），丸茂文昭（東京医歯大・医），入交昭彦，竹内俊二，安藤元紀（高知医大），丸山芳夫（自治医大），鈴木裕一，林　久由，丸山美智子（静岡県大・食品栄養科学），河原克雅（千葉大・医）

【研究会概要】

生体組織のうち，上皮膜は水・電解質を最もよく輸送する組織である。上皮膜の中には，膵β細胞などの興奮性細胞とか，唾液腺，胃腺などの刺激応答性を有する外分泌腺細胞とか腸粘膜，腎尿細管上皮のような非興奮性細胞が含まれ，多彩な生理機能を全うする。このような上皮膜の分泌・吸収機能は，生物的な目的性をもち，分子レベルで効果的に統合・制御されている。これらにあずかる要素としては，膜受容体を調節する種々のG蛋白とか，IP_3·Ca^{2+}，DGを含むprotein kinase C系，ならびにadenylate cyclase, cyclic AMPを含むprotein kinase A系が知られ，その何れも燐酸化，プロトン化に関連し，またカルシウムの関与も重要視されている。しかし，それらの統御機構の詳細な分子機構については解明されていない点が多い。

今回の研究会では，以下の点に焦点を絞り討議をおこなった。

(1) 腎臓，胃や腸上皮における輸送に対する細胞内の内在調節機構の検討。

(2) 唾液腺，膵臓細胞では，既にその調節機構が比較的明らかにされてきているので，その刺激応答（シグナル変換機構など）の詳細な分子機構を解明する。

(3) これらの調節における各上皮細胞の pH, Ca^{2+} その他の細胞内イオン環境の役割の検討。

(4) エネルギー代謝，上皮細胞間連絡などの水電解質輸送に対する関わりを明らかにする。

研究手法としては，電気生理学的方法（経上皮膜電位および電流，細胞内電位の測定，パッチクランプ法による膜電流の測定，微小イオン電極による細胞内イオン活量の測定），生化学的方法（蛍光を利用した細胞内イオン濃度の測定，顕微分光測光法による細胞内イオン分布の測定），遺伝子工学を用いた分子生物学的アプローチ，NMR 法などが用いられた。

【要約】

今回の研究結果を簡単に要約することは至難であるが，研究レベルとしてはどれをみても国際的に通用するほど高度のものが多い。研究材料が上皮であることを反映して，その結果にも多様性を示してはいるものの，近年の傾向として，膜のイオンチャネルの制御の研究が主流である。大まかにみて分泌・吸収にかかわるシグナル伝達におけるリセプター機構，制御機構は各細胞ではほぼ大筋において集約段階にあるようにも思われるが，分離細胞その他特殊な系が多いために，まだ一般化するのが困難なものも少なくない。これからはより一般化された系で，その分子機構，各制御因子間の相互関係に基づいた統括機構，その生理的意義などの全体像を各自のレベルでさらに研究を掘り下げ，生体全体での上皮膜の役割が統括的に理解出来るようになればと期待する。また，イオンチャネル，ポンプ，ゲートその他のより実際的定義，数量化，およびイオン相互関係などの確立ものぞまれる。以下抄録を発表順に掲載する。

(1) 急性腎不全ウサギ腎ネフロンにおけるエンドセリン分泌：免疫組織化学的検討を主体にして

丸茂文昭（東京医歯大・第二内科）

酢酸ウラン静注および片腎摘出後残腎動脈60分阻血による急性腎不全を家兎に生ぜしめた。24，48時間後の血清 Cr, Endothelin (ET) 等を測定，48時間後の腎を摘出して蛍光抗体法，ペルオキシダーゼ法，ABC 法で ET-1 抗体を用いて染色した。その結果，血清 Cr は上昇し急性腎不全は惹起されていたが，血漿 ET は上昇せず，FE_{ET} の上昇をみた。このことは腎尿細管からの ET 分泌を示唆する。染色結果は，糸球体に全く反応なく集合管のみに強い染色が認められた。この意義については，過去の ET が集合管の水，NaCl 再吸収を抑制するという in vitro の成績から考えて，急性腎不全に対し生体が ET を集合管で分泌させ，尿量を増加させようとする生体防御反応の一部かと思われた。

(2) エンドセリンB受容体を介する胃酸分泌細胞の Cl^- チャネル活性化応答

鍛治田英俊，白方祐子，小寺　徹，上田俊二（京都大・医・内科）
岡田泰伸（生理研）

ETのET_B受容体を介するモルモット胃壁細胞Cl電流に及ぼす効果についてパッチクランプ法，fura2を用いて検討した。細胞外にET-1を灌流させたところ，電流は一過性に用量依存性に増加し，逆転電位は細胞外Cl濃度に依存した。ET-1依存性Cl電流はNPPBおよびET_B拮抗薬により抑制されたが，SITS, ET_A拮抗薬には反応しなかった。単一チャネル・コンダクタンスは約380pSであった。ET-1の灌流により$[Ca^{2+}]_i$は変化せず，百日咳毒素やH-7は影響しなかった。

(3) ヒト大腸における分泌吸収機能の研究

鈴木裕一，林　久由，佐野知子，道源瑞紀（静岡県大・食品栄養科学）
亀山仁一，石田　一，塚本　長，板坂　哲，鞍掛彰秀，高橋恒男，金子健也（山形大・医）
矢島高二（ヤクルト中央研）

1）In vivo study：ボランチアに，管腔内電位測定用に改良したinfusion cathecerを肛門より挿入し留置した。Cl分泌活性の増大を反映すると考えられる管腔内負電位増大が，PGE2注入，あるいはバルーンによる伸展により見られた。2）In vitro study：手術により切出した大腸片をUssing型チャンバーに装着し，短絡電流測定を行った。アドレナリン作動薬の効果を検討したところ，α-1受容体を介する短絡電流低下が観察された。

(4) ラット耳下腺単離小胞体標本によるカフェイン誘発性 Ca^{2+} 放出

小沢輝高，西山明徳（東北大・医・第一生理）

耳下腺腺房細胞のカフェイン誘発性Ca^{2+}放出機構の存在を明らかにする目的で，単離小胞体標本を用いて，Ca^{2+}プールからのCa^{2+}放出に対する，カフェイン並びにリアノジンの効果を調べた。1～20mMのカフェインによりCa^{2+}放出が見られるが，その放出量はCa^{2+}-pumpの阻害剤であるThapsigarginで修飾された。IP_3受容体の阻害剤であるヘパリンはカフェインによるCa^{2+}放出を抑制しなかった。リアノジン存在下（10～500μM）では，カフェインによるCa^{2+}放

出が増強された。またリアノジン単独でも Ca^{2+} の放出が起こった。以上の結果から，耳下腺腺房細胞の小胞体には IP_3 受容体とは異なる Ca^{2+} 放出機構が存在し，それは筋小胞体で同定されているリアノジン受容体と類似の機構であることが示唆された。

(5) 顎下腺腺房細胞の IP_3 による Ca^{2+} 放出と Ca^{2+} 依存性膜電流

泉井　亮，張　　偉，福士靖江，林　　曠，西山明徳（東北大・医・第一生理）

Caged IP_3 を単離細胞内に投与して紫外線照射すると（< 500μs），細胞内からの Ca^{2+} 放出に依存した遅速2成分からなる K^+ 電流と，1成分性の Cl^- 電流が生じた。速い K^+ 電流は小さな電流で，持続も短く，記録されない例もあったが，Cl^- 電流と遅い K^+ 電流はいずれも大きく，その持続は数 sec であり，常に記録された。Cl^- 電流活性のピークは遅い K^+ 電流とほぼ同時か最大2sec 先行した。IP_3 によって大小2種の Ca^{2+} 放出が独立して発生すること，小さい Ca^{2+} 放出は K^+ channel 近傍に起きるが，大きな放出は Cl^- channel 近傍に生じ，放出された Ca^{2+} が拡散あるいは伝播して K^+ channel 近傍に到達することが示唆される。

(6) 顎下腺腺房細胞の Ca^{2+} 放出経路と流入経路：Sr^{2+} は Ca^{2+} を代用するか？

福士靖江，泉井　亮，小沢輝高，張　　偉，林　　曠，
西山明徳（東北大・医・第一生理）

顎下腺腺房細胞の刺激に対する Ca^{2+} 動員は，細胞内 Ca^{2+} プールからの放出と細胞外からの流入によってなされる。この両者のイオン通過経路における Ca^{2+} 選択性をみる目的で，Fura-2による細胞内の2価イオン濃度の測定を行い，外液 Ca^{2+} を Sr^{2+} に置換した。更に単離小胞体標本を用いて ^{45}Ca および ^{89}Sr の細胞内 Ca^{2+} プールへの取り込みを調べた。その結果次の知見を得た。(1) Sr^{2+} はストア感受性の Ca^{2+} 流入経路を通って細胞内に入る。ACh 刺激によるプールからの放出は殆ど見られない。(2) Sr^{2+} が細胞内に入っても Ca^{2+} 流入経路は開いたままである。(3)細胞内に入った Sr^{2+} は，細胞内 Ca^{2+} プールには殆ど取り込まれない。

(7) ラット唾液腺における分泌刺激時の細胞内負荷 calcein の挙動

杉田　誠，柴　芳樹，菅野義信（広島大・歯・口腔生理）
古家喜四夫，山岸俊一（生理研）

ラット耳下腺及び顎下腺の細胞内に負荷した蛍光色素 calcein は，カルバコール (CCh)，ノルアドレナリン (NA) 及び A23187 刺激により放出され，イソプロテレノール (IPR) 及び dbcAMP 刺激では放出されなかった。CCh 及び NA による calcein 放出はそれぞれアトロピン及びフェノキシベンザミンにより抑制された。細胞内カルシウム濃度を測定すると，CCh 刺激における細胞内カルシウム濃度上昇度と calcein 放出量において相関がみられた。また BAPTA を細胞内に取り込ませると CCh 及び NA による calcein 放出は抑制された。外液のカルシウムを除去すると，カルバコール刺激によりカルシウム濃度上昇は一過性となるが，calcein 放出には影響がなかった。今回は分離腺房細胞において，細胞内に負荷した calcein により，ムスカリン性及び α-アドレナリン性受容体を介し，細胞内カルシウム濃度上昇により引き起こされる分泌現象が観察された。

(8) カルシウムシグナル制御の二重構造：膵腺腺房細胞でのアラキドン酸と C-キナーゼ

丸山芳夫（自治医大・生理）

ラット膵腺腺房細胞において，ムスカリン性アセチルコリン受容体（ACh 受容体）刺激に伴う細胞内カルシウム濃度 (Cai) の上昇は，１）受容体レベルでの C-キナーゼによる抑制性制御 (ref. 1)，および２）IP_3 による管腔側局所 Cai 上昇部位 (ref. 2) でのアラキドン酸産制による抑制性制御 (ref. 3, 4) を受けると思われる。

問題点：２）の結果は GTP γ S 刺激および C-キナーゼ阻害下における Cai オッシレーションを説明しない。受容体に関連する GTP 結合蛋白を介したアラキドン酸消退促進因子もしくは IP_3 受容体感受性の維持因子が存在すると仮定される。

References:
１）Maruyama (1989) J. Physiol., 417: 343-359
２）Maruyama et al., (1993) EMBOJ., 12: 3017-3022
３）Maruyama (1990) J. Physiol., 430: 471-482
４）Maruyama (1993) J. Physiol., 463: 729-746

(9) Thapsigargin 誘導体を用いた SERCA アイソフォームに対する阻害

浅野真司，Jonathan Lytton (Harvard Med. School)

細胞内小胞体 (ER) および骨格筋・心筋小胞体 (FSR, CSR) に存在するカルシウムポンプ (SERCA) は，細胞内のカルシウムイオンを能動的に SR/ER プールに回収し，細胞内イオン濃度を下げ，Basal なカルシウムイオン環境を構築する。SERCA には 1a, 1b, 2a, 2b, 3 の五つのアイソフォームが存在する。本研究では各 SERCA アイソフォームの Thapsigargin およびその誘導体に対する阻害感受性の差および構造・活性相関について検討した。

【方法】

ウサギ骨格筋小胞体 (FSR) およびラットの SERCA アイソフォーム (SERCA1, 2b, 3) の cDNA を発現させた HEK-293 細胞を用いて，その Ca^{2+} -ATPase 活性およびカルシウム輸送活性に対する Tg 誘導体の阻害効果を検討した。

【結果】

(1) Tg は用量依存的に FSR の Ca^{2+} -ATPase (SERCA1) 活性を阻害し，モル比 1 : 1 の点において完全に阻害した。(2) Tg の構造中において (7, 11) Trans-OH，および 2 位の炭化水素鎖の脂溶性が阻害活性に重要である。(3) SERCA アイソフォーム間において Tg に対する感受性の違いが認められた (SERCA1, 2b > SERCA3)。(4) SERCA アイソフォーム間で阻害に重要な構造部分に違いが認められた。

(10) 単離食用蛙腎近位尿細管細胞に出現した K^+ チャネルの解析

森　禎章，萩原暢子，窪田隆裕，小寺邦彦，藤本　守（大阪医大・第二生理）

【目的】

腎近位尿細管細胞に存在する多くの K チャネルは，細胞内外のイオン輸送等に重要である。今回，食用蛙腎近位尿細管の単離細胞で，種々の K チャネルを同定し性質を調べた。

【方法】

食用蛙二重灌流腎から近位尿細管細胞をコラゲナーゼ処理にて単離し，パッチクランプ法で種々の K チャネルを同定し，その活性因子を調べた。

【結果】

単離細胞の基底側膜には，約 20, 70, 250pS の単一チャネルコンダクタンスを持つ K チャネルが存在し，70pS の K チャネルは，細胞内酸性化で不活性化されアルカリ化により活性化された。

【結論】

単離食用蛙腎近位尿細管細胞には種々のKチャネルがあり，約70pSの単一チャネルコンダクタンスのKチャネルは，その活性化に細胞内pHが重要である。以上は，既に培養オポッサム腎細胞で報告したものと一致する。

(11) ヒト胎児輸精管上皮細胞の maxi-K^+チャネルの Ba^{2+}による非対称的阻害

相馬義郎（大阪医大・第一生理）
A. Harris, C. J. C. Wardle （英オックスフォード大・分子医研）
M. A. Gray, B. E. Argent （英ニューカッスル大・生理）

パッチクランプ法により，ヒト胎児輸精管上皮由来の初代培養細胞の上面に1μm²あたり平均1～2個の Ca^{2+} -activated, voltage-dependent, maxi-K^+ channel (250pS) が認められた。このchannelは Ba^{2+}によって細胞質側と細胞外側から，それぞれ異なるkineticsで阻害された。細胞質側への Ba^{2+}投与は従来より報告されているsingle-site inhibition schemeに従うsec. durationのlong blockのみを示した。しかし細胞外側への Ba^{2+}投与は従来通りのsec. durationのlong blockのみならずmsec. durationのflickering blockをも示し，single-site inhibition schemeには従わなかった。この事実はこのmaxi-K^+ channelが従来の報告とはことなったchannel pore内部構造を持っている可能性を示唆している。

(12) 膵β細胞のイオン環境と ATP-sensitive K^+ channel 活動

北里　宏，丁　維光，服部政憲，何　莉萍（滋賀医大・第2生理）

細胞外glucose濃度が10mM付近ではβ細胞はspike-burstとsilent phaseとから成る電気的活動を示す。ところで，spike-burstの持続時間の機構はいまだ十分解明されていない。細胞外から Ca^{2+}を除くとspikeが連続して発生した。同様な結果は Ca^{2+}存在下で細胞外 Na^+濃度を下げる場合でも認められた。一方，β細胞を細胞内 Na^+濃度が低下するイオン環境に置くと，ATP-sensitive K^+ channelの活動は抑制された。これらのことから，Ca^{2+} spike発生と共に流入した Ca^{2+}が Na^+/Ca^{2+}交換輸送を介して細胞内 Na^+濃度の上昇をもたらし，Na^+濃度の上昇が Na^+/K^+ -pump活動を亢進させ，これが細胞内ATP濃度の低下をもたらし，K^+コンダクタンスが上昇して，再分極がおこり，spike発生が停止すると考えられる。

(13) ラット灌流顎下腺におけるカルシウム依存性血管側外向きKイオン輸送

石川　透，村上政隆，瀬尾芳輝（生理研）

ラット顎下腺血管灌流標本を用い，外分泌腺細胞血管側膜を介する外向きKイオン輸送に対するmaxi-Kチャネル阻害剤の効果を調べた。アセチルコリンによるCa依存性外向きKフラックスの大部分はTEA (5mM) やカリブドトキシン (100nM) により有意に抑制されなかった。サブスタンスP, A23187によるCa依存性の外向きKフラックスはTEA（5mMまたは10mM）によって有意に抑制されなかった。パッチクランプ法により，ラット顎下腺腺房細胞に存在するmaxi-KチャネルはTEA (5mM) で完全に抑制されることから上記のKフラックスのTEA非感受性はmaxi-KチャネルのTEA非感受性に由来するものではないことが示唆された。TEA (5mM) はA23187による水分泌を有意に抑制しなかった。これらの結果はmaxi-Kチャネル以外のCa依存性Kチャネルが血管側K輸送及び水分泌機構に重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

(14) 分泌持続期における唾液腺Na輸送体の寄与

村上政隆，瀬尾芳輝，石川　透（生理研）

唾液腺腺房細胞のClイオンの二次的能動輸送機構は，Na/K/2Cl共輸送体及び2つの対向輸送体（Na/H antiportとCl/HCO_3 antiportの共同）を用い，Na/K ATPaseによりつくられたNaの電気化学的駆動力にてドライブされるると信じられている。今回，ラット顎下唾液腺の血管灌流標本を材料に，NMR二量子フィルター法を用い，細胞内Na量の変化を測定し，これらのNa輸送体が分泌中にNa全体の輸送にどの程度寄与するかを検討した。細胞内Naは，持続分泌中，流入と汲みだしが釣り合い一定のレベルに保たれる。Na輸送体のひとつを阻害すると他の輸送体の活性により細胞内Naは一過性に変化し別の定常状態に移行する。ouabain, furosemide, amiloride, acetylcholine投与時に測定した細胞内Naの変化速度から各々のNa輸送体が持続分泌中に輸送するNa量を推定すると，Na/K/2Cl共輸送体は全Na流入の約40%，Na/H対向輸送体は全Na流入の60%寄与すると予測された。

(15) ナトリウム・ミオイノシトール共輸送体の電気生理学的研究

挾間章博（生理研）
E. M. Wright (UCLA Department of Physiology)

ナトリウム・ミオイノシトール共輸送体(SMIT1)のcRNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入し共輸送体を細胞膜に発現させ，2本微小電極による膜電位固定法によりその輸送様式を調べた。SMITのcRNAを注入した卵母細胞では，細胞外にミオイノシトール(MI)を与えると，MI濃度，Na濃度に依存した内向き電流が観察される。$K_{0.5}^{MI}$は約50μMで膜電位依存性は無く，$K_{0.5}^{Na}$は76mM (Vm＝-50mV)から40mM (-150mV)であり，ヒル係数は1.9で膜電位依存性は無かった。このことから2個のNaイオンが1個のMIと共役して運ばれるものと考えられる。また，フロリジンはこの内向き電流を抑制し，そのKiは64μM (-50mV)から130μM (-150mV)であった。

(16) 内耳血管条辺縁細胞のイオンチャネル

竹内俊二，入交昭彦（高知医大・第二生理）

蝸牛管側壁を形成する血管条は，内リンパの分泌と蝸牛直流電位の生成を行っている。血管条の主要な構成細胞である辺縁細胞を単離し，基底側膜のパッチクランプ・単一チャネル記録をおこなったところ，二種類のチャネルがみつかった。

(1) 90pSクロライドチャネル：イオン透過性は$Cl > Br > I = NO_3 >$ gluconateの順で，開確率の電位依存性はなかった。Na-K-ATPascによる陽イオン輸送にともなうクロライドの輸送経路として機能している可能性がある。

(2) 25pS非選択的陽イオンチャネル：イオン透過性は$NH_4 > Na = K = Rb > Li$の順で，活性化にはCa^{2+}が必要である。二価イオンに対する透過性はほとんどなく，開確率の電位依存性もなかった。

(17) 腎尿細管培養細胞（A6細胞）における細胞内Caと張力感受性チャネル電流の同時測定

河原克雅（千葉大・医・第二生理）

A6細胞にパッチクランプ法及び蛍光顕微測光法を適用し，低張液による細胞膨化時のCa流

入路の特性を調べた。A6 細胞膜には，張力感受性 Ca 透過型カチオンチャネル（SA チャネル）が発現しており，細胞膨化時の Ca 流入路として働く可能性が示唆された。細胞内 Ca 増加は，SA チャネル活性と連動していた。低張液灌流時の細胞膨化と全細胞膜電流（細胞外→内バリウム電流）の時間経過は，細胞内 Ca を 1-5mM EGTA でキレートした場合一致した（ピーク値まで約80秒）が，細胞内 Ca が増加するような条件 (0.1mM EGTA) では細胞膨化に先行した。SA チャネルは，膜張力及び細胞膜直下の局所 Ca 増加により協調的に活性化し，小さな張力増加で細胞内 Ca の最大増加を引き起こすと考えられた。

(18) パルス磁場勾配 NMR 法による細胞内含 ^{19}F 化合物の制限拡散の解析

ウテ　アンマ，瀬尾芳輝，石川　透，村上政隆（生理研）

医学生物学領域における F-19 NMR 応用として，生体に投与した ^{19}F ラベル化合物を用いての薬物代謝や膜輸送機構の観察が大きく進んでいる。しかしながら，F-19 NMR においては in vivo で有効な化学シフト剤がないことなどから，細胞内外の信号を分離して観察することができなかった。私たちは，パルス磁場勾配 NMR 法をもちいた細胞内信号の分離を試みてきた。前提条件として，細胞内の弗素ラベルした化合物のみかけの拡散速度が細胞外に比べて遅いことがある。ヒト赤血球及び赤血球ゴーストを用いて，3-trifiuoromethel hyppurate の拡散速度を拡散時間を変化させ測定した。拡散時間の延長に伴い細胞内分子の拡散速度の著しい減少が測定され，赤血球のサイズに依存した制限拡散がみかけの拡散速度の減少に大きく寄与していることが明かになった。

17. 虚血再灌流障害と活性酸素―心筋細胞から生体心まで―

1993年10月22日～23日
代表者：有田　眞（大分医大）
世話人：岡田泰伸

(1) グリベンクラミドによる心筋 A キナーゼ依存性クロライド電流の抑制
岡田泰伸，富永真琴（生理研）
堀江　稔（京大・医・分子病診療）

(2) GTP 結合蛋白の basal activity による心筋 L 型カルシウムチャネル電流の調節
堀江　稔，牧田俊則（京大・医・分子病診療）
森島　繁，鈴木　浩，湯月洋介，橋本　恵，篠山重威（同第三内科）
岡田泰伸，富永真琴（生理研）

(3) モルモット心室筋細胞膜電流に対する浸透圧変化の影響
野間昭典，光家　保（京大・医・第二生理）

(4) Oxygen paradox におけるプロスタノイド遊離と心筋障害
岡田隆夫，大地陸男（順天堂大・医・第二生理）

(5) Ion-pairing high-performance liquid chromatography (HPLC) による犬拍動心筋内の代謝変化
―白血球除去による再灌流モデルでの検討―
大久保信司，竹越　襄（金沢医大・循環器内科）

(6) 心筋細胞膜 Ca^{2+} 輸送機構と心筋トロポニンの Ca^{2+} 結合に及ぼす活性酸素の影響
金子雅則，小林　明，山崎　昇（浜松医大・第三内科）

(7) 冠血管による Post-Ischemic Vascular Injury ～ L-arginine nitric oxide pathway の意義
斎藤　崇，三浦　傅（秋田大・医・第二内科）

(8) 活性酸素障害における Nitric Oxide の影響
中澤博江，石田英之，一守康史（東海大・医・生理科学）

(9) SOD 分子設計による心活性酸素病態の制御
井上正康，宮本雅史（大阪市立大・医・第一生化）

(10) 虚血再灌流に対する心筋適応現象と Mn-SOD
星田四郎，西田昌司，山下宜繁，葛谷恒彦（大阪大・医・病理病態・同第一内科）

(11) 虚血再灌流と Free radical scavenger
田村裕男，斎藤　穎（日大・医・第二内科）

(12) 内因性 SOD の誘導と再灌流障害
牧野直樹，野替知容，畑　知二，矢永尚士（九大・生医研・気候内科）

(13) 抗フリーラジカル療法は心筋梗塞サイズを縮小するか？— in vivo 虚血再灌流モデルを用いた検討—

田中　昌，藤原久義，山崎憲蔵，堀江　稔，篠山重威（京大・医・第三内科）

(14) 虚血心筋に対する Cl^--HCO_3^- 阻害剤の作用

西　勝英，頼　仲方（熊大・医・薬理学第二）

(15) 再灌流不整脈の発生機序 Na^+/H^+ 交換系と Na^+-K^+ ATPase の関与

雪吹周生，草間芳樹，早川弘一，Metsn Avkiran, David J. Hearse

（日本医大・第一内科，Cardiovascular Research, St. Thomas' Hospital）

(16) 心筋小胞体 Ca^{2+} 放出チャネルの活性酸素ラジカルに対する反応態度とその機構

岡部栄逸朗，伊藤春生（神奈川歯大・薬理）

(17) T-butylhydroperoxide によるイオン電流傷害作用

西村昌雄，渡部良夫（帝京大・医・第一内科，藤田保健衛生大・総合医科学研）

(18) 鉄イオンキレート剤の心筋保護作用

小池　明，加藤　聡，秋田利明，安部稔雄，児玉逸雄，外山淳治（名大・環境医学研・循環器）

(19) モルモット単一心室筋細胞 ATP 感受性 K チャネルに対する異なった活性酸素種の作用

徳部浩司，清末達人，有田　眞（大分医大・生理第二）

(20) 活性酸素のモルモット心室筋 K チャネルに対する効果について

鶴原由一，松浦　博，穎原嗣尚（佐賀医大・生理）

(21) 心筋酸素欠乏・再酸素化時の ATP 感受性 K^+ チャネルの役割

平岡昌和，安谷屋均，沢登　徹（東京医歯大・難治疾患研・循環器病）

(22) 再灌流不整脈の臨床

笠貫　宏，荻原誠久，細田瑳一（東京女子医大・心臓血圧研・循環器内科）

【討論参加者】

岡田泰伸，富永真琴，老木成稔，挾間章博，山本　隆，林　誠治（生理研），坂手　実（ブラジル　エスタジュアル　ポリスター大学），堀江　稔，牧田俊則（京大・医・分子病診療），野間昭典（京大・医・第二生理），大地陸男，岡田隆夫（順天堂大・医・第二生理），竹越　襄，大久保信司（金沢医大・循環器内科），小林　明，金子雅則（浜松医大・第三内科），三浦　傅，斎藤崇（秋田大・医・第二内科），中澤博江（東海大・医・生理科学），井上正康，宮本雅史（大阪市立大・医・第一生化），葛谷恒彦，星田四郎（大阪大・医・病理病態・同第一内科），斎藤　穎，田村裕男（日大・医・第二内科），牧野直樹（九大・生医研・気候内科），田中　昌，山崎憲蔵（京大・医・第三内科），西　勝英，頼　仲方（熊大・医・薬理学第二），草間芳樹，雪吹周生（日本医大・第一内科），岡部栄逸朗（神奈川歯大・薬理），西村昌雄（帝京大・医・第一内科），渡部良夫（藤田保健衛生大・総合医科学研），外山淳治，小池　明（名大・環境医学研・循環器），有

田　眞，徳部浩司（大分医大・生理第二），穎原嗣尚，鶴原由一（佐賀医大・生理），平岡昌和（東京医歯大・難治疾患研・循環器病），笠貫　宏，荻原誠久，坂井理映子（東京女子医大・心臓血圧研・循環器内科）

【研究会概要】

虚血時および虚血後の再灌流で生じる心筋障害や不整脈と活性酸素との関連につき，基礎・臨床の研究者45名が一堂に会し，22題の研究発表について熱心な討論を行った。いづれも話題性に富んだ興味深いものであったが，特に注目された話題の一つは peroxynitrite anion（$ONOO^-$）に関するもので，NO 存在下で・O_2^-が発生すれば直ちに$ONOO^-$が生じ，SH 基の酸化反応を介してH_2O_2や・OH とは異なる特異的な細胞障害を惹起するという。

一方，最も論議が分かれたのは抗フリーラジカル療法に関するもので，モデル動物で発生させた虚血・再灌流による不整脈や梗塞サイズを縮小しうるか否かについてであった。動物種，実験方法によっても結果が正反対になる場合があるようで，なお早急な結論は控えたほうがよさそうである。これに関連し SOD の分子設計，内因性 SOD 誘導など注目された。電気生理学的アプローチとしては色々な活性酸素種（$\cdot O_2^-$, H_2O_2, $\cdot OH$, O_2^{1}）を用い，単離心筋細胞のI_{K1}や$I_{K,ATP}$チャネルに対する詳細な報告がなされ，この方面での格段の進歩がうかがわれた。このほか虚血と関連のあるCl^-電流，Ca^{2+}電流の調節，細胞伸展によるイオン電流変化についても新知見が報告された。

最後に臨床サイドから，冠動脈再疎通療法（PTCR）による再灌流不整脈には重篤なものがなく，治療の対象とさえならない場合が多い。これは，実験的再灌流不整脈が，細動にまで至る重篤なものであるのに較べ極めて対照的であるとの報告がなされた。その理由を論議する過程において，動物を使った今後の虚血実験のありかたと方向性についても議論が深まり，まことに実りの多い研究会となった。

(1)　グリベンクラミドによる心筋 A キナーゼ依存性クロライド電流の抑制

岡田泰伸，富永真琴（生理研）
堀江　稔（京大・医・分子病診療）

ATP 感受性カリウムチャネル阻害剤グリベンクラミドの心筋 A キナーゼ依存性クロライド（Cl）電流に対する効果を検討した。モルモットの単離心室筋細胞に対して全細胞型パッチクランプ法を用いて膜電流記録を行った。膜電位を 0mV に保持し，細胞外液には Na-rich, K-free, Cd（1mM）溶液を，細胞内液には Cs-rich 溶液を用いた。イソプロテレノール，フォルスコリン，cAMP の投与により時間非依存性の Cl 電流が誘発された。いずれの薬剤によって誘発された Cl 電流も細胞外からのグリベンクラミドの投与により濃度依存的に抑制された。50％抑制濃度は約

30μM であった。非特異的フォスファターゼ阻害剤オルソヴァナデート存在下でフォルスコリン刺激後持続的に活性化された Cl 電流も同様にグリベンクラミドによって抑制された。グリベンクラミドは心筋 A キナーゼ依存性 Cl 電流をチャネルのリン酸化，脱リン酸化プロセス以後のレベルで抑制することが明らかとなった。

(2) GTP 結合蛋白の basal activity による心筋 L 型カルシウムチャネル電流の調節

堀江　稔，牧田俊則（京大・医・分子病診療）
森島　繁，鈴木　浩，湯月洋介，橋本　恵，篠山重威（同第三内科）
岡田泰伸，富永真琴（生理研）

交感神経刺激下に副交感神経の刺激を突然中止するとき観察される変時／変力作用の反跳現象に関する G 蛋白の関与を調べるため，単離モルモット心室筋細胞に全細胞型パッチクランプ法を適用し，心筋 L 型 Ca チャネル電流を指標として検討した。高抵抗のパッチ電極を用い G 蛋白の基質である GTP が自由に変化し得る状態では反跳現象は再現性を持って観察されたが，低抵抗のパッチ電極では困難であった。百日咳毒素で前処置した細胞では basal の Ca 電流密度は有意に大きく，フォルスコリンに対する容量反応曲線は左方に偏位し最大反応も増加した。次に細胞内に GDPβS を負荷すると，basal の Ca 電流密度には変化がなかったがフォルスコリンに対しては同様の反応が認められた。細胞内に GTPγS を負荷すると Ca 電流は受容体刺激なしに徐々に増加した。以上より，受容体刺激なしでも G 蛋白は basal activity を有しており，アデニレート・シクラーゼ活性を微妙に制御していると考えられた。

(3) モルモット心室筋細胞膜電流に対する浸透圧変化の影響

野間昭典，光家　保（京大・医・第二生理）

心筋細胞の興奮性は自律神経支配やホルモンなど，個体レベルでの調節に加えて，心筋細胞自身でも調節するメカニズムがある。その例として，心筋細胞に与えられる張力，温度，イオン環境，細胞内代謝レベルなど生理学的にも重要な機転が考えられ，今これを自家調節機転として考える事ができる。今回，古くから知られている張力負荷による心拍動の亢進のイオンメカニズムを解明するため，単一心筋細胞を機械的に伸展する効果と，低浸透圧刺激による膜電流変化を解析した。機械的伸展では非選択的陽イオン電流が記録されたが，この詳細なメカニズムを明らかにする事は困難であった。低浸透圧刺激では遅延整流 K 電流が著しく増大し，高浸透圧刺激で

は逆に電流振幅が減少した。そのほかにNa/Kポンプ電流が浸透圧が上がると電流振幅が減少し，逆に下がると増大するのが観察された。低浸透圧刺激を続けると最後にはCl電流が活性化された。

(4) Oxygen paradoxにおけるプロスタノイド遊離と心筋障害

岡田隆夫，大地陸男（順天堂大・医・第二生理）

ラット遊離心臓を低酸素灌流後再酸素化すると，直後に心筋が非可逆的に損傷され，著明な細胞内酵素(Creatine kinase; CK)の逸脱を生じる(Oxygen paradox; O_2 paradox)。この時ほぼ同じ数分の時間経過で心臓からのプロスタノイド(PG)遊離が増加し，膜リン脂質崩壊が平行して進むことが示唆される。我々はO_2 paradox発生における活性酸素の関与を解明する目的で，好気的に300μM過酸化水素を加えて心臓を灌流した。PG遊離は灌流開始直後（1－2分）に著増したが，CKの遊離増加は著しく遅れ，20分後に増加し始め，30分後にO_2 paradoxと同程度の障害に達した。過酸化水素存在下での灌流液Ca濃度の低下，フォスフォリパーゼ阻害薬投与によりPG遊離増加は有意に抑制され，CK遊離増加もさらに遅延した。以上より，活性酸素によって生じる膜リン脂質の崩壊は心筋細胞の非可逆的障害を促進するが，O_2 paradoxにおいてはそれ以外の要因も重要な役割を演じていることが示唆された。

(5) Ion-pairing high-performance liquid chromatography (HPLC)による犬拍動心筋内の代謝変化—白血球除去による再灌流モデルでの検討—

大久保信司，竹越　襄（金沢医大・循環器内科）

【目的】

犬再灌流モデルを用いて虚血領域よりneedle biopsyにて得られた心筋抽出物から，HPLCを用いて心筋内malondialdehyde, ascorbic acidおよびadenine-mucleotide誘導体を観察し，白血球除去によるこの変化と心機能ならびに再灌流不整脈の発生について検討した。

【方法】

虚血－再灌流はそれぞれ1時間とし，虚血1時間前より体外循環を開始し，返血中に白血球除去フィルターを装着した。資料は前，虚血1時間後，再灌流1時間後に，LAD領域より採取した。また，その間の血行動態および心機能をモニターした。

【結果】

局所壁運動は除去群において有意に改善し，また再灌流不整脈の発生も有意に少なかった。そ

して心筋水分含量も白血球除去群で有意に少なかった。HPLCより求めたMDA, xanthineの増加は除去群で有意に抑えられ，ATPならびにascorbic acidの減少は有意に抑えられた。

【結論】

虚血再灌流モデルにおける拍動心から得られた代謝産物の変化，局所壁運動の変化ならびに再灌流不整脈の発生に白血球の関与が大きいと考えられた。

(6) 心筋細胞膜 Ca^{2+}輸送調節機構と心筋トロポニンの Ca^{2+}結合に及ぼす活性酸素の影響

金子雅則（浜松医大・第三内科）

活性酸素ラジカル(OFR)の細胞内Ca^{2+}動態への影響の解明は，心筋の虚血－再灌流障害の機序を理解するうえで極めて重要と考えられる。そこで，ラット心筋細胞膜のCa^{2+}輸送調節機構と心筋トロポニンのCa^{2+}結合に及ぼすOFRの影響について検討した。ATP-independent Ca^{2+} bindingはxanthine (X) ＋ xanthine oxidase (XO)，および，過酸化水素により有意に増加するが，voltage-dependent Ca^{2+} channelのBmaxは有意に減少し，Kdには変化は認められなかった。また，adrenergic β-receptorのBmaxとKdはX＋XOにより増加し，刺激性GTP結合蛋白活性は影響をうけず，さらに，adenylate cyclase活性は抑制された。心筋細胞膜のCa^{2+}-ATPase活性はOFRにより有意に抑制され，その機序として酵素蛋白のSH基の酸化が重要であることが示唆された。また，牛心筋トロポニンのCa^{2+}結合もOFRにより有意に抑制された。以上よりOFRは細胞内Ca^{2+}動態に影響を及ぼすことが示唆された。

(7) 冠血管による Post-Ischemic Vascular Injury ～ L-arginine / nitric oxide pathway の意義～

斉藤　崇，三浦　傅（秋田大・医・第2内科）

我々は，虚血再灌流によって微小血管床のみならず，いわゆるlarge coronary arteryにおいても内皮依存性弛緩反応の減弱やエンドセリンに対する選択的な収縮感受性亢進などの血管機能異常がみられ，その基盤として冠血管内皮傷害が存在することを報告してきた。この現象の成立機構についてウサギ摘出心灌流モデルを用いて検討した結果，我々は虚血再灌流により膜分画におけるエンドセリン結合部位の増大が見られ，このエンドセリン受容体のupregulationが活性化好中球存在下で有意に増強され，また，L-arginine/nitric oxide (NO) pathwayの特異的拮抗薬(L-

nitro-arginine) の再灌流時投与によって著明に抑制されることを見いだした。以上の所見は，虚血再灌流による冠血管内皮傷害に内皮自身から放出される NO が直接関与していることを示唆する所見と考えられる。

(8) 活性酸素障害における Nitric Oxide の影響

中澤博江，石田英之，一守康史（東海大・医・生理科学）

心筋の虚血・再灌流に伴って活性酸素 ($O_2^{\cdot-}$) が発生し再灌流障害に関与すると考えられている。一方，近年の EDRF/NO の研究の進歩により NO は $O_2^{\cdot-}$ と反応してこれを消去するため活性酸素障害の病態生理を理解する上で重要な因子であることが明らかになった。さらに $O_2^{\cdot-}$ と NO の反応により Peroxynitrite ($ONOO^-$) が生成されるがこれは SH 基の酸化反応を惹起する。

本研究は 1）化学発光法を用いて $O_2^{\cdot-}$ と NO の反応を示し，$ONOO^-$ の発生を real-time に測定した。2）$ONOO^-$ の組織障害性を検討する目的で合成した $ONOO^-$ を培養心筋細胞に作用させ短縮率と細胞内 Ca，細胞膜流動性を検討した。$ONOO^-$ (1mM) 添加後 5 分で心筋内 Ca は増加し，心筋細胞は拡張期で停止したが膜障害はあきらかでなかった。さらに 3）NO が $O_2^{\cdot-}$ の生成酵素である xanthine oxidase と NADPH oxidase を可逆性にまた濃度依存性に不活性化する事を示した。

(9) 酸素分子設計による虚血循環病態の制御

井上正康，宮本雅史（大阪市大・医・第 1 生化）

多細胞生物を支える生命線である血液循環系は組織への酸素運搬を最も根源的な機能としており，心血管機能は基本的には組織酸素代謝の質と量によりフィードバック制御されている。各種の疾患では，酸素が段階的に還元されて活性酸素が生じ，重要な生体機能分子が破壊されることが知られているが，これらの病変には血管を主座として進行するものが少なくない。一方，内皮依存性弛緩因子 (EDRF) や白血球の殺菌作用に見られるごとく，生物はこれらの活性酸素をも生理機構や防御機構に組み込み，その生存能力を強化している。活性酸素の寿命は極めて短く，それらが生じた局所で生体成分と反応するので，組織局所や病巣ではパラクリン様物質のごとく挙動する。このため，すべての生物は，必要な場所では活性酸素を産生し，あってはならない場所ではこれらを有効に消去する区画制御機構を有している。本シンポジウムでは，虚血病巣指向性 SOD や血管内皮指向性 SOD の分子設計，活性酸素による血液循環動態と血管機構の制御，およ

び脈管原性疾患における活性酸素の病態生化学的意義を論じる。

(10) 虚血・再灌流に対する心筋適応現象と Mn-SOD

星田四郎，西田昌司，山下宜繁，葛谷恒彦（大阪大・医・病理病態・第一内科）

梗塞前狭心症の有無が心筋梗塞サイズに影響を及ぼすという臨床的報告がある。我々はこの現象を犬モデルにおいて検証し，短時間反復虚血の24時間後に虚血耐性現象の出現を認め，同時に心筋抗酸化酸素－ミトコンドリア Mn-SOD －の活性並びに蛋白量が上昇することを明らかにした。今回，低酸素負荷による Mn-SOD 発現誘導の細胞内情報伝達機構及び低酸素耐性獲得における Mn-SOD 発現の意義をラット新生児培養心筋細胞を用いて検討した。その結果，低酸素（1時間）刺激後24時間においてミトコンドリア Mn-SOD は C キナーゼ系を介して合成が誘導され，この際，心筋細胞の低酸素耐性現象が認められた。アンチセンスオリゴヌクレオチドにより Mn-SOD の発現誘導を抑制すると，低酸素耐性獲得は消失することより，Mn-SOD 誘導が耐性獲得に中心的な役割を果たしていると考えられた。

(11) 虚血／再灌流障害とフリーラジカル・スカベンジャー

田村裕男，斎藤　穎，上松瀬勝男（日大・医・第２内科）

【緒言】

実験的虚血／再灌流心筋障害（梗塞サイズ）に及ぼす free radical scavenger の効果を，修飾型 superoxide dismutase (SOD) 及び抗白血球 monoclonal 抗体を用いて検討した。

【結果】

半減期を30時間以上に延長・安定化させた polyethylene-glycol 結合型 SOD (PEG-SOD) は，従来 negative result を生じた長い再灌流モデル（90分虚血／72時間再灌流）にても有意の梗塞巣縮小効果をもたらし，実験系と薬剤活性及び再灌流障害の持続時間についての問題を提起した。また，細胞外 free radical の主要な発生源である白血球の表面 receptor に対する monoclonal 抗体 {904F (ab')} を用いた同様の実験系にても，本抗体は有意の梗塞巣縮小効果をもたらした。

以上の結果は，虚血／再灌流心筋壊死に対する白血球及び活性酸素の関与を示唆すると共に，free radical scavenger 又は抗白血球抗体等の pharmacological intervention の有用性を支持するものと考えられた。

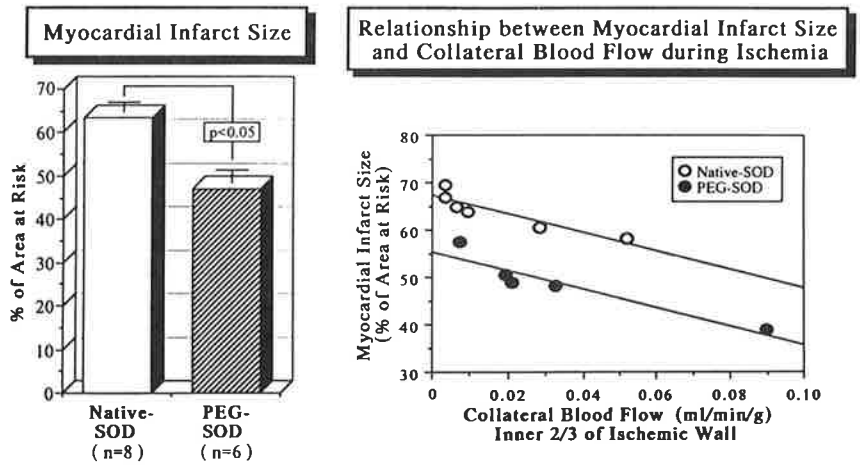


図１．６時間虚血―24時間再灌流モデルにおける心筋梗塞巣縮小効果 (PEG-SOD vs. Native-SOD)

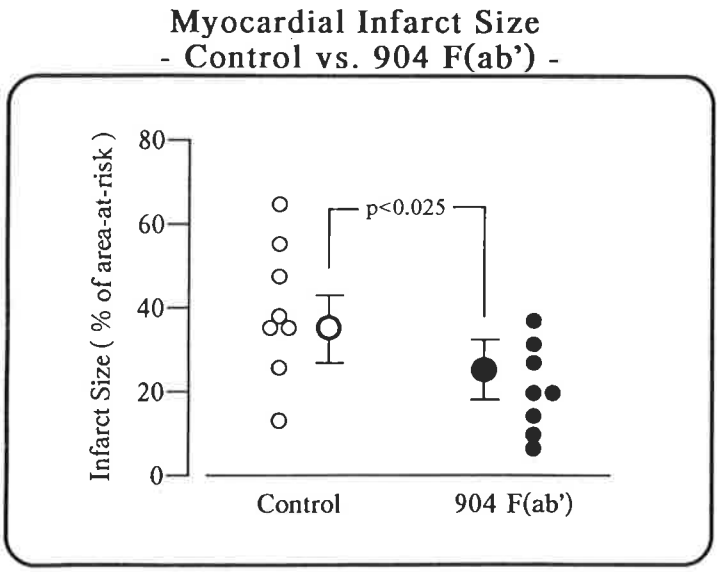


図２．抗白血球 Mo-1 抗体 (904F (ab')) の心筋梗塞巣縮小効果

⑿ 内因性 SOD の誘導と再灌流障害

牧野直樹，野替知容，畑　知二，矢永尚士（九州大・生体防御医学研・気候内科）

内因性のスーパーオキサイド・ジムスターゼ(SOD)の発現が虚血再灌流に伴う心筋障害を軽減できるか検討した。内因性 SOD の発現はインターロイキン(IL)-1α あるいは腫瘍壊死因子(TNF)を投与して行った。IL-1α 投与後24時間で心筋内の Mn-SOD の mRNA およびその蛋白量の増加を認め，IL-1α 投与後24時間後に摘出灌流モデルに応用した。再灌流直後に発生する不整脈の発生頻度は非投与に比し差を認めなかったが，不整脈持続時間は IL-1α の前投与にて有意に短縮した。同時に梗塞範囲の縮小効果も IL-1α の前投与にて確認した。以上の結果より IL-1α により誘導される内因性 SOD は虚血再灌流障害の軽減効果をみとめたことから内因性の SOD の発現は心筋防御作用があると推測された。

⒀ 抗フリーラジカル療法は心筋梗塞サイズを縮小するか？
―in vivo 虚血再灌流モデルを用いた検討―

田中　昌，藤原久義，山崎憲蔵，堀江　稔，篠山重威（京大・医・第三内科）

in vivo の虚血再灌流モデルでのオキシラジカルの産生は周知のところであるが，これが実際に心筋細胞壊死を招来するか否かは明らかではない。我々はイヌとウサギの冠動脈閉塞＋再灌流による in vivo 梗塞モデルを用い種々の抗オキシラジカル療法の梗塞サイズに及ぼす効果を検討した。ラジカルスカベンジャーとしては１）SOD ＋ Catalase，２）持効性の PEG-SOD ＋ Catalase，３）細胞膜透過性の MPG 及び４）DMTU を用い，ラジカル産生を抑制する方法としては１）Xanthine oxidase 阻害剤の oxypurinol，２）好中球の組織への取り込みを抑える Anti-CD18 抗体，３）ラジカル産生の基質を再酸素化前に washout する anoxic reperfusion を用いた。これらの治療はいずれも心筋梗塞巣を縮小せずオキシラジカルは心筋細胞壊死を end point として評価する限り，in vivo の心臓の虚血再灌流障害に関与しないことが示唆された。

⒁ モルモット心室筋細胞の虚血再灌流損傷に対する細胞内クロライドイオンの役割

西　勝英，頼仲　方（熊本大・医・薬理第二）

摘出したモルモット心室乳頭筋の灌流停止及び心筋表面を paraffin oil で覆う虚血再灌流のモ

デルを用い，心筋細胞の虚血再灌流損傷にする細胞内クロライドイオンの作用を検討した。細胞内クロライドイオン活量 (aCl^-) の測定には，二連型イオン選択性微小電極を用いた。正常タイロード液 Cl-free とすると，aCl^- の減少が見られた。心筋細胞の虚血では，aCl^- が急激に増加した。Cl-free 液を虚血10分前に灌流すると，aCl^- の増加は軽減した。心筋細胞虚血により，細胞内 pH (pH_i) は有意に減少した。虚血10分前に Cl-free 液を灌流すると，心筋虚血により誘導されたアシドーシスは軽減された。以上の結果より，細胞内クロライドイオンはモルモット心室筋細胞の虚血再灌流損傷において重要な役割を演じていることが示唆された。

(15) 再灌流不整脈の発生機序—— Na^+/H^+交換系と Na^+ -K^+ ATPase の関与

雪吹周生，草間芳樹，早川弘一（日本医大・第一内科）

ラット摘出灌流心にて左冠動脈床の10分間虚血＋８分間再灌流（pH7.4（対照群），7.1，6.8，6.6，6.4）を行うと，再灌流 VF の頻度は92%，92%，83%，42%（*），33%（*）（*：$p < 0.05$ v 対照群）と pH 依存性に抑制された。つぎに酸性再灌流 (pH 6.6) の持続時間を0.5，１，２，３，４分とし，しかるのちに灌流液 pH を7.4に正常化すると，0.5，１分間の酸性再灌流の後にのみ高率に新たなる VF が発生した。虚血域心筋の Na/K-ATPase を細胞化学的に測定すると，虚血終了時には虚血前の23.1±2.0%に低下したが，酸性再灌流開始と共に再上昇し，２分以降有意な回復を示した。すなわち灌流液 pH 正常化に伴う催不整脈作用が２分間以上の酸性再灌流の後には著しく減弱した理由として，心筋の Na/K-ATPase 活性が回復したことが考えられる。これは細胞内 Na^+ 濃度調節機能が再灌流不整脈の重要な要因であることを示唆する。

(16) 心筋小胞体 Ca^{2+}放出チャンネルの活性酸素ラジカルに対する反応態度とその機構

岡部栄逸朗，伊藤春生（神奈川歯大・薬理）

活性酸素ラジカル (xanthine-xanthine oxidase system) のイヌ心筋小胞体 (SR) 機能に対する影響を解析した。活性酸素ラジカルは，Ca^{2+} permeability や Ca^{2+} ポンプ活性の変動にリンクしない経路を介して SR 内自由 Ca^{2+} 量を減少させる。この効果は，Ca^{2+} 放出チャンネルを閉口させる条件の ryanodine（Ryn: 500μM，10分間処理）で抑制された。人工脂質二重層へ再構成された Ca^{2+} 放出チャンネル活性は，活性酸素ラジカル (cis) によって上昇した。この効果も Ryn (500μM) によって阻止された。観測されたすべての活性酸素ラジカルの効果は，SOD (10μg/ml)

あるいは外因性に calmodulin (CaM, 4.0μg/ml) を補足することによって抑制された。また，SR に内因性 CaM が存在した場合にのみ活性酸素ラジカルの効果を認めることができた。したがって，活性酸素ラジカルの標的は CaM 依存性反応段階であって，この段階を修飾することでチャンネルからの Ca^{2+} 放出を増大することが示唆できる。

(17) T-butyl hydroperoxide によるイオン電流傷害作用

西村昌雄，渡部良夫（帝京大・医・第一内科，藤田保健衛生大・総合医科学研）

再灌流時不整脈の発生機序を調べるため，t-butyl hydroperoxide (TBH) を用いて，ウサギ洞結節および房室結節細胞の膜脂質を過酸化させ，活動電位ならびにイオン電流に及ぼす効果を検討した。TBH は両結節細胞の Ca^{2+} 電流コンダクタンスを初期に増加させた後，減少させ，その結果自動能を一過性に促進後，抑制することが明らかとなった。Ca^{2+} 電流の不活性化曲線は TBH により脱分極側に偏位し，勾配因子も増加した。遅延整流性 K^+ 電流は Ca^{2+} 電流と同様に 2 相性の変化を生じたが，過分極により活性化される内向き電流と背景電流は単相性に増加した。房室結節細胞では TBH により早期後脱分極と遅延後脱分極が発現した。前者は Ca^{2+} 電流の著明な増加が，後者は細胞内 Ca^{2+} 負荷が機序をなすと考えられた。以上，TBH による膜脂質過酸化は結節細胞の生理的自動能の亢進とその後の抑制，更には異常自動能を惹起し，房室結節伝導を抑制する事が示唆された。

(18) 鉄イオンキレート剤の心筋保護作用

小池　明，加藤　聡，秋田利明，阿部稔雄（名大・医・胸部外科）
児玉逸雄，外山淳治（名大・環境医学研・循環器部門）

虚血再灌流時には心臓毒性が強いヒドロキシルラジカルが生成し，これに鉄イオンが触媒として関与することが知られている。本研究ではこの生成を抑制する鉄キレート剤 deferoxamine (DFX) の心筋保護効果を検討した。新生家兎摘出灌流心を用い，虚血前の灌流液及び心筋保護液中に上記の薬剤を添加したところ，対照群に比較し再灌流時の心機能回復率が改善した。また電子スピン共鳴法により計測したヒドロキシルラジカルは，DFX (30μM) 添加にて，対照の 1／3 に減少した。次に成熟家兎右室乳頭筋モデルでは，DFX (3mM) 添加にて H_2O_2 (1mM) による活動電位持続時間短縮と静止張力増強が，共に抑制された。以上より鉄キレート剤は虚血再灌流傷害に対し保護効果を持つことが示唆された。また外科開心術時，DFX を体外循環液中 (0.5g) 及

び心筋保護液中(250mg/L)に添加したところ，再灌流後の心筋酵素逸脱が軽減した。

(19) モルモット単一心室筋細胞 ATP 感受性 K チャネルに対する異なった活性酸素種の作用

徳部浩司，清末達人，有田　眞（大分医大・生理第二）

虚血再灌流による心筋障害の機序を明らかにする目的で，モルモット心室筋細胞の単一 ATP 感受性 K 電流($I_{K\cdot ATP}$)に対する活性酸素の効果を検討した。鉄イオン非存在下で Hypoxanthine と xanthine oxidase の反応により生じる活性酸素（O_2^-及びH_2O_2）は，細胞内液の ATP 濃度が 1 ～ 2mM の時，$I_{K\cdot ATP}$ を最も著明に活性化した。またこのチャネルに対する作用は，Glibenclamide (1μM) により阻止された。一方，鉄イオン (0.1mM) 存在下での Hypoxanthine と xanthine oxidase の反応により生じた活性酸素 (·OH) は，同様に $I_{K\cdot ATP}$ を活性化したが，Glibenclamide はこの活性化を阻止できなかった。以上のように活性酸素種により，ATP 感受性 K チャネルに対する作用が異なることが明らかとなった。

(20) 活性酸素のモルモット心室筋 K チャネルに対する効果について

鶴原由一，松浦　博，穎原嗣尚（佐賀医大・生理）

モルモット単一心室筋細胞を用いて，open cell-attached patch もしくは inside-out patch clamp 法にて，単一チャネル電流を記録した。パッチ電極内に充填した rosebengal の光増感反応により活性酸素（おもに一重項酸素）を生成しこれを細胞膜外から作用させ，その K チャネルに対する効果を検討した。

細胞内側に ATP1mM 存在下でも，細胞外からの活性酸素により ATP 感受性 K チャネルが活性化した。複数チャネル記録例では amplitude histogram は二項分布に従わず，活性酸素の作用はパッチ膜内の個々のチャネル間で不均一であると考えられた。また細胞外からの活性酸素は内向き整流特性 K チャネルの開確率や単一チャネルコンダクタンスには明らかな影響を及ぼさなかったが，このチャネルの sublevel の出現頻度を増加させた。この sublevel は full open のおよそ70％および50％の subconductance level をとった。

(21) 心筋酸素欠乏・再酸素化時のATP感受性K^+チャネルの役割

平岡昌和，安谷屋均，沢登　徹
（東京医歯大・難治疾患研・成人疾患研究部門・循環器病）

ATP感受性Kチャネル(K_{ATP})は，酸素欠乏や虚血時に開口して電気的障害に寄与するが，一方で再灌流時の障害発現に防止的に働くとも云われており，その役割の詳細は不明である。家兎摘出心を30分間の酸素欠乏下におくと種々の程度の房室ブロックが生じる。酸素欠乏単独よりグルコース欠乏や2―デオキシグルコース(2-DG)下では2度以上の高度ブロックが容易に発現，グルコース高濃度添加により伝導は改善した。K_{ATP}開口薬のピナシジール投与は全例完全ブロックに移行，抑制薬のグリベンクラミドはブロックを抑制した。同時の条件でモルモット心室筋細胞でcell-attached patchで酸素欠乏にさらすとK_{ATP}の開口が認められた。一方，30分間後に再酸素化を行うと，K_{ATP}の開口しない条件では心室細動・頻拍などの重篤な不整脈が多発したが，チャネルが開口しやすい条件下では不整脈の発生が少なかった。以上より，K_{ATP}チャネルの開口は再酸素化・再灌流時の不整脈発生に防止的に働くことが考えられた。

(22) 再灌流不整脈の臨床

笠貫　宏，荻原誠久，細田瑳一（東京女医大・心研内科）

再灌流不整脈は臨床的には心筋梗塞急性期の冠動脈血栓溶解療法(ICT)による再開通時の不整脈として注目されている。動物実験モデルでは再灌流不整脈としてVFが50～90％と高率に出現する。一方，ICTでは再灌流抗不整脈は20～50％で認められるが，VFは1％以下に過ぎない。促進型心室補充調律が3～20％と比較的高率に見られるが，致死的となることは殆んどなく，むしろ再開通の一徴候として意義づけられている。両者の違いはヒト心筋梗塞ではその発生機序の多様性及びpre conditioning等の多くの複雑な要因が加わっているためと考えられるが，今後，現在の実験モデルとの相違を明らかにすると伴に，新しい実験モデルの開発が期待される。

18. 分子神経生物学の進歩

1993年11月19日～20日

代表者：池中一裕

世話人：池中一裕，中平健祐，鹿川哲史

(1) 大脳皮質層構造の形成機構について；Cajal-Retzius neurons の役割

小川正晴（高知医大・生理）

(2) 大脳皮質におけるニューロンとグリア細胞の発生機構について；in vitro における neuroepithelial cells からのニューロンとグリアの発生

宮田卓樹（高知医大）

(3) GFAP 遺伝子転写活性の可視化によるアストロサイトの分化の解析

森田規之（京都府立医大）

(4) 小脳顆粒細胞の発生・分化

有賀　純（理研・分子神経）

(5) ショウジョウバエの RP ニューロンが特定の筋細胞を標的認識する時の分子機構の解析

千葉　晶（基生研）

(6) ショウジョウバエ神経―筋特異結合の分子生物学

能瀬聡直（基生研）

(7) 神経系特異的 RNA 結合蛋白質 mouse-*musashi* と神経分化

榊原伸一（東大・医科研）

(8) Ca^{2+} rise in hippocampal CA1 pyramidal cell is mostly due to entry through voltage-gated Ca^{2+} channels. — Ca^{2+} imaging study on brain slices —

宮川博義（山形大・医・第二生理）

(9) 脳における電位依存性 K^{+} チャンネル遺伝子の発現

中平健祐（生理研）

(10) 糖鎖分析の新しい方法

宮村　毅（宝酒造バイオ研究所）

(11) 新規レトロウィルスベクターによる遺伝子導入系の検討

吉松忠憲（生理研）

(12) 神経系における cdc2-related protein kinases

稲生英俊（千葉大・医　第３解剖）

(13) Type 1 1P3 受容体の精製とその機能

中出真嗣（小野薬品　基礎研究所）

⑭ IP3 受容体タイプ２，３遺伝子のマウス組織特異的発現に関する研究

藤野一郎（東大・医科研）

⑮ イノシトール３リン酸受容体の膜貫通トポロジーと糖鎖結合部位

道川貴章（東大・医科研）

⑯ ヒトのタイプ１ IP^3 受容体の cDNA クローニング

山田憲彦（東大・医科研）

⑰ アフリカツメガエルの受精及び形態形成における IP3 受容体の役割

粂　昭苑（東大・医科研）

【討論参加者】

御子柴克彦，宮脇敦史，光山冬樹，森田光洋，海津雅彦，中川敏幸，米島宏幸，高橋琢哉，松下文雄，梁　淑姫，岡野栄之，安富大祐，廣田順二，吉川文生，日野美紀，藤野一郎，井上貴文，岡部正隆，粂　昭苑，小林麻紀，門川俊明，道川貴章，古市貞一，榊原伸一，新延道夫，山田憲彦（東大・医科研），小川正晴，宮田卓樹（高知医大），横田尚樹，橋本光広，有賀　純（理化研），稲生英俊（千葉大・医），森田規之（京都府立医大），宮村　毅（宝酒造），中出真嗣（小野薬品），塩田千代（和歌山県立医大），白石陽子，駒井章治（京大・霊長研），宮川博義（山形大・医），千葉　晶，能瀬聡直，坪井昭夫，梅田達夫（基生研），池中一裕，中平健祐，吉松忠憲（生理研）

【研究会概要】

脳神経系は，多細胞生物個体の制御系として非常に複雑な構造を持ち，高度に分化した機能を持つ特殊な組織である。その研究は，従来，主として形態学・生理学・生化学的手法により行われてきた。しかし近年の分子遺伝学・発生生物学・電気生理学の技術的進歩や，遺伝子工学・細胞工学的手法の脳神経系への導入により，従来解析が困難であった脳高次機能や発生・分化の分子機構にもメスが加えられ，“分子神経生物学”と呼ばれる新しい研究領域が開かれてきた。本研究会では，複雑で緊密な細胞間相互作用をもとに発生・分化し，成熟してから後も高度な可塑性を基礎として様々な高次機能を営んでいるこの神経系に対し，最近の分子神経生物学が何を明らかにしてきたかを概観し，あわせて分子・細胞レベルからのアプローチが今後の脳研究において果たすべき役割について展望する。

(1) 大脳皮質層構造の形成機構について；Cajal-Retzius neurons の役割

小川正晴（高知医大・生理）

大脳新皮質の層構造に異常を持つリーラーミュータントマウスを用い，preplate の構成員であ

る Cajal-Retzius neurons の細胞質及びその表面に特異的に結合するモノクローナル抗体 CR-50 を分取した。この抗体を用いた免疫組織化学の実験から，CR-50 antigen が preplate と cortical plate 間の細胞認識に関係し，皮質ニューロンの配座に重要な役割を担っていることを紹介した。

(2) 大脳皮質におけるニューロンとグリア細胞の発生機構について；in vitro における neuroepithelial cell からのニューロンとグリアの発生

宮田卓樹（高知医大）

胎生期マウス大脳皮質より neuroepithelial cell (NE cell) を単離し，培養下に単一細胞の増殖，分化のパターンを解析した。E12-NE cell には，分裂後ニューロン (N) のみ生じる "neuroblast (NB)" と，分裂を繰り返し最初は N，数日後にグリア (G) を生じる "bipotent progenitor (P)" の 2 種類があった。E14-NE cell には "NB" と "P" に加えて，分裂後 G のみ生じる "glioblast (GB)" が見られた。E17 由来の培養では，分裂するのは "GB" のみであった。以上から N と G が，(1)共通前駆細胞からそれらの不等分裂によって，(2) N-G の順に差時的に発生することが示唆された。

(3) GFAP 遺伝子転写活性の可視化によるアストロサイトの分化の解析

森田規之（京都府立医大）

GFAP 遺伝子のアストロサイト特異的転写をもたらすプロモーター領域の下流に β-ガラクトシダーゼ遺伝子を連結したレトロウイルスベクターを作製した。マウス大脳初代培養細胞を感染させ GFAP 遺伝子の転写活性を可視化したところ，免疫組織化学的検出よりも早い発生段階からアストロサイトを検出できた。さらに胎生マウス大脳皮質原基の培養スライスで出現部位を検討したところ，陽性細胞が脳室壁に認められ，radial glia から直後アストロサイトに分化したものではないことが示唆された。

(4) 小脳顆粒細胞の発生・分化

有賀　純（理研・分子神経）

小脳顆粒細胞の発生・分化の分子機構を明らかにするために，新たな分子マーカー *zic* を単離

しその構造と発現様式を明らかにしてきた。この遺伝子は *ci*^{D}, *GLI* に似た zinc finger モチーフを持ち，塩基配列特異的 DNA 結合能，特定のプロモーターの制御活性を有する。in situ ハイブリダイゼーション，免疫組織化学染色等により，顆粒細胞系譜に持続的な発現が認められ，*zic* は顆粒細胞の分化形質の維持，神経管の部位特異性に関わる転写因子であることが推測された。

(5) ショウジョウバエの RP ニューロンが特定の筋細胞を標的認識する時の分子機構の解析

千葉　晶（基生研）

RP3 運動ニューロンが筋細胞 7，6 とシナプスをつくる時期に RP3 と 7，6 で免疫グロブリン・スーパーファミリーのファシクリン 3 膜蛋白が発現する。RP3 はファシクリン 2 欠如株内でも正常に標的選択できるが，全筋細胞でファシクリン 3 を異所発現させると他の筋細胞ともシナプスをつくる。従って，個々のニューロンは標的細胞上に特異的な分子（時に複数）を「標的認識分子」として利用すると思われる。

(6) ショウジョウバエ神経―筋特異結合の分子生物学

能瀬聡直（基生研）

connectin は少数の筋肉および運動ニューロンにおいて特異的に発現している接着分子である。我々は connectin の機能を調べるため，*Toll* のエンハンサー（connectin を発現していない約 7 本の筋肉線維における発現を促す）を用い，connectin を異所発現させた。この結果，運動神経の走行に異常が見いだされた。このことから，connectin が実際 in vivo において神経―筋特異認識に関与してることが強く示唆された。

(7) 神経系特異的 RNA 結合蛋白質 mouse-*musashi* と神経分化

榊原伸一（東大・医科研）

mouse-*musashi* は，ショウジョウバエ感覚器における神経細胞を含む細胞の運命決定に必要とされる *musashi* 遺伝子のマウス相同分子であり，ともに神経系特異的 RNA 結合蛋白質をコード

する。cDNA 解析により遺伝子産物は RNA 結合モチーフを２つ有し，モチーフ部分においてショウジョウバエ *musashi* に高い相同性（60%）を示した。抗体染色の結果，胎生期神経管の ventricular zone，生後の脳内では，小脳外顆粒細胞層，側脳室から，嗅球への migratory pathway などの mitotic active と思われる部位に強い発現が認められ，mouse-*musashi* 遺伝子は未分化な神経系細胞の前駆細胞に発現して分化，決定に関与していることが予測された。

(8) Ca^{2+} rise in hippocampal CA1 pyramidal cell is mostly due to entry through voltage-gated Ca^{2+} channels. — Ca^{2+} imaging study on brain slices —

宮川博義（山形大・医・第二生理）

海馬脳スライス内の単一錐体細胞に Ca 感受性色素を注入し，顕微鏡に取り付けた高感度カメラを用いて観察すると，反復シナプス入力に応じて，一過性の細胞内 Ca 濃度上昇が観察できる。この Ca 濃度上昇の大部分は錐体細胞の活動電位発生に伴うものであり，直接にはシナプス入力と関係の無い，膜電位感受性チャネルからの流入に由来するものであった。活動電位の発生を阻止した条件でもシナプス入力により Ca 濃度上昇が起きたが，この変動は細胞外無 Mg 下で過分極により抑制されることから，やはり膜電位感受性チャネルからの流入に由来するものであると結論した。細胞内 Ca 濃度上昇は様々な細胞内過程を誘起する重要な現象であるが，膜電位感受性チャネルからの Ca 流入はその重要な経路の一つである。

(9) 脳における電位依存性 K^+ チャンネル遺伝子の発現

中平健祐（生理研）

数多く知られている K-チャンネルのうち，shaker タイプの電位依存性 K-チャンネルの cDNA をクローニングし，その脳内における発現について検討した。マウス胎仔において，胎生12日の時点で RCK1 から 5 までのすべての遺伝子の発現が認められ，その発現量は時間とともに増大した。ただし，その増加のパターンには遺伝子間で若干差がみられた。また，抗体を用いた組織科学的検討により，それぞれの遺伝子産物の局在を明らかにした。

(10) 糖鎖分析の新しい方法

宮村　毅（宝酒造バイオ研究所）

糖鎖構造解析の分野では，(1) pmol レベルの微量試料でも解析できる（微量化），(2)シアル酸を含めた構造を解析できる（精密化），(3)構造解析が自動で，あるいは簡単なプロトコールにのっとってできる（簡便化），の３つに対する要求がますます強くなってきている。そのための方法として，全自動機による糖鎖の蛍光標識法（ピリジルアミノ化，PA 化）と，HPLC による糖鎖の分離分析法を紹介し，現在開発中の簡便な構造決定法についても述べる。

(11) 新規レトロウィルスベクターによる遺伝子導入系の検討

吉松忠憲（生理研）

レトロウィルスベクターを用いた細胞への遺伝子導入法について遺伝子導入効率の上昇などの検討を行った。パッケージングシグナルに関与している領域を長くし，さらに，このベクターにポリオーマ初期領域を導入することによってウィルス産生量が20倍上昇することが明らかとなった。また，IRES を組み込むことによって１つのプロモーターで複数の遺伝子を発現させることが可能なベクターを構築し，このベクターによる遺伝子導入系を検討した。

(12) 神経系における cdc2-related protein kinases

稲生英俊（千葉大・医・第３解剖）

CDC2 や CDK2 など cdc2-related protein kinases は真核生物の細胞周期の制御に非常に重要な役割をはたしている。ところが，本来分裂能をもたないはずの神経系にも cdc2-related kinases が存在することが明らかとなった。CDK5 はその１つであり，成熟マウスではニューロン特異的な発現を示す。E12 のマウス胎児脳で既に発現がみられ出生前後にかけて徐々に増加する。ただし，胎児脳での発現パターンは成熟脳と異なり脳全体に散在性に認められた。CDK5 は細胞周期制御以外の役割，たとえば，ニューロンの分化や突起伸長など調節に働いている可能性がある。

(13) Type 1 1P3 受容体の精製とその機能

中出真嗣（小野薬品・基礎研究所）

マウス小脳ミクロゾーム画分よりType1 1P3 受容体をサブタイプ特異的抗ペプチド抗体を用いてアフィニティー精製し，リボソームに再構成させ，そのチャネル活性を評価した。抗Type1 1P3 受容体抗体(18A10)の $^{45}Ca^{2+}$ 流入に対する影響を検討したところ，抗体は完全に $^{45}Ca^{2+}$ 流用を抑制した。又，予めA-kinaseをプロテオリボソームに作用させておくと $^{45}Ca^{2+}$ の取り込み量がコントロールに比して約20％増強することが分かった。

(14) IP_3 受容体タイプ２，３遺伝子のマウス組織特異的発現に関する研究

藤野一郎（東大・医科研）

イノシトール３リン酸(IP_3)受容体は，IP_3 との結合により細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇をもたらし，様々な生理現象に関与している。in situ ハイブリダイゼーション法で IP_3 受容体遺伝子ファミリーの mRNA の発現分布を調べたところ，神経系ではタイプ１が圧倒的に強く発現しており他のタイプの発現は極めて弱かった。神経系以外では，タイプ２は唾液腺など，タイプ３は胃線の分泌細胞等に特徴的に発現していた。

(15) イノシトール３リン酸受容体の膜貫通トポロジーと糖鎖結合部位

道川貴章（東大・医科研）

イノシトール３リン酸受容体（IP3R, 2749 アミノ酸）は，C 末端側に Ca2 ＋チャネルを構成する膜貫通領域がクラスターを成している。現在，IP3R の膜貫通様式として６回及び８回膜貫通モデルが提唱されている。そこで，両者のモデルで局在が食い違うアミノ酸配列2463―2529の領域が小胞体膜のどちら側に位置するかについて解析を行った。その結果，IP3R は糖鎖結合部位を２ケ所持つ，６回膜貫通型のイオンチャネルであることが示された。

(16) ヒトのタイプ1 IP_3 受容体の cDNA クローニング

山田憲彦（東大・医科研）

ヒトのタイプ1 IP_3 受容体の cDNA を子宮と卵管よりクローニングした。ヒトとマウス受容体ではアミノ酸配列で99％の高い相同性があった。クローン化した cDNA を培養細胞に導入して，IP_3 結合能をもつ蛋白質を形質発現させることが出来た。小脳変性症患者では，プルキンエ細胞の変性とともにその特徴的な発現は低下していた。タイプ1 IP_3 受容体遺伝子はヒト染色体3p25-26 にマップされた。

(17) アフリカツメガエルの受精及び形態形成における IP3 受容体の役割

粂　昭苑（東大・医科研）

アフリカツメガエル卵母細胞において発現している IP3 受容体の cDNA クーロンを単離した。この全一次構造決定，及び培養細胞 NG108-15 への強制発現により，本 cDNA は IP3 依存性のカルシウムチャネルをコードすると考えられた。本 cDNA クローンに対する特異的アンチセンス・オリゴヌクレオチドを用いた機能阻害実験により本分子は卵の活性化において，中心的役割を担うことが明らかとなった。また，特異的抗体を用いた免疫組織化学的解析により，IP3 受容体は精子侵入点からのカルシウム波の発生と伝播によく対応した局在様式を示し，IP3 受容体の受精における役割が強く示唆された。さらに初期胚における免疫組織化学的解析により，初期胚の形態形成における IP3 受容体の役割が示唆された。

19. ニューロンとグリアの相互作用

1993年7月8日～9日
代表者：村上富士夫（大阪大・基礎工）
世話人：池中一裕

(1) アストログリアの形態

濱　清（生理研）

(2) グリア細胞の分化と特異的遺伝子プロモーターの活性化

中平健祐，池中一裕（生理研）

(3) ニューロン・グリア共培養系におけるグリオタスチンの神経発育因子活性

加藤泰治（名市大・医）

(4) アストロサイトによるニューロトロフィン合成　―その生理的意義―

古川昭栄（岐阜薬大）

(5) 中枢神経のサイトカインネットワーク

錫村明生（藤田保健衛生大）

(6) ミクログリアの脳内機能

高坂新一（国立精神神経センター）

(7) アストロサイトにおけるヒスタミン受容体の発現（ニューロンの標的としてのアストロサイト）

福井裕行（大阪大・医）

(8) グリア性プロテオグリカンのひとつ，ニューロカンの構造・局在・機能

大平敦彦，渡辺英治（発達障害研）

(9) シュワン細胞の膜糖蛋白群の構造と機能

植村慶一（慶應大・医）

(10) 坐骨神経移植による視神経再生

福田　淳（大阪大・医）

(11) 脳の発生過程における放射状グリアの役割

川野　仁，川村光毅（慶應大・医）

(12) Myelin-associated glycoprote in (MAG) とニューロンとの機能的相互作用

佐藤修三（新潟大・医）

(13) 高密度培養下の C6 細胞による神経突起伸展の抑制

渡辺英治（発達障害研）
小林裕明，村上富士夫（大阪大・基礎工）

(14) オリゴデンドロサイトの神経突起伸展抑制作用の中枢神経と末梢神経に対する効果の特異性

渡辺英治（発達障害研）
小林裕明，村上富士夫（大阪大・基礎工）

【討論参加者】

村上富士夫，小林裕明，勝丸博信（大阪大・基礎工），福井裕行，福田　淳（大阪大・医），渡辺英治，大平敦彦（愛知県コロニー），藤田　忍（三菱化成），佐藤修三（新潟大），錫村明生（藤田保健衛生大），石川泰成，塩崎一昌（福祉村病院），川野　仁，坪川達也，植村慶一，川村光毅，中尾純治（慶應大・医），高坂新一（精神神経センター），加藤泰治，小林邦生，楠本　茂，磯部一郎，赤津裕康，高橋三津雄，大河内由香，藤田政隆（名市大・医），古川昭栄（岐阜薬大），植木孝俊（東工大），平野伸二，湯浅純一，野田昌晴，名川文清，岩瀬利郎（基生研），濱　　清，池中一裕，中平健祐（生理研）

【研究会概要】

ニューロンとグリアの相互作用は神経回路形成や再生をはじめとする脳における様々な現象の発現に極めて重要な働きをしていると考えられる。近年になり神経突起とグリア細胞への接触による相互作用のほか，サイトカインを介する相互作用も明らかになってきた。

しかしながらまだその分子機構はおろか，細胞レベルにおける現象の理解さえも不充分な状態にある。またその重要性にもかかわらず，学会などにおける認知度が低く，統一的な議論の場がないことも，この分野の進歩を妨げている。

本研究実施の目的は，ニューロンとグリアの相互作用について様々な立場からアプローチを試みている研究者が一堂に会することによって，最新の研究成果を発表し，意見を交換することによって，この問題に関する理解と関心とを深めるとともに，今後の研究のストラテジーについて議論をおこなうことにある。

(1) アストログリアの形態

濱　　清（生理研）

星状グリア細胞がCNSの形態形成，成熟脳の機能に大きな役割りを果たす事はよく知られている。然しながら，主として技術的な困難さのために個々の細胞の構造，特にその終末突起の三次元的な構造の詳細はよく知られていない。Golgi，染色法は星状グリア細胞の突起を先端に至る迄忠実に表現する事が分かったので，この染色法を用いた標本を，5umの切片として，1000kvの超高圧電子顕微鏡で観察した所見を用い，大脳皮ニューロパイル内，神経細胞表面，

血管表面などにおけるアストログリアの終末突起の三次元的な構造，神経細胞との関係などについてお話ししたい。

(2) グリア細胞の分化と特異的遺伝子プロモーターの活性化

中平健祐，池中一裕（生理研）

マウスの中枢神経系において，ニューロンとグリア細胞は脳室壁近くで分裂する均一な細胞集団から分化してくる。脳初代培養系でレトロウイルスを用いてこれらの細胞を標識すると，単一の細胞からニューロン，グリア様の細胞が現れる様子を見ることができる。このような細胞分化の過程において特異的遺伝子が受ける発現制御を明らかにするため，レトロウイルスベクターを用いてプロモーターの活性化を個々の細胞で検討した。アストロサイト特異的に発現するグリア線維性酸性蛋白質遺伝子，オリゴデンドロサイト特異的なミエリン塩基性蛋白質遺伝子のプロモーターは，初代培養細胞に導入されるとそれぞれの細胞に特異的に発現した。また，これらのプロモーターは遺伝子産物の検出されるよりも早い胎生期相当の時期から活性化されていることを示す結果を得た。

(3) ニューロン・グリア共培養系におけるグリオタスチンの神経発育因子活性

加藤泰治（名市大・医・分子医学研究所・生体制御）

グリオスタチン (gliostatin) は，グリア細胞由来の神経栄養因子で，ホモダイマー（分子量50Kのサブユニット2個よりなる）構造をとる酸性たんぱく質である。ラット胎仔脳より調製したニューロンとグリアとの共培養系（ニューロンは胎齢15日，アストロサイトは胎齢16—17日より調製）にグリオスタチンを添加すると，ニューロンの神経突起伸張，生存維持活性が認められるばかりでなく，ニューロン細胞体の著明な集塊形成と神経突起束化がみられた。また，単層のフィーダーレーヤー状の原形質アストロサイトの多くは，線維性アストロサイトに分化した。これらの結果は，グリオスタチンがニューロンばかりでなくグリアの発生・分化過程に重要な役割を果たし，さらにシナプス形成にも関与していることを示唆している。

(4) アストロサイトによるニューロトロフィン合成 —その生理的意義—

古川昭栄（岐阜薬大・分子生物）

中枢神経における NGF 合成は主にニューロンとアストロサイトが担っていると考えられる。正常成熟脳ではニューロンだけに NGFmRNA が発現しており，損傷を受けた脳ではアストロサイトも NGF を合成すると推定される。このことは NGF 合成の生理的意義がニューロンとアストロサイトでは異なっていることを示している。培養下のアストロサイトは損傷後の脳内に現れる種々の成長因子やサイトカインに応答して NGF 合成を高めるが，これは損傷修復機転としての役割を間接的に示している。現在，アストロサイトによる NGF を含めたニューロトロフィン合成の生理的意義を明らかにするための検討を行っている。

(5) 中枢神経のサイトカインネットワーク

錫村明生（藤田保健衛生大・医・神経内科）

神経系においても免疫系と同様のサイトカインが産生されることが明らかにされている。これらは神経系での特有の作用を持ち，あるものは神経細胞に対し成長因子として働き，あるものはグリア細胞の増殖，分化，活性化の誘導または抑制に働く。一部のサイトカインは正常発達段階において発現が見られ，神経細胞またはグリア細胞の分化に関与する可能性が示唆されており，あるものは病態において初めて発現し，病態の発症機序と密接に関与していると考えられる。また，サイトカインの特性として，中枢神経系においても産生細胞に autocrine に作用する場合と，周囲の細胞に対して paracrine に作用することも示されており，免疫系とは異なる独自のサイトカインネットワークを形成していることが明らかになっている。今回は，我々の得た成績をもとにサイトカインによる神経系の細胞の相互作用について報告する。

(6) ミクログリアの脳内機能

高坂新一（国立精神神経センター神経研究所・代謝研究）

ミクログリアは約半世紀前にその存在が記載されていたにも関わらず，脳内における機能に関しては依然不明な点が多い。しかし近年種々の成長因子がミクログリアより分泌されることが報告され，脳の発生過程や神経の損傷修復などにもミクログリアが重要な役割を担っている可能性

が示唆されている。本講演ではこれらの点につき，我々の研究成果を紹介しつつ論じてみたい。

(7) アストロサイトにおけるヒスタミン受容体の発現（ニューロンの標的としてのアストロサイト）

福井裕行（大阪大・医・第2薬理）

脳におけるヒスタミン神経は，1983年に Watanabe らによるヒスチジン脱炭酸酵素に対する抗体および Panula らによるヒスタミンに対する抗体を用いる蛍光免疫組織化学により同定された。ヒスタミン神経の分布は詳細に調べられたが，シナプスの形成が殆どないことを特徴とした。そこで，神経細胞以外の脳を構成する細胞もヒスタミン神経の標的として機能する可能性が考えられた。初代培養アストロサイトを用いてヒスタミン受容体の発現を調べたところ，H1 受容体については脳の平均受容体密度よりさらに高い発現が検出された。さらに，培養アストロサイトを1型および2型に分離してそれぞれにおけるヒスタミン受容体サブタイプの発現を調べた。その結果，1型には H2 受容体が，2型には H1 受容体が主に発現することが明かとなった。

(8) グリア性プロテオグリカンのひとつ，ニューロカンの構造・局在・機能

大平敦彦，渡辺英治（愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所・周生期学）

プロテオグリカンは，細胞表層に存在する代表的な複合糖質であり，細胞間や細胞－基質間の相互作用に関与していると考えられている。近年，脳には，多くの種類のプロテオグリカンが存在することが明らかとなった。私達は，ラットの脳からプロテオグリカンを単離し，それらに特異性を持つモノクローナル抗体を作製してきた。そのうち，1G2 と名づけた抗体は，220kDa および 150kDa のコア糖蛋白を持つコンドロイチン硫酸プロテオグリカン（ニューロカン）を認識した。ニューロカンは，おもにアストログリア細胞により産生されていることもわかった。1G2 抗体を用いたラット大脳の免疫組織化学により，ニューロカンは，視床からの求心性線維の進入路となるサブプレートに，線維の進入に先がけて発現していること，および，体性感覚野においてはバレル構造が形成される時期（生後数日から2週まで）に，バレルの壁部分に特に強く発現することなどがわかった。この結果は，ニューロカンが，ガイド分子およびグリア障壁としての機能を持つことを予想させる。

(9) シュワン細胞の膜糖蛋白群の構造と機能

植村慶一（慶應大・医・生理）

神経損傷時に特異的に減少するmRNAの検索によって，PMP22蛋白がShooterらによって見出されたが，この蛋白は以前私達が報告した末梢ミエリンのPASII蛋白と同じものであり，成長停止時に発現するGAS3とも同一のものであった。PASII/PM22遺伝子のポイント変異または重複が原因でtrembler マウスや遺伝性ニューロパチーの表現型が現れることが示された。POは末梢ミエリンの主要糖蛋白であるが，この蛋白は強い細胞接着作用と神経突起伸展促進作用を示した。それらの活性部位の検討結果および遺伝性神経疾患との関連を考察する。L1のアイソフォームであるL1csについても話題を提供する。

(10) 坐骨神経移植による視神経再生

福田　淳（大阪大・医・第2生理）

成熟ネコの視神経を切断しても同一個体の坐骨神経を移植することによって軸索再生させることができる。これは坐骨神経片内のシュワン細胞及びその外筒である基底膜が再生を促進させる環境を提供するからである。本発表では，こうして軸索再生した視神経線維髄鞘形成と生理機能について紹介する。

(11) 脳の発生過程における放射状グリアの役割

川野　仁，川村光毅（慶應大・医・解剖）

放射状グリアは発生初期の脳のほぼ全域に存在しているが，その後発生が進むとともに殆どの部位でアストログリアや上位細胞に変化する。しかし，放射状グリアは単なる前駆細胞ではなく，ニューロンの発生過程に重要な役割を果たしていると考えられる。本研究では，細胞外基質分子の一つであるテネイシンとアストログリアの骨格蛋白であるGFAPを放射状グリアのマーカーとして用い，脳内の異なった部位における放射状グリアの消長を明らかにするとともに，それらの機能を形態学的に検索する。

(12) Myelin-associated glycoprote in (MAG) とニューロンとの機能的相互作用

佐藤修三（新潟大・医・附属病院神経内科）

ミエリン内因性蛋白のひとつである myelin-associated glycoprotein (MAG) は，Neural cell adhesion molecule (N-CAM) などの細胞間認識蛋白，免疫グロブリン H 鎖や組織適合抗原など免疫系認識蛋白とのアミノ酸配列状の相同性があり，免疫グロブリンスーパーファミリーの一員として細胞間認識，特にミエリン形成細胞と神経軸索との接着上重要な分子と考えられている。また，これまでヒトやモデル動物の脱髄や再生，ミエリン形成不全などに関連している研究がみられることにより，神経系の各種の疾患による組織障害やその再生に重要な分子である可能性が高い。

われわれはこれまでに，cDNA クローニングによりヒトおよびマウス MAG の塩基配列を明らかにし，マウスにて各種病態における MAG の発現を検索してきた。また MAG の遺伝子のクローニングによってその構造を明らかにしたが，その 5′ 上流域にミエリン蛋白遺伝子に共通の配列を見いだし，ミエリンに特異な発現調節機構を解明するてがかりをえた。さらにグリオーマ cell line に MAG を transfect し，培養系での MAG の機能を検定する系を得，ニューロンとの機能的相互関係について検索中である。

(13) 高密度培養下の C6 細胞による神経突起伸展の抑制

渡辺英治（愛知県心身障害者コロニー，発達障害研究所）
小林裕明，村上富士夫（大阪大・基礎工，生物工学）

中枢神経の軸索が再生できない理由の一つとして，グリア細胞による軸索成長の抑制があげられる。近年グリア細胞が産生するいくつかの抑制因子が注目を浴びつつあるが，現時点ではその詳細は分子メカニズムは分かっていない。そこで本研究では株細胞に抑制活性を発現させることで，分子レベルでのアプローチのためのモデル系を作成することにした。使用した株細胞は C6 細胞で，高密度下で PLPmRNA を発現するという特徴を持つ。その C6 細胞の上で後根神経節細胞を培養したところ，低密度期の C6 細胞上では激しく突起伸展をおこなったが，高密度期の C6 細胞上では NGF 存在下にも関わらず突起伸展がほとんど観察されなかった。また，低密度細胞の一部分にパッチ状に高密度細胞を配置した培養では，神経突起は高密度細胞を避けるように成長した。これらのことは，高密度期の C6 細胞は神経突起伸長に対して抑制的であることを示唆しており，抑制性グリアの良いモデル系になる考えられる。

(14) オリゴデンドロサイトの神経突起伸展抑制作用の中枢神経と末梢神経に対する効果の特異性

渡辺英治（愛知県心身障害者コロニー・発達障害研究所）
小林裕明，村上富士夫（大阪大・基礎工・生物工学）

高等脊椎動物の中枢神経では，一般に，損傷を受けた場合再生が起こりにくい事が知られている。現在この原因として，オリゴデンドロサイトのミエリン膜上に存在する神経突起伸展抑制因子の役割が注目を浴びている。我々は，このオリゴデンドロサイトの抑制因子が，どのような神経細胞に対して作用するかについて調べ，その効果に特異性がある事を見いだした。鶏胚網膜，後根神経節，及び交感神経節と，ラット脊髄由来のオリゴデンドロサイトを共培養し，神経突起とオリゴデンドロサイトの相互作用を顕微鏡下で観察したところ，後根神経節由来の神経突起はオリゴデンドロサイトを避けるが，網膜由来のものは避けない事が分かった。網膜神経突起の，この抑制に対する不応性が再生過程でも存在するか否かはまだ分からないが，成熟動物でも再生が起こる場合があるという報告は，オリゴデンドロサイトの再生における役割を再考する必要がある事を示唆している。

20. 筋蛋白の分子構造とその機能

1994年 2 月25日～26日
代表者：月田承一郎
世話人：八木直人（東北大・医）

(1) アクトミオシン力発生における一分子計測の試み
吉川　博，宮田英威（慶應大・理工）

(2) クロスブリッジの滑り力と破断力の顕微計測
西坂崇之（早稲田大・理工）

(3) 蛋白質モーターの作動機構を遺伝子操作と力計測で検討する
須藤和夫（東京大・教養）

(4) 車軸藻モーター蛋白質
藤目杉江（名古屋大・理）

(5) ncd の酵素的性質
清水　隆（生命工学工業技術研究所）

(6) BDM の作用から見たミオシンモーターの特性
児玉孝雄（九州工大・情報工）

(7) F アクチンとミオシン分子の親和性の軸方向勾配形成の条件
鈴木　誠（工業技術院融合研）

(8) 原子間力顕微鏡によるモーター蛋白質系の研究
安藤敏夫（金沢大・理）

(9) 収縮中の骨格筋のクロスブリッジの三次元構造
光岡　薫（東京大・理）

(10) 3 個のクロスブリッジとアクチンフィラメント
御橋廣眞（名古屋大・理）

(11) X 線回折法で見たアクチンフィラメントの柔らかさ
若林克三（大阪大・基礎工）

(12) スキンドファイバー内アクチン線維の弾性率
樋口秀男（新技術開発事業団）

(13) 単一アクチン線維の弾性率
小嶋寛明（新技術開発事業団）

【討論参加者】

木下一彦，宮田英威，吉川　博，安田涼平（慶應大・理工），須藤和夫（東京大・教養），石渡信

一，西坂崇之，藤田英明，伊賀隆志，加藤宏一（早稲田大・理工），若林健之，光岡　薫，山川央，孟　　宇，安永卓生，土屋　章（東京大・理），片山栄作（東京大・医科学研究所），安藤敏夫，国岡由紀，網谷一郎（金沢大・理），清水　隆（生命工学工業技術研究所），藤目杉江（名古屋大・理），大岩和弘，山田　章（郵政省通信総合研究所），鈴木　誠，上田太郎（工業技術院融合研），太和田勝久，今福泰裕（九州大・理），御橋廣真（名古屋大・理），若林克三，杉本泰伸，武澤康範（大阪大・基礎工），八木直人（東北大・医），堀内桂輔（大分医大），児玉孝雄，小松英幸，重松順司，菅野　毅（九州工大・情報工），樋口秀男，小嶋寛明（新技術開発事業団），前田雄一郎，三森優子，前田佳代，小田俊郎，武田壮一（松下電器㈱国際研），江橋節郎，月田承一郎（生理研）

【研究会概要】

本研究会では二つのセッションが行われた。前半のセッションは，ミオシン・アクチンおよび他のモーター蛋白質分子の結晶内での構造の報告と，単分子を対象とした計測法の進歩をもとに，モーター蛋白質分子の機能を議論することを目的とした。多くの研究手法や材料についての話題が提供され，このテーマについてのさまざまなアプローチが紹介された。会の後半は，アクチンフィラメントの弾性の検討に充てられた。この会で報告された実験結果は，いずれもアクチンフィラメントが筋肉の発生する収縮張力によって伸びることを示し，筋肉の弾性要素のかなりの部分がアクチンフィラメント内に存在することが示唆された。

本研究会の意義は，発表された話題の内容のレベルの高さだけでなく，参加者全員による白熱した討論にあった。約15分の各発表について，15分以上の徹底した討論が行われ，意見の交換が行われた。それぞれの発表についてこれほどの長時間の議論が行われたことは，発表の内容の高さを示しており，また参加者が十分な知識と深い関心を持っていることを示している。一般の学会などにおいてこれほどの討論時間を確保することは困難であり，生理研研究会ならではの充実した会合となった。

(1)　アクトミオシン力発生における一分子計測の試み

吉川　博，宮田英威（慶應大・理工）

ATP一分子の骨格筋ミオシンによる加水分解で得られる化学エネルギーによってミオシンと骨格筋アクチンフィラメントの間に発生する力を in vitro motility assay と光ピンセット法を組み合わせて測定した。ミオシン分子はガラス表面上に吸着し，その上をアクチンフィラメントがATPの化学エネルギーを使って滑る。フィラメントの後端に直径1μmの小球を付けてそれを光ピンセットで保持すればミオシンの張力と光ピンセットが球を引く力の綱引きが始まる。ガラス

表面上のミオシン分子数を 1μm あたり100個程度とし，さらに ATP 濃度を調節してミオシン一個が１秒間に１個程度の ATP を分解するようにしたところ，球がステップ状に５ないし 20nm 動くことが明らかになった。これはたぶんミオシン分子が ATP を１個分解して力を出したところに対応するのではないかと推測された。

(2) クロスブリッジの滑り力と破断力の顕微計測

西坂崇之（早稲田大・理工）

結合性タンパク質ゲルゾリンを介してアクチンフィラメントの後端部にポリスチレンビーズを付着させ，このビーズを光ピンセットで顕微操作する方法により in vitro 滑り運動系におけるクロスブリッジの特性を１分子のレベルで調べている。(1)滑り運動時のビーズの変位から単一アクチンフィラメント上での滑り力を計測することができる。ATP 飽和時では１分子当たり 0.12pN, 10μM ATP では 3pN という値となった。(2)非常に薄い HMM 濃度の下では，ATP 非存在下でアクチンフィラメントはガラス面に数ケ所しか付着せず，このポイントの１つ１つが点在する HMM 分子に対応すると考えられる。光ピンセットで負荷をかけることでこの rigor 結合をつぎつぎに引きはがすことに成功した。平均の破断力は 6.2pN，最大値は 14pN であった。また系の柔らかさも見積られ，最大 0.54pN/nm という値が得られた。

(3) 蛋白質モーターの作動機構を遺伝子操作と力計測で検討する

須藤和夫（東京大・教養）

ミオシン分子の作動機構を明らかにするための遺伝子工学的アプローチの概要を説明した。まず，細胞性粘菌ミオシン重鎖遺伝子を用いて，ミオシンモータードメインのシステイン残基をすべてセリンあるいはスレオニン残基に変換する。このように cys-less mutant を作ってから，ATPase site に近いループにあらたにシステイン残基を導入する。このシステイン残基をマレイミドビオチンでビオチン化し，このビオチン化モータードメインをガラス表面に敷いたストレプトアビジンに結合させる。このようにして，モータードメインを ATPase site に近いループでガラス表面に固定する。このモータードメイン上でアクチンフィラメントが滑り運動をするかどうかを in vitro assay で調べる。現在，最終的な construct が出来上がり，細胞性粘菌の形質転換を行っている。

(4) 車軸藻モーター蛋白質

藤目杉江（名古屋大・理）

in vitro 運動アッセイの方法を用いて，運動活性を指標に車軸藻モータータンパク質の生成を試みた。車軸藻節間細胞の一端を切り，全細胞質を低イオン強度 MgATP を含む緩衝液に搾り出す。40,000rpm，30分の超遠心の上清に運動活性が認められることから車軸藻モータータンパク質は線維重合体を形成しないと考えられる。運動アッセイの方法でガラスに吸着したモータータンパク質を用いて，ATPase 活性を測定すると，骨格筋 F-アクチンにより約100倍活性化された。硫安分画の後，ATP 非存在下ウサギ骨格筋 F-アクチンを加え超遠心すると運動活性は F-アクチンと共沈する。この過程で分子量約 220kDa ポリペプチドが濃縮された。0.1M KCl, ATP を加え F-アクチンから解離させ，超遠心上の上清を陰イオン交換カラムにより精製すると，運動活性ピークには 220kDa ポリペプチドは ATP フォトアフィニティーラベルにより ATP 結合タンパクであることが確認された。以上のことから，220kDa ポリペプチドは車軸藻モータータンパク質の有力な候補であると考えられる。

(5) ncd の酵素的性質

清水　隆（生命工学工業技術研究所）

ncd はショウジョウバエ卵母細胞の減数分裂の染色体分離に機能する遺伝子の産物で，分子モーターであるキネシンのモータードメインと相同のドメインを持つこと，微小管に対する分子モーター活性を持つが，運動の方向性がキネシンと逆であることが明らかになっている。我々は ncd のモータードメイン（以下，ncd と省略）を大腸菌で発現させ，酵素的性質を調べた。ncd に蛍光性の ATP 類似物，マント ATP を加えて放置したところ，これがとりこまれ，蛍光強度が増大した。マント ATP は，とりこまれたのち加水分解されて，マント ADP となり，ゆっくりと解離するが，解離は微小管により著しく加速された。これらから，ncd には ADP が固く結合していること，ADP の解離が ATP アーゼの律速であること，などが示唆された。これらの性質は，キネシンのそれらにきわめて類似である。

(6) BDMの作用から見たミオシンモーターの特性

児玉孝雄（九州工大・情報工）

筋収縮を可逆的に抑制することで知られている 2, 3-butanedionemonoxime (BDM) が，(1)ミオシン ATP 分解における安定反応中間体 M. ADP. Pi の反応速度論的安定性を増加させる。(2)ミオシン ATP 分解中間過程の熱力学的特性を大きく変えている。(3) ATP 存在下におけるアクチンに対する親和性を低下させている。(4)ミオシン頭部ドメインの熱安定性を上昇させている，ことを示し，モーター部分のドメイン間相互作用を強めて，化学－力学エネルギー変換の変調を行っている可能性を示唆した。

(7) Fアクチンとミオシン分子の親和性の軸方向勾配形成の条件

鈴木　誠（工業技術院融合研）

アクトミオシンがモーターとしてはたらく条件を，これまで発表されている熱力学的諸量の変化から検討した。力発生は A. M. ADP. Pi の Pi の放出の際に起こるとされる。この過程は外液中の Pi 濃度が非常に薄い場合に始めて自然に進行する。この反応はエンタルピー的に不利である。その不利な原因は水の疎水的構造化によると推定できる。このことからタンパク間の滑り運動が水和水の構造と深く関わっているように思える。柳田氏の実験が示すように，1ATP 分解あたりミオシンの移動距離が 100nm 以上可能とすれば，ミオシン首降り説よりアクチンの方がミオシンとの接触点で変化してミオシンを運ぶとする考え方がより自然である。そのためにはアクチン線維の軸方向にミオシンとの親和性の勾配が形成されることが必要になる。これをアクチン線維上の水和水の構造の勾配として理解できないかを，誘電分散を用いて解析検討している。

(8) 原子間力顕微鏡によるモーター蛋白質系の研究

安藤敏夫（金沢大・理）

まず，我々の開発・製作した原子間力顕微鏡 (AFM) とそれを用いて観察された筋タンパク質の像を紹介した。この原子間力顕微鏡は倒立型蛍光顕微鏡と一体になっており，蛍光染色したタンパク質の蛍光像と AFM 像を同時に観察できる。また，カンチレバー探針先端も同時に観察できるため，試行錯誤せずに探針を試料にピンポイントアプローチできる。また，得られた AFM

像が試料のものであることが保証される。現在のところ，乾燥系ではあるが，アクチンフィラメント１本の像やミオシン頭部の像が鮮明に観察された。AFM は生体高分子を液中で高い空間分解能で観察できるので，今後極めて有効な手段となることは間違いない。装置上の改良も含めて，生体運動の研究に AFM が今後どのように利用されうるかを議論した。以下の課題の可能性を議論し，必要になる装置の改良方法を提案した。(1)タンパク質１分子のダイナミックな形状変化の追跡(2)タンパク質表面の物性（誘電分布や疎水性領域分布）のマッピング(3)ミオシン１分子の発生する力の計測(4)アクチンフィラメントに添った構造変化の伝搬の計測(5)タンパク質表面の高分解能微細構造観察

(9) 収縮中の骨格筋のクロスブリッジの三次元構造

光岡　薫（東京大・理）

等尺性収縮中のクロスブリッジの三次元構造を電子顕微鏡を用いて調べた。兎スキンドファイバーを収縮させ，そのまま急速凍結し，凍結置換して包埋した。収縮中のクロスブリッジの形態は，その形，角度，細いフィラメント上での配置の点で硬直状態とは明らかに異なっている。硬直状態のクロスブリッジは，細いフィラメントの近くで幅広く，太いフィラメントの近くで細いが，収縮中にはその全長にわたってほぼ幅は一定となる。収縮中のクロスブリッジの角度はばらついており，その細いフィラメントに対する平均角度は約90度であった。また，収縮中のクロスブリッジは 14.3nm のミオシンフィラメントの周期を保持したまま細いフィラメント上に並んでいた。硬直状態のクロスブリッジは傾いており，細いフィラメントの近くでは 36nm のアクチンフィラメントの周期を持っていた。

(10) ３個のクロスブリッジとアクチンフィラメント

御橋廣眞（名古屋大・理）

１本のアクチンフィラメントの，ミオシン ATP との接触点（力学的作用点）を考え，この作用点によるアクチンの変形を考える。明らかに，アクチンを剛体近似するかそれとも弾性体近似するかによって，アクチンの応答が異なる。アクチンを弾性体近似した場合，アクチンには非対称な変形（その生成と解消）が起こる（作用点より前方では圧縮，後方では伸長)。これらの変形は時間と共に解消する。解消に要する緩和時間と作用点の持続時間の大小関係により，変形解消後のアクチンの位置は作用点の前方に連続的に分布する。たとえば変形の解消が速くて作用点

の持続時間内に終わってしまえばアクチンの移動距離はそれだけ大きい。その逆ならばアクチンは一作用の間に少ししか移動しない。ところで，変形の解消過程では，前方に＜圧縮の波＞，後方に＜伸長の波＞が伝播する。したがって，ある距離 x だけ離れた二点でミオシン ATP と作用しているアクチンフィラメントがあり，もし二つの作用点間の距離 x が十分小さいと，後方からのアクチンの圧縮の波は前方の伸長の波と干渉し「吸収」されることがありうる。この場合，アクチン全体としての移動距離はそれだけ増える。したがって，見かけの移動速度が加算されるという現象が見いだされるであろう。

(11) X線回折法で見たアクチンフィラメントの柔らかさ

若林克三（大阪大・基礎工）

アクチンフィラメントのアクチンサブユニットの軸方向の間隔に相当する。1/2.7nm^{-1}の X 線子午線反射の位置を精密に測定した。太いフィラメントと細いフィラメントが完全に重なり合った状態のカエル骨格筋では，最大収縮中にこの反射の位置はフィラメントが伸びる方向に約0.25％変化した。フィラメント間の重なりが半分程度の筋肉でも，張力の大きさにほぼ比例しただけの反射位置の変化が見られた。しかし，フィラメント間に重なりのない筋肉では，逆に電気刺激によって0.1％程度の，フィラメントが短くなる方向の変化が見られた。収縮中の筋肉を引き伸ばした場合には，伸展による張力の増加に対応した分だけ反射の位置が変化した。1/5.1nm^{-1}と 1/5.9nm^{-1}のアクチンの層線も，これらと一致した変化を示した。以上の結果から，筋肉が弛緩状態から等尺性収縮状態に移行したときには，細いフィラメントが 3-4nm 伸びることを予想される。

(12) スキンドファイバー内アクチン線維の弾性率

樋口秀男（新技術開発事業団）

藤目智は（1970年），精製したアクチンの横方向の弾性を動的光散乱法を用いて測定し，筋収縮中にアクチン線維は10ナノメートル伸びることを予想した。一方，Huxley and Simmons の筋収縮機構（1971年）では，アクチン線維は固く，まったく伸びないと仮定された。本研究では，筋収縮中にアクチン線維がどの程度伸びるかを見積るために，筋線維内のアクチン線維の弾性を精度良く測定した。実験では，兎骨格筋スキンドファイバーを弛緩液につけ，BDM を含んだ収縮液中で弱く収縮させる。そして硬直液につけファイバーをほんのわずか引き伸ばし，張力と筋

節長変化を測定した。筋肉の弾性は，(力／筋節長変化) から見積った。その弾性をさまざまな筋節長で測定し，筋肉の伸びに対する，アクチンの伸びの寄与を算出した。その結果，アクチンの伸びは筋肉の伸びの53％を占めた。すなわち，力の発生に対する Huxley and Simmons の筋収縮機構におけるフィラメントが伸びないとする仮定は誤りだろう。

(13) 単一アクチン線維の弾性率

小嶋寛明（新技術開発事業団）

超分解能張力測定装置を用いることにより，単一アクチンフィラメントの単位長さあたりの弾性定数 Ka を決定し，その粘性成分，および印加張力による影響を検討した。その結果，弾性定数は，Ka = 43.7pN/μm，トロポミオシンをつけたときには，65.3pN/μm となった。さらに張力の変化に対する緩和時間は，0.3ms 以下であること，アクチンフィラメントにかかる張力が 50-170pN の範囲で，弾性定数が一定であることがわかった。以上の結果より，isometric 収縮中に細いフィラメントは，全長の0.23％のびることとなり，この値から，細いフィラメントを完全な剛体棒と見なすのは，実験結果を考慮するうえで，あまりにもおおざっぱな近似であることが示された。

21. 網膜神経回路の機能分化と視神経再生の生理学的・分子生物学的研究

1993年8月19日～8月21日

代表者：斎藤建彦（筑波大・生物科学系）

世話人：金子章道

(1) 小脳組織の発生，分化と神経回路形成の機構

湯浅茂樹（慶應大・医）

(2) 神経研究のモデル系としてのショウジョウバエ視覚神経系

岡野栄之，吉川真悟，沢本和延，御子柴克彦（東大・医科学研）

(3) GAP-43の網膜での機能について

新保　清，豊田順一，近藤博明，鯨岡　徹，朝倉幹雄（聖マリアンナ医大）

(4) ペリフェリン／RDS遺伝子異常(Asn-244-Lys)による網膜色素変性症の表現型の特徴

中沢　満，鬼川栄美，千田　靖，塩野　貴，玉井　信（東北大・医）

(5) 発達過程のラット網膜におけるtrkB. LNGFR遺伝子の発現

高橋　淳，宝子丸稔，小出智朗，児島正裕，菊池晴彦，畑中正一（京都大・医）

(6) 坐骨神経自家移植によるラット視神経再生における再生軸索とシュワン細胞膜との接触について

出沢真理（千葉大・医）

(7) 軸索切断後長期間生存しているネコ網膜視神経細胞

渡部眞三（発達障害研）

澤井　元，福田　淳（大阪大・医）

(8) 末梢神経自家移植によって軸索再生したネコ網膜神経節細胞の光受容野特性

三好智満，杉岡美保，澤井　元，福田　淳（大阪大・医）

渡部眞三（発達障害研）

(9) ラット視神経線維の逆行性変性過程

杉岡美保，澤井　元，福田　淳（大阪大・医）

(10) 視神経切断後の網膜神経節細胞の生存と神経再生

高野雅彦，堀江秀典（横浜市大・医）

(11) プラナリア過剰眼の視神経走行と再生能力

酒井章衣，渡辺憲二（姫路工大・理）

(12) 眼杯形成期におけるアセチルコリン(ACh)の作用

山下勝幸（大阪大・医）

(13) 網膜グリア細胞の変性および再生に関する細胞・分子生物学的研究

加藤　聖，菅原　清，寺西経信（金沢大・医）

(14) 培養家兎ミューラ細胞における excitotoxic amino acid の効果

川崎いづみ，若倉雅登（北里大・医）

(15) 培養したラット網膜の細胞分化とカリウムイオンによる調節

荒木正介（生命誌研究館）

(16) 単離培養下におけるイモリ色素上皮細胞の分化と膜電流の発現

酒井秀人，斉藤建彦（筑波大・生物）

(17) ヒキガエル網膜色素上皮 (RPE) 細胞の K^+ コンダクタンスは細胞外 K^+ 濃度に逆比例する

瀬川安則（金沢大・医）

Bret A. Hughes （ミシガン大）

(18) 糖尿病ラット網膜における GABA 濃度と分布の変化

石川　明，石黒誠一，玉井　信（東北大・医）

(19) 眼電位図 (EOG) Fast Oscillation 記録の試み―正常人眼における検討

中尾　寛，三木統夫，国頭七重，成田亜希子，玉井嗣彦（鳥取大・医）

(20) 塩酸メトクロプラミド（選択的 D_2 ドパミン作動性受容体阻害剤）投与の EOG Fast Oscillation に及ぼす影響

三木統夫，中尾　寛，瀬戸川章，玉井嗣彦（鳥取大・医）

(21) 微弱明順応下ヒト ERG の新成分と考えられる角膜側陽性電位

北　勝利，斉藤友護，田川考作，河崎一夫（金沢大・医）

(22) H1 水平細胞における受容野の波長依存性と APB 感受性シナプス

古川徹生，安井湘三（九州工大）

山田雅弘（電総研）

R. Petruv, M. B. A. Djamgoz （ロンドン大学インペリアルカレッジ）

(23) ドーパミンと明順応は H1 型水平細胞の分光応答を独立して修飾する

山田雅弘（電総研）

E. M. Fitzgerald, M. B. A. Djamgoz (Imperial College)

(24) 網膜双極細胞の軸索終末部における遊離 Ca^{2+} 濃度調節機構

立花政夫，小林克典，岡田　隆（東京大・文）

(25) ネコ網膜神経節細胞のアセチルコリン受容体

金子章道，橋本真生（慶應大・医）

(26) Simulation Study on the Wavelength and Intensity Dependency of the Spatial Properties of the Horizontal Cell Layer of Fish Retina.

J. B. A. Habraken, M. Kamermans, Y. Kamiyama, B. W. van Dijk, S. Usui

(Information and Computer Sciences, Toyohashi University of Technology)

(27) 網膜外網状層における Glutamate 回収機構と水平細胞の光応答の解析

鈴木達也，神山斉己，臼井支朗（豊橋技科大・情報工学）

(28) 脳による網膜の遠心性調節を中継する網膜細胞：鳥類の向網膜投射の標的細胞

内山博之，伊藤博信（日本医大）

田内雅規（国立リハセンター）

(29) ブラックバス網膜の機能と形態

海野　修，宍戸　修，小野真佐子（東邦大・理）

前原通代，霜田幸男，橋本葉子（東京女子医大）

(30) ウグイ網膜細胞間のギャップ結合連結について

日高　聡，橋本葉子（東京女子医大）

(31) 抗ヤツメウナギ視細胞抗体の同種松果体に対する反応性

吉田美加，外崎　昭（山形大・医）

(32) ショウジョウバエにおける視物質合成の調節機構

尾崎浩一，片野坂公明，河野明子，長谷晴美，徳永史生（阪大・理）

(33) 視物質および視物質変異体の発現

久富　修，山口卓也，茅田史生，徳永史生（阪大・理）

(34) 視物質の進化と色覚

吉澤　透（大阪産業大・工）

(35) 順応調節蛋白質 S-モジュリンの作用機構

河村　悟（慶應大・医）

(36) 無脊椎動物光情報伝達系の G 蛋白質

岩佐達郎，吉川知志，中川将司，津田基之（姫路工大・理）

(37) 錐体 cGMP-activated channel の修飾機構

渡辺修一（慶應大・医）

(38) 視細胞内節のイオン電流モデル

小椋俊彦，神山斉己，臼井支朗（豊橋技科大・情報工学）

(39) 人工網膜

八木哲也（九州工大）

松本　隆（早稲田大）

小林春夫（横河電機）

(40) 神経細胞の三次元形態の描画と表示について

田内雅規（国立リハセンター）

【討論参加者】

福田　淳，山下勝幸，三好智満，杉岡美保（大阪大・医・生理），酒井章衣，渡辺憲二（姫路工大・

理），徳永史生，久富　修，尾崎浩一（大阪大・理），金子章道，河村　悟，渡辺修一，桑田　治，三輪尚史，J. Stocker，沈　　静（慶應大・医・生理）若倉雅登，川崎いづみ（北里大・眼科），内山博之（日本医大・解剖），渡部眞三（発達障害研・生理），橋本葉子，日高　聡，前原通代（東女医大・生理），霜田幸雄（東女医大・総研・研究部），豊田順一，近藤博明，新保　清（聖マ医大・生理），立花政夫，岡田　隆（東大・文・心理），河又邦彦（秋田大・教育），堀江秀典，高野雅彦（横浜市大・医・眼科），荒木正介（生命誌研究館），高橋　淳（京大・医・脳神経外科），出沢真理（千葉大・医・解剖），宮地栄一（藤田保健衛生大・医・生理），吉澤　透（大阪産業大・工），大出尚郎（静岡日赤），玉井嗣彦，中尾　寛，三木統夫，瀬戸川章，成田亜希子（鳥取大・医・眼科），海野　修，小野真佐子，石井規雄，宍戸　修（東邦大・理），山田雅弘（電総研・分子機能），斉藤建彦，酒井秀人，千葉親文，金子優子，榊　洋子，新野瑞雪（筑波大・生物科学），安井湘三，古川徹生，八木哲也（九工大・情報工），外崎　昭，吉田美加，森　慶二（山形大・医・解剖），田内雅規（国立リハセンター），津田基之，岩佐達郎（姫路工大・理），加藤　聖，菅原清，寺西経信（金沢大・医・神経情報），臼井支朗，神山斉己，石井宏幸，河合房夫，小椋俊彦，鈴木達也，J. Habraken（豊橋技科大・情報工学），河崎一夫，白尾　裕，瀬川安則，北　勝利（金沢大・医・眼科），森田之大，保　智己（浜松医大・生理），玉井　信，石黒誠一，中沢　満，石川　明（東北大・医・眼科），湯浅茂樹（慶應大・医・解剖），岡野栄之（東大・医科学研），青木　清（上智大・生命研），藤沢　肇（名古屋大・理），中谷　敬（筑波大・生物科学），篠崎尚史（東歯大・眼科），林　高彰（慈恵医大・眼科）

【研究会概要】

脊椎動物の網膜は，発生学的には間脳に由来する光感覚組織であり，いわゆる脳の一部である。網膜は独立した神経組織を形成し，大脳皮質に匹敵する層状構造を持ち，失われた網膜や視神経を完全に再生する能力を持っている。一方，鳥類の網膜になると，網膜の再生が見られるのは胚発生の時期のみで，孵化後間もなくその能力は失われる。哺乳類の網膜・視神経では傷害を受けるとほとんど再生不可能であると言われている。

本研究では，１）網膜細胞や視神経線維を完全に再生する能力のある動物を用いて，再生の起源となる細胞の増殖・分化，そして網膜組織の再構築に関わる分子・遺伝子の同定する試みや，２）これまで再生不可能と考えられてきた動物の網膜や視神経を種々の実験操作（移植，神経栄養因子，その他）によって再生させようとする試みが報告された。網膜の再構築を研究する場合，網膜を構成する細胞の諸性質を理解することは不可欠であることから，網膜細胞の形態，生理，生化学的研究の報告も行われた。

湯浅茂樹先生（慶應大学・医・解剖）には，マウス小脳の組織構築の分子機構を，岡野栄之先生（東大・医科研）には，ショウジョウバエの網膜の形を決める遺伝子の同定について特別講演をしていただいた。ともに神経組織構築に関する細胞・分子生物学的立場からの最先端の研究を平易に話していただいたので啓蒙されるところが多かった。

生理学，解剖学，臨床医学，工学，生物物理学，発生生物学など多くの研究分野から90名以上の参加があり，活気に溢れた研究会であった。

(1) 小脳組織の発生，分化と神経回路形成の機構

湯浅茂樹（慶應大・医・解剖）

中枢神経系の発生においては，未分化神経上皮で最終分裂した幼若神経細胞が表層に向かって移動，配列し，皮質層構造あるいは神経核を形成する。そして，幼若神経細胞は突起伸展，シナプス形成を行うことにより，一見混沌とした神経原基から高度な秩序を持った神経回路が形成されてゆく。このような高い秩序をもった神経細胞の配列と相互の結合がどのような機構で形成されるかを明らかにすることは，神経発生生物学の中心的課題の一つである。さらに，損傷された神経組織の再構築の問題を考える際，再生過程で認められる諸現象には，発生過程との類似点が多く認められる。本講演においては，齧歯類小脳の発生を中心として，神経組織の形成と再構築の機構を以下の点から考察したい。

①小脳プルキンエ細胞の発生における移動と配列

プルキンエ細胞は小脳原基の神経上皮で発生後，表層に向かって放射状に移動し，皮質に配列する。この細胞移動は，脳室面から軟膜面に到る放射状グリアの突起との接触により誘導される。このグリアの突起にはニューロン－グリア間の細胞接着因子である tenascin が発現しており，細胞移動における細胞間相互作用に関与すると考えられる。また，皮質層構造の遺伝的形成異常のあるリーラーミュータントマウスの小脳原基においては，プルキンエ細胞の皮質への移動が障害されている。リーラーマウスの胎仔小脳の放射状グリアの突起配列は乱れており，グリアの形成異常が細胞移動の障害に関与すると考えられる。

②小脳求心線維起始核の発生における細胞移動と配列

菱脳胞の翼板から菱脳唇が形成され，これが背側に発達して小脳原基が形成される。小脳求心線維の起始核である橋核もやはり菱脳唇から発生し，橋核を形成する幼若神経細胞は実質内ではなく，軟膜下を前下方へ向かう細胞移動の流れを形成する。この移動経路にはレクチンの一つ peanut agglutinin (PNA) の受容体が発現し，この分子は移動細胞とそれが接する構造との接着部位に発現している。このような所見をもとに，軟膜下に認められる神経細胞移動の機構を考察する。

③小脳求心線維の発達とシナプス形成

周生期のマウス小脳において，小脳求心線維である登上線維，苔状線維は脳幹の起始核から小脳内に進入し，それぞれプルキンエ細胞，顆粒細胞にシナプスを形成する。これらの求心線維の発達とシナプス形成過程には種々の細胞接着因子が関与する。本講演においては，免疫グロブリンスーパーファミリーに属する Thy-1 の発現について細胞間相互作用の観点から考察する。

④小脳内への神経細胞移植

成体ラット小脳内に小脳原基を移植すると，移植片から宿主分子層内へのプルキンエ細胞の移動が認められる。移動プルキンエ細胞の周辺には細胞接着因子 tenascin の発現が誘導され，発生過程と類似の機構で細胞移動が起こると考えられる。このような例をもとに，損傷を受けた成体小脳の可塑性について考察したい。

(2) 神経研究のモデル系としてのショウジョウバエ視覚神経系

岡野栄之，吉川真悟，沢本和延，御子柴克彦（東京大・医科研）

神経系の発生・分化と神経細胞興奮の分子機構を明らかにするために，ショウジョウバエ *(Drosophila melanogaster)* の系を用いて，生化学，分子生物学，遺伝学，トランスジエニック動物の作製，組織化学，電気生理学的手法を組み合わせることにより，有機的に研究を行っている。特に，ショウジョウバエ視覚神経系は，解析が容易であるのみならず，神経細胞の興奮過程，シナプス伝達，軸索走行，細胞間相互作用等において異常を示す変異体を強力な遺伝学的手法を用いて解析を進めることができるため，神経生物学の非常によいモデル系であり，神経系において重要な役割を果たす未知の分子と，その変異体の単離・同定に適した系である。このような目的の為に，我々は，ショウジョウバエのトランスポゾンである P-エレメントのランダムな挿入による変異法を用いて，電気生理学的および形態学的なスクリーニングを行い，6500系統をスクリーニングし，数多くの新しい視覚系の変異体を分離した。

本シンポジウムでは，これらの変異体の内，Electroretonogram (ERG) あるいは視覚神経系の発生過程に異常を有する spike, *reversed potential (repo), strawberry* 変異体の表現型と遺伝子産物の構造，発現パターンおよび相同分子のクローニングによる哺乳類神経系への応用について報告したい。一例を述べると，*strawberry* (73A1-2) 遺伝子座は，partial loss of function タイプの変異体の表現型と，遺伝子産物の構造から，未分化な細胞集団から一つの細胞が神経細胞へと分化すると，隣接した細胞が神経細胞になるのを抑制すること（側方抑制）により神経細胞の数と位置を調整し，軸索走行を抑制する EGF モチーフを有する分泌性蛋白質をコードしていることが明らかとなった。さらに，トランスジエニック fly を用いた *strawberry* 産物の異所性の強制発現実験において，神経細胞の数が減少するという結果からも，このモデルの妥当性が支持された。

また，我々は，以上に述べたような手法以外にも，ショウジョウバエをはじめとする無脊椎動物の光応答機構における IP3/Ca^{2+} シグナリングと cGMP の役割に着目し，ショウジョウバエ IP3 受容体と guanylate cyclase に関する分子生物学的な解析を進めており，これらの結果と今後の展望についても言及したい。

(3) GAP-43の網膜での機能について

新保　清，豊田順一，近藤博明，鯨岡　徹，朝倉幹雄（聖マリアンナ医大）

プロテインキナーゼCの基質蛋白質であるGAP-43は神経突起の成長，再生，シナプス形成，神経伝達物質の放出，カルシウムによるカルモジュリンの調節に関与すると考えられ，動物によって網膜，とくに神経節細胞層，内網状層に存在が知られている。我々はRous sarcoma virus long terminal repeatプロモーターとラットGAP-43cDNAの結合遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作成，単離網膜神経節細胞を培養し，軸索成長速度の増加を観察した。また視神経切断一週間後の再生コイ神経節細胞でGAP-43の発現を観察した。電気生理学的，生化学的検討を加え，網膜に於けるGAP-43の役割について考察した。

(4) ペリフェリン／RDS遺伝子異常(Asn-244-Lys)による網膜色素変性症の表現型の特徴

中沢　満，鬼川栄美，千田　靖，塩野　貴，玉井　信（東北大・医）

ペリフェリン／RDSは錐体および杆体外節に存在する膜蛋白質で外節の構造維持などの機能を有すると考えられている。近年，網膜変性モデル動物のひとつであるrdsマウスはペリフェリン／RDS遺伝子の異常であることが知られ，またヒトでもこの遺伝子異常により網膜色素変性症が発症することが報告されている。今回われわれは日本人常染色体優性網膜色素変性症52家系の検索にてペリフェリン／RDS遺伝子コドン244の変異(AAC → AAA)をもつ1家系を見いだした。この遺伝子異常がもたらす表現型の特徴を各年齢層にわたって検討したので，その結果を報告する。

(5) 発達過程のラット網膜における *trkB*. i LNGFR遺伝子の発現

高橋　淳，宝子丸稔，小出智朗，児島正裕，菊池晴彦，畑中正一（京都大・医）

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)は，in vitroにおいて網膜神経節細胞の生存維持，神経突起形成を促すことが知られている。また近年，癌遺伝子産物であるTrkBが低親和性NGFレセプター(LNGFR)と共にBDNFと結合することが報告された。我々は，発達過程のラット網膜における *trkB*. LNGFR遺伝子の発現をNorthern blot analysisにて検討した。成熟ラットの網

膜における発現量を基準として比較すると，胎生17日から生後１日において *trkB* は1.5～2.5倍，LNGFR は5.5～６倍という mRNA 発現の増加がみられた。また，生後14～17日にも1.5倍くらいの小さなピークがみられた。これらの発現の変化は網膜神経節細胞のシナプス形成，自然細胞死および視覚機能の機能発達に関与している可能性があると思われる。

(6) 坐骨神経自家移植によるラット視神経再生における再生軸索とシュワン細胞膜との接触について

出沢真理（千葉大・医）

視神経再生時において，シュワン細胞，基底膜，再生軸索の関係を調べるために細胞性，無細胞性，部分細胞性の三種類の移植片を用いて再生実験を行った。更に，再生軸索とシュワン細胞との膜の相互関係を見るために凍結レプリカ法を実施した。細胞性，部分細胞性では再生が見られたが，無細胞性では見られなかった。また再生軸索とシュワン細胞，そして隣接するシュワン細胞同士では断続的な膜間における電子密度の高い物質と非常に短い密着結合が観察され，更にシュワン細胞間においてはギャップ結合もみられた。

(7) 軸索切断後長期間生存しているネコ網膜視神経細胞

渡部眞三（発達障害研）
澤井　元，福田　淳（大阪大・医）

成熟ネコの視神経を切断しても，少数の視神経細胞 (Retinal Ganglion Cells, RGCs) が数か月間生存していることが知られている。軸索切断60日後に生存している RGCs の数，分布とその形態を DiI 逆行性標識法と HRP および Lucifer Yellow 細胞内注入法で調べた。生存 RGCs の60—90％の細胞の樹状突起に，退縮や細かい突起の出現が見られ，α あるいは β 細胞と同定することはできなかった。少数の α 細胞および極めて少数の β 細胞も生存 RGCs に認められた。

(8) 末梢神経自家移植によって軸索再生したネコ網膜神経節細胞の光受容野特性

三好智満，杉岡美保，澤井　元，福田　淳（大阪大・医）
渡部眞三（発達障害研）

視神経切断後に坐骨神経を自家移植することによって，ネコ網膜神経節細胞の軸索が再生することが逆行性標識を用いて証明されている。今回，移植片を細くほぐして得られた線維束から銀線電極で再生軸索の電気活動を記録し，その光反応性や受容野を決定することができた。その結果，Y, X, W のいずれの特徴を持つ細胞も存在することが明らかとなった。しかし，速い動きには応じるにもかかわらずX細胞なみの小さな受容野を持つなどの，正常の受容野と異なる特性を持つ細胞も存在していた。

(9) ラット視神経線維の逆行性変性過程

杉岡美保，澤井　元，福田　淳（大阪大・医）

ラット網膜神経節細胞の軸索である視神経線維は軸索直径やその伝導速度から三群に分類されうる。今回，どの群の視神経線維から逆行性変性に陥るかを調べた。一側の視索を切断し，視交叉電気刺激に対する視神経複合活動電位を記録して，同一個体の左右眼窩でその振幅を比較すると，軸索伝導速度の遅い成分ほど切断による振幅の減少が著しかった。さらに，視索切断後，眼球直後の視神経横断面の電子顕微鏡写真から残存線維の軸索直径ヒストグラムを作成すると，軸索直径の小さい線維の割合が減少していた。これらの事実は，軸索直径の小さい線維ほど早期により著しく逆行性変性に陥ることを示している。

(10) 視神経切断後の網膜神経節細胞の生存と神経再生

高野雅彦，堀江秀典（横浜市大・医）

成熟ラットの視神経切断後の網膜神経節細胞の生存と培養下での神経突起再生能の経時的変化を検討した。9週齢のラットの視神経を麻酔下にて切断し，切断端より蛍光色素 (DiI) にて逆行性に神経節細胞を標識した。切断から2週後までの各時点で眼球を摘出し，網膜を観察し神経節細胞の生存率を計測した。また，網膜を Laminin 上で器官培養し，神経突起再生を観察した。標識された神経節細胞の数は切断3日後にピークに達しその後減少した。神経再生能は切断後7日

目に摘出された網膜において顕著に高まり以後低下した。

(11) プラナリア過剰眼の視神経走行と再生能力

酒井章衣，渡辺憲二（姫路工大・理）

眼の再生機構を調べる一環として，プラナリア過剰眼の存在様式とその再生能力を調べた。プラナリア視細胞特異抗体を用いた免疫染色から，過剰眼も一定の規則をもって脳に投射しており，機能をもつことが示唆された。しかしながら，通常の一対の眼が摘出後，3日で再生するのに対して，対を形成しない過剰眼は多くの場合，再生しないことがわかった。通常の眼そして過剰眼は再生過程で脳の前方に想定される眼形成領域から生じると考えられるが，完成した過剰眼の位置には，眼を再生する場はもはや存在しないと推定された。

(12) 眼杯形成期におけるアセチルコリン (ACh) の作用

山下勝幸（大阪大・医）

眼球の形態は胚発生の初期に決定される。前脳から眼胞が突出し，次に網膜神経層が眼胞内に陥入して眼杯となる。本研究では，この眼杯形成期の鶏胚網膜神経層の切りだし標本を作製し，ACh による細胞内 Ca 濃度の変化を蛍光測定 (Fura-2) にて調べた。ACh は細胞内 Ca 濃度の上昇をひきおこし，この応答はムスカリンレセプターにより生じることがわかった。また，ACh は網膜の湾曲運動を起こし，これは眼杯形成期における網膜の陥入運動を開始させるメカニズムである可能性を示唆する。ACh による Ca 応答は眼杯形成期をピークとして日齢とともに減少し，シナプス形成期以前にほぼ痕跡的となった。

(13) 網膜グリア細胞の変性および再生に関する細胞・分子生物学的研究

加藤　聖，菅原　清，寺西経信（金沢大・医）

最近グルタミン酸 (NMDA) レセプターを介した神経細胞死の研究がつとに盛んである。我々はコイ網膜を用いてグルタミン酸類似物質である DL-α-アミノアジピン酸による細胞死（特にグリア細胞毒性）について検索を進めているが，この毒性は非レセプター性で，ミューラー細胞に特

異的に発現しているシスチン／グルタミン酸交換輸送系を介したシスチン取り込みの阻害にもとづく細胞内 GSH の枯渇によることが判明した。また，このグリア毒性からの再生についても報告したい。

(14) 培養家兎ミューラ細胞における excitotoxic amino acid の効果

川崎いづみ，若倉雅登（北里大・医）

AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazolepropionic acid) 及び KA (kainate) を培養家兎ミューラ細胞に投与すると細胞内カルシウムイオン濃度 $[Ca^{2+}]_i$ が上昇し，これは non-NMDA antagonist で抑制されることから，我々はミューラ細胞に non-NMDA 受容体が存在し，これが excitotoxicity の防御と関係する可能性を討論した。今回ニューロンに遅発性細胞壊死を起こさせる量の KA（100μM，10分）を培養ミューラ細胞に投与した場合の動態を検討した。その結果投与直後，24時間後とも培養液内の lactate dehydrogenase (LDH) 濃度は上昇せず，形態的変化も起こらなかった。24時間後の細胞に AMPA を投与すると多くの細胞に $[Ca^{2+}]_i$ 上昇がみられるが，KA に暴露されていない細胞に比しその割合は高いことがわかった。ミューラ細胞は exitotoxic amino acid の暴露に対し抵抗性があり，かつ AMPA に対する応答の感度も変化させる可能性がある。

(15) 培養したラット網膜の細胞分化とカリウムイオンによる調節

荒木正介（生命誌研究館）

網膜には多様な神経細胞や視細胞があり，発生過程でその分化やネットワーク形成は複雑に調節・制御されている。この制御のメカニズムを知るために，未分化なラット網膜を単離・培養し，いくつかの細胞タイプを同定したのち，神経に脱分極を誘導する濃度の KCl を添加して，その効果を調べた。その結果，対照に比べて，4－5倍の GABA 陽性神経細胞や神経特異抗原 HPC-1 に陽性の神経細胞が観察され，特に大型の神経細胞ではよく発達した繊維が見られた。一方，ロドプシン陽性の視細胞は約10％に減少した。この結果から，網膜神経細胞のネットワークの形成には神経の刺激が重要な要素であると推測できる。

(16) 単離培養下におけるイモリ色素上皮細胞の分化と膜電流の発現

酒井秀人，金子優子，榊　洋子，斉藤建彦（筑波大・生物）

イモリ網膜の色素上皮細胞は，神経性網膜の障害・除去をきっかけにして，脱分化・増殖し，完全な網膜を再構築することができる。今回，イモリの網膜色素上皮細胞を単離培養し，単離直後の細胞の膜特性，および培養過程における膜特性の変化について，ホールセルクランプ法を用いて調べた。単離直後の色素上皮細胞は，-60mV 前後の静止電位を持ち，脱分極刺激に対し，遅延性 K^+ 電流応答を示した。これらの細胞を，血清を含む培養液中で培養すると，細胞の伸展，および色素顆粒の細胞内拡散が起こり，やがて，増殖が始まった。この時期のいくつかの細胞から，K^+ 電流以外に，電位依存性の Na^+ 電流が観察できた。さらに，培養すると，Ca^{++} 電流と思われる持続性の内向き電流成分を持つ細胞も現れた。これらの結果は，色素上皮細胞が，培養条件下で，新たなイオンチャネルを発現することを示唆している。現在，神経細胞への分化のきっかけとなる因子の検索を行っている。

(17) ヒキガエル網膜色素上皮 (RPE) 細胞の K^+ コンダクタンスは細胞外 K^+ 濃度に逆比例する

瀬川安則（金沢大・医）
Bret A. Hughes （ミシガン大）

視細胞外節と脈絡膜の間に位置する RPE 細胞の apical 膜は K^+ コンダクタンスを有し，網膜下腔の K^+ 濃度 ($[K^+]$) 調節に関与しているとされている。今回，パパイン処理によって得られたヒキガエル単離 RPE 細胞の K^+ コンダクタンスを perforated-patch clamp 法を用いて精査した。標準細胞外液 ($[K^+]$ = 2 mM) 中での静止膜電位は-71 ± 8 mV であった。静止膜電位は細胞外 $[K^+]$ 増大につれて脱分極した。膜電流は inward-rectifier (IR) 型の電圧電流関係を持ち，その大部分は K^+ チャンネル阻害作用を持つとされる Ba^{2+} (0.5 Mm) または Cs^+ (5 mM) 添加によって減少し，しかもその逆転電位は K^+ の平衡電位に合致したことにより，この IR は主として K^+ 電流に依存すると考えられた。この IR の-60 mV におけるコードコンダクタンスは細胞外 $[K^+]$ を 2 から 5 mM へ増加させると約25％減少した。この特性は網膜下腔の K^+ バッファー作用に寄与しているものと考えられた。

⑱ 糖尿病ラット網膜における GABA 濃度と分布の変化

石川　明，石黒誠一，玉井　信（東北大・医）

糖尿病患者に見られる ERG の異常について，その原因を検討するため，ストレプトゾトシン糖尿病ラットを用いて ERG を記録し，同じ動物を用いて網膜の遊離アミノ酸の定量を行った。糖尿病ラットでは，ERG b 波，OP 波の潜時延長，振幅低下が見られ，同時に抑制性アミノ酸，Glycine, GABA, の有意な増加が認められた。更にこれらアミノ酸に対する抗体を用いた免疫組織化学では，糖尿病ラット網膜において，Müller 細胞に GABA 様免疫反応の出現がみられ，網膜内濃度の上昇に相応する所見と思われた。Glycine, GABA は ERG, OP 波を減弱せしめることが知られている。糖尿病ラット網膜における，代謝異常に基づくと考えられるこれらアミノ酸の増加は，糖尿病で見られる電気生理学的応答異常の原因を考える上で，その一因になりうるものと思われる。

⑲ 眼電位図 (EOG) Fast Oscillation 記録の試み——正常人眼における検討

中尾　寛，三木統夫，国頭七重，成田亜希子，玉井嗣彦（鳥取大・医）

改良型 EOG 自動記録装置（ニデック EOG-2）を用いて，眼科的正常者60名120眼を対象に，fast oscillation (FO) の記録を行い，FO パラメータ［暗期の電位 (AD) と明期の電気 (AL) の差である df 値および FO ratio を示す RF 値］と年齢や性との相関について検討した。その結果，特に若年女性において，FO パラメータが有意に高くなる興味深いデータが得られた。これより，年齢，性差は FO パラメータの実測値を決定する上で，無視できない要因と思われる。

⑳ 塩酸メトクロプラミド（選択的 D_2 ドパミン作動性受容体阻害剤）投与の EOG Fast Oscillation に及ぼす影響

三木統夫，中尾　寛，瀬戸川章，玉井嗣彦（鳥取大・医）

ニデック EOG-2 （EOG 自動記録装置）を使用して，19－25歳の11名の健常者（男性 6 名，女性 5 名；volunteer）の EOG fast oscillation (FO) を記録し，選択的 D_2 ドパミン作動性受容体阻害剤である塩酸メトクロプラミド (MTCL) 投与の FO に及ぼす影響を検索した。その結果，EOG slow oscillation に対する MTCL の影響を無視できないものの，FO の起源における男女間のドパ

ミンに対する感受性の相違（女性で大）を示す結果が，特にFOパラメータdf値において観察された。

(21) 微弱明順応下ヒトERGの新成分と考えられる角膜側陽性電位

北　勝利，斉藤友護，田川考作，河崎一夫（金沢大・医）

暗順応下に記録されるヒト網膜電図(electroretinogram, ERG)の杆体系成分としては角膜側陽性電位であるrod-PII (scotopic b波＋DC component)および陰性電位である暗所閾値電位(scotopic threshold response, STR)が知られている。今回我々は極めて微弱な順応光がヒトERGに及ぼす影響を検討したところ，頂点潜時約120msecの角膜側陽性電位を見いだした。この陽性電位は順応光強度を絶対閾値近傍からわずかに強めていくとSTRおよびPIIが消失した後に出現し一定の範囲で順応光強度を強めるにつれその振幅は増大した。さらに杆体等価赤青刺激に対してunivariantであったことからこの陽性電位はヒトERGにおける杆体系由来の新成分である可能性が強く示唆された。

(22) H1水平細胞における受容野の波長依存性とAPB感受性シナプス

古川徹生，安井湘三（九工大）
山田雅弘（電子技術総合研究所）
R. Petruv, M. B. A. Djamgoz（ロンドン大学インペリアルカレッジ）

鯉のH1水平細胞は明順応下で受容野サイズの波長依存性を持ち，青受容野は赤受容野より狭い，暗順応に伴いH1の受容野サイズは増大し，この波長依存性は消失する。この現象のメカニズムをDA存在下の明順応網膜で調べた。その結果，APBが青受容野を広げ，受容野の波長依存性を消失させることがわかった。またAPBはH1の暗時入力抵抗を増大させ，またルシファー黄によりギャップ結合に無効なことを確認した。これらのことから，青受容野の拡大はギャップ結合ではなく膜抵抗が変化したために生じたものと考えられる。さらにAPBは短波長感受性錐体からH1へのコンダクタンス減少型シナプスのagonistであることを考えあわせると，このシナプスは明時に背景光波長に依存して作動することにより受容野を調節しているものと思われる。

(23) ドーパミンと明順応はH1型水平細胞の分光応答を独立して修飾する

山田雅弘（電総研）
E. M. Fitzgerald, M. B. A. Djamgoz (Imperial College)

鯉のH1型水平細胞は，錐体入力型水平細胞の1つで赤錐体が主入力だが短波長側の分光感度が測定により大きく異なる。1）明順応用の定常背景光照射後，短波長側の感度が低下することによって分光応答曲線は尖り，青と赤の応答振幅の比（B/R比）が減少した。2）この効果は，青よりも赤の背景光で顕著であった。3）暗順応過程においてB/R比は増大した。4）5μMのドーパミン投与は，明順応背景光によるB/R比減少と類似していた。5）しかし，明順応によるB/R比減少の効果は，5または50μMのドーパミン存在下でも見られただけでなく，50μMハロペリドール（ドーパミン阻害剤）存在下や，6-OHDAで前処理（ドーパミン性細胞を除去）した網膜でも見られた。上記の結果は，①H1型水平細胞は，短波長感受性錐体の入力をも受けており，それが明順応により分光応答曲線を尖らしており，②分光応答特性の修飾は，ドーパミンおよび未知の修飾物質によりもたらされていることを示唆している。

(24) 網膜双極細胞の軸索終末部における遊離Ca^{2+}濃度調節機構

立花政夫，小林克典，岡田　隆（東京大・文）

キンギョ網膜のON型双極細胞が脱分極すると，軸索終末部に局在するジヒドロピリジン感受性型Ca^{2+}チャネルを介してCa^{2+}が流入し伝達物質放出を引き起こす。脱分極によって上昇した細胞内遊離Ca^{2+}濃度（$[Ca^{2+}]_i$）の調節機構を調べるため，単離双極細胞をホールセルクランプし，膜電位固定下でのCa^{2+}電流を測定すると同時に，fura-2蛍光測光法により軸索終末部の$[Ca^{2+}]_i$を測定した。Ca^{2+}の流入量と$[Ca^{2+}]_i$の増加量との関係から，軸索終末部には強いCa^{2+}バッファが存在することが明らかになった。軸索終末部で増加した遊離Ca^{2+}は，細胞膜に存在するNa^+-Ca^{2+}交換機構およびCa^{2+}ポンプによって排出されることが示唆された。

(25) ネコ網膜神経節細胞のアセチルコリン受容体

金子章道，橋本真生（慶應大・医）

哺乳類網膜においてアセチルコリンはstarburstアマクリン細胞などに存在し，標的の動きに

特異的に応答する神経節細胞への興奮性伝達物質である。われわれは神経節細胞を単離し，パッチクランプ法を用いてアセチルコリン受容体の性質を解析した。-70mV の膜電位固定下でアセチルコリンを投与すると一過性の内向き電流応答が発生した。この応答はニコチン性のもので，ヘキサメトニウムとアトロピンによって抑制されたが，ヘキサメトニウムの抑制効果はアトロピンの50倍以上高かった。アセチルコリン応答のＩ－Ｖカーブは強い内向き整流特性を示した。また，Ca イオンによって強く影響され，特に 0 から 3mM までの範囲での修飾は劇的であった。これに比べ，Mg イオンはほとんど影響を示さなかった。今回われわれが観察した網膜神経節細胞のアセチルコリン応答は，中枢神経系に存在するニコチン性のアセチルコリン受容体の特徴を持つ。早い脱感作を示す一過性の応答であることは，このシナプスが標的の動きを検出する系にとって，持続的な応答に時間微分をかけ，変化分を取り出すという目的に叶った性質である。

(26) Simulation Study on the Wavelength and Intensity Dependency of the Spatial Properties of the Horizontal Cell Layer of Fish Retina.

J. B. A. Habraken, M. Kamermans, Y. Kamiyama, B. W. van Dijk S. Usui

Models describing horizontal cell properties generally describe either color coding or spatial properties. However, experiments indicate that it is not possible to separate these features. Therefore a model, describing the spatial and spectral properties of the horizontal cell layer was developed.

The model incorporates red, green and blue cones and mono-, bi- and tri-phasic horizontal cells. Three pathways prove to be essential to model the spectral and spatial properties of the horizontal cells. These are: the glutamatergic input from photoreceptors to cones, the GABAergic feedback from horizontal cells to cones and the electrical coupling between horizontal cells.

The main conclusion from this study is that pathways that are generally assumed to be involved in the color coding have major effects on the spatial properties of the horizontal cells. Only the combination of synaptic pathways and electrical coupling can explain the wavelength and intensity dependent receptive field properties of horizontal cells.

(27) 網膜外網状層における Glutamate 回収機構と水平細胞の光応答の解析

鈴木達也，神山斉己，臼井支朗（豊橋技科大・情報工学）

網膜外網状層における Glutamate 濃度は，視細胞シナプス部からの放出とトランスポータによる回収，シナプス間隙からの拡散及びミューラ細胞による回収により制御されている。こうしたシナプス伝達機構の特性を解明するため，本研究では，Glutamate トランスポータの作用を抑制する働きを持つ βHA (DL-threo-β hydroxyaspartate) を含むリンゲル液でコイ網膜を灌流し，水平細胞の光応答を記録した。βHA 灌流により静止膜電位は脱分極し，光応答オンフェーズは著しくスローダウンした。しかしながら，オフフェーズにはほとんど変化が生じなかった。さらに，水平細胞のイオン電流モデルを用いて，膜電位データから Glutamate 濃度を推定し，その時間特性を解析した結果，そのダイナミクスは回収・拡散に相当する成分と，放出に相当する成分に分離された。すなわち，βHA 作用下では，オンフェーズは回収効率の低下と拡散によるスローな成分により，オフフェーズは早い放出成分により制御されることが示唆された。

(28) 脳による網膜の遠心性調節を中継する網膜細胞：鳥類の向網膜投射の標的細胞

内山博之，伊藤博信（日本医大）
田内雅規（国立リハセンター）

鳥類網膜は中脳の isthmo-optic nucleus (ION) に由来する遠心性投射を受ける。biocytin をウズラの ION に限局的に注入して網膜へ投射する遠心性線維及び終末を標識した。種々の神経伝達物質等に対する免疫組織化学を重ねて行い，標的細胞の化学的性質を調べた。ION に由来する遠心性線維の終末は内顆粒層の最内層で一個の標的細胞の細胞体の基部を取り囲むようにシナプスを形成していた。標的細胞はアスパラギン酸，グルタミン酸に対する抗体で標識され，これら興奮性アミノ酸を伝達物質として利用していると考えられる。

(29) ブラックバス網膜の機能と形態

海野　修，宍戸　修，小野真佐子（東邦大・理）
前原通代，霜田幸男，橋本葉子（東京女子医大）

我々は約 3 年前からブラックバスを用いて網膜研究を行っている。そして，ブラックバスの双

極細胞では強いバイオサイチン結合を示すことを，昨年度の本研究会で報告した。ところで，ブラックバスはスズキ目に属し，これまで網膜研究でよく用いられてきたコイ目の魚類と異なる。ブラックバス網膜の構造と機能を，他のコイ目の魚類の網膜と比較しながら報告する。

(30) ウグイ網膜細胞間のギャップ結合連結について

日高　聡，橋本葉子（東京女子医大）

ビオチン複合物注入による細胞内標識法によって，ルシファー黄染色では観察できなかった網膜内の種々のニューロン間でギャップ結合連結の存在が明らかになってきた。そこで今回，網膜細胞におけるギャップ結合の存在及びその連結様式と，細胞の受容野構成との関係を調べた。アマクリン細胞では刺激光の照射面積の増大に対して，その樹状突起野の広がりを越えて応答を加算し，広い受容野中心部を形成するものが，同一型との間でギャップ結合によって連結していることが判明した。さらに，双極細胞や神経節細胞についても検討を行った。

(31) 抗ヤツメウナギ視細胞抗体の同種松果体に対する反応性

吉田美加，外崎　昭（山形大・医）

ヤツメウナギ網膜の長光受容細胞外節と短光受容細胞外節にそれぞれ特異的な2種類の単クローン抗体，L31 と S70 抗体を得た。2種の抗体が種々の脊椎動物網膜に対し，多様な交叉反応性を示すことを昨年の本研究会で報告した。これら抗体を，著明な外節を持つ同種松果体上皮細胞に作用させ，免疫組織学的に比較検討した。2種の抗体はともに松果体上皮細胞外節に反応する。L31 抗体陽性反応は周辺部の細胞に著しく，S70 抗体に陽性反応を示す細胞は松果体壁の全域に分布している。

(32) ショウジョウバエにおける視物質合成の調節機構

尾崎浩一，片野坂公明，河野明子，長谷晴美，徳永史生（大阪大・理）

ショウジョウバエの周辺視細胞に存在するオプシンは，発色団の欠乏によってその合成が抑えられる。この合成調節は翻訳以後の過程で起きており，発色団欠乏のハエ視細胞には，正常レベ

ルの mRNA と，糖鎖を持ったオプシンの合成中間体ペプチドが観察される。発色団の供給により，この中間体から成熟オプシンへの移行が誘導され，その過程で糖鎖の完全な切断が起こる。オプシンには糖鎖付加可能なアミノ酸配列が 2 ケ所存在し，糖鎖付加部位の Asn を Ile に置換した突然変異体では，正常なオプシン合成が起こらないことから，発色団だけでなく糖鎖もオプシン合成の調節に関与していると考えられる。今回は，野生型および糖鎖付加部位の突然変異体を用いた in vivo, in vitro の実験結果を中心に，オプシン合成の調節に対する発色団や糖鎖の寄与について考察する。

(33) 視物質および視物質変異体の発現

久富　修，山口卓也，茅田史生，徳永史生（大阪大・理）

脊椎動物視物質の cDNA を発現ベクターに組み込み，ヒト腎臓由来の培養細胞 (293S) に感染させた。48—72時間後，細胞を破砕・膜分画を単離し，11シスレチナールを加えて，視物質を再生させた。得られた視物質は，実際に網膜から単離した視物質の性質をよく反映していた。さらに，視物質 cDNA の一部を改変し，数種の部位特異的変異視物質およびキメラ視物質 cDNA を作成し，発現させその影響を調べたので報告する。

(34) 視物質の進化と色覚

吉澤　透（大阪産業大・工）

我々は前にニワトリの網膜からロドプシン以外に 4 種類の錐体物質（ニワトリ赤，緑，青，紫）を抽出した。一方，網膜には特有の有色の油球（赤，黄，うす緑，青，無色）を含む錐体が 5 種類ある。われわれは，どの視物質がどの視細胞に局在しているかを決定した。これに基づいて，複合錐体は昼間視の光強度の識別に，4 種の単一錐体は色覚に関与していること，また油球のフィルター効果は，波長識別能（分解能）を高めていることを推察する。またニワトリやヤモリのアミノ酸配列に基づいて，視物質の分子系統樹を作成したので，視覚特に色覚の進化について議論する。

(35) 順応調節蛋白質 S-モジュリンの作用機構

河村　悟（慶應大・医）

視細胞の順応には細胞内カルシウム濃度の減少が必須である。演者は，この細胞内カルシウム濃度の減少を検出して cGMP 分解の酵素カスケードを調節し，順応を制御する蛋白質 S-モジュリンの存在とその精製について，一昨年の本研究会で報告した。今回，S-モジュリンが視物質ロドプシンのリン酸化を調節することによって酵素カスケードを調節することを明らかにしたので報告する。またリカバリンと呼ばれている蛋白質も S-モジュリン作用を持っており，実は S-モジュリンと同一の蛋白質であることが明らかになった。

(36) 無脊椎動物光情報伝達系の G 蛋白質

岩佐達郎，吉川知志，中川将司，津田基之（姫路工大・理）

無脊椎動物視細胞での光受容・情報伝達機構はいくつかの点で現在その大筋の解明された脊椎動物と異なる。我々は既にこの経路に関与すると思われる G 蛋白質の細菌毒素によるキャラクタリゼーションを行った。さらに，それらの一次構造を明らかにしようと，タコ眼に存在する G 蛋白質遺伝子のクローニング，及び，抗 G 蛋白質抗体の結合，及び細菌毒素による ADP リボシレーションを指標とした G 蛋白質の精製を行っている。PCR 法によりタコ眼では Gi, Go, Gs, Gq タイプの G 蛋白質が発現していることが明らかになった。これらの DNA 断片と精製されつつある G 蛋白質とについて報告する。

(37) 錐体 cGMP-activated channel の修飾機構

渡辺修一（慶應大・医）

錐体外節の cGMP でゲートされるチャネルの活動は ATP によって増強あるいは抑制という修飾を受ける。この修飾はいずれもチャネルの cGMP に対する感受性の変化によって起こっている。イオンチャネルの修飾については多くの報告があるがリン酸化を介するものと介さないものが知られている。本研究では ADP あるいは ATP-γ-S などを用いて実験を行い，ATP による cGMP でゲートされるチャネル活動の修飾機構にリン酸化が関与しているかを検討した。

(38) 視細胞内節のイオン電流モデル

小椋俊彦，神山斉己，臼井支朗（豊橋技科大・情報工学）

視細胞の光応答は，外節の光感受性電流，内節に存在する3種類の膜電位依存性電流 (I_{Ca}, I_{Kv}, I_h)，2種類のカルシウム依存性電流 ($I_{Cl(Ca)}$, $I_{K(Ca)}$) により形成される。これらの各イオン電流の特性は，Schwartz (1982) や Maricq (1988) 等により測定されている。本研究では，こうした各イオン電流を Hodgkin-Huxley 型の微分方程式によりモデル化し，Torre (1990) 等の杆体外節モデルとの統合化を行った。その結果，光感受性電流に対する内節の各イオン電流の修飾作用，視細胞の光応答に伴うイオン電流変化の解析が可能となった。シミュレーション解析の結果，強いフラッシュ光照射時の一過性の過分極応答は，I_h により生じること，Normann (1976) 等により観測された長時間の過分極応答後の振動現象は，内節の I_{Ca} と細胞内カルシウム機構に由来することなどが示唆された。

(39) 人工網膜

八木哲也（九州工大）
松本　隆（早稲田大）
小林春夫（横河電機）

網膜の機能と回路構造は，工学的に見てきわめて優れておりかつ合理的である。最近アメリカを中心に網膜を集積回路により実現しようという試みが始まった。いわゆるシリコン網膜である。我々も脊椎動物の外網膜の情報処理機構を参考にシリコン網膜を試作した。この人工網膜は，双極細胞と同様の受容野をもち，画像の平滑化ーコントラスト強調を双極細胞の約1万倍の速さで実行する。本発表では，外網膜の機能と構造の優れた点をシステム論的立場から説明し，試作された人工網膜を紹介する。

(40) 神経細胞の三次元形態の描画と表示について

田内雅規（国立リハセンター）

神経細胞は一般的に複雑な樹状突起構造を有し，その分布，サイズ，突起の走行等を知ることによって機能の推定を行うことも可能である。一方，神経細胞は三次元的に突起を展開する場合

が多いが，それを薄切標本の再構成や顕微鏡観察像の写真によって行うことは容易ではないし正確性，定量性にも欠ける。現在，特定の染色標本について三次元描画あるいは計測を行う方法があるが，汎用性の点では問題が残る。今回，蛍光物質あるいは光吸収物質によって染色された細胞の三次元描画・表示・計測システムを開発したのでその機能の概要を紹介する。

22. 生殖細胞分化と受精におよぼす蛋白

1993年5月14日～15日
代表者：永野俊雄（千葉大・医）
世話人：有井達夫

(1) ヒト精巣・ラインケ結晶の染色性の再検討

安澄文興（琉球大・医）

(2) ラット Leydig 細胞の EDS (ethane-dimethane-sulphonate) 障害後の再生―幹細胞の分裂か 前駆細胞からの分化か

森 浩志（大阪医大）

(3) 精細管壁筋様細胞

前川眞見子，永野俊雄（千葉大・医）

(4) 精子細胞膜分子の発現の多様性

年森清隆，荒木早苗，谷井一郎，大浦親善（宮崎医大）

(5) 精子・卵子の融合に関与する精子上の抗原

岡部 勝（阪大・微研）

(6) 特別講演「生体内受精の神秘」

大浦親善，年森清隆（宮崎医大）

(7) 精細胞における蛋白チロシンフォスファターゼの発現

藤田 潤，中山広樹，金子嘉志（京都大・医）

(8) ハムスター成熟卵子と電気膜融合した精母細胞および精子細胞の微細形態上の変化

薄井紀子（帝京大・医）

(9) 静注された生理食塩水の侵襲期マウス胚子に対する特異的致死効果について

舘 澄江（東京女医大）

(10) 先体内酵素アクロシンは精子の膜融合能獲得に関与するか

高野広子（北海道大・医）

(11) 精細胞の増殖・分化に果たす W, Sl 遺伝子の役割

西宗義武（阪大・微研）

【討論参加者】

永野俊雄（千葉大・医），大浦親善，年森清隆，谷井一郎，荒木早苗（宮崎医大），西宗義武，岡部 勝（阪大・微研），森 浩志（大阪医大），安澄文興（琉球大・医），藤田 潤，中山広樹（京都大・医），高野広子（北海道大・医），舘 澄江（東京女医大），薄井紀子（帝京大・医），豊田二美枝，外山芳郎，羽地達次，前川眞見子，出沢真理（千葉大・医），浜 清，有井達夫（生

理研）

【研究会概要】

生殖細胞分化に関する解剖学的，分子生物学的，病理学的アプローチと受精現象にともなう種々の生物学的反応および細胞融合についての研究結果を発表討論する事を目的としている。

具体的には生殖細胞分化にともなう蛋白の発現，マスク，とその環境要因（セルトリ細胞，精巣上体，卵胞液，透明帯）について細胞化学的，免疫細胞学的に研究し，材料として正常動物，ミュータントマウス，病理材料，実験的毒性物質の影響，また哺乳動物の in vitro と in vivo 受精の相違等を討論した。さらに卵細胞への未成熟生殖細胞の強制注入による実験結果を討論した。

(1) ヒト精巣・ラインケ結晶の染色性の再検討

安澄文興，中村信之，高村寿雄（琉球大・医・解２）

1896年に Fr. Reinke が，ヒト精巣の間細胞（Leydig 細胞）に結晶を見いだし，その染色性を詳しく報告した。Reinke によるとその結晶は，フクシン，ヨード，サフラニン，鉄ヘマトキシリンに染色性を持つ。結晶の性状についても，塩酸とペプシンの両者に溶解性を示すことからタンパク質としている。しかし，H. Stieve が1930年に記載した成書では，ヘマトキシリンとエオジンの両者に不染性と述べられており，近年でも我々が参考としている幾つかの成書では同様に記述されている。

今回の報告は，手術で全摘された精巣を用い，幾つかの染色を試み再検討を行った。

精巣の固定は，通常のホルマリン固定とグルタールアルデヒド固定を用いた。前者はパラフインとグリコメサクリレイト樹脂 (GMA) に封入し，また後者は GMA に封入して薄切した。固定不全による結晶の溶解の可能性を調べるために，一部の標本をホルマリン固定液中に１ケ月間放置した後に，前記の方法で封入，薄切した。

ラインケ結晶は，ヘマトキシリンでも若干の染色性を有し，強いエオジン好性を示した。トルイジン青，鉄ヘマトキシリン，フクシンには染色性があり，周辺の組織構造の中で，強弱の程度差はあるが，特に赤血球と同じ染色性を持つ。ホルマリンに放置した試料で，ラインケ結晶の染色性は減退せずエオジン好性であった。

(2) ラット Leydig 細胞の EDS (ethane-dimethane-sulphonate) 障害後の再生 ——幹細胞の分裂か，前駆細胞からの分化か

森　浩志，宮野正雄，伊藤裕啓（大阪医大・病理）

Leydig 細胞の核分裂像は個体の幼若期以外殆ど観察されないが，老齢個体でも相当な数が存在する。Leydig 細胞は非常な長寿命なのか，あるいは再生する細胞なのか，もし再生するならば，それは幹細胞の分裂・分化によるのか，有限の前駆細胞の成熟によるのかを知る目的で，ラット Leydig 細胞を選択的に障害するとされている EDS を用いて，Leydig 細胞障害後の回復状態を検討した。

EDS 投与によってラット Leydig 細胞は死滅し，血中 testosterone (T) 値は著しく減少する。2 週間後には再生が始まり，1 月後には Leydig 細胞，血中 T 値ともほぼ正常状態に回復した。1 月間隔で EDS を反復投与（～4 回）すると，最終投与の 1 月後には精細管の変性・萎縮によって精巣重量は減少するが，Leydig 細胞の数・容積および血中 T 値は正常ラットに近い値に回復した。このことから Leydig 細胞は有限の前駆細胞からの成熟で補充されるのではなく，幹細胞の分裂で再生すると示唆される。

(3) 精細管壁筋様細胞

前川眞見子，永野俊雄（千葉大・医）

ラット，ゴールデンハムスター，マウスから精細管を単離し，ファロトキシン染色により筋様細胞内のアクチン細糸束の配列について共焦点レーザー顕微鏡で調べた。ラットでは，直交する格子状の細糸束がみられ，その方向は精細管長軸に対し輪走および縦走していた。ハムスターでは，輪走する方向の細糸束がより発達していた。マウス筋様細胞のアクチン細糸束はラット，ハムスターに比べて細く，配列もあまり規則的ではなかった。ファロトキシン染色によりセルトリ細胞基底部の細胞連結装置近傍のアクチン細糸束も明瞭に認められる。そこで，筋様細胞およびセルトリ細胞基底部の輪郭をトレースし，各々の面積を求め，各動物について比較した。その結果，筋様細胞の面積はハムスターが最も大きく（平均 2686μm^2），マウスが一番小さかった（平均 1782μm^2）。また，セルトリ細胞基底部の面積は，マウスが最大値を示した（平均 790μm^2）。

(4) 精子細胞膜分子の発現の多様性

年森清隆，荒木早苗，谷井一郎，大浦親善（宮崎医大・第1解剖）

精子の細胞膜成分の発現と挙動の報告にはしばしば混乱が見られる。その原因は，精子細胞膜分子の発現の複雑さと用いる抗体のエピトープの性状の複雑さにあると思われる。今回，それぞれの複雑さを分析し，精巣上体内精子の細胞膜成分の発現と挙動について考察した。精巣上体内精子の細胞膜構成分子を精巣内発現型と精巣上体内発現型に分けた。精巣内発現型を，発現後消失する消失型と，受精するまで保存される保存型に分けた。保存型をさらに修飾後保存型と非修飾保存型に分けた。修飾後保存型をさらに，化学的性状が修飾される性状修飾後保存型，局在が修飾される局在修飾後保存型そして両者が共に修飾変化する性状局在修飾後保存型に分けた。精巣上体内発現型をレセプター型と非レセプター型あるいは直接型に分けた。さらに抗体のエピトープの性状を分析した。以上のような観点から，著者らが作成した単クローン抗体 MC31, T21, MC121 の例を挙げて考察した。

(5) 精子・卵子の融合に関与する精子上の抗原

岡部　勝（阪大・微研）

先体反応を起こした精子のみが卵子と融合できる。先体反応精子には融合に必要な抗原が新たに発現するに違いない。ヒト精子に対するモノクローン抗体を作成した。このうちの MH61 抗体は先体反応精子とのみ反応しハムスターテストの系にいれると融合を阻害することが認められた。本抗原の分子量は 43KD であった。免疫沈降法により濃縮した抗原を電気泳動にかけた後 PVDF ペーパーに転写し配列を調べた。N 末端 4―26番目のアミノ酸配列が同定された。この結果を元にホモロジー検索を行ったところこの配列は補体調節因子 CD46 と完全に一致した。抗 CD46 抗体として取られたモノクローン抗体をハムスターテストの系に入れたところこれらにも融合の阻害活性が認められた。

CD46 は精子と卵子との融合に関与している可能性が示された。

(6) 特別講演　生体内受精の神秘

大浦親善，年森清隆（宮崎医大・解剖第一）

ハムスターおよびマウスの生体内受精を観察し，生物界にミステリーがある筈はないと知りつつも極めて多くの疑問を未解決のまま，今日まで残してしまった。それを「不思議」とか「神秘」で片付けるのは無責任のように思えてならないが，敢えて現時点では神秘という表現を使用させて頂き，そのうちの幾つかを挙げる。① early coitus, regular coitus, delayed coitus のうち，精子が最も早く卵に到達するのは delayed coitus である。② ハムスター精子は卵丘細胞群内で先体反応を起す。進入精子は透明帯に接近してから反応を惹起する。③ 進入精子頭部基底部の核質融解が完了すれば，基底部に続く頸部が進入を始める。④ 哺乳類の精子鞭毛は全長にわたって，そして卵の進入部位は膜融合しながら末端に向かって移動しながら進入する。⑤ 前核期末期までに精子の遺残体として消失するものは尾部主部の線維鞘，先体赤道部の周期構造，穿孔器と先体内膜複合体である。

(7) 精細胞における蛋白チロシンフォスファターゼの発現

藤田　潤，中山広樹，金子嘉志（京都大・医・分子病診療学）

PCR 法の出現により，複数の遺伝子の構造及び mRNA 発現の解析が極少量の標本を用いても出来るようになった。しかし RT-PCR 法を遺伝子発現の定量に応用するには問題がある。PCR 反応の対数増加期の生成物量は反応開始時の鋳型 DNA 量を反映するが，定常期の生成物量は初期の量を反映しない。そこで PCR のサイクルごとの生成物量を測定，グラフ化し，対数増加期の値をもとに初期鋳型量を推定した。モデル実験では，Northern ブロッチング法と一致する定量性が非 RI で得られた。そこで精巣生検標本における増殖関連遺伝子の発現の解析に応用した。また蛋白チロシンフォスファターゼ群さらにチロシンキナーゼ群でそれぞれ共通しているアミノ酸配列に対応する degenerate primer を用いて RT-PCR 法を行い，精細胞で発現しているものを同定し解析している。

(8) ハムスター成熟卵子と電気膜融合した精母細胞および精子細胞の微細形態上の変化

薄井紀子（帝京大・医）

ハムスター精細管より単離した球形の精子細胞を成熟卵子と電気膜融合させると，融合卵の殆どが2細胞期に達する[Ogura et al, Zygote 1993]。卵形質の前核誘導能を検索するため，単離した種々の精細胞を卵子と融合させ数時間後に観察した。1個の雌性前核とともに卵形質内に認められる数個の精細胞の核は，形・大きさともに変らず，精子細胞の核には先体胞が付着したまま残っていた。微細形態の変化は精母細胞とゴルジ期～頭帽期の精子細胞の球形の核にのみ認められた。これらの核は(1)高電子密度の核小体，(2)核膜内 *"blebbing"* など前核の特徴をそなえていた。すでにCSF, MPFなどが消失した卵形質内に前核を誘導する因子が存在すること，この因子は分散した染色質や核膜孔をもつ核にのみ，前核誘導能を持つことが示唆された。

(9) 静注された生理食塩水の侵襲期マウス胚子に対する特異的致死効果について

舘　澄江（東京女医大・解剖・発生生物）

マウス胚盤胞は，妊娠第4日目に子宮内膜に接着し，妊娠第5日目に内膜侵襲を開始する。即ち，栄養芽細胞は内膜上皮を食作用により除去し，脱落膜細胞に直接接するようになる。妊娠第6日目から9日目までのBALB/c系妊娠マウスに生理食塩水（0.2ml/ 20g体重）を10：00，或は22：00に尾静脈より注入し，12時間後の着床部位を観察した。子宮組織は3％グルタールアルデヒド溶液で灌流固定し，オスミウム酸で後固定した後，樹脂包埋し，厚さ2-3μmの切片を作製してトルイジンブルー染色を施した。妊娠第6日目22：00に生理食塩水を静注した動物では，ほぼ全着床部位で，また，妊娠7日目10：00に静注したグループでは約半数の着床部位で，胚子の退化像，或は流産後と思われる所見が得られた。着床胚が母体の血液と最初に接触する時期と一致して起こるものと考えられ，極めて僅かなイオンバランスの変化も致死効果をもたらす，この時期の着床胚に特異的な現象と推測される。

(10) 先体内酵素アクロシンは精子の膜融合能獲得に関与するか

高野広子（北海道大・医・第三解剖）
柳町隆造（ハワイ大・医・解剖）

受精のさいに精子の細胞膜は卵細胞膜と融合する。実験的に透明帯を除去した卵細胞（裸卵）に先体反応前あるいは後の精子を反応させると先体反応前の精子は受精できず，先体反応後の精子は受精できる。先体反応時に先体から放出される酵素が精子の細胞膜を卵細胞膜と融合できるようにするとも考えられる。そこで本研究では先体主要酵素，アクロシンが上記の精子膜融合能に関与する可能性をアクロシン阻害剤を用いてハムスター精子と卵細胞で検討した。精子は精巣上体尾から採取した。卵細胞は過剰排卵させて卵管から採取し，酵素処理により裸卵とした。観察は位相差顕微鏡で行った。精子を適当な条件で培養すると，培養3時間で先体反応を起こして先体を失った精子が出現し，このような精子の出現率は培養4時間でピークに達する。この実験では，精子を2時間培養し，この培養液にアクロシン阻害剤を加え，さらに2時間培養し，この精子をアクロシン阻害剤を加えた培養液にいれた裸卵と1.5時間反応させると，精子は先体反応を起こしていても，精子頭部の卵内侵入率は明瞭に低下した。精子をアクロシンと同様の作用も示すトリプシンにさらすと，精子は卵内侵入率を回復した。一方，先体反応後の培養4時間めからアクロシン阻害剤を作用させた精子の卵内侵入率には変化がなかった。

以上の結果は，先体反応時に先体から放出されるアクロシンによって精子細胞膜は卵細胞膜と融合できるようになることを示唆する。

(11) 精細胞の増殖・分化に果たす W, Sl 遺伝子の役割

西宗義武（大阪大・微研）

W, Sl 遺伝子は各々 c-kit レセプターとそのリガンド（Sl 因子）をコードしているがいづれの遺伝子に変異がおこっても，ホモ個体では通常不妊となる。

このメカニズムの研究から両遺伝子は精細胞分化の初期の段階に特に重要な役割を担っている事がだんだんと明らかになってきた。即ち Sertoli 細胞が産生する Sl 因子が精原細胞に発現している c-kit レセプターのチロシンキナーゼを活性化し，このリガンド・レセプター刺激によって伝達される情報が精原細胞の増殖・分化をひきおこす。このいづれが欠損しても同様に精細胞の増殖分化が障害され不妊となるものと理解できる。

【 国際シンポジウム 】

生理研コンファレンス
新プログラム国際シンポジウム報告

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，本年度は第19回を迎え，「Cl^-チャネル：その細胞分子生理学」(Cl^-channel: Molecular and Cellular Physiology) のタイトルの下に1994年３月１－３日所内で開催された。オーガナイザーには，所内からは岡田泰伸，山岸俊一が，所外からは赤池紀生，野間昭典，竹口紀晃があたった。

遺伝子クローニング法の確立によって電位作動性 Na^+, K^+, Ca^{2+}チャネルは共通した一次構造を持つことが明かとなった。しかし，Cl^-チャネルの一次構造はこれらのカチオンチャネルのとは大きく異なり，その活性化や不活性化のメカニズムや，ゲートやポアやフィルターなどの部位についても殆ど不明である。最近，サイクリック AMP 依存性 Cl^-チャネルは，嚢胞性線維症 cystic fibrosis の原因蛋白である CFTR そのものであることが示されたが，驚いたことにこの CFTR は（ATP 分解酵素型ポンプ様構造を持つ）ABC スーパーファミリーに構造上は分類されることが判明した。また同様に ABC スーパーファミリーに属する薬剤排出ポンプである P 糖蛋白 (MDR1) は，細胞膨張させたときには容積調節性 Cl^-チャネルとして機能することを示す論文が現れ，Cl^-チャネル研究は一躍脚光を浴びるに至った。そこで今回は，CFTR や MDR のほかに，Ca 依存性 Cl^-チャネル，電位作動性 Cl^-チャネル，リガンド作動性 Cl^-チャネルなど，すべての種類の Cl^-チャネルの最近の研究結果を突き合わせる目的で，世界各国の第一線級の研究者を一堂に会することを企画した。

参加者は，国外から20名，国内からは86名，計106名にのぼった。国外からの招待講演は，Boyd (Oxford), Brown (Manchester), Clapham (Rochester), Gadsby (New York), Hume (Nevada), Jentsch (Hamburg), Sepulveda (Cambridge), Twyman (Utah), Berger (Iowa), Wong (Brooklyn), Wine (California), Cahalan (Calfornia), Quinton (California), Roy (Montreal), Hoffmann (Copenhagen), 丸中良典 (Toronto) の16名によって行われ，国内からは穎原嗣久，今井　正，佐々木成，大地陸男，高橋智幸，赤木宏行，藤本　守，尾野恭一，田中永一郎，成瀬正浩，赤池紀生，竹口紀晃，山岸俊一，岡田泰伸の14名が最新の知見を中心に講演した。とくに，「本当に MDR1 がポンプとチャネルの間をスイッチし得るのか」について激しい討論が繰り広げられたことが印象的であった。そのほかポスター演題が31題掲示され，指定の時間や休憩時間に討論が行われた。

詳細な内容は Japanese Journal of Physiology 誌のサプルメントとして本年中に発行される。

PROGRAM
THE 19TH SEIRIKEN CONFERENCE
"CL⁻CHANNEL: MOLECULAR AND CELLULAR PHYSIOLOGY"

March 1－3, 1994

National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan

Host: Kiyoshi HAMA (Director-General, NIPS)

Organizers: Yasunobu OKADA (NIPS), Shun-ichi YAMAGISHI (NIPS), Norio AKAIKE (Kyushu Univ.), Akinori NOMA (Kyoto Univ.) & Noriaki TAKEGUCHI (Toyama Med. Pharmaceut. Univ.)

Opening remarks K. Hama (Director General, NIPS, Japan)

L1. *T. J. Jentsch* (Univ. Hamburg, Germany) Structure and function of CLC chloride channels.

L2. *S. Sasaki*, S. Uchida & F. Marumo (Tokyo Med. Dent. Univ., Japan) CLC family in the kidney.

L3. *N. Takeguchi*, Y. Tomiyama, S. Asano & M. Morii (Toyama Med. Pharmaceut. Univ., Japan) The apical chloride channel as part of the function of gastric H^+, K^+-ATPase.

Coffee & Poster Viewing (1F)

L4. M. A. Valverde, S. P. Hardy, H. Goodfellow, C. F. Higgins & *F. V. Sepulveda* (AFRC Inst. Animal Physiol. Gen. Res., U. K.) Protein kinase C-mediated inhibition of volume regulated chloride channel in P-glycoprotein-expressing cells.

L5. M. Ackerman, G. Krapivinsky, E. Gordon, L. Krapivinsky, K. Wickman & *D. C. Clapham* (Mayo Found., U. S. A.) Characterization of a native swelling-induced chloride current, $I_{Cl\text{-}swell}$, and its regulatory protein, pI_{Cln}, in *Xenopus* oocytes.

Lunch & Poster Viewing

L6. *M. D. Cahalan*, G. R. Ehring, Y. V. Osipchuk & P. E. Ross (Univ. California, Irvine, U. S. A.) Volume-sensitive Cl^- channels in lymphocytes and multidrug-resistant cell lines.

L7. *Y. Okada*, M. Kubo, S. Oiki, C. Petersen, M. Tominaga, A. Hazama & S. Morishima (NIPS, Japan) Properties of volume-regulatory chloride channels in human epithelial cells.

L8. *G. Roy* (Univ. Montreal, Canada) Channels for amino acids and metabolites activated by cell volume regulation.

L9. *M. Fujimoto*, Y. Mori, N. Hagiwara, T. Kubota & K. Kotera (Osaka Med. Univ., Japan) Functional significance of K^+ and Cl^- channels in volume regulation in proximal tubular cells.

L10. *M. Imai,* J. Taniguchi, M. Suzuki & K. Yoshitomi (Jichi Med. Sch., Japan) Regulation of Cl^- conductance in the thin ascending limb of Henle's loop.

L11. *M. Naruse,* T. Inoue, M. Nakayama, T. Sato & K. Kurokawa (Kumamoto Univ. & Tokyo Univ., Japan) Effect of luminal Cl^- and Ca^{2+} on tubuloglomerular feedback mechanism.

L12. *C. A. R. Boyd* & M. Vatish (Oxford Univ., U. K.) Regulation of conductive chloride transport in human placental membranes.

L13. *Y. Marunaka,* T. Nakahari & H. Tohda (Toronto Hosp. Sick Childr., Canada) Cytosolic [Cl^-] regulates Na^+ absorption in fetal alveolar epithelium? Roles of cAMP and Cl^- channels.

L14. *R. E. Twyman* (Univ. Utah, U. S. A.) Ultrafast GABA-A receptor activation: Simulation of post-synaptic responses in excised patches.

L15. *H. Akagi* (Gunma Univ., Japan) Function and modulation of the cloned glycine receptor channels expressed in *Xenopus* oocytes.

L16. *T. Takahashi* & A. Momiyama (Tokyo Univ. & Kyoto Univ., Japan) Glycine-gated Cl^- channels underlying synaptic currents.

L17. Q. X. Chen & *R. K. S. Wong* (SUNY at Brooklyn, U. S. A.) Intracellular control of $GABA_A$-receptor responses in hippocampal neurones: Role of phosphorylation.

L18. *E. Tanaka,* H. Higashi & T. Yamagami (Kurume Univ., Japan) Chloride-dependent potentials and their effects on firing pattern in guinea-pig cingulate cortical neurons.

L19. *N. Akaike* (Kyushu Univ., Japan) Inhibitory amino-acid-gated responses in neurons studied with gramicidin perforated patch recording.

L20. T. Kotera & *P. Brown* (Univ. Manchester, U. K.) Activation of chloride currents in choroid plexus by GTP-gamma-S and cyclic-AMP.

L21. *E. K. Hoffmann* (Univ. Copenhagen, Denmark) Swelling-activated anion channels in Ehrlich ascites tumour cells.

Dinner Party for Oversea Participants with Organizers

L22. *D. J. Benos* (Univ. Alabama at Birmingham, U. S. A.) Isolation, reconstitution, and cloning of a calcium-activated chloride channel from bovine trachea.

L23. *R. Ochi,* K. Yumoto & M. Watanabe (Juntendo Univ., Japan) Activation of Cl^- channels by external ATP, internal Ca^{2+} with ATP and hypotonic medium in endothelial cells.

L24. *S. Yamagishi,* I. Tsutsui & K. Furuya (NIPS, Japan) Emergence of a chloride permeability after internal perfusion with calcium in squid giant axons.

L25. *H. A. Berger,* D. P. Rich, S. H. Cheng, S. M. Travis, M. Saxena, A. E. Smith & M. J. Welsh (Univ. Iowa Coll. Med., U. S. A.) Regulation of the cystic-fibrosis transmembrane conductance regulator Cl^- channel by negative charge in the R domain.

L26. *T. Ehara,* I. Iyadomi & K. Hirahara (Saga Med. Univ., Japan) Regulation of cyclic AMP-dependent Cl^- channel in heart.

L27. *J. R. Hume,* P. Hart, P. C. Levesque, M. L. Collier, Y. Geary, J. Warth & B. Horowitz (Univ. Nevada, U. S. A.) Molecular physiology of CFTR chloride channels in heart.

L28. *D. C. Gadsby,* T. -C. Hwang, T. Baukrowitz, G. Nagel, M. Horie & A. C. Nairn (Rockefeller Univ., U. S. A.) Regulation of CFTR channel gating by phosphorylation and ATP hydrolysis.

L29. *K. Ono* & A. Noma (Kyushu Univ. & Kyoto Univ., Japan) Autonomic regulation of cardiac chloride current.

L30. *J. Wine,* C. Haws, Y. Xia, J. Widdicombe & W. Finkbeiner (Stanford Univ., U. S. A.) CFTR and other Cl^- channels in human submucosal gland cell line.

L31. *P. M. Quinton* & M. M. Reddy (Univ. California, Riverside, U. S. A.) Regulation of absorption by phosphorylation.

Closing Remarks K. Hama (Director General, NIPS, Japan)

POSTER SESSION

P1. *H. A. Berger,* D. P. Rich, S. H. Cheng, S. M. Travis, M. Saxena, A. E. Smith & M. J. Welsh (Univ. Iowa Coll. Med., U. S. A.) Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl^- channel by negative charge in the R domain.

P2. *S. Uchida,* M. Kawasaki, T. Monkawa, A. Miyawaki, K. Mikoshiba, F. Marumo & S. Sasaki (Tokyo Med. Dent. Univ., Japan) Cloning and expression of a protein kinase C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells.

P3. J. D. Warth, B. Horowitz & *J. R. Hume* (Univ. Nevada, U. S. A.) Identification of $CFTR_{cardiac}$ in non-hyman primate ventricular myocytes.

P4. *M. Tominaga,* M. Horie & Y. Okada (NIPS & Kyoto Univ., Japan) Additional similarity of cardiac cAMP-activated Cl^- channels to CFTR Cl^- channels. Glibenclamide inhibits cardiac cAMP-activated Cl^- channels.

P5. H. Oe, *M. Horie,* L. -H. Xie & S. Sasayama (Kyoto Univ., Japan) Pertussis toxin-sensitive G-protein-mediated regulation of cardiac PKA-activated Cl conductance.

P6. *A. F. James,* L. -H.. Xie & M. Horie (Ciba-Geigy Inst. & Kyoto Univ., Japan) The effects of endothelin-1 on the PKA-dependent Cl^- current in the heart.

P7. *G. Seki,* S. Taniguchi, S. Uwatoko, K. Suzuki & K. Kurokawa (Tokyo Univ., Japan) Activation of the basolateral Cl^- conductance by cAMP in rabbit renal proximal tubule S3 segment.

P8. *K. Kawahara* (Chiba Univ., Japan) Slow activation of chloride currrents during hypotonicity in rabbit proximal convoluted tubule (PCT) cells in culture.

P9. *K. Ueda,* T. Saeki, K., M. Hirai, Y. Tanigawara, R. Hori & T. Komano (Kyoto Univ., Japan) Human P-glycoprotein as an multi-drug transporter analyzec by using transepithelial transport system.

P10. C. C. H. Petersen, M. Kubo, S. Morishima, M. Tominaga & *Y. Okada* (NIPS, Japan) Single-channel recordings of volume-regulatory Cl^- channels in human epithelial cells.

P11. *S. Oiki,* M. Kubo & Y. Okada (NIPS, Japan) Inhibiting effect of Mg^{2+} on volume-regulatory Cl^- channels in human epithelial cells.

P12. *K. Yumoto,* M. Watanabe & R. Ochi (Juntendo Univ., Japan) Cl^- current is necessary for sustained ATP-induced Ca^{2+} increase in endothelial cells.

P13. *Y. Maruyama* (Jichi Med. Sch., Japan) Triggered exocytosis may not incorporate functional Cl^- channels into the luminal membrane in pancreatic acinar cells.

P14. *T. Ishikawa* & D. I. Cook (NIPS, Japan & Univ. Sydney, Australia) Characterization of an outwardly rectifying chloride channel in a human submandibular gland duct cell line (HSG).

P15. *T. Shirokawa* & T. Ogawa (Akita Univ., Japan) Release and uptake of GABA following whisker stimulation in rat barrel cortex.

P16. Y. Kataoka, M. Niwa, K. Yamashita & *K. Taniyama* (Nagasaki Univ., Japan) GABA receptor function in the parasympathetic ganglia.

P17. *M. Kano* (Jichi Med. Sch., Japan) Calcium-induced long-lasting potentiation of GABAergic currents in cerebellar Purkinje cells.

P18. *R. Shingai,* T. Ogurusu & H. Taira (Iwate Univ., Japan) Modulation of ionic currents through $GABA_A$ receptor subtypes by endogenous steroids.

P19. *K. Takahashi,* S. Miyoshi & A. Kaneko (Keio Univ., Japan) Two components of GABA-induced currents in catfish retinal horizontal cells.

P20. Y. Kubota & *Y. Kawaguchi* (RIKEN, Japan) Three classes of GABAergic interneurons in neocortex and neostriatum.

P21. *I. Inoue,* T. Nagahama & M. Takata (Tokushima Univ., Japan) Cl^- channels as a cholinergic Ach receptor in *Aplysia* in buccal muscle cells responsible for IJP generation.

P22. T. Nakahari & *Y. Marunaka* (Toronto Hosp. Sick Childr., Canada) Whole cell conductance regulated by cytosolic $[Cl^-]$ and ADH-activated Cl^- channels in a distal nephron cell line (A6).

P23. *Y. Marunaka* & H. Tohda (Toronto Hosp. Sick Childr., Canada) The stimulatory action of vasopressin on single Cl^- channels in the apical membrane of distal nephron epithe-

lium (A6).

P24. *H. Sakai* & N. Takeguchi (Toyama Med. Pharmaceut.Univ., Japan) A novel GTP-gamma-S-dependent regulatory mechanism in the basolateral Cl^- channels of gastric parietal cells.

P25. *H. Kajita,* Y. Shirakata, T. Kotera, S. Ueda & Y. Okada (Kyoto Univ. & NIPS, Japan) Endothelins activate large-conductance Cl^- channels of guinea pig parietal cella.

P26. *Y. Suzuki,* K. Kaneko, M. Maruyama & H. Hayashi (Univ. Shizuoka, Japan) Basolateral Cl^-/HCO_3^- exchange in epithelial cells from guinea pig distal colon.

P27. M. Robertson & *J. K. Foskett* (Hospt. Sick Children, Canada) Na^+ transport pathways in single secretory cells: Membrane crosstalk mediated by $[Cl^-]_i$. Activation of $Na^+ - H^+$ exchanger, $Na^+ - K^+ - 2Cl^-$ cotransporter and non-selective cation channel requires agonist-induced fall of $[Cl^-]_i$.

P28. *S. Takeuchi* & A. Irimajiri (Kochi Med. Sch., Japan) Cl^- and nonselective cation channels in the basolateral membrane of strial marginal cells in the chochlea.

P29. *K. P. Park* & P. Brown (Asan Med. Centr., Korea & Univ. Manchester, U. K.) Intracellular pH modulates the activity of K^+ and Cl^- channels in lacrimal gland acinar cells.

P30. *A. Takahashi,* H. Yamaguchi & H. Miyamoto (Tokushima Univ., Japan) Changes in density of K^+ current of HeLa cells during the cell cycle.

P31. *Y. Mori,* N. Hagiwara, K. Kotera & M. Fujimoto (Osaka Med. Coll., Japan) Role of pH-sensitive ion channels in regulation of cell volume and ion transport in the proximal tubular cells.

新プログラム国際シンポジウム

Plasticity of Aynapse and Neural Networks in the Brain

高次脳機能を担う神経細胞間シナプス伝達機構および神経回路機構に焦点を合わせ，これまでの知見を集約し，今後の研究の進路についての展望を得ることが本シンポジウムの目的であった。(1)シナプス伝達機構についての分子・細胞生理学，(2)シナプスの機能的可塑性，(3)神経回路網の形態変化を伴う可塑性の3テーマについて，以下に述べるような発表が行われ最新かつ重要な成果が多数報告され，かつ活発な討論が行われた。

(1) シナプス伝達は，シナプス前末端における Ca イオン濃度上昇によりシナプス小胞が放出されることにより起こる。神経終末内において，Ca チャネル・細胞内 Ca ストアー・Ca ポンプ・Ca buffer 分子等がどのように Ca イオン濃度の制御に関わるかが報告され，それらの分子に対して伝達物質やニューロモデユレーターが作用し，シナプス伝達が調節されることが報告された。また Ca イオン濃度上昇によりいかにしてシナプス小胞の分泌が引き起こされるかについても，神経終末内のシナプス小胞膜や細胞膜に局在する蛋白の機能を特異的に阻害するペプチドをシナプス終末に注入しシナプス伝達への影響を調べる手法や，非分泌性の細胞に分泌に必要と考えられる分子を注入し分泌能を再構築する手法，等により分子レベルの解析が進行していることが発表された。また伝達物質受容体についても G 蛋白結合型のメタボトロピックグルタミン酸受容体の作用機構等について最新の情報が報告された。

(2) 記憶・学習の細胞レベルでの基礎課程と考えられる長期増強や長期抑圧といったシナプス伝達機能の長期的変化について発表が行われた。海馬・大脳皮質においてはこれまでは長期増強が注目されていたが，長期抑圧も低頻度刺激により引き起こされることが示された。長期抑圧が起こるか長期増強が起こるかは細胞内 Ca イオンのレベルによるという仮説が提唱された。また長期抑圧へのフォスファターゼの関与を示す実験結果等も示された。小脳の長期抑圧についても Ca イオンが重要であることが報告されたほか，一酸化窒素の関与についての報告等がなされた。さらに小脳および大脳皮質において，長期増強が抑制性のシナプスでも起こることが示された。また分子生物学により得られた情報を使い，特定の伝達物質受容体の機能を特異的に阻害する抗体を作製した実験，特定の分子を欠損させたノックアウトマウスを長期増強の解析に用いた実験も紹介され，異なる分野の研究者の協力が有効であることが明らかになった。

(3) 複雑かつ精密な神経回路網がいかに形成されるかについての報告がなされた。神経回路形成には先天的に決まっている部分と神経系の活動に依存する部分が存在するが，各々が神経回路形成にどのように関わるかについての議論がなされた。また神経細胞がいかにして標的細胞に到達するかについて拡散性の物質やマトリクス上の物質の関与が考えられているが，それらが大脳皮質の回路形成や小脳核の投射線維においてどのように働くかについて培養標本やトレーサー物質の注入実験等が紹介された。再生については，脊髄の置き換え移植によっ

ても機能する神経系が再構築されうることが示され，中枢神経系にはかなりの再生能があることが明らかとなったが，網膜の神経節細胞を用いた実験により神経細胞種により再生能に差のあることも示された。

上記のように，シナプス伝達機構・シナプスおよび神経回路の可塑性の解析に様々な手法が用いられている現状が明らかになった。シナプスおよび神経回路網レベルの研究は個体レベルでの高次機能研究と分子生物的研究とを結び付ける領域であり，本シンポジウムにより両分野との協力により今後大きな成果の期待できる重要な課題が多数示唆された。

The 4th New Program Symposium
PLASTISITY OF SYNAPSE AND NEURAL NETWORKS IN THE BRAIN

January 26-28, 1994

Organizing committee: Ebashi, S., Ohmori, H., Toyama, K., Obata, K., Yamagishi, S., Hirano, T.

Opening remarks by Ebashi, S. (Okazaki National Research Institutes)

(1) Zucker, R. (UC, Berkeley) Calcium and short-term synaptic plasticity

(2) Tachibana, M. (Tokyo Univ.) Regulation of intracellular Ca^{2+} concentration and transmitter release in retinal bipolar cells

(3) Yawo, H. (Kyoto Univ.) Modulation of presynaptic calcium channels by neurotransmitters

(4) Ohno-Shosaku, T. (Kanazawa Univ.) Abilities of barium and strontium to trigger GABAergic and glutamatergic synaptic transmissions in rat cultured hippocampocampal neurons

(5) Augustine, G. (Duke Univ.) Molecular mechanisms of neurotransmitter secretion: Functional studies at the squid giant synapse

(6) Sugiyama, H. (Kyushu Univ.) Molecular and functional properties of metabotropic glutamate receptors in the brain

(7) Takahashi, T. (Tokyo Univ.) Presynaptic inhibition mediated by metabotropic glutamate receptor

(8) Poo, Mu-ming (Columbia Univ.) Plasticity of developing neuromuscular synapses and molecular mechanisms

(9) Kaneko, A. (Keio Univ.) Role of L-glutamate for formation of ON-and OFF-responses in the retina

(10) Ohmori, H. (Kyoto Univ.) Afferent and efferent synaptic transmissions inhair cell

(11) Williamson, R. (The Marine Lab. Plymouth) Efferent synapses in the cephalopod balance system

(12) Mayford, M. (Columbia Univ.) Ca^{2+} /Calmodulin dependent protein kinase II regulates the directionality of long-lasting synaptic changes produced by theta frequency stimulation

(13) Obata, K. (NIPS) Neuronal plasticity in the rat hippocampus after kainate-induced lesion

(14) Shibuki, K. (Niigata Univ.) Nitric oxide, an intercellular messenger in cerebellar synaptic plasticity

(15) Kano, H. (Jichi Med. Sch.) Long-lasting rebound potentiation of GABAergic inhibitory synaptic currents in cerebellar Purkinje cells

(16) Konnerth, A. (Univ. des Saarlandes) Calcium dynamics and synaptic plasticity in cerebellar Purkinje neurons

(17) Hirano, T. (Kyoto Univ.) Induction mechanism of long term depression in cultured Purkinje neurons

(18) Mulkey, R. (UCSF) The cellular mechanisms of hippocampal long-term depression

(19) Wyllie, D. (UCSF) Voltage pulse-induced potentiation of miniature EPSCs and AMPA responses in hippocampal CA1 neurons

(20) Komatsu, Y. (Kyoto Pref. Univ. of Medicine) Plasticity of inhibitory synaptic transmission in visual cortex

(21) Tsumoto, C. (Osaka Univ.) Mechanisms underlying the induction of long-term potentiation and depression in developing visual cortex

(22) Boltz, J. (INSERM) Development and plasticity of cortical organization

(23) Murakami, F. (Osaka Univ.) Outgrowth and path finding of cerebellar plate axons in the cat

(24) Yamamoto, N. (Kyoto Pref. Univ. of Medicine) Stop and branch signals for geniculate axonal extension

(25) Fukuda, Y. (Osaka Univ.) Axonal regeneration of cat's retinal ganglion cells by peripheral nerve transplant

(26) Kawaguchi, S. (Kyoto Univ.) Neural repairing of the point-to point projections in the mammalian central nervous system

Closing remarks by Hama, K. (Director-General, Natl. Inst. Physiol. Sci.)

【セミナー報告】

セ ミ ナ ー 報 告

〈生理研セミナー〉

1. The Role of Serotonin in the Peristaltic Reflex

Dr. Paul R. Wade (Department of Anatomy and Cell Biology College of Physicians & Surgeons of Columbia University New York)

(1993年4月7日)

The enteric nervous system (ENS) is a large division of the autonomic nervous system (a number of neurons approximately equivalent to that found in the spinal cord) that is responsible for the control and coordination of digestive functionas. These functions include absorption and secretion by the epithelium and the movement of contents within the lumen of the gastrointestinal tract. Peristalsis, the ordered propulsion of contents in the oral to aboral direction, is one type of movement that the ENS is responsible for regulating; in fact, the ENS can control this complex behavior of the gut in the absence of input from the CNS. This degree of autonomy indicates that the ENS contains all of the neuronal elements needed in a complete reflex arc: sensory cells, primary afferent neurons, interneurons and motor neurons (both excitatory and inhibitory). Although there are many neuroactive substances contained in the gastrointestinal epithelium and in the ENS, that are undoubtedly involved in the neural control of peristalsis, tha focus of this talk will be on only one such substance: serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT). Morphological, physiological and pharmacological evidence will be presented that suggests a critical role of 5-HT, in the initiation and propagation of the peristaltic reflex.

(担当：桑原厚和)

2. Regulation of electrolyte transport in the mammalian large intestine

Dr. Gerhard Rechkemmer (Niedersachsisches Institut fur Peptid-Forschung GmbH (IPF) Hannover Germany)

(1993年4月23日)

Electrolyte transport in the large intestine significantly contributes to overall electrolyte homeostasis in mammals. Electrolyte transport is well regulated, the mechanism, however, are not completely underestood. In Ussing-chamber experiments the basic mechanisms for Na, Cl, K and

SCFA (short-chain fatty acids) were examined. The involvement of intracellular calcium as a second-messenger for secretagogues was studied with a digital imaging system by measuring Fura-2 fluorescence signals in isolated colonic crypts. The regulation of ion channels involved in electrolyte secretion, particularly apical membrane chloride channels, were studied in T_{84} human colon tumor cells with patch-clamp technique.

(担当：桑原厚和)

3．共焦点顕微鏡および電子線トモグラフィー等を用いての3次元画像解析

Prof. Mark H. Ellisman (Department of Neurobiology, School of Medicine, University of California, San-Diego)

(1993年5月21日)

神経細胞の微細構造について，共焦点顕微鏡を用いた光学切片による立体再構築，連続超薄切片を用いた100kV電顕像からの立体再構築，さらに400kV高圧電顕を用いたトモグラフィー法による立体再構築を行った所見を示した。

特にIP3受容体及びryanodin結合タンパクに対する抗体による標識法を用い，細胞体，樹状突起，樹状突起刺等における小胞体の機能的な分布状態，相互関係等についての新しい所見を示した。

またこれらの画像処理のために演者らによって開発されたプログラム(SYNU)の説明および，その応用の結果得られたアニメーション像を用いて神経細胞内の小胞体，ミトコンドリア，微小管などの三次元的な配列の状態を，光学顕微鏡レベルから電子顕微鏡レベルまでズームアップして示し，また，アクチン細繊維に結合する各種タンパク質の立体配列，核膜孔などの立体構造を示した。

(担当：浜　　清，有井達夫)

4．胚性未分化細胞を用いた変異マウス作製による脳神経系の機能解析

八木　健（理化学研究所）

(1993年7月5日)

紹介　八木博士は，これまで理研においてマウスの個体レベルでの遺伝子操作を中心に技術開発に取り組まれ，多くの成果を挙げられました。この度，生理研に赴任されて，[個体レベルでの遺伝子操作の生理学研究への応用] と名づけたプロジェクトを中心となって遂行していただけることになりました。この機会にこの分野の最近の動向をも含めて話していただく機会をもうけ

ました。多数御参集下さい。

内容　記憶学習等の高次機能を有する哺乳動物の脳神経系を分子生物学的に解析するためには，何等かの方法でそれぞれの脳機能に関連する分子を特定する必要がある。この点では，突然変異体の原因遺伝子を追及する遺伝学的手法は極めて有効で，ショウジョウバエや線虫などでは多くの成果が挙げられている。しかし，高次脳機能を有する哺乳動物では，目的とした変異体を自由に得ることは難しかった。

この問題点に関して，マウス胚未分化細胞を用いた変異マウスの作製法の開発は，画期的な進展をもたらした。私は現在まで，この新しい技術の開発を手掛け，独自のマウス作製系を確立した。本セミナーでは，この技術の原理を解説し，その有用性と可能性について議論したい。また，現在までにこの方法で作製したFyn欠失マウス等を用いた脳神経系の形成過程と機能に関する解析結果についてもお話ししたい。

（担当：浜　　清）

5．アミロイド前駆体タンパク質の細胞内リン酸化と代謝制御

鈴木利治（Rockefeller 大学）

（1993年7月6日）

アルツハイマー病では正常に存在するアミロイド前駆体タンパク質(APP)の代謝が異常なため，アミロイドβタンパク質が産生して沈着すると考えられている。Greengardが提唱している「APPの代謝異常は細胞内タンパク質のリン酸化―脱リン酸化システムの異常にもとづく」という仮説の上に立って研究を進め，これに関与するAPPキナーゼの同定とcDNAクローニングを行ない，さらにAPPリン酸化のサイト同定と動態解析を行なった。

（担当：小幡邦彦）

6．ELONGATION FACTOR-2 (EF-2) のリン酸化によるタンパク質合成制御

三井健一 (The Rockefeller University)

（1993年7月23日）

EF-2は分子量100KDaで，56番目と58番目のスレオニンがリン酸化されるリン酸化タンパク質であり，その生理活性は，タンパク質合成系において，ペプチド鎖伸展中のtRNAがリボゾーム上のA-siteからP-siteへ転移する反応を触媒することである。EF-2のリン酸化は，それに特異的なリン酸化酵素であるCa^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase Ⅲ（CaM kinase Ⅲ）により起こり，リン酸化されたEF-2はその活性を失う。このセミナーでは，CaM kinase Ⅲの精製と

その性質についての最近の知見を述べ，さらに，培養細胞を用いた系で，細胞内 Ca^{2+} の変動によるタンパク質合成の変化が，EF-2 リン酸化を伴ったペプチド鎖伸展段階での制御を強く反映していることを示した実験結果を紹介した。

（担当：山肩葉子）

7. Electron Spin Transition Probability as a Second Dimension in EPR Spectroscopy

A. V. Astashkin *(Institute of Chemical Kinetics and Combustion, 630090 Novosibirsk, Russia)*

（1993年 8 月27日）

When studying c. w. EPR of some paramagnetic center, the first information one obtains is that about electron spin energy level splittings. This results directly from the positions of EPR transition lines. The line intensities are not so easily interpreted because they are contributed by a product of at least two static factors: by electron spin transition probability and by a statistic weight of the transition. There are no simple ways to discriminate these two factors by c. w. EPR. On the other hand, pulsed methods allow one to measure electron spin transition probability directly. Being added as a second dimension (first dimension is H_0) to the usual EPR spectrum it allows one to enhance a spectrum resolution and adds to the understanding of the studied system providing an information about anisotropic hfi or g-factor anisotropy or electron spin number.

In this lecture some methods for measuring EPR transition probabilities are discussed and experimental results for oriented and disordered samples of organic radicals and transition metal ions are presented.

（担当：亘　　弘）

8. Gap Junction Channel and Tumor Cell Invasion.

Prof. Dieter F. Hülser (Department of Biophysics, Biology Institute, University of Stüttgart)

（1993年 9 月 1 日）

Hülser 教授は，電子顕微鏡的及び電気生理学的手法を駆使して，動物細胞の cell-to-cell communication を担うギャップジャンクションについて研究してきました。今回は異なった connexin を発現させた腫瘍細胞における gap junction channel の性質とこれら腫瘍細胞の転移能との関係

についての最新の研究結果について興味深いお話をしていただいた。

（担当：岡田泰伸）

9．Anatomical constraints on extracranial field patterns

Prof. Lloyd Kaufman (New York University)

（1993年10月14日）

MEGによりヒトの高次機能を計測する方法のひとつとして，Kaufman博士は自発性の脳磁界，とくにアルファ波帯の活動をプローブとして計測，解析することを提案している。後頭部の視覚皮質にアルファ波の活動源があり，それらは十字形でモデル化される脳溝（鳥距溝）内の活動であると仮定し，計算機シミュレーションにより後頭部に生じる脳磁界パワー分布を示した。計測したアルファパワーとそれらの分布から精神的課題遂行に関連した皮質活動部位を推定できるとしている。さらに，メロディーの短期記憶課題を与えて左右の聴覚皮質付近のアルファ波活動を計測した例を示し，同時計測した反応時間との対応から聴覚皮質の特徴的な活動を推定している。

（担当：栗城，南部）

10. ACTUAL PROBLEMS OF ACETYLCHOLINE CYTOCHEMISTRY IN THE NERVOUS TISSUES

Dr. Shigeru Tsuji (Inst. Neurosci. (CNRS), Univ. P. et M. Curie, Paris)

（1993年10月15日）

Acetylcholine (ACh) is a most well known classical neurotransmitter. However, even in a modern text book of cytochemistry you will not find a method for ACh localization. Indeed, ACh is a highly soluble cation and difficult to be fixed. Since ten years ago, we proposed a cytochemical method for ultrastructural localization of ACh (ACh-like cation) in the nervous tissue. The specificity of the method was confirmed in vitro experiments. Co-localizations of ACh and neuropeptides were performed in the enteric nervous system. Recently, this method was applied, in both nerve terminal and neural cell body, for electron microscopic radioautography of (3H)-choline or its soluble derivatives, such as (3H)-ACh. Because of lack of efficient fixation method, the radioautography of tritiated choline was considered until now impossible. Finally, this method was successfully used to distinguish two types of afferent nerve terminals, cholinergic and non-cholinergic (probably GABAergic) ones, the both situated side by side, on the dopaminergic neurons of the substantia nigra of control and parkinsonien subjects.

(担当：桑原厚和)

11. Ca^{2+} effects on Na channel gating depend on $[Na^+]$

Clay M. Armstrong (Department of Physiology, University of Pennsylvania)

(1993年10月21日)

We investigated the effects of sodium and calcium ions on Na channel gating kinetics in squid giant axons. by varying $[Na^+]$ at constant $[Ca^{2+}]$, or the reverse.

Axons were perfused internally with N-methyl-glucamin-glutamate and fluoride. and packed in Na^+ Ca^{2+} Tris + solutions. Series resistance compensation was employed. Increasing $[Na^+]$ from 50 to 400mM shifted the closing-rate vs Vm curve to the left by 23mV in 15 Ca. but by only 6mV in 100 Ca: i. e., high $[Na^+]$ slowed closing, most strongly in 15 Ca. Increasing $[Na^+]$ from 150 to 400mM in 50 Ca caused a small (approximately 7mV) left shift of the g-v curve: higher $[Na^+]$ appears to facilitate opening. Turning to $[Ca^{2+}]$ from 15 to 100mM shifted the closing rate curve 9mV to the right in 50 Na, and 20mV or more to the right in 400 Na. Gating current measured in 0 Na was virtually unaffected by Ca variations.

These results suggest that a competition between Na and Ca for a gating site is involved in at least some of the effects of Ca. since Ca variations have little influence when Na is absent or present only at low concentration.

(担当：浜　　清)

12. Location of key componests of junctions between surface membranet tubules and sarcoplasmic reticulum in muscle fibres

Clara Franxini-Armstrong (Department of Cell and Developmental Biology. University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, U. S. A.)

(1993年10月21日)

Feet and tetrads are major structural components of the junctional domains of sarcoplasmic reticulum (SR) and transverse (T) tubules of skeletal muscle fibres respectively. They are located in close apposition to each other at SR-T junctions. The four components of a tetrad face the centre of the four subunits of the feet.

Feet have been identified with the cytoplasmic domains of ryanodine receptors (RR), the large macromolecules which constitute the SR calcium release channels. The hypothesis that tetrads are

composed of four dihydropyridine receptors (DHPRs) is strongly spported by lack of tetrads in muscle fibres from DHPR-defective dysgenic mice and by the reappearance of tetrads in cultured dysgenic cells trans fected with cDNA for skeletal DHPRs (collaboration with L. Bennett. T. Tanabe and K. Beam). The location of DHPRs is appropriate for an interaction with the feet via a direct molecular link (mechanical hypothesis of e-c coupling. (Schneider and Chandler, 1973). Transfection of CHO cells with RR and DHPRs does not result in the formation of junctions, indicating that some component in addition to feet and DHPRs may be needed for assembly of T-SR junctions (in collaboration with H. Takeshima et al.). In cardiac muscle of chicken and in muscles of arthropods, junctional proteins of the T and surface membrane are not grouped in tetrads and do not seem to bear a precise relationship to the feet.

(担当：浜　　清)

13. TGF-β Receptors and Signal Transduction

宮園浩平

(1993年10月29日)

TGF-βは，血管新生をはじめとする形態形成の制御因子としてきわめて重要であるが，その作用機序を明らかにするためには，レセプターを同定する必要がある。PCR法を用いてこのレセプターの同定に世界で初めて成功した。

(担当：月田承一郎)

14. Growth Factors and Cell Adhesion in Morphogenesis

Jean Paul Thiery (Laboratory of Physiopathology, CNRS, France)

(1993年11月4日)

EGFなどの成長因子は，カドヘリンを介した細胞接着に影響を与え，上皮の形態形成にとって重要な因子となりうることが明らかになった。このメカニズムは，形態形成のみならず，癌の浸潤の機構を考える上でも重要である。

(担当：月田承一郎)

15. Autocrine Control of Mammary Development and Milk Secretion

Dr. C. J. Wilde (Hannah Research Institute, Ayr, Scotland)

(1993年11月17日)

Frequency or completeness of milk removal from the lactating mammary gland regulates the rate of milk secretion by a mechanism which is local, chemical and inhibitory in nature. Screening of caprine, bovine and human milk proteins in rabbit mammary explant cultures has identified a single whey protein able to inhibit synthesis of milk constituents. The active goat whey protein, which we term FIL (Feedback Inhibitor of Lactation) is synthesized by the epithelial cells of the lactating gland, and is secreted into milk, from where it exerts acute concentration-dependent inhibition on the rate of milk secretion. FIL appears to exert this effect by a novel mechanism, in that it blocks constitutive secretion of milk constituents during their passage to the trans-Golgi region. Indeed, it now appears that exocytotic secretion of milk proteins, far from being a constitutive process as previously thought, may be regulated by a balance between stimulatory factors, which act by increasing intracellular free calcium, and inhibition of calcium-independent secretion by this novel milk protein. Regulation of intracellular membrane trafficking by FIL may also cause re-distribution of mammary hormone receptors, and thereby exert longer-term effects on mammary development. FIL has been shown to down-regulate prolactin receptors *in vivo* and *in vitro*, and this may account for its ability to decrease mammary epithelial cell differentiation in both situations.

(担当：古家喜四夫)

16. Regulation of intracellular pH in colonic epithelial cells

S. L. Abrahamse (Lower Saxony Institute for Peptide Research, Hannover, Germany)

(1994年1月26日)

In all cells, intracellular pH (pH_i) is regulated within a narrow range and maintained above its electrochemical equilibrium. An ubiquitous mechanism for H^+ secretion is the (Na^+ -H^+)-exchanger (NHE). In addition to NHE, the plasma membrane of colonic epithelial cells also contains a vacuolar type H^+ -ATPase and an (H^+ -K^+)-ATPase. Therefore we wanted to study the contribution of these H^+ secretory mechanisms to the regulation of pH_i in colonic epithelial cells.

To this end, we measured pH_i in monolayers of the human colon carcinoma cell line Caco-2 and in single cells within isolated colonic crypts from rabbit distal colon, using the pH sensitive dye 2', 7'-bis (carboxyethyl)-carboxyfluorescein (BCECF). Involvement of H^+ secretory mechanisms in

pH_i regulation, was studied by measuring their contribution to pH_i recovery after acid loading with NH_4^+ /NH_3 in the absence of HCO_3^-.

In monolayers of Caco-2 cells, both NHE and (H^+ -K^+)-ATPase contribute to the recovery of pH_i after an acid load. NHE activity decreases on prolonged cell culture, when proliferation decreases and differentiation commences, whereas (H^+ -K^+)-ATPase mediated pH_i recovery remains constant. Recovery of pH_i in colonic crypt cells from rabbit distal colon, is largely Na^+ -dependent and ethylisopropylamiloride-sensitive. Na^+ -insensitive pH_i recovery could not be blocked by inhibitors of the (H^+ -K^+)-ATPase or the H^+ -ATPase, SCH 28080 and bafilomycin A_1 respectively. NHE activity and pH_i were identical in all cells within a crypt. In contrast, intrinsic intracellular buffering capacity was significantly lower in cells within the lower two-fifths when compared to cells within the upper parts.

(担当：桑原厚和)

17. Femtomole protein sequencing; Gas chromatography / mass spectrometric-detection of amino acid 5-acetoxy-2-phenylthiazoles

M. L. Stolowitz (NSF Center for Molecular Biotechnology, Beckman Institute, California Institute for Techonology, Pasadena, CA, USA)

(1994年 3 月16日)

Isobutane chemical ionization mass spectrometric detection of 5-acetoxy-2-phenyl-thiazoles is compatible with the protein sequencing protocol described in protocol 1. Although thiobenzoylation with *S*-(thiobenzoyl) thioglycolic acid is included, alternative reagents offering improved reactivity have been described (Inman and Appella, 1986). Additionally, the experience of a decade of improvements in the field of peptide synthesis have not yet been applied to this development. Dithioesters, as a group, are only reactive in solvents of high polarity. Consequently, the pursuit of this method will require the adoption of solid-phase sequencing approaches. Appropriate instrumentation developed in our laboratory has recently been described elsewhere (Stolowitz and Hood, 1993). Cleavage of *N*-thiobenzoylpeptides occurs under conditions which are mild as compared to the Edman degradation. Although 2-phenyl-5 (4*H*)-thiazolones are volatile, they elute from the gas chromatography column at temperatures above 175℃ . Consequently, gas phase cleavage with trifluoroacetic acid vapor can be utilized without fear of evaporative losses. This is not the case in the related thioacetylation method (Strowitz *et al.*, 1989).

The tautomeric equilibrium involving the 2-phenyl-5 (4*H*)-thiazolone and 5-hydroxy-2-phenylthiazole is sensitive to solvent polarity and efficient derivatization of the enol form is achieved

only in polar solvents. We have found acetonitrile to be the solvent of choice in this instance. Acetylation of 5-hydroxy-2-phenylthiazoles proceeds rapidly at room temperature and affords volatile acetoxythiazoles for all twenty amino acids.

Having now prepared at least 100 mg quantities of each of the required analytical standards and properly characterized them with regard to stability, structure and detection limits, our attention is now directed toward the optimization of an interface which will allow us to place our newly developed solid-phase protein sequencer on-line to the mass spectrometer. We are hopeful that we will begin routine operation of a fully automated system in the not too distant future.

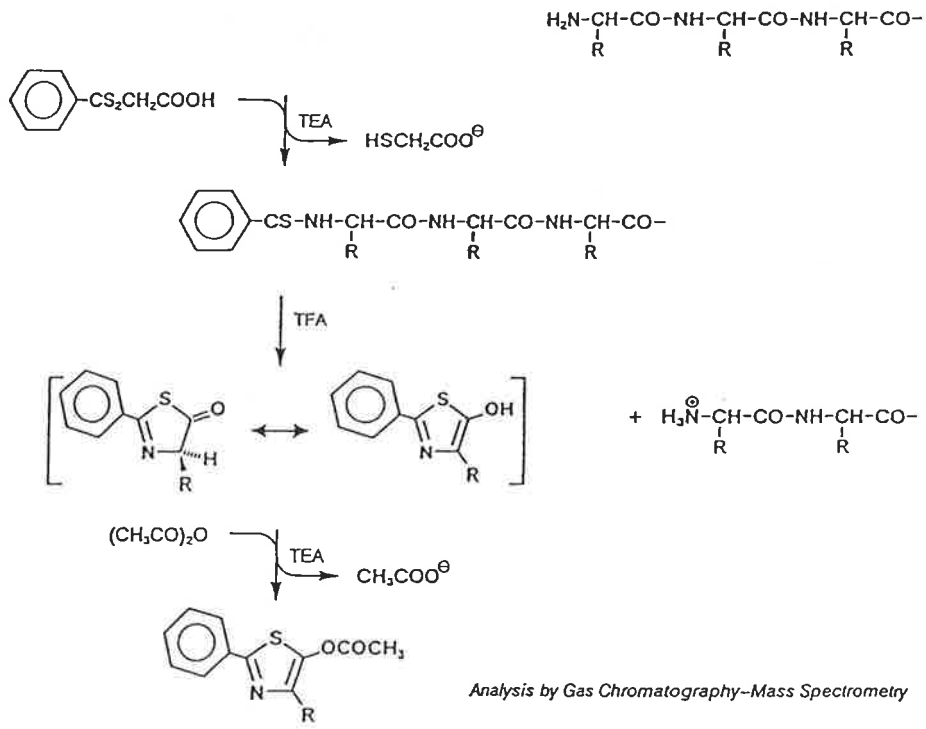


Figure1. Thiobenzoylation method of protein microsequencing. Thiobenzoylation of the *N*-terminal amino acid is effected by reaction with *S*-(thiobenzoyl) thioglycolic acid. The reaction is catalyzed by an aqueous solution of tertiary amine. Cleavage occurs under mild condition to afford the 2-phenyl-5 (4*H*)-thiazolone, which exists in a tautomeric equilibrium with the 5-hydroxy-2-phenythiazole. Acetylation of the tautomeric mixture with acetic anhydride and triethylamine affords the 5-acetoxy-2-phenylthiazole, which is suitable for analysis by GC/MS at or below the 10 femtomole level.

Inman, J. K. and Appella, E., 1986 Newer methods of solid- and liquid-phase sequence determination-personal views, *in*: Practical Protein Chemistry-A Handbook, Darbre, A. ed., Wiley.

Stolowitz, M. and Hood, L., 1993 Single syringe-pump solid-phase protein sequencer, *in*: Techniques in Protein Chemistry Ⅳ, Angeletti, R. H. ed., Academic Press.

Stolowitz, M. L., Paape, B. A. and Dixit, V. M., 1989 Thioacetylation method of protein sequencing: derivatization of 2-methyl-5 (4*H*)-thiazolones for high-performance liquid chromatographic detection, *Anal. Biochem.* 181: 113.

(担当：村上政隆)

18. Muscle Z-line: Protein composition, structure, functions, and Z-line-related muscle disorders

Dr. M. Yamaguchi (College of Veterinary Medicine, The Ohio State University, USA)

(1994年 3 月22日)

Striated muscle, which includes skeletal and cardiac muscle, is distinguishable from smooth muscle on the basis of its striped appearance under the microscpe. Skeletal muscle consists of bundles of fibers. Fibers vary greatly in size, and each contains approximately one thousand myofibrils.

Within myofibrils, repeating units called sarcomeres extend between the electron-dense Z-lines. In longitudinal section the sarcomere shows a central protein-dense region, the A-band. Between A-bands isotropic I-bands are found, each with a Z-line at the center.

The Z-line, besides defining sarcomere length, is of interest because of its dual properties: it is the muscle structure most resistant to physical forces but most susceptible to proteases. Thus, it is the initial target during muscle degradation and ptotein turnover.

The molecular architecture of the Z-line has been extensively studied, and conflicting structural views have been reported.

Anomalous Z-line structures, including rod bodies, are associated with many diseases including nemaline myopathy, chronic alcoholism, schizophrenia. Anomalous Z-lines also occur in aging cardiac muscle and rheumatic heart disease and can be induced through tenotomy and through injection of neostigmine methyl sulfate, which inhibits cholinesterase. How closely these structures are related to Z-lines is debated, but several recent studies suggest the basic backbone structure of the rod bodies is very similar if not identical to what would be seen if lateral Z-line polymers were formed.

Our recent study suggested that tropomyosin and even troponin are structural constituents of Z-lines.

As a function of Z-line, it's extremely important for the force transmission during muscle contraction.

(担当：桑原厚和)

19. カドヘリンスーパーファミリーの最近の話題

鈴木信太郎 (Doheny Eye Institute University of Southem California School of Medicine)

(1994年3月25日)

PCR 法を駆使することにより，多くの型の新しいカドヘリンを同定することができた。また，従来のカドヘリンと構造上の特徴がことなる新しい一群のカドヘリン様蛋白質の同定にも成功し，プロトカドヘリンと名付けた。

(担当：月田承一郎)

〈昼食セミナー〉

1．“グリア細胞分化におけるミエリンプロテオリピド蛋白質 (PLP) 遺伝子の役割”

鹿川哲史

(1993年 9 月13日)

神経系の高次機能発現は，各々特異に分化した多種類の細胞によって支えられている。我々はこのうちオリゴデンドロサイトの分化に興味を持っている。この細胞は，ミエリンという風変わりで，神経系のみに見られる構造物を形成する。オリゴデンドロサイトの分化異常を示す突然変異動物の解析やトランスジェニックマウスの系を用いて，ミエリンプロテオリピド蛋白質 (PLP) が，オリゴデンドロサイトの分化に深く関与していることが明らかになってきた。

2．“事象関連電位—ヒトの高次脳機能の非侵襲的検索—”

柿木隆介

(1993年 9 月27日)

脳波活動の解析によるヒトの高次脳機能の非侵襲的検索は，1960年代より開始され，科学技術の進歩にともない，近年急速な進歩を遂げている。CNV, P300 など多様な「事象関連電位」を紹介し，それらの意義付けについてわかりやすく解説したい。

3．“高解像度磁束計を用いた IN VITRO 標本からの磁場計測”

久寶真一

(1993年10月 4 日)

脳磁束計は非侵襲でヒトの脳機能を測定する有効な手段であるが，脳磁図の生理学的基礎は未だ充分に解明されたとはいえない。従来の磁束計は動物を使った基礎研究をするには大きすぎ解像力もよくなかった。高解像度磁束計 (μSQUID) は，動物実験用に設計されており従来の磁束計の100倍の感度を持つ。高解像度磁束計を用いてモルモット海馬切片とヒヨコ網膜から磁場計測を行ったので，その成果を報告する。

4．“随意運動の発現機序　サルの大脳小脳連関”

達本　徹

（1993年10月25日）

「運動開始時に，大脳皮質運動野は小脳からの入力で活性化される。」この仮説を検証するために，運動課題遂行中のサルの小脳を一時的に冷却し，その際の大脳皮質フィールド電位と反応時間の変化を解析した。

5．“抗心筋抗体による非選択的陽イオンチャネルの活性化”

富永真琴

（1993年11月１日）

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+}濃度に対する効果を検討したので心筋炎における細胞障害と関連づけて報告する。

6．“ナトリウム・グルコース共輸送体のアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた電気生理学的研究”

挾間章博

（1993年11月22日）

クローニングされたナトリウム・グルコース共輸送体をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ２本刺膜電位固定法を用いて電気生理学的実験を行った。その結果，グルコースの非存在下で voltage jump に応じて pre-steady state current が観察された。この電流発生のメカニズムを考察する。

7．“システムとしての神経回路網の解析”
—細胞内・外膜電位の記録と微小化学刺激—

森　茂美

（1993年12月13日）

行動の発現機序を解析する一つの方法として，その行動発現にかかわる神経回路網を同定する試みがある。免疫組織化学的解析法を微小電気生理学的解析法や微小化学的刺激法などと並行し

て用いることにより，神経回路網の作動様式を行動の制御機序と対応させて理解することも可能になりつつある。動物行動の最も基本となる”立つ””歩く”動作を例に挙げて，システムとしての神経回路網の作動様式を解説する。

8．“遺伝子から脳の機能が解明されるのか？”

八木　健

（1994年1月17日）

我々は発生工学的手法を用いてマウスの遺伝子座をある程度自由に変換する技術を確立してきました。この技術によりある特定の（例えば記憶・学習に関係していると思われる）遺伝子座に変異を導入することによりその遺伝子産物の全くできないマウス個体を作成することができるようになりました。現在，この技術は世界的に注目を浴び今まで解析が困難であった個体レベルでの脳神経系の解析についても盛んに研究が行われつつあります。我が研究室ではこの手法を用いて記憶・学習などの今まで遺伝子からはアプローチできなかった脳神経系の機能を分子レベルで解明することを目標に研究を進めているところです。

9．“ERMファミリーの機能と構造について”

佐藤成樹

（1994年1月24日）

アクチン分子はミオシン分子と協同して，筋収縮をはじめ多くの細胞運動に関与している。このようなアクチン分子に基づいた細胞運動や，細胞形態の維持にはアクチンフィラメントと細胞膜の結合が極めて重要であると考えられている。ERMファミリーはアクチンフィラメントと細胞膜の結合に重要と思われる蛋白質群である。今回の昼食セミナーは博士課程で研究してきたこのERMファミリーについて報告した。

10．“アルツハイマー病の分子生物学”

丸山　敬

（1994年2月21日）

痴呆の原因の一つであるアルツハイマー病では，β/A4蛋白質の異常な蓄積による神経変性が病因として提唱されている。アミノ酸42個のβ/A4はアミノ酸700個程度の前駆体(APP)に由来

し，このAPPの代謝過程に関心が集まっている。培養細胞での変異APPcDNA導入による代謝の研究を報告し，今後の研究の方向性を議論した。

11.“単離嗅細胞にパッチクランプ法を適用して解析した匂い情報変換の分子機構”

倉橋　隆

（1994年3月14日）

嗅細胞は，匂い分子をキャッチすると脱分極性の受容器電位を発生する。本セミナーでは，これまで本研究室で得られた実験結果をもとに匂い情報変換機構を総論的に発表する。おおよその分子機構は以下のようである。すなわち，匂い分子は，嗅絨毛に局在する受容蛋白質に結合し，アデニル酸シクラーゼを活性化する。それによって産生された細胞内cAMPが直接陽イオンチャネルを活性化する。このチャネルを通り細胞内に流入したCaが陰イオンチャネルを活性化する。また，ペン大（モネル研）のDr. Gold及びDr. Loweとの共同研究によって，最近，匂い分子によっては，この系を抑制するものがあることが明らかとなった。この新知見によって，長い間謎とされてきた嗅細胞の匂い応答の不可解な時間依存性（刺激off時応答，0.5秒もの長い潜時）を説明することができた。また，この応答抑制機構が，心理学的に知られるマスキング（消臭）の現象を嗅細胞レベルで説明するものであるかもしれない。

生理学研究所年報　第15巻

発　　行　1994年12月26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