岡崎国立共同研究機構

生理学研究所年報

第 19 巻



1998

はじめに

平成９年度の生理学研究所年報をお届けします。

行財政改革が進められ，省庁再編統合が計画されています。大学共同研究機構の研究所でも校費，装置維持費などがカットされ，研究所の研究・教育活動と運営に困難さを増してきました。それでも，社会一般から見れば，保証された優雅な営みに見えるかもしれません。しかし，いわゆるバブルの狂騒時代には，同じ研究所が冴えない地味な存在に見えたようでした。

研究者にも色々なタイプがあり，また実際に多様性が必要に思われます。時代の流行に乗り，タイムリーな論文（またはバブル論文）を次々と出す者，自分の興味に従って自分のアイデアによって，独自の研究（時に唯我独尊的研究）を続ける人，それら両極端の間にある多くの各種中間型など，異なったやり方で努力することが学問の進展に大切なのでしょう。それぞれ各自の方針または信念で心身こめて研究している人達に，ある程度の競争原理は適用しつつ，適当な研究費と場所が与えられることは文明先進国の一要件と考えられます。

この生理学研究所年報も，その一要件を示す指標であり続けて欲しいと強く希望します。

平成10年９月

佐々木　和夫

主な職員（1997年度）

所　　長　佐々木　和　夫（1997．4．1～）

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
助　　手	児島伸彦
〃	山肩葉子
〃	淺田英穂（～1997．5.31）
ﾘｻｰﾁ･ｱｼｽﾀﾝﾄ	石橋英俊（1997.5.31～1998.3.31）
外国人研究員	STORK, Oliver（1997.11.6～1998.3.31）
特別協力研究員	STORK, Simone（1997.11．6～）
大学院学生	久米秀明
〃	篠崎幸喜
〃	季　鳳雲

細胞内代謝研究部門

客員教授	宮崎俊一
客員助教授	矢田俊彦
助　　手	毛利達磨
特別研究員	出口竜作（1997.4.1～1998.3.31）
大学院学生	松川　浩

超微小形態生理研究部門

教　　授	永山國昭
助 教 授	村上政隆
〃	村田昌之
助　　手	東　晃史
〃	石川　透
〃	大橋正人
〃	高橋卓也（1997.10．1～）
非常勤研究員	足立栄希（～1997.10.17）
特別協力研究員	鍵和田聡（1997.4.1～1998.3.31）
〃	菱田竜一（1997.4.1～1998.3.31）
大学院学生	近藤明子
〃	森　誠之
特別共同利用研究員	石堂美和子（1997．4．1～）
〃	岩下　潤（1997.10．1～）
〃	魚住拓也（1997.10．1～）
〃	小田原成優（1997.10．1～）
〃	杉谷正三（1997.10．1～）
〃	杉浦淳之介（1997.10.1～1998.3.31）
〃	水野聡紀（1997.10.1～1998.3.31）

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（～1997．4．1）
〃	筒井泉雄
ﾘｻｰﾁ･ｱｼｽﾀﾝﾄ	中野春男（1997.6.1～1998.3.31）
外国人研究員	XU, Ke（1997.5.26～1997.8.31）
特別協力研究員	MEI, Zhen-Tong（1997.5.25～1997.9.5）
〃	MA, Xiaofeng（1997.5.25～1997.9.5）

能動輸送研究部門

客員教授	中西重忠
助　　手	中嶋善明（1997．4．1～）

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
〃	挾間章博
〃	富永真琴
〃	森島繁
非常勤研究員	謝安 (1997. 5. 1～)
〃	三好毅志
外国人研究員	SABIROV, Ravshan Zairovich (～1997. 5.28)
〃	ZHOU, Shi-Sheng (1997.6.4～1997.9.4)
特別協力研究員	林誠治 (1997.4.1～1998.3.31)
〃	上坂敏弘 (1997.4.1～1998.3.31)
〃	AZIMOV, Rustam Rashidovich (1997.10.1～1997.12.31)
〃	周士勝 (1997.10. 1～)
大学院学生	清水貴浩
〃	范海天
〃	劉艶
特別共同利用研究員	伊東武志 (1997.4.1～1998.3.31)

生体情報研究系

神経情報研究部門

教授	池中一裕
助教授	八木健 (1997. 4. 1～)
助手	中平健祐
〃	鹿川哲史
〃	馬場広子
非常勤研究員	南木浩二 (1997.4.1～1998.3.31)
〃	若園佳彦 (1997.11.9～1998.3.31)
リサーチ・アシスタント	若園佳彦 (1997.6.1～1997.9.30)
〃	IVANOVA, Anna (1997.10.1～1998.3.31)
〃	熊田竜郎 (1997.6.1～1998.3.31)
招聘外国人研究員	MENON, Krishna K (1997. 4. 1～)
〃	ESPINOSA, Araceli. (1997.4.1～1997.5.30)
特別研究員	安田利栄 (1997. 4. 1～)
大学院学生	若園佳彦 (～1997. 9.30)
〃	IVANOVA, Anna (～1998. 3.31)
〃	熊田竜郎 (～1998. 3.31)
〃	和田圭樹
〃	柴田理一
特別共同利用研究員	山田斉 (～1997. 9.30)
〃	奥村俊一郎 (～1998. 3.31)
〃	米増知子 (～1998. 3.31)
〃	佐々木学 (1997. 4. 1～)
〃	大竹洋介 (1997. 4. 1～)
受託研究員	岩崎靖乃

液性情報研究部門

教授	井本敬二
助教授	森泰生
助手	中井淳一
〃	若森実
リサーチ・アソシエイト	山崎由紀子 (1997. 4. 1～)
特別協力研究員	清水俊一 (1997.4.1～1998.3.31)
大学院学生	岡田峯陽
特別共同利用研究員	松山善次郎 (1997.8.1～1998.3.31)
	松野平宏史

高次神経機構研究部門

客員教授	三品昌美
客員助教授	千坂修
助手	藤本一朗
特別協力研究員	安田昌弘 (1997.4.1～1998.3.31)
大学院学生	武藤哲司
〃	先崎浩次
受託研究員	谷口雅彦
〃	須藤文和
〃	杉野英彦
〃	浜田俊

生体調節研究系

情報記憶研究部門

客員教授	金子章道 (～1998. 3.31)
客員助教授	倉橋隆 (1997.4.1～1998.3.31)
助手	河合房夫 (1997. 4. 1～)

高次神経性調節研究部門

教授	小松英彦
助教授	伊藤南 (1998. 1. 1～)
助手	花澤明俊
特別協力研究員	村上郁也 (1997.4.1～1997.8.31)
〃	SHENOY, Krishna V
大学院学生	近藤秀樹
〃	杉原弘記
〃	安田利栄
〃	浜田香世子
〃	三寶千秋

生体システム研究部門

教授	森茂美
客員教授	SEARS, Thomas A (1997.1.10～1997.4.20)
〃	浅沼宏 (1997.4.15～1997.6.5)
助教授	松山清治
助手	宮下英三
〃	中隣克己
〃	森大志 (1997.10. 1～)
非常勤研究員	松井利浩 (～1998. 3.31)
外国人研究員	KEKESI, Katalin (～1997.10.10)
〃	CZARKOWSKA-BAUCH, Julita (1997.9.11～1998.1.23)

高次液性調節研究部門

客員教授	宮下保司
客員助教授	櫻井芳雄 (1997.12. 1～)
助手	納家勇治
特別研究協力員	吉田正俊
〃	柴田愁子 (1997. 4. 1～)
特別協力研究員	伊藤壽一
〃	浅野目充
〃	小倉光博
大学院学生	奥村哲
特別共同利用研究員	久世文也 (1997.10. 1～)

統合生理研究施設

感覚・運動機能研究プロジェクト

教授	柿木隆介
助教授	金桶吉起
助手	小山幸子
〃	寶珠山稔
〃	中大輔
非常勤研究員	鈴木啓之 (1997. 4. 1～)
〃	大草知裕 (1997.4.1～1998.3.31)
ﾘｻｰﾁ･ｱｿｼｴｲﾄ	渡邊昌子 (1997. 4. 1～)
外国人研究員	ALSTERMARK, Bror Lars Erik (1997.9.1～1997.11.30)
〃	ARENDT-NIELSEN, Lars (1998. 1.25～)
外国人研究員	TAYLOR, Margot Jane (1998. 1.10～)
特別協力研究員	山崎浩 (1997.6.1～1998.3.31)
大学院学生	下条素子
〃	渡邉昌子
〃	向敬
〃	LAM Khanh
特別共同利用研究員	大岩昌子 (1997.4.1～1998.3.31)
〃	小池佑辰 (1997.4.1～1998.3.31)
〃	関口貴裕 (1997.4.1～1998.3.31)
〃	前田多章 (1997.4. 1～)
〃	川上治 (1997.10. 1～)
受託研究員	倉片憲治 (1998.1.25～1998.2.7)

高次脳機能研究プロジェクト

教授	伊佐　正	助手	斎藤康彦
客員教授	SABIROV, Ravshan Zairovich	助手	相澤　寛
		大学院学生	近藤利郎

自律機能研究プロジェクト

客員教授	橋本　勲	(1997. 4. 1～)
助手	福島達臣	(1997. 4. 1～)

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	今野　卓

電子計算機室

助手	石井宏幸

動物実験施設

助教授	尾崎　毅	
特別協力研究員	WEI Mu-xin	(1997.2.14～1997.5.6)
〃	CEREGRZYN, Michal	(～1997. 5.28)
〃	WANG, You-xue	(1997.12.15～)
特別共同利用研究員	吉川俊之	(～1998. 3.31)
〃	中島守夫	(1997.4.1～1998.3.31)

技術課

課長	大庭明生	(1997. 4. 1～)

研究系技術班

分子生理研究系技術係

技術主任	大河原　浩
技官	高木正浩
〃	葛目博子
〃	神原叙子
〃	中隣ゆかり (～1998. 1. 1)

細胞器官研究系技術係

係長	小原正裕	
技官	池田晃子	(～1998. 2.28)
〃	佐藤茂基	
技官	神谷絵美	
〃	山本友美	

生体情報研究系技術係

技官	水谷(秋田)裕美
〃	齊藤久美子
〃	関口直美
〃	三寶　誠

生体調節研究系技術係

係長	伊藤昭光
技官	戸川森雄
〃	吉友美樹
〃	森　将浩
〃	高須千慈子

生理機能技術係

係長	市川　修
技術主任	山口　登
〃	伊藤嘉邦
技官	吉村伸明
〃	高橋直樹
〃	村田安永

統合生理技術係

技術主任	瀬尾　道 (～1998．3.31)
〃	永田　治
技官	竹島康行
〃	鈴木千香 (1998．2．1～)

動物実験技術係

技術主任	佐治俊幸
技官	小木曽　昇
〃	廣江　猛

電子顕微鏡技術係

係長	前橋　寛

工作技術係

係長	加藤勝己

研究支援推進員	村瀬伸江
〃	伊藤磯子 (1997．4.14～)
〃	小山田順子 (1997.4.14～1997.6.10)
〃	山本淳子 (1997．4.14～)
〃	村田実千代 (1997.4.21～1997.9.30)
〃	柿木理恵子 (1997.5.1～1998.3.31)
〃	深津恵子 (1997．6．1～)
〃	藤田喜美子 (1997.6.1～1998.3.31)
〃	成瀬雅子 (1997.10．1～)
〃	土屋勝代 (1997.10．1～)

1997年度　生理学研究所年報

目　　次

はじめに

主な職員（1997年度）

研究活動報告

分子生理研究系 …… 10
細胞器官研究系 …… 19
生体情報研究系 …… 25
生体調節研究系 …… 36
統合生理研究施設 …… 46
生理機能研究施設 …… 52
動物実験施設 …… 61
技術課 …… 65

研究発表

発表論文 …… 84
学会発表 …… 113

一般共同研究報告 …… 147

計画共同研究報告 …… 178

磁気共鳴装置共同利用実験報告 …… 186

超高圧電子顕微鏡共同利用実験報告 …… 210

生体磁気計測装置共同利用実験報告 …… 246

研究会報告 …… 259

国際シンポジウム

COE国際シンポジウム …… 453

セミナー報告

生理研セミナー …… 467
昼食セミナー …… 475

【研究活動報告】

分子生理研究系

神経化学研究部門 …… 10

概　要

グルタミン酸脱炭酸酵素 GAD 遺伝子ノックアウトマウスによる神経系，非神経系における GABA の役割の研究

（小幡邦彦，淺田英穂，季　鳳雲，丸山　敬）

アルツハイマー病の分子生物学

（丸山　敬，篠崎幸喜，久米秀明）

神経可塑性に関与する遺伝子の検索

（丸山　敬，久米秀明，篠崎幸喜）

神経活動と Ca^{2+}／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼⅡ

（山肩葉子，小幡邦彦）

Fyn 過剰発現による NMDA 受容体サブユニット 2B チロシンリン酸化の亢進と情動行動に及ぼす影響

（児島伸彦，石橋英俊，小幡邦彦）

超微小形態生理研究部門 …… 12

概　要

細胞極性形成と細胞内オルガネラのトポバイオジェネシス

（村田昌之，加納ふみ，魚住拓也，永山國昭）

エンドサイトーシス経路のプロセシングに障害のある変異細胞株の樹立と解析

（大橋正人，石堂美和子，村田昌之，永山國昭，山本章嗣）

分子動力学シミュレーションと巨視的誘導体モデルを用いた蛋白質の構造安定性及び誘電応答

（高橋卓也，杉浦淳之介，永山國昭）

唾液腺の水分泌における Cl 輸送と重炭酸輸送の役割

（村上政隆，大河原浩，高木正浩）

細胞内代謝研究部門 …… 15

概　要

精子－卵融合時の卵内局所的 Ca^{2+} 増加反応

（毛利達磨，池上　晋，宮崎俊一）

精子の卵活性化蛋白質の作用部位

（毛利達磨，出口竜作，尾田正二，宮崎俊一）

マウス卵受精時および精子注入時の Ca^{2+} 増加の時・空間的解析

（出口竜作，中野義宏，宮崎俊一）

新しい膵島ホルモン PACAP ：そのオートクリン作用によるインスリン分泌の

増強
（矢田俊彦，松川　浩，中隣ゆかり，八重倉和朗，中田正範，柳田和弘，塩田清二）
摂食中枢視床下部弓状核ニューロンの代謝性および神経性調節
（矢田俊彦，室屋真二，塩田清二）
細胞器官研究系
生体膜研究部門 …… 19
概　要
膜電位依存性イオンチャネルの開過程最終転位の熱力学的性質
（久木田文夫）
神経細胞に発現する Cl^- チャネルの性質と遺伝子クローニングの試み
（山岸俊一，神谷絵美，筒井泉雄，古家喜四夫，榎本浩一）
筋収縮における細胞内オルガネラの役割の比較進化学的研究
（筒井泉雄，井上　勲，Q. Bone）
乳腺筋上皮細胞のカルシウム反応におけるオキシトシン受容体と ATP 受容体の協力作用
（中野春男，山岸俊一，古家喜四夫）
機能協関研究部門 …… 21
概　要
容積感受性 Cl^- チャネルの容積センサーメカニズム
（岡田泰伸，三輪晃子，植田和光）
内向き整流性Kチャネルの構造機能相関
（R.Z. Sabirov，富永知子，岡田泰伸，老木成稔）
心筋 CFTR Cl^- チャネル活性の 9-AC 感受性フォスファターゼによる制御
（周　七勝，高井　章，富永真琴，岡田泰伸）
生体情報研究系
神経情報研究部門 …… 25
概　要
［化学的糖鎖スクリーニング法］を用いた糖鎖解析と脳特異的糖鎖の生理学的解析
（藤本一朗，Krishna K. Menon，伊藤磯子，池中一裕）
レトロウイルスを用いた遺伝子導入法の開発および応用
（南木浩二，奥村俊一郎，佐々木学，池中一裕）
小脳顆粒細胞の成熟
（中平健佑，若園佳彦，柴田理一，池中一裕）

オリゴデンドロサイト (ODC) の発生・分化
（馬場広子，Anna Ivanova，米増知子，和田圭樹，秋田裕美，中平健佑，池中一裕）
アストロサイト分化過程の解析
（岩崎靖乃，馬場広子，熊田竜郎，大竹洋介，池中一裕）
液性情報研究部門 …… 28
概　要
レセプター活性型カルシウムチヤネルの同定と機能解析
（森　泰生，岡田峯陽，清水俊一）
電位依存性カルシウムチヤネルの分子的機能解析
（若森　実，森　泰生）
電位依存性カルシウムチヤネルの異常により起こる神経変性疾患の病態解明
（若森　実，森　泰生，松山善次郎，井本敬二）
興奮収縮連関の分子機構
（中井淳一）
高次神経機構研究部門 …… 29
概　要
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）
酵母系での蛋白質相互作用を利用した脳形成・機能制御分子の同定
（甲斐信行，八木　健）
Fyn と結合する新たなカドヘリン（CNR の解析）
（先崎浩次，光村直洋，武藤哲二，八木　健）
新たな薬剤（ピューロマイシン）耐性遺伝子を用いたマウス胚幹細胞遺伝子操作法の開発
（三寶　誠，八木　健）
NMDA 受容体サブタイプ欠損マウスの解析
（崎村建司，森　　寿，八木　健，三品昌美）
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，八木　健）
ニューロピリン欠損マウスの作製
（木津川尚史，八木　健，藤澤　肇）
エタノールによるシナプス Fyn の活性化
（宮川　剛，八木　健，二木宏明）
GAD65 及び 67 遺伝子欠損マウスの作製

情報記憶研究部門 …… 33
概　要
嗅細胞活動電位発生に対するホルモン効果とその作用機構の研究
（河合房雄，倉橋　隆，金子章道）
電気生理学的実験におけるケージド化合物使用の励起システムの開発的研究
（倉橋　隆，金子章道）
カエル味細胞の苦み応答に対する細胞内 cAMP 効果
（恒成　隆，倉橋　隆，金子章道）
生体調節研究系
高次神経性調節研究部門 …… 36
概　要
大脳皮質一次視覚野における色情報変換
（花沢明俊，小松英彦）
MST 野における運動刺激による面の傾きの表現
（村上郁也，杉原弘記，小松英彦）
視覚一次野における面の明るさの表現
（木下正治，小松英彦）
メタコントラスト条件下での V4 野ニューロン活動
（近藤秀樹，小松英彦）
生体システム研究部門 …… 38
概　要
新生ラットにみられる歩行運動の生後発達とセロトニン作動系
（中﨑克巳，森　大志，高須千慈子，松山清治，森　茂美）
歩行リズム形成に関わる脳幹・脊髄神経機構
（松山清治，森　大志，久世文也，奥村　哲，中﨑克巳，森　茂美）
斜流れベルト上でのサルの直立二足歩行運動：運動力学的解析
（森　大志，中﨑克巳，奥村　哲，松山清治，森　将浩，高須千慈子，森　茂美）
サル視覚誘導性上肢到達運動における脳内情報処理機構
（宮下英三）
小脳刺激により誘発される歩行運動と網様体脊髄路
（松井利浩，久世文也，松山清治，森　茂美）
単一前庭脊精髄路軸索の頚・胸・腰髄レベルにおける多髄節支配様式の解析
（久世文也，松井利浩，松山清治，森　茂美）
無拘束ネコの尾状核カルバコール刺激による行動変化と脳内神経伝達物質濃度

の変動
（奥村　哲，Katalin Kekesi，森　将浩，松山清治，森　茂美）
高次液性調節研究部門 …… 42
概　要
霊長類下部側頭葉の機能的マッピング
（納家勇治，吉田正俊，伊藤昭光，柴田愁子，宮下保司）
事象関連型機能的磁気共鳴画像法 (event-related fMRI) によるウィスコシンカード分類課題の大脳機構の解析
（宮下保司，小西清貴，納家勇治，吉田正俊）
事象関連型機能的磁気共鳴画像法 (event-related fMRI) による GO/NOGO 課題の大脳機構の解析
（宮下保司，小西清貴，納家勇治，吉田正俊）
サル大脳視覚野における最初期遺伝子の層特異的発現
（宮下保司，奥野浩行，納家勇治，吉田正俊）
統合生理研究施設
感覚・運動機能研究プロジェクト …… 46
概　要
体性感覚誘発脳磁図
視覚誘発脳磁場
仮現運動刺激に対する誘発脳磁場
高次脳機能研究プロジェクト …… 47
概　要
上丘中間層へのアセチルコリン作動性入力が局所神経回路に与える作用
（伊佐　正，遠藤利明，斎藤康彦）
サル上丘へのニコチン微量注入がサッカードに及ぼす影響について
（相澤　寛，小林　康，山本　優，伊佐　正）
視覚誘導性サッカード遂行時の脚橋被蓋核ニューロンの活動
（小林　康，伊佐　正，山本　優，相澤　寛）
上丘中間層ニユーロンの発火特性と一過性外向き電流の関連について
（斎藤康彦，伊佐　正）
上丘浅層ニューロンの電気生理学的特性と形態学的特徴
（遠藤利明，伊佐　正）
脚橋被蓋核から上丘へのコリン作動性投射の空間的特異性の検討
（山本　優，伊佐　正）

自律機能研究プロジェクト …… 51
概　要
生理機能研究施設
生体機能検査室 …… 52
概　要
15N ラベル蛋白質を用いたカルパスタチン機能ドメインの溶液構造の解析
（今野　卓，鎌足雄司，C. Dobson，牧　正敏）
円二色性スペクトルの特異値分解法を用いた蛋白質の相的性質解析法の発展
（今野　卓）
アミノ酸溶解度の精密測定
（今野　卓，岩下　潤，市川　修，永山國昭）
X線溶液散乱法を用いた非天然状態蛋白質の構造解析
（今野　卓，森　泰生，片岡幹雄，稲葉謙次，石森浩一郎，森島　績，鎌足雄司，黄地祥子，赤坂一之）
アルコール中における蛋白質鎖の特異構造の解析
（今野　卓，鎌足雄司，片岡幹雄，牧　正敏，田中直毅，金折賢二）
高圧下での PVP 高分子と疎水性リガンドの会合に伴う構造変化の解析
（今野　卓，田中直毅，功刀　滋）
組織培養標本室 …… 55
概　要
Intravenous injection of guanylin indueces mucus secretion from goblet cells in rat duodenal crypts.
（Sonoko Furuya，Satoru Naruse，Tetuo Hayakawa）
超高圧電子顕微鏡室 …… 56
概　要
電子線二次元検出器としてのイメージングプレートと電顕フィルムの比較
（有井達夫）
電子計算機室 …… 60
概　要
コイ網膜の R/G 型水平細細胞のダブルフラッシュ応答特解析
（石井宏幸，藤川智博，神山斉己，臼井支朗）
動物実験施設 …… 61
概　要
マウス精子形成細胞へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入
（山崎由起子，井本敬二，尾崎　毅，八木　健）

マウス卵子の体外受精と胚の凍結保存技術確立
（小木曽昇，廣江　猛，山崎由起子）
技術課 …… 65
概　要
（大庭明生）
施設の運営状況
1．統合生理研究施設
(1) 生体磁気計測装置室
（永田　治，竹島康行）
2．生理機能研究施設
(1) 超高圧電子顕微鏡室
（山口　登，伊藤嘉邦）
(2) 電子計算機室
（吉村伸明，村田安永，高橋直樹）
(3) 磁気共鳴装置室
（市川　修）
3．動物実験施設
(1) 陸生動物室
(2) 水生動物室
(3) 伊根実験室
（佐治俊幸，小木曽昇，廣江　猛）
4．共通施設
(1) 電子顕微鏡室
（前橋　寛）
(2) 研究機器試作室室
（加藤勝己）
(3) 低温・冷凍実験室
（大庭明生）

分子生理研究系

神経化学研究部門

【概要】

神経細胞情報伝達系および神経特異的転写調節系を構成する各種分子の生化学的特性，活性調節および神経発生・動物行動との関連について，下記の研究を行った。11月から文部省外国人研究員 O. Stork が加わり，遺伝子改変マウスの行動解析を組織的に行うシステムを構築して，研究を開始した。

グルタミン酸脱炭酸酵素 GAD 遺伝子ノックアウトマウスによる神経系，非神経系における GABA の役割の研究

小幡邦彦，淺田英穂，季　鳳雲，丸山　敬

GABA の合成酵素である GAD には 2 つのアイソフォーム GAD65, GAD67 があるが，それぞれの遺伝子ノックアウトマウスを高次神経機構研究部門の協力を得て作成し，次の所見を得た。1）GAD65 欠損では残存する GAD67 により代償されるため，脳内 GABA 量，脳機能（一般的行動，水迷路等の学習，小脳機能）が正常。2）GAD67 欠損マウスは誕生後，口蓋裂のため死亡。3）GAD67 欠損では大脳内 GABA は 7 %に減少するが，脳組織は正常。4）両遺伝子の欠損マウスは稀にしか得られないが，脳組織は正常。近年，GABA は神経組織発生に重要と考えられているのでこれらの所見は予想外である。GABA 減少による脳機能障害をしらべるため，口蓋裂が起こらない GAD67 欠損マウスの作成を試みている。

アルツハイマー病の分子生物学

丸山　敬，篠崎幸喜，久米秀明

アルツハイマー病の病因と深く関与されていることが定説になっているアミロイド蛋白質の代謝を培養細胞系を用いた研究を行っている。

家族性アルツハイマー病の原因遺伝子として Presenilin (PS) が同定された。疾患関連変異を持った PS を発現すると神経毒性の高い Aβ42 が増加することを昨年来の研究により確認した。

しかし，PSがアミロイド蛋白質の代謝を制御する分子機構は全く不明である。そこで，PS結合蛋白質の同定を試みた。酵母Two-Hybrid法により，カルシウム依存性プロテアーゼであるカルパインが結合することが見いだされ，その結合はCOS細胞における免疫沈降でも確認された。PSによる活性の制御あるいはカルパインによるPSの代謝など複雑な生理的相互作用が考えられる。現在，PSによるカルパインの活性の変化を検討中である。

神経可塑性に関与する遺伝子の検索

丸山　敬，久米秀明，篠崎幸喜

神経可塑性の一つのモデルである長期増強(LTP)に関連する遺伝子を検索し神経機能の解明を目指している。

Tetraethylammoniumによって LTP 状態になった海馬より差分法を用いて，神経特異的な，新規の basic helix-loop-helix 転写制御因子 kw8 と既存の遺伝子とは全く相同性が見いだされない norbin をクローニングした。kw8 では，酵母での転写活性が確認され，リン酸化による修飾が見いだされた。norbin は神経系培養細胞である Neuro2a で過剰発現させると突起伸長を誘発した。kw8 と norbin は発生初期から成体にいたるまで発現している。神経可塑性は新たな神経回路の形成という意味では神経細胞の成体における再分化ともいえ，神経発生に関わる遺伝子が神経可塑性でも重要な機能を担っていることも考えられる。現在，norbin のノックアウトマウスの作成を目指している。

神経活動と Ca^{2+}／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼⅡ

山肩葉子，小幡邦彦

Ca^{2+}／カルモジュリン依存性プロテインキナーゼⅡ(CaMKII)は，中枢神経系に豊富に存在し，細胞内 Ca^{2+} の上昇に反応して自己リン酸化を起し活性化されると共に，幅広い基質蛋白のリン酸化を行う。この自己リン酸化による活性化は，フォスファターゼによる脱リン酸化が起らない限り維持されることから，一過性の細胞内 Ca^{2+} の上昇を持続性の現象に変換するスイッチ機構として，シナプス可塑性への関与が示唆されている。我々は，生体内における神経活動と CaMKII の活性化状態との関連を明らかにするために，活性化に必要な自己リン酸化を特異的に認識する抗体を作成した。この抗体を用いて，急性の神経活動の活性化のモデルである電撃けいれんの際には，直後に，脱リン酸化による一過性の CaMKII の活性化状態の減少が起ることを明らか

にした。本年度は，カイニン酸の投与によって持続性のけいれんを誘発した際には，けいれん重積状態の間，CaMKII の活性化状態の減少が持続し，また，CaMKII の細胞内分布が変化することを見い出した。

Fyn 過剰発現による NMDA 受容体サブユニット 2B チロシンリン酸化の亢進と情動行動に及ぼす影響

児島伸彦，石橋英俊，小幡邦彦

我々はこれまでに Fyn を前脳ニューロンで過剰発現するマウスを解析することにより Fyn がシナプス伝達機能や可塑性に重要であることを明らかにしてきた。Fyn の基質のひとつは NMDA 受容体サブユニット 2B (NR2B) であり，in vitro のリン酸化実験によれば NR2B の細胞内ドメインには Fyn によってリン酸化されうるチロシン残基が複数存在する。Fyn 過剰発現マウスでは，NR2B のリン酸化が亢進し，それと並行してキンドリング発展が加速される。キンドリング発展は NMDA 受容体活性に依存することが知られており，NR2B のチロシンリン酸化によってその活性が調節される可能性がある。Fyn によるタンパク質チロシンリン酸化の亢進が動物行動に及ぼす影響を知るために各種行動実験を行ったところ，Fyn トランスジェニックマウスは野性型マウスに比べ高い情動反応を示した。したがって Fyn によるリン酸化の亢進は情動行動に影響を及ぼすと考えられる。

超微小形態生理研究部門

【概要】

「構造と機能」という分子生物学のパラダイムは生物の機能が生体高分子，特に蛋白質の独自の構造によって支えられていることを明らかにして来た。一方細胞より上の階層では組織，器官を見ると構造が機能と直結しているのはむしろ自明である。しかし生体高分子と組織・器官の中間に位置する細胞にはそのレベル独自の「構造と機能」が明確でない。細胞は一見オルガネラと各種小胞のランダムな集まりのように見える。しかし私達はこれら微小器官の集積の背後に，実は明確に細胞構造を規定する実体があると考える。特に細胞骨格構造を通して見た「細胞の形と働き」に興味がある。それはこうした現象の背後には細胞活動維持，形態維持のための細胞膜骨格，細胞骨格のかたい構造編成があり，骨格をレールとした物質輸送機構があり，更に化学－力学情報変換機構があると考えるからである。1997年度はこの細胞現象を新しい生物物理学技術と細胞生物学手法を用いて研究した。具体的報告を以下に記す。

細胞極性形成と細胞内オルガネラのトポバイオジェネシス

村田昌之，加納ふみ，魚住拓也，永山國昭

上皮細胞やニューロンなどの極性細胞の形態形成や分化過程を，核－中心体－ゴルジ体などの細胞内オルガネラが作る極性軸の形成過程としてとらえ，この軸の形成に関わるオルガネラの生成，消滅の「位置 (topo)」と「時間 (temporal)」を決定する細胞内因子を，部分的に形質膜を透過性にした培養細胞（セミインタクト細胞）を用いて生化学的に探索し，極性形成の分子メカニズムを単一細胞の「発生学」として明らかにすることを目的としている。本研究では，三次元極性軸形成のシステムとしてイヌ腎臓上皮由来の MDCK 細胞を，二次元極性軸形成のシステムとしてラット胎児海馬ニューロンを用いる。今年度は，（1）連鎖球菌の酵素感受性毒素 Streptolysin O (SLO) を用いて形質膜を部分的に透過性にした「セミインタクト細胞系」を完成した。これを用い，イリマキノン（海綿の代謝産物）により引き起こされた細胞分裂時におけるゴルジ体の小胞・断片化－＞再集合を，L5187Y 培養細胞質と ATP 再生系を用い，再構成することができた。（2）多重蛍光顕微鏡解析装置を開発した。本装置により，光学顕微鏡下で培養細胞・セミインタクト細胞の形態変化・カルシウム濃度変化・膜電位変化・ pH 変化等とともに，「細胞内の局所」で生起するイベント（蛋白質相互作用，膜動過程など）を高空間分解能・高時間分解能で定量化し，イメージングできる。

エンドサイトーシス経路のプロセシングに障害のある変異細胞株の樹立と解析

大橋正人，石堂美和子，村田昌之，永山國昭
山本章嗣（関西医科大）

エンドサイトーシス経路は，栄養物の取り込み，ホルモンに対する応答，抗原提示，シナプス小胞の形成等の生理現象の基礎として重要な膜動輸送系である。この経路のメカニズムを解明するため，二種類の蛍光性 LDL を用いたフローサイトメトリーにより，LDL のエンドサイトーシス経路でのプロセシングに障害のある新たな CHO 変異細胞株を選別，樹立した。一つめの蛍光性 LDL は，NBD コレステロールのオレイン酸エステルで標識したもの (NBD-CO-LDL) で，これをエンドサイトーシスした細胞は緑色の蛍光を発する。とりこまれた NBD-CO-LDL がリソゾームで分解されると，NBD コレステロールが遊離して，細胞外に出されるため，細胞は蛍光を失ってゆく。もう一つは，以前開発した，蛍光共鳴エネルギー移動を原理とし，細胞内で分解を受けると蛍光スペクトルを変化させる蛍光性 LDL (RET-LDL) で，これを用いると LDL のエンドサイトーシスによる取り込み，その後のリソゾームでの分解を生きた細胞で定量的に見積ることがで

きる。これらのLDLを順に用いて，6グループの独立に変異誘導したCHO細胞から，フローサイトメーターによる細胞選別を7回繰り返して行い，LDLを取り込むことができるが細胞内での分解が遅い6つの独立の変異細胞のプールを得た。このなかから，9つの変異株を樹立した。形態学的，生化学的解析から，これらの変異株は少なくとも4つのクラスに分類された。そのうち2つのクラスはエンドサイトーシス後期過程に変異を持ち，ひとつは以前得られたLEX1細胞と類似の変異，もう一つはLEX1細胞とは明らかに異なる段階に障害があった。これらの表現型より，後期エンドソームは複数の段階に分類され，それらがリソゾームと直接相互作用をしていることが示唆された。

分子動力学シミュレーションと巨視的誘電体モデルを用いた蛋白質の構造安定性及び誘電応答

高橋卓也，杉浦淳之介，永山國昭

水溶性球状蛋白質であるprotein G B1 domain分子の分子動力学計算を，真空及び水中で行った。この分子は，アミノ酸56残基からなる小さな蛋白質である。内部にS-S結合を持たず，ベータシートを主体とし，1本のヘリックスを持つ安定な3次構造をとる。真空中で複数（50）本の熱変性シミュレーションを行うことで，変性における異なる時定数をもつ緩和過程を，統計的に有意に分離することができた。そしてそれらが，局所的構造と非局所的な構造が崩壊する過程という，蛋白質構造の階層性の表れであることを確認した。またこの蛋白質は，C末端側が構造的に不安定であり，変性シミュレーションでも最初にそこから壊れた。その領域には酸性残基が集中しており，それが不安定性の原因であることが強く示唆された。同時に水溶液中の変性シミュレーションも行い，定性的には同様な現象が，水中でも生じることを確かめた。また水溶液中の天然状態で平衡化した，この蛋白質分子における誘電的応答も，分子動力学(MD)シミュレーションで調べ，実効誘電率という電気的な遮蔽効果を，表すパラメタがほぼ電荷間距離に比例して，増加することがわかった。つまりこの場合，蛋白質溶媒系は，一様な誘電率を持つ連続体として，近似することが可能であった。そしてこの遮蔽効果は，クーロン力のカットオフによって失われることがわかり，遠方の水分子の配向が遮蔽にとって，重要な役割を果たしていることがわかった。これはこれまでの誘電体モデルによる計算と実験との一致を裏付けるものであった。

唾液腺の水分泌における Cl^- 輸送と重炭酸輸送の役割

村上政隆，大河原浩，高木正浩

唾液腺腺房細胞の水分泌は，基底側膜の中性共輸送体および二つの対向輸送体が Cl^- を取込み，管腔への Cl^- 分泌を駆動し，これに Na^+ および水が伴うとされる。このモデルによると，水分泌量は管腔への Cl^- 放出を反映し，酸素消費増加分は殆ど，基底側輸送体活性と連結した Na^+/K^+ ATPase の活性化により，両者の比から共輸送体と対向輸送体の寄与を推定できる。今回，ラット顎下腺血管潅流法を用い，重炭酸あり・なしの潅流条件で水分分泌速度と酸素消費を測定，Cl^- 置換・ DIDS 投与・ bumetanide 投与・ acetazolamide 投与実験を行い，HCO_3^- の関与，Na^+/HCO_3^- 共輸送の関与を検討した結果，１）水分分泌には Cl^- が不可欠，２）中性共輸送体阻害時には，重炭酸の細胞内への補給が Cl レベルを細胞内で維持するために不可欠，３）重炭酸の細胞内への補給は炭酸脱水素酵素であることが明らかになった。

細胞内代謝研究部門

【概要】

細胞内代謝部門では，生物活性物質や細胞－細胞間刺激に対する細胞の刺激受容機構，細胞内情報伝達機構，細胞機能発現機構を対象とし，特に細胞内カルシウムイオン (Ca^{2+}) 動態の画像解析を行っている。宮崎と毛利は，受精時の精子による卵活性化機構の解析として，最初の卵内 Ca^{2+} 増加反応を共焦点レーザー走査顕微鏡で分離・記録することに成功した。また出口竜作（学術振興会特別研究員），尾田正二（東京女子医大助手）が加わり，精子由来の卵活性化因子の作用機序を解析した。出口はマウス卵受精時の Ca^{2+} 増加反応の時・空間的画像解析を行った。矢田は松川浩（総研大学院生）とともに神経・膵ペプチド PACAP について，その膵島インスリン分泌制御における生理的役割および糖尿病発症における病態生理的役割を解明するため，正常および糖尿病モデルラットを用いて研究を行なった。また糖代謝・摂食の中枢性調節機構の解明のため，摂食調節中枢の一つである視床下部弓状核のニューロンの性質とその神経性・液性調節様式を解析した。

共同研究については，宮崎は生殖細胞の活性化機構に関する研究グループを編成し共同実験を行った。また，河原克雅（北里大医学部生理学教授）と核内 Ca^{2+} 調節機構と遺伝子発現について，五嶋良郎（横浜市立大医学部助教授）と反発因子の神経成長円錐における細胞内 Ca^{2+} 動態に及ぼす効果ついて実験を行った。矢田は八尾寛（東北大医学部教授）と GABA を介する膵島 β-α 細胞間パラクライン調節機序について，栗生修司（九州大医学部教授）と視床下部神経細胞におけるレプチン，PACAP, 栄養素の作用機序に関する共同実験を行った。また飯野正光（東

京大医学部教授）を代表者として細胞機構制御とカルシウムシグナル，嶋津孝を代表者としてインスリン分泌と糖・脂質代謝の組織間クロストークによる制御と題する研究会を開催した。

精子ー卵融合時の卵内局所的 Ca^{2+} 増加反応

毛利達磨，池上　晋（広島大），宮崎俊一

動物種に普遍的に，受精時に卵細胞内 Ca^{2+} 増加反応がおこり，卵活性化の引き金になる。バフンウニ（*Hemicentrotus pulcherrimus*）を用い，受精時の精子ー卵結合後最初に卵に起こる膜電流と細胞内 Ca^{2+} 増加を，単電極膜電位固定法および共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた Ca^{2+} 画像解析で同時記録し，さらに精子ー卵結合を赤外線カメラで同時観察した。通常の受精では精子結合と同時にステップ状の内向き電流がおこり，それから数秒して精子結合部位直下から卵全体に伝播する Ca^{2+} 波が発生した。精子ー卵膜融合を阻害する jaspisin の存在下で，一度融合しかけた精子が卵から解離する条件を設定することができ，この条件で精子結合部位直下で局所的な Ca^{2+} 濃度の上昇を分離・記録することに成功した。即ち，精子が卵内に侵入しなくても卵の受精シグナルは誘起できることが示された。局所的な Ca^{2+} 増加反応は精子の最初の刺激によるものであり，今後の精子刺激の解析の有用な指標になると考えられる。論文をまとめ，Development に発表した。

精子の卵活性化蛋白質の作用部位

毛利達磨，出口竜作，尾田正二（東京女子医大），宮崎俊一

近年，受精時の精子ー卵融合に際して精子細胞質因子が卵内に移行し，細胞内 Ca^{2+} 増加を誘発するという説が注目されている。我々はハムスター精子細胞質蛋白質を超音波処理によって抽出し，Cibacron Blue に対するアフィニティークロマトグラフィーを通して部分的に精製し，これをハムスター，マウスの未受精卵に注入して Ca^{2+} 増加反応の時・空間的な分布を共焦点レーザー顕微鏡で画像解析した。精子抽出物を蛍光標識して注入時の卵内拡散を同時記録した。卵表層部への微量注入によってその部位から発生する Ca^{2+} 波が誘発された。1回の注入により Ca^{2+} 増加反応は繰り返しおこり，いわゆる Ca^{2+} オシレーションが誘発された。卵中心部への注入では数十秒の遅れをもって卵全体でほぼ同期的に Ca^{2+} が上昇した。精子因子に対する感受性は卵皮質でより高いことが示され，精子因子説を支持する結果を得た。IP_3 注入による Ca^{2+} 遊離についても卵表層部が感度が高く，精子因子は IP_3 レセプターに作用して Ca^{2+} 遊離を促進す

る可能性が示唆された。

マウス卵受精時および精子注入時の Ca^{2+} 増加の時・空間的解析

出口竜作，中野義宏（順天堂大），宮崎俊一

マウス卵受精時の細胞内 Ca^{2+} 増加を，部門に新設した高速 Ca^{2+} 画像解析装置（ARGUS/HiSCA, 浜松ホトニクス）を用いて解析した。最初の Ca^{2+} 増加は精子結合部位から発する Ca^{2+} 波を形成したが，詳細に解析すると二段階の上昇を示すことがわかった。これは精子抽出物を卵内表層部に注入した場合の Ca^{2+} 波とよく一致していた。こののち Ca^{2+} 波は反復発生し，Ca^{2+} オシレーションは受精後 3 時間以上も持続した。近年，精子の卵細胞内注入 (Intracytoplsmic Sperm Injection; ICSI) が男性不妊の有力な治療として適用されている。マウスでの ICSI に対する Ca^{2+} 増加反応をレーザー顕微鏡で観察した。精子注入後15－30分して Ca^{2+} オシレーションが発生し始めた。Ca^{2+} は卵全体でほぼ同期的に上昇し，精子抽出物を卵中央部に注入した場合によく一致した。注入精子の細胞膜が壊れ，細胞質因子が卵細胞質に漏出して Ca^{2+} 遊離を誘発するという説明が可能であり，精子因子説を支持する結果を得た。

新しい膵島ホルモン PACAP ：そのオートクリン作用によるインスリン分泌の増強

矢田俊彦，松川　浩，中﨑ゆかり
八重倉和朗，中田正範，柳田和弘（鹿児島大）
塩田清二（昭和大）

ラット膵に局在し強力なインスリン分泌刺激作用を持つ神経ペプチド PACAP について，これが膵島物質であるのか，オートクリン作用によりインスリン分泌を増強しているのかを検討した。

【結果】

1）Wistar ラット膵島 β 細胞における PACAP38 の局在が特異的抗体を用いた免疫組織化学により検出された。

2）ラット膵島および β 細胞株 MIN6 細胞において，PACAPmRNA の発現が PCR 法により検出された。

3）PACAP 受容体の膵島 β 細胞における局在が免疫組織化学的に検出された。

4）膵島からの PACAP 分泌を，β 細胞内 Ca^{2+}（$[Ca^{2+}]$）応答を用いてバイオアッセイした。膵島を高グルコースとインキュベーションした Medium には $[Ca^{2+}]$ 増加活性が見られ，その活

性は特異的PACAP中和抗体の添加により消失した。
5）高グルコース刺激による膵島インスリン分泌は，PACAP中和抗体の共存により約25％抑制された。
6）糖尿病GKラットβ細胞においてPACAPに対する$[Ca^{2+}]$応答が障害されていた。
【結論】
1）PACAPはβ細胞で作られる膵島ホルモンであり，グルコース刺激により放出され，オートクリン作用によりグルコース刺激インスリン分泌反応を膵島内で増強している。
2）PACAPオートクリン作用の障害と糖尿病発症との関連が示唆される。

摂食中枢視床下部弓状核ニューロンの代謝性および神経性調節

矢田俊彦，室屋真二（鹿児島大），塩田清二（昭和大）

視床下部の弓状核は腹内側核，外側視床下部，室傍核とならんで摂食調節中枢として機能している。その性質を解明するため，ラット弓状核ニューロンを単離し，細胞内Ca^{2+}濃度($[Ca^{2+}]$)を測定し，摂食調節物質の作用を調べた。弓状核神経の一部は，低グルコースにより$[Ca^{2+}]$が上昇するグルコース感受性神経であり，これらの多くはNeuropeptide Yを含有する細胞であった。低グルコースによる$[Ca^{2+}]$上昇は膵ホルモンInsulinと脂肪由来ホルモンLeptinにより抑制された。さらに，この$[Ca^{2+}]$上昇は神経伝達物質GABAによっても抑制された。これと対応し，GABA陽性終末が弓状核ニューロンにシナプスを形成している像がみられ，GABA受容体が弓状核ニューロンに局在した。弓状核神経は末梢代謝栄養シグナルおよび中枢神経性シグナルにより制御されていることが明らかとなった。

細胞器官研究系

生体膜研究部門

【概要】

生体膜研究部門は各種細胞のイオンチャネル，リセプター，細胞内シグナル分子，および発現遺伝子を解析し，細胞固有の生理的活動の機構の解明を目指す研究を進めてきた。

神経の活動については，イカ巨大神経標本を用い，Na チャネルのゲート機構の研究を進めた。また細胞内 Ca^{2+} によって発現する大きな Cl コンダクタンスの生理的性質の検討と Cl^- チャネル遺伝子クローニングの試みを行った。

筋収縮メカニズムにおける細胞内オルガネラの果たす役割について種々の海生プランクトンを用い，比較進化学的研究を進めた。

乳腺組織からの乳分泌のメカニズムについて研究し，乳腺筋上皮細胞のオキシトシン受容体と ATP 受容体の役割を検討した。

一般共同研究としては，榎本（島根医大），柴（広島大歯），橋本（東京医歯大）グループとの共同研究を進めた。

研究会は「ATP 受容体生理機能と分子機構に関する総合的基礎研究」（代表：桂木猛（福岡大）を担当した。

膜電位依存性イオンチャネルの開過程最終転移の熱力学的性質

久木田文夫

膜電位依存性の Na チャネルや K チャネルの開過程はゲート電流とイオン電流の時間経過を測定することにより解析される。ゲート電流では主として閉－閉の転移を表し，イオン電流は閉－開の全体の転移を示している。本研究では両者に対する溶媒（粘性・浸透圧）と温度の効果の定量的な違いを測定した。ゲート電流が一過性に流れてしまうことは，膜電位依存性の本質である構造変化の終了を意味するが，その後ある過程を経て，実際にイオン電流が流れる。この最後の過程が，最終転移である。この最終転移の力学的或いは熱力学的性質を調べ，分子構造に立脚した構造変化のモデルを構築するための基礎とすることを目指している。

神経細胞に発現する Cl^- チャネルの性質と遺伝子クローニングの試み

山岸俊一，神谷絵美，筒井泉雄
古家喜四夫（京都工繊大），榎本浩一（島根医大）

神経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。通常，Cl^- イオンはじめ各アニオンは静止電位，活動電位に殆ど影響を与えない。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 K^+ 選択性を示す。このとき，細胞内の Ca^{2+} レベルを増加させると K^+ コンダクタンスを大きく上回る Cl^- コンダクタンスが発現する。P_{Cl}/P_K 値は通常の0.28から13.5まで変化した。この Cl^- コンダクタンスは 10^{-7} M Ca^{2+} 投与の範囲までは可逆的であるが，それ以上の Ca^{2+} 濃度では非可逆となる。この Cl^- コンダクタンスのアニオン透過順列は $Br^- > Cl^- > I^- > F^-$ で，Eisenman III 型を示した。イカ神経における Cl^- チャネルの ClC ファミリーの遺伝子クローニングから得られた cDNA 断片308塩基のうち，301塩基がラット脳 ClC-3 に一致していた。

筋収縮における細胞内オルガネラの役割の比較進化学的研究

筒井泉雄，井上　勲（徳島大），Q. Bone（プリマウス MBA）

筋肉の収縮弛緩と細胞内オルガネラ（SR, ER, T 管）における分子機構（Ca ポンプ，Na/Ca 交換輸送，Ca チャネル，リアノジン受容体，DHP 受容体等）の機能構造相関を研究するうちで，特に Na/Ca 交換輸送系が筋収縮，筋弛緩時の細胞内 Ca 調節にどのような役目を担っているかを，種々の海生動物プランクトンを用いて研究した。SR, ER を欠いた動物種では，筋収縮に対して細胞外からの Ca 流入が必須であり，Ca は細胞膜の Na/Ca 交換輸送系のみを用いて排出（調節）されること，また SR, ER が十分に発達した動物種においては細胞内オルガネラが積極的に Ca の汲み上げをつかさどっていること，細胞膜の Na/Ca 交換輸送系は関与していないことが判明した。これより細胞内オルガネラの発達と細胞内 Ca 濃度制御方法が密接に関連することが判明した。この機能分子の果たす役割を筋の進化系統発生の諸過程においてひきつづき検討中である。

乳腺筋上皮細胞のカルシウム反応における オキシトシン受容体と ATP 受容体の協力作用

中野春男，山岸俊一
古家喜四夫（京都工繊大）

乳腺筋上皮細胞においては，オキシトシンによって細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し，収縮を引き起こす。このカルシウム反応はオキシトシン濃度依存的に漸増するというよりはむしろ，閾値濃度（約 1 nM）を超えるとほぼ最大反応となる全か無か (all or none) 的な様相を示す。

細胞外 ATP （≧ 10 μM）によっても細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇するが，これは P2Y 型の ATP 受容体の活性化により細胞内ストアからカルシウムが遊離することによる。カルシウム反応を起こさない濃度の ATP (1 μM) 存在下にオキシトシン刺激すると，カルシウム反応の閾値濃度が下がり生理的範囲のオキシトシン濃度（≧ 0.01 nM）で反応するようになった。

乳腺腺胞において筋上皮細胞に隣接する分泌上皮細胞が，機械的刺激によって ATP, UTP 等のヌクレオチドを放出することが知られているので，ATP が局所的なシグナルとして筋上皮細胞の機能を調節していることは十分に考えられる。

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（イオンチャネル，水チャネル）やトランスポータ（キャリア，ポンプ）の働きによって担われ，支えられている。本部門では，1）“チャネルとトランスポータの構造・機能協関”を分子細胞生理学的に解明し，2）“細胞機能におけるチャネル，トランスポータの役割”を統合生物学的に解明することを目標に，次のような研究課題に取り組んでいる。

①「細胞容積調節の分子メカニズムと細胞死」： 殆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。このメカニズムには各種チャネルやトランスポータの働きが関与している（図 1）。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・代謝が行われる生理的過程においても重要である。また，(持続性膨張を伴う) ネクローシスや (持続性収縮を伴う) アポトーシスの防御線としても働いている。現在，容積調節の分子メカニズムや，その破綻と細胞死との関連について研究している。

②「消化管上皮細胞の分泌・吸収機能と分子メカニズム」： 小腸の溶質吸収細胞，Cl^- 分泌細胞やパネト細胞，胃の酸分泌細胞，膵臓のインスリン分泌細胞，肝臓の星細胞などの細胞機能にお

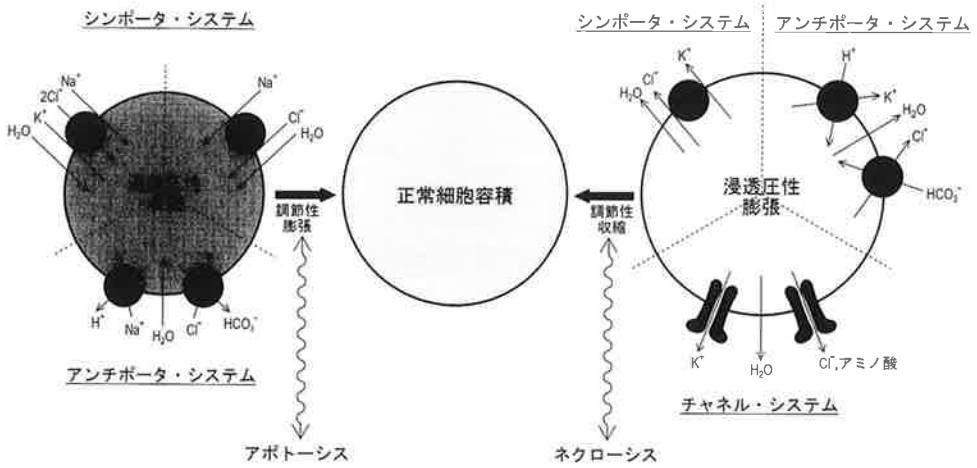


図１：異常浸透圧環境下での細胞容積調節とそのメカニズム，及び細胞死との関係

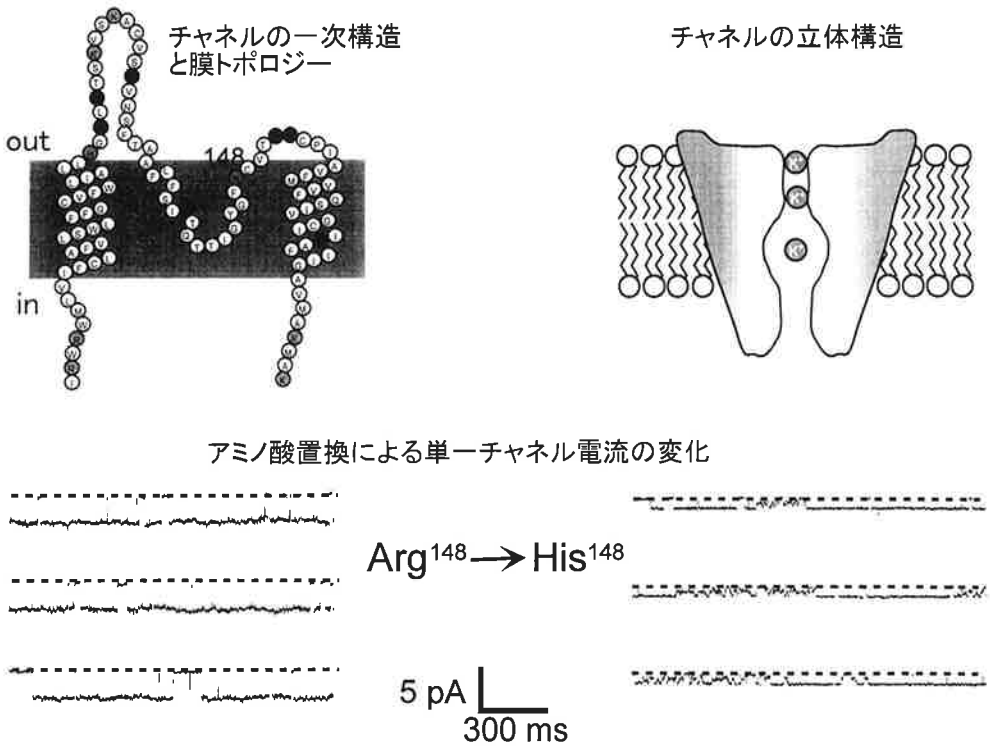


図２：内向き整流性 K^+ チャネルの構造とアミノ酸置換による単一チャネル電流変化

けるチャネルやトランスポータの役割について研究している。
③「イオンチャネルの構造・機能相関と多機能性」：イオンチャネル蛋白へアミノ酸変異を導入し，その結果もたらされるチャネル特性の変化をシングルチャネル記録で捉え，チャネルの構造（一次構造，膜内トポロジー，立体構造）と機能（イオン透過，選択性，ブロック）との関係（図２）や，チャネル蛋白の多機能性の分子メカニズムを研究している。
その他，④「心筋細胞機能とチャネル」，⑤「腎密集斑細胞 NaCl センサー機能の分子メカニズム」，⑥「運動神経細胞生存維持シグナル因子」，などについても研究している。

容積感受性 Cl^- チャネルの容積センサーメカニズム

岡田泰伸，三輪晃子，植田和光（京都大・農）

浸透圧性膨張後にみられる容積調節過程に重要な役割を果す容積感受性 Cl^- チャネルについて，私達はこれまで，その性質や分子実体を含めて検討を行ってきた。1997年度は主としてその容積センサーメカニズムについて調べた。その結果，本チャネルの活性化は，細胞膨張時の膜伸展によってゲートされるものではなく，むしろ細胞膜 infolding のほぐれによってもたらされるものであることが明らかになった[1)]。この容積感受性は，多剤耐性薬物排出ポンプであるＰ糖蛋白 (MDR1) の共発現によって高められること[2)]，しかしＰ糖蛋白の ATP 水解能（従って，ポンプ活性）には依存しないこと[2)]を明らかにした。

１）Y. Okada (1997) *Am. J. Physiol.* 273, C755-C789
２）A. Miwa, K. Ueda & Y. Okada (1997) *J. Membrane Biol.* 157, 63-69

内向き整流性Ｋチャネルの構造機能相関

R. Z. Sabirov，富永知子，岡田泰伸，老木成稔

内向き整流性Ｋチャネル族 Kir にはチャネルポアを形成するＰ領域Ｃ末端近傍に正電荷のアルギニン残基が高く保存されている。まず，Kir2.1 (IRK1) の pH 依存性をツメガエル卵母細胞発現系で調べたところ，細胞内及び細胞外プロトン増によって異なる pK 値で抑制されることが明らかになった[1)]。次に、生理的に内向き電流を担うＫチャネルの細胞外開口部付近になぜ正電荷が必要かという疑問から，Kir2.1 のアルギニン (Arg^{148}) のヒスチジン置換効果を調べた。変異型チャネルは野生型チャネルとヘテロ４量体を形成し，発現したチャネルは野生型チャネルとは単一チャネルコンダクタンスなど異なる性質を示した。これらの結果から，アルギニン残基はその

正電荷により細胞外二価カチオンを排除してブロック効果を減弱させ，内向き整流性を強化していることが明らかになった[2]。

1）R.Z. Sabirov, Y. Okada & S. Oiki (1997) *Pflugers Arch.* 433, 428-434

2）R.Z. Sabirov et al. (1997) *J. Gen. Physiol.* 110, 665-677

心筋 CFTR Cl^-チャネル活性の 9-AC 感受性フォスファターゼによる制御

周　士勝（生理研），高井　章（名古屋大・医），富永真琴，岡田泰伸

心筋細胞のサイクリック AMP 賦活性 Cl^-チャネル (CFTR) は，自律神経刺激下において活動電位の変調や細胞容積調節に関与することが知られている。このチャネルはAキナーゼによる燐酸化によって活性化され，フォスファターゼによる脱燐酸化によって不活性化される。脱燐酸化には，オカダ酸感受性フォスファターゼ (PP-2A, PP-1) と，未特定のオカダ酸非感受性フォスファターゼが関与する。1997年度に後者について検討したところ，Cl^-チャネル阻害剤 anthracene-9-carboxylate (9-AC) とバナジン酸に対して感受性を示すことが明らかとなった。このフォスファターゼは，これまで知られている蛋白フォスファターゼ (PP-1, PP-2A, PP-2B, PP-2C) ともアルカリフォスファターゼや酸性フォスファターゼとも異なる，新型のフォスファターゼであることが明らかとなった。

S.-S. Zhou, A. Takai, M. Tominaga & Y. Okada (1997) *Circ. Res.* 81, 219-228

生体情報研究系

神経情報研究部門

【概要】

神経系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。神経情報究部門では，神経上皮細胞からどのようにして種々の細胞種への分化決定がなされるのか分子・細胞生物学的に研究している。

グリア細胞はその系譜が未だに定かになっておらず，免疫組織学的手法や in situ hybridization 法を駆使してその分化・移動様式を明らかにしている（岩崎，大竹，Ivanova，和田，馬場，池中)。また，われわれ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かにするとともに，転写因子からも発生・分化機構を解明している（馬場，岩崎，熊田，秋田，米増，中平，池中)。

小脳の顆粒細胞の分化過程を電気生理学的に解析し，形態学的にもアプローチしている（中平，若園，柴田，池中)。

脳の発達段階における糖蛋白質糖鎖構造の解析も行っている（藤本，Krishna，伊藤，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遺伝子治療の基礎的研究を行っている（南木，奥村，佐々木，中平，池中)。

小脳顆粒細胞の成熟

中平健祐，若園佳彦，柴田理一，池中一裕

神経細胞の分化成熟の過程における電気的活動の役割を検討するため，小脳顆粒細胞の電位依存性 K^+ チャネルの発現と活動電位の発現について解析をおこなった。小脳培養系において，パッチ電極内に蛍光色素を加えて細胞を標識し，形態と電気活動を同時に記録したところ，未成熟の顆粒細胞では slow-inactivating な K^+ 電流がほとんどであるが，成熟に伴い fast-inactivating な A-type 電流成分の発現が観察された。抗体染色及び，in situ ハイブリダイゼーションの結果より，それぞれの成分の発現には Kv3.1 及び Kv4.2 遺伝子の発現がよく対応していた。この系で細胞の活動電位を測定すると，培養初期の細胞では内向き電流がほとんど無く活動電位も記録されないが，培養経過に従い観察されるようになり，A-type の K^+ 電流を発現するようになると反復発火が観察された。

オリゴデンドロサイト (ODC) の発生・分化

馬場広子，Anna Ivanova，米増知子，和田圭樹，秋田裕美，中平健祐，池中一裕

ODC は中枢ミエリン形成細胞であり，神経上皮細胞から分化してくるが，限局された部位から発生することを示す報告が多い。そこで，in vivo や in vitro の系において，ODC 前駆細胞のマーカーである PLP (proteolipid protein) や PDGFa 受容体遺伝子発現を解析したが，両者の発現様式は一致せず，ODC 細胞系譜は 2 種類あることが示唆された。

ODC がミエリンを形成する時，多くの遺伝子発現を誘導する。この機構を知るために，UDP-ガラクトース・セラミドガラクトース転移酵素 (CGT) 遺伝子の発現調節機構を研究している。本年は CGT 遺伝子の ODC 特異的転写調節に寄与している領域を決定した。

ミエリン形成後，カリウムチャネルはランビエ絞輪近くに局在化するが，視神経の発達過程や脱髄マウスの解析からその誘導・維持に compact myelin が必要であることを示した。

アストロサイト分化過程の解析

岩崎靖乃，馬場広子，熊田竜郎，大竹洋介，池中一裕

アストロサイトに特異的な転写活性化因子をクローニングする系を確立した。グリア前駆細胞株に GFAP （アストロサイト特異的）遺伝子のプロモーター領域とレポーター遺伝子を組み込んだ細胞を用い，この細胞株にレトロウィルス法により cDNA ライブラリーを導入し，レポーター遺伝子の発現誘導の起きた細胞を FDG-FACS で回収した。今回はレトロウィルスの感染効率を上げること，陽性細胞の解析方法を改良する事により，幾つかのポジティブなクローンを得る事が出来，現在，クローンの解析を進めている。

また，アストロサイトの前駆細胞のひとつと考えられている放射状グリアの分化・発生過程を追う新たなマーカーとして，グルタミン酸トランスポーター (GLAST) を用い，マウス脳における発現を蛋白・ mRNA 両レベルで調べた。放射状グリアの発生は，部位と時期によって異なる様々な制御を受けている事が示唆された (390)。

[化学的糖鎖スクリーニング法] を用いた糖鎖解析と脳特異的糖鎖の生理学的解析

藤本一朗，Krishna K. Menon，伊藤磯子，池中一裕

我々は阪大の長谷教授らのグループと共に糖蛋白糖鎖を微量の組織から直接切り出し，蛍光標識した後，HPLC を用いて，詳細に脳の糖鎖構造を解析できる系 [化学的糖鎖スクリーニング法] を開発した。これにより，ある特定の領域の細胞群に発現する糖鎖を単離し，その構造を決定することが可能となった。さらに昨年，自動化を確立し多数のサンプルを簡易に処理できるようになった。

マウス，ヒト脳の糖鎖パターンを解析したところ，同じ時期，同じ部位では全くと言っていいほど，糖鎖のパターンは保持されていた。ヒト脳固定切片の解析は糖鎖発現に遺伝子背景が関与しないことを示唆する。しかし，E18, P1, P7, adult と時期を変えることで，マウス小脳の糖鎖中には大きな変動を示すものが見いだされた。

脳特異的糖鎖の BA2 を多量に発現する培養細胞 (CG4) を見つけだし，Gal 転移酵素を強制発現させ，糖鎖合成を変異させた。脳特異的糖鎖の生理機能の解明は，神経系の発生の解明のみならず，脳神経疾患の治療に貢献できると考えている。

レトロウイルスを用いた遺伝子導入法の開発および応用

南木浩二，奥村俊一郎，佐々木学，池中一裕

改良型パッケージング細胞と遠心濃縮法を用いることにより，高力価レトロウイルスを調整し，従来困難とされてきた神経系への遺伝子導入を飛躍的に向上させた。これを神経疾患に対する遺伝子治療のみならず，神経上皮細胞からの細胞系譜の解析にも応用した。　癌関連遺伝子の同定にレトロウイルスを用い，線維芽細胞が本来もつ contact inhibition の抑制を指標とするスクリーニング法を開発し，現在も臨床標本を使ってクローニング中である。

また，特定の組織や細胞において発現している遺伝子を同定しその発現の強さを定量できる serial analysis of gene expression (SAGE) を確立することを試みている。

液性情報研究部門

【概要】

液性情報研究部門では，分子生物学的手法と生理学的手法を用いて，脳神経系における情報伝達機構およびその可塑性に関する研究を行っている。これまで私たちのグループでは，神経伝達物質受容体・イオンチャネルなどのシナプス間情報伝達に重要な役割を果たす機能的分子のcDNAクローニング・発現を行い，これらの分子自体の機能を検討してきたが，最近では特に神経系のカルシウムシグナリングを中心的な課題とし，新たなカルシウムチャネルファミリーの同定と機能解析をすすめるとともに，これら機能分子の生理機能の検討を行っている。これらの機能分子の異常により変性性神経疾患が起こることが知られてきており，その病態解明も目指している。

分子生物学的手法は神経生物学の分野に大きな進歩をもたらしたが，チャネル蛋白など機能的素子の研究で得られた知識と，運動・知覚・記憶など高次脳神経機能の理解に必要な知識の間には，いまだに大きなギャップがあり，そのギャップを狭めるためには，神経情報伝達に関る蛋白の機能を生体であるいは生体に近い条件で観察することが重要となって来ている。生体機能を分子のレベルで解析していくためには，種々の技術的開発が必須であり，われわれのグループでも生体センサーの開発，測定機器の開発に取り組んでいる。

レセプター活性型カルシウムチャネルの同定と機能解析

森　泰生，岡田峯陽，清水俊一

レセプター活性型カルシウムチャネルのTRPチャネルの哺乳類ホモローグのcDNAクローニングとその機能解析を行った。マウスには数種類のTRPチャネルホモローグがあり，それらは主に脳に発現している。これらのチャネルの生理的機能は現在のところ不明であるが，まずこれらのチャネルを培養細胞に発現させ機能的性質を検討することを始めている。

電位依存性カルシウムチャネルの分子的機能解析

若森　実，森　泰生

脳には少なくとも数種の電位依存性カルシウムチャネルが混在する。それぞれのタイプは固有の性質を有しているが，混在しているため，固有の性質を検討することは困難であった。クロー

ン化されたcDNAから発現させたNタイプの電位依存性カルシウムチャネルの解析を行い，イオンの透過路の分子的構造，およびチャネルの開閉に伴うイオン選択性フィルター部位の構造的変化に関しての知見を得た。

電位依存性カルシウムチャネルの異常により起こる神経変性疾患の病態解明

若森　実，森　泰生，松山善次郎，井本敬二

P/Qタイプの電位依存性カルシウムチャネルの遺伝子の異常により，小脳失調症などの神経疾患が起こる。その分子的メカニズムを明らかにするために，モデルマウスであるtotteringマウスなどを入手し，分子生物学的手法と電気生理学的手法をあわせて用い，変異チャネルの解析およびその影響の解析をはじめている。

興奮収縮連関の分子機構

中井淳一

興奮収縮連関の分子的本体は，骨格筋カルシウムチャネルとリアノジン受容体という巨大な蛋白間の相互作用である。従来の研究でリアノジン受容体に情報を送るカルシウムチャネルの部分が明らかにされているが，リアノジン受容体からカルシウムチャネルにも情報が伝えられていることが明らかとなった。また骨格筋型リアノジン受容体と心筋型リアノジン受容体のキメラを用いた実験より，カルシウムチャネルとの相互作用に関わるリアノジン受容体の部分が明らかにされた。

高次神経機構研究部門

【概要】

本研究部門では哺乳動物行動を制御する神経回路の形成・脳機能発現の分子メカニズムを解明することを目的として研究を行っている。脳形成・機能制御関連遺伝子を探索するとともに，遺伝子ターゲティング法によるマウス個体レベルでの機能解析を行っている。

現在までに脳形成・機能発現に重要なFyn, NMDA受容体のサブタイプ，コラプシン，ニューロピリンの遺伝子欠損マウスを作製し，遺伝子と神経回路形成・行動制御との関連について研究

を行っている。また，Fynと結合する新たな分子を総括的に得ることにより，神経回路形成及び行動制御機構の分子メカニズムについて解析を深めて行きたいと考えている。

技術的には，遺伝子欠損マウス作製系を確立し，遺伝子操作の新たな方法・技術の開発を行っている（三宝）。

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

Fyn欠損マウスでは，脳形成や学習・情動行動の異常が認められており，脳神経系でFynと共役する分子はこれらの分子機構において重要な分子であることが予想される。我々は，グルタチオンーSートランスフェラーゼ(GST)とFynとの融合タンパク質によるアフィニティーカラムを用いることにより，脳神経系でFynと結合するタンパク質の同定を試みた。その結果，このアフィニティーカラムにはFynアミノ酸配列に特異的に多くのタンパク質が結合してくることが明らかとなった。このアフィニティー精製タンパク質を抗原としてモノクローナル抗体を作製したところ，130kDaに対する抗体が作製できた。この抗体による分子機能を解析した結果，1）p130はFynと結合する，2）p130は脳特異的に発現する。3）p130はシナプス肥厚分画に濃縮する，4）空間学習，情動行動，アルコール感受性に異常があるDBA/2マウス系統で分子量が異なる，ことが明らかとなった。現在，cDNAの単離に成功し，DBA/2での変異が明らかになっている。

酵母系での蛋白質相互作用を利用した脳形成・機能制御分子の同定

甲斐信行，八木　健

多種多様な行動制御を司る脳神経系では神経回路の多様な分化がおこる。現在までに神経回路の多様性を生み出す分子機構の存在が想定されているが殆どその実体は明らかとなっていない。このような分子機構を司る分子を単離・同定するためには，その発現が領域・時期において限定されていることが予想されるため，精度の高い分子単離・同定システムが必要となる。我々は，酵母内での結合蛋白質同定系を用いて脳形成・機能発現で重要な機能をもつことが明らかとなっているFynと結合する分子の同定を試みた。その結果，現在までにFynとの結合の強い分子を5クローン単離し，この内，1クローンはすでにFynとの結合が明らかにされているhn-RNPKであった。また2クローンは未知の分子であり，1つは脳神経系で高発現する新たなRNA結合

蛋白質であることが明らかとなった(J. Neuro. Sci, 1997)。

Fynと結合する新たなカドヘリン(CNR)の解析

先崎浩次，光村直洋，武藤哲二，八木　健

酵母中でのFyn結合分子の探索で得られた154クローン中に，膜貫通領域となる疎水性アミノ酸が存在する分子を見つけた。この予想細胞質領域でFynが結合できることが明らかとなり，全長のcDNAの構造決定したところ，新たなカドヘリン関連分子であった。従来までのカドヘリンと比べ25－35％のアミノ酸の相同性しかなく，細胞質領域は全く異なったアミノ酸配列であった。この分子はシナプスに存在し，マウスで約20種類のファミリーを構成していた（Neuron印刷中)。脳神経系での発現様式はFynと一致しており嗅球，海馬，小脳で高い発現が認められ，他の大脳皮質などでも発現が広く認められた。Zoo blotの結果，魚類，両生類，爬虫類，鳥類，哺乳類と脳の機能が高次化するにつれ，ゲノム上に存在する遺伝子数が増えており，脊椎動物の系統進化過程で重複が徐々に進んできた遺伝子であった。現在我々は，この分子を動物の進化の過程で重複した遺伝子であると考え，マウスを用いた脳領域分化，神経回路形成での分子機能の解析を行っている。情動形成に関わるFyn分子と結合する受容体型分子が脳特異的に発現し，動物進化の過程で徐々に重複している事実は，この過程での脳機能の多様化，高次化を考えるに興味深い分子である。脊椎動物種のゲノム構造の比較による遺伝的変異の変遷についても，進化に伴う遺伝子重複のメカニズムを考える上で興味深い。また，新規カドヘリン型受容体は上記した脳の進化に関わる遺伝子の条件を満たしていることより，この分子を脳の進化に関わった遺伝子であると位置づけ，近い将来，動物異種間での遺伝子交換による行動，脳機能の移植について解析を進めて行きたいと考えている。

新たな薬剤（ピューロマイシン）耐性遺伝子を用いたマウス胚幹細胞遺伝子操作法の開発

三宝　誠，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，我々はより簡便なキメラマウス作製技術の開発に努めている。また本年度，脳領域・時期特異的なターゲティング法を試みた。ES細胞段階でのCre-loxP組換え系をピュー

ロマイシンを用いて新たに開発する事に成功している (NAR, 1998)。

NMDA 受容体サブタイプ欠損マウスの解析

崎村建司，森　　寿（東京大・医），八木　健，三品昌美

現在までに NMDA 受容体サブタイプ欠損マウスを 4 種作製して，その行動異常，脳形成異常の解析を行ってきた。また本年度は新たな遺伝子欠損マウスの作製に成功し，現在，脳機能異常について解析を試みている。(計画共同研究の項参照)

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，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。われわれは現在までにマウスでこの分子を同定し，遺伝子構造を解析した。遺伝子欠損マウスの作製に成功し，末梢神経回路形成異常を明らかにした。コラプシンが哺乳類の末梢神経回路形成に重要であることが明らかになるとともに，コラプシンの受容体の特定にも成功した (Neuron, 1997)。

ニューロピリン欠損マウスの作製

木津川尚史，八木　健，藤沢　肇

ニューロピリンは神経回路形成において特徴的な発現をする細胞膜受容体である。我々はこの分子の神経回路形成に関わる分子機能解析を目的として遺伝子欠損マウスの作製を試みた。その結果，ニューロピリン欠損マウスでは末梢神経回路の異常及び血管走行の異常が認められた。また，ニューロピリンが神経回路形成におけるコラプシンの受容体であることを明らかにした (Neuron, 1997)。

エタノールによるシナプス Fyn の活性化

宮川　剛，八木　健，二木宏明

Fyn 欠損マウスはエタノールに感受性が高い。この分子メカニズムを明らかにする目的で，エタノール投与後での Fyn の活性化について調べた結果，エタノール依存的に NMDA 受容体の NR2B (ε2) が海馬体において Fyn によりリン酸化されることを明らかにした (Science, 1997)。この結果は，学習障害，情動異常に関わるエタノールの海馬シナプスへの作用機作を明らかにした結果として注目されている。(計画共同研究の項参照)

GAD65 及び 67 遺伝子欠損マウスの作製

神経化学部門と共同で GAD65 及び 67 遺伝子欠損マウスの作製に成功した。(神経化学研究部門の項参照)

情報記憶研究部門

【概要】

本部門は，1997年度をもって金子（教授・客員／慶應義塾大学医学部），倉橋（助教授・客員・大阪大学理学部）の客員任期が修了するため，５年間継続した研究（主に視覚，嗅覚及び味覚における情報変換機構）の最終まとめに関する研究を行った。嗅覚にかんしては，嗅覚受容器細胞（嗅細胞）の細胞内情報変換機構，順応機構さらにホルモン制御に関する研究をまとめた。また，味覚に関しては慶応義塾大学医学部の恒成　隆助手との共同研究を行い，カエル味細胞の苦み受容の研究を行った。この際，ケージド cAMP による細胞内 cAMP ジャンプによって細胞応答が修飾されることを見いだした。

嗅細胞電位発生に対するホルモン効果とその作用機構の研究

河合房雄，倉橋　隆，金子章道

古くから嗅覚の質は情動や体調に影響されると言われ，ホルモン性のシステム修飾であろうと考えられてきた。一般に，嗅覚は嗅粘膜上に位置する嗅細胞によって始まるわけであるが，ホルモンの影響が嗅覚の情報変換システムに直接影響を及ぼすとは考えられなかった。というのは，嗅覚受容を司る嗅細胞部位は対外環境に接する繊毛部に限られており，体内ホルモンがこの部位まで影響を及ぼすとは考えにくいからである。むしろ，一般的には，体内ホルモンは嗅粘膜に存在し，嗅粘液を分泌するボウマン腺に働きかけ，粘液の厚さを調節することで嗅細胞の感度を変化させているのであろうと考えられてきた。今回我々は，嗅細胞が細胞体において活動電位を発生し，匂い情報をコードする点に着目し，アドレナリン（嗅粘膜に免疫染色像が確認される）が活動電位発生に対する効果を検討した。その結果，アドレナリンはCaチャンネルを抑制し，Naチャンネルを増強させる2つの効果を持つことで活動電位の発生頻度を調節することを見いだした。これらの効果は抑制と増強という異なる現象ではあるが，ともに細胞内cAMP依存性のリン酸化によるものである。

電気生理学的実験におけるケージド化合物使用の励起システムの開発的研究

倉橋　隆，金子章道

近年，神経系や液性情報伝達系の研究分野において，細胞間情報伝達物質やセカンドメッセンジャーシステムの研究が活発化している。この様な細胞内メッセンジャー物質の細胞内での効果を知るための手法の一つに，近年，UV光照射によって物質を活性化するケージド化合物が開発され，生理学的実験に用いられるようになってきた。ケージド化合物は，光によって瞬時に活性化することや分解過程が光強度に依存して変化することなど，物質の挙動を光という物理量によって自在に制御できる特性をもっており，定量的なシステムの解析に有利な可能性を持っている。しかし，従来は，主に特定の物質の効果の有無のみを調べるような定性的な実験に使用されてきた。これは，主にケージド化合物の使用の歴史が比較的浅く，従って，生理学的実験条件でこの物質を制御することができるシステムが市販化されていないことによる。そこで本研究では，ケージド化合物の光分解反応のパラメータを定量化し，細胞システムを定量的に解析するように新たな実験を展開することを最終的な目標として，その実験に不可欠であるUV照射装置と調光システムを製作し，嗅細胞，味細胞に応用する。ケージド化合物を励起するためのUV制御装置の振動などは電気生理記録を行う上で致命的とされる。すでに我々の研究室では試験的にシステ

ムを構築しつつある。すなわちUV光源とその制御部を記録を行う顕微鏡とはクオーツ製の光ファイバーで機械的に分離し，光ファイバーの出力を倒立型顕微鏡の落斜蛍光装置に接続した。

カエルの味細胞の苦み応答に対する細胞内cAMP効果

恒成　隆（慶應大・医），倉橋　隆，金子章道

ヒトの味覚は，5基本味に代表される。このうち「苦み」に関しては，近年様々な知見が報告されている。一連の研究報告により，苦み情報変換機構には以下のような仮説が提唱されている。(1)味細胞受容膜に苦み物質を受容する蛋白質が存在し，(2)G蛋白を介して(3)PDEを活性化する。その結果(4)細胞内cAMP濃度が減少し，(5)cAMPに抑制されているイオンチャンネルが開口する。この仮説を検討するために，我々の研究室では，カエル味細胞を単離し，電気記録を行いながら，苦み物質で刺激する実験を試みた。その結果，刺激によって形質膜の陽イオンチャンネルが開くことが確認された。また，最近の実験の結果では，この苦み物質感受性陽イオンチャンネルは膜透過性のcAMPによって修飾されることを見いだしている。また，味細胞の苦み応答の最中に細胞内cAMPを上昇させる実験としてケージド化合物を使用し，苦み応答がcAMPジャンプによって抑制されるかを確かめたところ，一部は抑制されるものの，条件次第では増強される場合も観察されあ。以上の結果から，cAMP依存性パスウェイ以外の情報変換機構が苦み受容に関与している可能性が強く示唆された。

生体調節研究系

高次神経性調節研究部門

【概要】

我々が目で見て知覚する世界は脳内の複雑な視覚情報処理の結果生じている。視覚神経系は数多くの領域から構成される複雑な並列分散システムであり，異なる種類の視覚情報は違う場所で処理されていると考えられている。一方知覚にのぼる世界は全体として統一のとれたものであり，分散処理された視覚情報を統合する何らかの仕組があると考えられる。また二次元の網膜像から世界の三次元構造を理解できる事実が示すように，視覚情報処理はさまざまの拘束条件を用いた計算過程とみなすことができる。当部門では視知覚におけるこれらの基本的問題に関する神経機構を解明するために，大脳皮質を中心とするニューロン活動記録とその解析，及び心理学的方法による行動の解析を行っている。現在，現在（1）色情報の変換過程，（2）視覚系における面の表現，の二つを大きなテーマとして研究を進めている。（1）に関しては色相や彩度の情報を取り出す上で重要と考えられる錐体信号の非線形な処理がV1でどのように行われるかを調べた。（2）に関しては運動視における三次元的な面の表現，一様な面の明るさの表現，メタコントラストを用いた視野地図上での面の表現と知覚の関係を調べた。

大脳皮質一次視覚野における色情報変換

花沢明俊，小松英彦

大脳皮質一次視覚野(V1)の色選択性ニューロンにはその活動が錐体信号の線形和で表されるもの（線形ニューロン）と，表されないもの（非線形ニューロン）が存在する。非線形ニューロンは色覚における色相や彩度の表現の基礎になっていると考えられる。一方V1に入力を与える外側膝状体小細胞層には線形ニューロンのみ存在する。V1の線形ニューロンの活動は外側膝状体の異なる種類のニューロンの活動をさまざまな重みづけで線形加算したものとして説明できる。V1で非線形ニューロンが生じる過程に関しては，線形ニューロンと非線形ニューロンが直列的に順番に作られるという可能性と，別々に並列に作られるという可能性が考えられる。今年度はこのいずれの可能性がより確からしいかを検討するため，V1で線形ニューロンがどのような層に存在するかを調べた。もし直列モデルが正しければ，線形ニューロンは外側膝状体から入力を受ける4層に多く見られることが期待される。サルのV1ニューロンの色選択性を調べ線形ニューロンが記録された場所でマーキングを行った結果，線形ニューロンは2／3層，6層に多

く存在し，直列モデルからの予想と異なる結果が得られた。

MST 野における運動刺激による面の傾きの表現

村上郁也，杉原弘記，小松英彦

動きは物体の形状や面の傾きに関する重要な情報源となることが知られている。MST 野がこのような情報の処理にも関係するかどうかを明らかにするため，MST 野で運動刺激に反応するニューロンが回転面の傾きに対して選択性をもつかどうかを調べた。一点を中心に回転しているランダムドットを斜め方向から単眼で観察した時に生じる動きのパターンを刺激として用い，MST ニューロンの応答を調べた。その結果多くのニューロンが回転面の傾きを変えると応答の強さが規則的に変化し，回転面の三次元的な傾きの情報を伝えていることがわかった。またこれらのニューロンが記録された部位に WGA-HRP を注入して線維連絡を調べたところ，頭頂間溝の深部に限局して逆行性に標識されたニューロンおよび順行性の投射の終末が多く見られた。

視覚一次野における面の明るさの表現

木下正治，小松英彦

視野のある場所に現れた面の明るさの知覚は，そこから視野の上で離れた場所に現れた刺激の明るさの影響を受けて大きく変化することが知られており，このような知覚現象は明るさ誘導と呼ばれる。一次視覚野 (V1) が面の明るさの表現にどのように関わるかを調べるために，一様な面刺激の内部に受容野をもつ V1 ニューロンの活動を記録し，面の周囲の輝度を変化させて，面刺激に明るさ誘導を生じさせた時の活動の変化を記録した。その結果，V1 には面刺激の輝度そのものに応じるニューロンと，明るさ誘導の知覚に対応して活動が変化するニューロンが存在することがわかった。この結果は V1 が明るさ誘導における空間的な情報の統合に関与していることを示している。

メタコントラスト条件下でのV4野ニューロン活動

近藤秀樹，小松英彦

視野のある場所に現れた面の見え方は，時間的および空間的に隣接した場所に出された別の刺激によって影響を受けることが知られている。特に，面が現れて30-100ms後に，それと空間的に隣接して現れた刺激によってマスキングが起こり，最初に現れた面の見えが顕著に低下することが知られている。そのような現象はメタコントラストと呼ばれる。メタコントラストに対応して皮質視覚野の網膜対応地図上でどのような活動が生じるかを見ることにより，網膜対応地図上でのニューロン活動と面の見えの関係に関する手がかりが得られると考えられる。サルの視覚前野のV4野において受容野と重なる円形の刺激を呈示し，それと空間的に隣接する同心円状の刺激をさまざまなタイミングで呈示した。その結果V4野ニューロンの円形刺激に対する応答は，同心円状の刺激が同時に呈示された時に最も強く抑制され，呈示の時間差が大きくなるにつれて影響は小さくなることが見られた。

生体システム研究部門

【概要】

歩行運動の制御と高次脳機能

目的をもった歩行運動の発動には高次脳機能の関与を必要とする。高次脳から始まる歩行発動信号（フィードホワード信号）は脳幹および脊髄に分散配置されている要素的神経機構を活動させる。フィードホワード信号は視覚，前庭感覚，体性感覚器官からのフィードバック信号と絶えまなく参照・対比され，その内容が歩行運動の目的に適合するように修飾される。歩行運動の制御と高次脳機能のかかわりを解明するためには，個体発生的な観点からと系統発生的観点からの研究を並行して進めることが必要である。この目的を達成するため生体システム部門ではラット・ネコ・サルを実験動物として用い，多角的な観点からのシステマティックな研究を展開している。

新生ラットにみられる歩行運動の生後発達とセロトニン作動系

中隣克己，森　大志，高須千慈子，松山清治，森　茂美

セロトニン作動系は胎性期の早期に発達し，他の神経系の分化・発達に影響を及ぼすことが知られている。本研究では胎生期のセロトニン作動系発達が歩行運動の生後発達過程如何なる作用を持つかを明らかにしようとした。このため 5-HT 合成阻害剤 para-chlorophenylalanine (PCPA) を妊娠ラットに腹腔内投与し，胎生期の 5-HT 作動系の発達を抑制した仔ラット実験モデルを用いて，１）遊泳運動時の姿勢および四肢協調運動，２）縫線核内 5-HT 含有細胞および脊髄内 5-HT 含有線維投射，３）四肢筋支配運動神経細胞のそれぞれの生後発達について観察・解析した。この結果，PCPA 投与モデルでは生後早期に縫線核内 5-HT 含有細胞および脊髄内 5-HT 線維の発達が著明に抑制されるとともに，遊泳運動時の姿勢および四肢協調運動の発達が対照群に比較して有意に遅延した。さらに生後早期の四肢筋支配運動神経細胞の形態的発達遅延も見られた。生後14日齢以降の脊髄内 5-HT 線維分布が正常レベルまで回復した時期では，遊泳運動および運動神経細胞の発達に改善が認められた。以上より，5-HT 作動系は運動制御の要素的神経回路網の形成に対して促進的に働き，とくに胎生期から出生直後における歩行制御系の形成・発達に重要な役割を果たすと推定された。

歩行リズム形成に関わる脳幹・脊髄神経機構

松山清治，森　大志，久世文也，奥村　哲，中隣克己，森　茂美

歩行運動制御には，①歩行指令信号の下行性伝達系（網様体脊髄路系），②脊髄介在細胞群から構成される歩行リズム生成機構 (Central Pattern Generator)，③運動器官からの感覚情報フィードバック系の３者が相互に関連する。本研究ではとくに①②の関連に着目し，網様体脊髄路入力を受ける脊髄介在細胞の歩行リズム形成への関与および脊髄支配様式を明らかにしようとした。このため無動化除脳ネコの腰髄部で，網様体刺激により順行性応答発射を示す介在細胞の軸索より Neurobiotin(NB)-1M KCl 封入微小電極を用いて軸索内記録を行った。中脳歩行誘発野刺激による歩行リズム誘発時に介在細胞の発射活動を記録した後，NB を電気泳動的に軸索内注入し軸索および細胞体を標識した。この結果，記録細胞のほとんどは歩行リズムに対応したリズム発射を示した。また NB 標識細胞の多くはⅧ・Ⅶ層に細胞体が存在し反対側脊髄に軸索を伸ばす交連性介在細胞であった。以上より，同定した交連性介在細胞は左右歩行リズムの協調的形成に重要な役割を持つと考えられた。

斜流れベルト上でのサルの直立二足歩行運動：運動力学的解析

森　大志，中隣克己，奥村　哲，松山清治，森　将浩，高須千慈子，森　茂美

水平流れベルト上での直立二足歩行運動を学習したニホンサル *(M. Fuscata)* はどのようなストラトジィーを用いて傾斜流れベルト上での直立歩行を遂行するかを解析した。傾斜角は７，10，15度，流れベルト速度は 0.7, 1.0, 1.3, 1.5m/s に設定した。歩行運動の歩容を空間・時間的に解析するため，体幹，下肢の動きを軌跡として描画し，股・膝・足関節角度の変化などを同時記録した。空間的成分では傾斜角および速度の増加に伴い，サルは体幹軸をより前屈させ，股・足関節可動域を拡大させたが，膝関節のそれは減少させた。時間的成分では遊脚相は傾斜角・速度の変化に関わらずほぼ一定であったが，着地相は同一の測定速度では傾斜角の増加に伴い延長した。これらの結果より，サルは傾斜流れベルト上で重心を円滑かつ迅速に前方へ移動させる推進力を体幹軸および下肢関節の可動域を調節して遂行していることが明らかになった。

サル視覚誘導性上肢到達運動における脳内情報処理機構

宮下英三

視覚誘導性上肢到達運動に際して次の３つのカスケードが脳内で生じていると考えられている。すなわち，（１）視覚座標系での運動軌道の生成，（２）運動軌道の視覚座標系から運動座標系への変換，（３）運動軌道から運動命令の生成，である。本研究では視覚情報から運動命令への変換過程の中で運動パラメータがどの様に神経細胞活動に表現されているのか解明することを目的とする。この目的を遂行するために，新しく開発した運動課題遂行中の上肢運動パラメータと共に神経細胞活動をサル大脳皮質運動野から記録した。

記録した合計23個の神経細胞の内，運動に関連しない神経細胞および，手首あるいは手指の動きに関連する神経細胞を除いた11個を解析対象とした。11個全ての神経細胞で，神経細胞の発火プロファイルは手の速さプロファイルに相関があった。８個の神経細胞では手の特定の運動方向との相関があった。

小脳刺激により誘発される歩行運動と網様体脊髄路

松井利浩，久世文也，松山清治，森　茂美

除脳ネコ歩行標本の小脳正中部白質に連続微小電気刺激を加えると歩行運動が誘発できる。本研究では小脳刺激によって誘発される歩行運動がどの様な網様体脊髄路細胞を介して脊髄に伝達されるのかを解明しようと試みた。そのため除脳ネコ (n = 8) の橋延髄内側部領域で細胞外記録を行い，第一腰髄 (L1) の外・腹側索刺激により243個の網様体脊髄路細胞を逆行性に同定した。これらの細胞について小脳歩行誘発野刺激に対する応答様式や脳幹における局在，軸索下行路および軸索伝導速度を解析した結果，第1に小脳室頂核の出力は網様体脊髄路細胞に強力な促通性の影響を及ぼしていること，第2に室頂核からの locomotor driving signal は橋延髄網様体内側部の速い伝導速度をもつ網様体脊髄路細胞を介して脊髄へ伝達されていることが明らかにできた。

単一前庭脊髄路軸索の頚・胸・腰髄レベルにおける多髄節支配様式の解析

久世文也，松井利浩，松山清治，森　茂美

本研究では頚・胸・腰髄レベルにおける前庭脊髄路軸索の支配様式を比較することを目的とした。順行性神経標識法である PHA-L 法を用い，前庭脊髄路軸索を頚・胸・腰髄にわたり標識し，これらから単一軸索についての解析を行った。ネコの右 Deiters' 核に PHA-L (5%, 0.3μl) を注入し，２－12週の生存期間の後，頚・胸・腰髄部の厚さ 50μm の連続前額断切片を作製した。PHA-L 標識線維は生存期間２－３週，６－７週，10－12週のネコにおいて，それぞれ頚髄 (C1-T2)，頚・胸髄 (C5-T11)，胸・腰髄 (T10-L7) に認められた。標識軸索は頚・胸髄では前索から前側索にかけて下行したのに対し，腰髄では前索の内側部を下行した。連続切片上より単一軸索の走行軌跡を最長約 10cm （８髄節）にわたり追跡した。単一軸索から複数の軸索側枝が分枝し，これらは胸・腰髄に比較して頚髄で多かった。終末線維はいずれのレベルでも主として灰白質のⅦ層とⅧ層に分布していた。

無拘束ネコの尾状核カルバコール刺激による行動変化と脳内神経伝達物質濃度の変動

奥村　哲，Katalin Kekesi，森　将浩，松山清治，森　茂美

本研究は尾状核コリン刺激によって誘発される動物行動及び脳内モノアミン・アミノ酸レベル

の変動を明らかにする事を目的とした。そのため，ネコの尾状核，視床 VL/VA 核，吻側橋網様核の３ヶ所にマイクロダイアリシスプローベを慢性的に設置し，各部位の細胞外神経伝達物質濃度を高速液体クロマトグラフィーを用いて30分毎に測定した。ネコの行動解析には VTR 撮影に加え，脳波，頚筋筋電図，眼球運動電位，PGO 波の導出・記録も行った。実験では，各プローベ内を人工脳脊髄液で２時間潅流後，尾状核のプローベ内をカルバコールを含む人工脳脊髄液で１時間潅流した。この結果，カルバコール潅流開始直後から約２時間にわたって，尾状核のセロトニンレベルは著しく上昇した。また潅流開始後，覚醒状態が数時間持続し，同時に頚筋の筋活動の亢進が観察された。以上より，尾状核に対するコリン刺激は，尾状核のセロトニンレベルを上昇させるとともに，動物の睡眠・覚醒リズムに影響を与えることが示唆された。

高次液性調節研究部門

【概要】

本研究部門では，高次認知機能がどのような多層的調節システムによって発現してくるかの解明を目的としている。現在は，霊長類における認知記憶の大脳メカニズムを，電気生理学的・形態学的・分子生物学的方法を総合して研究している。霊長類では，認知的記憶（健忘症で失われる記憶。それ以外の「手続き的記憶」と区別される）は，海馬を中心とした側頭葉内側部と大脳新皮質連合野との相互作用により営まれる，との仮説が有力である。この仮説を検証するためには，視覚的形態認知・記憶に関連した領域（下部側頭回皮質や海馬）において，認知記憶過程を担うニューロンを具体的に同定し，記憶回路の全貌を解明する必要がある。我々は，臨床テスト (WMS-R) に類似した「対連合記憶課題」を開発し，大脳下部側頭回皮質において図形間連合をコードするニューロン群を同定し，この記憶情報が想起過程において活性化されるニューロン機構を研究している。現在さらに形態的方法を併用してこうした機能を実現する神経回路を解析している。また，本研究部門では東京大学医学部生理学教室との共同研究で，ヒト大脳皮質の活動を機能的磁気共鳴画像法 (functional Magnetic Resonance Imaging, fMRI) を用いて非侵襲的に解析している。

ことに最近，事象関連 fMRI 法 (event-related fMRI) と呼ばれる方法を開発して，時間分解能・空間分解能の大幅な向上に成功した。ウィスコンシン式カード分類課題のように，臨床的には大脳前頭葉症状の診断に最も良く使われているが責任病巣の正確な部位さえ不明な課題も，この方法によって大脳メカニズムの解明が進んでいる。また，大脳記憶機構解明の一環として霊長類の長期記憶形成過程に発現する遺伝子を，サルを用いてスクリーニング中である。RT-PCR 等の定量法によって神経成長因子等の遺伝子発現について解明したい。

霊長類下部側頭葉の機能的マッピング

納家勇治，吉田正俊，伊藤昭光，柴田愁子，宮下保司

霊長類下部側頭葉に物体の知覚または記憶に関係するニューロンがどのように分布しているかを電気生理学的手法により調べると同時に，これら視覚記憶ニューロンが構成する神経ネットワークを解剖学的手法により検討した。

手がかり刺激から特定な選択図形の想起を要求する視覚性対連合記憶課題は知覚処理のみならず長期記憶を要求する。ニホンザルに視覚性対連合記憶課題を学習させた後，MRIによりサル脳一個体アトラスを作成した。アトラスを参照しながら，課題遂行中のサルの下部側頭葉におけるニューロン活動を記録した。この電気生理学的マッピングの作成と並行して，さらにファースト-ブルーやジアミジノ-イエロー等の蛍光色素とコレラトキシンを同一個体に微量注入することにより下部側頭葉内におけるニューロンの投射様式を調べた。

事象関連型機能的磁気共鳴画像法 (event-related fMRI) によるウィスコンシンカード分類課題の大脳機構の解析

宮下保司，小西清貴，納家勇治，吉田正俊

The Wisconsin Card Sorting Test, which probes the ability to shift attention from one category of stimulus attributes to another (shifting cognitive sets), is the most common paradigm used to detect human frontal lobe pathology. However, the exact relationship of this card test to prefrontal function and the precise anatomical localization of the cognitive shifts involved are controversial. By isolating shift-related signals using the temporal resolution of functional magnetic resonance imaging, we reproducibly found transient activation of the posterior part of the bilateral inferior frontal sulci. This activation was larger as the number of dimensions (relevant stimulus attributes that had to be recognized) were increased. These results suggest that the inferior frontal areas play an essential role in the flexible shifting of cognitive sets.

事象関連型機能的磁気共鳴画像法 (event-related fMRI) による GO/NOGO 課題の大脳機構の解析

宮下保司，小西清貴，納家勇治，吉田正俊

We investigated the response inhibition function of the prefrontal cortex associated with the go/no-go task using functional magnetic resonance imaging in five human subjects. The go/no-go task consisted of go and no-go trials given randomly with roughly equal probability. In go trials a green square was presented and the subjects had to respond by promptly pushing a button using their right or left thumbs, but in no-go trials a red square was presented and subjects were instructed not to respond. When brain activity in no-go trials is dominant over that in go trials in areas in the prefrontal cortex, this no-go dominant brain activity would reflect the neural processes for inhibiting inherent response tendency. We used a new strategy of image data analysis by which transient brain activity in go or no-go trials can be analysed separately, and looked for the prefrontal areas in which the brain activity in no-go trials is dominant over that in go trials. We found the no-go dominant foci in the posterior part of the right inferior frontal sulcus reproducibly among the subjects. This was true whether the right or left hand was used. These results suggest that this region in the prefrontal cortex is related to the neural mechanisms underlying the response inhibition function.

サル大脳視覚野における最初期遺伝子の層特異的発現

宮下保司，奥野浩行，納家勇治，吉田正俊

To investigate intracellular mechanisms of cortical layer-specific gene regulation, we quantitatively examined the expression of two transcription factors, Zif268 and JunD, and compared their expression levels in each layer of the primary visual cortex (V1) and visual area 2 (V2) of macaque monkeys *(macaca fuscata)*. The brain sections were immunohistochemically stained for determination of the percentage of Zif268- or JunD-expressing neurons in the total neuronal population. We found area- and layer-specific expression of these transcription factors; Zif268 tended to be expressed at high levels in layers on the parvocellular pathway in V1, whereas JunD did not show such an expression pattern. In V1, many Zif268-immunopositive neurons were observed in layers II/III, IVCβ and VI. The percentage of Zif268-immunopositive neurons was highest in layer IVCβ and lowest in layer IVCα. JunD-immunopositive neurons were fewest in layer IVCβ and most

abundant in layer VI. InV2, the level of expression of Zif268 was almost the same as that of JunD in layer II/III. However, layer IV of V2 tended to contain more Zif268-immunopositive neurons than JunD-immunopositive neurons, whereas layer VI contained more JunD-immunopositive neurons than Zif268-immunopositive neurons. Although it has been reported that the same extracellular signals induce both Zif268 and JunD, the present results indicate that the expression of these transcription factors is differentially controlled in each layer of primate visual cortical areas. Furthermore, the present results suggest that these transcription factors contribute to area- and layer-specific gene regulation by mediating transmission of extracellular signals to the nucleus via different intracellular signalling pathways.

統合生理研究施設

感覚・運動機能研究プロジェクト

【概要】

当研究室は，1993年に初代教授として柿木隆介が赴任，その後徐々に教室員が増え，1998年1月時点では15名（留学中3名）が研究に励んでいる。一貫して脳波と脳磁図を用いたヒト脳機能の研究，特に各種刺激に対する誘発脳磁図および誘発脳波（電位）を教室のメインテーマとして研究を行っている。また1998年3月21－25日には，文部省COE国際シンポジウムを主催した。これは国際誘発電位シンポジウム(International Evoked Potentials Symposium, IEPS)との共催という形式で行われた。IEPSは「人の脳波と脳磁図の研究」を主要テーマとしており，第1回が1978年に英国のノッチンガムで開催され，以後は4年毎にクリーブランド，ベルリン，トロント，ミラノで開催されてきた伝統のある会議である。本分野におけるわが国の研究の発展及び生理学研究所における脳磁図研究が高く評価され，第6回(6th IEPS)が岡崎で開催されることとなった。会長は橋本勲教授で，柿木隆介が事務総長を務めた。海外27カ国から104名，国内から256名，計360名が参加し，国際シンポジウムの名に恥じない規模のものとなった。幸い天候にも恵まれて全スケジュールを予定通りに遂行することができた。

本年度における主要研究内容を列挙する。

(1) 体性感覚誘発脳磁図

従来より，体性感覚誘発脳磁図を検索する時には皮膚末梢を電気刺激する。この方法では信号は末梢神経の触覚線維を上行し，第1次感覚野の3b野に到達する。従って，筋紡錘由来あるいは深部固有感覚に関係する成分の，感覚野での受容部位を決定することは不可能であった。そこで指の受動運動を催起する新しい機器を制作して脳磁図を記録した。波形および活性部位は明らかに電気刺激の場合とは異なっており，3a野あるいは2野を発生源とすることが想定される結果であった。

触覚刺激が体性感覚誘発反応波形に大きな影響を与えることは以前より知られている。脛骨神経刺激による体性感覚誘発脳磁図に対する触覚刺激の影響を詳細に検討した。すると，刺激同側の足裏を触覚刺激するといずれの反応も有意に振幅低下するが，対側の足裏を刺激すると刺激後約60msecの成分が有意に振幅増加した。第1次感覚野での干渉作用のみならず，対側半球からの影響が示唆される所見であった。

電気刺激による体性感覚誘発反応は，第1次および第2次感覚野のみならず，第1次感覚野の後方(posterior parietal cortex, PPC)にも出現する可能性が最近報告されている。多双極子モデル(BESA)を用いて検討したところ，上肢，下肢あるいは唇刺激のいずれに対してもPPCに反応がみられた。体性感覚受容が単純なものではないことを示す所見であった。

(2) 視覚誘発脳磁場

格子縞反転刺激を用いて，周辺視野と中心視野刺激に対する視覚野の反応部位を脳磁図を用いて検討した。すると脳磁図反応は中心視野刺激に対しては小振幅で，周辺視野に対する反応は大きかった。これは中心視野に対する反応部位は後頭極付近にあるため双極子は radial 方向となり脳磁図では記録されにくく，周辺視野に対する反応部位は半球間裂にあるため双極子は tangential 方向であり記録されやすいものと考えられた。これは従来より言われている解剖的所見と一致するものであった。

(3) 仮現運動刺激に対する誘発脳磁場

ある物体（例えば線分）が適当な時間的，空間的間隔をおいて交互に呈示される時，ヒトはあたかもその物体が滑らかに動くかのように知覚する。このような「仮現運動」は，最近の霊長類による実験から実際運動と同じメカニズムで認知されると考えられるようになってきた。仮現運動に対する脳磁図を記録すると，ヒトの MT/V5 領域に相当する部位に反応がみられた。２つの線分間の距離を0.05，0.1，0.2，1.0，3.0，5.0度の６種を用いてそれらに対する反応を潜時を測定した。すると線分間の距離が大きくなると反応潜時が短くなることがわかった。これは新知見であり，現在そのメカニズムを検討中である。

高次脳機能研究プロジェクト

【概要】

統合生理研究施設高次脳機能研究プロジェクトは，哺乳類上丘中間層に入力するアセチルコリン作動性入力が空間的注意に基づいて視線の動きを修飾する機能を持つという作業仮説を立て，さらにそれを手がかりとして注意の中枢神経機構を統合的に理解することを目指している。そのためにその局所神経回路での作用メカニズムから個体の注意行動に与える影響まで，多面的に研究を展開している。具体的には（１）ラットの上丘スライス標本を用いてパッチクランプ法により上丘局所神経回路の構造と機能を明らかにするとともにアセチルコリン作動性入力に機能を解明している（伊佐正，斎藤康彦，遠藤利朗)。また（２）慢性サルを用いてアセチルコリン作動性システムが上丘によって制御されている眼球のサッケード運動をどのように修飾するかを解析している（伊佐正，相澤寛，小林康，山本優)。さらに（３）脚橋被蓋核から上丘へ投射する個々のアセチルコリン作動性細胞がどのような空間表現様式を持っているかを解剖学的に推定しようとする試みも行っている（伊佐，山本)。

上丘中間層へのアセチルコリン作動性入力が局所神経回路に与える作用

伊佐　正，遠藤利朗，斎藤康彦

生後17－22日齢のラット上丘スライス標本において中間層ニューロンからホールセル記録を行い，上丘中間層へのアセチルコリン作動性入力の機能解析を行った。その結果，アセチルコリン投与はニコチン型受容体を活性化することが明らかになった。ニコチン投与によって生じる内向き電流は顕著な内向き整流特性を示し，IC50 値 IC50 値は 12.7μM で，mecamylamine, dihydro-β-erythyoidine によって抑制されるが α-bungarotoxin, methyllycaconitine に対しては感受性がなく，α7 subunit を含まない受容体の活性化による。ニコチンの投与は中間層ニューロンに脱分極を引き起こし，視神経束の刺激によって中間層ニューロンに誘発される多シナプス性 EPSP を増強することから，上丘局所神経回路での興奮伝搬を促通し得ることが明らかになった。

サル上丘へのニコチン微量注入がサッカードに及ぼす影響について

相澤　寛，小林　康，山本　優，伊佐　正

外界のある感覚刺激に対して決まった運動を司る脳の回路が複数存在する場合，どのような神経機構がそのうちの一つを選択するのだろうか？　視覚対象に向かって視線を動かすサッカードの反応時間の分布には複数のピークが存在することが知られているが，1）そのうちの超短潜時のエクスプレスサッカードの発現には上丘内の浅層から深層へ直結する回路が促通して起こる，2）この促通には上丘へのアセチルコリン作動性入力が関与する，との仮説をたてた。このことを確かめる第1歩としてアセチルコリンのアゴニストであるニコチン (1-10 mM, 1-2 ml) をサッカード課題を訓練したニホンザル2頭の上丘に微量注入したところ，1）潜時の短縮とエクスプレスサッカード頻度の増加，2）運動の内容（ダイナミックス）には変化は起きない，ということを観察した。この結果は上記の仮説を支持する。

視覚誘導性サッカード遂行時の脚橋被蓋核ニューロンの活動

小林　康，伊佐　正，山本　優，相澤　寛

上丘にコリン作動性入力を送っている脚橋被蓋核ニューロンの電気活動をサッカードを行っている覚醒サルより記録したところ，1）サッカード開始前の準備状態で活動を徐々に増加させ，

サッカード遂行直前から遂行中にかけてバースト状に発火するニューロン群と2）指標を凝視しているときに一定の発火頻度で発火し，サッカード遂行直前から遂行中にかけて発火頻度を急激に減少させるニューロン群が見出された。

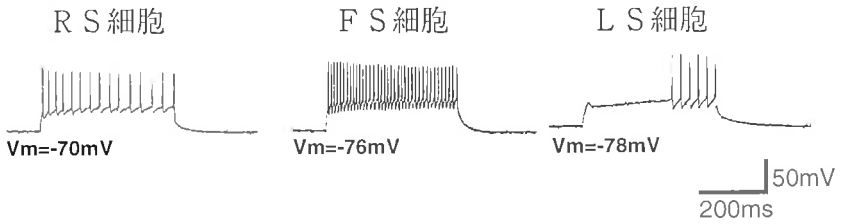
さらに，サッカード課題遂行中にターゲットが現れる可能性があるスクリーン上の場所を限定するとサッカードの反応時間が減少することが観察された。この反応時間の短縮は空間的注意の上昇と解釈することができるが，この反応時間の短縮に伴って，サッカード準備状態での活動を変化させるニューロン群も見出された。

これらの結果は，上丘へのコリン作動性入力が空間的注意に基づいてサッカード運動の開始を制御している可能性を示唆する。

上丘中間層ニューロンの発火特性と一過性外向き電流の関連について

斎藤康彦，伊佐　正

本研究では，上丘中間層において異なる発火特性をもつ細胞群（図）の間にみられる一過性外向き電流(VOCs)の特性を比較することを目的とした。ラットの上丘スライス標本から中間層の細胞をホールセルパッチクランプ法により記録を行い，発火様式およびその細胞のVOCsを解析した結果，LS細胞のVOCsには不活性化の時間経過が速く振幅が大きいものと，不活性化の時間経過が遅いものがあった。RS細胞，FS細胞では不活性化の時間経過は速く，振幅は小さかった。また，FS細胞のVOCsは高い膜電位で活性化するのに対し，RS細胞，LS細胞ではより過分極側で活性化した。以上のように発火特性の異なる神経細胞の間で異なるタイプのVOCsが見られた。このことから，異なる発火特性が生じる原因の一つにVOCsの特性の違いが関与していることが示唆される。



図：上丘中間層で見られる異なる発火特性をもつ細胞群。左より，一定したスパイク間隔を持ち発火頻度が30Hz以下のRegular spiking neuron（RS細胞），60Hz以上の安定した高頻度発火を示すFast spiking neuron（FS細胞），スパイクの生成が時間的に遅れるLate spiking neuron（LS細胞）を示す。

上丘浅層ニューロンの電気生理学的特性と形態学的特徴

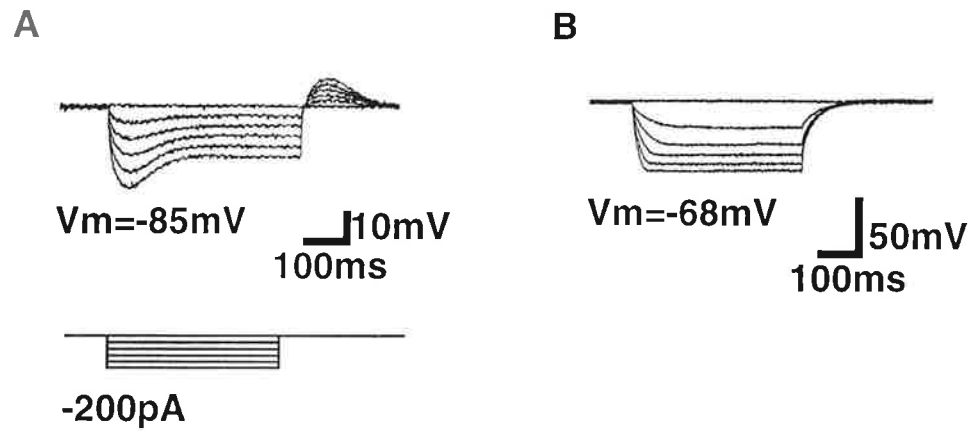
遠藤利朗，伊佐　正

生後17－21日齢ラットの上丘スライス標本を用い，ホールセルパッチクランプ記録とバイオサイチンの細胞内注入により上丘浅層ニューロンの電気生理学的特性と形態学的特徴を調べた。上丘浅層ニューロン (n = 173) は脱分極通電に対する発火パターンから5種類に分類でき，そのうち(1) regular spiking neuron (2) burst spiking neuron が大部分を占めた（51％と38％）。(2)のバースト発火には低閾値型 Ca^{2+} チャネルが関与することが示された。過分極通電に対しては多くの細胞で活性化の遅い内向き電流（Ih, 図A），または速い内向き電流による内向き整流特性（図B）が見られた。形態は Langer と Lund (1974) に従って5種類に分類でき，いずれでも(1)と(2)が見られた。とくに wide field vertical cell と呼ばれる細胞はすべてが Ih を示し，他の細胞が示す Ih より活性化が速く（-60mV から -130mV のパルスを与えたとき，τ = 0.12 ± 0.01sec, mean ± s.e., 他は τ = 0.30 ± 0.04sec），電流量が大きい (I = 10.8 ± 1.1pA/pF, 他は I = 3.2 ± 0.3pA/pF) ことが明らかとなった。

脚橋被蓋核から上丘へのコリン作動性投射の空間的特異性の検討

山本　優，伊佐　正

ラット上丘中間層へのアセチルコリン作動性入力の起源を調べるため，上丘に蛍光色素を注入



し，逆行性標識と ChAT の抗体染色を併せて行ったところ，脚橋被蓋核 (PPN) と二丘傍体核と背外側被蓋核に二重標識されたニューロン群が見出された。そのうち PPN に BDA を注入すると上丘中間層に順行性に標識された神経終末が観察された。ので PPN がこのコリン作動性入力の起源であることが明らかになった。また個々の PPN ニューロンの上丘における投射範囲を調べるために左右の上丘に Fast Blue (FB) と Diamidino Yellow (DY) をそれぞれ注入し，二重標識される細胞の占める比率を調べた。FB と DY で標識されたそれぞれ244個，1387個の細胞のうちで二重標識されたものが44個見つかった。これにより PPN から上丘の両側に投射するニューロンが一部存在することが明かになった。

自律機能研究プロジェクト

研究の概要

ヒトは外界から刺激を受けると，刺激に含まれる有用な情報を抽出し，合目的的に処理し，その処理結果に基づいて行動を起す。感覚入力から出力としての行動に至る一連の情報処理を行う中枢神経系の活動を脳磁図を用いて非侵襲的に観測し，解析することが本研究プロジェクトの重要な目的の一つである。本プロジェクトでは主に体性感覚，聴覚，視覚を入力とする高次脳機能の解析を行うとともに，ヒトが日常体験する多種感覚（体性感覚，視覚，聴覚）の情報統合のメカニズムの解明を目指している。さらに出力系として，随意運動に先行する運動時の活動を脳磁図を用いて計測，運動発現の脳内メカニズムの解明を目指している。また，体性感覚野と運動野の再構築の病態生理学について非侵襲的に計測し解明していく。具体的には，以下のようなテーマで研究を進める計画を立てた。

1．体性感覚刺激に含まれる要素的感覚情報である空間位置，強度，周波数の皮質再現
2．複合感覚，特に体性感覚系におけるパターン認知のメカニズム
3．体性感覚野からの高周波磁界信号 (300-800 Hz) の生理学的メカニズム
4．多種感覚情報の統合メカニズム
5．言語的課題を処理する脳活動の計測
6．点字使用者（盲人）の体性感覚野の再構築
7．腕神経叢損傷に対する助間神経移行術後の運動野の再構築

研究活動報告

本プロジェクトは，1997年４月に橋本・福島が着任し上記の計画に従って実験を開始したが，まだ日が浅く，実験データの解析も十分ではない。従って，各課題の研究活動報告は次年度に行う。

生理機能研究施設

生体機能検査室

【概要】

生体機能検査室では，共同利用として従来から活用されている人工気候室，音響実験室が引き続き稼働した。また分子レベルでの生体機能現象の研究のための施設充実を行った。遺伝子工学を用いた蛋白質分子の生産，蛋白質精製，生体分子の構造解析の設備を整え，所内外との共同研究に対応している。

15N ラベル蛋白質を用いたカルパスタチン機能ドメインの溶液構造の解析

今野　卓，鎌足雄司，C. Dobson （Oxford 大），牧　正敏（名古屋大・農）

カルパスタチンは蛋白質分解酵素カルパインの特異的阻害蛋白質である。この系は，細胞内での蛋白質処理機構に特別な重要性を持ち，様々な病態にも関与する。我々の従来の研究で行ったカルパスタチンの構造多様性の解析を微視的レベルにまで進めるため，15N 核種でラベルしたカルパスタチンを作成し，多次元 NMR 測定の適用を企図した。カルパスタチンは大腸菌中での分解速度がきわめて速いため，最小培地を用いた 15N ラベル蛋白質の生産は極めて困難であった。結局，詳細な培養条件の検討により，１リットルの大腸菌培養液あたり約 10 mg の 15N ラベルしたカルパスタチンの純品を得た。現在，Oxford 大学のグループと共同で HMQC 法等を用いて NMR による構造解析を進めつつある。

円二色性スペクトルの特異値分解法を用いた蛋白質の相的性質解析法の発展

今野　卓

蛋白質鎖は，細胞内での合成から分解までの履歴中で様々な局所的条件を通過し，それに応じて多様な構造状態をとると考えられる。この生理的意義及び物性論的観点から，溶液条件の摂動に対する蛋白質構造の変化を効率よく正確に記述する方法論の発展は，重要な意義を持つ。これへの寄与のため，遠紫外領域の円二色性スペクトルを用いた体系的な構造解析法の確立を行った。具体的には，500本あまりの蛋白質の円二色性スペクトルをごく高精度に測定し，それで構成さ

れるデータ行列に対して特異値分解を含む線型変換を施すプログラムを作成した。この解析結果を他の分光測定で決めた構造変化特性と比較照合したところ，充分満足な結果を得た（1998年4月に論文掲載)。なお，本研究のため作成したプログラムは，国内外の研究者に提供している（www2.umdnj.edu/cdrwjweb に登録予定)。

アミノ酸溶解度の精密測定

今野　卓
岩下　潤（東京大・理)，市川　修，永山國昭

蛋白質の構造変化はその機能と密接に相関するが，この現象は細胞内では種々の局所環境で実現する。その構造変化の決定因子を要素過程に分解すると，蛋白質を構成するアミノ酸とその環境を構成する溶液分子や蛋白質・膜の構成要素との相互作用に還元できる。従って，この個々の相互作用の自由エネルギーを実験的に決定することは，基本的重要性を持つといえる。この定量は，各アミノ酸の種々溶媒に対する溶解度の測定で実現することができる。我々のグループは，NMR 法・乾燥重量法の併用により，水・重水・ソルビトール溶液・メタノール・TFE 等に対する各アミノ酸の溶解度の精密測定を行っている。このデータは，他の研究課題の結果を物理化学的に解釈するための基礎をなす。

X線溶液散乱法を用いた非天然状態蛋白質の構造解析

今野　卓，森　泰生
片岡幹雄（奈良先端大)
稲葉謙次，石森浩一郎，森島　績（京都大)
鎌足雄司（Oxford 大)，黄地祥子，赤坂一之（神戸大)

蛋白質の合成過程・膜透過等で出現するいわゆる非天然状態では，高度な構造揺らぎのため原子レベルでの構造記述は意味を持たないことが多く，むしろ分子の広がり・表面のフラクタル性などの平均的性質による記述が不可欠である。この幾何学的構造情報を得るためには，小角領域でのX線散乱法 (SAXS) が最適である。非天然状態の蛋白質鎖への SAXS の適用の歴史は比較的新しく，データ蓄積の不足とも関係して解析方法には発展の余地を残している。この点に寄与するため，キメラヘモグロビンを含む多くの蛋白質について，所内外の研究者と共同研究を進めている。この測定の通常の問題点はX線源の弱さにあるが，これはシンクロトロン放射光の利用に

よって画期的に解決される。シンクロトロン放射光を用いた測定は，国内では筑波と播磨にある高エネルギー加速器機構の施設利用が必要であり，定期的な測定を維持するため今野を研究代表者とする共同利用課題が採択されている。

アルコール中における蛋白質鎖の特異構造の解析

今野　卓
鎌足雄司（Oxford 大），片岡幹雄（奈良先端大）
牧　正敏（名古屋大・農），田中直毅・金折賢二（京都工繊大・高分子）

アルコール溶液中での蛋白質・ポリペプチド鎖の構造の研究には長い歴史があるが，アルコールのもつ構造変化能の物理化学的起源は，まだ充分に理解されてはいない。我々の研究グループは従来から，アルコール溶液中での蛋白質の構造多様性を詳細に解析し，新たな現象を幾つも報告した。97年度は，低濃度のハロゲン化アルコール溶液中での蛋白質鎖の構造を詳細に解析した。この結果は，アルコールの蛋白質鎖の構造に対する効果が複数の違った機序の微妙なバランスで成り立っていることを，興味深い形で示唆した。(1998年 5 月現在，論文投稿中)

高圧下での PVP 高分子と疎水性リガンドの会合に伴う構造変化の解析

今野　卓，田中直毅・功刀　滋（京都工繊大・高分子）

蛋白質の物性研究では，その一次配列の複雑さが原因で解析が困難になる場面に，多く遭遇する。従って，その複雑さの中から一部の特徴だけを抽出した合成高分子モデルを用いた研究が有効である場合がある。我々は，蛋白質における疎水的結合力のモデル解析のシステムとして，高分子研究の専門家と共同して PVP 高分子と疎水性リガンドの会合現象を扱っている。特に，PVP 高分子と疎水性リガンドの結合力は加圧により変化するが，その変化の方向は PVP 高分子の分子量に特異的に依存することが，97年度の研究で明らかとなった。この結果の意義を解釈するためには，状態数 3 ～22の平衡状態でのマルコフモデルをあてはめる解析を行った。(1998年 5 月現在，論文投稿中)

組織培養標本室

【概要】

本年度は保温箱付き蛍光位相差微分干渉倒立顕微鏡（オリンパス）を整備した。蛍光標識した細胞や蛍光物質を産生している細胞の動向の観察,記録に利用されている。本年度の常時利用者は，所内８部門２施設45名，所外７名の合計52名であった。

Intravenous injection of guanylin induces mucus secretion from goblet cells in rat duodenal crypts.

by Sonoko Furuya, Satoru Naruse & Tetuo Hayakawa.

Guanylin, structurally related to the heat-stable enterotoxin of *E.coli,* is a 15 amino acid peptide isolated from rat small intestine. We investigated the morphological effects of an intravenous injection of rat and human guanylin upon the rat intestine. Various doses of rat guanylin were injected intravenously in anesthetized rats. After 5, 10 and 30 min, rats were sacrificed by intracardiac perfusion with aldehyde fixative, and specimens of the intestine were then prepared for light and electron microscopy. Intravenously injected rat guanylin rapidly induced mucus secretion from crypt goblet cells in the duodenum. About half of the crypt goblet cells secreted mucous granules by compound exocytosis within 5 min (Fig. 1, 2). The villus goblet cells, in contrast were not sensitive to guanylin (Fig. 1). Goblet cells in the jejunum were less responsive compared with those in the duodenum.This secretory response was rare in the ileum and colon. Human guanylin produced similar results. The mucus secretion induced by guanylin was inhibited by a prior-injection of atropine, but not hexamethonium (Fig. 1, 2). Moreover, guanylin induced intense edema in the mucosa and submucosa of the small intestine 5 min after the injection, which disappeared after 30 min. A prior-injection of atropine did not block the appearance of edema. In conclusion, the intravenous injection of guanylin induces two phenomena related to water movement; 1) compound exocytosis of mucous granules from crypt goblet cells in the rat duodenum and jejunum; and 2) perineural, inter-epithelial and intra-epithelial edema in the rat small intestine.

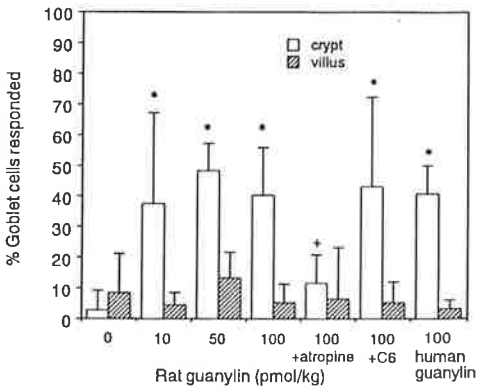


Fig. 1. Number of goblet cells responded to guanylin

The percentages of the number of goblet cells with clear cavities to the total number of goblet cells in the duodenal crypts and duodenal villi are shown. Rats were fixed by intra-cardiac perfusion 5 min after the injection of each dose of rat or human guanylin. Atropine (1mg/kg) or hexamethonium (C6; 2 mg/kg) was injected 5 min prior to an injection of 100 pmoles/kg rat guanylin. The numbers of rats analyzed are as follows; rat guanylin: 0 (n = 10), 10 (n = 4), 50 (n = 4), 100 (n = 13), atropine + 100 (n = 9), C6 + 100 (n = 5) and human guanylin 100 pmoles/kg (n = 4).
Data exhibiting a significant difference are indicated (*$p<0.01$ vs.guanylin 0 pmole/kg, + $p<0.01$ vs. guanylin 100 pmoles/kg analyzed by Scheff'es test).

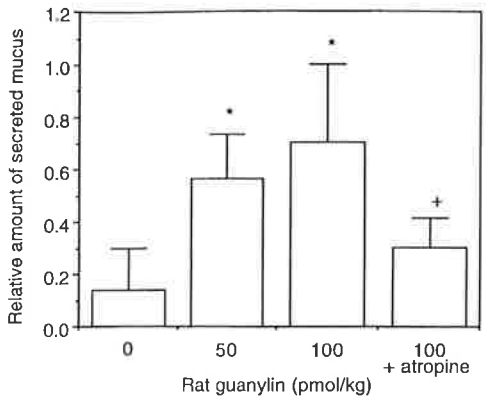


Fig. 2. Relative amount of secreted mucus induced by guanylin

An average 500,000 mm^2 of duodenal mucosa below the villus/crypt junction (crypts plus lamina propria mucosa) was analyzed in each animal. The areas of mucous granules, clear cavitation of mucous granules and expanded crypt lumen were measured and expressed per unit area. The relative amount of secreted mucus is expressed as the ratio of the cavitated area of mucus granules plus the area of expanded crypt lumen to the total granule area per unit area. The numbers of rats analyzed are as follows; 0 (n = 6), 50 (n = 4), 100 pmoles/kg of rat guanylin (n = 6) and atropine + 100 pmoles/kg of rat guanylin (n = 5). Data exhibiting a significant difference are indicated (*$p<0.05$ vs. guanylin 0 pmole/kg, + $p<0.05$ vs. guanylin 100 pmoles/kg analyzed by Scheff'es test).

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９年度は共同利用実験計画が16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９年度は最終的に19課題が採択され，18課題が実施された。これらは，主に①厚い生物試料の立体観察と三次元解析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。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。また生理研生命科学実験技術トレーニングコースの一課題として超高圧電顕操作実習（2.5日間）を，行っており，今年度は若手の研究者2名の参加があった。

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，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，自然状態における観察のための基礎実験等に取り組んでいる。また濵生理研前所長（平成9年3月まで）を代表とする平成6-8年度の国際共同研究の一環として，米国カルフォルニア大サンヂエゴ校のNCMIR（National Center for Microscopy and Imaging Research: エリースマン教授代表）と提携して，超高圧電子顕微鏡像に対するトモグラフィー解析用プログラム(suprim)の導入を進めている。さらに60度傾斜用の回転ホルダーを，新たに導入した。また，前年度に引き続いて走査線本数1,024本の高感度高解像度撮像管であるハーピコン管を用いての1,000 kVで加速された電子による蛍光板（カメラ室下部に設置されている）上の超高圧電顕像の結像特性を実験的に検討しており，さらに蛍光板に改良を加えて，より高感度，高分解能化を目指して応用研究を行っている。また超高圧電子顕微鏡本体に用いている試料位置表示装置に表示される模様を印刷できるようにプログラムを改良した。

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171日，修理調整等65日である（技術課超高圧電顕室報告参照)。電顕フィルム使用枚数は8,252枚，フィラメント点灯時間は528.2時間であった。装置は，平均94％の高い稼働率で利用されており，試料位置で10^{-6}Pa台の高い真空度のもとに，安定に運転されている。

電子線二次元検出器としてのイメージングプレートと電顕フィルムの比較

有井達夫

画素サイズ25μm角の電顕用イメージングプレート（Fuji: FDL UR-V; 16,384階調）[1]とこれに対する読みとり機(Fuji: FDL 5000)の特性を超高圧電顕H-1250M（常用加速電圧1,000kV）を用いて測定し電顕フィルムの特性と比較検討してきた。

イメージングプレートにおいては，読みとり機からの出力(raw data)は，変換式を用いれば強度となる。このとき独立した画素に対する電子の検出量子効率は，照射電子数の少ない領域においてraw dataから強度に変換する時に不可避のカットオフ効果を除去できる範囲で，次式[2]を用いると求めることができる。

$$\eta' = (I_E - I_0)^2 / (N(\sigma_E^2 - \sigma_0^2))$$

N：画素あたりの平均電子数，I：平均強度，σ：標準偏差

この結果，イメージングプレートの114kVでの基本画素(25μm × 25μm)に対する見かけの

DQE は最高感度 (S = 200) のときに，約3.5と理想値 (DQE = 1) よりも高いが，点像分布関数を考慮した実効的な画素サイズ８×８画素を１画素（ほぼ独立した画素）とすると1.0になった。加速電圧 1,000kV では，基本画素で1.0程度と理想値に近いが，８×８画素を１画素とすると0.4程度まで減少することを報告している（年報17[3]）。

今回，イメージングプレートの場合と同様の方法で，電子線二次元検出器としての電顕フィルムの特性を測定しイメージングプレートと，より詳細に比較した。このとき両者のデータを同等に比較できる量に変換して取り扱うことが重要である。フィルムの場合は強度に相当するのは，光学的濃度（黒化度；O.D.）である。加速電圧 114 ～ 1,000kV の範囲においてマイクロデンシトメーター (Perkin Elmer: PDS1010M) による光学的濃度の出力はバックグランドの影響を除くと，平均照射電子数に対して，幅広い範囲 ($0 < O.D._{\infty} < 4$ ～ 5) に対して線形な関係にある。また加速電圧 1,000kV で，20℃，コピナール６分現像で 20μm 角の画素に対して η' は約0.2と求められた。このときの加速電圧 1,000kV でのイメージングプレートと電顕フィルムとの間の平均照射量と強度または光学的濃度との関係を図１に示す。イメージングプレートの特性とフィルムの特性は点像分布関数の拡がりを考慮した実効画素で考えると近い関係にあることがわかる。イメージングプレートにおける利点は，ダイナミックレンジを広くとれることと，電子線照射直前に，可視光を照射して，乳剤中に励起されている励起子（色中心）を消去できるために，環境による放射線などの影響をほとんど除去できること，および一個の電子により励起される励起子の数が多いため感度が高く低照射量側においても装置に起因するノイズを少なくできることである。欠点は，乳剤の厚さが 110μm と厚いため点像分布関数に起因する空間分解能およびコントラストの劣化があり，また照射量が多くなると画素間の検出感度のばらつき（画素当たりに含まれる乳剤のばらつき）などの効果が量子ノイズよりも大きくなり，一様照射下で，箇々の画素間の感度のばらつきが電顕フィルムに比較してより大きくなることである（年報17)。一方，電顕フィルムにおいては，低照射量側において光学的濃度測定時のノイズの影響がある。フィルムの黒化度；O.D. の測定においてはバックグランドの影響を測定フィルムに依存するかたちで定量的に見積もることができる。マイクロデンシトメーター (PDS1010M) による場合では20℃，コピナール６分現像で 20μm 角の画素に対して未照射領域でのバックグランドの黒化度の標準偏差は σ_0 ～ 0.01 となる。この値は同じ条件での 1,000kV での電子数の変動に換算すると約60個／画素に対応する。イメージングプレートでは 1,000kV で，画素あたり平均照射量約６個未満ではカットオフ領域にかかるところが生じる。このとき 25μm 角に対して約２個未満（８×８画素では128個／画素に相当してしまう）のところの強度情報が不確定になる。この意味で，η', σ_0 とは異なる装置に起因する誤差を低照射領域で含むことになる。（この意味での誤差は FDL5000 が，raw data ではなく，直接，強度を出力すれば防ぐことができる。）これに加えて，電子線照射量が増加すると上部からのハードなＸ線の影響や観察室内に到達した電子線により発生するＸ線および反射電子線などの影響があるのでバックグランドとしてのみかけの電子数は，イメージングプレートにおいてもフィルムにおいても観察室に到達した全電子数にも依存しているので，定量的

な議論にあたっては，撮影方法を工夫する必要もある。

1）N. Ogura, K. Yoshida, Y. Kojima and H. Saito: ICEM 13-Paris, 219-220 (1994)

2）T. Arii, N. Yoshimura and Y. Kamiya: J. Electron Microsc. 42, 55-63 (1993)

3）有井達夫，吉村伸明：生理学研究所年報　17, 90-95 (1996)

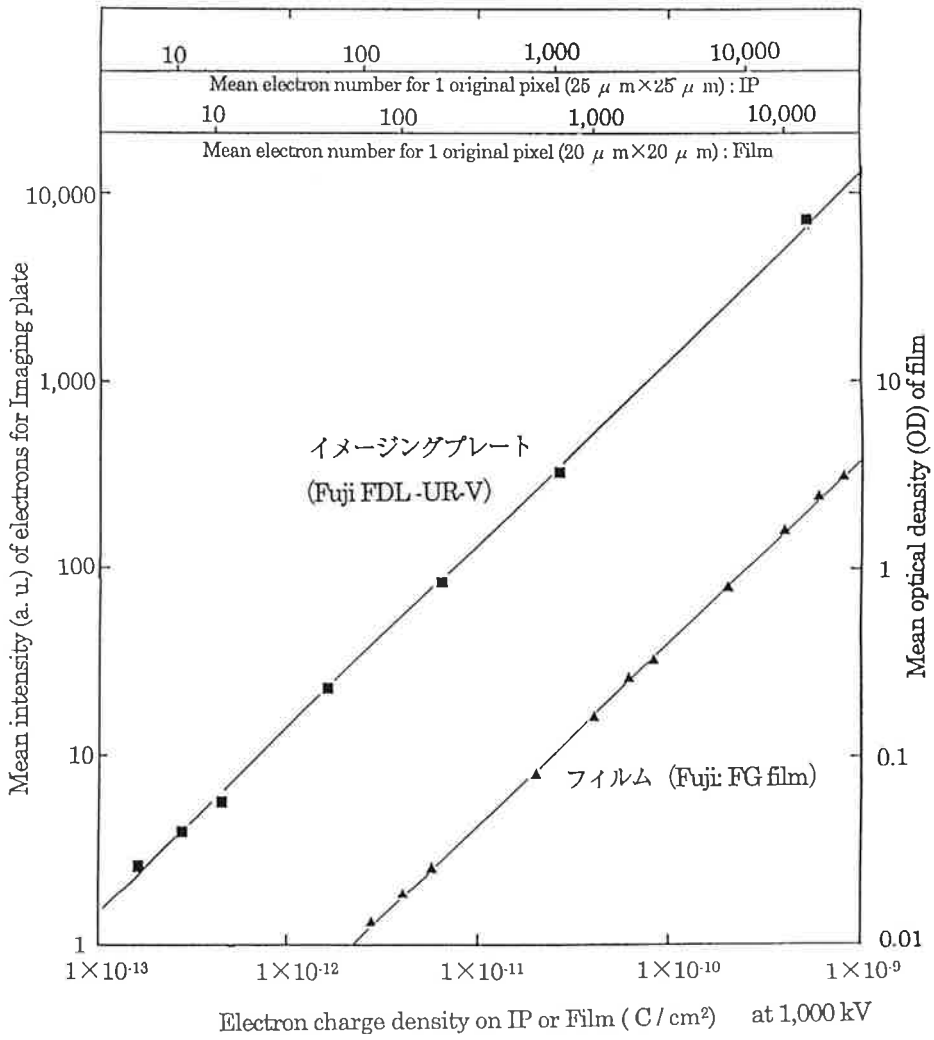


図1　フィルムおよびIPの電子線検出特性の比較

電子計算機室

【概要】

電子計算機室では，中央設備である生体情報解析システムと所内ローカルエリアネットワーク(LAN)の維持・管理を行うとともに，新たな研究対象，手法に対応したデータ解析，画像処理，モデリング・シミュレーション環境の開発を行っている。また，視覚神経系のニューロン活動に対する研究を，計算論的立場から進めている。現在，(1)網膜水平細胞の光応答特性を生成するために必要な視細胞－水平細胞間の機能的な回路構成，(2)皮質ニューロン活動に及ぼす複数のシナプス入力の効果に関する解析を行っている。

コイ網膜 R/G 型水平細細胞のダブルフラッシュ応答特解析

石井宏幸
藤川智博（豊技大・情報工学）
神山斉己（愛知県立大・情報科学）
臼井支朗（豊技大・情報工学）

ダブルフラッシュ光刺激に対するコイ網膜 R/G 型水平細胞の応答特性を解析し，視細胞（錐体）－水平細胞間の回路構成の観点から，その生成メカニズムを検討した。まず，３色 LED を光源とする光刺激装置を用いてダブルフラッシュ応答を細胞内記録した。記録した膜電位応答から，１発目の刺激のみに対する膜電位応答を引くことにより，２発目刺激に対する応答成分を抽出した。次に，R/G 型水平細胞への主な入力と考えられる緑錐体からの直接入力と緑錐体を介したＬ型水平細胞からのフィードバック入力に相当するテンプレート波形を用意し，抽出した２発目刺激に対する応答成分を２つのテンプレート波形の線形和で再構成した。再構成波形は抽出した２発目刺激に対する応答成分をよく再現したが，各テンプレートの係数や時間遅れ（特徴パラメータ）は，ダブルフラッシュの刺激間隔や色の組合せに依存した変化を示した。そこで，視細胞（錐体）－水平細胞ネットワークモデルを用いた計算機シミュレーションにより，その生成メカニズムを検討した。その結果，特徴パラメータの特性は，Stell らの基本的なシナプス結合様式と錐体における光感受性コンダクタンスの飽和特性，錐体の持つダイナミクスにより生じることが示唆された。

動物実験施設

概要

生命科学研究の場である動物実験施設に期待される役割は多岐にわたるが，近年，生理学研究所，基礎生物学研究所の研究人口の増加が著しく，それに伴って新たな実験計画に応えるための様々な取り組みが行われている。

トランスジェニックマウスやノックアウトマウスなどの遺伝子導入動物や分子生物学的手法を用いた動物実験は，ますます広範な領域で用いられるようになると共に，国内外を問わず施設間の移送も頻繁に行われるようになってきた。施設間の動物の移送が増えるに伴って，施設で維持する動物の系統数が増え，飼育数が増大する一方，微生物学的統御のレベルの異なる動物の持ち込みよるトラブルも増えている。平成９年度における系統動物の導入，分与は30件近くに及び，微生物による汚染事故が数件発生した。原因は導入元の微生物学的統御レベルの違いによると考えられ，事故そのものは軽微で，汚染の拡大は最小限度の範囲に止めることが出来たが，事故防止のためには，施設内における微生物統御の徹底と，導入時の微生物学的検査体制の重要性が改めて認識された。動物実験施設における微生物学的統御については施設によって考え方や運用に幅がみられ，動物の取り扱いは個々の施設の判断に委ねられているのが現状である。平成９年度の国立大学動物実験施設協議会において，ラット・マウスの SPF に関しては全国的な統一基準案が示されたので，今後は系統動物の授受の際に見られた微生物学的品質の解釈をめぐる混乱はなくなることが期待される。生理学研究所動物実験施設における微生物統御についても今後は基準案に沿うよう諸手続や体制の見直しを行うこととしている。

動物の個体の発生や機能発現を遺伝子のレベルで解析する手法は，きわめて急速に広範な領域で用いられてきており，動物実験施設のサービスに対する期待も，単に動物の飼育や飼育スペースの提供にとどまらず，受精卵の保存や体外受精，微生物モニタリングからＳＰＦ動物の作出におよんでいる。一方，遺伝子導入動物の飼育に備えて用意した陸生動物室のトランスジェニック（Tg）動物飼育室は，平成７年度末の段階で早くも大部分が飽和状態となり，平成８年度と９年度には相次いで，一般飼育室を Tg 動物飼育室に改修して対応したが，飼育スペースの不足はもはや飼育室の入れ替えで対処することが困難な状態になっている。スペース不足を深刻にしている背景には，生理研・基生研の研究人口の著しい増加とともに，広い飼育／実験スペースを要する脳研究や遺伝子導入動物実験の占める割合が相対的に高くなっていることがあげられる。

当面する飼育スペースの不足を緩和する方法としては，受精卵の凍結による系統維持動物の削減が考えられる。動物実験施設では平成７年度より受精卵の凍結，移植技術の導入に取り組み，平成10年度より実施に移す予定である。しかしながら，現段階では凍結保存可能な系統保存動物の数は未知数であり，さらに次年度より新たにラットでの遺伝子導入実験が予定されているので，飼育スペースの問題は引き続き残ることになろう。

良質の実験動物の安定供給の要望に応えることは，動物実験施設の主要な任務の一つである。

中でも脳研究の推進に不可欠なサル類は，供給体制，品質ともに不安を抱えているため，入手ソースの開拓と検疫体制の確立を最重要課題の一つに位置付けて取り組みを行った。実験用サル類の繁殖は，アカゲザルとカニクイザル，新世界ザルの一部で行われているが，数量，価格共に実験需要を賄うに至っていない。このため，国内の特に生理学領域の研究においてはアカゲザルよりむしろニホンザルが使われることが多くなっており，当研究所においても需要の多いニホンザルに関する情報の収集に努めた。ニホンザルの入手源としては，動物商，野猿公園や動物園からの払い下げ，そして「有害鳥獣駆除」により自治体が捕獲した野生ザルなどがあるが，いずれにしても品質，数量ともに満足出来る状況にはないことと，野生動物や自然保護の視点からも野生サルの実験使用は慎重にすべきであり，早急な実験用サルの供給体制の整備が望まれる。

アメリカで起きた実験用サルからのＢウイルスによる感染事故の発生と死亡記事の報道は，当然の事ながら日本国内のマカカ属サルのＢウイルス抗体の保有状況と，安全性の確保に関心が向かうところとなった。生理学研究所においても「国動協バイオハザード小委員会」と「Ｂウイルス科研班」からの要請に応えて研究所で保有するすべてのサルについてＢウイルス抗体の調査を行い，その結果，オス５頭，メス１頭のサルでＢウイルス抗体陽性が判明した。動物実験施設では関係者にＢウイルスに関する資料，情報を提供すると共に，事故の防止とサルによる受傷の際の措置について万全を期すよう呼びかけを行った。

実験用ネコについても，実験動物としての供給体制がほとんどないため，自治体からの払い下げに頼っている。イヌ，ネコの自治体からの払い下げについては，従来より動物愛護団体からの根強い反対があり，自治体によっては払い下げに慎重になるところも出ている。イヌに比べて生産が難しいネコは需要が少ない事もあって供給体制に進展が見られず今後の成り行きが心配される。国立大学動物実験施設協議会はこのような状況に対して，関係団体，機関に対して協力を呼びかけると共に，動物実験に対する社会的な関心と理解を得るための活動を積極的に行うべきであるとの方針を打ち出した。この方針に基づいて当施設も「動物実験の必要性」をアピールしたパンフレットや，小冊子の作成など協議会の広報活動に協力すると共に，機会あるごとに一般への普及に努めた。

動物実験に対する社会的批判に応える上でなおざりに出来ない問題の一つは，研究者の側の節度とモラルである。「動物実験指針」は，動物実験を行う際に研究者に対して求められる自己規制の規範といえるものであるが，その運用に当たって動物実験施設が果たす役割も重要である。動物実験委員会が行う動物実験計画書の審査や，動物実験区域の指定等の実務や手続きの中には，動物実験施設のスタッフに期待されるものが少なくない。真に社会からの期待に応えるため，今後とも一層の努力を続けていく決意である。

マウス精子形成細胞へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入

山崎由起子，井本敬二，尾崎　毅，八木　健

マウス以外の動物種にも応用可能な，新しいトランスジェニック動物作製法の開発を目指している。そのひとつとして，精子形成細胞への遺伝子導入法を検討した。すなわち，精子形成の場である精細管内にガラスキャピラリにてDNAを注入後，精巣全体にエレクトロポレーションを行い，精子形成細胞に遺伝子導入，成熟精子を介しての作製法である。今回，レポーターとしてGFP (green fluorescent protein) 遺伝子を用いた。このレポーター遺伝子は，lacZ，CAT，ルシフェラーゼ遺伝子に比べ，生きた状態での発現を蛍光下で連続的に解析出来，次世代への外来遺伝子の伝達の確認が簡単に行える。さらにstableな状態での遺伝子導入効率を改善する目的で，注入量および濃度の検討も行った。その結果，麻酔下の生きたマウスの精巣において，GFP発現を経時的に観察することが出来た。精巣容積に合わせてDNA注入量を最大限まで増加させたところ，遺伝子導入後2日目のtransientな発現は精巣切片のほぼ全域に及び，本法による遺伝子導入は精巣深部にまで均一に行えることが確認された。導入後2ヶ月目では，低頻度ながら精子形成細胞にもstableな発現が認められた。遺伝子導入後のオスは正常な繁殖能力を備えていることが自然交配試験により確認できたが，次世代への遺伝子伝達は観察されていない。今後，GFP発現を指標としたセルソーティングを行うことにより遺伝子導入細胞を選別・濃縮し，最終的に体外受精や顕微受精を介したトランスジェニックマウス作成の可能性が考えられる。

マウス卵子の体外受精と胚の凍結保存技術の確立

小木曽昇，廣江　猛，山崎由起子

マウスの各種系統や品種を凍結胚の状態で半永久的に保存し，必要に応じて融解・仮親への移植を行って動物を再生産するといった一連の実験システムは，胚銀行（embryo bank）として既に国内外のいくつかの機関で実用化されている。胚の凍結保存により，動物飼育管理の省力・省スペース化，汚染動物の清浄化（SPF化），輸送の簡易化，遺伝的変異や災害および事故の回避など多くのメリットがある。近年の遺伝子導入・改変技術の進歩に伴い，飼育マウスの系統数が増大している本施設において，胚の凍結保存技術の本格的な導入・確立に取り組んだ。まず基本的操作として，B6C3F1マウス由来胚の体外培養，体外受精，2細胞期胚の卵管移植などの技術習得を行った。その後，体外受精由来の2細胞期胚を簡易ガラス化法により凍結，一定期間液体窒素内で保存した後，融解して仮親に移植した。その結果，凍結胚より産子が得られた。さらに一連の操作技術の安定化を計り，一定水準以上の成功率を維持することが可能となった。現在，

胚凍結サービスの開始に向けて準備を進めるとともに，系統間での成績の違いや，未受精卵および精子の凍結保存技術についても検討を行っている。

技　術　課

大庭明生

1．概要

今年度の技術課は大きな節目を人事の面で迎えた年であった。濵清所長の機構長就任により佐々木和夫新所長を迎へ，また南定雄課長の定年退職に伴い大庭明生研究系班長の技術課長への昇任があった。課員においては，統合生理技術係瀬尾道主任，細胞器官研究系技術係池田晃子係員，分子生理研究系技術係中﨑ゆかり係員の退職があった。退職者の補充には脳研究分野の研究領域の拡大に対応するため獣医学分野から鈴木千香を係員として協議採用し，統合生理技術係に配置した。

平成８年度より始まった研究プロジェクトの遂行に必要な技術支援要員を確保し，質の高い学術研究を支える研究支援体制の強化を目的にした研究支援推進経費により今年度は８名の研究支援推進員を採用し，技官欠員部門と重要課題や共通性の高い研究を遂行する部門・施設に配置した。

生理学研究所が1993年以来進めている研究所の自己点検評価の一貫として，本年，技術課は研究支援体制について点検を受けた。所内に，所長，分子生物分野および個体機能システム解析分野の教授，技術課長により構成される研究支援体制専門員会が設けられ，課の設置の経過と現状および技術支援体制検討の必要性が確認され，岡崎国立共同研究機構規程集（技術課業務分掌規則），課組織図，技官年齢構成図，課員専門分野表をもとにした，課の職階制，技官配置の実状，技官の活力性と職務専門性が議論され，（１）研究系と施設系とが連携した協調的，相補的な技官配置の構築，（２）工学系と生物系の両立と流動性を目指した職務形態の創出，（３）高度な先端技術の修得をはかる新たな技官研修方法の考案の必要性が提言された。これらの課題の解決に向けて議論を深めていくことが課の今後の課題となった。

東海・北陸地区では，平成４年から技術系職員を対象にその職務に必要な専門知識と技術を修得による技術系職員の資質の向上と相互の交流を目的に合同研修が実施されている。今回研修当番校として合同研修生物コースを８月27日㈬から29日㈮の３日間開催した。研修では当研究所の教官による分子，個体レベルの脳機能の講義と課員による実習指導が行われた。実習は講義に対応して，①パッチクランプ法，②遺伝子変換マウス作製法，③In situ hybridization 法の３技術を取り上げ行った。研修には10大学，22名の参加があった。特に課員による技術指導は好評であった。合同研修を開催する一方で，他大学で行われる合同研修に課員を参加させた。今回は金沢大学での電気・電子コースと静岡大学での情報処理コースに各１名を参加させた。他に日本生理学会，神経科学学会を始めとして多くの学会や各種の技術研究会および研修会にも参加させた。こうした課員の個人レベルの研修とともに課レベルの所外研修として本年は半導体，マイクロマシン等に関する基礎研究を行っているデンソー基礎研究所と愛知医科大学にある痴呆疾患研究の加齢医科学研究所およびマトリックス分子の人為操作技術の開発を進めている分子医科学研究所を

見学し，民間企業や他大学の研究現場との交流に努めた。

また，技術課業務報告会を開催し，課員の出向先の業務の概要と技術支援上の創意等を発表し，それぞれの出向先課員の業務の理解と自己技術を深めるとともに課員間の交流と協力関係の充実を図り，課内の技術交流基盤整備の推進にも努めた。

自主研鑽基盤整備として，課員の個人目標書をもとに構成メンバーを募り，業務関連技術の習得と専門技術向上を目指してプロジェクト活動を本年も実施した。本年の活動テーマとして，①基本図書輪読班，②回路解析班，③画像処理プログラミング学習班，④凍結割断班，⑤サプライ・データベース班，⑥胚操作実験班が設定され，活動が進められている。

全国の技術系職員の技術交流基盤整備として，課は第20回生理学技術研究会を1998年２月19日㈭，20日㈮の２日にわたり開催し，26大学・研究機関から80名の参加を得，口演とパネル展示発表による技術討論と研究者による研修専門講演を，①脳磁図を用いた人脳機能，②視覚脳科学，③多細胞活動同時測定法，④神経回路の構築，⑤プログラム細胞死をテーマに講義を受け，新技術の動向を知る研修となった。この研究会の詳細は『生理学技術研究会報告（第20号)』としてまとめられる。また，技術課の研究支援活動については『生理学研究所技術課報告（第13号)』としてまとめられる。

研究所は，現在事務電算化による事務の簡素化と合理化を進めている。この事務電算化は研究所から依頼を受け，各系・施設から課員と系秘書メンバーによる小委員会を設置し，事務業務の実状把握調査を行い，それに基づき事務電算化の提言書をまとめ研究所に報告した。この報告をもとに事務の簡素化と合理化が実行され成果を上げている。

２．施設の運営状況

①　統合生理研究施設

⑴　生体磁気計測装置室

永田　治，竹島康行

センサ状況：

本年度のSQUIDセンサは昨年同様に安定したノイズレベルであり，真空層破壊等のトラブルも起きていない。ただし，下部センサにおいては蒸発量計測においては4.8l/day程度であったものが98年４月以降において5.2l/day前後まで増加しているため真空度低下の可能性がある。しかし，LHe充填状況下で真空引はできないため，現状においてノイズとLHeの蒸発量を観察しながら対応を検討したい。

また，安静時において2chが基線のズレを起こすことがあったが，原因として考えられるFLL基盤の交換により現状では復旧した。これは湿度の上昇や計測中のLHe蒸発量増加に伴う結露が原因で，基盤配線の電気分解によるショートが原因であることが多く，クリーニング程度で復旧する場合もあるが，信頼性を考慮すると基盤交換による修理が確実である。

解析装置：

自律機能研究プロジェクトの橋本教授着任により新規解析環境の構築と再整備を行った。具体的には，現在共有で使用している計測用ワークステーションの他，新規に解析用ワークステーションを設置し，独立した解析環境を構築した。その結果，計測と解析による負荷を分散することによって効率的な環境を確保できた。ただし，新規に設置したワークステーションにおいても計測は可能であるため，ユーザにより使用するサーバを分散すればさらに有用であろう。

また，感覚・運動機能研究プロジェクトにおいても共同研究等における解析効率の向上をはかるため，新規に解析装置を増設した。基本的には自律機能プロジェクトと同等構成の装置である。

解析室は従来使用されていたB54室に加えてB55室を新たに整備し，計測装置室に設置されていたワークステーション及びディスクサーバをB55室に移設した。その結果計測室の実験スペースを拡大できた。

共通の周辺装置としては，現在使用しているインクジェットプリンタが旧式化したため，カラーレーザプリンタの導入を検討しているが，解析システムからのコントロール性が重要であるため，現在テスト中である。

近年MRI等の画像データが大幅に増加したため，ディスクサーバの容量不足が問題となってきている。現在，MRI用に2GByte，その他の画像用に2GByteを確保しているがSQUID利用者と計測件数の増加により対応するMRI画像も急速に増加しており，早期の対応が必要である。

生体磁気計測装置稼働率：

SQUIDセンサ維持の為のLHe充填作業と定期点検作業時間以外の稼働率は，実験準備時間のロスタイムを考慮すれば客員と共同研究の使用時間を含めほぼ100％の稼働率である。ただし，センサ維持の関係上，休日の使用を禁止しているので実働は5日／周である。また，LHe充填で使用できない時間はセンサの真空度と利用状態により充填回数が変動することもあるため一定ではないが，6時間／周程度である。

その他の装置：

最終的な出力装置として使用されている銀鉛型プリンターであるPICTROGRAPHY3000は画質的には問題ないが，ポスタ等には最大出力サイズがA4であるため用途が限定されることがあった。また，スプールを管理するためサーバにUNIXマシンを使用していた関係で使用法が複雑で，より簡易な方法で出力できることが望まれた。今年度はそれらの要求からPICTROSTAT400を新規に設置した。これは最大出力がA3まで可能であり，通常のコピーと同様の操作で出力することができる。したがって，印刷原稿からそのまま拡大縮小やトリミングができ，コンピュータを介在することなく写真出力とOHPの作成が可能となった。また，サーバとしてMacを接続してあるので，ネットワークを介して従来通り画像ファイルからの出力もできる。将来的には，利用者の要求があればスライドや透過原稿からの出力環境も整備したい。

その他スライドフィルムから画像ファイルを作成する依頼が増加しているが，入力画像の補正時間以外に，使用しているフィルムスキャナが旧式化しており処理時間が取り込みだけで15分程度の時間を要し極めて効率が悪いため，高速で高分解能の機種に更新する必要がある。

② 生理機能研究施設

(1) 超高圧電子顕微鏡室

山口 登，伊藤嘉邦

今年度における共同利用実験は合計19課題が採択され，その内18課題が実施された。これらの共同利用実験の成果は，超高圧電子顕微鏡室共同利用実験報告の章に詳述されている。

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

1997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
1997年 4月	30	9	9	12	8	0	8	67%	修理5日
5月	31	9	4	18	12	4	16	89%	
6月	30	9	4	17	13	1	14	82%	
7月	31	9	4	18	9	2	11	61%	
8月	31	10	9	12	8	0	8	67%	改良5日
9月	30	10	5	15	6	5	11	73%	
10月	31	9	7	15	10	1	11	73%	修理2日
11月	30	12	4	14	10	3	13	93%	
12月	31	12	4	15	5	12	17	113%	
1998年 1月	31	12	6	13	2	14	16	123%	修理2日
2月	28	9	4	15	4	18	22	147%	
3月	31	9	5	17	3	21	24	141%	
計	365	119	65	181	90	81	171	94%	

フィラメント点灯時間　　528.2時間
使用フィルム枚数　　8,252枚

(2) 電子計算機室

吉村伸明，村田安永，高橋直樹

今年度は，中央コンピュータシステム（生体情報解析システム），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。

生理学研究所における中央コンピュータの利用形態は，情報サービス（e-mail, net-news, gopher, WWW 等），ファイルサービス（FTP, NFS 等），高性能共通機器サービス（ワークステーション，高画質フルカラープリンタ等），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，整備も重要である。このような現状をふまえたうえで，中央コンピュータシステム（生体情報解析システム）の整備を進めている。

中央コンピュータシステムは平成11年１月末にレンタル期間を終了し２月より新システムが導入稼働予定である。新システム導入にあたり，研究部門・施設にアンケート調査を行い，研究の現状をふまえた仕様を検討し，新システムは研究に直結したソフトウェアの導入に重点を置くこととなった。新システムではメール等のネットワークサーバやネットワーク自体の導入は行われないため，現在の中央コンピュータシステムで行われているこれらのサービスをレンタル以外の機器に移行し，整備を進めている。

生理研のアカウント数は約230名，LAN には FDDI 系に約300台，ATM 系に約140台の端末が接続され，これらは増加の一途をたどっている。前年度から運用を開始した WWW は平成９年度中に3,500のサイトから25,000回のトップページへのアクセスがあった。同じく前年度から運用を開始した所内向けのダイヤルアップサービスは400回／月以上の利用がある。

(3) 磁気共鳴装置室

市川　修

施設利用及び運転状況

磁気共鳴装置室における MRI は導入後10年以上が経過する。本体及び周辺設備の老朽化が進み，機能面は無論，装置の運転継続に対しても深刻な状況にある。最悪事，これまでのサービス停止も避けられない。特に，撮影後の画像処理に使用される IDC 装置に接続のマルチフォーマットカメラ (MFC) は数年前に製造中止しており，部品の種類によっては入手困難のため故障時の修理保証がない。近年，MRI システムの各ユニットの故障が頻発し，保守全般に要する経費の点でも問題となっている。

平成９年度中には，生理動態画像解析装置の定期点検及び MFC 定期点検，12インチ光ディスクユニットの故障修理，IDC 故障修理，He 冷凍機用ガスホースの交換，MRI シム電源の動作不安定に対し再調整，MRI 冷水循環装置コンプレッサーの交換，MFC の故障修理，MRI 傾斜磁場電源ダウンに対する修理，MRI 冷却水循環装置異常の修理，MRI 液体 He 充填２回などを実施した。

MRI シム電源の動作不安定は，出力信号に微小な発振信号が重畳して磁場を乱し，正常画像が得られなくなる不具合で過去にも発生し，今回もメーカーの調整により対処したが再発の可能性は否定できない。不運にも実験中や実験直前でこれに遭遇した研究グループには多大な迷惑が掛かるため，根本的な修理をすべくメーカーと共に検討してきた。しかし，原因は設計レベルに起因するため問題の根治が技術的に困難で，回路定数の再調整による対処法のみが実現可能範囲と判

断されたため，緊急時には利用者側でも対処可能な様に電源制御部の改造を準備している。

MRI 撮影後には IDC 等を使用した画像処理やフィルム焼付け等が行われるが，fMRI 実験等の進展に伴い，3 次元画像構築等の描画機能や画像間演算等の画像処理機能を強化するため，汎用の医療画像処理ソフト (Dr. View) を既存の HP725 で利用できるよう整備した。

その他，周辺設備としては，EX90 型 NMR 装置のデータ処理等に使用された PC を WINDOWS マシンに更新した。統計処理や他研究機関へのデータ転送作業等を簡便に実施できるようになった。当室では，開室当初からマシンタイムの予約管理を電算機により行なってきたが，利用者からネットによる MRI 予約状況の閲覧化の要望があり，これを可能とすべくサーバーを立ち上げ試験的にサービスを開始した。

平成 9 年度 5 月からの生理機能研究施設担当用務員配置替えの結果，共同研究者の宿泊予約や，装置予約等の窓口業務については，生理機能配属の事務補佐官が，プローブやベッド等の消毒，自動現像機保守等については私が担当した。10月からは生理機能研究施設に技術推進員（機能協関併任）が配属され，消毒清掃等の業務を担当して頂けるようになった。平成 9 年度の生理動態画像解析装置利用は，共同利用実験に採択された11研究グループのほか，所内 3 研究グループに使用された結果，生理動態画像解析装置の稼働率は年平均約13%，リアルタイム装置の稼働率は年平均約30%であった。

平成 9 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
1997年　4	30	0	30	2	0	2	7	
5	31	1	30	3	0	3	10	修理
6	30	0	30	2	0	2	7	
7	31	2	29	3	2	5	17	修理
8	31	1	30	3	0	3	10	保守
9	30	0	30	4	2	6	20	
10	31	2	29	3	0	3	10	停電
11	30	0	30	1	0	1	3	
12	31	1	30	5	0	5	17	保守
1998年　1	31	14	17	1	2	3	18	定期保守
2	28	0	28	3	1	4	14	
3	31	0	31	4	2	6	19	
計	365	21	344	34	9	43	12	

＊保守以外の日祝祭日は，使用可能日数に含めた。

平成９年度　リアルタイム装置月別稼働率

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
1997年　4	30	0	30	0	4	4	13	
5	31	2	29	0	5	5	17	修理点検
6	30	0	30	0	6	6	20	
7	31	0	31	0	6	6	19	
8	31	0	31	0	12	12	39	
9	30	0	30	0	7	7	23	
10	31	0	31	0	8	8	26	
11	30	0	30	0	13	13	43	
12	31	2	29	0	9	9	31	定期点検
1998年　1	31	0	31	0	12	12	39	
2	28	0	28	0	13	13	46	
3	31	0	31	1	14	15	48	
計	365	4	361	1	109	110	30	

＊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

(1)　陸生動物室

佐治俊幸，小木曽昇，廣江　猛

平成９年度における陸生動物室飼育室利用は，28研究部門で（生理研17部門，基生研11部門）あった。飼育室の利用件数は月平均62件（延べ745件）で対前年度比5.0％の減少となった。搬入動物数は，遺伝子導入動物（トランスジェニック(TG)マウスやノックアウト(KO)マウス），疾患モデル動物等の国内外の動物を含めて９種，延べ9,523匹で，前年度より47.6％増加となった。動物種別搬入数では，脳機能研究の材料として遺伝子導入動物の作製や系統維持または受精卵凍結事業に向けた胚操作技術習得等で使用しているマウスの他にサルの増加が見られた。また遺伝子導入作製を目的としたラットもにわかに増加傾向を示しはじめた。一方，材料採取や抗体作製で使用していたモルモット，ウサギの他，歩行運動実験で使用しているネコが減少した。延べ飼育数による動物種別では，遺伝子導入動物（TG, KO マウス）の作製や系統維持を含めた飼育数は前年度と比較し21.9％，サルでは25.0％増加したのに対し，一般マウス13.7％，モルモット27.3％をはじめとしてウサギ，イヌ，ネコで延べ飼育数の減少が見られた。最近では，遺伝子操作マウスや疾患モデルマウスの授受が頻繁に行われるようになり，国内外で18件あった。また授

受に伴って8件の微生物モニタリング検査を外注で行ったことから，今後も増加傾向にあるため検査経費の都合上施設での微生物モニタリング検査の実施が検討される。

陸生動物室のTGマウス飼育室利用は昨年度からさらに利用部門が増えたことから飼育室の飽和度がさらに高くなり，今後利用部門や共同研究利用増加，TGラットの作製等が考えられることから実験計画に基づいた飼育室の使用計画の策定が課題となっている。

実験用動物の供給源は特にサルにおいて確保が困難であったことから，他大学からの譲渡や実験動物用で生産されたものを業者から購入した。今後サルの導入については様々な問題があることから，供給体制の安定化が課題となるであろう。

飼育中の動物に関するトラブルとしては，ネコで導入前の外傷，輸送ストレス，飼育環境変化によると思われる死亡例が2例，食欲不振や下痢の症状を示すものがネコ，サルでそれぞれ数例認められた。

この他，マウス飼育数の増加に伴って寄生虫（外部・内部）やウイルスの感染と見られる個体が発見され，現在感染症の防除や駆虫の対応に追われている。

国立大学動物実験施設協議会バイオハザード対策小委員会による特に輸入TGマウスを対象とした感染症実態調査の結果，18件中9件マイコプラズマ肺炎ウイルスが陽性となった。しかし他のウイルスは検出されなかった。

検疫は，ネコ73件（昨年度比27.0％減），サル22件（15.8％増）について行った。ネコは自治体からの払い下げに由来していることから，感染症，蚤やダニ等の寄生した個体が多いため，搬入直後に薬浴と抗生物質の投与，血液・生化学検査結果による治療，妊娠や感染動物の隔離等を行っている。その結果搬入直後から数日間にかけての死亡は減少したが，飼育環境の違いによるストレスや伝染性胃腸炎等の症状で衰弱したり死亡するものが見られた。サルは捕獲ニホンザル由来が多いため，体重のばらつきや外傷のあるもの等，実験動物としての適性に問題のある個体が見られた。

実験室の利用は，遺伝子操作マウス作製に関わる胚操作実験室，ニホンザルやラットを用いた高次脳研究を目的とする手術室や解剖室の利用が増加した。

設備・機器関係では，例年経年劣化による空調機器類（再熱ヒーター，温・湿度センサー）が故障したのをはじめ，飼育設備についても高圧蒸気滅菌器（オートクレーブ）の熱圧力弁の腐食や温度コントローラーの故障があり修理を行った。

遺伝子導入動物の飼育数が顕著に増加したことから，施設では飼育管理の省力化，感染症による系統絶滅の危険を回避するために，プログラムフリーザーを導入し受精卵や胚の凍結保存の技術の確立をめざしている。

(2) 水生動物室

平成9年度の水生動物室利用状況は，生理研・基生研両研究所あわせて13部門・施設，52件の利用があった。加熱冷却ユニットの動作不良が2件あり，業者に依頼して修理した。また，加熱冷却ユニットの老朽化が進んでおり，何らかの措置をする必要がある。フロン対策も考慮にいれ

た熱源集中発生管理による温度コントロール方式への改修を希望している。

近年多発している水槽の亀裂がさらに1件発生した。この亀裂は修理不能だったために，新規に同型の水槽を購入し置き換えた。1t水槽の架台の改装と合わせて，水槽の更新計画も必要に迫られている。また，利用者から5連の小型水槽の利用希望が多いために，新たに2基の5連水槽を購入した。さらに，1t水槽利用効率を上げるために，外付け濾過槽を2基新設した。残り3基の1t水槽の外付け濾過槽化も早期に実現したい。

プレハブ恒温室の床の腐食と冷凍機の老朽化が進んでいるため，更新を予算化したい。

(3) 伊根実験室

平成9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，のべ218日，36名の利用があった。従来は，冬期の利用が中心であったが，昨年度から一年を通して利用されるようになり，利用効率が上がっている。施設内の床や絨毯の汚れが目立つため外注業者によるクリーニングを実施した。

伊根実験室は，遠隔地に設置されているために各種情報の伝達に遅延が見られたが，ISDN回線を用いたネットワーク化が行われ岡崎に居るときと同じように伊根実験室から電子メールやWWWの利用が可能になった。

室利用状況（平成9年度）

月 室名	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
手術室	15	19	0	1	1	0	1	10	5	15	7	7	81
生理実験室＊	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
培養実験室＊	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
測定室＊	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
胚操作室1・2	0	0	0	0	0	0	9	9	9	16	12	9	64
手術実験室＊	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
解剖室	1	0	2	0	2	7	1	2	0	0	0	0	15
新館手術室	2	3	6	4	3	4	5	3	3	4	10	8	55
標本室＊	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
計	22	27	13	10	11	16	21	29	22	40	34	29	274

＊は長期使用も含む

陸生動物　部門別・動物種別搬入数（平成９年度）

動物種 / 部門名	マウス	TGマウス	SPFマウス	ハムスター	ラット	ウサギ	モルモット	ネコ	イヌ	サル	ニワトリ	合計
神経化学	43	460	0	0	160	4	0	0	0	0	0	667
超微小形態生理	0	0	0	0	96	0	0	0	0	0	1,500	1,596
細胞内代謝	218	0	0	67	36	0	0	0	0	0	0	321
生体膜	97	0	0	0	9	0	25	0	0	0	0	131
機能協関	66	0	0	0	66	0	259	0	0	0	0	391
能動輸送	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	35
神経情報	413	59	0	0	2	0	0	0	0	0	0	474
液性情報	71	10	0	0	3	0	0	0	0	0	0	84
高次神経機構	139	54	1,091	0	42	2	0	0	0	0	0	1,328
高次神経性調節	0	0	0	0	8	0	0	0	0	7	0	15
生体システム	0	0	0	0	32	2	1	68	0	2	0	105
高次液性調節	0	0	0	0	0	0	0	5	0	5	0	10
統合生理・高次脳機能	0	0	0	0	57	0	0	0	0	7	0	64
統合生理・感覚・運動機能	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
組織培養標本室	9	0	0	0	46	0	3	0	0	0	0	58
動物実験施設	1,368	0	0	0	219	0	0	0	3	0	0	1,590
細胞機構	0	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	10
細胞内エネルギー変換	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
細胞増殖	47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	47
細胞情報	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	4
生殖	37	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	44
細胞分化	310	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	312
感覚情報処理	45	1,053	0	0	77	4	0	0	0	0	0	1,179
種分化第一	40	21	0	0	416	0	0	0	0	0	0	477
細胞器官培養室	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
RI実験施設	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	4
種分化第二	345	195	0	0	22	4	0	0	0	0	4	570
生理研技術課	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
合計	3,284	1,856	1,091	67	1,291	44	288	73	3	22	1,504	9,523

陸生動物　月別・動物種別搬入数（平成９年度）

月 / 動物種	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
マウス	132	212	475	199	350	367	316	300	269	308	135	221	3,284
TGマウス	3	153	50	136	78	204	304	270	222	121	137	178	1,856
マウス（SPF）	120	42	63	133	104	97	105	63	85	92	83	104	1,091
ハムスター	12	9	18	0	0	0	10	12	6	0	0	0	67
ラット	181	104	119	48	82	64	79	69	96	117	161	171	1,291
ウサギ	7	12	4	2	4	1	5	4	2	2	0	1	44
モルモット	31	17	37	38	37	22	14	41	14	13	16	8	288
ネコ	5	9	6	4	7	7	2	8	7	7	6	5	73
イヌ	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
サル	0	2	0	8	0	8	0	0	0	4	0	0	22
ヒヨコ	0	0	60	0	180	220	0	180	200	300	124	240	1,504
月合計	494	560	832	568	842	990	835	947	901	964	662	928	9,523

水生動物　月別・動物種別搬入数（平成９年度）

動物種＼月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	合計
ゼノパス	50	110	0	0	0	0	35	35	25	35	0	55	345
ワキン	500	0	1,450	300	0	0	0	0	0	0	0	120	2,370
メダカ	0	0	0	1,500	1,000	1,150	500	1,000	500	500	1,000	500	7,650
ペラ	0	0	41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	41
アマゴ	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	50
ティラピア	0	0	0	9	0	15	20	0	100	300	10	40	494
ウニ	30	60	30	0	0	0	160	0	120	440	300	211	1,351
月合計	580	170	1,521	1,809	1,000	1,215	715	1,035	745	1,275	1,310	926	12,301

④　共通施設

(1)　電子顕微室

前橋　寛

（A）電子顕微鏡室の状況

今年度は，電子顕微鏡室に移設した汎用型 120kV 電子顕微鏡（日本電子，JEM-1200EX）の保守契約を行い，他の同タイプ２台と同等に使用できるようにした。基礎生物学研究所（形態形成部門）より万能凍結割断装置（日本電子，JFD-7000），真空蒸着装置（日本電子，JEE-400）等の移管を受け，老朽化した電子顕微鏡用試料作製装置の補充を行った。

顕微画像解析室に昨年度設置した共焦点レーザー走査顕微鏡（カールツァイス，LSM510）の講習会を２度にわたって行い，利用者それぞれの試料，目的に対応した利用法を習得できるようにした。

作画室へ，論文用原図の複写を目的として，インスタントプリントシステム（フジ，PICTROSTAT 330 NEXPO）を導入した。

（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22件であった。機構内では18件あり，機構外（国内）では４件であった。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	液生情報	・神経筋接合部の観察
	神経情報	・in situ hybridization 法による神経細胞の発生・分化の解析
	神経化学	・培養細胞の免疫染色の観察
	機能協関	・発生過程における標的細胞依存性の運動神経細胞の形態学研究
	超微小形態生理	・エンドサイトーシス変異細胞の解析 ・タンパク質の2次元結晶化と構造解析
	組織培養標本室	・小腸絨毛上皮細胞下繊維芽細胞の免疫組織学的研究
	高次脳機能	・上丘内の神経細胞形態の観察
	技術課	・コメツキムシの走査像微細構造観察 ・凍結割断法の開発
基生研	形態形成	・ショウジョウバエを用いた神経形成機構に関する研究
	生殖	・キンギョ卵母細胞核マトリクス内に存在するアクチン繊維の構造解析
	細胞分化	・マウス脳で発現するパルシトイル化酵素の機能解析
	細胞機構	・単離植物オルガネラの形態観察と免疫電顕 ・Arabidopsis の hydathode における液胞の機能 ・カタラーゼ輸送機構の解析
	種分化第2	・ミズワラビ MADS 遺伝子の発現様式の観察
	遺伝子発現統御第2	・大腸菌 DNA の複製中間体の解析
分子研	機器センター	・単層カーボンナノチューブのチューブ直径決定及びその面内構造の電子線回折による決定

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
富山大学	唐原一郎	エンドウ黄化芽生えにおけるカスパリー線形成の検定
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
東海大学	大城香	ラン藻及びシアノファージの微細構造の観察
名城大学	新居直祐	葉緑体の観察

(2) 機器研究試作室

加藤勝己

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置され，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，修理を行っている。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。平成８年４月山口技官が生理機能研究施設超高圧電子顕微鏡室に配置転換となった後は，機械工作技官１名で担当していたが，平成９年４月より午後半日ではあるが研究支援推進員が配置された。機械工作は危険な作業や重量物を使用する作業も多々あるので，複数での作業が望まれている。

当施設で製作した実験機器・部品としては，各種動物実験用器具，脳切片用などの各種保温環流用チェンバー，各種ホルダー，光学顕微鏡用各種ステージ，凍結割断機用試料ホルダーなどの各種部品などがある。設備としては，一般工作室に設置してあった汎用フライス盤（井上工機製 EV-6）を生理研技術課プロジェクトの助けをかりて，簡易 NC フライス盤に改良した。生理学実験などで使用される各種チェンバーは，複雑な形状を必要とすることが多くあるが，当施設にある小型 NC フライス盤（ローランド製　CAMM-3）は，樹脂加工専用でパワーが小さいため金属材料を加工することが出来なかった。この改良では，既存の NC フライス盤用ソフト　モデラー－３も使えるように工夫したため，過去のデータも利用することができ，２軸同時加工や，漢字切削もできるようになっている。また，マッキントッシュ用 CAD ソフト (Mini-Cad Ver.7)，フォトレタッチソフト（フォトショップ Ver. 4.0），フォーマットソフト (B's Crew Ver.2) などのバージョンアップを行った。

昨年の定期点検の際，ベルが鳴らないという不備が発覚した緊急用非常ベルは，調査後再工事して動作するようになった。本年度も，昨年同様大きな事故の発生はなかったが，工作機械の大半は刃物あるいは被削材が高速回転し，誤った使用方法をすると大きな事故につながる可能性があるため，今後も工作機械の使用方法，注意事項などの周知徹底に努力して行きたいと考えている。

機器研究試作室委員会は，本年度は１回開催され，以下のことが話し合われた。

平成９年９月29日(月)

○委員長に岡田委員，副委員長に飯田委員がそれぞれ選出された。

○平成８年度予算執行報告

○平成８年度分予算振替について

○平成８年度施設利用状況について

○平成９年度予算案について

○機器研究試作室を有効に活用するために，依頼製作品リストを作成し公開する。

○その他

なお，機器研究試作室の平成９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）

月	ボール盤	横切盤	コンターマシン	フライス盤	グラインダー	旋盤	切断機	その他	合計
4	7	19	7	6	6	9	3	10	67
5	20	16	14	15	8	6	6	7	92
6	5	19	7	7	8	5	7	19	77
7	11	11	7	2	8	2	5	7	53
8	15	6	12	5	7	7		6	58
9	16	9	22	16	9	11	6	9	98
10	16	11	15	8	7	1	6	12	76
11	8	7	6	9	7	9	5	10	61
12	18	3	9	14	8	1	1	6	60
1	8	9	9	6	3	8	2	12	57
2	7	4	5	5	4	5	2	6	38
3	11	7	3	6	1	4		14	46
合計	142	121	116	99	76	68	43	118	783

機器研究試作室利用人数表

月	生理研（人）	基生研（人）	合　　計	延べ時間（h）
4	38	12	50	46
5	51	15	66	85
6	41	18	59	70
7	33	12	45	51
8	39	9	48	51
9	71	5	76	114
10	40	10	50	61
11	35	6	41	61
12	31	4	35	51
1	33	5	38	36
2	24	2	26	23
3	21	12	33	33
合計	457	110	567	682

機器研究試作室部門別利用状況

統合生理研究施設	97名	生体システム	73名	高次神経性調節	67名
超微小形態生理	59名	超高圧電顕室	50名	生体膜	30名
液性情報	18名	動物実験施設	13名	磁気共鳴装置室	10名
神経化学	7名	高次神経機構	7名	技術課	6名
機能協関	5名	高次液性調節	4名	細胞内代謝	3名
神経情報	3名	電子顕微鏡室	3名	電子計算機室	2名
情報記憶	1名	生体機能検査室	1名		
大型スペクトロ	21名	RI 実験施設	20名	種分化機構第一	14名
形態形成	8名	生殖	7名	遺伝子発現統御第二	4名
細胞融合	5名	人工気象室	4名	細胞分化	3名
発生生物学	3名	計時機構	3名	電子計算機室	3名
分析室	3名	細胞増殖	2名	細胞情報	2名
所長付研究室	2名	エネルギー変換	1名	情報制御	1名
遺伝子発現統御第一	1名	種分化機構第二	1名		

(3) 低温・冷凍実験室

この室は，変質しやすい実験材料，試料，試薬等の長期保存や蛋白質やペプチド等の生理活性物質の抽出，分離，精製等の低温実験に活用されているが，電力の節約や新設部門の受け入れによるスペース委員会からの要請に基づき室の使用調査が行われ，室の活用の見直しが進められている。

【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 …… 84
超微小形態生理研究部門 …… 85
細胞内代謝研究部門 …… 87
生体膜研究部門 …… 88
機能協関研究部門 …… 90
神経情報研究部門 …… 92
液性情報研究部門 …… 94
高次神経機構研究部門 …… 95
情報記憶研究部門 …… 96
高次神経性研究部門 …… 97
生体システム研究部門 …… 98
高次液性調節研究部門 …… 100
感覚・運動機能研究プロジェクト …… 103
高次脳機能研究プロジェクト …… 105
自律機能研究プロジェクト …… 106
生体機能検査室 …… 107
組織培養標本室 …… 108
超高圧電子顕微鏡室 …… 109
電子計算機室 …… 110
動物実験施設 …… 111

発　表　論　文

《神経化学研究部門》

1. Sekino Y, Obata K, Tanifuji M, Mizuno M & Murayama J (1997) Delayed signal propagation via CA2 in rat hippocampal slices revealed by optical recording. J Neurophysiol 78: 1662-1668.

2. Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding RG, Kanbara N, Kuzume H, Sanbo M, Yagi T & Obata K (1997) Cleft palate and decreased brain γ-aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. Proc Natl Acad Sci USA 94: 6496-6499.

3. Obata K (1997) Excitatory and trophic action of GABA and related substances in newborn mice and organotypic cerebellar culture. Dev Neurosci 19: 117-119.

4. Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Kume H, Shinozaki K, Tokuhiro S, Capell A, Walter J, Gruenberg J, Haass C, Iwatsubo T & Obata K (1997) The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer's disease (Volga German families) increases the secretion of amyloid β protein ending at the 42nd (or 43rd) residue. Proc Natl Acad Sci USA 94: 2025-2030.

5. Saito Y, Maruyama K, Saido TC & Kawashima S (1997) Overexpression of a neuropeptide nociceptin/orphanin FQ precursor gene, N23K/N27K, induces neurite outgrowth in mouse NS20Y cells. J Neurosci Res 48: 397-406.

6. Kojima N, Wang J, Mansuy IM, Grant SGN, Mayford M & Kandel ER (1997) Rescuing impairment of long-term potentiation in fyn-deficient mice by introducing Fyn transgene. Proc Natl Acad Sci USA 94: 4761-4765.

7. Shinozaki K, Maruyama K, Kume H, Kuzume H & Obata K (1997) A novel brain gene, Norbin, induced by treatment of tetraethylammonium in rat Hippocampal slice and accompanied with neurite-outgrowth in Neuro 2a cells. Biochem Biophys Res Commun, 240: 766-771.

8. 山肩葉子 (1997) calcium/calmodulin-dependent protein kinase II α Molecular Medicine 臨時増刊号ノックアウトマウス・データブック 34: p66.

9．小幡邦彦，淺田英穂 (1997) GAD65, GAD67 (gultamic acid decarboxylase 65, 67) Molecular Medicine 臨時増刊号ノックアウトマウス・データブック 34: p185-186.

10. 丸山　敬 (1997) プリオン Molecular Medicine 臨時増刊号ノックアウトマウス・データブック 34: p414.

11. 大室弘美，丸山　敬 (1997) カルシウム結合タンパク質の検出法　実験医学別冊　細胞生物学の基礎技術 p161-p166

12. 野田春彦，丸山工作，石川　統，須藤和夫，山本啓一，丸山　敬，三井恵津子（訳）(1997) 分子細胞生物学 H. Lodish, D. Baltimore, A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matudaira, J. Darnell （原著）東京化学同人

13. 石浦章一，丸山　敬（訳）(1997) 乳ガン遺伝子をつきとめろ！　Kevin Davies, Michael White （原著）三田出版会

14. 石浦章一，丸山　敬（訳）(1997) ヒト遺伝子の聖杯　Daniel J. Kevies, Leory Hood （原著）アグネ承風社

15. 岩坪　威，丸山　敬（訳）(1997) アルツハイマー病遺伝子を追う　Daniel A. Pollen （原著）三田出版会

《超微小形態生理研究部門》

1）原著論文

1．Adachi K & Nagayama K (1997) Contribution of convective flux to uniform apoferritin film formation on a liquid gallium surface. Chem Phys Lett 284: 440-445

2．Kanaseki T, Kawasaki K, Murata M, Ikeuchi Y, & Ohnishi S (1997) Structural features of membrane fusion between influenza virus and liposome as revealed by quick-freezing electron microscopy. Cell Biology 137: 1041-1056.

3．Koizuka I, Seo Y, Murakami M, Seo R & Kato I (1997) Micro-magnetic resonance imaging of the inner ear in the guinea pig. NMR Biomed 10: 31-34

4．Nakamura K, Era S, Ozaki Y, Sogami M, Hayashi T & Murakami M (1997) Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy. FEBS Letters 417: 375-378

2）総説

1．Ebashi S & Nagayama K (eds.) (1997) Protein Array: An Alternative Biomolecular System. Special Issue of Adv Biophys (Tokyo) Vol 34.

2．Nagayama K (1997) Protein Array: Concepts and Subjects. Adv Biophys (Tokyo) 34: 1-23.

3．永山國昭 (1997) たんぱく質結晶化膜の作製と機能評価。信学技報 OME97-78: 1-6.

4．Takahashi T (1997) Significant role of electrostatic interactions for stabilization of protein assemblies. Adv Biophys 34: 41-54

5．東　晃史 (1997)「等速－最早」現象と熱力学の法則をめぐる混乱。Molecular Medicine 34: 246-249

6．東　晃史 (1997) 精神工学の第一歩はミンコフスキーとファインマンから。Molecular Medicine 34: 530-534

7．東　晃史 (1997) 善悪判断の知の技法。Molecular Medicine 34: 1176-1181

8．東　晃史 (1997) 自然科学の原点に横たわる大問題と先進国の抱える大問題。Molecular Medicine 34: 1564-1569

3）学会発表の抄録論文・アブストラクト

1．永山國昭 (1997. 11) 遺伝子工学を用いた二次元蛋白質結晶の制御，平成9年度電子顕微鏡技術研究会（生物系）（京都）

2．高橋卓也，杉浦淳之介，永山國昭 (1997) 蛋白質溶媒系における実効誘電率：誘電体モデルと MD，第35回生物物理学会予稿集 S64

3．杉浦淳之介，高橋卓也，永山國昭 (1997) 分子動力学による Protein G －水系の変異体の比較，第35回生物物理学会予稿集 S66

4．水野聡紀，中迫雅由，高橋卓也，永山國昭 (1997) リポソーム中における bR の離合集散，第35回生物物理学会予稿集 S194

5．高橋卓也，田中　全，杉浦淳之介，永山國昭 (1997)50本の MD シミュレーションによる蛋白質の変性過程の研究，第４回タンパク質立体構造の構築原理ワークショップ予稿集

6．Murakami M (1997) Energy cost for salivary secretion and contribution of duct. Jpn J Physiol 47 (Suppl2) SP69

7．Nakamura K, Era S, Hayashi T, Kuwata K, Imai H, Nagai N & Murakami M (1997) Laser Raman Spectroscopic studies of bovine serum albumin in solution and in gel. Jpn J Physiol 47 (Suppl2) 17

8．Sogami M, Sra S, Murakami M, Seo Y & Uyesaka N (1997) Kinetics of water transport across cell membrane. Jpn J Physiol 47 (Suppl2) 25

《細胞内代謝研究部門》

1．Nakano Y, Shirakawa H, Mitsuhashi N, Kuwabara Y & Miyazaki S (1997) Spatiotemporal dynamics of intracellular calcium in the mouse egg injected with a spermatozoon. Mol. Human Reprod. 3: 1087-1093

2．Maruyama T, Cui ZJ, Kanaji T, Mikoshiba K & Kanno T (1997) Attenuation of intracellular Ca^{2+} and secretory responses by Ins(1,4,5) P_3-induced Ca^{2+} release modulator, 2APB, in rat pancreatic acinar cells. Biomed. Res. 18: 297-302

3．Maruyama T, Kanaji T, Mikoshiba K, Nakade S & Kanno T (1997) 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane penetrable modulator of Ins(1,4,5)P_3-induced Ca^{2+} release. J. Biochem. 122: 498-505

4．Satoh Y, Sano K, Habara Y & Kanno T (1997) Effects of carbachol and catecholamines on ultrastructure and intracellular calcium-ion dynamics of acinar and myoepitherial cells of lacrimal glands. Cell Tissue Res. 289: 473-485

5. Shioda S, Yada T, Muroya S, Takigawa M & Nakai Y (1997) Noradrenaline activates vasopressin neurons via α1-receptor-mediated Ca^{2+} signaling pathway. Neurosci. Lett. 226: 210-212

6. Nakata M, Yada T, Nakagawa S, Kobayashi K & Maruyama I (1997) Citrulline-argininosuccinate-arginine cycle coupled to Ca^{2+} signaling in rat pancreatic β-cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 235: 619-624

7. Yada T, Sakurada M, Ishihara H, Nakata M, Shioda S, Yaekura K, Hamakawa N, Yanagida K, Kikuchi M & Oka Y (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is an islet substance serving as an intra-islet amplifier of glucose-induced insulin secretion in rats. J. Physiol. (Lond.) 505 (2): 319-328

8. Shioda S, Yada T, Muroya S, Takigawa M & Nakai Y (1997) Nicotine increases cytosolic Ca^{2+} in vasopressin neurons. Neurosci. Res. 29: 311-318

9. 佐藤雄一，宮崎俊一 (1997) 受精のシグナル伝達と ICSI：基礎研究と臨床との接点。産婦人科の実際 46: 81-88

10. 菅野富夫，浅田尚登 (1997) マウス膵島内B細胞の振動性カルシウムシグナルの同調。Peptide Hormones in Pancreas 17: 17-21

11. 佐藤洋一，菅野富夫，葉原芳昭 (1997) 小腸陰窩上皮細胞の細胞質カルシウム濃度変動を惹起する伝達物質・修飾物質の検討。消化管ホルモン 15: 39-41

《生体膜研究部門》

1. Kukita F (1997) Solvent-dependent rate-limiting steps in the conformational change of sodium channel gating in squid giant axon. J Physiol 498: 109-133

2. Inoue I, Tsutsui I & Brown E R (1997) K^+ accumulation and K^+ conductance inactivation during action potential trains in giant axons of the squid Sepioteuthis. J Physiol 500: 355-366

3. Bone Q, Inoue I & Tsutsui I (1997) Contraction and relaxation in the absence of a sarcoplasmic reticulum: muscle fibres in the small pelagic tunicate Doliolum. J Muscle Res and Cell Motil 18: 375-380

4. Oosawa Y, Imada C & Furuya K (1997) Temperature dependency of calcium responses in mammary tumor cells. Cell Biochem Func 15: 113-117

5. Ishizawa Y, Furuya K, Yamagishi S & Dohi S (1997) Non-GABAergic effects of midazolam, diazepan and flumazenil on voltage-dependent ion currents in NG108-15 cells. NeuroReport 8: 2635-2638

6. Nakano H, Furuya K, Furuya S & Yamagishi S (1997) Involvement of P2-purinergic receptors in intracellular Ca^{2+} responses and the contraction of mammary myoepithelial cells. Pflügers Archiv 435: 1-8

7. Inoue I, Tsutsui I, Bone Q & Brown E R (1997) Evolution of skeletal muscle excitation-contraction coupling. In: Progress in Cell Research Vol 6 (Eds Sokabe M *et al*), Elsevier, pp111-122

8. Furuya S, Nagata R, Ozaki Y, Furuya K, Nakayama T & Nagahama M (1997) A monoclonal antibody to astrocytes, subepithelial fibroblasts of small intestinal villi and interstitial cells of the myenteric plexus layer. Anat Embryol 195: 113-126

9. Liu Y, Zhao J, Ji Y-H, Oiki S, Hazama A, Morishima S, Savirov R, Zhou S-S, Hayashi S, Tsumura T, Ito T, Furuya K & Okada Y(1997) The venom of scorpion *B. martensi* selectively inhibits transient outward K^+ currents in neonatal rat ventricular cells and KV channel currents in NG108-15 cells. Biomed Res 18: 383-388

10. 古家喜四夫，榎本浩一(1997)カルシウム波による細胞間情報伝達　細胞工学 16:17-23

11. 久木田文夫(1997)細胞電気信号の発生機構　In:ニューバイオフィジックス８巻　脳・神経システムの数理モデル（臼井史朗編）共立出版 14-28

12. Furuya K, Nakano H, Enomoto K & Yamagishi S (1997) Purinergic and mechanical interactions between myo- and secretory epithelial cells in mammary gland. Jpn J Physiol 47 (Suppl

1) S62

13. Hirono C, Sugita M, Tanaka S, Furuya K, Yamagishi S & Shiba Y (1997) Role of calcium ions in the potentiation by isoproterenol of carbachol-induced ionic currents and secretion activity in rat salivary glands. Jpn J Physiol 47 (Suppl 1) 60-61

14. Furuya K, Nakano H, Enomoto K & Yamagishi S (1997) ATP receptors mediating interaction in mammary epithelial cells. Jpn J Physiol 47 (Suppl 2) S24

15. Nakano H, Furuya K & Yamagishi S (1997) Calcium signaling and electrical properties of mammary myoepithelial cells. Jpn J Physiol 47 (Suppl 2) S60

16. Kukita F (1997) Mechanics of voltage-gated ion channel gating resembles the mechanical coupling in motor proteins. Jpn J Physiol. 47 (Suppl 2) S119.

17. Furuya K, Nakano H & Enomoto K (1997) Intercellular calcium signaling in mammary cells-Roles of myoepithelial cells. International Symposium "Frontiers in Pancreatic Research: From Basic to Clinic" Abstracts (Eds. Hayakawa T and Naruse S) p22

18. Nakanishi K & Kukita F (1997) Functional synapses in synchronized bursting neurons in culture. Neurosci Res (Suppl) S64

《機能協関研究部門》

1. Miwa A, Ueda K & Okada Y (1997) Protein kinase C-independent correlation between P-glycoprotein expression and volume sensitivity of Cl^- channel. J Membrane Biol 157: 63-69

2. Sabirov RZ, Okada Y & Oiki S (1997) Two-sided action of protons on an inward rectifier K^+ channel. Pflügers Arch Eur J Physiol 433: 428-434

3. Zhou S-S, Takai A & Okada Y (1997) Phosphatase-mediated enhancement of cardiac cAMP-activated Cl^- conductance by a Cl^- channel blocker, anthracene-9-carbocylate. Circul Res 81: 219-228

4. Liu Y, Zhao J, Ji Y-H, Oiki S, Hazama A, Morishima S, Sabirov RZ, Zhou S-S, Hayashi S, Tsumura T, Ito T, Furuya K & Okada Y (1997) The venom of scorpion B. martensi selectively inhibits transient outward K^+ currents in neonatal rat ventricular cells and K_v^+ channel currents in NG108-15 cells. Biomed Res 18: 383-388

5. Sabirov RZ, Tominaga T, Miwa A, Okada Y & Oiki S (1997) A conserved arginine residue in the pore region of an inward rectifier K channel (IRK1) as an external barrier for cationic blockers. J Gen Physiol 110: 665-677

6. Okada Y, Oiki S, Tominaga M, Kubo M, Miwa A, Tominaga T, Tsumura T & Ueda K (1997) Volume-sensitive Cl^- channel in human epithelial cells: Regulation by ATP and relation to P-glycoprotein. Jpn J Physiol 47 (Suppl 1) S19-S20

7. Okada Y (1997) Volume expansion-sensing outward-rectifier Cl channel: A fresh start to the molecular identity and volume sensor. Am J Physiol 273: C755-C789

8. Oiki S, Koeppe II RE & Andersen OS (1997) Voltage-dependent gramicidin channels. In Towards Molecular Biophysics of Ion Channels. (Eds M Sokabe, A Auerbach & FJ Sigworth) Elsevier Amsterdam, 189-201

9. Hazama A, Loo DD, Wright EM (1997) Presteady-state currents of the rabbit Na^+ /glucose cotransporter (SGLT1). J Membrane Biol 155: 175-186

10. 岡田泰伸 (1997) MDR1 と細胞容積感受性クロライドチャネル　日本農芸化学会誌 71: 789-792

11. 岡田泰伸，清野 進（編）(1997) チャネルとトランスポータ：その働きと病気。分子医科学で病気を識るシリーズ５。メジカルビュー社　東京

12. 岡田泰伸 (1997) チャネルとトランスポータ：その構造・機能協関と疾病。*In* チャネルとトランスポータ：その働きと病気。分子医科学で病気を識るシリーズ５。(岡田泰伸，清野 進　編）メジカルビュー社　東京 1-15

13. 挟間章博，岡田泰伸 (1997) Cl^-チャネルとその異常による遺伝病。*In* チャネルとトランスポータ：その働きと病気。分子医科学で病気を識るシリーズ５。(岡田泰伸，清野　進　編）メ

ジカルビュー社　東京 89-117

14. 森島　繁，森　泰生，井本敬二 (1997) 電位依存性カチオンチャネルと神経・筋・心疾患。*In* チャネルとトランスポータ：その働きと病気。分子医科学で病気を見るシリーズ５。(岡田泰伸，清野　進　編) メジカルビュー社　東京 17-53

15. 老木成稔 (1997) モデルチャネルの構造と機能―単一チャネル記録から原子レベルの構造と素過程へ。*In* シリーズ・ニューバイオフィジックス⑤イオンチャネル。(曽我部正博 編) 共立出版 78-100

16. 老木成稔 (1997) イオン流で探るチャネルポアのプロファイル　膜 22: 307-315

17. 挾間章博 (1997) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). Molecular Medicine 34 (ノックアウトマウス・データブック臨時増刊号) : 128-129

18. 挾間章博 (1997) 電気生理学的手法による開口放出の検出　実験医学 15 (増刊) : 53-59

《神経情報研究部門》

1. Wakazono, Y., Kurahashi, T., Nakahira, K., Nagata, I., Takayama, C., Inoue, Y., Kaneko, A. and Ikenaka, K. (1997) Appearance of a fast inactivating voltage-dependent K^+ currents in developing cerebellar granule cells in vitro. Neurosci. Res., 29, 291-301

2. Shibata, T., Yamada, K., Watanabe, M., Ikenaka, K., Wada, K., Tanaka, K. and Inoue, Y. (1997) Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial Glia-Astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. J. Neurosci., 17, 9212-9219

3. Kagawa, T., Mekada, E., Shishido Y. and Ikenaka, K. (1997) Immune system-related CD9 is expressed in mouse CNS myelin at a very late stage of myelination. J. Neurosci. Res., 50, 312-320

4. Peyron F., Timsit, S., Thomas J-L., Kagawa, T., Ikenaka, K., and Zalc, B. (1997) In situ expression of PLP/DM20, MBP, and CNP during embryonic and postnatal development of the jimpy mutant and of transgenic mice overexpressing PLP. J. Neurosci. Res., 50, 190-201

5. Miyao, Y., Shimizu, K. Tamura, M., Akita, H., Ikeda, K., Mabuchi, E., Kishima, H., Hayakawa, T. and Ikenaka, K. (1997) Usefulness of a mouse myelin basic protein promoter for gene therapy of malignant glioma: Myelin basic protein promoter is strongly active in human malignant glioma cells. Jpn. J. Cancer Res., 88, 678-686

6. Miyao, Y., Ikenaka, K., Kishima, H., Tamura, M., Nakamura, K., Kurumi, M., Hayakawa, T. and Shimizu, K. (1997) FUT-175, a Synthetic inhibitor of the complement pathway, protects against the inactivation of infectious retroviruses by human serum. Human Gene Therapy., 8., 1575-1583

7. Ikeda, H., Yoshida, J., Yamada, H., Yoshimatsu, T. and Ikenaka, K. (1997) Retroviral introduction of the p16 gene into murine cell lines to elicit marked antiproliferative effects. Jpn. J. Cancer Res. 88., 712-717

8. Mabuchi, E., Shimizu, K., Miyao, Y., Kaneda, Y., Kishima, H., Tamura, M., Ikenaka, K. and Hayakawa, T. (1997) Gene delivery by HVJ-liposome in the experimental gene therapy of murine glioma. Gene Therapy. 4., 768-772

9. Baba, H., Nakahira, K., Morita, N., Tanaka, F., Akita, H. and Ikenaka, K. (1997) GFAP gene expression during development of astrocyte. Dev. Neurosci., 19., 49-57

10. Morita, N., Nakahira, K., Baba, H., Akita, H., Kumada, T., Ogawa, M., Nakajima, K., Kawata, M., Mikoshiba, K. and Ikenaka, K. (1997) Astrocytic lineage analysis by detection of GFAP promoter activity in vitro. Dev. Neurosci., 19., 210-218

11. Tamura, M., Shimizu, K., Yamada, M., Miyao, Y., Hayakawa, T. and Ikenaka, K. (1997) Targeted killing of migrating glioma cells by injection of HTK-modified glioma cells. Human Gene Therapy. 8., 381-391

12. 池中一裕, (1997) Myelin proteolipid protein (PLP) Molecular Medicine Vol.34 臨時増号　ノックアウトマウス・データブック, 342-343

13. 奥村俊一郎, 池中一裕 (1997) 癌の遺伝子治療への試み　医学の歩み, 7, 446-447

《液性情報研究部門》

1）原著論文

1．Nakai J, Ogura T, Protasi F, Franzini-Armstrong C, Allen PD, Beam KG. (1997) Functional nonequality of the cardiac and skeletal ryanodine receptor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1019-1022.

2．Garcia J, Nakai J, Imoto K, Beam K G (1997) Role of S4 Segments and the Leucine Heptad Motif in the Activation of an L-Type Calcium Channel. Biophys. J. 72, 2515-2523.

3．Dirksen RT, Nakai J, Gonzarez A, Imoto K, Beam KG (1997) The S5-S6 linker of repeat I is a critical determinant of L-type Ca^{2+} channel conductance. Biophys. J. 73, 1402-1409.

4．Furukawa T, Nukada T, Suzuki K, Fujita Y, Mori Y, Nishimura M, Yamanaka M (1997) Voltage and pH dependent block of cloned N-type Ca^{2+} channels by amlodipine. Br. J. Parmacol. 121, 1136-1140.

5．Kobayashi T, Strobeck M, Schwartz A, Mori Y (1997) Inhibitory effects of a new neuroprotective dilitiazem analogue, T-477, on cloned brain Ca^{2+} channels expressed in Xenopus oocytes. Eur J Parmacol 332: 313-320

6．Nakashima Y, Nishimura S, Maeda A, Hakamata Y, Nakai J, Allen PD, Imoto K, Kita T. Molecular cloning and characterization of a human brain ryanodine receptor, FEBS Lett 417: 157-162

2）総説，その他の著作

7．井本 敬二 神経系とカルシウム (1997) ―分子生物学的研究の成果と今後の問題点― 小児神経学の進歩 第26集，129-138

8．中井淳一 (1997) リアノジン受容体・カルシウム放出チャネルと悪性高熱 最新医学 51: 36-41

9．井本敬二 (1997) 分子生物学的実験のための準備と基礎技術 日本生理学会誌 59: 271-278

10．森 泰生 (1997) Mutagenesis によるレセプター，チャネルの構造機能解析 日本生理学会

誌

11. 森島　繁，森　泰生，井本敬二 (1997) 電位依存性カチオンチャネルと神経・筋・心疾患 Inチャネルとトランスポーター：その働きと病気　分子医科学で病気を識るシリーズ5（岡田泰伸，清野　進　編）78-100 メジカルビュー社，東京

《高次神経機構研究部門》

1. Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T., & Fujisawa, H. (1997) Neuropilin Function as a Receptor for Semaphorion」/D, and Plays a Crucial Role in Peripheral Nerve Projection in Mice. *Neuron* 19, 995-1005

2. Taniguchi, M., Yuasa, S., Fujisawa, H., Naruse, I., Saga, S., Mishina, M., & Yagi, T. (1997) Diaruption of semaphorin」/D gene causes severe abnormality in peripheral nerve projection. *Neuron* 19, 519-530

3. Miyakawa, T., Yagi, T., Kitazawa, H., Yasuda, M., Kawai, N., Tsuboi, K., & Niki, H. (1997) Fyn-Kinase as a determinant of ethanol sensitivity: Relation to NMDA-receptor function. *Science*278, 698-701

4. Kai, N., Mishina, M., & Yagi, T. (1997) Molecular cloning of Fyn-associated molecules in the mouce central nervous system. *J. Neuroscience Res*48, 407-424

5. Yagi, T., Takahashi, T., Kakinuma, S., Kurokawa, A., Okada, T., Takatsu, Aizawa, S., & Katagiri, T., (1997) Suppression of autoimmune disease and of massive lymphadenopathy in MRL/MRL-lpr mice lacking tyrosine kinase Fyn (p59fyn). *J. Immunol*159, 2532-2541

6. Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding,R-D., Kanbara, N., Kuzume, H., Sanbo, M., Yagi, T., & Obata, K. (1997) Cleft palate and decreased brain gamma-aminobutyric acid in mice lacking the 67 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*94, 6496-6499

7. Taniguchi, M., Yasuda, S., Seto-Ohshima, A., Mishina, M., & Yagi, T. (1997) Role of collapsin-1 in axonal guidance. *Society for Neuroscience Abstracts*23, Part 1 246.12

8. Yasuda, M., & Yagi, T. (1997) A brain-specific fyn-associated protein thathas a subtype in dba/2 mice. *Society for Neuroscience Abstracts*23, Part 1 578.11

9. 八木　健, 甲斐信行, 安田昌弘 (1997) 脳機能の遺伝, 現代化学ー増刊32, 神経細胞の生と死, 3-8

10. 八木　健 (1997) 脳の進化をもたらした遺伝子の探索ー情動形成に関わる分子メカニズムによる研究ー, 細胞工学 16, 1140-1149

11. 八木　健 (1997) Fyn 欠損マウスの脳形成・機能異常の解析, 神経研究の進歩 41, 794-801

《情報記憶研究部門》

1, Kurahashi T & Menini A (1997) Mechanism of Odorant Adaptation in the Olfactory Receptor Cell. Nature 385, 725-729.

2. Kawai, F., Kurahashi, T. and Kaneko, A., "Nonselective suppression of voltage-gated currents by odorants in the newt olfactory receptor cells", Journal of General Physiology, 109: 265-272, 1997

3. Kawai, F., Kurahashi, T. and Kaneko, A., "Quantitative analysis of Na^+ and Ca^{2+} current contributions on spike initiation in the newt olfactory receptor cell", Japanese Journal of Physiology, 47(4): 367-376, 1997

4. Wakazono Y, et al. (1997) Appearance of a fast inactivating voltage-dependent K^+ current in developing cerebellar granule cells in vitro. Neutrosci Res. (4): 291-301.

5. 河合房夫, 倉橋　隆, "嗅覚器", 生体の科学, 47(5), pp.482-485, 1996

6. 倉橋　隆 (1997) 匂いのセンサー, 共立出版　シリーズニューバイオフィジックス, 6巻 生物スーパーセンサー, pp.44-53

《高次神経性調節研究部門》

（原著論文）

1．Murakami I, Komatsu H & Kinoshita M (1997) Perceptual filling-in at the scotoma following monocular retinal lesion in the monkey. Visual Neuroscience 14: 89-101

（総説，その他の論文）

1．Komatsu H, Murakami I & Kinoshita M (1997) Surface representation in the visual system. In Brain and Mind-for better understanding of the dynamic function of mind and its supporting brain mechanism ed. M Ito Elsevier Amsterdam 187-201

2．Komatsu H (1997) Neural representation of color in the inferior temporal cortex of the macaque monkey. In The Association Cortex-Structure and Functions Ed. Sakata H, Mikami A & Fuster J M. Harwood academic publishers, 269-280

3．小松英彦 (1997) 視覚系の構造と機能　In シリーズ・ニューバイオフィジックス（脳・神経システムの数理モデル―視覚系を中心に―（日本生物物理学会ニューバイオフィジックス刊行委員会編）87-105 共立出版

（学会抄録）

1．von der Heydt R, Friedman H S, Zhou H, Komatsu H, Hanazawa A & Murakami I (1997) Neuronal responses in monkey V1 and V2 unaffected by metacontrast. Investigative Opthalmology & Visual Sci 38: S459

2．花澤明俊，村上郁也，小松英彦 (1997) マカクザル第一次視覚野における色表現　日本生理学雑誌 59: 169

3．Hanazawa A, Murakami I, Kondo H & Komatsu H (1997) Transformation of color information in V1 of the macaque monkey. XXXIII International Congress of Physiological Sciences Abstracts, P080.05.

4．Komatsu H, Hanazawa A & Kondo H (1997) Linearity in color selective responses of macaque LGN neurons. Neuroscience Research 21 (Suppl) S206

5．Komatsu H & Kinoshita M (1997) The coding of figure size in the macaque striate cortex

(V1). Society for Neuroscience Abstract 23: 454

6. Hanazawa A, Murakami I, Kondo H, & Komatsu H (1997) Hue/saturation color selectivity originates in V1, not in LGN, of the macaque monkey. Society for Neuroscience Abstract 23: 1026

《生体システム研究部門》

1) 原著論文

1. Matsuyama K, Takakusaki K, Nakajima K, and Mori S. (1997) Multi-segmental innervation of single pontine reticulospinal axons in the cervico-thoracic region of the cat. An anterograde PHA-L tracing study. J.Comp.Neurol., 377: 234-250.

2. Matsuyama K, and Drew T. (1997) Organization of the projections from the pericruciate cortex to the pontomedullary brainstem of the cat: a study using the anterograde tracer Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. J.Comp.Neurol., 389: 617-641.

3. Asanome M, Matsuyama K, and Mori S (1998) Augmentation of postural muscle tone induced by the stimulation of the descending fibers in the midline area of the cerebellar white matter in the acute decereberate cat. Neurosci Res 30, 257-269

2) 総説その他の著作

1. 森　茂美 (1997) 歩行運動の神経生理学　臨床脳波 Vol.39, No.2, 73-79.

2. 森　茂美 (1997) 運動の制御 [Ⅳ] ブレインサイエンス Vol.7-4, 83-96.

3. Mori S. (1997) Neurophysiology of locomotion: Recent advances of the study of locomotion. In Gait disorders of aging, falls and therapeutic strategies. (eds. Masdeu J C, Sudarsky L, and Wolfson L), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp.55-78.

4. 森　茂美 (1997) 運動の階層性制御，セラピストのための基礎研究論文集 1　運動の制御と運動学習 (eds. 宮本省三・沖田一彦)，pp.23-47.

5. 宮下英三 (1998) 一次運動野による手の運動制御　神経研究の進歩 1998 vol 42 pp.68-77.

3）学会発表の抄録論文アブストラクト

1. Asanome M, Nakajima K, Matsuyama K & Mori S (1997) Augmenting effects of postural muscle tone induced by the stimulation to the midline area of the cerebellum in cats. Jpn J Physiol, Supple, 46, S143.

2. Hamada Y, Miyashita E & Tanaka H. (1997) Gamma-band LFP oscillation in the barrel cortex precedes rat's whiskering as exploring behavior. Neurosci Res Suppl., Vol 21, S221.

3. Kekesi A, Matsuyama K, Mori S, Dobolyi A & Juhasz G. (1997) Extracellular monoamine and amino acid levels in the caudate nucleus, thalamic nuclei (VA/VL) and pontine reticular formation in the freely moving cat. Neurosci. Res. Supple., 21, S182.

4. Kuze B, Matsui T, Matsuyama K & Mori S (1997) Multi-segmental innervation of single vestibulospinal axons descending from the Deiters' nucleus. Society for Neuroscience abstractsVol. 23, part1, P1043

5. Kuze B, Matsui T, Matsuyama K & Mori S. (1997) Multi-segmental innervation of single vestibulospinal axons descending from the Deiters' nucleus in the cervico-thoracic segment. Neurosci Res. Suppl., 21, S201

6. Matsui T, Kuze B, Matsuyama K, & Mori S. (1997) Response properties of pontomedullary reticulospinal cells to the stimulation of the locomotion inducing regions in the mesencephalon and the cerebellum in decerebrate cats. Society for Neuroscience abstracts, Vol 23 part 1, P1043.

7. Matsuyama K, Nakajima K, Matui T, Kuze B & Mori S (1997) Axonal morphology of lumbar interneurons involved in fictive locomotion in the cat. COE International Symposium Abstracts (Okazaki), p78.

8. Matsuyama K, Nakajima K & Mori S. (1997) Lumbar interneurons in the cat; Discharge pattern during fictive locomotion and axonal morphology. International Symposium "Brain and Movement" Abstract (St. Petersburg & Moscow), p133.

9. Matsuyama K, Nakajima K & Mori S (1997) Collateralization in the cat lumbar spinal cord of bulbospinal axons involved in fictive locomotion. International Congress of Physiological Sci-

ences Abstruct (St. Petersburg), P078-13.

10. Mori S, Nakajima K, Asanome M, & Matsuyama K (1997) Characteristics of bipedal locomotion in nonhuman primates (Japanese monkeys; Macaca fuscata) on a surface of a moving treadmill. COE International Symposium Abstracts (Okazaki), p80.

11. Mori S, Matsuyama K, Asanime M, Nakajima K, Matsui T & Kuze B. (1997) Cerebellar control of postural muscle tone and locomotion in acute decerebrate cats. International Symposium "Brain and Movement" Abstract (St. Petersburg & Moscow), p136

12. Nakajima, K., Matsuyama, K. and Mori, S. (1997) Contribution of serotonergic system to the postnatal development of fore- and hindlimb extensor motoneurons in newborn rats. Jpn. J. Physiol. Supple, 46, S140.

13. Nakajima K, Matsuyama K and Mori S. (1997) How do the Japanese monkeys walking on the treadmill change their locomotion from the quadrupedal to bipedal patterns? Neurosci. Res., Supple. 21, S192.

《高次液性調節研究部門》

1）原著論文リスト

1. Okuno H, Kanou S, Tokuyama W, Li YX & Miyashita Y (1997) Layer-specific differential regulation of transcription factors Zif268 and Jun-D in visual cortex V1 and V2 of macaque monkeys. Neuroscience 81: 653-666.

2. Sekihara K, Poeppel D, Marantz A, Koizumi H & Miyashita Y (1997) Noise covariance incorporated MEG-MUSIC algorithm: A method for multiple-dipole estimation tolerant of the influence of background brain activity. IEEE Transactions on Biomedical Engineering 44: 839-847.

3. Ito K, Miyashita Y & Kasai H (1997) Micromolar and submicromolar Ca^{2+} spikes regulating distinct cellular functions in pancreatic acinar cells. EMBO J 16: 242-251.

4. Ninomiya Y, Kishimoto T, Yamazawa T, Ikeda H, Miyashita Y & Kasai H (1997) Kinetic di-

versity in the fusion of exocytotic vesicles. EMBO J 16: 929-934.

5. Sato T, Tokuyama W, Miyashita Y & Okuno H (1997) Temporal and spatial dissociation of expression patterns between Zif268 and c-Foes in rat inferior olive during vestibular compensation. NeuroReport 8: 1891-1895.

6. Sjodin L, Ito K, Miyashita Y & Kasai H (1997) Cytoplasmic Ca2 + gradients evoked by acetylcholine and peptides in pancreatic acinar cells of the guinea-pig. Eur J Physiol 433: 397-402.

7. Takahashi N, Kadowaki T, Yazaki Y, Miyashita Y and Kasai H (1997) Multiple exocytotic pathways in pancreatic βcells. J Cell Biol 138: 55-64.

8. Konishi S, Nakajima K, Uchida I, Sekihara K & Miyashita Y (1997) Temporally resolved nogo dominant brain activity in the prefrontal cortex revealed by fubctional magnetic resonance imaging. NeuroImage 5: 120.

2）総説，その他の著作

1. Ito M, Miyashita Y & Rolls ET (Editors) (1997) Cognition, Computation, & Consciousness. Oxford University Press.

2. Miyashita Y, Okuno H, Tokuyama W, Ihara T & Nakajima K (1997) Feedback signal from medial temporal lobe mediates visual associative mnemonic codes of inferotemporal neurons. In: Brain and Mind (ed Ito M), Elsevier Science, Amsterdam. pp.153-164.

3. Miyashita Y (1997) Neuronal origin of visual imagery. In: Cognition, Computation, & Consciousness, (eds M Ito, Y Miyashita & ET Rolls), Oxford University Press, pp151-161.

3）学会抄録

1. Konishi S, Nakajima K, Kameyama M, Sekihara K & Miyashita Y (1997) Direct analysis of brain activity in prefrontal cortex related to extradimensional shift. Soc Neurosci Abstr 23: 211.

2. Okuno H., Tokuyama W, Li XY, Hashimoto T & Miyashita Y (1997) Differential transcriptional regulation of neurotrophic factors and TRK receptors in visual cortices of macaque monkeys. Soc Neurosci Abstr 23: 1396.

3. Okuno H, Tokuyama W, Li XY, Ohbayashi M & Miyashita Y (1997) Comparison of BDNF and trkB mRNA expression levels in the monkey visual cortices by quantitative RT-PCR. Jpn J Physiol 47 (Suppl) S204.

4. Tokuyama W, Okuno H, Sato T, Li XY & Miyashita Y (1997) Quantification of NT-3 and trkC mRNA in the monkey cerebral cortex: : a quantitative RT-PCR study. Jpn J Physiol 47 (Suppl) S204.

5. Kasai H, Ninomiya Y, Kishimoto T & Miyashita Y (1997) Kinetic diversity in the fusion and Ca^{2+} binding of the exocytotic machinery. Jpn J Physiol 47 (Suppl) S5.

6. Ito K, Miyashita Y & Kasai H (1997) Agonist-induced micromolor Ca^{2+} spikes triggering exocytotic secretion from exocrine pancreas. Jpn J Physiol 47 (Suppl) S60.

7. Maeda H, Ito K, Miyashita Y & Kasai H (1997) Ca^{2+} imaging of cultured purkinje cells using the low affinity Ca^{2+} indicator BTC. Jpn J Physiol 47 (Suppl) S61.

8. Takahashi N, Kadowaki T, Yazaki Y, Miyashita Y & Kasai H (1997) Multiple exocytotic pathways in pancreatic β-cells revealed by simultaneous application of capacitance measurements and amperometric detection. Jpn J Physiol 47 (Suppl) S66.

9. Uchida I, Kikyo H, Nakajima K, Konishi S & Miyashita Y (1997) Kanji-sensitive regions in human visual cortex studies by functional MRI. Jpn J Physiol 47 (Suppl) S150, 1997.

10. Tokuyama W, Okuno H, Li XY Hashimoto T, Sato, T & Miyashita, Y. (1997) Quantification of mRNAs neurotrophins and their receptors in primate visual cortices. Neurosci. Res. 21 (Suppl) S213.

11. Konishi S Nakajima K., Uchida I, Kikyo H, Kameyama M, Sekihara K & Miyashita Y (1997) Mapping of response inhibition function of the prefrontal cortex using functional magnetic resonance imaging. Neurosci. Res. 21 (Suppl) S290.

12. Sato T, Tokuyama W, Okuno H & Miyashita Y (1997) Differential induction of Zif268 and c-Fos in rat beta nucleus and dorsal cap of inferior olive during vestibular compensation. Neurosci. Res. 21 (Suppl) S169.

13. Miyashita Y (1997) Neural mechanisms of visual memory. Neuropathology 17, S2.

《感覚・運動機能研究プロジェクト》

1）原著論文

1. Kaneoke Y, Bundou M, Koyama S, Suzuki H, Kakigi R (1997) Human cortical area responding to stimuli in apparent motion NeuroReport 8: 677-682.

2. Kitamura Y, Kakigi R, Hoshiyama M, Koyama S, Watanabe S & Shimojo M (1997) Pain-related somatosensory evoked magnetic fields following lower limb stimulation. J Neurol Sci 145: 187-194.

3. Kakigi R, Shimojo M, Hoshiyama M, Koyama S, Watanabe S, Naka D, Suzuki H & Nakamura A (1997) Effects of movement and movement imagery on somatosensory evoked magnetic fields following posterior tibial nerve stimulation. Cogn Brain Res 5: 241-253.

4. Xiang J, Kakigi R, Hoshiyama M, Kaneoke Y, Naka D, Takeshima Y & Koyama S (1997) Somatosensory evoked magnetic fields and potentials following passive toe movement in humans. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 104: 393-401.

5. Xiang J, Hoshiyama M., Koyama Y, Kaneoke Y, Suzuki H, Watanabe S, Naka D & Kakigi R (1997) Somatosensory evoked magnetic fields following passive finger movement. Cogn Brain Res 6: 73-82.

6. Hoshiyama M, Kakigi R, Koyama S, Watanabe S & Shimojo M (1997) Activity in posterior parietal cortex following somatosensory stimulation in man: magnetoencephalographic study using spatio-temporal source analysis. Brain Topogr 10: 23-30

7. Hoshiyama M, Kakigi R, Koyama S, Takeshima Y, Watanabe S & Shimojo M (1997) Temporal changes of pyramidal tract activities after decision of movement: a study using transcranial magnetic stimulation of the motor cortex in humans. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 105: 255-261

8. Hoshiyama M, Kakigi R, Berg P, Koyama S, Kitamura Y, Shimojo M, Watanabe S & Nakamura

A (1997) Identification of motor and sensory brain activities during unilateral finger movement: spatiotemporal source analysis of movement-associated magnetic fields. Exp Brain Res 115: 6-14

2）総説その他

1．Kakigi R (1997) CO_2 laser-induced pain-related somatosensory evoked potentials. (Editorial), Internal Medicine, 36: 849-850

2．柿木隆介 (1997) 脳磁計の脳機能研究への有用性　新医療 24: 88-91.

3．柿木隆介 (1997) 体性感覚誘発脳磁界　リハビリテーション医学 34: 195-198

4．柿木隆介 (1997) 痛み関連脳電位　臨床検査増刊号「神経系疾患と臨床検査」41: 1432.

5．杉　剛直，中村政俊，池田昭夫，柿木隆介，柴崎　浩 (1997) 安静閉眼時背景脳波の徐波特性定量判読，医用電子と生体工学，35: 95-99.

6．下条素子，柿木隆介 (1997) 下肢神経刺激による体性感覚誘発脳磁界　臨床脳波，39: 528-535

3）学会抄録その他

1．Bundou M, Kaneoke Y, Suzuki H, Koyama S, Yoshida J & Kakigi R (1997) Human neuromagnetic response to stimuli in apparent motion with varied spatial parameter Neurosci Res Suppl 21: S210

2．Naka D, Koyama S, Kaneoke Y & Kakigi R (1997) Effect of tactile interference stimulation on somatosensory evoked magnetic field (SEF) following posterior tibial nerve stimulation. Society for Neuroscience Abstracts 23: 1008

3．Koyama S, Watanabe S, Naka D & Kakigi R (1997) Evoked magnetic responses during a word recognition. task Society for Neuroscience Abstracts 23: 1057

4．Kaneoke Y, Bundou M & Kakigi R (1997) Speed of response to visual stimuli in apparent motion in human visual motion area Society for Neuroscience Abstracts 23: 457

5. Hoshiyama M, Kakigi R & Koyama S (1997) Spatio-temporal source analysis of movement associated brain magnetic fields Neurosci Res Suppl 21: S191

6. Bundou M, Kaneoke Y, Suzuki H, Koyama S, Yoshida J & Kakigi R (1997) Human neuromagnetic response to stimuli in apparent motion with varied spatial parameter Neurosci Rese Supple 21: S210

7. Koyama S, Kakigi R, Watanabe S, Naka D & Kaneoke Y (1997) Evoked magnetic responses associated with word recognition Neurosci Res Suppl 21: S292

8. 金桶吉起，文堂昌彦，鈴木啓之，小山紗智子，柿木隆介，中　大輔 (1997) 仮現運動刺激に反応するヒト大脳皮質領域　日本生体磁気学会誌 10: 162-163

9. 中　大輔，柿木隆介，小山紗智子，渡辺昌子，金桶吉起 (1997) 後脛骨神経刺激による体性感覚誘発脳磁界に対する触覚干渉刺激の影響　日本生体磁気学会誌 10: 54-55

10. 宝珠山稔，柿木隆介，小山紗智子 (1997) 多双極子モデル (BESA) を用いた運動関連脳磁場の研究　日本生体磁気学会誌 10: 176-177

11. 向　　敬，宝珠山稔，小山紗智子，渡辺昌子，金桶吉起，柿木隆介 (1997) 指受動運動による体性感覚誘発脳磁場　脳波と筋電図 25: 136

12. 柿木隆介 (1997) 体性感覚誘発電位　脳波と筋電図 25: 106

13. 金桶吉起，柿木隆介 (1997) 脳磁図と脳波によるヒト運動視中枢の同定とその臨床応用の可能性の検討　臨床神経学 37: 1244

《高次脳機能研究プロジェクト》

A. 論文

1. Itazawa S, Isa T, Ozawa S (1997) Inwardly rectifying and Ca^{2+} -permeable AMPA-type glutamate receptor channels in rat neocortical neurons.Journal of Neurophysiology, 78: 2592-2605

2. Yamamoto K, Kobayashi Y, Kawano K, Takemura A, Kawato M (1997) A mathematical model

that reproduces vertical ocular following responses from visual stimuli by reproducing by simple spike firing frequency of Purkinje cells in the cerebellum. Neurosci. Res 29: 161-169

《自律機能研究プロジェクト》

1）原著論文リスト

1．Nakano S, Imamura S, Tokunaga K, Tsuji S, Hashimoto I (1997) Evoked Potentials in Patients with Chronic Respiratory Insufficiency. Internal Medicine 36: 270-275

2．岩瀬嘉志，山内裕雄，落合直之，益子拓徳，今田俊明，橋本　勲 (1997) 末梢神経障害における複合神経活動磁界の計測　日本生体磁気学会誌 9: 1-12

3．斉藤泰彦，井口義信，中野修治，橋本　勲 (1997) 体性感覚刺激による事象関連電位成分の要素波解析　足利工業大学研究集録 24: 201-205

4．橋本　勲，益子拓徳，今田俊明 (1997) 手指の振動刺激による脳磁界反応　日本生体磁気学会誌 10: 64-67

5．福島達臣，橋本　勲 (1997) インターフェロンによる末梢神経障害：電気生理学的検討　臨床脳波 39: 593-597

6．福島達臣，大東祥孝，橋本　勲 (1997) 左半球の広汎な血流低下を伴った非流暢性ジャルゴン失語　神経内科 47: 611-614

7．岩瀬嘉志，黒澤　尚，落合直之，益子拓徳，今田俊明，橋本　勲 (1997) 末梢神経障害における活動電位のコンピュータ・シミュレーションと計測された磁場信号の比較：振動現象の解釈　日本生体磁気学会誌 10: 17-28

2）総説，その他の著作

1．橋本　勲 (1997) 体性感覚と運動の MEG In 脳磁気科学－ SQUID 計測と医学応用－（原宏－栗城真也編）178-195 オーム社

3）学会発表の抄録論文・アブストラクト

1．木村友昭，西條一止，橋本　勲 (1998) 絶縁鍼電極による motor point 刺激 SEPs 脳波と筋電

図 26: 110

2．尾崎　勇，鈴木千恵子，馬場正之，八重樫裕幸，橋本　勲 (1998) 正中神経 SEP 早期皮膚反応の高周波成分について　脳波と筋電図 26: 113

3．橋本　勲，益子拓徳，今田俊明 (1998) ヒト 1 次体性感覚野に周波数再現はあるか：脳磁図による検討　脳波と筋電図 26: 116

4．福島達臣，橋本　勲 (1998) 体性感覚情報処理過程における聴覚刺激の先行効果：脳磁図を用いた研究　脳波と筋電図 26: 117

5．井口義信，橋本　勲 (1998) 視覚誘発 ERP による単語熟読中の情報処理課程の検討　脳波と筋電図 26: 121

6．中野修治，橋本　勲 (1998) Visual Display Terminal (VDT) データ入力作業が事象関連電位に与える影響　脳波と筋電図 26: 121

7．斉藤泰彦，井口義信，中野修治，橋本　勲 (1998) air-puff 皮膚刺激による事象関連電位 (ERPs) の要素波抽出　脳波と筋電図 26: 128

8．福島達臣，勇内郁子，橋本　勲 (1998) アルツハイマー病における事象関連電位の左右差の検討　脳波と筋電図 26: 131

9．岩瀬嘉志，落合直之，益子拓徳，今田俊明，橋本　勲 (1998) 末梢神経障害における誘発電位の電算機シミュレーションと計測された磁場信号との比較：振動現象の解釈　脳波と筋電図 26: 147

《生体機能検査室》

1）原著論文

1．Takashi Konno, Yuji Kamatari, Mikio Kataoka & Kazuyuki Akasaka "Urea-induced conformational changes in cold- and heat-denatured states of a protein, Streptomyces subtilisin inhibitor." (1997) Protein Sci. 6: 2242-2249.

2. Takashi Konno, Naoki Tanaka, Mikio Kataoka, Emiko Takano & Masatoshi Maki "A circular dichroism study of preferential hydration and alcohol effects on a denatured protein, pig calpastatin domain I." (1997) Biochem. Biophys. Acta 1342: 73-82.

3. Kenji Inaba, Keisuke Wakasugi, Koichiro Ishimori, Takashi Konno, Mikio Kataoka & Isao Morishima "Structural and functional roles of modules in hemoglobin - substitution of module M4 in hemoglobin subunits." (1997) J. Biol. Chem. 272: 30054-30060.

2) 総説, その他

1. Kazuyuki Akasaka, Tohro Yamaguchi, Hiroshi Yamada, Yuji Kamatari, and Takashi Konno. "NMR Approachs to Heat-, Cold-, and Pressure Induced Unfolding of Proteins" (1997) A contributed chapter to the book associated with the International NMR Symposium (March 1994, Stanford University), Oxford University Press.

2. Takasshi Konno, Mikio Kataoka, Kenji Inaba and Isao Morishima. (1997) "Solution X-ray scattering study of chimeric hemoglobin" Photon Factory Activity Report 1996 14: 245.

3. Yuichi Harano, Yuji Kamatari, Takasshi Konno, Mikio Kataoka and Kazuyuki Akasaka. (1997) "pH dependent conformation of heat-denatured apomyoglobin" Photon Factory Activity Report 1996 14: 247.

4. Yuji Kamatari, Takasshi Konno, Mikio Kataoka, Shoko Ohji and Kazuyuki Akasaka. (1997) "Small angle X-ray scattering analysis of methanol-induced expanded helical conformation of proteins" Photon Factory Activity Report 1996 14: 248.

《組織培養標本室》

1. Furuya S, Nagata R, Ozaki Y, Furuya K, Nakayama T, Nagahama M (1997) A monoclonal antibody to astrocytes, subepithelial fibroblasts of small intestinal villi and interstitial cells of the myenteric plexus layer. Anat Embryol 1295: 113-126

2. Furuya S, Naruse S, Ando E, Nokihara K, Hayakawa T (1997) Effect and distribution of intravenously injected ^{125}I-guanylin in rat kidney examined by high resolution light microscopic radioautography. Anat Embryol 196: 185-193

3．Nakano H, Furuya K, Furuya S & Yamagishi S (1997) Involvement of P2-purinergic receptors in intracellular Ca^{2+} responses and the contaction of mammary myoepithelial cells. Plüfgers Archiv 435: 1-8

《超高圧電子顕微鏡室》

1．有井達夫 (1997) 超高圧電顕によるイメージングプレート像の特性Ⅲ。日本物理学会　第52回年会講演概要集 2, p 374.

2．有井達夫 (1997) 超高圧電顕によるフィルム像とイメージングプレート像の特性Ⅲ。日本電子顕微鏡学会第53回学術講演会　発表要旨集（電子顕微鏡 32, Supple. 1）p 194.

3．仙石昌也，有井達夫，花井孝明，大野　完 (1997) Imaging plate を用いた有機物結晶の電子照射損傷の測定。日本物理学会　1997年秋の分科会　講演概要集 2, 387.

4．有井達夫 (1997) 電子線二次元検出器としてのイメージングプレートの感度と分解能Ⅲ。日本結晶学会年会　講演要旨集 1997 p 71.

5．谷口美恵子，荒金宏臣，有井達夫 (1997.10) プロトプラストの電気融合過程におけるミクロフィラメントのネットワーク形成。生物物理，37, S194.

6．谷口美恵子，荒金宏臣，鈴木直哉，有井達夫 (1997) プロトプラストの電気細胞融合過程におけるミクロフィラメントのネットワーク形成。Prog. 20th Meeting Japan Soc. For Laser Microscopy, 46-53.

《超高圧電子顕微鏡共同利用実験（除アブストラクト）》

1．追手　巍，斉藤真子，村上修一 (1996) 血管内皮細胞による周細胞の機能抑制―腎糸球体をモデルとして―。新潟医学会雑誌 110, 207-209.

2．T. Ezaki, Y. Uehara (1997) Thymic nurse cells forming a dynamic microenvironment in spontaneous thymoma BUF/Nna rats. Arch. Histol. Cytol., 60, 39-51.

3．R. Hashimoto, O. Tanaka, H. Otani (1997) Selective translocation of different markers in the ante- and retrograde pathways between the Golgi apparatus and the rough endoplasmic reticulum. Ann. Anat. 179, 105-116.

4．日高　聰，橋本葉子 (1997) 色弁別能を有するウグイ網膜においてギャップ結合で連結した双極細胞，アマクリン細胞と神経節細胞の規則的なモザイク。東京女医大誌，67, 248-275.

5．片桐展子，片桐康雄，島谷祐一，相川英三，橋本葉子 (1997) 準薄切切片による皮膚光覚細胞軸索の走行の立体構築　東京女医大誌，67, 332-341.

6．K. Hama (1997) Neurological research and shared imaging resources at the National Institutes in Okazaki, Japan. Proceeding of the 55th annual meeting of the Micros. Soc. America: pp. 293-294.

7．M. Saikawa(1997) Light and electron mivroscopy of Zoophagus tentaclum, a rediscovered rotifer-capturing aquatic fungus from Japan. Mycologia, 89. 268-273.

8．T. Nagata (1997) Three dimensional observations on whole mount cultured cells and thick sections stained with histochemical reactions by high voltage electron microscopy. In Recent advances in microscopy of cells, tissues and organs(ed. P.M. Motta). pp.37-44.

9．谷口美恵子，荒金宏臣，鈴木直哉，有井達夫 (1997) プロトプラストの電気細胞融合過程におけるミクロフィラメントのネットワーク形成。Prog. 20th Meeting Japan Soc. For Laser Microscopy, 46-53.

《電子計算機室》

1）原著論文

1．石井宏幸，山本将生，神山斉己，臼井支朗 (1997) 網膜水平細胞へのシナプス性入力信号の空間特性解析。電子情報通信学会論文誌 (D-II) J80-D-II: 1939-1946

2）総説，その他の著書

2．臼井支朗，神山斉己，石井宏幸 (1997) イオン電流モデルによる神経システムのシミュレーション。骨・関節・靭帯 10: 469-477

3）学会発表の抄録論文・アブストラクトなど

3．Ishii, H. and Komatsu, H. (1997) Simulation study on the effects of two synaptic inputs on neural responses. Neurosci Res Suppl 21: S297

4．Ishii, H., Kamiyama, Y. and Usui, S. (1997) Simulation study on chromatic properties of retinal horizontal cell responses. Jpn J Physiol 47 (Suppl.2) : S157

《動物実験施設》

1．Watanabe Y., Ito T., Iino S., Harada T., Ando H., Seo T., Kobayashi S. & Ozaki T. (1997) Unique spindle cells in the involved ileal segment of rats with congenital Aganglionosis. Journal of Pediatric Surgery 32:1229-1233

2．Ishikawa K. & Ozaki T. (1977) Distribution of several gut neuropeptides and their effects on motor activity in muscularis mucosae of guinea-pig proximal colon. J. Autonomic Nervous System 64:91-100

3．Onaga T., Kubagaya S., Lee S., Mineo H., Kato S., Naruse S. & Ozaki T. (1997) Role of peptide YY in regulation of duodenal motility during the interdigestive period in sheep. J. Comp. Physiol. B 167: 352-360

4．山崎由起子，藤本弘一，野瀬俊明（1997）in vivo エレクトロポレーション　動物細胞への新たな物理的生体遺伝子導入法　実験医学　15:268-271

b．学会発表

〔目　　次〕

神経化学研究部門 …… 113
超微小形態生理研究部門 …… 114
細胞内代謝研究部門 …… 116
生体膜研究部門 …… 118
機能協関研究部門 …… 119
神経情報研究部門 …… 120
液性情報研究部門 …… 124
高次神経機構研究部門 …… 125
情報記憶研究部門 …… 127
高次神経性調節研究部門 …… 127
生体システム研究部門 …… 128
高次液性調節研究部門 …… 130
感覚・運動機能研究プロジェクト …… 132
高次脳機能研究プロジェクト …… 135
自律機能研究プロジェクト …… 137
生体機能検査室 …… 138
超高圧電子顕微鏡室 …… 139
電子計算機室 …… 140
動物実験施設 …… 141
江橋研究室 …… 141

学　会　発　表

《神経化学研究部門》

1．丸山　敬，富田泰輔，篠崎幸喜，西道隆臣，岩坪　威，小幡邦彦 (1997.3) 培養細胞におけるアルツハイマー病アミロイド前駆体蛋白質の代謝　日本薬理学会（東京）

2．丁　日高，淺田英穂，小幡邦彦 (1997.3) カイニン酸誘発けいれんによるラット海馬 CA3 および CA1 領域からの GABA 放出　第74回日本生理学会大会（浜松）

3．淺田英穂，丸山　敬，久米秀明，丁　日高，八木　健，小幡邦彦 (1997.3) グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD) 欠損マウスを用いた脳内 GAD および GABA の変化とけいれん発作　第74回日本生理学会大会（浜松）

4．関野祐子，白尾智明，小幡邦彦 (1997.3) 海馬内神経回路における海馬 CA2 領域の機能　第74回日本生理学会大会（浜松）

5．小幡邦彦，淺田英穂，丁　日高 (1997.3) GABA の神経発生，可塑性への関与－ GABA 合成酵素 GAD65 と GAD67 の選択的役割－　第74回日本生理学会大会（浜松）

6．児島伸彦，石橋英俊，小幡邦彦 (1997.7) Fyn トランスジェニックマウスにおけるけいれんと NMDA 受容体のチロシンリン酸化の亢進　第20回日本神経科学大会（仙台）

7．陸　雲飛，児島伸彦，富沢一仁，森脇晃義，小幡邦彦，松井秀樹 (1997.7) 活性型 Fyn 発現マウス海馬における LTP 閾値の低下とシナプス伝達の増強　第20回日本神経科学大会(仙台)

8．山肩葉子，小幡邦彦 (1997.7) 神経活動と Ca^{2+} / カルモジュリン依存性プロテインキナーゼⅡ　第20回日本神経科学大会（仙台）

9．淺田英穂，川村勇樹，丸山　敬，久米秀明，神原叙子，葛目博子，八木　健，小幡邦彦 (1997.7) 67kDa グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD67) 欠損マウスの作製と解析　第20回日本神経科学大会（仙台）

10．小幡邦彦 (1997.7) 物質としてみた脳－分子生物学的アプローチ　第20回日本神経科学大会：一般公開講座（仙台）

11. 丸山　敬 (1997.8) 培養細胞でのアルツハイマー病アミロイド前駆体タンパク質の代謝の解析　プロテアーゼ研究会（名古屋）

12. 篠崎幸喜，丸山　敬，久米秀明，葛目博子，季　鳳雲，神原叙子，小幡邦彦 (1997.9) Two-Hybrid 法によるアルツハイマー病アミロイド前駆体タンパク質ならびに presenil in2 結合タンパク質の検索　日本生化学会（金沢）

13. 丸山　敬，篠崎幸喜，久米秀明，葛目博子，季　鳳雲，神原叙子，小幡邦彦 (1997.9) 神経特異的遺伝子 HE5 のクローニング　日本生化学会（金沢）

14. 久米秀明，丸山　敬，葛目博子，季　鳳雲，篠崎幸喜，小幡邦彦 (1997.9) ラット脳特異的に発現する bHLH 転写制御因子 KW8 の解析　日本生化学会（金沢）

15. Kojima N, Ishibashi H, Obata K & Kandel ER (1997.10) Epileptic seizure and enhanced tyrosine phosphorylation of NMDA receptor subunit 2B in Fyn-transgenic. 27th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans)

16. Asada H, Kawamura Y, Maruyama K, Kume H, Ding RG, Kanbara N, Kuzume H, Yagi T & Obata K (1997.10) Targeted disruption of the 67kDa isoform of glutamic acid decarboxylase gene. 27th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans)

17. Yamagata Y & Obata K (1997.10) Dynamic regulation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II by acute neuronal excitation. 27th Annual Meeting of Society for Neuroscience (New Orleans)

18. Obata K (1997.12) Development and neural function of glutamic acid decarboxylase (GAD)-deficient mice. Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine Neuroscience: Frontiers of Neural Development （東京）

《超微小形態生理研究部門》

1．加納ふみ，魚住拓也，永山國昭，村田昌之 (1997.10) セミインタクト極性細胞を用いたゴルジ体の再構築，第35回生物物理学会，（京都）

2．加納ふみ，Kai Simons，村田昌之 (1997.12) MDCK 細胞におけるゴルジ体の極性小胞輸送に関わる膜蛋白質 VIP17，第20回分子生物学会年会（京都）

3．Ohashi M, Miwako I, Nakamura K, Yamamoto A, Murata M & Nagayama K (1997.11) Investigation of the intracellular endocytic pathways using Chinese hamster ovary cell mutants. International symposium "Dynamic aspects of lysosomal/vacuolar system"（岡崎）

4．Ishido M, Ohashi M, Yamamoto A, Murata M & Nagayama K (1997.11) A Chinese hamster ovary cell mutant with a low level of low density liporpteoin degradation is defective in the late endosomal membrane dynamics. International symposium "Dynamic aspects of lysosomal/vacuolar system"（岡崎）

5．石堂美和子，大橋正人，山本章嗣，村田昌之，永山國昭 (1997.9) 受容体媒介エンドサイトーシスされた低密度リポタンパク質の細胞内輸送変異株の解析　第50回日本細胞生物学会大会（横浜）

6．高橋卓也，杉浦淳之介，永山國昭 (1997.10) 蛋白質溶媒系における実効誘電率：誘電体モデルと MD，第35回生物物理学会（京都）

7．高橋卓也，田中　全，杉浦淳之介，永山國昭 (1997.12)50本の MD シミュレーションによる蛋白質の変性過程の研究，第 4 回タンパク質立体構造の構築原理ワークショップ（三島）

8．高橋卓也 (1997.10) MD による Protein G の Unfolding Pathway の研究，平成 9 年度分子研スーパーコンピューターワークショップ '97（岡崎）

9．Murakami M, Seo Y & Ishikawa T (1997.2) Energy cost for salivary secretion by the mandibular and parotid glands. Gordon Research Conferences "Salivary glands and saliva" (Ventura·USA)

10. 中村浩二，惠良聖一，林　知也，桑田一夫，今井　一，永井直樹，村上政隆 (1997.3) レーザーラマン分光によるウシ血清アルブミン (BSA) の構造転移に関する研究　第74回日本生理学会大会（浜松）

11. 曾我美　勝，惠良聖一，村上政隆，瀬尾芳輝，上坂伸宏 (1997.3) 細胞膜水透過の絶対反応速度論的研究　第74回日本生理学会大会（浜松）

12. 村上政隆 (1997.3) 唾液腺の水エネルギー効率と導管輸送の寄与　第74回日本生理学会大会（浜松）

13. Murakami M & Seo Y (1997.5) Energy consumption associated with fluid and electrolyte transportin the mandibular and parotid glands. 2nd Internatioal Symposium on Salivary Glands in Honor of Niccolo' Stenone (Cagliari·Italy)

14. Seo Y & Murakami M (1997.5) NMR studies of salivary glands: from energy metabolism to morphology. 2nd Internatioal Symposium on Salivary Glands in Honor of Niccolo' Stenone (Cagliari·Italy)

15. Steward MC, Seo Y, Murakami M, Larcombe-McDouall JB & Case RM (1997.5) Cell volume regulation and diffusion of intracellular water in salivary acinar cells. 2nd Internatioal Symposium on Salivary Glands in Honor of Niccolo' Stenone (Cagliari·Italy)

16. 関　泰長，成瀬　達，北川元二，石黒　洋，早川哲夫，瀬尾芳輝，村上政隆 (1997.7) 高速MRビデオを用いた胃運動機能の研究　第2回NMRマイクロイメージング研究会（京都）

17. 肥塚　泉，加藤　巧，瀬尾芳輝，村上政隆 (1997.10) 高分解能MRIによるモルモット内耳微細構造の描出　第56回日本平衡神経科学会総会（松本）

18. Murakami M (1997.10) Energy Consumption for Electrolyte and Water Transport in the perfused mandibular and parotid salivary glands. International Symposium "Intracellular Control of Membrane Processes" (Homburg/Saar·Germany)

《細胞内代謝研究部門》

1. Shirakawa H & Miyazaki S (1997) Spatiotemporal analysis of intracellular calcium increases in hamster sperm induced by solubilized zona pellucida. Jpn. J. Physiol. 47, Suppl.2: S62

2. Sato Y, Shirakawa H & Miyazaki S (1997) The use of an agonist of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, adenophostin, for activation of mouse eggs injected with round spermatids. Jpn. J. Physiol. 47, Suppl. 2: S61

3. Mohri T, Ikegami S & Miyazaki S (1997) Anaysis of sperm-induced Ca^{2+} response and membrane current in sea urchin eggs in the presence of jaspisin. Cell Struct. Func. 22: 782

4. Kyozuka K, Degichi R, Mohri, T & Miyazaki S (1997) Intracellular calcium oscillations and meiosis resumption from metaphase I induced by injection of the sperm extract in the acidian *Ciona savignyi*. Zool. Sci. 14, Suppl.: 65.

5. Miyazaki S & Shirakawa H (1997) Spatiotemporal analysis of calcium dynamics in hamster spermatozoa during acrosome reaction observed with confocal microscopy. 33rd Internl. Congr. of Physiol. Sci. (St. Petersburg, Russia)

6. Yada T, Sakurada M, Ishihara H, Nakata M, Shioda S, Yaekura K, Hamakawa N, Oka Y & Kikuchi M (1997) PACAP is an islet hormone serving as an autocrine/paracrine potentiator of glucose-induced insulin secretion. 3rd Internl. Symp. on VIP, PACAP, and Related Peptides. Regulatory Peptides 71(2): 143P

7. Yanagida K, Yaekura K, Arima T & Yada T (1997) Glucose toxicity produced in isolated pancreatic B-cells is counteracted by PACAP. 3rd Internl. Symp. on VIP, PACAP, and Related Peptides. Regulatory Peptides 71(2): 144P

8. Shioda S, Yada T, Nakajo S, Nakai Y & Arimura A (1997) PACAP increases cytosolic calcium in vasopressin neurons: synergism with noradrenaline. 3rd Internl. Symp. on VIP, PACAP, and Related Peptides. Regulatory Peptides 71(2): 134P

9. Shioda S, Muroi M, Yada T, Zhou CJ, Kikuyama S, Nakajo S, Nakai Y & Arimura A (1997) Distribution and ultrastructural localization of PACAP receptors in the rat pancreatic islets. 3rd Internl. Symp. on VIP, PACAP, and Related Peptides. Regulatory Peptides 71(2): 134P

10. Yada T, Nakata M & Yaekura K (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) stimulates insulin secretion in islets and potentiates glucose-transport in adipocytes. Jpn. J. Physiol. 47, Suppl. 1: S27

11. Yada T, Sakurada M, Ishihara H, Nakata M, Yaekura K, Kikuchi M & Oka Y (1997) PACAP as an intra-islet amplifier of glucose-induced insulin secretion. 16th Internl. Diabetes Fed. Cong. Abs.: A112

12. Nakata M, Maruyama I & Yada T (1997) Citrulline-argininosuccinate-arginine cycle in B-cells coupled to Ca^{2+} signaling and insulin release via nitric oxide. 16th Internl. Diabetes Fed. Cong. Abs.: A111

13. Yanagida K, Arima T & Yada T (1997) Glucose toxicity on pancreatic β-cells is not due to insulin action or hyperosmolarity and is counteracted by PACAP. 16th Internl. Diabetes Fed. Cong. Abs.: A116

14. Shioda S, Yada T, Matsukawa H, Nakajo S, Kiuchi Y, Nakai Y & Arimura A (1997) PACAP increases cytosolic calcium in vasopressin neurons: synergism with noradrenaline. 27th Ann. Meet. Soc. Neurosci.

《生体膜研究部門》

1．久木田文夫 (1997.3) イオンチャネルは柔らかい分子モーターである　第74回日本生理学会大会（浜松）

2．中野春男，古家喜四夫，山岸俊一 (1997.3) 乳腺筋上皮細胞のカルシウムシグナリング　第74回日本生理学会大会（浜松）

3．中西圭子，久木田文夫 (1997.7) 培養大脳皮質ニューロン間の同期した burst の解析　第20回日本神経科学大会（仙台）

4．久木田文夫 (1997.10) 麻酔状態で観察される Na チャネルのゲート電流　日本生物物理学会第35回年会（京都）

5．中西圭子，久木田文夫 (1997.10) 培養大脳皮質ニューロン間の同期した burst の解析　第44回中部日本生理学会（岡崎）

6．筒井泉雄，井上　勲 (1997.10) イカ Schwann 細胞のシングルチャネルの解析　第44回中部日本生理学会（岡崎）

7．中野春男，古家喜四夫，古家園子，山岸俊一 (1997.10) 乳腺筋上皮細胞の単離培養とカルシウムシグナリング　第44回中部日本生理学会（岡崎）

《機能協関研究部門》

1．Hazama A, Miyoshi T, Hayashi S, Miwa A, Yamamoto T & Okada Y (1997) CFTR Cl^- channel and ATP secretion. Jpn J Physiol 47 (Suppl) S24

2．Wang HC, Morishima S & Okada Y (1997) Blocking effects of phenothiazine, a neuroleptic, on the rapidly activating delayed rectifier potassium channel in the guinea-pig ventricular myocytes and its mechanism. Jpn J Physiol 47 (Suppl) S81

3．Zhou S-S, Takai A & Okada Y (1997) Deactivation of the cardiac CFTR Cl^- channel involves a novel type of phosphatase sensitive to anthracene-9-carboxylate. Jpn J Physiol 47 (Suppl) S83

4．Miyoshi T, Hazama A & Okada Y (1997) A role of isoprenylated proteins in the expression mechanism of epithelial CFTR protein on the plasma membrane. Jpn J Physiol 47 (Suppl) S123

5．Liu Y, Tsumura T, Oiki S & Okada Y (1997) Glibenclamide inhibits the volume-sensitive Cl^- conductance in human epithelial cells. Jpn J Physiol 47 (Suppl) S123

6．Sabirov RZ, Morishima S & Okada Y (1997) Water permeability through ion channels on oocyte plasma membrane. Jpn J Physiol 47 (Suppl) S123

7．Tsumura T, Hazama A, Oiki S, Ueda S & Okada Y (1997) CFTR-type Cl^- currents in guinea pig Paneth cells. Jpn J Physiol 47 (Suppl) S123

8．Oiki S (1997) Single-channel recordings of translocon channels from rough endoplasmic reticulum of *Xenopus* oocytes. Jpn J Physiol 47 (Suppl 2) S6

9．周　軍，岡田泰伸，老木成稔 (1997) 内向き整流性 K チャネルの細胞外 Mg^{2+} ブロック機構 生物物理 37: S47

10. 岡田泰伸 (1997) チャネル・トランスポータ・受容体の構造・機能協関　生化学 69: 498

11. 津村剛彦，挾間章博，上田俊二，岡田泰伸 (1997) モルモット小腸パネート細胞における

CFTR 型 Cl 電流　日本消化器病学会雑誌 94: 394

12. 老木成稔，村松郁延，松永茂樹，伏谷伸宏 (1997) イオンチャネル形成毒：海綿由来ペプチド Polytheonamide B.　日本薬理学雑誌 110: 195P-198P

《神経情報研究部門》

1. Wakazono, Y., Kurahashi, T., Nakahira, K. Nagata, I., Takayama, C., Inoue, Y., Kaneko, A. and Ikenaka, K. (1997.7) Morphologial and electrophysiological analysis of the maturation of cerebellar granule cells in the microexplant culture., Sixteenth Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry and Twenty-Eighth Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry (Boston)

2. Fujimoto, I., Tanaka, F., Natsuka, S., Hase S. and Ikenaka, K. (1997.7) Automated analysis of sugar chains of glycoproeins in mouse brains., Sixteenth Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry and Twenty-Eighth Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry (Boston)

3. Baba, H., Nanmoku, K., Akita, H. and Ikenaka, K. (1997.7) Mouse and human GFAP promoter activity in astrocyte., Sixteenth Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry and Twenty-Eighth Annual Meeting of the American Society for Neurochemistry (Boston)

4. Yamada, M., Ivanova, A., Yamaguchi, Y. and Ikenaka, K. (1997.7) PLP C-terminal fragment promotes the differentiation of oligodendrocytes in vitro., ISN Satellite and UConn-Kroc Symposium (Connecticut)

5. Yonemasu, T., Nakahira, K., Kagawa, T., Ohba, A., A. Espinosa de le los Monteros, J. de Vellis and Ikenaka, K. (1997.7) CGT gene regulation during oligodendrocyte development., ISN Satellite and UConn-Kroc Symposium (Connecticut)

6. Baba, H., Nakahira, K., Kagawa, T., Inoue, Y. and Ikenaka, K. (1997.7) Localization of K^+ channel complexes on myelinated axons., ISN Satellite and UConn-Kroc Symposium (Connecticut)

7．柴田理一，中平健祐，若園佳彦，池中一裕 (1997.7) 小脳顆粒細胞の発生過程における電位依存性 K^+ チャネルの発現変化，第20回日本神経科学大会（仙台）

8．後藤隆洋，柴田理一，池中一裕，内山安男 (1997.7) ジンピーマウス中枢神経の軸索ニューロフィラメントH蛋白の非リン酸化，第20回日本神経科学大会（仙台）

9．池中一裕，小泉克久 (1997.7) レトロウィルスベクターを用いたマウス脳初代培養細胞への遺伝子導入，第20回日本神経科学大会（仙台）

10. 大庭明生，鹿川哲史，IVANOVA ANNA，池中一裕 (1997.7) PLP および PDGF-α-受容体遺伝子のマウス胎仔脳における経時的発現，第20回日本神経科学大会（仙台）

11. 池中一裕，鹿川哲史，山田真久，山口宣秀，馬場広子，Anna Ivanova (1997.7) オリゴデンドロサイトの発生・分化と病態，第20回日本神経科学大会（仙台）

12. 池中一裕 (1997.8) 神経発達過程における糖蛋白質糖鎖の発現制御，平成9年度重点領域研究「神経回路の機能発達」班会議・夏期ワークショップ（千葉）

13. 岡本佳久，大道薫，山中正二，池中一裕，長谷純宏 (1997.9) マウス脳特異的糖鎖の生成に関与する酵素の検索，第70回日本生化学会大会（金沢）

14. 中北慎一，長束俊治，池中一裕，長谷純宏 (1997.9) ミュータントマウス脳の糖鎖パターン解析，第70回日本生化学会大会（金沢）

15. 竹下智子，福　真一，久田明子，清水範夫，池中一裕，御小柴克彦 (1997.9) COS-1 細胞で発現させた PLP および DM20 とイノシトール6リン酸との結合，第70回日本生化学会大会（金沢）

16. 若園佳彦，中平健祐，柴田理一，倉橋隆，金子章道，池中一裕 (1997.9) 小脳 microexplant culture における顆粒細胞の形態と電位依存性　K^+ チャネル遺伝子の変化，第70回日本生化学会大会（金沢）

17. 中川秀光，山田正信，都築貴，清水恵司，池中一裕 (1997.9) 悪性脳腫瘍の髄腔内播種に対する 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FdUrd) の髄腔内化学療法に関する基礎と臨床，第56回日本癌学会総会（京都）

18. 増井一弘，栗山茂樹，中谷敏也，富永謙太郎，池中一裕，福井博 (1997.9) シトシンデアミナーゼ遺伝子を用いた癌に対する遺伝子治療の検討，第56回日本癌学会総会（京都）

19. 菊川政次，栗山茂樹，吉川正英，長尾慎太郎，浅田　潔，池中一裕，福井　博 (1997.9) チミジンキナーゼ遺伝子とガンシクロビルを用いた癌に対する in vivo 遺伝子治療の検討，第56回日本癌学会総会（京都）

20. 宮尾泰慶，清水恵司，馬淵英一郎，金田安史，貴島晴彦，田村雅一，佐々木学，池中一裕，早川　徹 (1997.9) マウス悪性脳腫瘍モデルに対する遺伝子治療法の検討 -HVJ-リポソーム法とその改良，第56回日本癌学会総会（京都）

21. 田中文啓，和田洋巳，人見滋樹，池中一裕 (1997.9) 癌における糖蛋白糖鎖構造解析自動化の試み，第56回日本癌学会総会（京都）

22. 山田　斉，福島正和，上山泰男，池中一裕 (1997.9) マウス再生肝における Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) 遺伝子発現制御に関する検討，第56回日本癌学会総会（京都）

23. 田村雅一，清水恵司，吉松忠憲，宮尾泰慶，山田正信，田村和義，馬淵英一郎，貴島晴彦，早川　徹，池中一裕 (1997.9) 高力価レトロウィルスベクターを用いたマウスグリオーマ細胞の腫瘍内移動の可視化，第56回日本癌学会総会（京都）

24. 池中一裕 (1997.9) グリア細胞の発生・分化機構解明へのアプローチ，岩手細胞生物学懇話会第 6 回例会（岩手）

25. Nakahira, K. Wakazono, Y.,Shibata, R., Kurahashi, T., Kaneko, A. and Ikenaka, K. (1997.10) Developmental expression of voltage-gated potassium channels in mouse cerebellar granule cells in vivo and in the microexplant culture., Society for Neuroscience 27th Annual Meeting (New Orleans)

26. Mori, Y., Takada, N., Okada, T., Wakamori M., Imoto, K., Wanifuchi, H., Oka, H., Oba, A., Ikenaka, K. and Kurosaki, T. (1997.10) Subtypes of capacitative calcium entry channel are differentially expressed in mouse brain., Society for Neuroscience 27th Annual Meeting (New Orleans)

27. Gotow, T., Ttokuno, O., Koumura, M., Ohsawa, Y., Watanabe, T., Shibata, R., Ikenaka, K. and

Uchiyama, Y. (1997.10) Neurofilaments are influenced in organization and phosphorylation in dysmyelinated axons in jumpy mutant mouse., Society for Neuroscience 27th Annual Meeting (New Orleans)

28. 南木浩二，馬場広子，池中一裕 (1997.10) マウス脳の発達段階におけるグリコーゲン合成酵素の発現，第40回日本神経化学会（松山）

29. 藤本一朗，M. Krishna，田中文啓，長束俊治，長谷純宏，池中一裕 (1997.10) 糖蛋白糖鎖の化学的糖鎖スクリーニング法の自動化と応用，第40回日本神経化学会（松山）

30. 米増知子，中平健祐，奥村俊一郎，池中一裕 (1997.10) オリゴデンドロサイトの分化における CGT 遺伝子の転写調節機構，第40回日本神経化学会（松山）

31. 馬場広子，池中一裕 (1997.10) グリア細胞の発生・分化機構，第40回日本神経化学会（松山）

32. 山田真久，Anna Ivanova，池中一裕 (1997.11) PLP gene product can be secreted and promotes the differentiation of oligodendrocytes during embriogenesis., 第 2 回グリア研究会（東京）

33. 中平健祐，和田圭樹，池中一裕 (1997.11) 小脳顆粒細胞の分化と電位依存性 K^+ チャネルの発現，国立遺伝学研究会（三島）

34. 馬場広子，中平健祐，鹿川哲史，井上芳郎，池中一裕 (1997.11) 脱髄に伴う電位依存性チャンネルの局在変化，第 2 回グリア研究会（東京）

35. Ooba, A., Ivanova, A. and Ikenaka, K. (1997.12) Cells, containing PDGF-ALPHA receptor message are dstinct from the PLP/DM-20 mRNA-containing cells in the embryonic CNS of mouse., Keio University International Symposia for Life Sciences and Medicine Neuroscience: Frontiers of Neural Development (Tokyo)

36. Nakahira, K., Wakazono, Y., Shibata, R., Kurahashi, T., Kaneko, A. and Ikenaka, K. (1997.12) Developmental expression of voltage-gated potassium channels in mouse cerebellar granule cells in vivo and in the microexplant culture., Keio University Inernational Symposia for Life Sciences and Medicine Neuroscience: Frontiers of Neural Development (Tokyo)

37. Iwasaki, Y., Otake, Y., Watanabe, M., Tanaka, K. and Ikenaka, K. (1997.12) Glutamate trans-

poter (GLAST) as a radial glial marker in primary culture., Keio University Inernational Symposia for Life Sciences and Medicine Neuroscience: Frontiers of Neural Development (Tokyo)

38. Ikenaka, K., Ivanova, A., Yamada, M, Yamaguchi, Y. and Kagawa, T. (1997.12) Function of myelin proteolipid protein gene products during oligodendrocyte development., Keio University Inernational Symposia for Life Sciences and Medicine Neuroscience: Frontiers of Neural Development (Tokyo)

39. 岩崎靖乃，馬場広子，池中一裕 (1997.12) マウスグリア細胞系譜の解析，第20回日本分子生物学会年会（京都）

《液性情報研究部門》

1．Nakai J, Ogura T, Protasi F, Franzini-Armstrong C, Allen PD & Beam KG (1997.3) Functional non-equality of the cardiac and skeletal ryanodine receptors. Biophysical society 41st annual meeting (New Orleans, USA)

2．若森　実，新留徹広，井本敬二，森泰生 (1997.3) Distinct sets of G-proteins are responsible for inhibition of Ca^{2+} channel types 日本生理学会（浜松）

3．中井淳一，小倉達也，Protasi F, Franzini-Armstrong C, Allen PD & Beam KG (1997.9) 骨格筋型と心筋型リアノジン受容体の機能的不等性　第70回日本生化学会大会（金沢）

4．中井淳一 (1997.10) L型カルシウムチャネルミュータントを用いた興奮収縮連関の分子機構の解析　第44回中部日本生理学会（岡崎市）

5．松野平宏史，若森　実，森　泰生，井本敬二 (1997.10) Cd^{2+}による$_{\alpha 1A}$ (P/Q型) Ca^{2+}チャネルの抑制及びその回復過程の解析　第44回中部日本生理学会（岡崎）

6．Mori Y, Takada N, Okada T, Wakamori M, Imoto K, Wanifuchi H, Oka H, Oba A, Ikenaka H, Kurosaki T (1997.10) Subtypes of capacitative calcium entry channel are differentially expressed in mouse brain Society for Neuroscience the 27th Annual Meeting (New Orleans, LA, USA)

7．森　泰生，高田尚幸，岡田峯陽，若森　実，井本敬二，鰐淵　博，岡　弘章，大庭明生，池中一裕，黒崎知博 (1997.12) 容量性カルシウム流入を担うイオンチャネルの分子解析　第20会日本分子生物学会年会（京都）

《高次神経機構研究部門》

1．光村直洋，安田利栄，三品昌美，八木　健 (1997) マウス脳神経系で発現する新たなカドヘリンファミリーの解析，第30回日本発生生物学会，38

2．谷口雅彦，湯浅茂樹，成瀬一郎，佐賀信介，三品昌美，八木　健 (1997) マウス神経回路形成における collapsin-1 の分子機能解析，第30回日本発生生物学会，38

3．木津川尚史，八木　健，三宝　誠，藤澤　肇 (1997) ニューロピリン欠損マウスにおけるニューロピリンの機能解析，第30回日本発生生物学会，44

4．三宝　誠，谷口雅彦，三品昌美，八木　健 (1997) 一過的遺伝子導入 ES 細胞を用いた遺伝子変換マウスの作製，第30回日本発生生物学，90

5．八木　健，甲斐信行，安田昌弘，三品昌美，光村直洋 (1997) 哺乳動物行動制御を司る分子メカニズムの解析，第30回日本発生生物学，115

6．谷口雅彦，湯浅茂樹，成瀬一郎，佐賀信介，三品昌美，八木　健 (1997) 神経回路形成における collapsin-1 の機能解析，第20回日本神経科学大会，74

7．八木　健，光村直洋，甲斐信幸，三品昌美，渡辺雅彦 (1997) 哺乳類脳神経系で発現する新規カドヘリンファミリー，第20回日本神経科学大会，96

8．安田昌弘，光村直洋，八木　健 (1997) PSD に存在する Fyn 結合タンパク質 p130 の同定，第20回日本神経科学大会，198

9．湯浅茂樹，服部功太郎，八木　健 (1997) Fyn 欠損マウス中枢神経系におけるカルシウム結合蛋白陽性ニューロンの構築異常，第20回日本神経科学大会，210

10．中本百合江，宮川　剛，八木　健，二木宏明，吉井光信 (1997) オートラジオグラフィ法に

よるFyn欠失マウス脳内ベンゾジアゼピン受容体分布，第20回日本神経科学大会，229

11. 浅田英穂，川村勇樹，丸山　敬，久米秀明，神原叙子，葛目博子，八木　健，小幡邦彦 (1997) 67kDa グルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD67) 欠損マウスの作製と解析　第20回日本神経科学大会，288

12. 木津川尚史，八木　健，三宝　誠，藤澤　肇 (1997) ニューロピリンは軸索ガイダンスに必須であるーニューロピリン欠損マウスによる解析，第20回日本神経科学大会，294

13. 安田利栄，光村直洋，八木　健 (1977) マウス脳神経系で発現する新たなカドヘリンファミリーの解析，第20回日本分子生物学会年会，9

14. 森　　寿，中村和裕，真鍋俊也，鈴木紀光，渡辺雅彦，和田志麻，八木　健，崎村建司，井上芳郎，高橋智幸，三品昌美 (1997) NMDA 受容体チャンネル ε2 サブユニット細胞内ドメインの生理機能，第20回日本分子生物学会年会，23

15. 村田俊浩，西田昌弘，川辺玉恵，安田昌弘，八木　健，川勝一左哲，大和田幸嗣 (1997) Src ファミリー，Fyn の防錘体との結合部位と結合蛋白質の検討，第20回日本分子生物学会年会，84

16. 山崎由起子，尾崎　毅，井本敬二，八木　健 (1997) マウス精子形成細胞への遺伝子導入法の検討，第20回日本分子生物学会年会，126

17. 三宝　誠，神原叙子，三宝千秋，八木　健 (1997) ピューロマイシン耐性遺伝子を用いた部分的な loxP 組換え細胞単離法，第20回日本分子生物学会年会，126

18. 先崎浩次，八木　健 (1997) マウス脳において多様化して存在する新規カドヘリン (CNR) 分子群の発現様式，第20回日本分子生物学会年会，127

19. 安田利栄，光村直洋，八木　健 (1997) マウス脳神経系で発現する新たなカドヘリンファミリーの解析，第20回日本分子生物学会年会，131

20. 谷口雅彦，藤澤　肇，湯浅茂樹，三品昌美，八木　健 (1997) 神経回路形成における collapsin-1 の役割，第20回日本分子生物学会年会，132

21. 湯浅茂樹，八木　健 (1997) Fyn 欠損マウス中枢神経系におけるニューロン鉱の形成異常，第20回日本分子生物学会年会，134

22. 宮川　剛，八木　健，北沢宏理，安田昌弘，川合述文，二木宏明 (1997) Fyn 欠失マウスのエタノール感受性の異常－ NMDA 受容体の機能との関連，第20回日本分子生物学会年会，134

23. 三宝千秋，三品昌美，八木　健 (1997) 哺乳・哺育行動に関わる遺伝子の解析，第20回日本分子生物学会年会，134

24. 安部　学，渡辺雅彦，橋本浩一，狩野方伸，八木　健，節谷悦子，三品昌美，崎村建司 (1997) NMDA 受容体チャンネル ε3 サブユニット欠損マウスの作製と生理機能解析，第20回日本分子生物学会年会，134

《情報記憶研究部門》

1. Kaneko, A., Kawai, F. and Kurahashi, T, "Contribution of Ca^{2+} and Na^{+} currents in spike generation in the newt olfactory receptor cels", IUPS, 1997, Russia

2. Kawai, F., Kurahashi, T. and Kaneko, A., "Nonselectve suppression of voltage-gated currents by odrants in the olfactory receptor cells", Japanese Journal of Physiology, Supplement (1997)（日本生理学会、浜松医科大学）

3. Kurahashi T (1997) Determination of the molocular site underlying odorant adaptation in the olfactory receptor cell. IUPS Russia

4. 倉橋　隆 (1997) 嗅細胞における匂い順応の分子機構の決定：ケージド化合物を用いた細胞内分子ネットワークシステムの定量化。日本生理学会、シンポジウム「視覚、嗅覚における順応のメカニズム」、浜松。

《高次神経性調節研究部門》

1.von der Heydt R, Friedman H S, Zhou H, Komatsu H, Hanazawa A & Murakami I (1997.5)

Neuronal responses in monkey V1 and V2 unaffected by metacontrast. 1997 ARVO (Fort Lauderdale)

2. Hanazawa A, Murakami I, Kondo H & Komatsu H (1997.6) Transformation of color information in V1 of the macaque monkey. XXXIII International Congress of Physiological Sciences (St. Petersburg, Russia)

3. Komatsu H & Kinoshita M (1997.10) The coding of figure size in the macaque striate cortex (V1). 27th Society for Neuroscience Meeting (New Orleans, U.S.A.)

4. Hanazawa A, Murakami I, Kondo H, & Komatsu H (1997.10) Hue/saturation color selectivity originates in V1, not in LGN, of the macaque monkey. 27th Society for Neuroscience Meeting (New Orleans, U.S.A.)

5. 小松英彦，花澤明俊，近藤秀樹 (1997.7) マカクザル外側膝状体における色表現の線形性。第20回日本神経科学学会（仙台）

6. 花澤明俊，近藤秀樹，小松英彦 (1997.8) 色相／彩度による色情報表現は第１次視覚野から始まる　第１回視覚科学フォーラム（岡崎）

《生体システム研究部門》

1）国際学会

1. Mori S, Nakajima K, Asanome M, & Matsuyama K (1997.3) Characteristics of bipedal locomotion in nonhuman primates (Japanese monkeys; Macaca fuscata) on the surface of a moving treadmill. COE International Symposium "Brainstem Control of Sensorimotor Systems: Behavioral Aspects" (Okazaki)

2. Matsuyama K, Nakajima K, Matui T, Kuze B & Mori S (1997.3) Axonal morphology of bulbospinal neurons and lumbar interneurons involved in fictive locomotion in cats. COE International Symposium "Brainstem Control of Sensorimotor Systems: Behavioral Aspects" (Okazaki)

3. Mori S, Nakajima K, Asanome M, & Matsuyama K (1997.6) Characteristics of bipedal locomotion in nonhuman primates (Japanese monkeys; Macaca fuscata) on a surface of a moving

treadmill. International Congress of Physiological Sciences Abstruct (St. Petersburg)

4. Matsuyama K, Nakajima K & Mori S (1997.6) Collateralization in the cat lumbar spinal cord of bulbospinal axons involved in fictive locomotion. International Congress of Physiological Sciences Abstruct (St. Petersburg)

5. Mori S, Matsuyama K, Asanome M, Nakajima K, Matsui T & Kuze B (1997.7) Cerebellar control of postural muscle tone and locomotion in acute decerebrate cats. International Symposium "Brain and Movement" (St. Petersburg & Moscow)

6. Matsuyama K, Nakajima K & Mori S (1997.7) Lumbar interneurons in the cat; Discharge pattern during fictive locomotion and axonal morphology. International Symposium "Brain and Movement" Abstract (St. Petersburg & Moscow)

7. Matsui T, Kuze B, Matsuyama K, & Mori S (1997.10) Response properties of pontomedullary reticulospinal cells to the stimulation of the locomotion inducing regions in the mesencephalon and the cerebellum in decerebrate cats. Society for Neuroscience (New Orleans)

8. Kuze B, Matsui T, Matsuyama K & Mori S (1997.10) Multi-segmental innervation of single vestibulospinal axons descending from the Deiters' nucleus. Society for Neuroscience (New Orleans)

2）国内学会

1. 中隣克己，松山清治，森　茂美 (1997.7) ニホンサルにおけるトレッドミル上の歩行運動：餌取り運動の発動にともなう歩容変化，第20回日本神経科学大会（仙台市）

2. 久世文也，松井利浩，松山清治，森　茂美 (1997.7) 単一前庭脊髄路軸索の頚・胸髄レベルにおける多髄節支配様式の解析，第20回日本神経科学大会（仙台市）

3. Kekesi A, Matsuyama K, Mori S, Dobolyi A, and Juhasz G (1997.7) 無拘束覚醒ネコの尾状核・視床核・橋網様体における細胞外モノアミン・アミノ酸レベル，第20回日本神経科学大会（仙台市）

4. 松山清治，中隣克己，久世文也，松井利浩，森　茂美 (1997.10) ネコ歩行運動のリズム形成と腰髄介在細胞，第44回中部日本生理学会（岡崎市）

5．中隣克己，高須千慈子，松山清治，森　茂美 (1997.10) トレッドミル上におけるサルの歩行運動：四足および 直立二足歩行運動の比較，第44回中部日本生理学会（岡崎市）

6．森　茂美 (1997.10) 運動の高次制御；シナジィー，ストラトジィーと運動プログラム　全国肢体不自由児療育研究大会（名古屋市）

7．森　茂美 (1997.10) 運動の高次制御；シナジィー，ストラトジィーと運動プログラム　平衡神経学会（松本市）

8．森　茂美 (1997.11) 歩行制御の神経機構，脳波筋電図学会，福岡。脳波筋電図学会（福岡市）

9．久世文也，松井利浩，松山清治，森　茂美，宮田英雄 (1997.12) 前庭脊髄路軸索の微小形態：頚・胸・腰髄レベルにおける比較，日本耳鼻咽喉科学会，第91回東海地方部会連合講演会（名古屋市）

10. 森　茂美，松井利浩，久世文也，松山清治，中隣克己 (1998.3) 除脳ネコ標本の小脳白質部に同定できた歩行誘発部，第74回日本生理学会大会（金沢市）

11. 奥村　哲，松山清治，森　茂美 (1998.3) 尾状核カルバコール微小化学刺激による脳内モノアミン・アミノ酸レベルの変動，第74回日本生理学会大会（金沢市）

12. 松井利浩，久世文也，松山清治，森　茂美 (1998.3) 小脳刺激により誘発される歩行運動と網様体脊髄路細胞，第74回日本生理学会大会（金沢市）

13. 中隣克己，森　大志，奥村　哲，松山清治，森　茂美 (1998.3) 傾斜トレッドミル上でのサルの歩行運動：運動力学的解析，第74回日本生理学会大会（金沢市）

《高次液性調節研究部門》

1．Sekihara K, Poeppel D, Marantz A, Phillips C, Koizumi H & Miyashita Y (1997.3) MEG covariance difference analysis: A method to extract target source activity by using task and control measurements. The International society for Brain Electro magnetic Topography （スイス，チューリッヒ）

2. Sekihara K, Poeppel D, Marantz A, Koizumi H & Miyashita Y (1997.3) Noise covariance incorporated MEG-MUSIC algorithm: multiple-dipole estimation tolerant of the influence of background brain activity. The International society for Brain Electro magnetic Topography (スイス，チューリッヒ)

3. Konishi S, Nakajima K, Uchida I, Sekihara K, & Miyashita Y (1997.5) Temporally resolved no-go dominant brain activity in the prefrontal cortex revealed by functional magnetic resonance imaging. Third International Conference on Functional Mapping of the Human Brain (デンマーク，コペンハーゲン)

4. Sekihara K, Poeppel D, Marantz A, Phillips C, Koizumi H & Miyashita Y (1997.5) MEG covariance difference analysis: extraction of target source activity by using task and control measurements. Third International Conference on Functional Mapping of the Human Brain (デンマーク，コペンハーゲン)

5. Sekihara K, Miyauchi S, Takino R, Fujimaki N & Miyashita Y (1997.5) Frequency-selective MEG MUSIC algorithm: a new method for analyzing rhythmic spontaneous brain activity. Third International Conference on Functional Mapping of the Human Brain (デンマーク，コペンハーゲン)

6. Konishi S, Nakajima K, Kameyama M, Sekihara K & Miyashita Y (1997.10) Direct analysis of brain activity in prefrontal cortex related to extradimensional shift. 1997 Annual Meeting of Society for Neuroscience (アメリカ，ニューオリンズ)

7. Okuno H., Tokuyama W, Li XY, Hashimoto T & Miyashita Y (1997.10) Differential transcriptional regulation of neurotrophic factors and TRK receptors in visual cortices of macaque monkeys. 1997 Annual Meeting of Society for Neuroscience (アメリカ，ニューオリンズ)

8. Okuno H., Tokuyama W, Hashimoto T, Li XY & Miyashita Y (1997.12) Gene activation in the monkey temporal lobe during visual paired associate learning. ULP/JAPAN Colloquium (フランス，ストラスブルグ)

9. Konishi S Nakajima K., Uchida I, Kikyo H, Kameyama M, Sekihara K & Miyashita Y (1997.7) Mapping of response inhibition function of the prefrontal cortex using functional magnetic resonance imaging. 第20回日本神経科学大会 (仙台)

10. 内田以大，中嶋京一，小西清貴，桔梗英幸，関原謙介，宮下保司 (1997.3) 文字刺激に対するヒト視覚野活動の機能的磁気共鳴画像法による計測　第74回日本生理学会大会（浜松）

11. 奥野浩行，徳山　宣，李　悦欣，大林真知子，宮下保司 (1997.3) サル大脳皮質各領域における BDNF mRNA および trkB の定量的発現解析　第74回日本生理学会大会（浜松）

12. 徳山　宣，奥野浩行，佐藤　隆，李　悦欣，宮下保司 (1997.3) 定量的 RT-PCR を用いたサル大脳皮質における NT3 及び trkC 遺伝子発現の定量的解析　第74回日本生理学会大会（浜松）

13. 河西春郎，二宮靖典，岸本拓哉，宮下保司 (1997.3) 分泌小胞の膜融合速度定数と Ca^{2+} 結合速度定数の測定　第74回日本生理学会大会（浜松）

14. 伊藤公一，宮下保司，河西春郎 (1997.3) 膵外分泌腺細胞の低親和性 Ca^{2+} 指示薬である BTC を用いた Ca^{2+} 画像解析　第74回日本生理学会大会（浜松）

15. 前田仁士，伊藤公一，宮下保司，河西春郎 (1997.3) 低親和性 Ca^{2+} 指示薬 BTC を用いた培養小脳プルキンエ細胞の Ca^{2+} 画像解析　第74回日本生理学会大会（浜松）

16. 高橋倫子，門脇　孝，矢崎義雄，宮下保司，河西春郎 (1997.3) 膵 β 細胞に存在する 3 つの開口放出路　第74回日本生理学会大会（浜松）

17. 徳山　宣，奥野浩行，李　悦欣，橋本隆紀，宮下保司 (1997.7) 霊長類大脳視覚領野における神経栄養因子群及び受容体群の mRNA 発現量の定量的解析　第20回日本神経科学大会（仙台）

18. 佐藤　隆，徳山　宣，奥野浩行，宮下保司 (1997.7) 前庭片側破壊後のオリーブにおける転写制御因子 Zif268 と c-Fos の発現誘導の違い　第20回日本神経科学大会（仙台）

《感覚・運動機能研究プロジェクト》

1. Kaneoke Y, Vitek JL (1997.3) What is missing in the current concept of basal ganglia functional model? COE International Symposium: "Brainstem control of sensorymotor systems: Behavioral aspects" (Okazaki)

2. Watanabe S, Kakigi R, Koyama S, Hoshiyama M, Suzuki H, Xiang J, Naka D & Kaneoke Y (1997.4) Pain processing traced by magnetoencephalography in the human brain. III Pan-Pacific Conference on Brain Topography (Tokyo, Japan)

3. Xiang J, Hoshiyama M, Koyama S, Kaneoke Y, Suzuki H, Watanabe S, Naka D and Kakigi R (1997.4) Somatosensory evoked magnetic fields following passive finger movement. III Pan-Pacific Conference on Brain Topography (Tokyo, Japan)

4. Koyama S, Kakigi R, Hoshiyama M, Naka D, Watanabe S & Kaneoke Y (1997. 4) The cortices involved in Japanese character (Kanji and Kana) recognition: A magnetoencephalographic study. Symposium "Neural Generators ERPS: Invasive vs. Noninvasive methods" III Pan-Pacific Conference on Brain Topography (Tokyo, Japan)

5. Kakigi R & Hoshiyama M (1997.4) Identification of motor and sensory brain activities during unilateral finger movement: Spatio-temporal source analysis of movement associated magnetic fields. Symposium "Source Localization and Functional Imaging", In III Pan-Pacific Conference on Brain Topography (Tokyo,Japan)

6. Kakigi R (1997.7) Somatosensory evoked magnetic fields. Symposium "Somatosensory System", In XXXIII International Congress of Physiological Sciences (St. Petersburg, Russia)

7. Kakigi R (1997.8) Pain-realted brain activities: magnetoencephalograhic studies. Plenary session on "Neurophysiological assesment and management of pain". In 14th International Congress of EEG and Clinical Neurophysiology (Florence, Italy)

8. Hoshiyama M, Kakigi R, Koyama S, Takeshima Y, Watanabe S & Shimojo M (1997.8) Temporal changes of pyramidal tract activities after decision of movement: a study using transcranial magnetic stimulation of the motor cortex in humans. In 14th International Congress of EEG and Clinical Neurophysiology (Florence, Italy)

9. Naka D, Koyama S, Kaneoke Y & Kakigi R (1997.11) Effect of tactile interference stimulation on somatosensory evoked magnetic field (SEF) following posterior tibial nerve stimulation. 27th Annual Meeting Society for Neuroscience (New Orleans, USA)

10. Koyama S, Watanabe S, Naka D & Kakigi R (1997.11) Evoked magnetic responses during a

word recognition task 27th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (New Orleans, USA)

11. Kaneoke Y, Bundou M & Kakigi R (1997.11) Speed of response to visual stimuli in apparent motion in human visual motion area 27th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (New Orleans, USA)

12. 小山紗智子，柿木隆介 (1997.2) 脳磁場からみた文字・単語認知　基礎心理学フォーラム（京都）

13. 金桶吉起，柿木隆介 (1997.3) 仮現運動刺激に反応するヒト大脳皮質領域　第74回日本生理学会（浜松）

14. 金桶吉起，柿木隆介 (1997.5) 脳磁図と脳波によるヒト運動視中枢の同定とその臨床応用の可能性の検討　第38回日本神経学会（横浜）

15. 金桶吉起，文堂昌彦，鈴木啓之，小山紗智子，柿木隆介，中　大輔，渡辺昌子，向　　敬，Lam Kharnh，稲尾意秀，根来　真，吉田　純 (1997.5) 仮現運動刺激に反応する大脳皮質領域の検討　第12回日本生体磁気学会大会（大阪）

16. 中　大輔，柿木隆介，小山紗智子，渡辺昌子，金桶吉起 (1997.5) 後脛骨神経刺激による体性感覚誘発脳磁界に対する触覚干渉刺激の影響　第12回日本生体磁気学会（大阪）

17. 文堂昌彦，金桶吉起，鈴木啓之，小山幸子，吉田　純，柿木隆介 (1997.7) 仮現運動視覚刺激の空間的要因に対する脳磁場反応潜時特性　第20回日本神経科学大会（仙台）

18. 小山紗智子，渡辺昌子，柿木隆介，中　大輔，金桶吉起 (1997.7) 脳磁場を指標とした単語認知に関与する脳部位の検索　第20回日本神経科学大会（仙台）

19. 苧阪直行，苧阪満里子，小山紗智子，柿木隆介 (1997.9) 脳磁場 (MEG) 計測による運動視および運動残効 (MAE) に関与する脳内部位の推定（2）日本心理学会第61回大会（西宮）

20. 小山紗智子 (1997.9) 単語認知に伴う脳磁場 (MEG): プライミング効果は脳のどこで生じているのか？日本心理学会第61回大会（西宮）

21. 金桶吉起，文堂昌彦，柿木隆介 (1997.10) 仮現運動刺激に対するヒト運動視中枢 (MT/V5) の反応特性　第44回中部日本生理学会大会（岡崎）

22. 中　大輔 (1997.10.23) 体性感覚誘発脳磁界 (SEF) に対する触覚干渉刺激の影響　第56回日本脳神経外科学会総会（大阪）

23. 金桶吉起，柿木隆介 (1997.11) 仮現運動の MEG　第12回臨床神経生理学東京談話会（東京）

24. 柿木隆介 (1997.11) ヒト体性感覚の皮質受容機構，シンポジウム「感覚情報処理の非侵襲的解析」，日本脳波・筋電図学会（福岡）

25. 小山紗智子，柿木隆介，中　大輔，大草知裕，渡辺昌子，関口貴裕 (1997.11) 脳磁場 (MEG) を指標とした認知機能の研究：現状と問題点，シンポジウム「事象関連電位内因成分：その誘発パラダイムと問題点」第27回日本脳波・筋電図学会学術大会（福岡）

26. 小山紗智子，中　大輔，柿木隆介，中川和美，渡辺昌子，前田多章 (1997.11) 視覚 oddball 課題時の誘発脳磁場　第27回日本脳波・筋電図学会学術大会（福岡）

27. 中川和美，小山紗智子，柿木隆介，中　大輔，古賀良彦，武正建一 (1997.11) 両耳分離聴課題に伴う脳磁場の検討　第27回日本脳波・筋電図学会学術大会（福岡）

28. 伊藤順子，小山紗智子，投石保広 (1997.11) Parkinson 病と Alzheimer 型痴呆患者の事象関連電位 N400　第27回日本脳波・筋電図学会学術大会（福岡）

29. 中　大輔，柿木隆介 (1997.11) 電気刺激を用いた末梢神経（Aδ 線維）伝導速度の計測　第27回日本脳波・筋電図学会学術大会（福岡）

30. 中　大輔，柿木隆介，小山紗智子，渡辺昌子，向　　敬，Lam Khanh，金桶吉起 (1997.11) 後脛骨神経刺激体性感覚誘発脳磁界に与える触覚刺激の影響　第27回日本脳波・筋電図学会学術大会（福岡）

《高次脳機能研究プロジェクト》

3．Yasuhiko Saito & Tadashi Isa (1997) Local circuit of the superior colliculus : intrinsic firing

properties and functional role of acetylcholinergic innervation. Abstracts for COE Symposium, National Institute for Physiological Sciences, Okazaki, Japan

4. Tadashi Isa (1997) Directional control of orienting eye and head movements by different subpopulations of reticular neurones. Abstracts for 13th International Symposium of International Society for Postural and Gait Research, Paris, France

5. Y. Saito & T. Isa (1997) Intrinsic firing and morphological properties ofneurons in the optic and intermediate layers of the superior colliculus of rats. Abstracts for XXXIII International Congress of Physiological Sciences, St. Petersburg, Russia, P077.04

6. Saito, Y. & Isa, T. (1997) Local circuit of the superior colliculus in rats. I: Intrinsic firing and morphological properties of neurons in the inter mediate layer. Jpn. J. Physiol. Vol. 47, Suppl., S142

7. Isa, T. & Saito, Y. (1997) Local circuit of the superior colliculus in rats.II. Specific ionic conductances which characterize the firing properties of neurons in the intermediate layer. Jpn. J. Physiol. Vol. 47, Suppl., S142

8. Yasuhiko Saito & Tadashi Isa (1997) Local circuit of the superior collicul us in rats. I. Intrinsic firing and morphological properties of neurons in the optic and intermediate layers. Abstr. Soc. Neurosci. 510.14

9. Tadashi Isa & Yasuhiko Saito (1997) Local circuit of the superior colliculus in rats. II. Local connections and effect of acetylcholinergic input. Abstr. Soc. Neurosci. 510.15

10. Aizawa H, Kobayashi Y, Yamamoto M & Isa T (1997) Modification of saccadiceye movements by acetylcholine-related substances injected into monkey superior colliculus. Abstr. Soc. Neurosci. 510.16

11. Saito, T. & Isa, T. (1997) Contribution of 4aminopyridine-sensitive transient outward current to firing properties of neurons in the intermediate layer of the superior colliculus. Neurosci.Res. Suppl., 21, S22

12. Isa, T. & Saito, Y. (1997) Signal transmission in the local circuit of the superior colliculus

and its modulation by acetylcholinergic input. Neurosci. Res., Suppl., 21, S188

13. Kawato M, Kobayashi Y, Kawano K, Takemura A, Inoue Y, T Kitama, H Gomi (1997) Cell-to-cell negative correlations between the simple spike and the complex spike firing Characteristics of Individual Purkinje Cells. Soc. Neurosci. Abstr. 511.9,

14. Kobayashi Y, Kawano K, Takemura A, Inoue Y, T Kitama, H Gomi, Kawato M (1997) Temporal firing patterns of PurkinjeCells Cerebellar Ventral Paraflocculus during ocular following Responses in monkeys. Soc. Neurosci. Abstr. 511.10,

15. Yamamoto K, Kobayashi Y, Kawano K, Takemura A, Kawato M (1997) A simulation system for vertical ocular following responses with simple spike firing rate of Purkinje cells in the cerebellum. Soc. Neurosci. Abstr. 609.6,

《自律機能研究プロジェクト》

1．橋本　勲 (1997.1) 体性感覚の MEG　日本学術振興会超伝導エレクトロニクス第146委員会公開講演会「脳活動の無侵襲観察－脳からの磁場を見る」（東京）

2．岩瀬嘉志，落合直之，益子拓徳，今田俊明，橋本　勲 (1997.6) 末梢神経障害における誘発電位の電算機シミュレーションと計測された磁場信号との比較：振動現象の解釈　第10回ニューログラム研究会（東京）

3．小尾聡美，川名ふさ江，石山陽事，中西成元，橋本　勲 (1997.11) ABR と中潜時反応 (MLR) の同時記録の有用性について　臨床病理学会（神戸）

4．井口義信，橋本　勲 (1997.11) 視覚誘発 ERP による単語熟読中の情報処理課程の検討　日本脳波・筋電図学会学術大会（福岡）

5．中野修治，橋本　勲 (1997.11) Visual Display Terminal (VDT) データ入力作業が事象関連電位に与える影響　日本脳波・筋電図学会学術大会（福岡）

6．岩瀬嘉志，落合直之，益子拓徳，今田俊明，橋本　勲 (1997.11) 末梢神経障害における活動磁界のコンピュータ・シミュレーション，振動現象の発生メカニズム日本脳波・筋電図学会

学術大会（福岡）

7．木村友昭，西条一止，橋本　勲(1997.11)絶縁鍼電極による motor point 刺激 SEPs　日本脳波・筋電図学会学術大会（福岡）

8．尾崎　勇，鈴木千恵子，馬場正之，八重樫裕幸，橋本　勲(1997.11)正中神経 SEP 早期皮質反応の高周波成分について　日本脳波・筋電図学会学術大会（福岡）

9．斉藤泰彦，井口義信，中野修治，橋本　勲(1997.11) air-puff 皮膚刺激による事象関連電位(ERPs)の要素波抽出　日本脳波・筋電図学会学術大会（福岡）

10．福島達臣，勇内郁子，橋本　勲(1997.11)アルツハイマー病における事象関連電位の左右差の検討　日本脳波・筋電図学会学術大会（福岡）

11．橋本　勲，益子拓徳，今田俊明(1997.11)ヒト1次体性感覚野に周波数再現はあるか：脳磁図による検討　日本脳波・筋電図学会学術大会（福岡）

12．福島達臣，橋本　勲(1997.11)体性感覚情報処理過程における聴覚刺激の先行効果：脳磁図を用いた研究　日本脳波・筋電図学会学術大会（福岡）

13．橋本　勲(1997.11)脳磁図(MEG)へのアプローチ　第12回臨床神経生理学東京談話会「脳磁図(MEG)による脳機能・脳病態へのアプローチ」（東京）

14．福島達臣，橋本　勲(1997.12)脳磁図による聴覚及び体性感覚における interaction の検討　生理学研究所脳磁図研究会「脳磁場計測によるヒト機能の解析」（岡崎）

《生体機能検査室》

1．Y. O. Kamatari, S. Ohji, T. Konno, M. Kataoka & K Akasaka, The alcohol-induced globular and expanded-helical conformations of proteins, Magnetic Resonance/Spectroscopy in Food Science, 1997.9.15, Himeji

2．田中直毅，竹村元良，今野　卓，功刀　滋：タンパク質構造形成機構モデルとしての水溶性高分子の疎水性化合物結合，第46回高分子討論会，1997.10.1 名古屋

3．黄地祥子，鎌足雄司，今野　卓，片岡幹雄＆赤坂一之，蛋白質立体構造に対するメタノールの効果，溶液化学討論会，1997.11.6, 京都

《超高圧電子顕微鏡室》

1．有井達夫 (1997.3) 超高圧電顕によるイメージングプレートの特性Ⅲ。日本物理学会第52回年会（名古屋）

2．有井達夫 (1997.5) 超高圧電顕によるフィルム像とイメージングプレート像の特性Ⅲ。日本電子顕微鏡学会第53回学術講演会（尼崎）

3．仙石昌也，有井達夫，花井孝明，大野　完 (1997.10) Imaging plate を用いた有機物結晶の電子照射損傷の測定。日本物理学会　1997年秋の分科会（神戸）

4．谷口美恵子，荒金宏臣，有井達夫 (1997.10) プロトプラストの電気融合過程におけるミクロフィラメントのネットワーク形成。第35回日本生物物理学会年会（京都）

5．有井達夫 (1997.11) 電子線二次元検出器としてのイメージングプレートの感度と分解能Ⅲ。日本結晶学会年会（姫路）

6．谷口美恵子，荒金宏臣，鈴木直哉，有井達夫 (1997.11) プロトプラストの電気細胞融合過程におけるミクロフィラメントのネットワーク形成　Prog. 20th Meeting Japan Soc. for Laser Microscopy （東京）

《超高圧電子顕微鏡共同利用実験》

1．野田　亨，井出千束 (1997.5) 有窓層板の層間連絡構造について。日本電子顕微鏡学会第53回学術講演会（尼崎）

2．S. Hidaka, Y. Lu, M. Maehara, Y. Hashimoto (1997.5) Functional segregation of gap junctionally connected amacrine cells in the inner plexiform layer. Annual meeting of Assoc. for Res. in Vision and Ophthalmology (Florida, USA).

3．M. Taniguchi (1997.7) Electrofusion of plant protoplast and dynamic properties of actin filaments. The VIII International Symposium on Electroopto '97 (St-Petersburg, Russia)

4．K. Hama (1997.8) Neurological research and shared imaging resources at the National Institutes in Okazaki, Japan. The 55th annual meeting of the Micros. Soc. (Cleveland, USA)

5．仙石昌也，有井達夫，花井孝明，大野　完 (1997.10) Imaging plate を用いた有機物結晶の電子照射損傷の測定。日本物理学会　1997年秋の分科会（神戸）

6．谷口美恵子，荒金宏臣，有井達夫 (1997.10) プロトプラストの電気融合過程におけるミクロフィラメントのネットワーク形成。第35回日本生物物理学会年会（京都）

7．谷口美恵子，荒金宏臣，鈴木直哉，有井達夫 (1997.11) プロトプラストの電気細胞融合過程におけるミクロフィラメントのネットワーク形成　Prog. 20th Meeting Japan Soc. for Laser Microscopy（東京）

《電子計算機室》

1．酒井みどり，石原彰人，石井宏幸，神山斉己，中内茂樹，戸田尚宏，臼井支朗 (1997.3) 3色 LED によるランダム光刺激を用いた視細胞－水平細胞ネットワークの非線型特性の解析，電子情報通信学会 ME とバイオサイバネティックス研究会（東京）

2．石井宏幸，神山斉己，臼井支朗 (1997.3) 網膜Ｌ型水平細胞の波長感度特性に関するシミュレーション解析，第74回日本生理学会大会（浜松）

3．石井宏幸，小松英彦 (1997.7) 2つのシナプス入力が神経活動に及ぼす効果に関するシミュレーション解析，第20回日本神経科学大会（仙台）

4．石井宏幸，神山斉己，臼井支朗 (1997.9) コイ網膜水平細胞層における刺激依存性受容野の解析，第12回生体・生理工学シンポジウム（東京）

5．藤川智博，石井宏幸，神山斉己，臼井支朗 (1997.12) 網膜 R/G 型水平細胞のダブルフラッシュ応答解析，電子情報通信学会 ME とバイオサイバネティックス研究会（豊橋）

《動物実験施設》

1．Furuya K. Furuya S. & Ozaki T. (1998.3) Endothelin Induced Morphological Changes in Subepithelial Fibroblasts and Astrocytes in the Rat with a Mutant ET_B Receptor Gene. The Physiological Society of Japan (Kanazawa)

2．古家園子，尾崎　毅，古家喜四夫（1998.3）　ET_B 受容体一部欠損ラットにおける小腸絨毛上皮線維芽細胞とアストロサイトの形態変化，　第103回日本解剖学会（大阪）

3．山崎由起子，藤本弘一，野瀬俊明（1997･5）マウス精子形成細胞へのエレクトロポレーションによる遺伝子導入　第30回日本発生生物学会大会（つくば）

4．山崎由起子，尾崎　毅，井本敬二，八木　健（1997･12）マウス精子形成細胞への遺伝子導入法の検討　第20回日本分子生物学会年会（京都）

《江橋研究室》

1．江橋節郎（1997.2）第16期日本学術会議化学研究連絡委員会　化学の将来（東京）

2．江橋節郎（1997.3）第74回日本生理学会　筋グループディナー（浜松）

3．江橋節郎（1997.5）今井昭一教授退官記念新潟国際セミナー　平滑筋の収縮と弛緩「Ca 説の成立とその発展」（新潟）

4．江橋節郎（1997.6）東海学士会　無機イオンと生命（名古屋）

【 一般共同研究報告 】

一般共同研究報告

〔目　　次〕

1．アルツハイマー病 Aβ 生成機構の研究（岩坪　威他）…… 147
2．分子分光法による血精アルブミンの高次構造に関する研究（恵良聖一他）
…… 148
3．唾液腺における水輸送と開口分泌の協調機構（村上政隆他）…… 150
4．生殖細胞の活性化機構（宮崎俊一他）…… 151
5．反発因子の神経成長円錐における細胞内 Ca^{2+} 動態に及ぼす効果の解析
（五嶋良郎他）…… 152
6．核内 Ca^{2+} の調節機構と遺伝子発現（河原克雅他）…… 153
7．GABA を介する膵島 β-α 細胞間のパラクライン調節機序の研究
（八尾　寛他）…… 153
8．視床下部神経細胞におけるレプチン，PACAP, 栄養素の作用機序
（粟生修司他）…… 154
9．多価陰イオン蛍光物質の細胞内外カルシウムイオン依存性分泌機構
（柴　芳樹他）…… 155
10．培養神経細胞の細胞死に対する GDNF の防御作用（榎本浩一他）…… 156
11．インスリン分泌に及ぼす CD38 抗体の生化学的，生理学的検討
（田港朝彦他）…… 157
12．ヒト胎児小腸上皮由来培養細胞 (Intestine407) における水チャネルの
細胞容積調節に果たす役割（上田俊二他）…… 158
13．正常発達および病態における糖鎖構造の解析（和田洋巳他）…… 160
14．悪性グリオーマに対する高力価な脳特異的レトロウイルスベクターの開発
（清水恵司他）…… 161
15．中枢神経系におけるニューロンとグリア細胞の発生・分化：低密度培法を
用いた細胞運命決定機構の解析（小川正晴他）…… 163
16．新しい生体分子センサーの開発（森井　孝他）…… 164
17．Fyn 欠失マウスのエタノール感受性（二木宏明他）…… 164
18．味細胞苦味応答電流に対する細胞内二次伝達物質の影響（恒成　隆他）　165
19．脳高次機能と運動制御（南部　篤他）…… 166

20. 神経標識法を用いたMotor neuron degeneration (Mnd) マウス発育に伴う
神経変性過程の研究（永田　豊他） …… 167
21. サルのセントラルパターンジェネレータの作動様式（山口峻司他） …… 168
22. 神経伝達物質受容体の局所神経回路における発現様式の電気生理学的・
分子生物学的解析（伊佐　正他） …… 169
23. aganglinosis ratの腸管における神経成長因子の発現の検討（河谷正仁他）
…… 169
24. 行動制御の基盤となる中枢神経回路の解析（武市雅俊他） …… 170
25. 蛍光測定による聴覚中枢活動の観察（橋本　享他） …… 171
26. 各種上皮細胞における細胞内カルシウム動態の画像解析（佐藤洋一他） 173

1．アルツハイマー病 Aβ 生成機構の研究

岩坪　威（東京大・大学院薬学系研究科・臨床薬学）
丸山　敬（生理研）

アルツハイマー病の病因の一つとしてアミロイド前駆体蛋白質 (APP) から生成される Aβ の異常な蓄積が考えられている。東京大学臨床薬学教室では，Aβ に対する種々のモノクローナル抗体やウサギ抗体を作成し，Aβ の免疫学的定量法を樹立している。生理学研究所・神経化学部門では，各種の変異アミロイド前駆体蛋白質を遺伝子導入により培養細胞で強制発現を行っている。そこで，この培養細胞が生成する Aβ を免疫学的定量法で測定することによって，アミロイド前駆体蛋白質の代謝過程を詳細に検討することを目的として共同研究を行った。

家族性アルツハイマー病の一部には APP に変異が存在し，それが原因遺伝子変異であることがほぼ確認されている。その一つ，Val717 変異が APP の代謝に及ぼす影響は長らく不明であったが，1994年に凝集性毒性の高い Aβ42 の比率を増加させることが報告された。本共同研究では，Val717 をアルツハイマー病家系で見いだされている変異やその他のアミノ酸に変異してその影響を検討した。その結果，アルツハイマー病家系で見いだされた Ile, Phe, Gly は既報通り Aβ42 を増加したが，他のアミノ酸ではそのような効果は見いだされなかった。(Maruyama, K. et al. 1996)

1995年，一部の家族性アルツハイマー病に付随した変異遺伝子プレセニリン (PS-1, PS-2) が報告された。それらの機能は全く不明であるが，アミロイド前駆体蛋白質と共発現させその代謝に及ぼす影響を検討した。PS-1, PS-2 を PCR でクローニングし COS 細胞でアミロイド前駆体タンパク質 (APP) と共発現した。AD と連鎖した変異をもった PS を発現させると Aβ42 が増加した。また，もともと Aβ を分泌している神経系培養細胞の Neuro2a に PS2 を発現させると，やはり Aβ42 が上昇した。つまり，これらの変異は難溶性 Aβ42 を増加させることによって AD の原因となるという仮説を支持する結果が得られた。(Tomita, T. et al. 1997)

Kei Maruyama, Taisuke Tomita, Kohki Shinozaki, Hideaki Kume, Hideo Asada, Takaomi C. Saido, Shoichi Ishiura, Takeshi Iwatsubo and Kunihiko Obata
Familial Alzheimer's Disease-linked Mutations at Val^{717} of Amyloid Precursor Protein are Specific for the Increased Secretion of A β 42 (43)
(1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 227, 730-735
Taisuke Tomita, Kei Maruyama, Takaomi C. Saido, Hideaki Kume, Kohki Shinozaki, Shinya Tokuhiro, Anja Capell, Jochen Walter, Juergen Gruenberg, Christian Haass, Takeshi Iwatsubo and Kunihiko Obata
The presenilin 2 mutation (N141I) linked to familial Alzheimer's disease (Volga German families)

increases the secretion of amyloid β protein ending at the 42nd (or 43rd) residue
(1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 2025-2030

2．分子分光法による血清アルブミンの高次構造に関する研究

恵良聖一，中村浩二，林　知也，桑田一夫（岐阜大・医・第2生理）
曽我美　勝（岐阜大）
村上政隆，永山國昭（生理研）

ウシ血清アルブミン(BSA)は，製品中に含まれる微量のプロテアーゼによって，pH 3.8のF型状態ではBSA*に変化する。さらにこのBSA*は，重水中で7％以上で容易にゲル化(BSA*-gel)する[1)]。今回は，BSAのこのような溶液→ゲル変換における高次構造の経時変化を，ラマン分光法によって研究した。

ラマン分光光度計は日本分光社製R-800を用い，Ar^+レーザーによって514.5 nmで励起した。

重水中のタンパク質の二次構造変化に関しては，そのマーカー・バンドとして，ヘリックス含

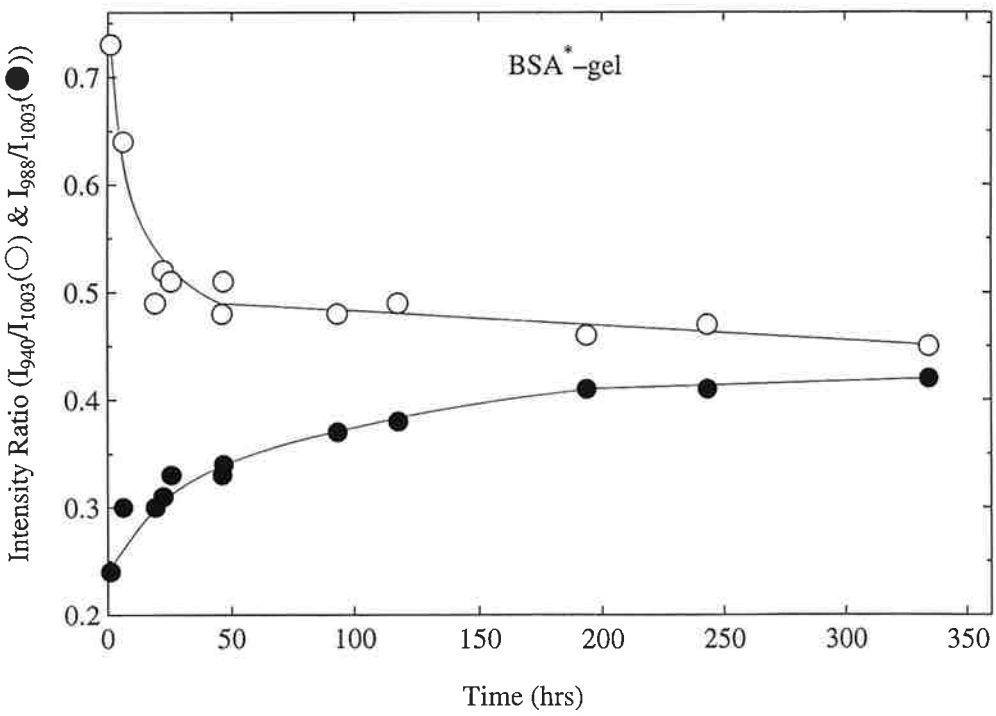


図1　I_{940}/I_{1003}（○）とI_{988}/I_{1003}（●）の経時変化

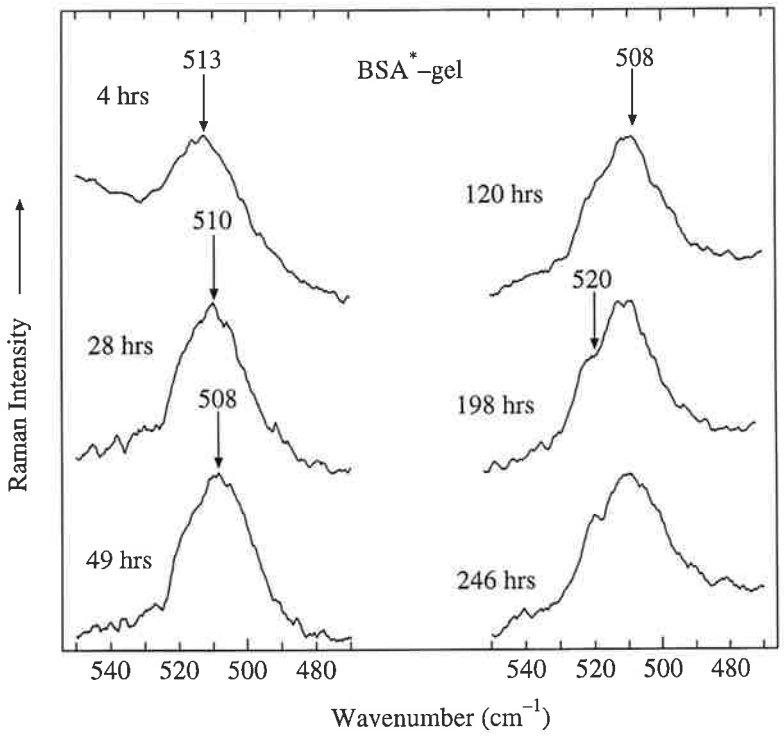


図2　500 ～ 550 cm^{-1} 領域でのS-S結合のコンフォメーションの経時変化

量に対しては I_{940}/I_{1003} を，不規則構造含量に対しては I_{988}/I_{1003} を指標としてそれぞれ見積もった。図1より，BSA* のゲル化の進行に伴って，ヘリックス含量は急激に減少し，逆に不規則構造は増加した。しかし両曲線に鏡像関係が認められなかったことから，ヘリックス含量の減少に伴って，不規則構造のみならずβ構造も形成されているであろうことが示唆された。

BSAには17個のS-S結合が存在し，そのコンフォメーションは，従来の報告ではゴーシュ・ゴーシュ・ゴーシュ (G-G-G) のみとされていた[2]。しかし我々の研究において，G-G-Gだけでなく，ゴーシュ・ゴーシュ・トランス (G-G-T) も存在し，その割合もN-F転移，F-E転移に一致して変化することが明らかになった[3]。図2に示すように，S-S結合のS-S伸縮振動を反映している 500 ～ 550 cm^{-1} に観測されるラマン線の変化から，ゲル化の進行に伴ってG-G-T成分が徐々に増加した。

以上のことから，BSA* のゲル化において，ヘリックス含量の減少と同時に，β構造や不規則構造含量の増加，さらにそれに伴ってS-S結合のコンフォメーションの変化が生じていることが明らかになった。

1）Sogami, M., Nagaoka, S., Era, S., Inouye, H., Kuwata, K., Kida, K., Watari, H., Shiga, K. and Akasaka, K. (1986) Water structure in modified bovine plasma albumin (BPA*) gel and bovine

mercaptalbumin solution: ^{1}H-n.m.r. studies. Int. J. Peptide Protein Res. 28, 130-140

2) Chen, M. C. and Lord, R. C. (1976) Laser-excited Raman spectroscopy of biomolecules. VIII. Conformational study of bovine serum albumin. J. Am. Chem. Soc. 18, 990-992

3) Nakamura, K., Era, S., Ozaki, Y., Sogami, M., Hayashi, T. and Murakami, M. (1997) Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy. FEBS Lett. 417, 375-378

3．唾液腺における水輸送と開口分泌の協調機構

村上政隆（生理研）
瀬尾芳輝（京都府立医大）
吉村啓一（北海道大・歯）
瀬川彰久（北里大・医）
杉谷博士，横山三紀，吉垣純子，三井由香，小方頼昌，古山俊介（日大松戸・歯）
赤川公朗（杏林大・医）

外分泌腺は，分泌刺激を受けると水輸送機構と開口分泌が両方活性化されるが，その時間的経過，相互作用については不明な点が多い。本研究の目的は，水分泌測定の可能な唾液腺を材料に，血管潅流系及び遊離細胞系を用い，分泌経過に沿って水輸送と開口分泌を計測し両システム間の協調機構を検討することである。

1）ラット顎下腺血管潅流系のNMRマイクロイメージングに成功，緩和試薬を潅流系に添加し，wash-outを計測した。一方，水分泌と酸素消費の同時測定から，重炭酸潅流下での対向輸送系によるClイオン取り込みには，炭酸脱水素酵素による機構がNa/重炭酸共輸送より重要であることを見出した。

2）耳下腺のアミラーゼ分泌に及ぼすcyclic AMP系及びCa系agonistの効果を遊離細胞環流系で二相性分泌パターンの変化を解析した。その結果分泌顆粒のprimingにはATPが必要，細胞内Ca濃度上昇は不必要，一方最後のfusion/exocytosisには細胞内Ca濃度上昇が重要でATPは直接には必要としない。一方cyclic AMPやc-kinaseは，主に顆粒のprimingにより働くとするモデルが分泌パターンをよく説明できた。但しcyclic AMPとc-kinaseによるprimingの作用点は異なっている。B B A 1402; 171-187 1998

3）走査電顕・共焦点レーザー顕微鏡を用い，ヒトおよびラット唾液腺の開口分泌の膜動態の観察をおこなった。その結果，異なる分泌刺激により（酵素分泌刺激と水分泌刺激）2種のexocytosis-endocytosis coupling機構が誘発され，それが細胞骨格・細胞内情報伝達系による調節をうけることをみつけた。基本的に2種の膜動態はヒトとラットでかわらず，種をこえた普遍的

なものであることが示唆された。開口分泌が水分泌にかかわるかもしれないという本研究課題を裏づける結果を得た。Cell Tissue Res 291: 325-336 1998; J Cell Biol (141: 135-142) 1998; Eur J Morph (in press) 1998; Bioimages (5: 153-155) 1998

4）ウサギ耳下腺腺房細胞において，水分泌をひきおこすムスカリン性受容体刺激によりカルシウム依存性に一酸化窒素合成酵素が活性化され，一酸化窒素 (NO) の産生が引き起こされ，さらに NO がグアニル酸シクラーゼを活性化し，cGMP 産生を引き起こす Ca^{2+} /NO/cGMP シグナルを明らかにした。この系において，従来一部の研究者により考えられていた cGMP が開口放出を引き起こすことは認められなかった。一方，βアドレナリン受容体刺激による開口放出は NO により修飾をうけることが認められた。Arch Oral Biol 42: 621-624, 1997; Cell Calcium (in press) 1998

4．生殖細胞の活性化機構

経塚啓一郎（東北大・浅虫臨実）
池上晋（広島大・生物生産）
宮崎俊一，尾田正二，白川英樹（東京女医大・第二生理）
黒田英世，黒田律（富山大・生物）
森沢正昭（東京大・三崎臨実）
桑原慶紀，桜井明弘（順天堂大・産婦人科）
毛利達磨，出口竜作（生理研）

精子ー卵相互活性化機構について，種々の実験系の利点を生かして実験を行った。1）ハムスター卵透明帯の可溶成分を精子に投与して精子先体反応（開口分泌の一種）を誘発し，この際の精子細胞内 Ca^{2+} 増加反応の画像解析を行った。2）原索動物ホヤの精子抽出物の卵内注入により Ca^{2+} 増加反応が誘発され，減数分裂の再開・進行が誘導された。Ca^{2+} 増加反応は 2 セットの Ca^{2+} オシレーションを示し，各々第一，第二減数分裂の中期に相当していた。これらの反応は受精時の場合と非常によく一致していた。精子抽出物注入による初めの Ca^{2+} 増加は卵表層から開始され，Ca^{2+} 波を形成した。3）ウニ精子による卵表層局所の Ca^{2+} 増加の分離・記録に成功した。4）ウニ卵内に注入した caged IP_3, caged cADP ribose を紫外線照射により瞬時に活性型に変換して卵を刺激した場合，Ca^{2+} 波が発生するか否かを観察した。4）マウス卵への精子注入後の卵細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の時・空間的解析を行い，注入後15－30分で卵全体でほぼ同期して濃度が上昇し，この一過性の Ca^{2+} 上昇が数時間に亘って持続することを観察した。5）ハムスター精子抽出物をマウス卵内に注入した際の卵細胞内 Ca^{2+} 上昇を時・空間的解析した。卵に Ca^{2+} オシレーションを誘発する活性をもつ精子因子に対する感受性は，卵皮質が中心部に比べ

て高いことを明らかにした。これらの結果は相互に関連しており，いづれも精子細胞質の卵内移行によってCa^{2+}遊離を誘発するという考えを支持するものであった。

5．反発因子の神経成長円錐における細胞内Ca^{2+}動態に及ぼす効果の解析

五嶋良郎（横浜市大・医・薬理）
中山　孝（同・生化学第一）
白川英樹（東京女医大・第二生理）
毛利達磨，出口竜作，宮崎俊一（生理研）

個体の発生段階において神経軸索がいかに正確に標的細胞を認識し適切な回路網を形成・維持していくかを分子レベルにおいて解明することは生命科学において最も重要な検討課題の一つである。近年，成長円錐は神経回路形成の過程において様々な標識分子を認識する能力を有し，神経走行を決定する上に究めて重要な役割を果たすことが認識されつつある。現在分子レベルの解析に至っている成長円錐の退縮ならびに軸索伸展の抑制・短縮を引き起こす因子，反発因子の一つは collapsin (repulsive axon guidance signal) である。本研究の目的はこれらの軸索ガイダンス因子が成長円錐の細胞内Ca^{2+}動態に及ぼす効果並びに成長円錐運動との相関を解析することにある。鶏胚より網膜及び後根神経節を調製し，初代培養をおこなった。培養１～２日で発達してくる神経成長円錐にCa^{2+}インディケーターである INDO-1 もしくは CALCIUM GREEN/FURA RED を負荷し，反発因子である collapsin, Ionomycin 及び ATP で成長円錐を刺激する。成長円錐のCa^{2+}濃度の経時変化は，レーザーコンフォーカル顕微鏡と高感度ビデオカメラを組み合わせることによって刺激前・後から一秒間隔下に連続的におこない，成長円錐の退縮反応との関連を調べた。カルシウムイオノフォア，イオノマイシン（最終濃度 1 μM）の培養液への添加は成長円錐もしくは成長円錐付近の軸索膨大部におけるCa^{2+}濃度を直後一秒以内に上昇した。そのプラトー相は20秒程度持続し，その後は徐々に減少した。一方，collapsin (1-10 U/ml) 投与は，数十秒ないし数分内に成長円錐の退縮を惹き起こした。同条件下に成長円錐 C-domain における一過性のシグナルの上昇を認めた例もあったが，数例の実験結果から再現性が得られず，本実験系においては，collapsin による成長円錐部の細胞内Ca^{2+}濃度の変動は認められないと結論した。collapsin の成長円錐退縮の初期応答が filopoida 先端の極微小な領域において惹起されることが考えられる。従って，collapsin とCa^{2+}変動との相関性の有無を決定する上に同部におけるCa^{2+}の変動を秒あるいはそれ以下の単位において再現性よく捉えることが，今後の重要な課題となろう。

6．核内 Ca^{2+}の調節機構と遺伝子発現

河原克雅（北里大・医・生理）
毛利達磨，出口竜作，中隣ゆかり，宮崎俊一（生理研）

腎臓は，体液浸透圧調節のため高張尿を体外に排出する。腎髄質内層集合管細胞 (IMC D) は，脱水時に，脳下垂体から分泌される抗利尿ホルモン（バゾプレッシン，AVP）と正常体液浸透圧 (300 mOsm/kgH_2O) の 4 － 5 倍の高張液に晒される。血中 AVP は，集合管側底膜の V1, V2 受容体を介して細胞内 Ca と cAMP 濃度を増加させ，それぞれの細胞内シグナル系を介して管腔膜の水，尿素透過性を増加させる（短期的調節（秒－分））。中長期的には（時間－日），AVP と高浸透圧刺激により，水チャネル，尿素輸送体 遺伝子の転写が促進され，水チャネル，尿素輸送体 mRNA の発現とそれに引き続く蛋白の合成が促進される。われわれは，培養 IMCD 細胞において，AVP の V1 受容体を介して 増加する細胞内 Ca の増加を，共焦点レーザー顕微鏡を使って空間的，時間的に解析 した。Indo-1（Ca 蛍光指示薬）を負荷したラット IMCD の培養細胞（単層）に AVP を投与 すると，濃度依存的に (1-100 μM) 細胞質内，核質内 Ca が増加した。この反応は，細胞外 Ca free の条件でも同様におこった（反応は小さい）。細胞内 Ca 増加時の蛍光比（核質内／細胞質内）は 1 より大きかった（1.4－1.7）。低い血清濃度（＋0.3％血清，＞ 5 時間）で培養した IMCD 細胞に，10-8 M AVP（細胞内 Ca の増加を認めない濃度）を投与し，経時的に，培養細胞から RNA を抽出した。AVP 投与後0.5，1，2，6，12，24時間に，IMCD 細胞の尿素輸送体 (rUT1) mRNA 発現量を測定した。rUT1 mRNA の発現量は，AVP 投与後 2 相性に増加した（第 1 ピーク，2 時間；第 2 ピーク，24時間）。これらの結果は，ラット培養 IMCD 細胞の核質内 Ca は，細胞質内 Ca と独立して調節を受けている可能性を，AVP による尿素輸送体の遺伝子発現は細胞内 Ca 増加検出限界以下の低濃度ホルモンの作用で調節が行なわれている可能性を示唆した。

7．GABA を介する膵島 β-α 細胞間のパラクライン調節機序の研究

八尾　寛，谷内一彦（東北大・大学院医学系研究科）
八重倉和朗，中田正範，柳田和弘（鹿児島大・医）
丁維　光（滋賀医大）
矢田俊彦（生理研）

【目的】膵島内において，α-細胞と β 細胞が相互作用して，グルカゴンとインスリンの分泌を調節していると考えられる。しかし，これを直接的に証明した報告はない。このようなパラクライ

ン調節機序の一つは，GABA によるα細胞のグルカゴン分泌の抑制であることが示唆されている。しかし，β細胞がグルコース濃度に応答して GABA を分泌しているか否かは，未だ検証されていない。膵島細胞の約70％はβ細胞であり，α細胞は約20％を占めるにすぎない，従って，膵島レベルの実験結果からα細胞の事象を抽出することは困難である。ゆえに，本年度は分散培養系においてα細胞を同定する方法を確立することを第一の目的とした。$GABA_A$ 受容体の活性化によりα細胞の細胞内 Cl^- 濃度が上昇することが期待される。これを Cl^- 感受性色素を用いて光学的に測定することにより，β細胞からの GABA 分泌を検出する系を確立することを第二の目的とした。

【方法】1）膵α細胞の機能解析方法の確立：ラット膵島からコラゲナーゼ法により膵島細胞を単離しカバーガラス上にまき1－3日間培養した。単一細胞の直径を顕微鏡下に測定し，細胞内 Ca^{2+} 濃度（$[Ca^{2+}]$）を fura-2 顕微測光により測定した後，抗インスリン・グルカゴン抗体を用いた免疫組織化学によりβおよびα細胞を同定した。2）Cl^- 感受性色素による $GABA_A$ 受容体応答の測定：6-methoxy-N-ethylquinolinium iodide (MEQ, Molecular Probes) を sodium borohydrate により還元し，還元型 MEQ (DiH-MEQ) をエーテル抽出した。エーテルを N_2 ガス流により蒸散させた後，培養液に 400μM になるよう溶解させた。37℃，10－15分間インキューベートすることにより，酸化型 MEQ がα細胞に取り込まれていることが確認された。GABA はアロステリック モジュレーター，diazepam と pentobarbital とともに Y-tube 法により局所的に投与した。測定系の感度を上げる目的で細胞外 Cl^- を SCN^- に置換した。

【結果】1）細胞直径のヒストグラムは 10μm と 15μm に2ピークを取った。2）直径 12.5-17.5μm の細胞はほぼ100％トルブタミド 300μM に対して $[Ca^{2+}]$ 増加応答を示しインスリン陽性であった。3）直径 9-11μm の細胞のうちトルブタミド・高グルコースに対して $[Ca^{2+}]$ 増加（－）の細胞はグルカゴン陽性であった。すなわちα細胞は直径 9-11μm でトルブタミド・高グルコース応答（－）の細胞として同定し解析することが出来ることが明らかになった。GABA に応答して蛍光強度が減少する細胞が認められる一方，明瞭な応答が認められない細胞も多数存在した。これは測定系の S/N 比が十分大きくないことに原因があると考えられる。

8．視床下部神経細胞におけるレプチン，PACAP，栄養素の作用機序

粟生修司，高木　博（九州大・医・第一生理）
塩田清二（昭和大・医・第一解剖）
室屋真二，浦村一秀（鹿児島大・医・神経精神科）
中条茂男（昭和大・薬）
矢田俊彦（生理研）

視床下部の弓状核は腹内側核，外側視床下部，室傍核とならんで摂食調節中枢として機能している。その性質を解明するため，ラット弓状核ニューロンを単離し，細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]$) を測定し摂食調節物質の作用を調べた。弓状核神経の約半数は，低グルコースにより $[Ca^{2+}]$ が上昇するグルコース感受性神経であり，これらの多くは Neuropeptide Y を含有する細胞であった。この $[Ca^{2+}]$ 上昇は脂肪由来ホルモン Leptin により抑制され，また神経物質 GABA (10^{-7}-10^{-6}M) により抑制された。GABA 陽性終末が弓状核ニューロンにシナプスを形成していた。この GABA の作用は，GABA-A 受容体阻害剤もしくは GABA-B 受容体阻害剤の単独投与によっては阻害されず，二つの阻害剤の共存により阻害された。弓状核神経はグルコース・Leptin を介した末梢代謝性情報および GABA を介した中枢神経性情報により制御されていることが明らかとなった。

ラット視床下部における PACAP は Vasopressin (VP) 分泌を促進し，VP を含有すると思われる神経内分泌ニューロンにはT型，L型，N型，P/Q 型の Ca^{2+} チャネルがそれぞれ発現していることが明らかになっている。しかしその細胞内シグナル伝達経路や機能的意義についてはほとんど不明である。そこで VP ニューロンの PACAP 性神経支配を免疫電顕法でしらべ，さらにその細胞内シグナル伝達機構と Ca^{2+} チャネルとの関連性を機能形態学的にしらべた，多数の PACAP 様免疫陽性終末が視索上核や室傍核の神経内分泌ニューロンの細胞体やその突起にシナプスを形成し，その免疫陽性反応は軸索内の果粒小胞（直径 80-100 nm）に一致してみられた，二重免疫電顕法により，PACAP 陽性終末が VP ニューロンにシナプスを形成している像がみられた。PACAP は 1-10 nM で VP 含有細胞の細胞内カルシウムを上昇させ，プロテインキナーゼ A (PKA) 活性阻害により PACAP 投与後の細胞内カルシウムの上昇はみられなかった。また PACAP は主にT型とL型の Ca^{2+} チャネルを介して VP ニューロンを興奮性に調節していることも明らかになった。

9．多価陰イオン蛍光物質の細胞内外カルシウムイオン依存性分泌機構

柴　芳樹，広野　力，岩佐佳子，田中秀司（広島大・歯）
山岸俊一（生理研）
古家喜四夫（京都工繊大・繊維）

［目的］本研究は多価陰イオンとして蛍光物質を用い，副交感神経作動薬及び交感神経作動薬による分泌と分泌の修飾及び水分泌との関連並びにその分泌機構を解明し，さらに細胞内外の Ca^{2+} や cAMP の分泌に果たす各々の役割を明らかにすることを目的としている。昨年度に引続き，多価陰イオン物質カルセインの分泌と水分泌でと共通点が多いことに注目し，両分泌の細胞内反応機構および両分泌の交感神経作動薬による増強機構を比較検討した。

［方法］ラット耳下腺より腺房をコラゲナーゼ処理により分離した。腺房細胞内に多価陰イオン蛍光物質のカルセインを負荷しカルバコール，イソプロテレノール等の自律神経作動薬によるカルセインの分泌量を蛍光分光光度計で測定した。腺房細胞内に fura-2 を負荷し，自律神経作動薬による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定するとともに，ホールセルパッチクランプ法により，腺房細胞のカリウム電流とクロライド電流を測定した。またラット顎下腺の動脈よりリンゲル液および分泌刺激薬を潅流し導管より分泌される唾液量を測定した。

［結果・考察］カルバコールで腺房細胞内より分泌されるカルセインは，カリウム電流を抑制するチャネルブロッカー等で分泌量が抑制された。カルバコールで誘発されるカルセイン分泌のイソプロテレノールによる増強作用は外液 Ca^{2+} 依存性であり，同じくカルバコールで誘発されるカリウム電流のイソプロテレノールによる増強も外液 Ca^{2+} 依存性で，細胞内 Ca^{2+} の測定より細胞外からの Ca^{2+} 流入に依存していた。以上のことからカルバコールで誘発されるカルセイン分泌及びイソプロテレノールによる増強作用はカリウム電流と共役している可能性が高いことが示唆された。カルバコール刺激によるラット潅流顎下腺からのカルセイン分泌の時間経過は一過性であり，同刺激による唾液分泌速度の時間経過の初期相に対応していた。

［参考文献］C. Hirono, M. Sugita, K. Furuya, S. Yamagishi and Y. Shiba. Potentiation by isoproterenol on carbachol-induced K^+ and Cl^- currents and fluid secretion in rat parotid. J. Membr. Biol., 164, 1998 (in press).

10. 培養神経細胞の細胞死に対する GDNF の防御作用

榎本浩一（島根医大）
古家喜四夫（京都工繊大）
山岸俊一（生理研）

活性酸素は TCA サイクルの活動により必然的に発生する。発生した活性酸素は反応性が高く細胞の機能及び生存にとって有害なため，細胞はスーパーオキサイドジスムターゼ (SOD) 等の酵素で防御している。SOD の活性低下による酸化ストレスが神経細胞死を起こし，神経難病の原因となる可能性がある。たとえば 1-DOPA はドーパミンの前駆物質であり，パーキンソン病の治療薬として重要であるが，その代謝過程において活性酸素が必然的に発生し，かえって神経細胞死を促進する可能性が指摘されている。

神経細胞死を glial-cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) 等の神経栄養因子が抑制するという報告がある。GDNF や GDNF 受容体遺伝子を培養神経細胞に強制発現させ，その細胞の性質から GDNF の保護作用を調べる計画を立案した。

GDNF と GDNF 受容体遺伝子の塩基配列はすでに報告がある。ラット大脳より抽出した

mRNA をもとに RT-PCR で GDNF, GDNF 受容体遺伝子を増幅し，それぞれ蛋白合成プロモーターをもつベクターと連結した。できたプラスミドを大腸菌で増やし，培養神経細胞（NG108-15 と PC-12, 原株に GDNF と GDNF 受容体の発現はない）に形質導入した。形質導入細胞を G418 耐性によりスクリーニングし，導入遺伝子の発現を RT-PCR で確認した。

GDNF, GDNF 受容体遺伝子を発現した 2 種の NG108-15 は両者とも dbcAMP により正常に分化し，活動電位も正常であった。

両細胞の原株では $_{L}$-DOPA 投与 (50-200mM) により細胞死が誘発され，特に 200mM では 3－4 日でほとんど死亡した。4 種の GDNF, GDNF 受容体発現株すべてに $_{L}$-DOPA 耐性がみられ，100-200mM でもほとんど死亡しなかった。今後，この細胞を使用して $_{L}$-DOPA 耐性の生じる機構と抗酸化剤の効果を検討していきたい。

11. インスリン分泌に及ぼす CD38 抗体の生化学的，生理学的検討

伊東武志，田港朝彦，加藤裕子，夏目秀彦（浜松医大・二内）
岡田泰伸，挾間章博（生理研）

インスリン分泌に細胞内 Ca^{2+} 上昇が必要であることは論を待たないが，この細胞内 Ca^{2+} 上昇の機序についても未だ未解明の点が多く残されている。

その調節特に細胞内小器官の Ca^{2+} プールからの動員経路において最近 NAD^{+} の分解によって生成される cyclic ADP-ribose (cADPR) が IP3 感受性のプールとは別の分画からの細胞内 Ca^{2+} 動員作用を発揮することが岡本らによって明らかにされ，細胞内カルシウムの濃度調節機構の新しいセカンドメッセンジャーとして，注目されるようになった。

この cADPR 合成酵素（アメフラシ）とリンパ球表面抗原の一つの CD38 抗原との相同性が高く，かつ CD38 抗原が膵 βcell 上に表出していることが報告され，糖尿病患者の血液から CD38 抗体が検出されたり，CD38 抗体の前処理によって MIN6 細胞からのインスリン分泌が抑制されることが当グループの研究によって明らかにされたため，CD38 抗体が膵 β 細胞に及ぼす影響を生化学的，生理学的な面から検討した。

【方法】マウス膵ランゲルハンス島及び MIN6 細胞（マウス膵 βcell line）を用いてインスリン分泌実験を施行した。

マウス膵ランゲルハンス島はコラゲナーゼ消化法により単離し RPMI1640 培地にて 1～2 時間培養後，実験に供した。

抗 CD38 抗体は培養液内で 1 時間前処理を施した。

【結果】マウス膵ランゲルハンス島において抗 CD38 抗体の前処理は高グルコースによるインスリン分泌を約50％に抑制した（図 1）。

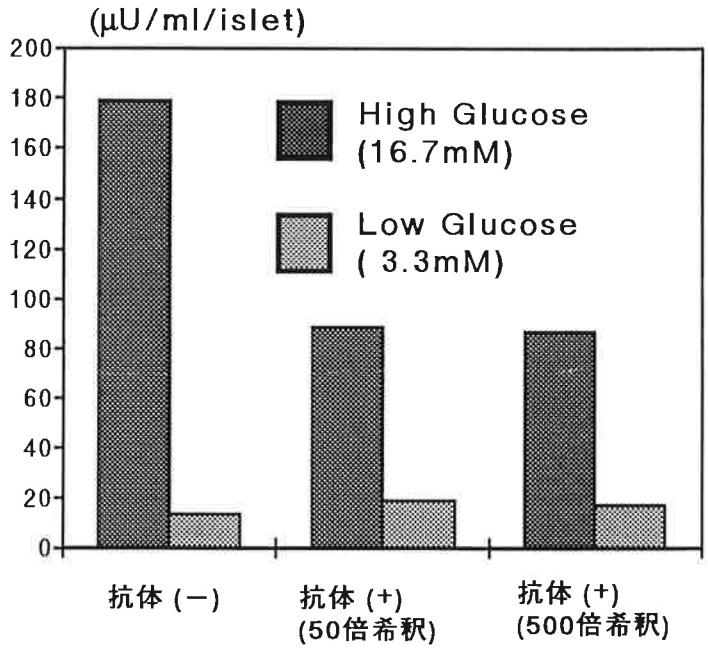


図1：CD38抗体前処理時のインスリン分泌

現在，MIN6細胞を用いて，同様のプロトコールにてインスリン分泌実験を施行中である。

更に，パッチクランプ法や細胞内カルシウム濃度測定によりインスリン分泌のどのステップにCD38抗体が関与しているかを検討する予定である。

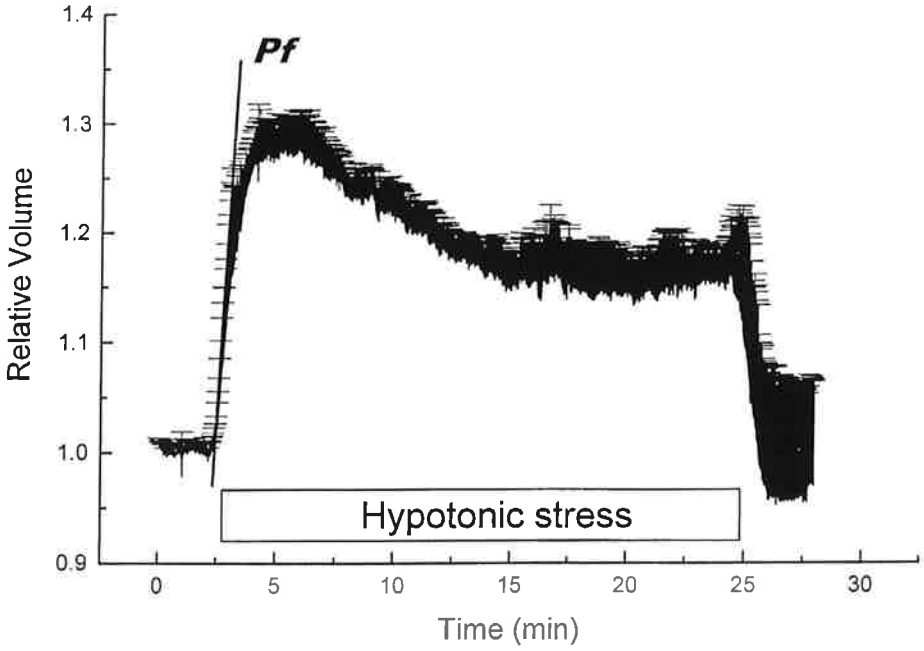
12. ヒト胎児小腸上皮由来培養細胞 (Intestine407) における水チャネルの細胞容積調節に果たす役割

上田俊二，木田　肇，津村剛彦（京都大・医）
岡田泰伸，挾間章博，森島　繁（生理研）

ほとんどの細胞は細胞内外の浸透圧の変化に対し，一時的にその細胞容積が変化するが，まもなく元の容積に復帰しようとする。これまでこの機構に関するイオンチャネルやトランスポーターの性質が広く調べられてきたが，水の移動に関しては系統的に調べられた研究はほとんどない。我々は本研究で水チャネルの小腸細胞での容積調節に果たす役割を明らかにする事を目的とした。

ヒト胎児小腸上皮由来培養細胞 (I407) を用い，浸透圧刺激を与え，その後の細胞体積変化を

顕微鏡下に調べ，その過程を詳細に検討するために，CCD カメラとコンピューターからなる自動的に細胞辺縁を検出する高速画像解析システムを開発した。これにより1/30秒毎に画像を取り込み，細胞容積変化を自動的に決定することが可能となった。低浸透圧性膨張時および調節性収縮 (regulatory volume decrease 以下 RVD) の過程におけるそれぞれの水の pathway を検討するために，細胞容積変化を本システムを用いて測定した。その結果より osmotic water permeability (Pf) を計算した (Pf = 10-20 μm/s)。Pf は，水チャネルブロッカーである $HgCl_2$, MMTS (methyl-methane thiosulfonate) により濃度依存的に抑制をうけた。また，Pf より Arrhenius' activation energy を測定したところ低値を示し (2.7kcal/mol)，以上より水の pathway は水チャネルを介することが示唆された。次に RVD の過程における水の pathway を MMTS に対する影響で見たところ，MMTS の濃度 (3μM-3mM) に依存し RVD は抑制をうけた。この MMTS による RVD 抑制は，陽イオン選択制 ionophore である gramicidine (0.5μM) を MMTS 存在下に与えても RVD に影響なく，また，低浸透圧刺激で活性化される容積感受性 Cl 電流（パッチクランプ法により記録）が MMTS により抑制されないことより，水チャネルが細胞容積調節過程にも重要な役割を担っているものと考えられた。



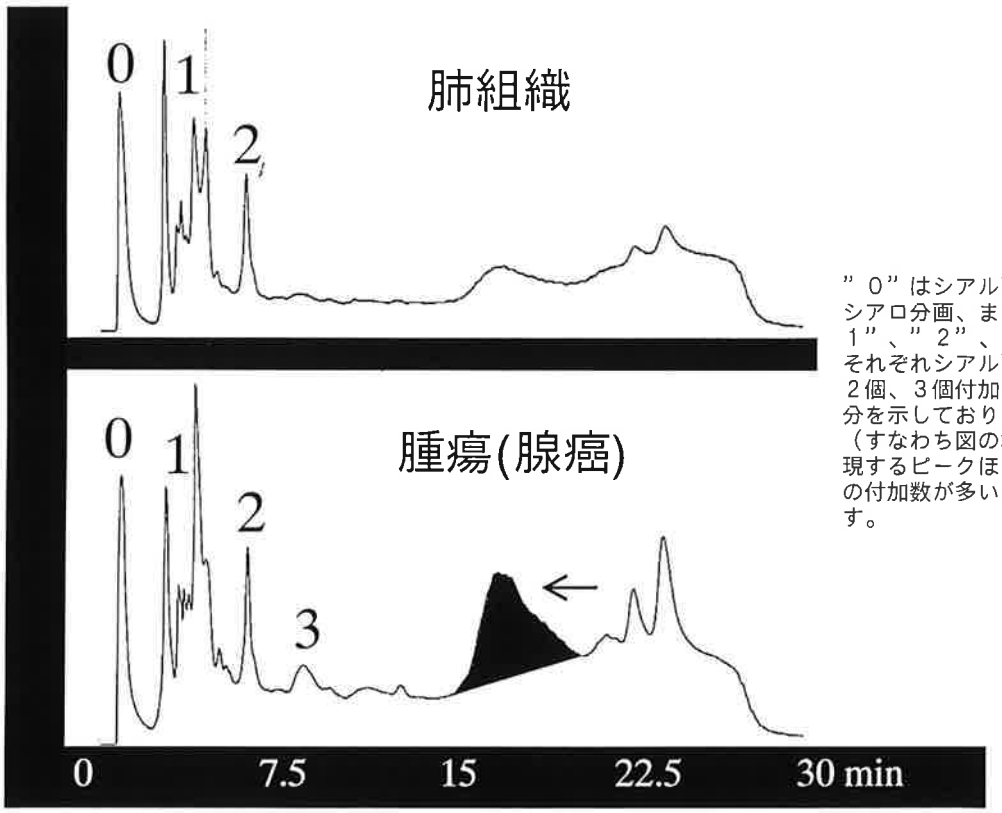
図：高速画像解析システムを用いて測定した低浸透圧刺激による I407 細胞の細胞容積変化

13. 正常発達および病態における糖鎖構造の解析

田中文啓，和田洋巳（京都大・胸部疾患研・胸部外科）

細胞膜表面に存在する糖鎖は，細胞間相互の情報伝達や癌細胞の転移に大きな役割を果たしていることが次第に明らかとなってきた。このうち糖脂質の糖鎖構造の解析とその役割については近年の研究によって十分な知見が蓄積されつつあるが，糖蛋白の糖鎖については，その構造の複雑性と多様性の為に解析が十分に進んでいないのが現状である。

昨年までの共同研究により，糖蛋白の糖鎖構造の系統的かつ高感度な解析方法である化学的スクリーニング法の自動化の実用化が可能となったため，今年度には肺および肺癌組織をモデルとして，正常および病態における糖蛋白糖鎖の系統的解析を試みた。すなわち，肺癌患者から手術



”０”はシアル酸の無いアシアロ分画、また”１”、”２”、”３”は、それぞれシアル酸が１個、２個、３個付加した糖鎖画分を示しており、遅れて（すなわち図の右方に）出現するピークほどシアル酸の付加数が多いことを示す。

図２：イオン交換 HPLC によるシアル酸解析。ヒドラジン分解にて正常肺組織（上段）と同一症例の腫瘍組織（下段）からヒドラジン分解にて切り出した糖蛋白鎖ゲル濾過精製後，陰イオンの電荷によって糖鎖のシアル酸付加数を解析したもの。腫瘍組織では，正常組織にはみられない強い陰性電荷を示すピーク（←）を認め，腫瘍特異的にポリシアル酸が発現している可能性がある。

時に摘出された肺癌組織と周囲の正常肺組織からヒドラジン分解を原理とした自動切り出し装置(GlycoPrep)により行い，これを自動標識装置(GlycoTag)にて非還元末端に自動的に蛍光基質である2－アミノピリジンでラベルする。蛍光標識された糖鎖は1）サイズ分画と逆相高速液体クロマトグラフィーを用いた二次元解析による糖鎖骨格の解析，2）イオン交換高速液体クロマトグラフィーによるシアル酸付加数の解析に供した。

二次元解析による糖鎖骨格の解析では，正常肺部分における糖鎖の発現パターンは多くの症例を通して極めて類似部分が多い反面，一方で各症例毎に異なる部分も認められた。また，図1に示す通り，正常肺部分には認められずに腫瘍組織においてのみ発現するピークも認められた。今後症例を重ねて検討を加え，正常肺における糖鎖骨格構造のバリエーションや，腫瘍特異的に発現を認める糖鎖骨格構造の同定を進めていきたい。

イオン交換高速液体クロマトグラフィーによるシアル酸付加数の解析では，図2に示す通り，腫瘍組織においては極めて強い陰イオン電荷を有する糖鎖ピークの増強を認めた。このことは，腫瘍組織においてポリシアル酸の発現が増強していることを示している可能性がある。

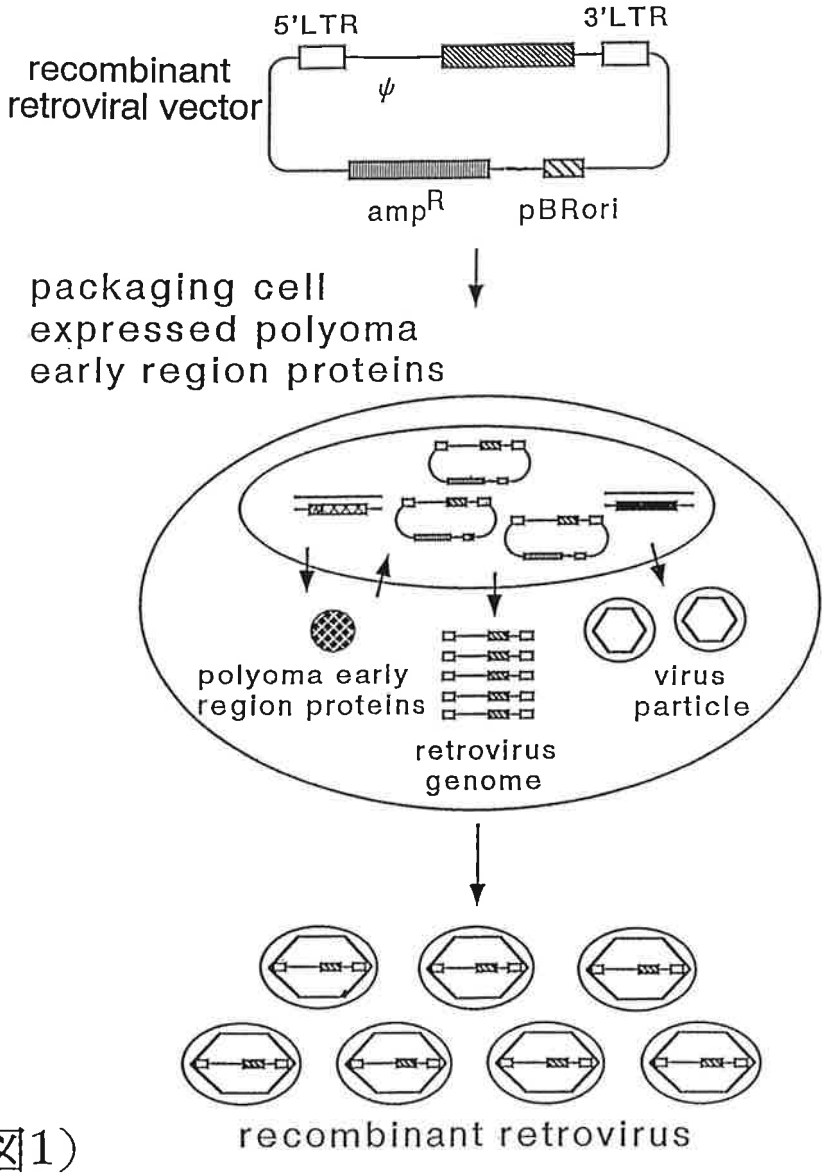
14. 悪性グリオーマに対する高力価な脳特異的レトロウイルスベクターの開発

田村雅一，清水惠司，田村和義，宮尾泰慶，貴島晴彦，馬淵英一郎（大阪大・医・脳神経外科）
池中一裕（生理研）

悪性腫瘍に対する治療として，ベクターを用いて自殺遺伝子を腫瘍細胞に導入することにより腫瘍細胞を死滅させる手法が試みられている。種々のベクターのなかで，レトロウイルスベクターは分裂細胞特異的に感染するため，悪性腫瘍細胞への遺伝子導入に適している。しかし，従来の手法を繰り返す限り，感染効率は他のベクターに比べて低いという欠点があるため，高力価クローンを確立するための研究を続けた。また，体内には正常分裂細胞も存在するため，従来より悪性グリオーマにのみ特異的に目的遺伝子を発現させるため，マウス myelin basic protein (MBP) プロモーターを用いた実験を繰り返し，さらには臨床応用を実施する目的でヒト MBP プロモーターで調整された自殺遺伝子導入による治療実験を繰り返してきた。

レトロウイルスベクターの遺伝子導入効率は，1 ml あたり $10^5 \sim 10^6$ (CFU/ml) であった。我々は，ポリオーマ初期領域遺伝子を導入したパッケージング細胞に，目的とする遺伝子を組み込んだ組み換えレトロウイルスベクターを導入すると，ポリオーマ初期領域遺伝子の作用で，組み換えレトロウイルスゲノムが多数産生され，組み換えウイルスが多く産生された（図1）。これにより，レトロウイルスの遺伝子導入効率は，$10^7 \sim 10^8$ (CFU/ml) に向上した。自殺遺伝子として最も多く用いられている Herpes simplex virus thymidine kinase (HTK) 遺伝子を標的細胞内に導入し，さらに ganciclovir (GCV) を投与すると，HTK 遺伝子導入細胞が死滅する。標的細胞同

志が隣接している場合，全体の1/5程度の細胞にHTKが導入されていれば，bystander効果にて全腫瘍細胞を死滅させうることを実証できている。それでも，臨床で治療対象となる腫瘍細胞数を考慮すると，$10^7 \sim 10^8$ (CFU/ml) という力価は決して満足できるものではなかった。そこで，



（図1）

図1　組み換えレトロウイルスベクターを，あらかじめポリオーマ初期領域遺伝子を導入してあるパッケージング細胞に導入すると，初期領域遺伝子産物の働きで組み換えウイルスゲノムが多数作られる。そのために，組み換えレトロウイルスが多く産生される。

ウイルス液を遠心濃縮することで，現在では $10^{11} \sim 10^{12}$ (CFU/ml) という高力価な組み換えウイルスを入手できている。最後に，ウイルス投与部やウイルス投与から GCV 投与までの期間を検討することにより，臨床応用可能なプロトコールの開発を目指している。

15. 中枢神経系におけるニューロンとグリア細胞の発生・分化：低密度培養法を用いた細胞運命決定機構の解析

小川正晴（高知医大）

大脳皮質を構成するニューロンとグリア細胞は，脳室壁の神経上皮細胞から発生する。マウスの新皮質では，ニューロンは胎生期 (E)10日前後に最初のものが出現し，その後急速に増加した後，E18 前後でその誕生は終了する。一方，分化したグリア細胞は誕生前後から急速に出現することが知られている。このようなニューロンとグリア細胞の発生機序を in vitro の系で検討した。遊離した大脳皮質細胞を低密度で培養し，個々の細胞の増殖と分化を継続的に追跡して，ニューロンとグリア細胞の誕生の過程を解析した。E11 以降の大脳皮質細胞では，（1）共通の神経上皮細胞からニューロンとグリア細胞が誕生すること，（2）神経上皮細胞の不等細胞分裂を契機に形質の異なる細胞種が誕生すること，(3)神経上皮細胞からは，ニューロブラストおよびニューロンが先行し，おくれてグリオブラストが誕生すること，（4）個々の神経上皮細胞から生まれるニューロンの数は個体の発達に伴って減少し，E18 以降にはニューロブラストおよびニューロンの新たな誕生がないこと，（5）グリオブラストは E14 以降に現われ，分化したグリア細胞は E18 以降に急速に出現してくることなどを明らかにした。これらのことは，胎生後半期におけるニューロンとグリア細胞の発生は，神経上皮細胞自身のもつ自律的なメカニズムに強く規定されていることを示唆している。

E11 以前については，遊離細胞の条件下では神経上皮細胞が死滅することから，細胞小塊で培養し検討した。E10 の大脳皮質細胞小塊では，培養開始後すみやかに単層の細胞集団として培養皿上に広がり，ついで細胞増殖にともなって，ニューロブラストおよびニューロンが発生し，おくれてグリオブラストが現われた。一方，E9 の大脳皮質から分離した細胞小塊では，培養皿上に単層に広がり増殖するが，細胞はネスチン陽性の神経上皮細胞の形質に止まって，ニューロブラストおよびニューロンは誕生しなかった。この結果は，大脳皮質に最初のニューロンが現われる前後の時期においては，神経上皮細胞自身の増殖と分化能が細胞－細胞間の相互作用ならびに神経管に発現する様々な分泌性シグナル分子によって調節されていることを示唆している。

今回の実験によって，哺乳類の中枢神経系におけるニューロンとグリア細胞の発生機構を検索できる in vitro の実験系を確立することができた。現在，この実験系を用いて，各種の分化誘導因子，ショウジョウバエで見い出された proneural 遺伝子，neurogenic 遺伝子，あるいは GCM

遺伝子等の相同分子等々の作用の解析が行われている。

16. 新しい生体分子センサーの開発

森井　孝（京都大・化学研究所）
森　泰生，井本敬二（生理研）

研究目的：脳に発現する分子は数多く同定されているが，それらの機能を検討するための技術は非常に限られている。本研究では，これらの細胞内メッセンジャー動態を生体内で解析することを目的として，特定の細胞内メッセンジャーに選択的に結合し，なおかつ光学的な手法で定量測定することが可能な分子センサーの設計と合成を行う。
研究結果：細胞内メッセンジャーとしてホスファチジルイノシトール(PI)に注目し，PIに特異的に結合するリセプターペプチドを設計した。リセプターペプチドはIP3との複合体の解離定数がナノモル濃度であることが知られているホスフォリパーゼCのPHドメインをもとにして設計した。ラットの脳に存在するホスフォリパーゼCをクローニングし，そのうちPHドメインを構成する139アミノ酸部位を発現ベクターに組み込んだ。このベクターを大腸菌中で発現させ，陽イオン交換クロマトグラフィーおよび逆相HPLCにより，目的とするペプチドを得た。このペプチド中にはシステインが2残基含まれているため，これらのシステインをセリンに変異させたPHドメインを作製した。今後，これをもとにして，PHドメイン中のIP3結合部位周辺に新たにシステインを導入し，このシステインをダンシル基やフルオレセインにより修飾することにより，目的とする分子センサーを合成する。

17. Fyn欠失マウスのエタノール感受性

二木宏明，宮川　剛（理研・脳科学・情動機構）

本研究の目的は，まず，行動実験で立直り反射の消失時間，体温低下，活動量の変化等を指標として，fyn欠失マウスのアルコール感受性の亢進を確認し，次に，行動実験で明らかになったアルコール感受性の亢進の生化学的なcorrelatesを調べ，さらに電気生理学的なcorrelatesをSlice preparationで調べることである。

ホモfyn欠失マウスでは，立直り反射の消失時間を指標としたアルコール感受性が，対照群のヘテロfyn欠失マウスよりも亢進していることが明らかとなった。しかし，コントロールとしてベンゾジアゼピンの一種であるフルラゼパムを投与した場合についても調べたところ，フルラゼ

パムにたいする感受性では差が見られなかった。このように，ホモ fyn 欠失マウスにおける立直り反射の消失時間の延長効果はアルコールに特異的であった。なお，実験群と対照群で血中のエタノールの濃度を測定し，両群間で差がないことも確認できた。

行動実験で明らかになったアルコール感受性の亢進の生化学的な correlates を調べるべく，チロシンリン酸化されたタンパク質に特異的に結合する抗体を用いて，Western blottting 法により脳内のチロシンリン酸化されたタンパク量を調べたところ，ホモ fyn 欠失マウスでは，対照群で見られるようなアルコール投与による 180-kD タンパクのチロシンリン酸化の up-regulation が見られないことが明らかとなった。次に，免疫沈降法により，ホモ fyn 欠失マウスで異常が見出された 180-kD タンパクが，NMDA 受容体サブユニット NR2B であることも同定できた。

さらに，スライス実験から，エタノールに対する Acute tolerance がホモ fyn 欠失マウスでは見られないことが見出された。

以上の成果は，1997年10月24日発刊の SCIENCE 誌上に，掲載された。

本年度発表論文

Miyakawa, T, Yagi, T., Kitazawa, H, Yasuda, M., Kawai, N, Tsuboi, K and Niki, H. Fyn-kinase as a determinant of ethanol sensitivity: Relation to NMDA receptorfunction. Science 278: 698-701, 1997.

18. 味細胞苦味応答電流に対する細胞内二次伝達物質の影響

恒成　隆（慶應義塾大・医・生理）
金子章道（生理研）

ウシガエル単離味細胞では，苦味物質である塩酸キニーネの刺激により陽イオン性膜電流が生じることが既に明らかとなっている。苦味情報変換においては環状ヌクレオチドなどの細胞内二次伝達物質の濃度変化により味細胞が脱分極するとの仮説があるが，苦味刺激による電気的応答と細胞内二次伝達物質の関係については不明な点が多い。そこで本研究ではキニーネ応答電流の活性化における環状ヌクレオチドの関与について検討した。まず細胞内に二次伝達物質が存在しない条件でのキニーネ応答電流生成の可能性を検討するために，細胞内側の溶液に ATP および GTP を一切添加していない条件で，ウシガエル単離味細胞のアウトサイドアウトパッチ膜標本にキニーネ刺激をおこなったところ，キニーネ刺激に伴ってチャネルの開閉現象が観察された。このチャネル電流を解析した結果，イオン選択性および単一チャネルコンダクタンスの値は，全細胞においてキニーネが活性化するコンダクタンスのイオン選択性および応答電流のノイズ解析によって得られた単一チャネルコンダクタンスの値とそれぞれほぼ一致した。この結果から環状

ヌクレオチドなどの二次伝達物質の存在は，キニーネで活性化する陽イオンチャネルの活性化には必須ではなく，苦味物質刺激が直接陽イオンチャネルを活性化している可能性が示唆された。

また，味細胞に細胞内環状ヌクレオチドによって閉じられるイオンチャネルがあり，苦味刺激時に環状ヌクレオチド濃度が減少し，応答電流が生じるとの仮説があることから，ケージドcAMPまたはケージドcGMPをパッチピペット溶液内に添加した状態で全細胞膜電流を測定し，キニーネ刺激中に光フラッシュを与え生じた細胞内環状ヌクレオチドの作用を調べた。その結果5mMキニーネ刺激による応答電流は環状ヌクレオチドによって部分的に抑制されたが，2.5mMキニーネ刺激による応答では逆に増強され，キニーネ濃度によって環状ヌクレオチドの作用が異なる傾向が認められた。この結果は環状ヌクレオチドによってイオンチャネルが直接抑制されるとの単純な機構では説明できず，上述のアウトサイドアウトパッチ膜での結果と合わせて考えると，苦味受容細胞はキニーネによって直接活性化されるチャネルを持ち，細胞内環状ヌクレオチドはこのチャネルを調節している可能性があると考えられた。

19. 脳高次機能と運動制御

南部　篤（東京都神経研）
稲瀬正彦（電総研）
森　茂美，松山清治，中隣克己（生理研）

歩行運動の研究は，除脳したネコをフレームに固定しトレッドミル上を歩かせ，中脳を中心とした歩行中枢を調べるという，すでに完成された方法によることが多い。しかし，1）ヒトを特徴づけている二足歩行のメカニズム，2）大脳皮質，大脳基底核などより高次の中枢による歩行制御，などの研究をするためには，新たな方法の確立が必要である。森らは，すでに覚醒下のニホンザルを非拘束下で二足歩行をさせるモデルを完成させ，歩行の運動解析を行っている。一方，南部らは覚醒下のサルの一次運動野，補足運動野をはじめとする大脳皮質運動関連領野，大脳基底核などを電気生理学的手法によりマッピングするという方法を用いて実験を行ってきた。本共同研究は，これら2つの研究方法をあわせることにより，歩行運動，とくに二足歩行の大脳皮質，大脳基底核などによる制御のメカニズムを明らかにしようというものである。

本年度は，二足歩行を十分訓練したニホンザルの一次運動野，一次体性感覚野，補足運動野，運動前野などの下肢の領域を皮質内微少電気刺激，感覚入力などを手がかりに電気生理学的に同定した。その後，補足運動野の下肢領域に，GABAアゴニストであるムシモルをハミルトンシリンジを用いて微量注入し，この領域を一時的にブロックすることを試みた。実験の回数がまだ多くないので確かなことは言えないが，補足運動野下肢領域のブロックでは，麻痺は生じないが，二足歩行が拙劣になる傾向があった。

今後は，1）補足運動野ブロックの実験を継続すると同時に，他の高次運動領野（とくに運動前野など）のブロックも行う，2）大脳皮質運動関連領野，大脳基底核から歩行運動時の単一ニューロン活動の記録を行う，などを計画している。

20. 神経標識法を用いた Motor neuron degeneration (Mnd) マウス発育に伴う神経変性過程の研究

山内理充，永田　豊（藤田保衛生大・医・生理）
松山清治，森　茂美（生理研）

筋萎縮性側索硬化症 (ALS) は，脊髄前角にある運動神経細胞体が選択的に変性・脱落し，やがて死亡する疾患である。現在 ALS の原因，治療法などの研究は行われているが，死亡した患者の脊髄標本を集めることが難しいなどの問題もあり決め手となるものは見つけられていない。そのため我々は ALS と同様に徐々に下肢の麻痺症状から進行し，ほぼ10ヶ月で死亡するモデル動物（Motor neuron degeneration: Mnd マウス）を用いて，主として生化学的研究を行ってきた。そして，発育に伴い Mnd マウス脊髄内で，タンパク分子の架橋反応を促進し，細胞死においても活性化が認められる Ca^{2+} 依存性トランスグルタミナーゼ活性の上昇を認めた。また，グリア線維性酸性タンパク (GFAP) の増加，および GFAP 分子の断片化も認め，報告してきた。今回は神経標識法を用いて，この Mnd マウスの発育に伴い，どの筋肉を支配している神経から変性・脱落が始まるかを検索するため実験を行った。

方法

1　HRP 注入および標本作製

Mnd マウスをケタラール (0.5ml ip.) 麻酔下に，大腿部皮膚を切開し，大腿四頭筋を露出させた。そこに HRP （グレードⅢ　30％生理食塩水溶液）10μl をマイクロシリンジで 1μl ずつ注入し，麻酔から覚まし24時間飼育した。翌日，ケタラール麻酔下に開腹し，流速 4ml/min で潅流固定（脱血：0.01M PBS　10分，固定：4％パラホルムアルデヒド20分，ポンプを止めて30分放置，10％シュクロース10分，すべての操作は氷上で行った。）を行い，脊髄を摘出後，クリオスタットにて厚さ 50μm で薄切した。

2　組織化学染色

組織切片を浮遊法を用いて，テトラメチルベンチジン (TMB) を含む溶液中で20分反応させ，0.3%H_2O_2 を 2ml 加えてさらに20分間暗室で反応，0.01M 酢酸緩衝液で 5 分間 3 回洗浄後，標本をプレパラートに並べ，ニュートラルレッドで対比染色を行った。

結果

HRP 注入 1 日後の Mnd マウス脊髄前角で，TMB 陽性の像を確認することができた。今回は神

経標識法の手技を習得し，また，HRP がマウスにおいて大腿四頭筋より逆行性軸索輸送で脊髄までの時間（1日）の確認も行うことができた。今後，Mnd マウスの交配・繁殖を行い，各発育期における変動について検討を行いたい。

21. サルのセントラルパターンジェネレータの作動様式

山口峻司，伊藤啓一，目黒直哉（山形大・工）
関　和彦（国際武道大）
松山清治，森　茂美（生理研）

霊長類を含む四足動物の歩行運動のリズミックな筋活動は脊髄固有の神経回路，Central Pattern Generator (CPG) により形成される。この中枢プログラムはリーチングなどの運動においても重要なサブシステムとして機能している可能性がある。しかし，CPG のニューロン構成は不明な部分が多い。本研究は，サルの CPG を解明し，ひいてはヒトの二足歩行，上肢のリーチング運動の理解を目標とする。このために我々は以下の実験計画を立てた。（1）ネコ前肢・後肢の CPG ニューロンのデータベースを作成しサルの実験に備える。（2）（1）において典型的な CPG ニューロンについては細胞内染色法により細胞構築をも明らかにする。（3）急性実験動物としてサルを入手できしだい CPG 介在ニューロンを検索し，サルの CPG のニューロン構成を解析する。本年度は計画（1），（2）に従って実験した。

除脳・非動化ネコの上部頚髄側索を頬回刺激し Fictive Locomotion を誘発した。この Fictive Locomotion の神経発射には，頚髄側索刺激による寡シナプス性興奮が含まれていた。この寡シナプス経路はリズム形成に関与していると考えられ，その介在ニューロンを検索し，Neurobiotin の細胞内染色を試みた。予備実験として8頭のネコを用い，側索ー運動ニューロン寡シナプス経路のニューロンを探索した。その結果，歩行周期に同期してリズミックな活動を示す136ヶのニューロンの中で40ヶのニューロンが頚髄側索刺激に応答した。それらは頚髄膨大部 (C5-C8) の脊髄灰白質腹側部（Rexed の Ⅶ層腹側）に分布していた。4頭のネコで生理学的に同定したニューロンに Neurobiotin を電気泳動的に細胞内注入し単一ニューロンの染色を試みた。8ヶのニューロンに色素注入し2ヶのニューロンで軸索の分布様式を明らかにした。今後さらにこの様な生理学的にも形態学的にも同定されたニューロンの数を増やすことによって CPG の細胞構築と作動様式が明らかになると考えている。

22. 神経伝達物質受容体の局所神経回路における発現様式の電気生理学的分子生物学的解析

板澤俊一，小澤瀞司（群馬大・医）
遠藤利朗，伊佐　正（生理研）

中枢神経系における主要な興奮性伝達物質であるグルタミン酸のイオン透過型受容体の中でも特に速いシナプス伝達に関与することが知られている AMPA 型受容体には，機能的に異なる 2 種類のものがあることが知られている。そのうちⅠ型と呼ばれるものは弱い外向き整流特性を示し，カルシウム透過性はきわめて低いのに対し，Ⅱ型と呼ばれるものは顕著な内向き整流性を示し，高いカルシウム透過性を持つ。そのほかにⅠ型とⅡ型の受容体が混在するような中間型のニューロンも数多く存在する。本年度の共同研究で，ラット大脳皮質のスライスにおいてⅡ/Ⅲ層の非錐体型ニューロンの多くが中間型の性質を示し，それらのニューロンに誘発される興奮性シナプス電流も中間型の特性を示し，Ⅱ型受容体の選択的ブロッカーである spermine によって部分的に抑制されることが明らかになった。さらに一部の上丘浅層ニューロンにおいても興奮性シナプス電流の AMPA 成分が内向き整流特性を示すことも明らかになり，Ⅱ型の AMPA 受容体が海馬以外の様々な部位においても発現していることが明らかになった。

23. aganglionosis rat の腸管における神経成長因子の発現の検討

河谷正仁，佐藤智哉，今泉　満，仁村俊枝（秋田大・医）
尾崎　毅（生理研）

すでに報告されているようにこの腸管の狭窄部には，腸管を拡張させる伝達物質の一つである一酸化窒素含有神経細胞が欠落している[1)]。また，遠心性神経細胞の欠落だけでなく，求心性の神経繊維そのものが分布していないことも明らかとなった[2)]。これまでの研究で，狭窄部分には神経支配を目的とする自律神経繊維が分布しなかったと予測される。今回は，この原因が，神経成長していく時期に臓器側から放出される成長因子（神経成長因子，NGF）が欠損しているためなのか否かについて検討した。

日齢20－24の aganglionosis rat 5 匹（平均体重；27.5g）と，同腹で生まれた健常 rat 5 匹（平均体重 39.4g）を用いた。ネンブタール (40-50mg/kg) の腹腔内投与により全身麻酔を行い開腹した。全消化管を摘出し，十二指腸・小腸正常部・小腸膨大部・大腸狭窄部の各部に分割し，直ちに部位ごとに湿重量を測定した。各臓器は液体窒素により直ちに凍結し，保存した。凍結腸管は湿重量の10倍量のトリス緩衝液を加えて，ホモジナイズし，さらに 3 倍量のトリス緩衝液を加

えた後，10万Gで30分間遠心した。遠心後の上清を用いて，NGFの定量をtwo-site enzyme immunoassay (EIA)法により測定した。抗体にはBoehringer Mannheim Biochemicals社製の抗NGFモノクローナル抗体を用いた。

健常ratでは，十二指腸18.2pg/mg protein，小腸健常部20.8，小腸膨大部14.5，大腸（狭窄部）16.4であった。この値はWistar系の成熟ratに比べて30－40％高かった。aganglionosis ratにおいては十二指腸12.3pg/mg protein，小腸健常部16.7，小腸膨大部14.2，大腸（狭窄部）15.2であった。NGFの値はaganglionosis ratの異常腸管においても正常値と有意差のある結果は見いだせなかった。従って，aganglionosis ratでは中枢側からの神経の成長機構に問題があったと考えられた。

1）鈴木　誠，河谷正仁，尾崎　毅，岡松孝男(1996)先天性aganglionosis ratにおけるNADPHの分布　日小外会誌32: 17-22

2）渡会　有，岡松孝男，福岡大太郎，尾崎毅，河谷正仁(1995)先天性aganglionosis ratにおけるc-fosを用いた知覚機能の検討　昭医会誌55: 314-318

24. 行動制御の基盤となる中枢神経回路の解析

山本　優，武市雅俊（京都大・理）
伊佐　正（生理研）

ある特定の神経回路が動物の行動制御にどのような意味を持つかを明らかにする研究パラダイムを確立する目的で，今回は特に上丘中間層に入力するアセチルコリン作動性線維の機能に注目した。まずこの線維の起始核を調べるためにラット上丘にrhodamineでラベルされた逆行性標識用の蛍光ビーズを注入し，数日後に灌流固定して，choline acetyltransferase (ChAT)との2重標識を行ったところ，両側の脚橋被蓋核(PPN)に多くの2重標識されるニューロンが見いだされ，PPNが起始核であることが明らかになった。現在サルでも同様な手法で起始核の同定を行っている。そしてサルの上丘にアセチルコリンのアゴニストであるニコチン1-10mMを1-2ml注入すると視野周辺に呈示した視覚対象に対して70－80ミリ秒という極めて短い反応時間でおきるexpress saccadeの頻度が著明に増加したことから，このアセチルコリン作動性線維がサッケード運動のinitiationを促進し得ることが明らかになった。さらにサルで視覚刺激に対するサッケード運動課題を遂行中のPPNのニューロン活動を記録したところ，注視点の消灯後，目標が点灯するまでのギャップ期間中にそれまでに注視点に集中していた空間的注意が周辺に拡散する過程に対応して活動を増加させるニューロンが存在することが明らかになった。このことからPPNから上丘に至るアセチルコリン作動性経路は空間的注意の動きに伴って眼球のサッケード運動の開始を調節することに関与する可能性が示唆された。

25. 蛍光測定による聴覚中枢活動の観察

橋本　亨（東京医歯大・医用研）
山岸俊一（生理研）

膜電位感受性蛍光色素を用いて，モルモットの聴覚中枢電気活動を可視画像化し，蛍光発光の空間パターンを測定することにより，聴覚中枢の機能的構成を解明した。

ネンブタール麻酔，人工呼吸した実験動物の大脳皮質聴覚野を直視下に置き，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。Xe ランプのパルス発光を聴覚野に照射し，この励起光 (480 ～ 546 nm) により発生する蛍光発光 (620 ～ 1,000 nm) を，落射蛍光実体顕微鏡と冷却 CCD カメラ（浜松フォトニクス）により観測する。観測された蛍光発光のうち，中枢電気活動に関係なく発生している背景画像を画像の減算により差し引きすると，中枢電気活動の空間パターンを光学的に記録することができる。音刺激に対応

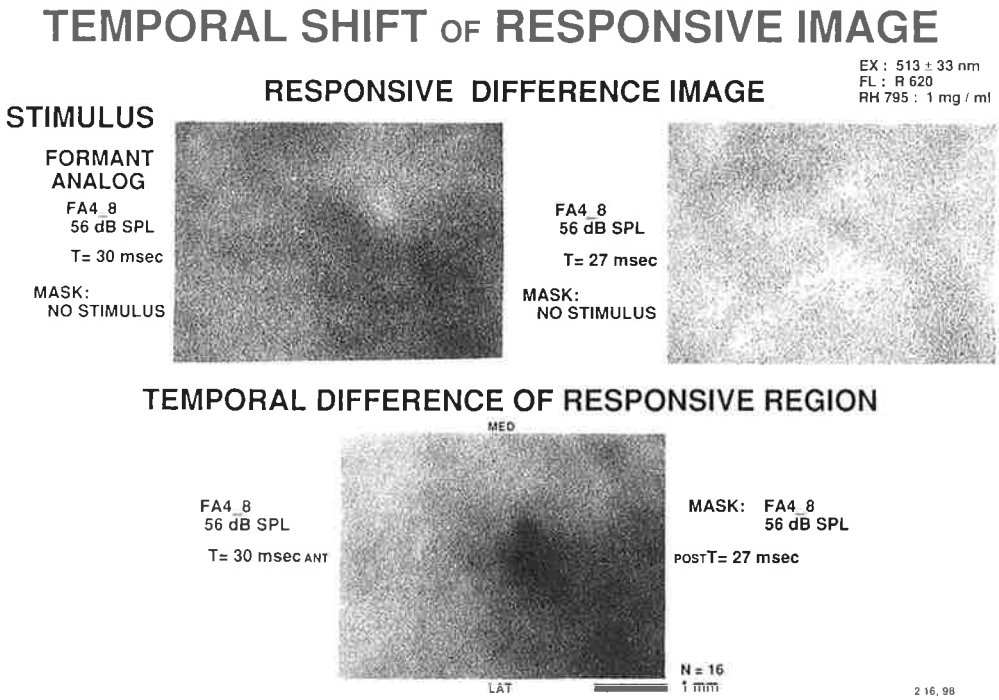


図１．調波構造を備えたモルモットの鳴き声を模擬した音刺激によって聴覚中枢に誘起される蛍光発光の空間パターンとその時間的推移。
上段左の画像は，刺激開始後の潜時： 30ms において観察される蛍光発光の空間パターンを示す。
上段右の画像は，潜時： 27ms において見られる蛍光発光の空間パターンを示す。
下段の画像は，左上の画像から右上の画像を差し引いた差分画像で，潜時の差： 3ms の間に起こった中枢活動の推移を画像化したものである（16回加算）。

して発生する聴覚中枢電気活動の時間的・空間的変化を，蛍光発光の瞬時パターンの時系列としてとらえた。

図1に，調波構造を備えたモルモットの鳴き声を模擬した音刺激によって聴覚中枢に誘起される蛍光発光の時間的変化を示す。下段の画像は，刺激開始後の潜時：30msにおいて観察される蛍光発光（左上）から潜時：27msにおいて見られる蛍光発光（右上）を差し引いた差分画像で，3msの間に起こった中枢活動の推移を画像化したものである。図の中央部に黒く見える領域は蛍光発光の増加が発生していることを示している。

図2には，下段にモルモットの鳴き声（調波構造を備えたもの，56 dB SPL）に対応して，上段に模擬音によって，聴覚中枢に誘起される蛍光発光の時間的変化を示す。左の画像は，潜時：30msにおける蛍光発光と潜時：27msにみられる蛍光発光を差し引きした差分画像である。中央部に蛍光発光の増加を示す空間パターンが見られる。右の画像は，潜時：40msにおいて観察される蛍光発光と潜時：30msにおいて見られる蛍光発光の差分画像を示す。上段，下段を比較

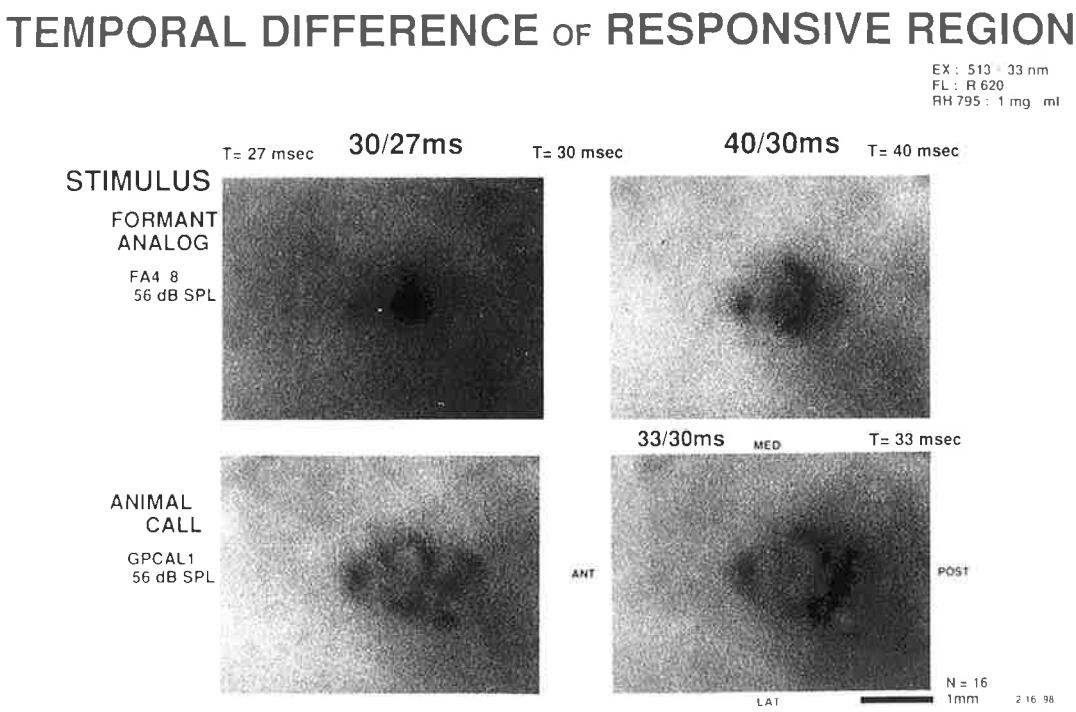


図2．下段にモルモットの鳴き声（調波構造を備えたもの，56 dB SPL）に対応して，上段に模擬音によって，聴覚中枢に誘起される蛍光発光の時間的変化を示す。
左の画像は，潜時：30msにおける蛍光発光と潜時：27msにみられる蛍光発光を差し引きした差分画像である。中央部に蛍光発光の増加を示す空間パターンが見られる。
右の画像は，潜時：40msにおいて観察される蛍光発光と潜時：30msにおいて見られる蛍光発光の差分画像を示す。

すると，音刺激の違いにより蛍光発光の変化の空間パターンが異なることがわかる。刺激開始から画像観測を行うまでの時間を順次変えていくと，それぞれの潜時に対応した応答画像が得られ，中枢活動の時間経過を観察することができる。

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。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。

Toru Hashimoto and Shun-ichi Yamagishi
Key Words: Optical Imaging, Auditory Cortical Response, Columnar Structure.

26. 各種上皮細胞における細胞内カルシウム動態の画像解析

佐藤洋一（岩手医大・解剖）
山本正夫（広島大・医・解剖）
浅田尚登（北海道教育大旭川校）
菅野富夫（北海道大・大学院比較形態機能・生理）
宮崎俊一，毛利達磨（生理研）

顕微測光画像解析システム (ARGUS50/CA, Nikon RCM8000) にて，各種伝達物質や薬物が上皮組織の細胞に与える効果を検討した。

胃腸管上皮に関して：マウス腸管上皮単離標本の周囲を ATP を含む液で灌流すると，$[Ca^{2+}]_i$ の上昇が観察された。遠位部回腸では，その上昇が上端（絨毛境界部）から生じたのに対し，近位十二指腸では陰窩中央部～下端から $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が起きた。その上昇は，上部から底部に向って伝播しており，オクタノールによる gap junction 抑制で，その伝播は消失した。この ATP による反応は P2 受容体拮抗物質により抑えられ，しかもアデノシンでは反応が起きなかったことから，この反応が P2 受容体を介すると判定された。更にサブタイプを検討したところ，UTP によりわずかに反応が惹起され，一方 αβ methylene-ATP は殆ど効果を表さなかったことから，P2Y が主たる受容体と思われた。非特異的な Ca^{2+} チャネルブロッカーで細胞外からの Ca^{2+} 流入を抑えても ATP による反応が引き起こされたことから，消化管上皮の P2受容体は細胞内 Ca^{2+} 貯蔵場からの Ca^{2+} の動員と連関していると結論できた。今のところ反応性における部位差が，いったいどのような意義を有するか，わかっていない。また十二指腸腺で見られた $[Ca^{2+}]_i$ の律動的変動は，オクタノールで減弱したことから，その発生には何らかの細胞間の情報交換が関与しているかも知れない。腸管以外の上皮組織：ラット前立腺ではカテコールアミンの他に，一部の平滑筋細胞はサブスタンスＰにも反応することが確かめられた。一方，腺細胞の $[Ca^{2+}]_i$

の上昇を惹起する伝達物質は同定できなかった。ウサギ角膜上皮では，ATP により角膜中間層で律動的な変動が引き起こされたが，表層や基底層の細胞における $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は持続的であった。培養水晶体上皮細胞では，全て一様に見える細胞であるにもかかわらず，反応性にばらつきがあり，カルバコールやエンドセリンに対して反応する細胞は一部に限られていた。けれども ATP に対しては殆ど全ての細胞で $[Ca^{2+}]_i$ が上昇した。

結論：上皮細胞は分化過程で，その機能が様々に変容していく。それと同時に形態も変わり，また細胞内情報伝達系の仕組みも変化していく。これまでの細胞生物学における研究で軽視されてきた細胞内情報伝達系のメタモルフォーゼは，組織形態を保ったままの標本を用いて画像解析することにより，明瞭になっていくと期待される。

【 計画共同研究報告 】

計画共同研究報告

〔目　　次〕

1．ドレブリンA欠失マウスを用いた中枢シナプス可塑性の研究（白尾智明他）
…… 178
2．Chimeric mice to map inducible gene expression in the brain （Saffen. D 他）
…… 179
3．fyn 遺伝子欠損マウスを用いた情動神経回路の機能解剖学的研究
（湯浅茂樹他） …… 180
4．グルタミン酸受容体欠損マウスの作成と機能解析（崎村建司他） …… 181
5．脳部位特異的標的遺伝子組換え法によるシナプス可塑性分子の
生理機能解析（森　　寿他） …… 182

1．ドレブリンA欠失マウスを用いた中枢シナプス可塑性の研究

木村光宏，関野祐子，平井里香，白尾智明（群馬大・医・行動分析）
児島伸彦，小幡邦彦（生理研）

ドレブリンはアクチンに結合して細胞骨格を変化させ，細胞の形態変化を誘導する。従って中枢神経細胞シナプス後部に局在しているドレブリンAは，シナプスの可塑的変化に付随して起こる細胞骨格の変化に関与している可能性が高い。また最近C末端部分にSH3ドメインを持ったドレブリンも見つかってきており，ドレブリンファミリーが細胞内情報伝達のアクチンフィラメント上の受け皿となっている可能性が示唆された。

本研究は標的組み換え法あるいは遺伝子導入法によりドレブリンEとAあるいはドレブリンAのみを欠失するマウスおよび，ドレブリンEあるいはA発現トランスジェニックマウスを作製し，これらのマウスを用いてドレブリンの役割を解明することを目的とする。

（1）ドレブリン遺伝子の構造解析

昨年度までの研究でその構造がほぼ明らかとなっていた，ドレブリン遺伝子クローンDmg14の5‘端をプローブとして，新たに全長約14kbのクローンDmg308を得た。Dmg308はDmg14より5’端に約6.4kb先までのびていた。現在その全遺伝子配列を決定中である。

（2）トランスジェニックマウスの作製

ラットドレブリンEおよびAのcDNAをCaMKIIのプロモーターを持つ発現ベクターに組み込んだ。次にこのベクターを用いて，トランスジェニックマウスを作製した。組み込まれた遺伝子の発現はノーザンブロッティング及びin situ hybridizationにより確認した。ドレブリンA発現トランスジェニックマウスでは，導入したドレブリンの発現は少量であり，ドレブリン抗体による染色では過剰発現は確認できなかったが，シナプトフィジン染色で，シナプスに異常があることが示唆された。またニッスル染色により，海馬CA1領域のピラミダール細胞に，ピクノーシスが観察された。

（3）ドレブリンノックアウトマウス作成用のターゲッティングベクターの作製

ドレブリンのnull mutantを作製するために，ドレブリンの第二エクソンをネオマイシン耐性遺伝子に置き換えたターゲッティングベクターを作成中である。

（4）ドレブリンA欠失ノックアウトマウスの作製

昨年度までの研究において作製済みのドレブリンA欠失ノックアウトマウス作製用のターゲッティングベクターを，エレクトロポレーション法によりES細胞に導入し，G418添加培地中で培養し，複数のコロニーを得た。現在サザンブロッティングにより，予定通りの遺伝子組み換えが起きているかどうかを解析中である。

2. Chimeric mice to map inducible gene expression in the brain

David Saffen and Julie Geng
Department of Neurochemistry, Faculty of Medicine, Tokyo University

The purpose of the proposed research is to create chimeric mice that will allow inducible gene expression in the brain to be visualized. This will be accomplished by using homologous recombination to place a beta-galactosidase reporter gene under the control of the endogenous promoter of the zif268 gene. The zif268 gene encodes a transcription factor that is rapidly induced in neurons of the cerebral cortex and hippocampus following activation of NMDA receptors. Zif268 gene induction is also closely correlated with the induction of long-term potentiation of synaptic transmission in the hippocampus, suggesting that zif268 may be a marker for neuronal plasticity. Mice that allow zif268 gene expression to be visualized may thus allow the mapping of neuronal networks that play role in learning and memory.

We have constructed a targeting vector designed to place beta-galactosidase under the control of the endogenous zif268 promoter. DNA sequences from the endogenous zif268 gene were subcloned from a recombinant lambda phage containing an approximately 14 kb insert that includes the zif268 structural gene and flanking sequences. This lambda phage was isolated from a TT2 embryonic cell genomic library (provided by Dr. T. Yagi) using mouse zif268 cDNA as a probe. The structures of the 5' and 3' flanking regions were determined by restriction enzyme analysis in combination with southern blotting. Based upon these results, a strategy was developed for constructing a targeting vector using plasmids containing the neo-gal cassette [pKJ2(X +)Neo + pact-betagal(Xho I-BamH I fragment)] and the diphtheria toxin gene(pMC1DTpA), provided by Drs. K. Obata and T. Yagi. The final targeting vector contains approximately 2 kb of zif268 5' sequences and 5 kb of zif268 3' sequences flanking the beta-galactosidase and neomycin resistance genes, which are followed by the diphtheria toxin gene.

This targeting vector was introduced into TT2 embryonic stem cells by electroporation, and approximately 100 independent neomycin-resistent sublines that had stably acquired the neomycin resistance gene were isolated. Screening the DNA of these sublines by PCR analysis revealed that the targeting vector had become integrated into the chromosome at the zif268 locus in three of the sublines, presumably be homologous recombination. Further analysis of genomic DNA isolated from these cells southern blotting, however, revealed that only one of the three sublines had acquired the beta-galactosidase gene. This subline line (# 90) was selected for further analysis and for injection into mouse blastocysts for the production of chimeric mice. We hope to obtain chimeric mice for analysis this summer.

3．fyn 遺伝子欠損マウスを用いた情動神経回路の機能解剖学的研究

湯浅茂樹，服部功太郎（千葉大・医）
八木　健（生理研）

1．Fyn 欠損マウスの神経構築異常

正常成体マウス前脳において Fyn は扁桃体，梨状葉，海馬，帯状回，大脳新皮質に強く発現し，免疫電顕的には細胞質，樹状突起とともに，postsynaptic density (PSD) に高濃度に局在していた。Fyn 欠損成体マウスにおいては，海馬，梨状葉，大脳新皮質，嗅球，扁桃体の層構造あるいは神経核構築の異常が認められた。海馬歯状回では calbindin 陽性ニューロンの一部が層構造からはずれて異所性に分布し，アンモン角では calbindin 陽性錐体細胞の配列が乱れて層構造が広がっていた。扁桃体皮質核および梨状葉ニューロンの層状構造の形成不全も認められた。大脳新皮質においてはⅡ～Ⅲ層の calbindin 陽性ニューロンの位置異常が認められ，深層へ異所性に分布していた。また，calcium/calmodulin-dependent protein kinase Ⅱ免疫陽性錐体細胞の特定のサブセットの位置異常もみとめられ，第Ⅲ層錐体細胞が減少していた。これと関連して脳梁，前交連の低形成も見い出された。さらに，嗅球では顆粒層内の calretinin 陽性ニューロンの減少が認められた。

2．Fyn 欠損マウス情動神経回路の機能異常

Fyn 欠損マウスの情動神経回路は，正常マウスと比較してどのように異なった興奮パターンを示すのであろうか。最終目標は情動学習における神経細胞の興奮パターンを比較することであるが，まず，どのような神経細胞群が易興奮性を示すかを単純な条件で比較検討した。痙攣閾値以下の量の N-methyl-D-aspartate (NMDA) を投与すると，Fyn 欠損マウスではコントロールと比較して扁桃体，梨状葉，視床下部で c-Fos 免疫陽性ニューロンの数が著明に増加することが明らかになった。この c-Fos 発現は NMDA の antagonist の同時投与により部分的に抑制される。扁桃体の亜核内における c-Fos 免疫陽性ニューロンの分布について検討すると，Fyn 欠損マウスでは内側核，皮質核での c-Fos 陽性ニューロン数の増加が著明で，中心核ではコントロールと有意な差はなく，外側核，基底外側核ではむしろ減少する傾向が認められた。情動表出系である視床下部へ投射する扁桃体内側核群で NMDA 刺激に対する興奮性が亢進し，快・不快の価値判断の結果を認知する大脳皮質への投射系である外側核群の興奮性はむしろ低下しているという所見は，Fyn 欠損マウスの示す過度の恐怖反応，嗅覚刺激に対する異常興奮性のような情動障害とよく対応している。

現時点では Fyn 欠損マウス扁桃体で c-Fos を発現したニューロンが投射ニューロンか介在性ニューロンであるか，あるいは扁桃体と視床下部，大脳皮質との結合関係が正常なパターンを維持しているか，また NMDA 受容体の分布ならびに活性に関してコントロールと差があるか否かという重要な問題は未解決である。正常成体マウスでは Fyn は PSD に局在して NMDA 受容体 ε2 subunit をリン酸化して受容体活性を調節すると考えられている。したがって，Fyn 欠損によ

り扁桃体における NMDA 受容体を介するシナプス伝達が影響を受けることが推測される。また，Fyn 欠損マウスは胎生期における神経細胞サブセットの移動障害を示し，神経細胞の相互の位置異常のために回路形成の障害も起こっている可能性がある。

4．グルタミン酸受容体欠損マウスの作成と機能解析

崎村建司（新潟大・脳研・基礎神経科学）
八木　健（生理研）

グルタミン酸受容体のなかで NMDA 型受容体チャネルは，長期増強に代表されるシナプス伝達効率の変化や，発生期におけるシナプスの構築や安定化に深く関与することが示唆されている。我々は NMDA 受容体チャネルが生体ではたす役割を解明する目的で，この受容体チャネルの機能的多様性を決定する 4 種類の ε サブユニットを欠損したマウスの作成と解析を進めてきた。小脳顆粒細胞に強く発現する ε3 サブユニットを欠損したマウスの解析の結果，この変異による著明な変化は認められなかった。しかし，ε1 および ε3 サブユニット両者を欠損したマウスでは，弱い運動障害が認められた。このことは，NMDA 受容体チャネルがある種の運動制御に関与している可能性を示唆する。また，発生の過程で強い発現がある ε4 サブユニットを欠損したマウスでは，音刺激による驚愕反射が増大していることが明らかになり，このサブユニットが神経の回路形成に何らかの影響を与えていることが示唆された。

4 種類の ε サブユニットを欠損したマウスのうち，ε2 サブユニット欠損個体は，哺乳反射が消失しておりミルクが飲めないために生後24時間以内に死亡する。そのため，このサブユニットが成体で果たす役割を解析することができない。そこで，成体でのみ ε2 サブユニットを欠失するマウスの作成を試みた。この目的のために，発達初期より発現し，生後その発現が減少する ε4 サブユニット遺伝子プロモーターを利用し，ε2 サブユニットを発現させるマウスの作成をおこなった。この遺伝子導入マウスと ε2 サブユニットノックアウトマウスとをかけ合わせることにより新生児期致死を回避させようと計画した。ε4 サブユニット mRNA の 3' 非翻訳領域に IRES (Internal Ribosome Entry Site) と ε2 サブユニットの cDNA をつなぎ発現させるために，ε4 サブユニット遺伝子座に相同組換えによって IRES と ε2 サブユニットの cDNA を導入したマウスを作成した。ヘテロにこの変異遺伝子を持つマウスでは，ε4-ε2 融合 mRNA が野生型 ε4 サブユニット mRNA と同程度発現していたが，融合 mRNA からの ε2 サブユニットの翻訳効率は低く，ε2 サブユニットを欠損するマウスの新生仔死を回避することはできなかった。これは，IRES を介するタンパク合成の効率が低いためだと思われる。

5．脳部位特異的標的遺伝子組換え法によるシナプス可塑性分子の生理機能解析

森　　寿（東京大・医学系研究科・薬理・分子神経生物）
八木　健（生理研）

研究目的：我々は成体でのシナプス可塑性が記憶・学習に直接関与するのか検証する目的で，ノックアウトマウスを作成し解析を行ってきた。その結果，シナプス可塑性に関与すると考えられる分子が，発達期における神経回路形成にも関わることが，明らかになった。すなわち，これらのノックアウトマウスは神経回路網形成に障害を示したり，重篤な場合は致死であり，成体での解析が不可能であった。従って，本研究では従来のノックアウト法を発展・改良し，脳内部位を特定した遺伝子ノックアウト法を実現させ，脳高次機能の分子機構を解析することを目的とした。

方法：特定する脳内部位として，記憶・学習に関与する前脳に焦点をあて，ES 細胞を用いた標的遺伝子組換え法により，終脳領域に特異的に発現する細胞接着分子テレンセファリン遺伝子に遺伝子組換え酵素 Cre をノックイン法により導入する。一方，同様に ES 細胞を用いた標的遺伝子組換え法により，NMDA 受容体 ζ1 サブユニットに Cre の認識配列 loxP を導入する。これら２系統の ES 細胞からマウスを作成し，掛け合わせにより両組換え遺伝子をもつマウスを作成し，終脳特異的に NMDA 受容体を欠損させシナプス可塑性と記憶・学習を解析する。

成果：テレンセファリン遺伝子に Cre をノックインした ES 細胞が複数得られた。これらのうち１系統で生殖系列伝達を示すマウスが得られた。このマウスを Cre 活性により lacZ 遺伝子を発現するレポーターマウスと掛け合わせたところ，Cre 活性が検出され，Cre が脳内で十分機能していることが明らかとなった。しかしながらその発現は全脳領域に及んでいた。一方，NMDA 受容体 ζ1 サブユニットに Cre の認識配列 loxP を導入した ES 細胞も複数得られ，キメラマウスの作成を試みている。

考察，展望：テレンセファリン遺伝子に Cre をノックインしたマウスは，成体の全脳領域で Cre を発現していることから，さらに発生期での Cre の発現部位，時期を検討する。また，このマウスは掛け合わせによりホモ個体にすれば，テレンセファリンのノックアウトマウスであるので，テレンセファリンの生理機能を個体レベルにおいて解析する。一方，NMDA 受容体 ζ1 サブユニットに Cre の認識配列 loxP を導入した ES 細胞からは引き続きキメラマウスの作成を試みる。

【 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．マイクロイメージング法による脳機能画像法 (fMRI) の基礎的研究と神経回路形成過程の三次元構成に関する研究（荻野孝史他） …… 186
2．MRI による内耳病変の検出（肥塚　泉他） …… 187
3．超高速磁気共鳴画像法の生体応用（森本武利他） …… 189
4．磁気共鳴イメージングによる門脈－肝臓領域 Na 受容機構の中枢投射の同定（森田啓之他） …… 193
5．超高速磁気共鳴画像法による消化管運動の研究（成瀬　達他） …… 194
6．MRI によるラット脊髄圧迫の研究（松井宜夫他） …… 198
7．小腸における虚血耐性現象の検討－エネルギー代謝からみて－（藤井義敬他） …… 199
8．高次脳機能解明の基礎データとして MRI 計測（三上章允他） …… 200
9．MRI によるサル側頭葉の観察と微小電極定位への利用（藤田一郎他） 201
10．MRI によるサル視覚皮質の観察と電極定位（小松英彦他） …… 202
11．サル大脳皮質の定位的脳地図の作成と記録への応用（酒田英夫他） …… 203
第18回磁気共鳴装置共同利用実験ワークショップ（代表者：永山國昭） …… 206
（1998．3.12）

磁気共鳴装置室

【概要】

磁気共鳴画像装置 (MRI & MRS) は，磁気共鳴という非常に小さいエネルキー現象を利用し生きた状態で，組織構築を破壊することなく，断層画像・燐化合物量など多種多様の情報を観測するために導入された。1988年度は装置の立ち上げ，1989年度には公募共同利用研究を開始した。1997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及びエネルギー状態の連続観察，の研究テーマのもとに11課題（採択共同実験者数59名）が採択され実施された。1997年1月～12月の磁気共鳴画像装置の利用状況の内訳は，共同利用実験等43日，修理調整等27日，利用率13％であった。

1994年生理学研究所に導入されたリアルタイム磁気共鳴画像解折装置は，マウスからイヌまでの実験動物を用い，磁気共鳴画像を毎秒30枚の速度で測定・記録し，高速で磁気共鳴画像を再構築できる。1994年度は本装置の立ちあげを進め，1995年度より「超高速磁気共鳴画像法の生体応用」のテーマで共同研究をくみ，1）体液の流体力学の解折，2）消化管運動の非破壊的動作解折などを進める為の実験システムの開発・予備実験を行なった。1996年3月リアルタイム画像解析用多核種 MRI 探査器が生理学研究所に導入され，MRI データを高速高画質で NTSC フオーマットに変換することが可能になった。

磁気共鳴装置室では共同利用実験計画の援助の一環として磁気共鳴装置共同利用ワークショップを行った．第18回ワークショップとして1998年3月12日に開催し，1997年度及び1998年度共同利用実験研究者（所外19名，所内5名）を対象として，1997年度の利用報告，共同利用のガイダンス，今後の装置改善等について打ち合せが行われた。

また，2月28日～3月8日 Radostin Danev (Sofia Univ.) を招聘し，共同研究を実施した。

1．マイクロイメージング法による脳機能画像（fMRI）法の基礎的研究と神経回路形成過程の三次元的構成に関する研究

荻野孝史，中村　俊（国立精神神経センター神経研）
瀬尾芳輝（京都府立医大）
永山國昭，村上政隆，大河原浩（生理研）
松永　是（東京農工大）

本研究は，Bruker BIOSPEC 4.7 Tesla 動物用 MR 装置を用いて，1）脳機能の空間的時間的発展を可視化，画像化することを可能とする高空間分解能，高速マイクロイメージング脳機能画像法を開発し，脳機能の無侵襲的解析を行う。合わせて fMRI 信号変化の機構を明かにする。2）

開発した高空間分解能マイクロイメージング法を用い，神経回路を形成しつつある神経細胞の移動を無侵襲的かつ三次元的に観察する技術を開発し，神経回路形成過程を可視化，画像化することを目的とした。

平成９年度は，共同利用実験の初年度であるために方法論の確立に重点を置き，以下の成果を得た。

１）動物実験法の確立：NMR 法を用いたラット脳の脳機能研究に不可欠な NMR プローブ内非磁性動物脳定位固定装置の作製及び麻酔法を確立した。

２）RF 検出コイル・プローブの作成：Bruker BIOSPEC 4.7 Tesla MR 装置の高感度化の基幹となるラット大脳皮質用および脳深部用の高感度 RF 検出コイルの回路設計，制作を行い，ラット脳の面内分解機能40－80um の高空間分解能 MRI 画像を高感度で得た。

３）高分解能マイクロイメージング，神経繊維走行，組織構築の画像化：
Stimulated Echo パルス系列に拡散磁場勾配パルスを加えた拡散測定用パルス系列を作成し，脳組織内の水分子の異方的拡散を画像化することにより緩和時間強調画像では得ることが不可能なラット脳の神経繊維の走行の可視化や組織の構築の詳細な高分解能画像を得た。

４）脳機能 MRI 画像，fMRI 実験：ラット足の電気刺激により生じる大脳皮質における MRI 信号変化をグラディエントエコー法で測定した。得られた時系列画像データを相関解析した結果，刺激対側の前頭葉の体性感覚野に対応した部位に高信号の賦活領域を見いだし，その脳機能マッピングを作成した。

５）脳室潅流実験：ラットを用いて脳室潅流モデルを作成した。陽性造影剤，GdDTPA を側脳室に注入し，脳脊髄液の潅流過程の時間変化を画像化した。本モデルの成功は，磁気プローブで標識された神経上皮細胞を成体ラットの脳室に注入し細胞の異動を観察する研究目的の２の実験を可能にした。

６）超高速撮像法，EPI 法：fMRI 測定法の定番である超高速撮像法のグラディエントエコー型およびスピンエコー型の EPI パルス系列を作成した。同時サンプリング法のみならずシークエンシャルサンプリング法にも対応する EPI 画像処理プログラムを作成した。これらにより Nyquist ghost のない4.7テスラ高磁場 EPI 画像を得ることが出来た。

２．MRI による内耳病変の検出

肥塚　泉，宮本康裕，大塚崇志（聖マリアンナ医大）
瀬尾　律（電子技術総合研究所）
尾崎　毅，村上政隆（生理研）

実験目的

メニエール病の本態は内リンパ水腫と言われている。これを直接証明するには，蝸牛内に存在

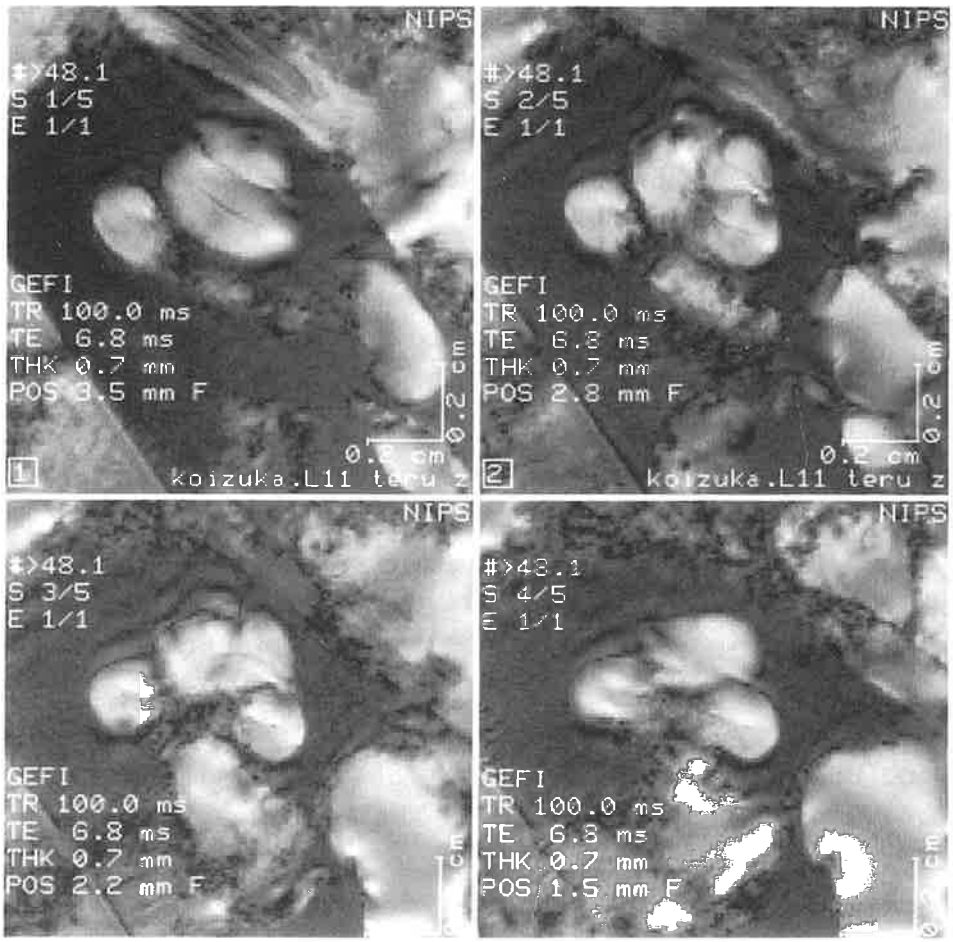


図1　正常ヒト側頭骨標本のMRI画像
蝸牛基底回転，第2回転，頂回転の基底板が良好に描出されている。

する，ライスネル膜（厚さ約10～20m）と呼ばれる薄い膜を描出することが必須である。我々はこれまで，人側頭骨標本，健康成人ボランティアを対象としてMRIによる内耳微細構造の撮影を行ってきた。これら両者について，蝸牛基底板，半規管クプラなどの画像化に成功した[1)]。また最近，静磁場強度7.05TのNMR microscopy (AMX-300wb)を用いてモルモット摘出内耳のライスネル膜の描出に成功した[2)]。しかしながら人側頭骨標本を対象とした撮影については，今現在，満足な結果が得られていない。今年度は静磁場強度4.7TのBiospecを用いて人側頭骨標本のライスネル膜の描出を試みた。

対象および方法

実験には正常ヒト側頭骨標本を用いた。スロットレゾネーターコイルを用いて，2次元および3次元MRI撮影を行った。撮影にはBruker社のBiospec (4.7T)を用いた。パルスシーケンスは

Gradient Echo (GE) を用いた。各パラメータは次の通りである。repetition time (TR) は150.0msec, echo time (TE) は 6.8msec, スライス厚は 1.0mm, 撮影マトリックスは128×128あるいは256×256, field of view (FOV) は 4.0cm, 加算回数は 2 回とした。画像データの処理には NIH イメージを用いた。

結果及び考察

図 1 に本装置を用いて撮影した正常ヒト側頭骨標本の MRI 画像を示す。蝸牛内微細構造については，基底回転，第 2 回転，頂回転の，それぞれの基底板についてはこれまで通り，比較的良好に描出することが可能であった。しかしながら，今回の主目的であるライスネル膜については描出が困難であった。ライスネル膜はそのほとんどが，一層の細胞で構成されている。つまりこれ自体を描出することが可能な空間および組織分解能を，現在の設定のままで得ることは困難と思われる。今後さらに撮影シーケンスについて改良を加え，更なる高分解能を得ることが，ライスネル膜描出の重要なキーポイントになると思われる。

参考文献

1）Koizuka I, Seo R, Sano M, Matsunaga T, Murakami M, Seo Y, Watari H. High-resolution magnetic resonance imaging of the human temporal bone. ORL 53: 357-361, 1991

2）Koizuka I, Seo Y, Murakami M, Seo R, Kato I. Micro-magnetic resonance imaging of the inner ear in the guinea pig. NMR in Biomedicine 10: 31-34, 1997

3．超高速磁気共鳴画像法の生体応用

瀬尾芳輝，鷹股　亮，日下義章，森本武利（京都府医大・第一生理・整形外科）
Gil Navon （Tel-Aviv University）
村上政隆，永山國昭（生理研）

本実験は，リアルタイム磁気共鳴画像解析装置を用い，生理活動に伴う代謝・拡散・血流・動き等のパラメータを測定し，画像化する新しい生理機能画像法を開発することを目的とした。平成 9 年度は以下の成果を得た。

1）ラット脳測定用の表面コイルの作成し，面内分解能 80um の画像の測定を行った。また，拡散測定用パルスシーケンスの作成を行い，脳内神経繊維の走行を可視化することができた。

2）ラットを用い，脳室潅流モデルを作成し，脳室内の脳脊髄液の潅流状態を画像化することに成功した。側脳室に注入された GdDTPA は，約15分間で小脳テント部に表れた。また，脈絡叢血管内への GdDTPA の取り込みがないことを確認した。

3）関節軟骨荷重試験モデルを用い，組織内の水の拡散や流れおよび組織全体の応力変形を経時的に測定した。荷重時に椎間板軟骨髄核部の，T1 緩和時間が延長し拡散係数も大きくなり，荷

重時に水分画の増加が生じることを明らかにした。また，繊維輪の応力変形の測定結果より，有限要素法による応力解析を行いつつある。

4）組織内の「結合水」の画像化を目的とし，アキレス腱・末梢神経・ラット尾部組織において，二量子磁気共鳴法により画像化の基礎実験を行い，腱組織・筋組織・末梢神経組織内の結合水を弁別することができた。

装置の保守管理状態が劣悪であり，装置の故障の診断・修理に多くの時間を費やした。共同利用研究者に不必要な負担を強いないためにも，保守管理体制を改善し，共同利用実験の研究支援体制を強化する必要がある。

業績

【原著】

1．Shinar H, Seo Y & Navon G.
Discrimination between the different compartments in sciatic nerve by 2H double-quantum-filtered NMR. J Magn Reson 129: 98-104, 1997.

【学会発表】

「国際シンポジウム（含・招待講演）」

1．（講演）Seo Y, Morita H, Shinar H & Navon G.
Diffusion of water in rat sciatic nerve measured by 1H PFG NMR and 2H DQF PFG NMR.
Advanced NMR Techniques in the Study of Ordered Biological Tissues and Elastomers by Research Workshop of the Israel Science Foundation, 1997.6.16-6.19.（Tel-Aviv, Israel）Abstract p.121-124.

2．（講演）Seo Y, Takamiya H, Ishikawa H, Nakashima T, Sharf Y & Navon G.
NMR imaging of rigid biological tissues.
4th International Conference on Magnetic Resonance Microscopy, 1997.9.21-9.25. (Albuquerque, USA) Abstract p.22.

3．（講演）Seo Y.
NMR microimaging of biological tissues
1st Taiwan-Japan NMR Symposium. 1997.11.24-11.25. (Tsing Hua, 台湾) Abstract p.5, 1997

「国際学会（一般発表，等）」

1．（発表）Sharf Y, Seo Y, Eliav U, Akselrod A & Navon G.
2H double-quantum-filtered MRI of strain exerted on the blood vessel wall.
5th Scientific Meeting and Exhibition of International Society of Magnetic Resonance in Medicine. 1997.4.12-4.18 (Vancouver, Canada)

2．（発表）Sharf Y, Seo Y, Eliav U, Akselrod A & Navon G.

2H double-quantum-filtered MRI: A novel tool for mapping order in biological tissues.
5th Scientific Meeting and Exhibition of International Society of Magnetic Resonance in Medicine. 1997.4.12-4.18 (Vancouver, Canada)

3．（発表）Seo Y & Murakami M.
NMR study of salivary glands: from energy metaboilsm to morphology.
2nd International Symposium on Salivary glands in Honor of Niccolo' Stenone. 1997.5.23-5.25. (Cagliari, Italy) Abstract p.50

4．（発表）Steward MC, Seo Y & Murakami M.
Diffusion and exchange of intracellular water in salivary acinar cells.
2nd International Symposium on Salivary glands in Honor of Niccolo' Stenone. 1997.5.23-5.25. (Cagliari, Italy) Abstract p.37

5．（発表）Sharf Y, Seo Y, Eliav U, Akselrod A & Navon G.
2H double-quantum-filtered MRI of strain exerted on the blood vessel wall.
Advanced NMR Techniques in the Study of Ordered Biological Tissues and Elastomers by Research Workshop of the Israel Science Foundation, 1997.6.16-6.19. (Tel-Aviv, Israel) Abstract p.125-130.

6．（発表）Shinar H, Seo Y & Navon G.
2H double quantum filtered NMR study of water compartmentation in rat sciatic nerve.
Advanced NMR Techniques in the Study of Ordered Biological Tissues and Elastomers by Research Workshop of the Israel Science Foundation, 1997.6.16-6.19. (Tel-Aviv, Israel) Abstract p.131-137.

7．（発表）Uemura O, Kusaka Y, Nakajima S, Hirasawa Y & Seo Y.
Topographical difference and anisotropy of water diffusion in normal intervertebral disc before and during axial load.
Advanced NMR Techniques in the Study of Ordered Biological Tissues and Elastomers by Research Workshop of the Israel Science Foundation, 1997.6.16-6.19. (Tel-Aviv, Israel) Abstract p.145.

8．（発表）Navon G. Sharf Y. Eliav U & Seo Y
Histology and strai images of blood vessel walls using 2H double quantum-filtered MRI.
4th International Conference on Magnetic Resonance Microscopy, 1997.9.21-9.25. (Albuquerque, USA) Abstract p.21.

9．（発表）Takamiya H, Kusaka Y, Seo Y, Morimoto T, Hirasawa Y.
MR image of cortical bone using constant-time-imaging method.
4th International Conference on Magnetic Resonance Microscopy, 1997.9.21-9.25. (Albuquerque, USA) Abstract p.77.

10. (発表) Navon G, Shinar H & Seo Y.
Diffusion studies using double quantum filtered NMR.
Abstracts Book of Probing into Restricted Geometries by CAS Workshop of the University of New Mexico, 1997.9.26-9.27 (Albuquerque, USA) Abstract p.13.

1. (プロシーディングス) Sharf Y, Seo Y, Eliav U, Akselrod A & Navon G.
2H double-quantum-filtered MRI of strain exerted on the blood vessel wall.
Proceedings of the International Society of Magnetic Resonance in Meditvine 5th Scientific Meeting and Exhibition, p.303, 1997
2. (プロシーディングス) Sharf Y, Seo Y, Eliav U, Akselrod A & Navon G.
2H double-quantum-filtered MRI: A novel tool for mapping order in biological tissues.
Proceedings of the International Society of Magnetic Resonance in Meditvine 5th Scientific Meeting and Exhibition, p.1449, 1997

「国内学会 (一般発表)」
1. (発表) 瀬尾芳輝, Hadassah Shinar
ラット座骨神経水分子環境の H-2 DQF NMR を用いた解析
第74回日本生理学会大会, 1997.3.26-3.28 (浜松)
2. (発表) 瀬尾芳輝, Shinar H,Sharf Y, Navon G.
H-2 二量子フィルター NMR によるラット座骨神経内の水分子の測定
25回日本磁気共鳴医学会大会, 1997.9.3-9.5 (大宮)
3. (発表) 瀬尾芳輝, Shinar H,Navon G.
H-2 DQF NMR によるラット座骨神経内の水分画の解析
日本生物物理学会第35回年会, 1997.10.10-10.12 (京都)
4. (発表) 瀬尾芳輝, 高宮尚武, Shinar H, Sharf Y, Navon G.
家兎アキレス腱の H-2 DQF Spectroscopic Imaging
第36回 NMR 討論会, 1997.10.29-10.31 (東京) 抄録集 p.79-81

1. (プロシーディングス) Seo Y & Shinar H.
Analysis of water in rat sciatic nerve: A H-2 DQF NMR study.
Jpn J Phisol 47 (Suppl): S22, 1997.
2. (プロシーディングス) 瀬尾芳輝, Shinar H, Sharf Y, Navon G.
H-2 二量子フィルター NMR によるラット座骨神経内の水分子の測定
Jpn J Magn Reso Med 17 (Suppl) 123, 1997

1. Uemura, O., Kusaka, Y., Mikami, Y., Hase, H., Morimoto, T., Hirasawa, Y., Water retention in the loaded human intervertebral disc and its corr elation with deformation of end-plate. 43nd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (San Francisco, USA) (1997)
Trans. of the Orthopaedic Research Society, 22: 122 (1997)
2. Kusaka, Y., Uemura, O., Nakajima, S., Seo, Y., Hase, H., Hirasawa, Y. The effect of annulus fibrosus perforation on the water kinetics and viscoelasticity of the loaded intervertebral disc. 43nd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (San Francisco, USA) (1997)
抄録 Trans. of the Orthopaedic Research Society, 22: 391 (1997)
4. 植村　理，日下義章，三上靖夫，平澤泰介，圧迫により生ずるヒト椎間板終板の粘弾性変形が椎間板の水の動態に与える影響，第12回日本整形外科基礎学術集会（新潟）(1997)
抄録　日本整形外科学会誌，71: S1337 (1997)
5. 高宮尚武，日下義章，瀬尾芳輝，野口昌彦，森本武利，平澤泰介，アキレス腱における H1-NMR 緩和時間の異方性の解析－ MRI によるコラーゲン線維配向の定量化のための基礎実験，第12回日本整形外科基礎学術集会（新潟）
抄録　日本整形外科学会誌，71: S1622 (1997)
6. 中島慎一郎，日下義章，植村　理，青芝秀幸，長谷　斉，瀬尾芳輝，村上政隆，平澤泰介，椎間板内における水の動態が椎間板内部のひずみに与える影響，第12回日本整形外科基礎学術集会（新潟）(1997)
抄録　日本整形外科学会誌，71: S1668 (1997)
7. 青芝秀幸，日下義章，中島慎一郎，植村　理，茶谷賢一，瀬尾芳輝，村上政隆，平澤泰介，屈曲位の荷重負荷が椎間板内部のひずみと水の移動に与える影響，第12回日本整形外科基礎学術集会（新潟）(1997)
抄録　日本整形外科学会誌，71: S1669 (1997)

4．磁気共鳴イメージングによる門脈－肝臓領域 Na 受容機構の中枢投射の同定

森田啓之，萩池昌信，山口　修（岐阜大・医・第一生理）
村上　宏（香川医大・第二生理）
瀬尾芳輝（京都府医大・第一生理）
荻野孝史（東京都精神神経研）
村上政隆（生理研）

【目的】

本研究の目的は，内臓受容器からの中枢投射を，ニューロン活動の興奮に伴う血流増加として

MRI 画像上に捉えることである。内臓受容器の刺激として，門脈－肝臓領域の Na 受容機構刺激を用いた。

【対象と方法】

全ての実験は，Wistar 系雄ラット（体重 350 ～ 450g）を用い，α-クロラロース麻酔下にてアクリル製頭部固定器に固定して行った。O_2, CO_2, N_2O の混合ガスにて人工呼吸し，$PaCO_2$ は 35 ～ 45mmHg に保った。肝門脈カテーテルから 0.75M の NaCl 溶液を 0.05 ml/min, 下大静脈カテーテルから蒸留水を 0.2 ml/min のスピードで10分間同時投与した。磁気共鳴施設の ABX Biospec 47/40 （Bruker 社，4.7T）を用い，投与前，投与中，投与終了後と連続して，グラディエントエコー画像を以下の撮影条件にて撮影した：視野 20 × 20mm, データ画素数 64 × 64, スライス厚 750μ, Bregma を中心に前後に10スライス，パルスの繰り返し時間 300ms, エコー時間 16ms。合計39枚の画像（1 ～11投与前，12～18投与中，19～39投与終了後）から，投与前の平均値を求め，各画像から平均値をサブトラクトした。画像変化の有意性は t-test により行った。

【結果と考察】

我々は，Fos タンパクの免疫染色を用いた実験により，paraventricular hypothalamic nu, supraoptic nu, subfornical organ 等が肝門脈内高張 NaCl 溶液投与に応答し，活動が増加することを確かめている。しかし，今回の実験ではこれらの領域に MRI 画像上有意な血流増加を確認できなかった。この理由として，解像度が充分でなかったことが考えられる (1 pixel = 313 μm)。今後，データ画素数を 256 × 256 として，解像度をあげる予定である。今回の実験で有意に血流が増加した部位は，側脳室の脈絡叢のみであった。この脈絡叢血流増加の生理学的意義についても確かめていく必要がある。

参考文献

Morita H, Yamashita Y, Nishida Y, Tokuda M, Hatase O, Hosomi H: Fos induction in rat brain neurons following stimulation of the hepatoportal Na-sensitive mechanism. American Journal of Physiology, 272: R913-R923, 1997.

5．超高速磁気共鳴画像法による消化管運動の研究

成瀬　達，関　泰長，中江康之，石黒　洋，北川元二，早川哲夫（名古屋大・医・第二内科）
瀬尾芳輝（京都府医大・第一生理）
村上正隆，佐治俊幸，小木曽昇，廣江　猛，尾崎　毅（生理研）

【目的】私共は先年度までの共同研究により，食道のように速い消化管運動（伝播速度 10 cm/s）を Snapshot 法により記録する方法を確立した。この計測で生体における消化管運動の記録として 3 画像／秒の速度と世界記録を達成することができた[1)]。胃は食道と異なり，食物を一時貯留

し，小腸に数時間かけてゆっくり排出する機能を有する。この食物の胃からの排出は，約3回／分の頻度で前庭部に発生する伝播性の律動運動によって行われる。従って，胃運動をMRIを用いて観察をするためには，高速かつ長時間記録が必要である。従来の撮像法では，長時間撮像を行うと情報量が多くなりコンピュータ上のメモリーが飽和してしまう欠点がある。そこで，本年度は得られた画像情報を逐次画像再構成してビデオテープに記録する高速MRビデオ法による胃

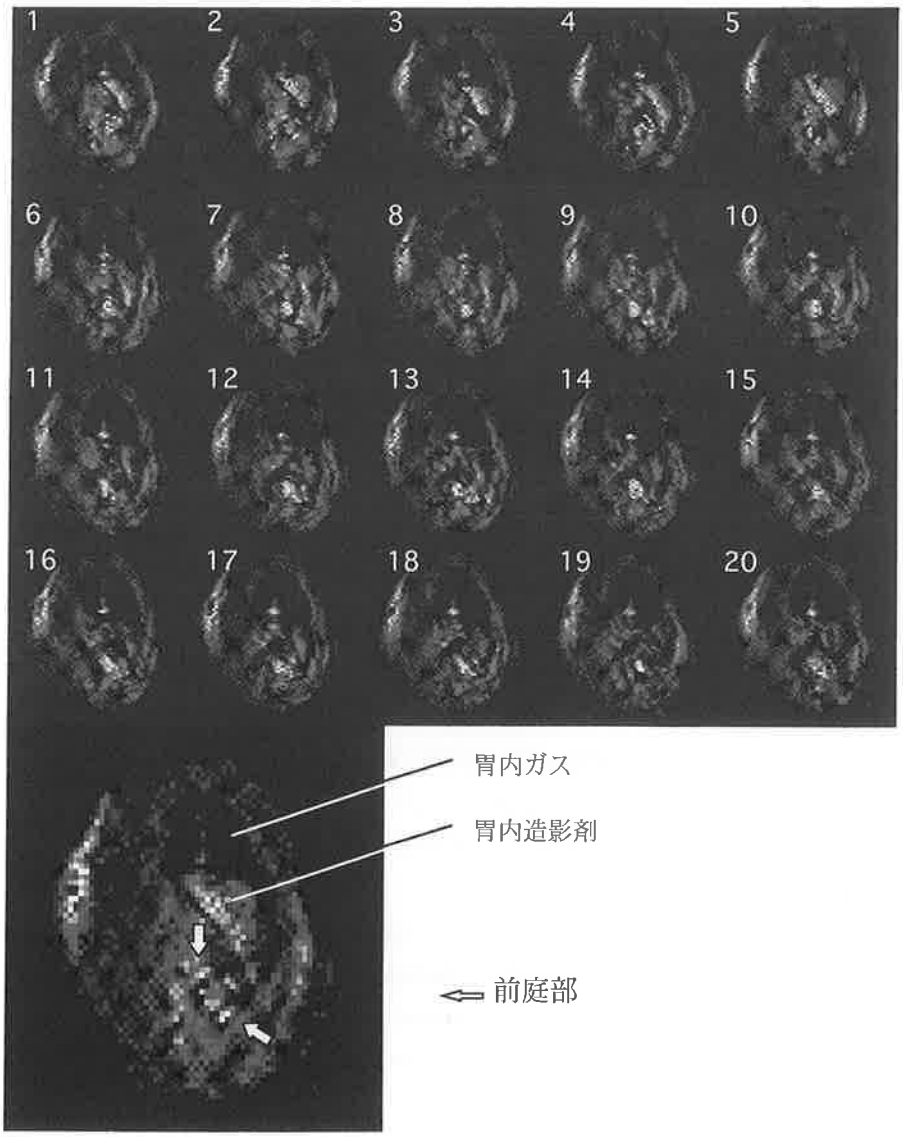


図1　高速MRビデオ法による胃運動の記録
（横断像：128×128，撮像間隔0.45秒）

運動の記録を試みた。

【方法】体重 10 kg のビーグル犬を用いた。ペントバルビタール麻酔下に，経口的にシリコンチューブを胃内に挿入し，クエン酸アンモニウム鉄溶液を 200 ml 注入すると同時に撮像を開始した。測定には Biospec 47/40 （Bruker, 4.7T, 磁石内口径 400 mm, 内径 250 mm の能動遮蔽型勾配磁場コイル使用）とリアルタイム MR イメージ再構築システム (real-time MR imaging reconstruction system; FDLLC,Arizona) を用い，以下の条件で連続的に画像を再構築し，ビデオテープに記録した。

Snapshot 法，field of view 30 cm, matrix 128 × 128, slice thickness 10 mm,
TR 3.4 msec, TE 1.8 msec, coronal scan (single-slice)

また，１週間の期間をおいた後，従来の画像記録システム１）を用いて同様の撮像を行った。

【結果】高速 MR ビデオ法を用いて，胃運動を 0.45 sec/1 slice で20分間連続撮像することが可能であった。胃の収縮輪は１分間に約１回の割合で胃体部で発生し，これが幽門部へ移動してゆく運動を描出することができた（図１）。しかし，高速 MR ビデオ法を用いて得た画像を従来の画像記録システムを用いて得た連続画像（図２）と比較すると，画質の低下，ROI の狭小化，画像の上下反転などの問題点があった。

【考察】近年，生体の速い変化を MRI で観察するリアルタイム MRI 法の進歩には著しいものがある。しかし，これまでの方法はすべての撮像を終えてから情報を画像として再構築している点で“リアルタイム”とは言い難い。高速 MR ビデオ法は，MR 画像を逐次再構築してビデオ表示できる点でリアルタイム MRI と呼ぶにふさわしいシステムである。今回の実験では20分間で計測を止めたが，記録時間はビデオシステムの限界まで延長可能であり，従来のシステムに比べて測定時間が飛躍的に延びた。しかし，画質の低下，ROI の狭小化，画像の上下反転などの問題点があることが判明した。ROI の狭小化，画像の上下反転は,，リアルタイム MR イメージ再構築システムのソフトを改良することにより解決可能である。一方，画質の低下は，ビデオテープに画像情報を記録するときに起こる情報の劣化が原因であると推定され，今後の検討課題である。

【結論】高速 MRI 法と MR ビデオ法を併用することにより，長時間にわたるリアルタイム MRI が可能であり，本法を用いて胃の収縮運動と胃排出を同時に計測する道が開かれた。

文献

１．Seki Y, Naruse S, Seo Y, Murakami M, Ozaki T, Kitagawa M, Ishiguro H, Nakae Y, Hayakawa T. Fast MR imaging of esophageal motility. Spatially Resolved Magnetic Resonance: Methods and Applications in Materials Science, Agriculture and Biomedicine, edited by B. Blumich, P. Blumler, R. Botto, and E. Fukushima., Spinger-Verlag, in press.

高速 MR ビデオを用いた胃運動測定の試み
第83回日本消化器病学会総会（1997年４月17日：名古屋国際会議場，名古屋）
——日本消化器病学会誌第94巻臨時増刊号（第83回総会）212

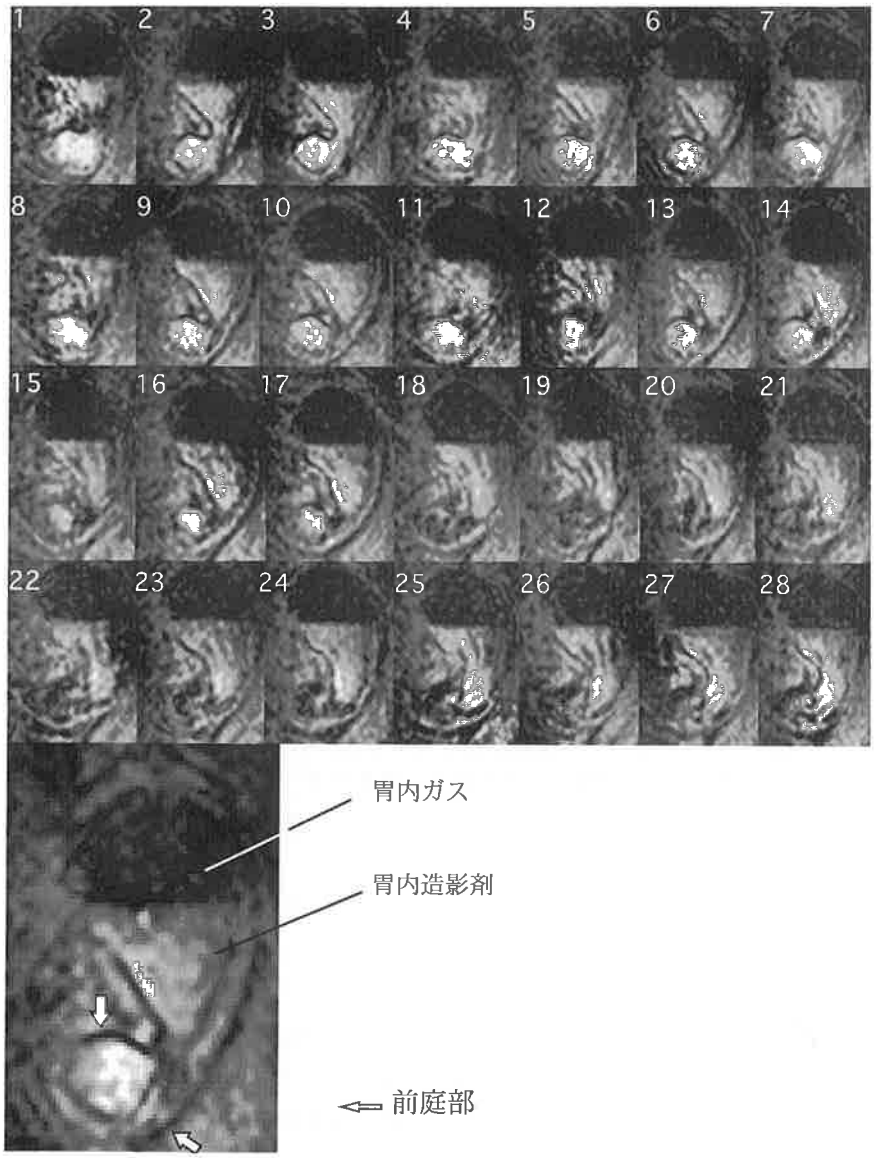


図2　従来の画像記録システムによる胃運動の記録
（横断像：128×128，撮像間隔0.45秒）

第94回日本内科学会講演会（1997年4月25日：ホテルニューオオタニ，大阪）

——日本内科学会雑誌（第94回講演会抄録）207

Analysis of esophageal motility by fast MR imaging

4th International Conference on Magnetic Resonance Microscopy

(October 22, 1997. Sheraton hotel Albuquerque New Mexico USA)

固形食の胃排出－インピーダンストモグラフィー(EIT)法とMRI法の比較
第3回胃運動機能検査法の確立と診断，治療への応用研究会
(1997年10月31日：都久志会館大ホール　福岡)
――日本消化器病学会誌第94巻臨時増刊号（第39回大会）434

Analysis of esophageal motility using SNAPshot imaging.
1st Taiwan-Japan NMR Symposium. 1997.11.24-11.25.
(National Tsing Hua University, Tsing Hua, Taiwan: 新竹清華大学・新竹市・台湾)
―― Abstract p.52, 1997

Fast MR imaging of esophageal motility
―― Spatially Resolved Magnetic Resonance: Methods and Applications in Materials Science, Agriculture and Biomedicine, edited by B. Blumich, P. Blumler, R. Botto, and E. Fukushima.
Seki Y, Naruse S, Seo Y, Murakami M, Ozaki T, Kitagawa M, Ishiguro H, Nakae Y, Hayakawa T
1998年8月出版予定。出版社： Spinger-Verlag

6．MRIによるラット脊髄圧迫の研究

福岡宗良，大塚隆信，柴山元英，松井宣夫（名古屋市大・医・整形外科）
村上政隆，尾崎　毅（生理研）

【目的】動物モデルを用いて脊髄圧迫疾患の病態を明らかにする。また，損傷した脊髄に対して脊髄移植を試み，MRIで評価する。
【対象と方法】7週令雄ラットの脊髄後方圧迫モデルを使って，脊髄の圧迫形態と輝度変化についてMRIで観察した。MRI撮像はspin echo法を用い，T1強調像(TR500ms/TE30ms)，T2強調像(TR2000ms/TE80ms)で脊髄矢状断像と横断像を撮影し，矢状断像から脊髄圧迫率を求めた。最終観察後屠殺し，脊髄の病理標本を作製した。後肢の麻痺は6段階で評価した。術後8週間以上観察できた57匹のうち，grade 1以上の麻痺を認めた46匹を対象とし，MRIでの脊髄の輝度変化と麻痺の重症度や回復の程度，病理組織所見について検討した。また，10週令雌ラットの胸髄または腰髄の右半分を切除し，胎生ラットの脊髄を移植後，移植部の状態をMRIで観察した。
【結果と考察】後方圧迫モデルでの後肢の麻痺は圧迫率51～60％以上で出現し，術後1週前後に最も顕著となり，その後徐々に改善した。圧迫率で70％前後が，麻痺が残存するか否かの境界であった。最終観察時のMRIでの輝度変化は脊髄の圧迫がより高度な例に認めた。T1強調横断像で低輝度を呈したものには，脊髄の後方部分に比較的大きな低輝度領域を示す例と圧迫部頭側の横断像で脊髄の中心に点状に低輝度を示す例の二種があった。これまでの研究で，脊髄後方部分

の大きな低輝度領域は，病理組織で後索部分の嚢胞と比較的よく一致していた。脊髄中心に点状の低輝度を示す例については，今回新たに脊髄の矢状断の病理切片も作成し，圧迫部から頭側の脊髄中心管の拡大を表わすことを確認した。T2 強調像高輝度の所見は病理組織で，脊髄の脱髄や小空胞，嚢胞，gliosis などの非可逆性の変化から，可逆性変化である浮腫まで種々の病態を表わしていた。脊髄移植例については，いずれも術後右後枝の麻痺が出現したが，経過とともに麻痺は改善傾向を示した。MRI では移植片が，T2 強調像でほぼ均一に高輝度のものと，不均一に低輝度部分を含むのものとが存在した。また，移植母床と移植片とが密着したものと，一部その間に低輝度領域を挟むものが存在した。

7．小腸における虚血耐性現象の検討—エネルギー代謝からみて—

杉浦正彦，佐藤篤司，桑原義之，藤井義敬（名古屋市大・医・第 2 外科）

脳神経，心血管領域において，一度ストレスを与え生き残った細胞は，二度目のストレス（虚血）に対し耐性を持つという現象が確認されている。さらに，この現象にストレス蛋白 (heat shock protein) の関与が指摘されているがその機序は不明である。また小腸における虚血耐性現象に関しては，組織学的な検討の報告が見られるのみで，エネルギー代謝の面から検討した報告は皆無である。我々は以前より，小腸虚血・再灌流後に起こる障害について ^{31}P-MRS 法を用いてエネルギー代謝の観点から実験を行ってきた。現在のところ虚血再灌流時の小腸組織そのものの障害を評価し得るパラメーターはエネルギー代謝のなかの ATP のみであり，しかも ^{31}P-MRS 法は非侵襲的かつ連続的に ATP を測定できるという大きな利点がある。そこで，小腸における

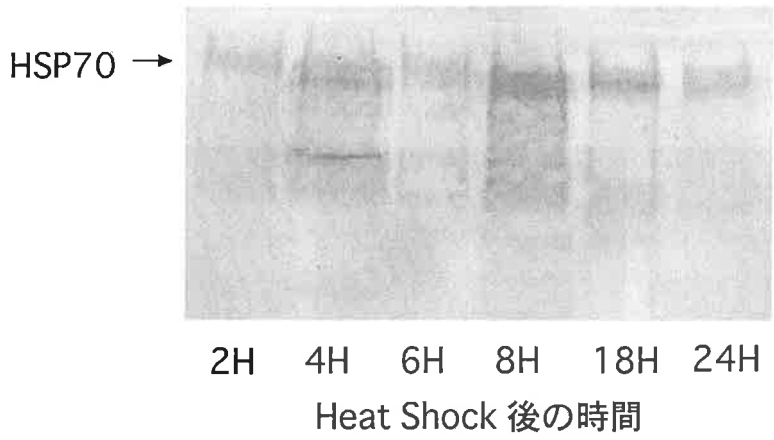


図 1 ：小腸における HSP の発現

虚血耐性現象に対するストレス蛋白の関与を ^{31}P-MRS 法を用いエネルギー代謝の観点から検討することを目的とした。

実験には Wister 系雄性ラットを用い，①対照群と② Preconditioning 群の二群で比較検討することとした。Preconditioning 群は Pentobarbital sodium 12.5mg/kg body weight を腹腔内投与した後，Water bath にて直腸温を42℃に20分間保つ。その後室温に戻し，2時間，4時間，6時間，8時間，18時間，24時間後にそれぞれ小腸組織を摘出し，Western blot anarysis 及び免疫組織染色にて Heat Shock Protein の発現を観察した。その結果，Heat Shock Protein は Preconditioning 後8時間をピークとして発現しており，免疫組織学的には小腸の絨毛先端部の上皮細胞を中心に発現が認められた。

今後はこのモデルを用い，Preconditioninng 後8時間より小腸を虚血・再灌流し，虚血時間60分，再灌流時間180分間のエネルギー代謝を ^{31}P-MRS 法を用い経時的に測定し組織障害の程度を対照群と比較検討する。

8．高次脳機能解明の基礎データとしての MRI 計測

三上章允，櫻井芳雄（京都大・霊長研）
小松英彦（生理研）

サル類の高次脳機能解明の基礎データを得る目的で，アカゲザルの MRI 計測を行った。高次脳機能解明のための組織学的研究における脳内特定領域へのトレーサー注入，学習課題遂行中のニューロン活動解析のための特定領域への電極刺入，PET 計測，これらいずれの場合も実験開始前に脳内構造を正確に把握することが望ましい。特に PET 計測においては，基準となる形態画像なしにデータの解釈は不可能である。図1は，動きの視覚で活動するアカゲザルの脳領域の機能マッピングの結果である。サルが中央の小さなスポットを注視しているときに30％のコヒー



レント・モーション刺激（30%のランダム・ドットが一定方向に動き，70%のランダム・ドットがでたらめな方向に動く）を2秒間呈示する。サルは，ランダム・ドットが消えた後，ドットの動きの方向をその方向への眼球運動で答える。課題遂行中にO^{15}でラベルした水を静注し，PET計測する。図1では，第1次視覚野および視覚前野で強い活動が見られる一方，頭頂連合野，側頭連合野，前頭連合野の活動はわずかであった。ヒトを被験者として行われたPET計測では，従来5mm以上の比較的大きな周波数特性を持つ空間フィルターを用いてデーター処理されてきたが，本データの処理は2mmのフィルターで処理されたものであり，かなりの解像度で活動部位を同定できた。

文献：

1．Mikami, A., Ando, I., Inoue, M., Hasegawa, R., Tsukada, H., Newsome, W.T., and Petersen, S.E., (1997) Functional mapping of the macaque brain during perception of visual motion. Jap. J. Physiol. Sup., 2: S148.

2．Mikami, A., Ando, I., Inoue, M. and Tsukada, H. (1997) Functional mapping of the macaque brain region related to saccade eye movement. Neurosci. Res. Sup. 21: S205.

3．Mikami, A., Ando, I., Inoue, M., Tsukada, H., DeAngelis, G.C., Miezin, F.M., Newsome, W.T. and Petersen, S.E. (1997) PET assesment of brain activation in maqaque monkeys performing a visual direction discrimination task. Neurosci. Abst. 458.

9．MRIによるサル側頭葉の観察と微小電極定位への利用

藤田一郎（大阪大・大学院基礎工学研究科）

サルの側頭葉視覚連合野は，上側頭溝の中のSTS皮質と回部の下側頭葉皮質TE野から成る。上側頭溝は深部において複雑な湾曲を示し，また，TE野には，個体によって走行が異なる後中側頭溝と前中側頭溝がある。視覚生理学的実験のために刺入した微小電極とこれらの溝との相対的位置を，MRIを用いることによって，サルを殺すことなく，実験遂行期間に知ることができる。マーカーを装着したサルの脳のMRI像を撮影し，マーカーからの位置とMRI像を参考に，電極を刺入し，生理学的実験を行う。実験処分，組織学的検索に到ったサルの検討結果では，2mm程度の誤差が出ている。上下方向の誤差については，聴覚反応性細胞の分布から上側頭溝の位置を推定することで，1mm以内の誤差に補正することが可能である。この手法は，長期にわたり1匹の実験動物を用いなくてはならない，訓練ザルを用いた実験において，能率や精度の向上の大きな助けとなる。

この方法を用いて，覚醒サルの下側頭葉皮質細胞から記録を行い，両眼視差を有する図形に対する応答を調べた。解析を行った細胞の約半数が両眼視差に対して感受性を持っていた。その内

の75％は，交差視差を与えた時に反応が増大する near cell か，非交差視差を与えた時に反応が増大する far cell であった。図形の全体にではなく部分に視差をあたえ，一つの図形を複数の面に分離すると（例えば，十字の水平棒の垂直輪郭にのみ視差を与えることで，水平棒と垂直棒を分離すると），一群の細胞は，与えた視差のタイプ（交差視差か非交差視差か）ではなく，知覚される３次元奥行き構造（水平棒が手前に見えるか，奥に見えるか）に相関して，活動を変化させた。下側頭葉皮質は，従来考えられていたように，形，色，テクスチャーなどの２次元図形特徴に反応するだけではなく，網膜２次元情報から３次元奥行き構造を復元する過程に関わっているものと考えられる。

A．論文

(1) Murayama, Y., Fujita, I. and Kato, M. (1997) Contrasting forms of synaptic plasticity in monkey inferotemporal and primary visual cortices. NeuroRep. 8:1503-1502

B．学会抄録

(1) Uka, T., Tanaka, H. and Fujita, I. (1997) Disparity selective neurons in the inferior temporal cortex of the macaque monkey. Neurosci. Res. Suppl. 21: s208.

(2) Uka, T., Tanaka, H., Kato, M. and Fujita, I. (1997) Disparity sensitivity and representation of 3-dimensional surface structure in monkey inferior temporal cortex. Soc. Neurosci. Abstr. 23: 2063.

(3) Wang, Y., Fujita, I. and Murayama, M. (1997) GABAergic mechanisms of neuronal selectivity for visual object features in monkey inferior temporal cortex. Chinese J. Neuroanat. 13: 340.

10. MRI によるサル視覚皮質の観察と電極定位

小松英彦（生理研）

視知覚および視覚認知の神経機構を調べるためにサルの脳の視覚関連領野からニューロン活動の記録を行ない，刺激選択性や行動との関連を調べる実験を行なっているが，このような研究において，MRI を用いたサルの脳構造の測定は，実験精度の向上，実験時間の短縮，動物の有効利用という観点から，非常に有用である。その理由，および MRI 利用方法は昨年度と同じであり，昨年度の年報に記載してある。MRI 撮影後手術を行なったサルに注視タスクを行わせ，大脳視覚皮質の MST 野からニューロン活動の記録を行い，回転面に対する応答を調べ，面の三次元的な傾きに対する MST 野ニューロンの選択性を調べた。実験の内容に関しては本年の年報の部門研究活動に記載してある。MST 野は上側頭溝の内部に存在するため，脳表面の位置だけでは場所の同定が困難であるが，MRI で上側頭溝の位置を求め，MST 野の位置を推定して電極を刺入した結果，容易に MST 野に到達することができ，MST 野の探索に要する時間を非常に短縮する

ことができた。

11. サル大脳皮質の定位的脳地図の作成と記録への応用

酒田英夫，泰羅雅登，楠　真琴，村田　哲（日本大・医・第一生理）
森　茂美，宮下英三（生理研）

物体の三次元空間内での傾きを検出するには，遠近法や陰影などの形状の情報と，両眼視の情報が重要な手がかりとなっている。われわれはサルの頭頂連合野から単一ニューロン活動を記録し，物体の長軸の空間内での傾きに選択性を持つニューロンが頭頂間溝外側壁に存在することをあきらかにし，さらに，立体視ディスプレイ上に呈示したコンピューターグラフィックスを用いてこの軸方位選択性ニューロンの視覚刺激の形状に対する選択性を調べてきた。その結果，軸方位選択性ニューロンの多くは細長い刺激によく反応すること，少数ながら，角柱より円柱によく

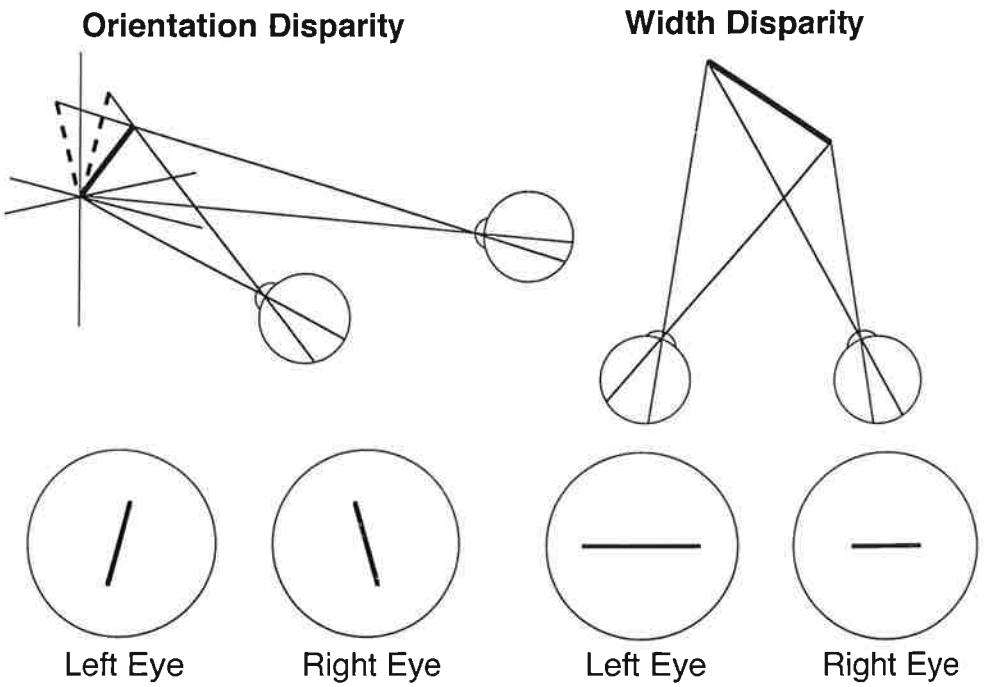


図1．奥行き方向の傾きの知覚を引き起こす両眼視差の種類。右眼に呈示される線分が左に傾いており，左眼に呈示される線分が右に傾いている方位視差をあたえると，矢状面内で手前に傾いている線分が知覚される（左図）。右眼に呈示される線分が左眼に呈示される線分より短い横幅視差が与えられると，水平面内で右側が手前に傾いている線分が知覚される（図右）。

反応するなど刺激の形状に選択性を持つものがあることがわかった。今年度はこれらのニューロンの両眼視情報に対する選択性を調べた。

左右の眼に映る物体の像の傾きの違い，すなわち方位視差によって矢状面内での傾きが知覚され，左右の目に映る物体の像の水平方向の長さの違い，すなわち横幅視差によって水平面内での傾きが知覚されることが知られている（図１）。そこで，立体視ディスプレイ上にスリット刺激を呈示し，右眼への刺激と左眼への刺激の傾きや横幅を独立して変えることにより両眼視差だけを変化させて軸方位選択性ニューロンの反応を調べた。記録に先立ち，サル頭部の磁気共鳴像を撮影して脳定位地図を作成し，それを参考にして頭頂間溝外側壁をねらって電極を刺入した。図２に軸方位選択性ニューロンのディスプレイ上に呈示した円柱の三次元空間内での傾きに対する選択性と，方位視差および横幅視差に対する選択性の例を示す。図２Ａのニューロンは矢状面内で後ろへ倒れた円柱によく反応している。方位視差に対する選択性を調べると，右眼の像が垂直から右へ，左眼の像が左へ傾いている刺激にはよく反応するが，傾き方が反対の場合には反応は見られず，矢状面内での方位選択性とよく一致していた。図２Ｂのニューロンは水平面内で方位

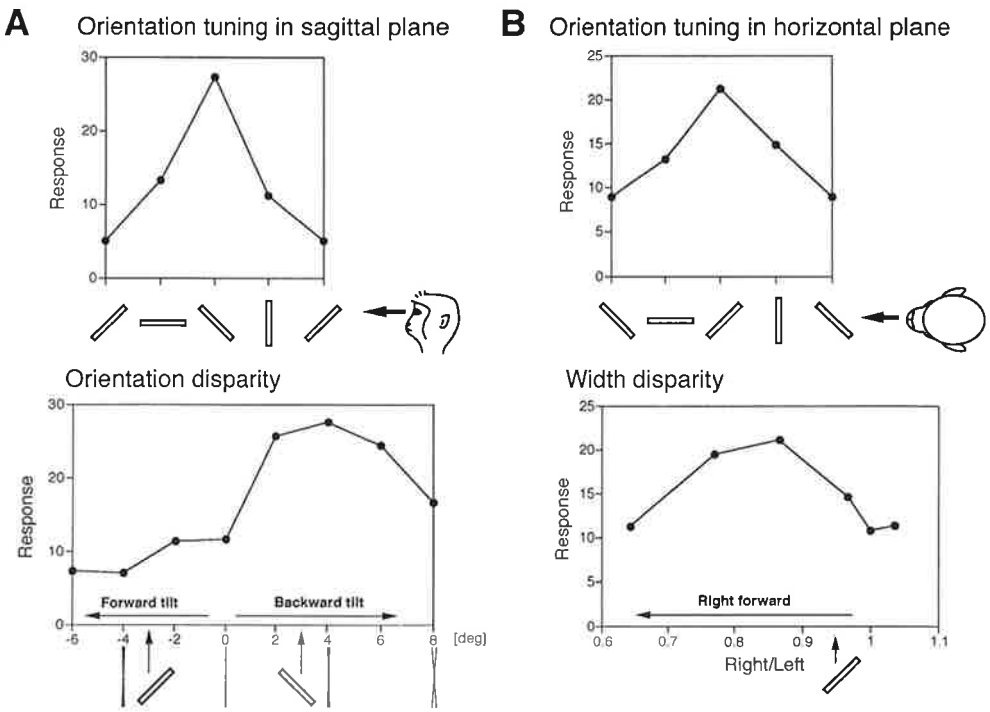


図２．軸方位選択性ニューロンの方位視差と横幅視差に対する選択性の例。Ａのニューロンは矢状面内で後ろに倒れている円柱によく反応しており，方位視差に対する選択性を調べると，右眼に呈示された像が右に，左眼に呈示された像が左に倒れているときに強い反応が見られた。Ｂのニューロンは水平面内で右側が手前に傾いている円柱によく反応しており，横幅視差に対する選択性を調べると，右眼に呈示される像の長さが左眼に呈示される像の長さより短い時に強い反応が見られた。

選択性を持っており，右側が手前に傾いている円柱によく反応する。このニューロンの横幅視差に対する選択性を調べると，右眼の像が左眼の像より短い刺激によく反応しており，水平面内での方位選択性とよくあっていた。

以上の結果から，頭頂間溝外側壁の後部の軸方位選択性ニューロンは，長さや太さなどの単眼性の手がかりとともに，方位視差や横幅視差などの両眼性の手がかりを用いて物体の空間内での傾きの識別に関与していることが示された。

A．論文

1．Sakata H, Taira M, Murata A, Gallese V, Tanaka Y, Shikata E & Kusunoki M (1997) Parietal visual neurons coding three-dimensional characteristics of objects and their relation to hand action. Parietal Lobe Contributions to Orientation in 3D Space, Eds. P Thier & H-O Karnath (Experimental Brain Research Series 25) Springer-Verlag, Heidelberg, 237-254

2．Sakata H, Taira M, Kusunoki M, Murata A & Tanaka Y (1997) The parietal association cortex in the depth perception and visual control of hand action. Trends Neurosci 20(8): 350-357

3．Sakata H, Taira M, Kusunoki M, Murata A & Tanaka Y (1997) Role of parietal association cortex in depth perception and hand action. The Association Cortex Structure and Function, Eds. H Sakata, A Mikami & JM Fuster, Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 137-161

B．学会抄録

4．Tsutsui K, Taira M, Jiang M & Sakata H (1997) Representation of 3D visual features by neurons in monkey caudal intraparietal sulcus. Soc Neurosci Abstr 23(2): 1546

5．Jiang M, Tsutsui K, Taira M & Sakata H (1997) 3D visual information processing in the monkey parietal cortex: a reversible inactivation study. Jpn J Physiol 47 (Suppl 2) S149

6．Tsutsui K, Taira M, Jiang M & Sakata H (1997) Processing of 3D visual features by neurons in monkey caudal intraparietal sulcus. Neurosci Res (Suppl 21) S208

7．原中善源，Win Nyi Shein，遠藤恵子，楠　真琴，酒田英夫 (1997) 立体視ディスプレイによるニホンザルの頭頂葉の長軸方位選択性ニューロンに関する研究。第21回日本神経心理学会総会　予稿集，82

第18回磁気共鳴装置共同利用実験ワークショップ

(1998. 3. 12)

〈討論参加者〉

村上　宏（香川医大），成瀬　達，関　泰長（名古屋大・医），肥塚　泉（聖マリアンナ医大），楠　真琴（日本大・医），棚橋光彦，重松幹二（岐阜大・農），藤田一郎（大阪大・医），福岡宗良，佐藤篤司，柴山元英，杉浦正彦（名古屋市大・医），力丸　裕，古川嗣久，鳥山覚司，山田恒仁，小畑宜久（同志社大・工），瀬尾芳輝（京都府医大），萩池昌信（香川医大），小松英彦，村上政隆，伊佐　正，今野　卓，永山國昭（生理研）

〈概要〉

1997年度の共同利用実験成果を検討し，1998年度の実験研究計画を打ち合わせるため，第18回磁気共鳴装置共同利用実験ワークショップを1998年３月12日開催し，1997年度及び1998年度共同利用実験研究者（所外19名，所内５名）を対象として，1997年度の利用報告，共同利用のガイダンス，今後の装置改善等について打ち合せが行われた。

【 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．ネコ歯根膜機械受容器の立体微細構造（野田坂佳伸他）…… 210
2．リーラーマウス小脳における Bergmann glia 形成異常の超高圧電顕による観察（湯浅茂樹他）…… 212
3 A．*Acanthamoeba* の分化プロセスの超高圧電顕的研究（Ⅱ）（鶴原　喬他）…… 213
3 B．バキュロウィルスベクターを用いたC型肝炎ウィルスの遺伝子発現（鶴原　喬他）…… 215
4．菌類胞子粘着の超高圧電顕的研究（犀川政稔他）…… 217
5．網膜神経細胞間のギャップ結合様式：双極細胞の解析（日高　聡他）… 219
6．イソアワモチ類外套の筋線維の形態と配列の厚切切片による立体構築（片桐展子他）…… 221
7．ヒト腎糸球体メサンギウム細胞表面の機能分子の解析（追手　巍他）… 223
8．分離培養破骨細胞のグリッド全載標本の細胞骨格とくに接着装置としての podosome の構造解析（明坂年隆他）…… 225
9．細胞融合過程におけるミクロフィラメント構造の立体観察（谷口美恵子他）…… 226
10．アクチン及びアクチン複合体のクリスタルの電子線回折と高分解能観察（一海孝光他）…… 227
11．有機物結晶の電子線照射損傷（大野　完他）…… 228
12．*Chlamydia trachomatis* 封入体における intra inclusion net work の存在について―第２報（保條説彦他）…… 230
13．中枢神経系におけるグルココルチコイド受容体の state-dependent な局在の変化：超高圧電子顕微鏡を用いた解析（小澤一史他）…… 232
14．グリオーマ細胞の接着能，浸潤能に関する超高圧電顕観察（継続）（垰本勝司他）…… 233
15．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）…… 236
16．ラット樹状細胞の組織内における微細構造の三次元解析：Ⅱ．ラット肝の樹状細胞の動態（江崎太一他）…… 237
17．発達期脳の神経細胞フィロポディア様突起の３次元立体構造解析（村上富士夫他）…… 239
18．神経細胞およびグリア細胞突起の CT 解析（濵　　清他）…… 240

1．ネコ歯根膜機械受容器の立体微細構造

野田坂佳伸，鎌田　勉（北海道大・歯）
有井達夫（生理研）

矯正治療のために歯に矯正力を負荷すると患者は痛みを含む不快感を感ずる。そのような感覚は他の歯周組織によってばかりでなく，歯根膜機械受容器を介しても中枢へ伝達される。著者らは矯正力が同受容器におよぼす影響を神経生理学的に見てきたが，下歯槽神経あるいは三叉神経知覚核ニューロンの反応閾値は矯正力負荷によって上昇する傾向があった。このような矯正力はまた歯根膜の圧迫・伸展などを起こし，機械受容器に形態学的な変化も与えていると思われる。同受容器は神経終末あるいはルフィニ小体として歯根膜内に広く分布し，複雑に分岐した構造を持っているので比較的厚い切片において広範囲な観察をすることが必要と思われ，超高圧電顕での観察を試みた。

材料はネコ犬歯の歯根膜で，左犬歯を遠心方向に矯正力100ｇで牽引して実験群とし，右犬歯を対照とした。灌流固定後，犬歯をまわりの組織とともに切り出し，脱灰した。歯軸に垂直に薄切した後，通法に従ってエポキシ包埋して普通透過電顕用に0.5ミクロン，超高圧電顕用に２ミクロンの切片を作成した。ウラン鉛二重染色後，1000kV 超高圧電顕（日立 H-1250M）にて観察した。

歯槽骨とセメント質の間にある歯根膜部分に血管，myelinated 神経終末，unmyelinated 神経終末，Ruffini 小体などいろいろな構造が観察された。しかし，固定操作あるいは脱灰処理のため，細部の観察ができるクリアな像は得られなかった。矯正力を負荷すると歯は牽引側に傾斜し，歯根膜は上の部分では牽引方向に圧迫され，反対側では伸展される。歯根尖端では逆に牽引方向とは反対側で圧迫され，牽引側では伸展される。このように歯根膜内の構造物は部位によって違った影響を受けるので，その形態変化を大局的に把握することは容易ではない。本実験でも試料を予め歯軸に垂直に輪切りにして各部分の薄切を作成して観察したが，圧迫あるいは伸展が上記各構造に与えたと思われる変化を見いだすことは困難であった。図１には対照群の試料で見られた神経線維群，図２には矯正力負荷群の犬歯の象牙質セメント質歯根膜境界部を示す。しかし，これらが圧迫によって影響を受けた構造かあるいは正常な構造かを判断するには至らなかった。

今後，さらに神経のラベルを行い，光顕との比較，圧迫部位と牽引部位の受容器の大局的変化と，その部位の細かな観察ができる切片を作成し，超高圧電顕と電顕とでの像の対照が行えるような条件を考慮し，微細構造の変化の定量的な観察，さらに微細構造の立体的構築を行ってみたいと考えている。

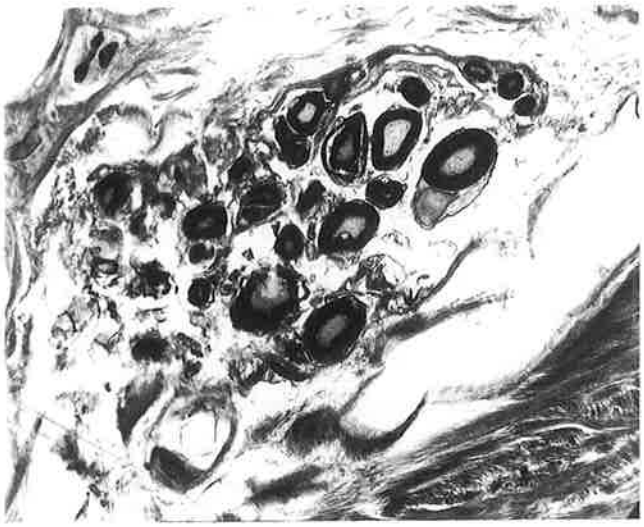


図１．対照群歯根膜で見られた神経線維群（×1500）



図２．矯正力負荷群の歯根膜における象牙質セメント質歯根膜境界部（×2000）

2．リーラーマウス小脳における Bergmann glia 形成異常の超高圧電顕による観察

湯浅茂樹，外山芳郎（千葉大・医・第二解剖）
有井達夫（生理研）

リーラーマウスは遺伝的皮質形成障害を示し，*reelin* 遺伝子の欠損による神経細胞の層状配列過程の障害が原因である。小脳においては，特にプルキンエ細胞の層状配列の障害が著明である。小脳発生過程においては，外顆粒層に発現する *reelin* 遺伝子の作用によりプルキンエ細胞の皮質への配列が制御されているが[1]，この分子が直接にプルキンエ細胞に作用するのか，あるいは放射状グリアに作用して間接的にプルキンエ細胞移動を制御するのか，という疑問は現時点では未解決である。我々は，正常マウス小脳 Bergmann glia の発生機構を検討し，少なくともその一部は胎生期放射状グリアに由来すること[2]，リーラー小脳発生過程で Bergmann glia の形成異常があること[3]を複数のマーカーを用いて明らかにしている。また，寺島らは，成体リーラーマウス小脳皮質の Bergmann glia を Golgi 染色により光顕的に観察し，形態異常と分布をもとにいくつかのタイプを分類している[4]。本研究では，成体リーラーマウス小脳皮質の Bergmann glia の形態を Golgi 染色後，超高圧電顕により観察し，どのような形成異常が認められるかを検討して，発生・発達機構における障害について考察した。

正常マウスにおいては，Bergmann glia の放射状突起は分子層全域にわたって伸長し軟膜まで達していた（図A）。そして，葉状の小突起が放射状突起の周囲に多数ひろがり，無数の小孔が認められた（図B）。これらの小孔には隣接する Purkinje 細胞の樹状突起棘が収まっている[5]。一つの細胞体から複数の放射状突起が枝分れしているものが多いが，大部分が平行に，狭い相互間隔で軟膜まで伸長していた。

これに対し，リーラーマウスにおいては，Bergmann glia の分布は不規則で層構造の形成は認められず，放射状突起も短く軟膜まで達していなかった（図C）。その先端には，グリア突起の終足状の構造などの特殊化は認められなかった。また，太い突起は細胞体からいったん側方にのびたあと，表層へ向かって方向を変えて伸長していた。この放射状突起から周囲に小突起がのび，一部ではやや広く葉状の突起が広がっていたが，正常マウスの場合と比較して，その密度は低く周辺への広がりも非常に乏しかった（図D）。また，これらの小突起においては小孔は部分的にしか認められなかった。これらの小突起の一部は，周辺の血管壁に対し終足状に接していた。

これらの所見から，リーラーマウスの Bergmann glia は発生過程で前駆細胞の放射状グリアの突起が軟膜からはずれて，グリアの細胞体の移動が障害され突起の形成も不全をきたした可能性がある。また，周辺にひろがる葉状突起とその小孔が少ないのは，プルキンエ細胞の層状配列障害のために，その樹状突起と Bergmann glia 突起との接触が正常に行われず，そのため樹状突起棘との複合体形成がおこりにくいためと考えられる。

文献

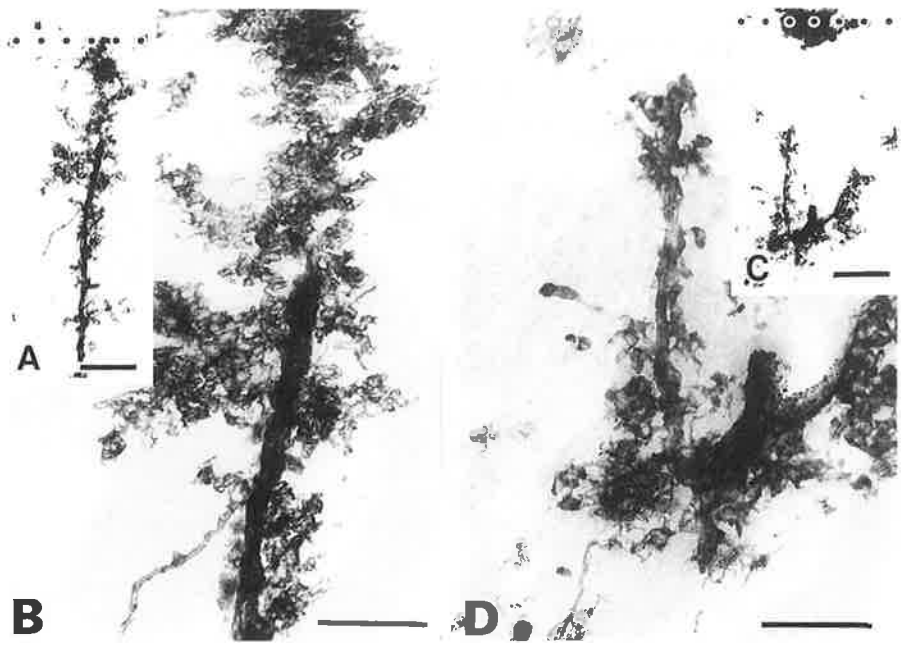
1．Miyata T. et al.: J. Comp. Neurol., 372, 215-228, 1996.

2．Yuasa S.: Anat. Embryol., 194, 223-234, 1996.

3．Yuasa S. et al.: Anat. Embryol., 188, 317-329, 1993.

4．Terashima T. et al.: Dev. Brain Res., 18, 103-112, 1985.

5．Hama K. and Kosaka T.: Prog. Neuropath. 4, 61-77, 1979.



A．正常成体マウス小脳皮質 Golgi 染色で認められる Bergmann glia の放射状突起。B．Aの葉状突起の強拡大像。葉状突起には無数の小孔が認められる。C．リーラーマウス成体小脳皮質の Golgi 染色像。Bergmann glia の放射状突起は短く，軟膜まで達していない。D．太い突起は分岐した後に表層へ向かって伸びるが，葉状突起は未発達である。A，Cの破線は軟膜表面を示す。Scale bars, A, C 10μm; B, D 5μm。

3 A．*Acanthamoeba* の分化プロセスの超高圧電顕的研究（Ⅱ）

鶴原　喬，鳥居千春，笠原秀浩（東京学大・生物）

有井達夫（生理研）

Acanthamoeba は元来自由生活性のアメーバであり，その生活環は棘状擬足を有して運動性に富み分裂・増殖を行うアメーバ型（栄養型；trophozoite）と飢餓や乾燥などの悪条件下で生存

可能な二重の壁に囲まれたシスト型（cyst：嚢胞）に分けられる。この両期の交代は生活史にともなう必然的なものではなく偶発的であることが特徴で，栄養型からシストへの転換は，飢餓[1-3]，乾燥，高濃度の塩[1]，ある種の薬剤，ミトコンドリアの高分子合成阻害剤[4]などにより，実験的に誘導することができる。

シスト化誘導因子の存在[5]などシスト化に関する研究は多岐にわたっているが，誘導因子の実態や分化の詳細なプロセスなど不明な点も数多い。

昨年度に引き続き土壌より分離しクローン化した *A. hatchetti*（GS89-1057 株）を PYG 培地[6]で無菌培養化し，対数増殖期後期の細胞をシスト化培地へ懸濁しシスト化を誘導した。シスト形成用培地としては，50mM $MgCl_2$，アメーバ生理塩類溶液（NKCMT 液：1mM NaCl, 0.09mM KCl, 0.05mM $CaCl_2$, 0.02mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1mM Tris-HCl; pH 7.0）を用いた。

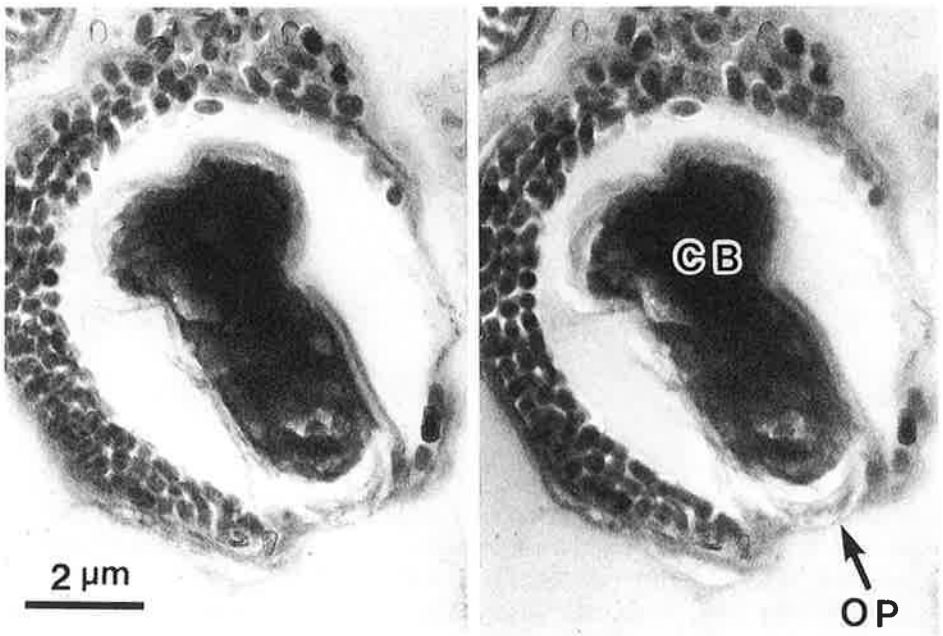


図　シストの超高圧電子顕微鏡によるステレオペア像：
脱シスト孔部に細胞体 (CB) とつながった operculum (OP) が認められる。

超高圧電子顕微鏡によるステレオペア像（図）から，成熟シストのシストの際の脱出孔である ostiole 部分に脱出孔の蓋にあたる operculum がシスト内の細胞体の細胞壁と明らかに接続して観察された。現在，成熟シストだけでなくシスト化の初期像や成熟シストからの脱シストの像を走査型電子顕微鏡で観察中であり，それらの表面構造と超高圧電子顕微鏡による内部構造の観察により，2 層のシスト壁の形成過程と ostiole との関連，脱シスト時の細胞体と operculum との関連などについて検討を進める予定である。

引用文献

1）Band, R. N. (1963): J. Protozool., 10, 101-107.

2）Neff, R. J., Ray, S. A., Benton, W. F. and Wilborn, M. (1964): Methods in Cell Physiology, 1, 55-83.

3）Raizada, M. K. and Krishna Murti, C. R. (1971): J. Protozool., 18, 115-119.

4）Akins, R. A. and Byers, T. J. (1980): Develop. Biol., 78, 126-140.

5）Lasman, M. (1987): Develop. Growth and Differ., 29, 547-552.

6）Stratford, M. P. & Griffiths, A. J. (1978): J. gen. Microbiology, 108, 33-37

3 B．バキュロウイルスベクターを用いたC型肝炎ウイルスの遺伝子発現

鶴原　喬（東京学大・生物）
松浦善治（国立感染症研）
有井達夫（生理研）

タンパク質の発現系として大腸菌，酵母，植物細胞や哺乳動物細胞が主に用いられてきたが，生物活性を保持した形で目的のタンパク質を大量に発現させることは容易ではない。遺伝子産物が種々の翻訳後修飾を受けた形で，しかも大量に発現できる系として昆虫ウイルスのバキュロウイルス (baculovirus) をベクターとした発現系が注目されるようになった。

バキュロウイルスの中で感染細胞の核内に多角体と呼ばれる封入体を全感染細胞タンパク質の40%にも達するほど大量に作る一群のウイルスが核多角体ウイルス (nuclear polyhederosis virus: NPV) である。これらの多角体はウイルスが自然界で生存するためには必須であるが，ウイルスの増殖そのものには必要なく多角体遺伝子の代わりに発現したい外来遺伝子を挿入してもウイルスは支障なく感染し増殖することが出来る[1)]。

このバキュロウイルスをベクターとして，C型肝炎ウイルス (HCV) の cDNA の発現実験によりワクチンや診断用抗原の研究開発が盛んに行われている[2,3)]。今回，C型肝炎ウイルス (HCV) の cDNA の発現産物の電子顕微鏡観察を試みたので報告する。

組換えバキュロウイルスとして *Autographa californica* NPV を使用し，HCV の構造タンパク質の cDNA 組込み，夜蛾の幼虫由来株化細胞（*Spodoptera frugiperda* 細胞）にトランスフェクトした。非感染細胞及び親ウイルス感染細胞を対照とした。常法の二重固定後，２%酢酸ウラニルで20分間ブロック染色，アルコール系列で脱水，エポキシ樹脂に包埋した。ウルトラミクロトーム (Super Nova, Reichert-Jung) により３～５μm の切片を作製し，６～７分間の鉛染色後，日立 H-1250M 型超高圧電子顕微鏡を用いて観察・撮影を行った。

親ウイルスである NPV 感染細胞は核内に多数の多角体封入体が観察されるが（図１），HCV

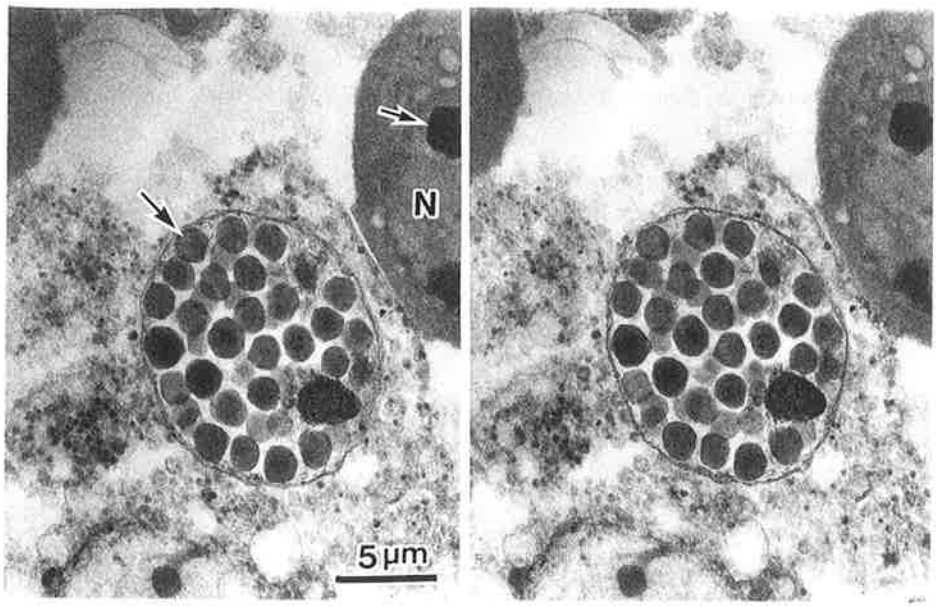


図1　野生株感染細胞のステレオペア像：
中央に細胞質が崩壊し，封入体である多角体で充満した核。
矢印・・多角体　　N・・核

の構造タンパク質であるコア蛋白－cDNA 組込み NPV 感染細胞では多角体封入体は観察されなかった（図2）。非感染細胞と比べて繊維状の構造物や小胞などが認められたが，これらの構造物と親ウイルスである NPV 感染細胞に出現する構造物との相違からC型肝炎ウイルス－cDNA による遺伝子産物を特定することはできなかった。

HCV の構造タンパク質にはコア蛋白，エンベロープがあり，これらのモノクローナル抗体を用いたC型肝炎ウイルスの各遺伝子発現細胞の蛍光顕微鏡観察で，核内に強い陽性反応が認められていることから[4]，免疫電子顕微鏡法により遺伝子発現物質の細胞内における局在性については，通常の電子顕微鏡より厚い切片を用いる超高圧電子顕微鏡によるステレオペア観察がより有効だと考え解析中である。

引用文献

1）松浦善治：蛋白質核酸酵素，37, 211-222 (1992)
2）Matsuura, Y., et al.: Intervirology, 37, 114-118 (1994)
3）松浦善治他：Medical Practice, 12, 1625-1627 (1995)
4）松浦善治：ウイルス，45, 105-115 (1995)

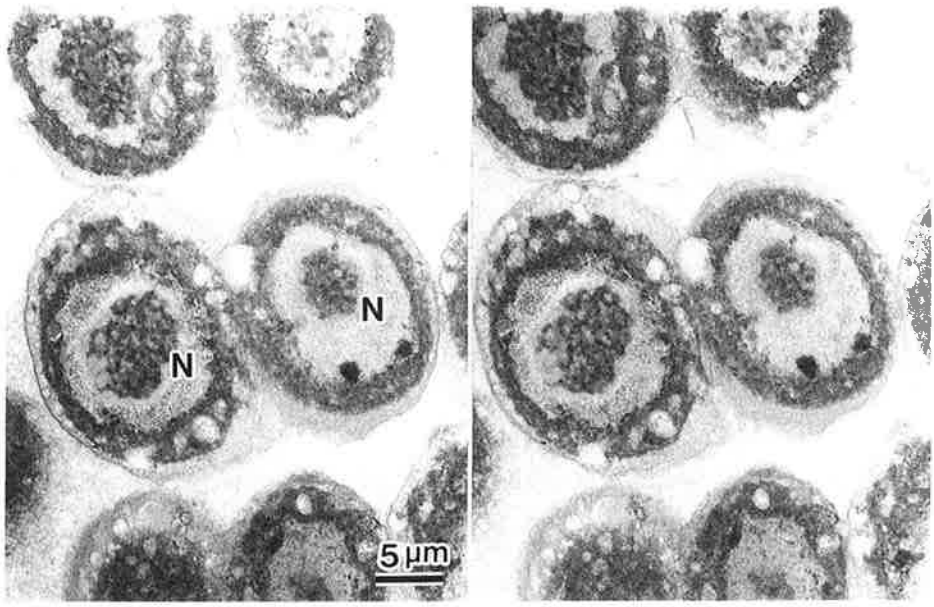


図2　HCV 構造遺伝子領域 cDNA を発現した細胞のステレオペア像。
N・・核

4．菌類胞子粘着の超高圧電顕的研究

犀川政稔，鈴木清美（東京学大・生物）
有井達夫（生理研）

高等菌類のうち水生不完全菌類とよばれる菌類は，胞子が水中の落ち葉などの適当な基質に付着して無性的に繁殖する。走査型電顕像によれば付着は分泌された粘着物によるのだが，走査電顕像が示す粘着物は表面が平滑となった「のり」状である (Hyde et al., 1986)。しかし，その形態は明らかに試料作成時乾燥によって胞子本体に貼りついてしまったものである。粘着物をはじめて超薄切片中に観察したのは Read et al. (1992) であった。粘着物を分泌している部分では細胞壁が膨潤しており，壁を構成する粘着物であるフィラメントは放射方向に伸びていた。粘着物は乾燥によって胞子本体にへばりつくこともないので，粘着物はより真実に近い形態を示した。しかし，欠点もある。超薄切片像ではその部分が胞子の先端部だけなのか，あるいは先端部からある程度離れたところにまでわたっているのかについては不明であった。そこで本研究では水生不完全菌7種の胞子を準超薄切片とし，粘着物質を分泌している部分を超高圧電顕で観察した。

用いた水生不完全菌類は，多摩川上流域で採集した水中に沈んだ落ち葉を，その日のうちに滅

菌水で洗浄し，これを15-20℃で1-2日間滅菌水を入れたシャーレ中でインキュベートして得た。菌の胞子は水底の寒天平板に付着した。超高圧電顕観察したのは，*Triscelophorus monosporus* (Fig. 1a), *Alatospora acuminata, Varicosporium elodeae, Clavatospora longibrachiata* (Fig. 1b), *Tricladium angulatum, Clavariopsis aquatica, Tetrachaetum elegans* の胞子であった。その結果，粘着物は，*T. monosporus* と *A. acuminata* では胞子先端部にのみ多量に分泌されており，*V. elodeae, C. longibrachiata, T. angulatum, C. aquatica, T. elegans* の5種では，それは先端からかなり離れた部分にまでわたっていることがわかった。

引用文献

Read, S. J., Moss, S. T. and Jones, E. B. G. 1992. Attachment and germination of conidia. In: ed. by Billings, W. D., et al. Ecological studies. 94. The ecology of aquatic hyphomycetes. Springer- Verlag, Berlin. Pp. 135-151.

Hyde, K. D., Jones, E. B. G. and Moss, S. T. 1986. Mycelial adhesion to surfaces. In: ed. by Moss, S. T. The biology of marine fungi. Cambridge Univ. Press. Pp. 331-340.

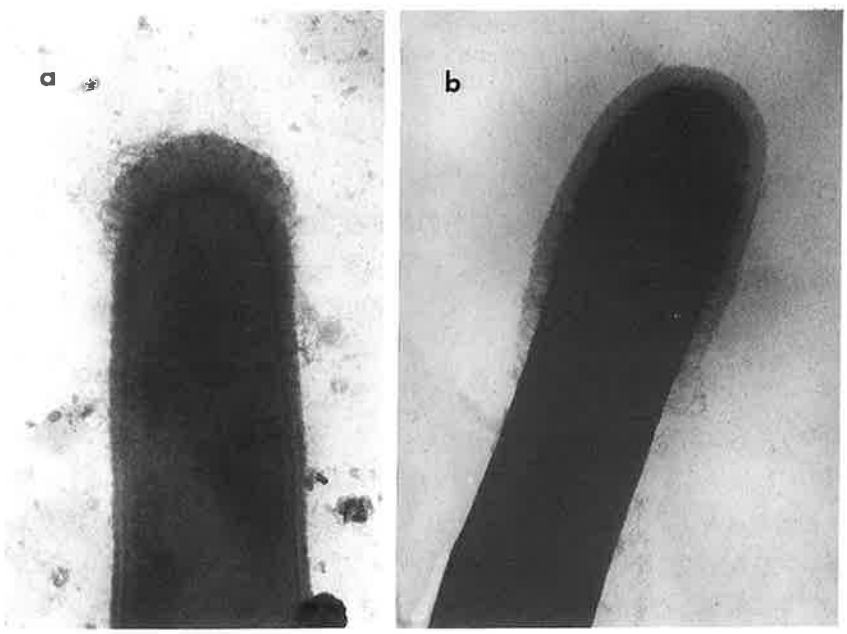


Fig. 1. Distal portions of conidia covered with adhesive substance.
a. *Triscelophorus monosporus:* × 30,000: b. *Clavatospora longibrachiata.* × 15,000

5．網膜神経細胞間のギャップ結合様式：双極細胞の解析

日高　聰（藤田保衛大・医・生理）
橋本葉子（東京女医大・看護短大）

［目的］

網膜双極細胞は，視細胞で発生した光応答の情報を網膜神経節細胞に興奮性に転送する二次の介在ニューロンである。視細胞の光応答はすべて過分極性であるが，双極細胞では小さなスポット光に対して過分極性（OFF 中心型）と脱分極性（ON 中心型）の異なる二つの光応答を発生し，中心部と周辺部が拮抗する受容野を形成している。ビオチン複合物の細胞内注入法から，脊椎動物網膜内の様々なニューロンがギャップ結合で連結していることが明らかになってきた[1)-3)]が，網膜内で縦方向に情報伝達する双極細胞も同じ機能型の間でギャップ結合で連結していることが最近になってわかった[4)]。今回，双極細胞について，光応答を記録した細胞一個の全体像，細胞の分布様式，細胞突起の先端の三次元構造および突起間の接触部の微細形態を電子顕微鏡で調べた。

［方法］

細胞内記録法を用いて，コイ，キンギョとウグイ網膜の双極細胞から直径 400μm の白色のスポット光および内径 1mm, 外径 2.5mm の環状光に対する応答を記録した。ガラス管微小電極には，Lucifer Yellow と biocytin あるいは Neurobiotin を溶解し，電気泳動的にマーカーを細胞内に注入した[5)]。細胞の Lucifer 標識を確認後，ビオチン複合物の局在部位を同定するために，HRP 標識 -avidin-biotin 複合物との反応を経て，反応産物の増強のために Ni^{2+} と Co^{2+} の存在下で diaminobenzidine (DAB) で可視化した[6)]。さらに nitroblue tetrazolium を添加して光酸化によって反応産物を増強した[7)]。電子線密度の増強のために，重クロム酸カリウム，酢酸ウランとリンタングステン酸によるブロック染色を施した[5)]。エポキシ樹脂標本から，厚さ 3μm の網膜縦切片を作製し，超高圧電子顕微鏡下で 1,000kV で解析した。

［結果と結論］

実験した ON 中心型双極細胞と OFF 中心型双極細胞は，共に，同一形態の周囲の細胞へビオチン複合物の拡散（tracer coupling の形成）を示した。

今回調べた ON 中心型双極細胞は，大きな細胞体と内網状層の中枢側 (sublamina b) で分枝のない大きな軸索終末を有する細胞形態を示した。この細胞形態はキンギョの桿体視細胞入力型巨大双極細胞[8),9)]およびコイの ON 中心型の I 型双極細胞[10)]の特徴であり，これらの細胞は免疫細胞化学的に抗 protein kinase C (α subunit または type 3 subunit) 抗体に陽性である[11)]。ON 中心型双極細胞と tracer coupling を形成した双極細胞では，細胞密度は 609.76cells/mm^2 であり，最も近い隣の細胞までの距離（細胞体の中心で測定）は 35.73 ± 5.96mm で，規則性の指標となる細胞間距離の平均／標準偏差の値は5.99であった。また，抗 PKC 抗体で標識された ON 中心型双極細胞の分布と密度を測定した所，細胞密度は 1050cells/mm^2 であり，最近傍細胞間距

離を計測すると 30.93 ± 7.19mm であり，平均／標準偏差の値は4.30であった。また，光学顕微鏡観察から，ON 中心型細胞は周りの双極細胞と樹状突起同士で接触していることが認められた。ON 中心型細胞の軸索終末間の接触は見られなかった。接触した標識樹状突起を電子顕微鏡で観察した結果，ギャップ結合を同定した。

一方，OFF 中心型双極細胞と tracer coupling を形成した周りの双極細胞は，六角格子状に配列していた。細胞密度は 588.24cells/mm^2 であり，最近傍細胞間距離は 37.58 ± 5.38mm （平均±標準偏差）であった。細胞間距離の平均／標準偏差の比の値[12]は6.99であった。この値が5以上では無秩序ではなくて規則性があると言える[12]ので，OFF 中心型双極細胞の周りのこれらの双極細胞は六角細密格子状に規則性を持って配列していると言える。また，光学顕微鏡観察から OFF 中心型双極細胞は周りの双極細胞と軸索終末同士で接触していることが認められた。内網状層の末梢側 (sublamina a) で接触した軸索終末を電子顕微鏡で調べた結果，標識された軸索終末部の突起の間にギャップ結合を同定した。

今回調べた最近傍細胞間距離の解析から，OFF 中心型双極細胞は ON 中心型双極細胞よりも高い規則性で六角格子状に分布していると考えられる。桿体入力優勢の ON 中心型双極細胞は樹状突起でギャップ結合で連結し，OFF 中心型双極細胞は軸索終末でギャップ結合で連結している。ON 中心型双極細胞と OFF 中心型双極細胞におけるこれらの形態学的な違いについて，その神経機能を今後検討して行きたい。

[引用文献]

1．Hidaka S, Maehara M, Umino O, Lu Y & Hashimoto Y (1993) NeuroReport 5: 29-32.

2．Hidaka S & Hashimoto Y (1995) Prog in Cell Res 4: 261-264.

3．Vancy DI (1994) Prog in Retinal & Eye Res 13 (1): 301-355.

4．Umino O, Maehara M, Hidaka S, Kita S & Hashimoto Y (1994) Visual Neurosci 11: 533-548.

5．日高　聰，橋本葉子 (1993) 日本生理誌 55: 241-254.

6．Adams JC (1981) J Histochem Cytochem 29: 775.

7．Vaney DI (1992) J Neurosci Methods 44: 217-223.

8．Kaneko A (1970) J Physiol 207: 623-633.

9．Ishida AT, Stell WK & Lightfoot DO (1980) J Comp Neurol 191: 315-535.

10. Saito T & Kujiraoka T (1982) J Comp Neurol 205: 161-170.

11. Suzuki S & Kaneko A (1990) Visual Neurosci 5: 223-230.

12. Wassle H & Riemann HJ (1978) Proc R Soc Lond Biol 200: 441-461.

6．イソアワモチ類外套の筋線維の形態と配列の厚切切片による立体構築

片桐展子（東京女医大・総合研）
片桐康雄（同・看護）
有井達夫（生理研）

イソアワモチ類（軟体動物，腹足類）の外套背表は多数の小突起で覆われ，その皮下組織に皮膚光覚細胞（Dermal photoreceptor cell, DP 細胞）が夥しく分布する。DP 細胞は形態および光応答から感杆型光受容細胞と見なされる“眼外光受容器”である。小陰影を外套の一部に与えると局所的な収縮が起こり，外套から切り離した小突起においても陰影反応が見られる。結合組織内には多数の筋線維が散在し，DP 細胞に密接するものがあることから局所的な陰影反応に関与すると思われる。DP 細胞からの光情報は軸索を介して中枢へ伝えられると推測される (Katagiri et al 1990)。筋線維と DP 細胞の軸索および神経との関係を明らかにするため，初めに筋線維の基本的な形態を観察した。

材料と方法：イソアワモチ類の幼動物（体長 4mm 前後）を 2 %オスミウム酸水溶液で40℃，48時間加温処理，脱水過程で酢酸ウランでブロック染色，エポン樹脂に包埋した。0.5 と 1.0μm 厚さに交互に準薄切して連続切片を作成，切片をグリッドに載せ，その上にホルムバール支持膜を貼った。0.1%トルイジン青液で染色し光顕観察後，酢酸ウランと鉛染色し，1000kV で電顕観察した。一定倍率で撮影，同倍率に写真を引伸ばし筋線維を立体構築した。

結果と考察：外套の皮下組織には多数の筋線維が諸方向に走行し，これらは全て平滑筋である。5～10個の筋線維が一群で体の前後軸に対し縦または横方向に互いに直交するように走行し特に体腔側で顕著である（図 2）。筋線維は横断像では楕円形，縦断像では直線的に伸びる部分と波状の部分がみられ，径 0.4 ～ 3μm, 追跡できた長さは約 125μm であった。これは幼動物体の横幅が約 1.5mm であることに対比して長大な細胞であることを示している。筋線維は核周囲部では 5μm にもなる。筋線維の存在部位や伸縮の差によって，太さや長さが異ってみえると思われる。筋線維の核はヘテロクロマチンに富んだ楕円形，細胞内部には電子密度の高い 2 種（太いと細い）の細線維，細胞周囲に小陰窩が認められ，筋線維の特徴は判別できるが，微細構造は薄切切片の観察が適する。背眼を含む部位では外側に背眼を支えるように斜めに走行する筋線維があり，上方にむけて 2 ～ 3 つに分岐するのが認められ（図 1），表皮細胞の間または下で筋線維は終わる。いずれの筋線維もその末端，他構造との付着部はとらえがたく，今後の課題である。

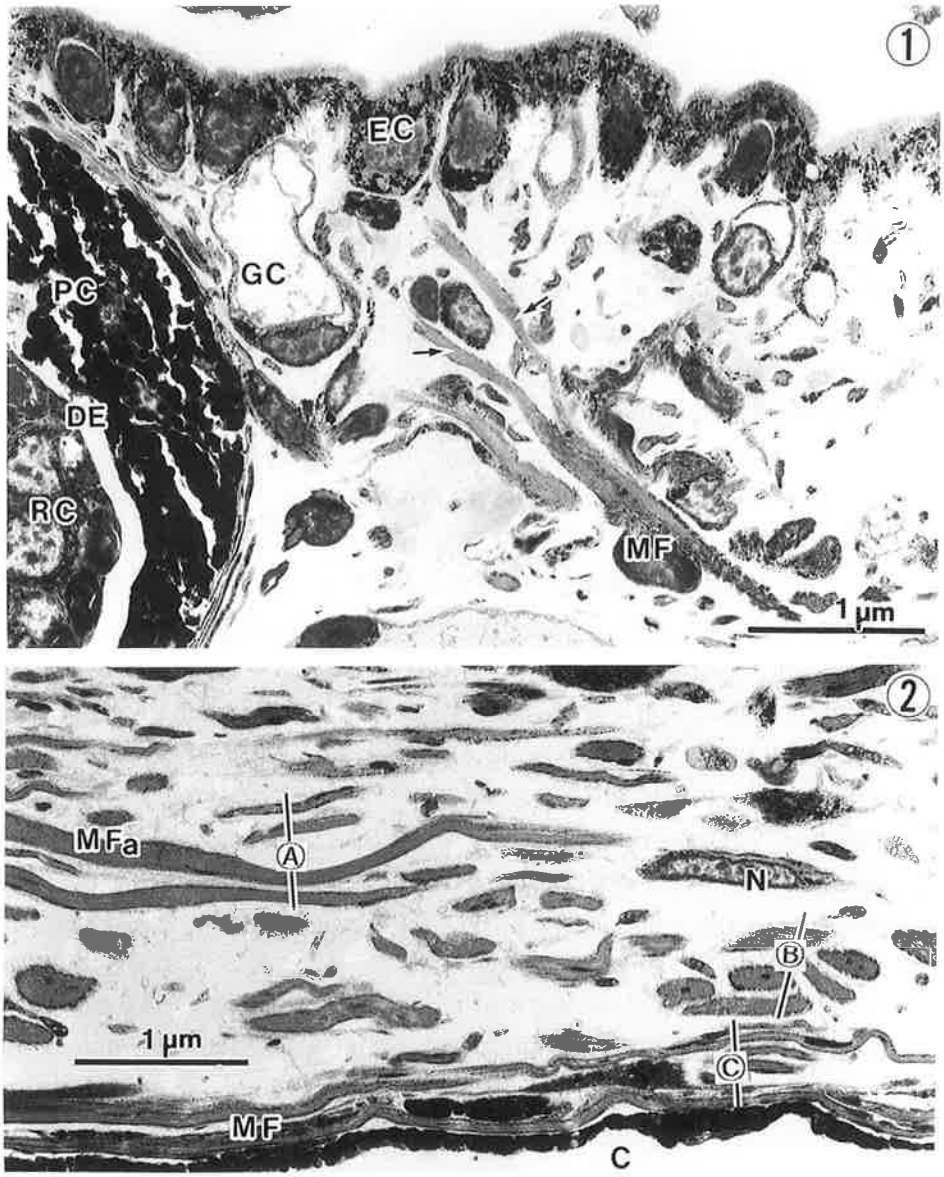


図 1　*Onchidium sp.* 幼動物の外套。
背眼 (DE) の外側に斜め方向に走行する筋線維 (MF) は上方で 2 つに分岐（↓）している。

図 2　外套下部を走行する筋線維群 (MF)。
Ⓑ群に 7 本の筋線維群の横断像。ⒶとⒷ群には縦断された筋線維群が認められ，Ⓑ群と直交する．
立体構築で追跡できた筋線維 (MFa) の長さは 125μm。
C, 体腔； EC, 表皮細胞； N, 筋線維の核； PC, 背眼の色素細胞； RC, 背眼の光受容細胞。

7．ヒト腎糸球体メサンギウム細胞表面の機能分子の解析

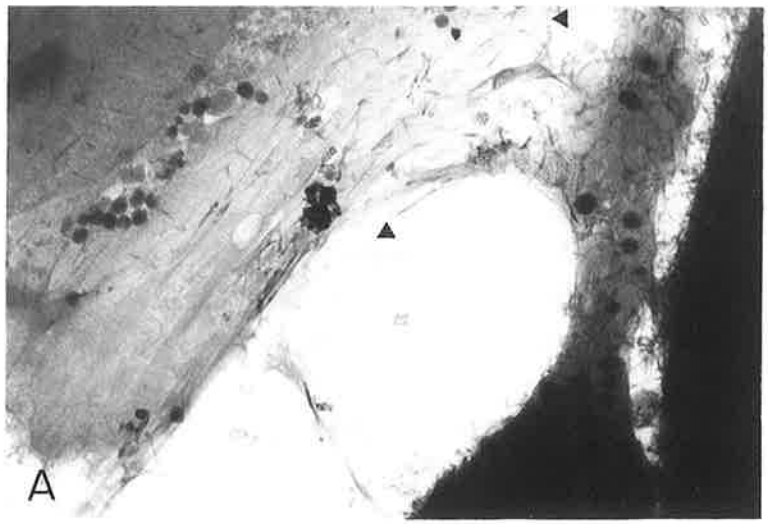
追手　巍，森岡哲夫（新潟大・医・腎研・機能制御）
有井達夫（生理研）

ヒト・メサンギウム細胞上の機能分子についてはアンギオテンシンⅡレセプター，ある種の細胞接着分子などが知られているが，糸球体内皮細胞との接着部位に発現する機能分子についての研究は未開発である。その研究の第一歩として本年度は，混合培養した両細胞の接着部位をレザー顕微鏡（MRC-1000, Bio-Rad），超高圧電子顕微鏡（生理研）で観察した。

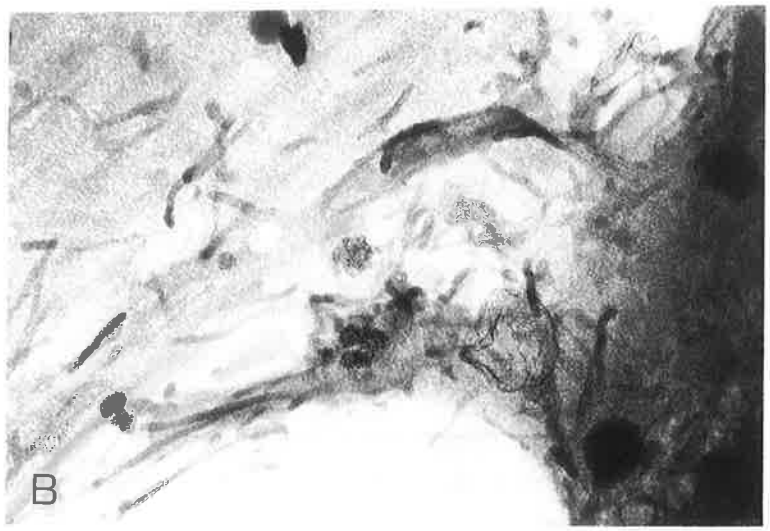
（方法）ヒト・メサンギウム細胞の培養：既報（生理学研究所年報 10: 283, 1989）のごとくラットの場合に準じて行った。ヒト糸球体内皮細胞の培養法：市販の細胞を継代６代目以内で用いた。第８因子関連抗原の存在，アセチル化 LDL の取り込みにより内皮細胞の特異性をチェックした[1]。両細胞の混合培養法は，既報[2]の方法を一部改変して行った[3]。培養細胞全載標本作製は以下のごとく行った。Formvar 膜被覆メッシュ上に両細胞を混合培養し，一定期間後37度Ｃに加温した2.5％グルタール溶液中で細胞を固定する。１％オスミウム酸で後固定，２％ウラニル水溶液中で30分染色する。段階的に濃度を上げてエチルアルコール溶液で脱水し，臨界点乾燥後，カーボン蒸着した。（結果及び考察）１）Formvar 膜は，しばしば棄損したり，収縮し，しわができる。このため，そのような所見の少ないメッシュ孔近辺の部位が検索可能であった。２）メサンギウム細胞はマイクロフィラメントの豊富な細胞で，内皮細胞の細胞小突起と一部分接触していた（写真Ａ，Ｂ）。細胞接着部位を微細構造レベルで検討する際，超高圧電子顕微鏡による全細胞の観察は，立体的所見がとらえられなど情報量が多い。今後は細胞の機械的変形の問題をさけるためエポン包埋，厚い切片でも検討する必要がある。

（参考文献）

1．Oite T, Suzuki Y, Morioka T, Saito M, Shimizu F. Efficient isolation of rat aortic endothelial cells by elimination of contaminating cells with a monoclonal antibody. Microvasc. Res. 50: 113-118, 1995.
2．Saeki T, Morioka T, Arakawa M, Shimizu F, Oite T. Modulation of mesangial cell proliferation by endothelial cells in coculture. Am. J. Pathol. 139: 949-957, 1991.
3．Oite T, Saito M, Suzuki Y, Arii T, Morioka T, Shimizu F. A specific Thy-1 molecular epitope expressed on rat mesangial cells. Exp. Nephrol. 4: 350-360, 1996.
4．Narisawa-Saito M, Kimura S, Fujiwara N, Oite T, Shimoji K, Shimizu F. Thy-1-mediated phosphatidylinositol turnover in cultured rat glomerular mesangial cell. J. Cell. Physiol. 168: 705-710, 1996.
5．追手　巍，森岡哲夫　腎糸球体における内皮細胞とメサンギウム細胞の相互作用　日本腎臓学会誌 40: 75, 1998.（日本腎臓学会学術総会シンポジウム，演題抄録）



図Ａ：ヒト糸球体内皮細胞とメサンギウム細胞の混合培養所見。細胞全載標本でメサンギウム細胞（左）に伸びた細胞突起の一端で内皮細胞（左）が接触している（倍率，×5,280)。



図Ｂ：図Ａの矢頭の部位の拡大所見（倍率，×17,900)。

8．分離培養破骨細胞のグリッド全載試料の細胞骨格とくに接着装置としての podosome の構造解析

明坂　年隆（朝日大・歯・解剖第二）
有井達夫（生理研）

破骨細胞は骨表面に接着することによって骨吸収を開始し骨のリモデリングを通じて接着，離脱過程をくりかえす。破骨細胞の接着装置としては細胞骨格のアクチン線維が集積した podosome が知られている。一方 *in vitro* 破骨細胞では培養基質が何であるかで podosome を形成したりしなかったりする。骨片上で培養すると膜面の分化形態として刷子縁と podosome 集合体である明帯が区別されるが，ガラスやプラスチック上で培養した破骨細胞では刷子縁構造が形成されないが接着機構としての podosome は形成される。このような分離培養破骨細胞の接着構造について通常超薄切片法とともにグリッド全載標本による超高圧電子顕微鏡を用いて解析した。生後一週齢の白色ウサギの長管骨内面の骨質を骨髄組織と共にキュレットし medium 199 培地との混合液をフォルムバール膜金グリッド上で１～２日間培養し液化プロパンにて浸漬急速凍結固定，真空デバイス社製 VFD-300 にて凍結乾燥，オスミウム酸による蒸気固定を加え超高圧電子顕微鏡試料とした。または凍結固定後マイナス80℃に冷却したオスミウムアセトンにて凍結置換した

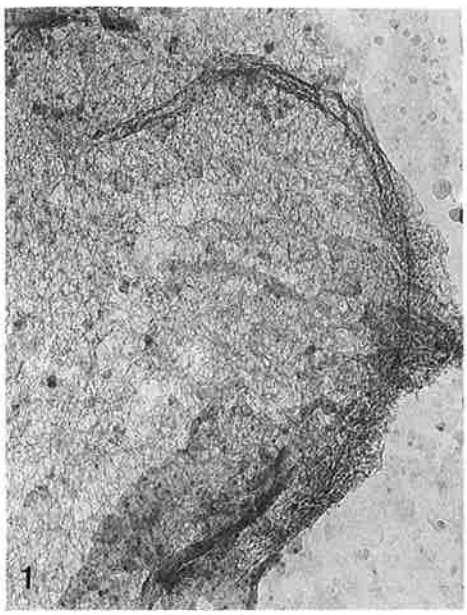


写真１　分離培養破骨細胞の辺縁部の膜性成分と細胞骨格要素からなる lamellipodium を示す。倍率は19,000倍

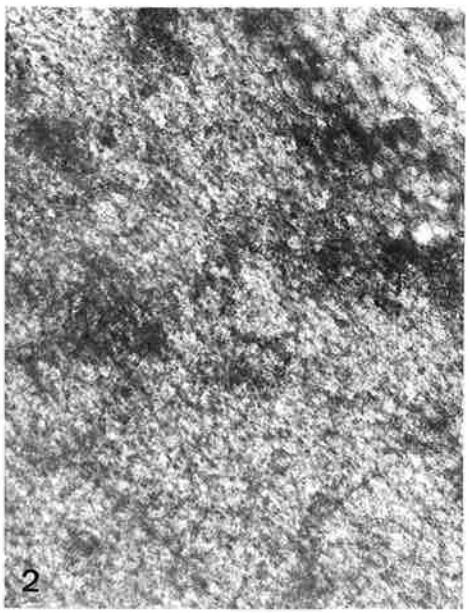


写真２　細胞質辺縁の podosome の融合した密に集積した微細線維の集合体の部分を示す。倍率は39,000倍

試料を超薄切片とし通常透過型電子顕微鏡で観察した。フォルムバールを張った金グリッド上に分離した破骨細胞を培養することしばしば困難で明瞭なスポット状の podosome を形成することはなかった。それらに代わり細胞質辺縁部の lamellipodium には細胞外縁に沿って走行するマイクロ線維が密集していた（写真１）。細胞辺縁のこの部には細胞小器官は存在せず細胞骨格要素で占められていた（写真２）。プラスチックやガラス，骨，歯牙の上で培養すると典型的な podosome が出現するがコラーゲンゲルの場合は形成されず今回のフルムバール膜上で破骨細胞を培養したとき骨，ガラス面と同様な接着装置が形成されるかどうかは今後の検討課題である。また破骨細胞の厚みが10数ミクロンまで達することがあり超高圧電子顕微鏡をもってしても観察困難なことがしばしばあった。運動性を示す破骨細胞ではスポット状の podosome が形成されるが運動能の喪失とともにより強固なスポット状からそれらが癒合連結した接着構造が作られると考えられ今回フォルムバール上で分離培養した破骨細胞の辺縁部に見られるマイクロ線維の集積は接着装置を反映しているものと考えられる。

9．細胞融合過程におけるミクロフィラメント構造の立体観察

谷口美恵子，荒金宏臣（名古屋大・理・物質理学専攻）

植物のプロトプラストをパルス電場により細胞融合させ，融合過程に重要な役割を果たしていると考えられるアクチンフィラメントやマイクロチューブルなど細胞骨格フィラメントがネットワーク形成に関与している様子を超高圧電子顕微鏡でステレオ観察しコンピューター画像解析法で明らかにした。ダイズのプロトプラストは交流電場（周波数 1MHz, 200V/cm,30秒）をかけると電場方向に細胞同士が一列に並ぶ構造をとる。さらに直流パルス (1600V/cm, 50μs duration) を加えると細胞の融合が始まる。融合が始まった細胞を，固定，包埋し，厚さ 0.1μm, 0.5μm に薄切した試料を 1MeV の超高圧電子顕微鏡で立体観察した。DMSO で処理をしたプロトプラスト試料では，アクチンフィラメントが壊れる事なく良い電子顕微鏡像が得られた。前回厚い試料で細胞小器官や小胞体を網目状に取り囲んでネットワークしているアクチンフィラメントの様子を立体的に観察したことを報告した[(1)]。

今回はまず融合細胞のアクチンフィラメントを FITC でラベルしたアクチン抗体で蛍光染色し融合過程を共焦点レーザー顕微鏡を使つて調べてみるとネットワーク状に広がつていたアクチンフィラメントが融合部位にむかつて螺旋状に絞り込まれていく様子を三次元的に捕らえた[(2)]。２つのプロトプラストが融合して出来たと思われるくびれた穴のある部位を超高圧電子顕微鏡を使つて高倍率で立体観察すると，フィラメント同士が螺旋状にサイドバイサイドに結合してアクチンリングのトンネルが構築されていた。図１は，アクチンフィラメントが細胞融合部位でリング状集合体を形成している様子を傾斜角±14°で撮像したステレオ像である。今回植物細

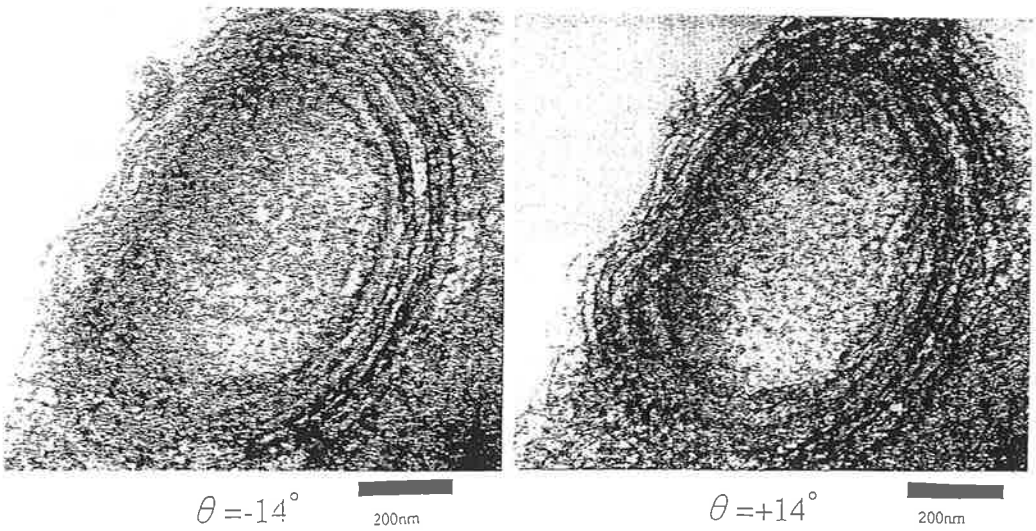


図1　アクチンリングの超高圧電子顕微鏡による観察
ステレオ像は試料を電子線の入射方向に垂直な面に対して±14°傾斜させて撮影した。渦巻きリング状になったフィラメントが観察された。

胞の細胞融合に関わる細胞骨格フィラメントのリング形成を明らかにした。

(1)　生理学研究所年報18巻，280-281 (1997)
(2)　第20回レーザー顕微鏡研究会報告書 46-53 (1997)

10. アクチン及びアクチン複合体のクリスタルの電子線回折と高分解能観察

一海孝光（愛知県芸大）
有井達夫（生理研）

ActoDNase1 複合体のクリスタルを－230度Cに急速冷却し，超高圧電子顕微鏡下で－160度Cに於いてその電子線回折を観察した。加速電圧は 1,000kV に設定した。これにより13.8オングストロームの反射が得られた。

オーストラリアの dos Remedios 等のグループがイカの外套の筋肉のアクチンが作るマイクロクリスタルの電子線回折を行い，それから13.5オングストロームの反射を得たと報告している(1)。さらに松下国際研のグループはアクチンフィラメントのX線回折が27オングストロームの反射を生じると報告している(2)。これらの報告から考えて，13.8オングストロームの反射はアクチン内部のヘリックスから生じているものと推定される。Direct Spot の周辺部でこのような

反射が得られたのでさらに中心に近い部分でもこのような反射が得られるはずであり，今後さらに多くの反射が得らるように改良を行っていく予定である。dos Remedios 等は電子線の照射を弱くして回折像を得るために，20μm 口径のコンデンサーを使いレンズの焦点を over-focus にして写真撮影を行っている。なお彼等は室温で実験を行ったようである。我々は極く短時間電子線をクリスタルに当てることにより，クリスタルの損傷を少なくしている。電子線回折の方法は近年2次元クリスタルを用いてチュウブリンの構造が明らかにされたのを見ても大変有用な方法であることがわかる[(3)]。

1．A Comparison of the Unit Cell of Dreied and Hydrated Actin Microcrystals Curmi, P. M. G., Tulloch, A.V. D. P.A., dos Remedios, C.G. (1983) Actin (dos Remedios, C.G. and Barden, J. A. eds) Academic Press Australia pp 45-52.

2．Native Thin Filament 配向ゾル X 線回折像のトロポニンの反射　牧野浩司，小田俊郎，山下一郎，難波啓一，前田雄一郎 (1997) 生物物理 37 Supplement 2 S141.

3．Structure of the αβ Tubulin Dimer by Electron Crystallography Nogala, E., Wolf, S. G., and Downing, K. H. (1998) Nature 391 199-203

11. 有機物結晶の電子線照射損傷

大野　完，仙石昌也（愛知医大）
有井達夫（生理研）

有機物結晶の電子照射損傷の指標として，電子回折像の消滅速度の測定が広く行われてきた。初期の研究において，回折斑点が消滅する臨界照射量は加速電圧とともに増加することが報告されていたにも拘わらず，多くの測定は 100 kV で行われてきた。今回，生理研の超高圧電子顕微鏡を使用することにより，より正確な電子照射量の測定を行い，100-1,000 kV の範囲における臨界照射量の加速電圧依存性を調べた。

実験結果の解釈を容易にするために，試料には，ラングミュアー＝ブロジェット法で作成したベヘン酸の単分子膜を使用した。試料上の同一照射領域からの電子回折像をイメージングプレートに一定時間間隔で連続的に記録した。試料は室温に置かれ，試料上の照射領域は直径 6-10 μm であった。たとえビームの変動があっても確実に照射領域内からの回折像を記録するために，試料上直径 3 μm の領域を制限する制限視野絞りが使用された。試料を通過した電子流の強度は，電子線の通路にファラデーケージを挿入して測定した。今回の実験における試料上の電子電流密度は，0.03-0.15 electrons/$Å^2$·s であった。生理研の超高圧電子顕微鏡では，正確に露光時間を制御できる機械的シャッターを試料の上部に挿入できるので，その開閉により試料を照射する電

子量を正確に決定することができた。特に,この機構により照射開始初期における電子回折像の記録が可能になった。

実験結果の概略は次の通りであった。ベヘン酸の単分子膜は第1図のような4.2 Åの格子定数をもった6回対称の電子回折像を示した。この1次の回折斑点の強度を測定し，それが照射初期の値の1/eに減少するまでの電子照射量を求めた。それを臨界照射量と定義する。こうして測定された臨界照射量の加速電圧依存性を第2図に示す。同図に見られるように，加速電圧が増加すると臨界照射量は増大し，1,000 kVでは100 kVの場合の約6倍になる。イメージングプレートで記録するとき，1,000 kVの電子線の強度は，114 kVの場合の1/6に減少するが，電子数変動に対する検出量子効率は40%に減少するだけである。それ故，電子照射に弱い有機物結晶の電子回折像を観察するには，加速電圧1,000 kVでイメージングプレートに記録することが有利であると結論できる。

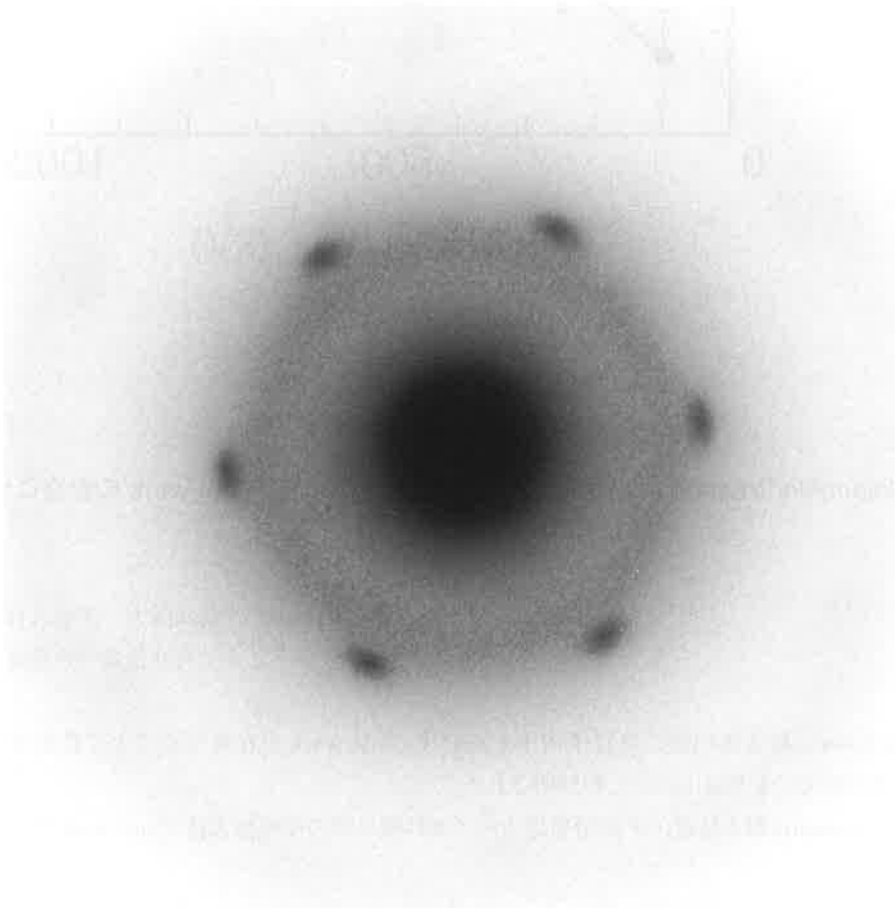


図1．ベヘン酸単分子膜の電子線回折像

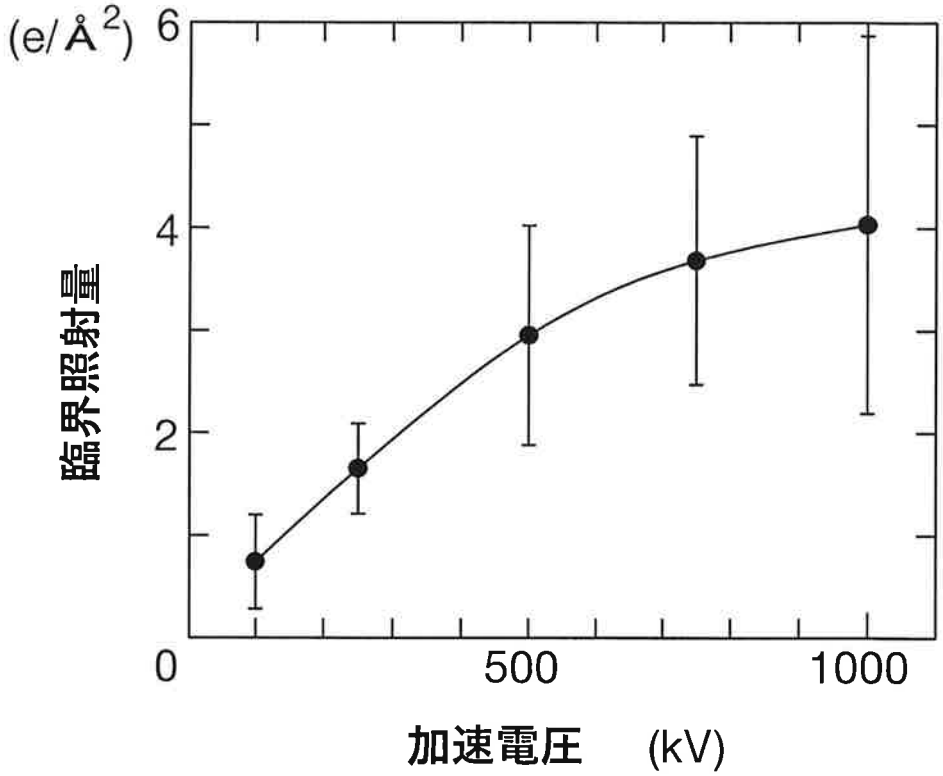


図２．臨界照射量の加速電圧依存性

12. *Chlamydia trachomatis* 封入体における intra inclusion net work の存在について …第２報

保條説彦，岡本俊充（愛知医大・産婦人科）
有井達夫（生理研）

C. trachomatis 封入体内部には粒子同士を連結する net work が存在することを前年度報告した。以後の研究により以下のことが解明された。

１）*C. trachomatis* 封入体は，その増殖環の中で30時間以降の成熟封入体で net work 構造が出現する。

２）初期封入体（30時間以前）では net work はほとんど認められず，封入体膜未接触の情報伝達ができなかった巨大化した RB が崩壊し，同時に粒子内部より glycogen を多数付着した

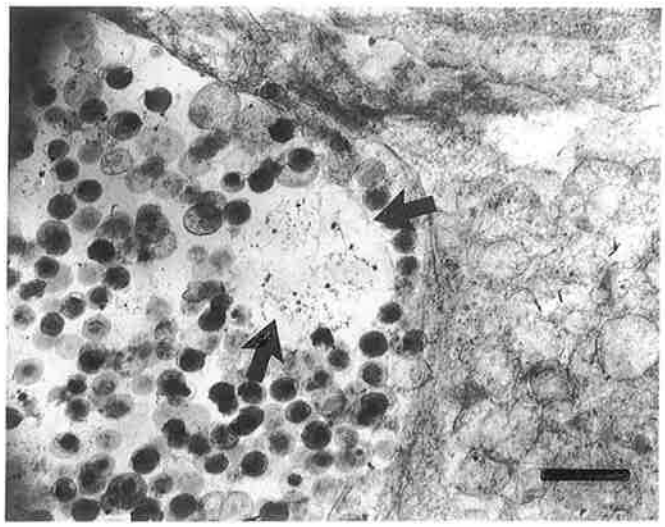


Fig. 1　C.T 接種後28時間の封入体
（矢印：巨大化した RB の崩壊と内部の net work 構造物の排出。Bar ＝ 1μm）

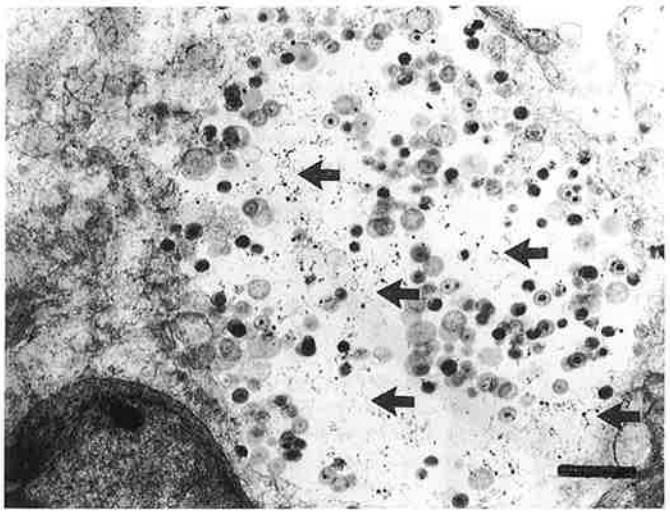


Fig. 2　C.T 接種後36時間の封入体
（矢印： net work は封入体内の間隙に散在し，その周囲に glycogen 顆粒を付着する。Bar ＝ 2μm）

net work 様構造物の排出が認められる (Fig. 1)。

3）RB より排出された内部構造物（Net work 構造）は，末期成熟封入体において封入体の粒子間隙に拡散して認められ，両者は形態的に同様の構造物と思われる。

4）3）の net work の所見については，SEM による過去の報告と一致し，TEM による検出は初

めてである。2）については，超高圧電顕を用い初めて観察された。
5）今後 net work の機能と抗原性につき検討を加える。

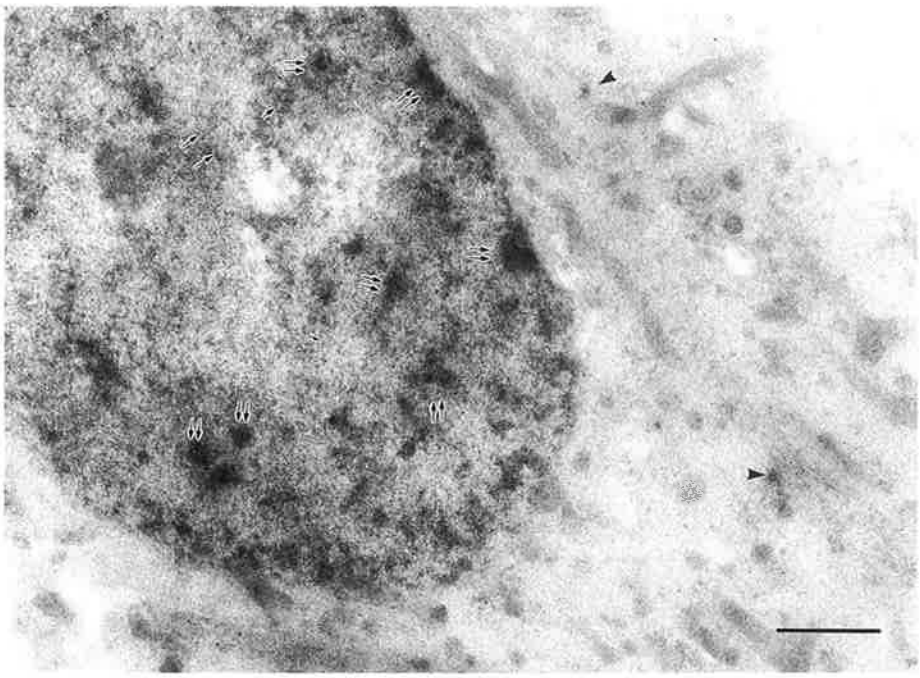
13. 中枢神経系におけるグルココルチコイド受容体の state-dependent な局在の変化：超高圧電子顕微鏡を用いた解析

小澤一史，西　真弓，河田光博（京都府医大・第一解剖）

副腎皮質ステロイドの一つであるグルココルチコイドは神経系において，神経細胞や神経膠細胞に作用し，これらの細胞機能発現に重要な働きを演じていることが知られている。グルココルチコイドはその受容体と結合して，核内の DNA 上の Hormone responsive elements (HRE) と結合し，転写促進因子の一つとして作用する。ステロイドホルモン受容体の細胞内における分布は，一般的にはエストロゲン受容体に代表されるように核内に存在していると考えられているが，グルココルチコイド受容体 (GR) はリガンドであるグルココルチコイドの濃度に依存して，細胞質から核へと移行することが想定されている。

そこで実際の神経細胞における GR の細胞内局在を観察する目的で，免疫電子顕微鏡法により GR の分布を観察し，超微細構造，特に立体的超微細構造との関連性を検索する目的で，1 μm の厚さの切片を，超高圧電子顕微鏡を用いることにより観察した。試料の作成は，ラット脳を 4 % パラホルムアルデヒド−0.1%グルタールアルデヒド混合液で灌流固定した後，同固定液に 2 時間浸漬固定し，30%蔗糖の入った PBS に 3 日間浸漬した。試料を急速凍結後，クリオスタットで 30 μm の凍結切片を作成し，浮遊法で免疫組織染色した後に，脱水，エポン包埋して 1 μm の準超薄切片を作成し，超高圧電子顕微鏡で観察を行った。切片は海馬の領域や視床下部室傍核の小細胞性領域，弓状核などにおいて観察を行った。

通常のコントロール群においては，いずれの部位においても，ごくわずかの反応が細胞質にも認められたが，免疫陽性を示すほとんどの DAB の酸化沈殿物が核内に認められ，特にクロマチンと一致するような核内分布を示した。したがって，通常のコルチコステロイドが体内を循環している状態においては，GR は核内へ移行して存在することが確認された。この細胞内局在を確認する目的で高圧電子顕微鏡を用いて観察することは，極めて有用であることも明らかとなった。これまでの我々のデータから，循環コルチコステロイド濃度の変化により，GR の細胞内における移動が想定されることから，例えば培養細胞等を用いて GR を発現させ，この GR の細胞内局在変化を培養細胞そのままで超高圧電子顕微鏡を用いて観察することが出来る可能性が示唆され，今後の研究への有用性が確認された。



視床下部室傍核小細胞性領域の神経細胞におけるグルココルチコイド受容体の免疫細胞化学像。DAB の酸化沈殿物が黒く観察される。ごくわずかの免疫反応が細胞質にも認められる（矢頭）が，反応の多くは核内にクロマチンの分布に一致するように認められる（矢印）。Bar = 1 μm.

14. グリオーマ細胞の接着能，浸潤能に関する超高圧電顕観察（継続）

埠本勝司，伊地智昭浩（兵庫県成人病センター・脳神経外）

有井達夫（生理研）

濵　　清（岡崎国研機構）

【実験目的】

グリオーマ細胞は正常脳組織に容易に浸潤する性質を持つが，そのメカニズムはよくわかっていない。細胞浸潤には突起の伸展のみならず細胞外マトリックス等の細胞接着因子が関係すると考えられることから，昨年度はラットの培養系においてグリオーマ細胞と正常グリア細胞の Co-culture を行い細胞相互の interaction を超高圧顕微鏡を用いて立体的に観察し，CD44 受容体の発現を免疫電顕でも確認した。今年度はヒトの正常グリア細胞とヒト悪性グリオーマ細胞の Co-culture において接着様態が異なるか否か，更に昨年度は観察し得なかった他の接着分子受容体 (Cadherin, Integrin) の発現の有無や特徴について超高圧電顕下に観察した。

【実験方法】

ヒト正常 Astrocyte (NHA4524) は米国 Clonetics から購入し，20%FBS 加 AMBTM (TaKaRa Code: B3187) 培地で培養した。これらの培養細胞中に，株化された非ヒト悪性グリオーマ細胞である U-251MG 細胞を加えて，サーモノックス板上で共同培養を行い，24時間，48時間後に PIPES Buffer で洗浄，4% Paraformaldehyde で固定した。CD44s, CD44v, Integrin, Cadherin, Fibronectin 及び VEGF, VEGF receptor (KDR, Flt-1) 抗体を 4 ℃12時間作用させた後，抗マウス金コロイドで標識し，2% Glutal-aldehyde 及び 1% Osmium 酸で二重固定した後，アセトン系列で脱水後臨界点乾燥し，カーボン蒸着後日立 H-1250M 型超高圧電子顕微鏡で立体観察をおこなった。

【結果および考察】

ヒト正常 Astrocytes は規定の培地では増殖速度は弱いものの比較的安定した増殖を示し，広い胞体を培地の底面に接着させて長い突起をだす。グリオーマ細胞とは数倍大きく，大きさの上で一見して区別できるほどの明らかな差が認められだけでなく，その増殖速度に明らかな違いが認められた。まず正常 Astrocyte を 20%FBS 加 AMBTM (TaKaRa Code: B3187) 培地で 1 週間培

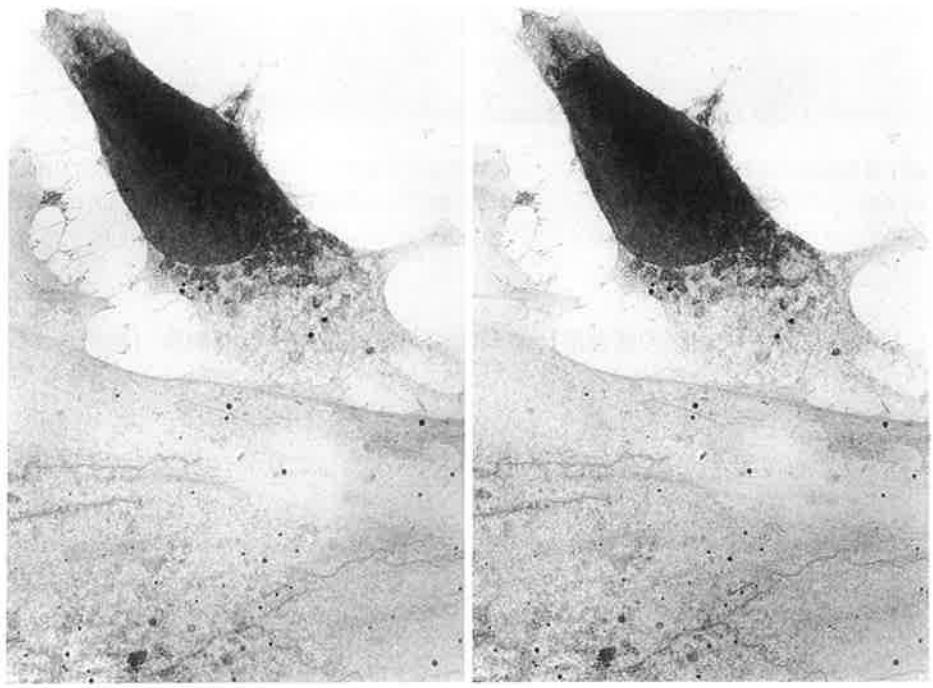


Fig. 1　(×1,500)

Stereo-pair of high voltage electronmicrograph of Normal human astrocyte and attached U-251 glioma cell in the primary co-culture with AMBTM (TaKaRa Code: B3187) medium. at 24 hours after co-culture. The large normal astrocyte (lower half) has elongated mitochondrias and intermediate filaments in the wide cytoplasm and small glioma cell with oval nucleus, many mitochondrias and dense bodies in the cytoplasm (Upper half) attached to the normal astrocyte with fine cell processes.

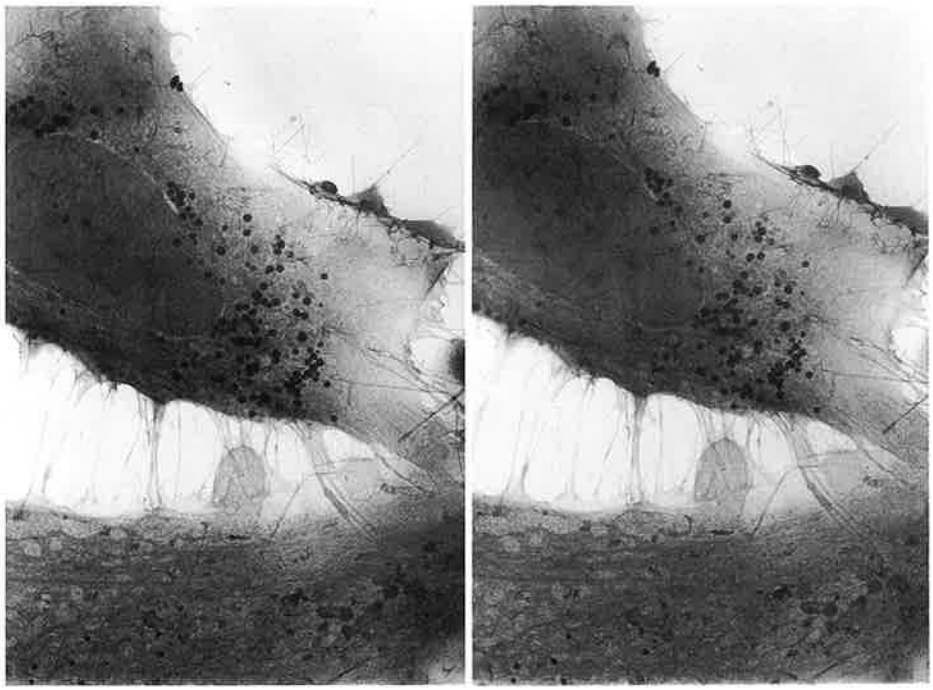


Fig. 2　(×2,200)
Stereo-pair of high voltage electronmicrograph of another Normal human astrocyte and attached U-251 glioma cell at 48 hours after co-culture. Many fine cell processes of the U-251MG (upper half) are attached to the normal astrocyte (lower half).

養し突起を伸ばして充分広がった時期に MEM 培地で培養した U-251MG 細胞を加えると，24時間以内に中型で bipolar ないし tripolar な細胞突起を持つ U-251MG 細胞が大型の Astrocyte に付着しはじめた (Fig. 1)。接着面の観察において U-251MG 細胞表面から小突起を正常グリア細胞に伸ばしはじめて大きな正常 Astrocyte の細胞膜に接着していくのが経時的な標本で観察された。両細胞の接着した細胞突起の表面に昨年度検索した rat Type-1 astrocyte と C6 glioma cell の co-culture の結果と同様に免疫電顕で抗 CD44s, Fibronectin の反応が認められたが，今回はそれ以外に抗 VEGF 抗体に対する直径 10nm の金コロイドが認められた (Fig. 2)。しかし Integrin, Cadherin 抗体に対する反応は認められず，VEGF receptor である KDR や Flt-1 の発現も認められなかった。正常 astrocyte と U-251MG グリオーマ細胞の接着に CD44s や Fibroncetin 以外にグリオーマ細胞から産生される VEGF が接着にも何らかの役割を持っている可能性が示唆された。

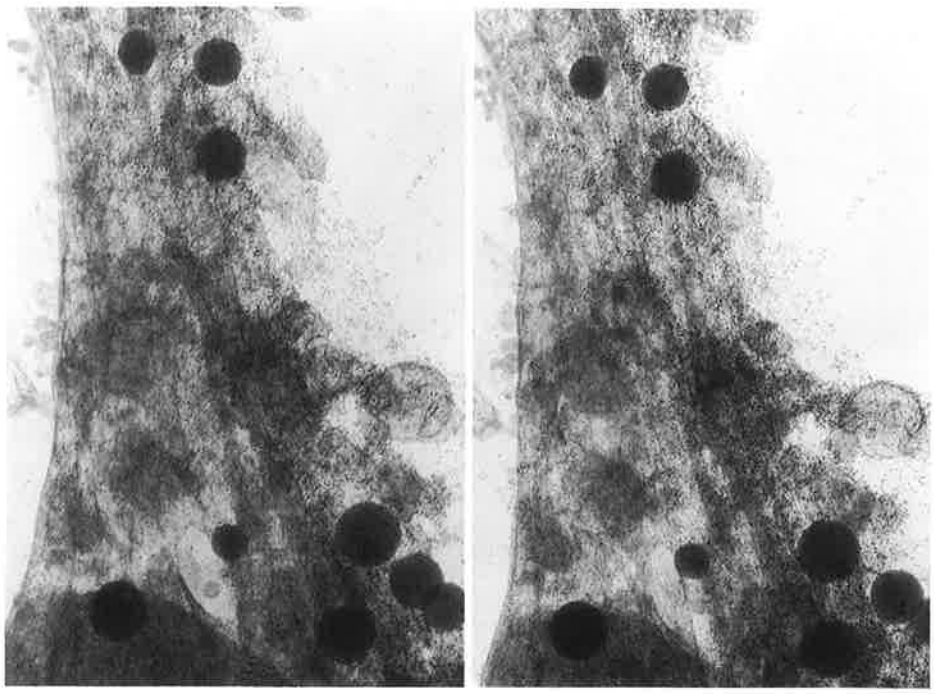


Fig. 3　(×12,000)
High magnification stereo-pair of high voltage electronmicrograph of U-251 glioma cell at 48 hours after co-culture. Many colloidal gold particles of VEGF antibody are seen on the cell process of U-251 glioma cell.

15. 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（九州大・医・解剖第三）

我々は現在，嗅覚の一次中枢嗅球のシナプス構成 (Synaptic Organization) の解析を進めているが，そこで問題なのは，免疫細胞化学法により化学的性質が明らかとなったニューロン種の三次元形態学的同定である。即ち，超薄（連続）切片上で確認されたシナプスがそのニューロンの全体のどの部分にあるのか？言い換えれば，各種ニューロンの特徴的構造のどこにどのようなシナプスがどれだけあるのか？ということである。この様なシナプスの定量的解析上の必要性から，平成９年度は，嗅球各種ニューロン群について，その突起の三次元的微細構造を解析する為，超高圧電顕を用いて形態学的再検討を行った。

まず，免疫及びゴルジ染色された嗅球各種ニューロン群を共焦点レーザー顕微鏡及び描画装置

にて記録後，超高圧電顕にて解析を行い，個々の解析の有用性と組み合わせて解析する可能性を検討した (Toida et al., 1998)。免疫細胞化学法は，切片への抗体の浸透度が様々で形態解析に限度がある。一方ゴルジ法は，化学的性質は解析できないがより詳細な全体像の解析が可能である。そこでゴルジ法により嗅球各種ニューロンの形態学的解析を進め，免疫染色ニューロン像との検討を比較検討を行った。更にゴルジ染色ニューロンを光顕レベルで全体像を解析し，特に複雑な構造を呈する突起部分について超高圧電顕により解析を行った。

光顕下では，Granule Cells の樹状突起は外網状層において特徴的な棘構造 (Gemmules) を伴い複数の突起が複雑に絡み合っていた。超高圧電顕では，複数の樹状突起と様々な形態の複数の Gemmules が近接·密集しているのが観察された。また，Glial Cells の突起が Granule Cells の樹状突起群に複雑に入り込んでおり，Granule Cells のシナプスと Glial Cells の突起との関係が示唆される。

一方 Glial Cells の薄膜状の突起が，外網状層の Tufted Cell の細胞体の周り断続的に取り囲み他方では血管を取り巻いている構造が観察された。

このようなグリアとニューロンとの三次元構造的関係は，現在のところゴルジ染色ー超高圧電顕法が最も高い解像度で解析できるものと考えられ，現在解析を進めている。

16. ラット樹状細胞の組織内における微細構造の三次元解析：Ⅱ．ラット肝の樹状細胞の動態

江崎太一，松野健二郎（熊本大・医・解剖第二）
有井達夫（生理研）

研究目的：

抗原提示樹状細胞 (DC: dendritic cell) は様々な免疫反応の場で重大な役割を果たしているものの，実際の組織内での形態や周囲の細胞との接触形態などの細胞間相互作用に関する基本的な情報に乏しい。我々はこれまでラットの DC について，主に免疫組織化学的方法により，光顕的にそれらの分布・動態を検索してきた（文献１，２，３）。今回は異系ラットに移植されたドナー肝臓由来の DC が，宿主動物の体内でどのような動態をとるかに注目してその局在と三次元的広がりを高分解能を持つ超高圧電子顕微鏡 (H-1250M) を用いて解析を加えた。

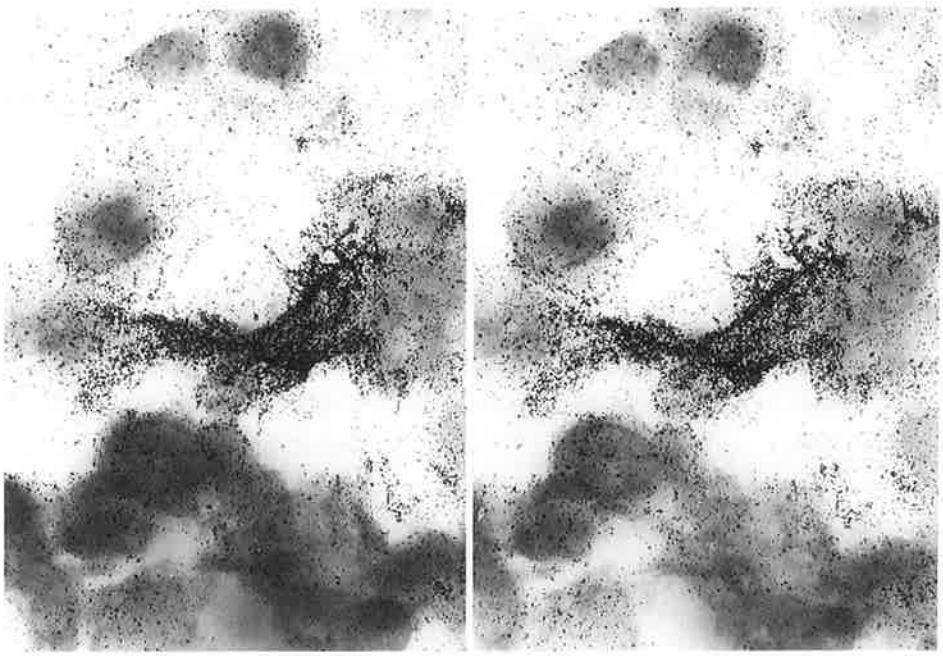
研究方法：

DA ラットの肝臓を Lewis ラットに移植し，36時間，48時間後に PLP 固定液による還流固定後，脾臓・リンパ節を採取し，30％果糖リン酸緩衝液に浸漬後，約50ミクロンの凍結切片を作成した。抗 DA 主要組織適合抗原に対する抗体 (MN4-91-6) と 2nm-イムノゴールドによる免疫染色後，銀増感 (BioCell) を行なった。光顕で DC の分布する部位を確認後，さらに５ミクロンの連続切片を

作成し，DC の異系ラットの脾臓ならびにリンパ節内での局在と局所における DC の三次元的構造を超高圧電子顕微鏡によって観察した。

研究結果・考察：

光顕での検索の結果，DC は肝臓移植後36時間目には既に異系宿主ラットの脾臓の白脾髄にならびにリンパ節内へ多数観察された。MN4-91-6 陽性細胞は，脾臓では主に濾胞域と動脈周囲リンパ鞘 (PALS) の外側に分布しており，超高圧電子顕微鏡でこれらの部分を観察した。濾胞域に分布する細胞が，比較的大型で長い突起をほとんど持たないのに対し，PALS 域に存在する細胞は，長い突起を有する樹状の細胞が多かった。今回は，免疫染色がやや不完全であったために細胞膜を均一に連続した膜としては見ることができなかったものの，局所での細胞突起の広がりがある程度明瞭に観察された。それらの突起は，鹿の角状のものからベール状のものまで様々であり，一部では周囲の細胞を包み込んでいるように見える（図)。一方，DC を直接静脈注射後同様に免疫染色した標本を通常の透過型電顕で観察すると，やはり複雑な細胞突起で周囲の細胞を取り囲みながら細胞集塊を作っているような典型的な DC 像が観察された。また，このように DC と接触を持つ細胞の中には細胞増殖中のリンパ芽球様細胞がしばしば見られた。以上のこと



異系ラット脾臓内に移動した DC の超高圧電子顕微鏡によるステレオペア像；肝臓移植後36時間目の脾臓，T 細胞領域に見られた DC。鹿の角状のものからベール状のものまで複雑な細胞突起を伸ばしつ，周囲の宿主細胞とロゼットを形成している。×2,800。

から，DC は異系宿主ラットへの移植後そのリンパ組織内の胸腺依存域に集まり，複雑に延びた細胞突起で多数の宿主側細胞と細胞集塊（ロゼット）を形成することが分かった。その結果，DC は宿主側の細胞に抗原提示を行ない，それらの細胞の免疫反応を惹起しているものと思われる。

本研究の成果：

Matsuno K, Miyanari N, Kudo S, Saiki T & Ezaki T

Alloantigen presentation by dendritic cells in situ.

in "Keystone Symposia on Cellular and Molecular Biology of Dendritic Cells"

(Santa Fe, New Mexico; March 7-13, 1998) 発表予定

参考文献：

1. Matsuno K, Ezaki T, Kudo S & Uehara Y (1996) A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: Their terminal division active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. J Exp Med, 183 (4): 1865-1878
2. Kudo S, Matsuno K, Ezaki T & Ogawa M (1997) A novel migration pathway for rat dendritic cells from the blood: Hepatic sinusoids-lymph translocation. J Exp Med, 185: 777-784
3. Ezaki T. & Uehara Y. (1997) Thymic nurse cells forming a dynamic microenvironment in spontaneous thymoma BUF/Mna rats. Arch Histol Cytol, 60: 39-51

17. 発達期脳の神経細胞フィロポディア様突起の 3 次元立体構造解析

村上富士夫（大阪大・基礎工・システム人間系）

C. J. Wilson （Dept. of Anatomy, Univ. of Tennessee, USA）

発達期の脳の神経細胞には多数の棘またはフィロポディア様突起が見られる。棘状の突起は成熟脳においてもみられるが，発達期に存在するものはそれに比べてはるかに数が多く，また形態が複雑である。その意義に関してシナプス形成との関係が考えられているが，明確なことはわかっていない。また構造についてもその複雑さゆえ，十分な記述がなされていない。本研究では昨年度に引き続き細胞内染色をおこなった新生ネコの赤核細胞を材料として用い，その構造を定量的に記述することを目的としておこなった。

生理学的に同定した新生ネコの赤核細胞を HRP の細胞内注入で染色し，連続超薄切片の通常の電顕による観察と，2-3μm の厚さの連続切片の高圧電子顕微鏡による観察と定量化を行った。

樹状突起から伸びる多様な形態の棘様突起は細胞体，近位樹状突起，遠位樹状突起のいずれの部位においても観察された。細胞体は 2-3μm の短い突起によって覆われていた。いっぽう樹状突起にはそのほぼ全長に亘って糸のように細長い突起が伸びる様子が観察された。その長さは長いものでは 10μm にも及んだ。またその密度は極めて高く，樹状突起のほぼ全表面が突起によっ

て覆われていた。遠位樹状突起では近位樹状突起に比べて，密度が低く（1/2−1/3）なっていた。

最近のタイムラプス計測によると樹状突起からでる棘様突起は秒のオーダーで形態が変化している。このことは棘様突起は短期におこる可塑性に関与している可能性を示唆している。一方我々は大脳ー赤核シナプスの多くはこのフィロポディア様突起の上に選択的に形成されていることを明らかにした。また成熟ネコでは小脳からの線維は赤核細胞の細胞体部に，大脳皮質由来の線維は樹状突起にシナプスを形成している。いっぽう小脳からの線維は大脳由来のものよりも２週間ほど先行して，赤核に入ってくる。そこで次のようなことが考えられる。すなわち，発達の時期が比較的早い小脳からの線維は，比較的早い時期に赤核へ到達する。そのころは樹状突起の発達が充分ではないため，シナプスは細胞体部にしか形成されない。その後樹状突起が伸長して充分に発達した段階で大脳性線維が到着し，シナプス形成が始まる。この時には充分発達した樹状突起があるため，またフィロポディア様突起の働きもあってシナプスの多くは樹状突起に形成されるのかもしれない。

18. 神経細胞およびグリア細胞突起の CT 解析

濵　　清（岡崎国研機構）
M. H. Ellisman （NCMIR, Univ. Cal. San Diego, USA）

ほ乳類中枢神経系の灰白質部は血管および少量（約15％）の細胞間基質を除き，神経細胞およびグリア細胞の細胞体と突起で占められている。中枢機能の理解のためには，これらの細胞突起のひろがり，長さ，表面積　体積等の定量的な計測値を知る必要がある。我々はゴルヂ染色法を用いて個々の神経細胞およびグリア細胞を選択的に染め出し，神経細胞については樹状突起およびスパインについて，グリア細胞については星状グリア細胞の灰白質内細枝および血管小足についての定量解析を行っている。これらの細胞突起は極めて繊細なので光学顕微鏡による解析では不正確であり，また大きな拡がりを持つので超薄連続切片を用いた電顕三次元再構築法は適用しにくい。我々は４～５μm の切片を用いて超高圧電子顕微鏡による三次元立体計測を行っている。ラット歯状回顆粒細胞の樹状突起スパインについては画像処理により二値化，骨格化像を得たのち computer 三次元解析法によって，長さ，表面積，体積について興味深い所見を得て報告した。現在，CT 法による解析を行っている。

星状グリア細胞の細突起の詳細はゴルヂ染色標本を用いた超高圧電顕による立体観察ではじめて明らかにされた。神経細胞体，樹状突起，およびシナプス部を取りまく星状細胞突起の厚さは50nm 以下の部分が多く光学顕微鏡では細胞突起の存在を判別することができない。また血管周辺には血管足の他に，多数の血管小足が付着し，先端が薄い小判状のパッチとなって血管を取り囲んでいる。血管に近い星状グリア細胞突起の多くが神経性要素を取り囲む一方で血管小足を出

しているので，神経細胞と血管の関係は従来のモデルで考えられていたものより，はるかに密接なものであることが分かった。星状グリア細胞は細胞外Kイオンの調節の他に神経伝達物資の取り込み，処理，Caシグナルの伝搬などを通して神経細胞機能に大きな影響を持つが，これらを正確に理解するためには脳実質内での星状グリア細胞の三次元的定量形態解析が必須である。我々はUCSDのM. H. Ellismann教授のグループとの共同研究でCT解析のためのプログラム開発を進めている。その結果の一部は1997年アメリカ顕微鏡学会で招待講演発表を行った。さらに精度を高めるため超高圧電顕および解析ソフトの両面での改良を進めている。

【 生体磁気計測装置
共同利用実験報告 】

生体磁気計測装置共同利用実験報告

〔目　　次〕

1．視覚呈示された言語課題による脳磁界反応の解析（栗城真也他）　…… 246
2．ヒト中枢神経系における歯髄感覚入力投射部位の同定（岩田幸一他）　… 247
3．知覚・記憶の脳内機構の脳磁場計測による研究（苧阪満理子他）　…… 248
4．知的活動と情的興奮に伴う脳磁場の計測（達本　徹他）　…… 249
5．脳磁場を指標としたオクターブ知覚の検討（松井理直他）　…… 250
6．ニオイ刺激による嗅覚誘発反応の脳磁界計測（加藤寿彦他）　…… 251
7．嗅覚刺激誘発脳磁界の multiple dipole analysis （中島健二他）　…… 252

1．視覚呈示された言語課題による脳磁界反応の解析

栗城真也，竹内文也，砂盃尚子（北海道大・電子研）
柿木隆介（生理研）

はじめに

視覚呈示された言語の処理過程を調べるために，37チャネル SQUID 磁束計 2 基を用いて脳神経活動を計測し，MR 画像に重ねて検討した。また，脳磁界を 2 種類のトリガーで時間同期加算することにより，異なる脳活動の抽出を試みた。

方法

被験者は右利きの 9 名である。被験者には，視覚呈示された単語が具象語であるか抽象語であるかをすばやく判断し，左手のボタン押し分けによって回答するよう指示した。単語は新聞雑誌の頻出語からかな 3 文字表記できるものを選んだ。左右側頭上で脳磁界を計測し，ボタン押しに同期したトリガー信号も同時に取り込んだ。計測した脳磁界反応を単語呈示時刻とボタン押し時刻のそれぞれに同期させて（刺激同期とボタン押し同期）120～145回加算平均した。また，それぞれの応答波形を被験者間で平均して被験者に共通した活動が見られる潜時帯（活動潜時帯）を決定した。そして，個々人の脳磁界反応に対して活動潜時帯での単一双極子による信号源推定を行い，被験者毎の MR 画像に重ねた。

結果と考察

刺激同期波形では，活動潜時帯としてⅠ：220 ～ 340ms，Ⅱ：340 ～ 390ms，Ⅲ：420 ～ 530ms が観察された（図 1）。潜時 220 ～ 390ms （Ⅰ，Ⅱ）では，被験者に共通した左紡錘状回付近，右島，左海馬傍回付近，左上側頭溝中部の活動が観察された。左紡錘状回は単語の「視覚認知」に関わるという報告がある。また，左海馬付近は「記憶」との関連が報告されている部位であり，Wernicke 野近傍の左上側頭溝中部は単語の「音韻変換 (phonological)」や「意味理解 (semantics)」との関連が推定されている。潜時 420 ～ 530ms （Ⅲ）では，被験者に共通した左上側頭溝中部周辺と右シルビウス裂後端の活動が観察された。これは，単語の「音韻変換」過程や「意味理解」過程を反映していると推察する。ボタン押し同期波形では，活動潜時帯がⅠ'：-160 ～ -30ms，Ⅱ'：-30 ～ 60ms で観察された（図 1）。潜時 -160 ～ -30ms （Ⅰ'）では，右島，右海馬傍回，右前頭下部などに信号源が推定されたが，被験者に共通した部位はなかった。潜時 -30 ～ 60ms （Ⅱ'）では，被験者に共通した右中心溝の活動が見られた。これはボタン押しによる運動に関係していると思われる。

S. Kuriki, F. Takeuchi and Y. Hirata (1998) Neural processing of words in the human extrastriate visual cortex., Cogn Brain Res. 6: 193-203

S. Kuriki, F. Takeuchi and Y. Hirata (1998) Dynamic excitation of cortical areas during visual information processing., In Brain Topography Today: Y. Koga, K. Nagata and K. Hirata (eds), Elsevier

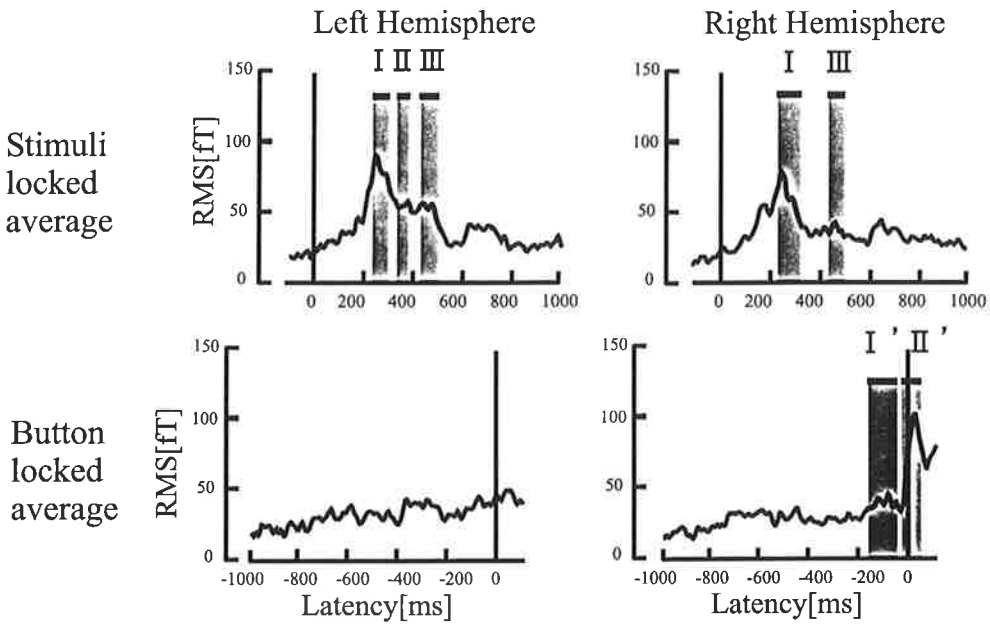


図１：２種類の同期加算法による脳磁界反応の RMS 対の全被験者間平均値。上段は刺激同期，下段はボタン押し同期である。被験者に共通した活動が見られる潜時帯（活動潜時帯）を影で示した。

Science BV, Amsterdam: 262-265

F. Takeuchi, Y. Hirata, S. Kuriki (1997) Neuromagnetic responses related to the visual perception of readable and unreadable characters and word., NeuroImage 5: S536

2．ヒト中枢神経系における歯髄感覚入力投射部位の同定

岩田幸一，坪井美行，野村洋文（日本大・歯・生理）
柿木隆介（生理研）

従来の研究から，歯髄感覚入力は三叉神経脊髄路核に入力し，視床諸核を経由し，大脳皮質第１次感覚野に到達することが明らかにされている。しかし，これまでの研究はすべて動物を用いた研究であったため，動物が実際にいかなる感覚を受容しているかについては全く不明である。そこで我々は，ヒトの歯髄に定量的温度刺激を与えることにより誘発される感覚と，中枢神経における活性化部位の局在を同定し，歯髄感覚情報の投射経路を明らかにすることを目的として脳磁図の研究をおこなっている。実験には健全な歯牙を有するヒトを用いる。ただし誘発脳磁図を記録するには，磁気ノイズが少ないものでなければならない。本年度は刺激機器を試作した。木

とプラスチック，それにファイバーだけを用いた。機器の強度，精密性も要求されるため，何回もの試行錯誤の末に完成した。現在はその機器を用いて記録される反応を試験的に検索する段階である。被験者をアームチェアに座らせ，上顎中切歯の唇側面から温度刺激により誘発された感覚強度を，主観的痛覚レベルとして表示する。さらに刺激強度を様々に変化させ，脳磁図で記録された活性部位とその程度が，刺激強度変化に対し，そのように変化するかを検索する予定である。

3．知覚・記憶の脳内機構の脳磁場計測による研究

苧阪満里子（大阪外語大）
柿木隆介，小山紗智子（生理研）

昨年度に引き続き，ヒトの高次認知機構，とくに運動視における錯視現象の脳内機構についての研究および，ワーキングメモリの脳磁計測による検討を行った。運動錯視としては，運動残像を用いた。この実験では同心円上に拡大運動する視覚運動パタンに順応させたあと，運動を静止させるとその瞬間から運動残像として反対方向への縮小運動が観察される。このとき，パタン自体は物理的に静止しているにもかかわらず，主観的な見えの世界で縮小運動が観察されるので運動錯視と呼ばれる。同心円上に運動する正弦波グレーティングパタンの提示時および静止直後の運動残像観察下でのパタンが誘発する脳内磁場を加算し誘発脳磁場を求めた。後頭葉，側頭葉，頭頂葉を含む右大脳半球から37点のセンサーで観測される磁場変化のデータから等磁界線マップを求め，マップから電流双極子（ダイポール）の位置の推定を行った。その結果，運動および運動残像を生み出す脳内部位の有力候補として後頭葉，側頭葉，頭頂葉の接合領域近傍にダイポールの位置を検出した。この部位は，マカックザルのMT領域のhuman-analogueと推定され，ヒトの運動およびその残像がMT領域での脳の情報処理と関わることが分かった。

また，ヒトの記憶の高次脳内機構の検討のため，リスニングスパン(Listening Span)を用いたワーキングメモリの脳磁場による解析を行った。リーディングスパンテストの測定方法をもとにして作成されたリスニングスパンテストにより，被験者のワーキングメモリ容量を実験心理学的に測定し，それと被験者のワーキングメモリ遂行中の脳磁図のパワースペクトル特性の比較を行った。最もワーキングメモリ負荷の高い条件（閉眼状態で連続した五文を聞きとり，その中に含まれる五単語を記憶して報告する）では顕著な差異が左半球前頭部位で観察された。ピーク周波数は，パワースペクトルのアルファ波帯域でのピークを測定してその周波数を測定した。脳磁図の変化傾向は，ワーキングメモリの処理効率の個人差により影響を受けた。ここでは，ワーキングメモリ容量の効率の高い被験者では4文条件や，5文条件の最も負荷の大きい条件でシフトが最大になる傾向が見られた。一方，ワーキングメモリ容量の効率の低い被験者では2文条件や，3文条件でのみシフトが見られたにすぎなかった。文の数が増えてワーキングメモリの負荷が高

まると，脳磁図のアルファ波ピークが高い周波数に出現する傾向がみられた。シフトが最大になる条件は個人のワーキングメモリの容量に依存することがわかった。シフトが最も顕著であったのは，前頭から側頭にかけての左半球の領域においてであった。結論として，言語にかかわるワーキングメモリの脳機構が一部そこに限局していることが伺われた。

文献

Ashida H & Osaka N (1995) Motion aftereffect with flickering test stimuli depends on adapting velocity. Vision Research, 35, 1825-1833.

中谷和夫 (1995) 行動空間の感性情報処理（新版 "情報処理ハンドブック"，6章4節：オーム社）

苧阪満里子 (1994) ワーキングメモリの認知神経心理学的研究：脳波からのアプローチ，風間書房

Osaka, M. (1998) Effect of working memory load on the peak alpha frequency shift measured with magnetoencephalography. Y. Koga, K. Nagata & K. Hirata (Eds.), Brain topography Today. Pp.167-172, Elsevier Science.

Osaka, M., Osaka, N., Koyama, S., Nambu, A., Nakatani, K. & Kakigi, R. (1996) Peak alpha frequency of magnetoencephalography (MEG) changes during the performance of verbal working memory tasks. Electroencephalography & Clinical Neurophysiology, 97, S123.

苧阪満里子，苧阪直行 (1994) 読みとワーキングメモリ容量，心理学研究，65, 339-345

苧阪直行，蘆田　宏，　苧阪満里子，小山幸子，南部　篤，中谷和夫，柿木隆介 (1996) 脳磁場計測 (MEG) による運動視に関与する脳内部位の推定，日心59回大会，論文集 p.461.

苧阪満里子，苧阪直行，小山幸子，南部　篤，中谷和夫，柿木隆介 (1996) 脳磁図によるワーキングメモリの脳内機構に関する研究，日心59回大会，論文集 p.782.

Osaka, N., Osaka, M., Okusa, T., Naito, T., Koyama, S., & Kakigi, R. (1998) Neural correlates of motion aftereffect using evoked magnetic fields. 6th International Evoked Potential Symposium, Abstract p.255.

4．知的活動と情的興奮に伴う脳磁場の計測

逵本　徹（京都大・医）

南部　篤（東京都神経研）

佐々木和夫，柿木隆介（生理研）

1．目的

暗算や多声音楽のイメージ演奏に集中すると，前頭部に 5-7Hz のシータ波（前頭知的シータ波）が生じ，その電流双極子は左右大脳半球前頭葉の皮質領野に広く分布して推定されることが，こ

れまでの脳磁計を用いた研究で示されている (Sasaki et al. 1994)。感情的興奮によってもシータ脳磁波が観察される (Sasaki et al. 1996) が，その本態は不明である。この点の理解を深めるため，本研究では昨年に引き続き，種々の感情状態における脳磁場を，暗算中や安静状態などにおける脳磁場と比較検討する実験をおこなった。成人の結果と比較検討するために，小児を対象とする計測も行なった。

2．方法

いくつかの感情的興奮状態を閉眼で 維持する課題を被験者に与えた。感情は，喜怒哀楽それぞれの範疇に属するものを，被験者の個人的体験から想起再生するようにさせた。また，比較のため，各被験者が得意とする事柄に集中する課題や，暗算や音楽のイメージ演奏に集中する課題，なるべく無念無想の安静状態となる課題も行わせた。それぞれの課題を遂行中の脳磁場を 2 分間記録し，周波数分析によりその特徴を観察した。

3．結果

暗算や音楽のイメージ演奏により以前の報告と同様に前頭知的シータ波が観察された。感情的興奮では，5-7Hz のシータ脳磁波活動を生じる被験者が複数見い出された。周波数分析により，同一被験者においては前頭知的シータ波と感情的興奮によるシータ波は各々ほぼ一定の固有の周波数をもつが，この両者の周波数は同一ではないことが判明した。また，両者の空間的分布パターンも異なることが明らかになった。これらの電流相極子の位置推定を現在試みている。

4．考察

感情的興奮の際に，前頭知的シータ波とは別の発生源をもつシータ波活動が惹起されうることが示された。このように，暗算課題と感情的興奮課題という異なる課題の際に，発生場所や周波数は異なるが，どちらもシータ波が発現しうる，という事実は，大脳皮質活動におけるシータ波の意義に何等かの示唆を与えるものであろう。今後，小児の結果についてさらに例数を増やして検討考察を加える予定である。

文献

Sasaki K, Tsujimoto T, Nambu A, Matsuzaki R, Kyuhou S (1994) Dynamic activities of the frontal association cortex in calculating and thinking. Neurosci Res. 19: 229-233

Sasaki K, Nambu A, Tsujimoto T, Matsuzaki R, Kyuhou S, Gemba H (1996) Studies on integrative functions of the human frontal association cortex with MEG. Cognitive Brain Res. 5: 165-174

5．脳磁場を指標としたオクターブ知覚の検討

倉片憲治（生命工学工業技術研究所）
松井理直（大阪大・言語文化）
小山紗智子，柿木隆介（生理研）

音の高さの知覚と音響刺激の物理量には良い対応関係があり，純音の場合はその周波数と対応する。すなわち，周波数が増加すると，それに応じて知覚される音の高さが上昇する。このような，周波数と一次元的な関係にある音の高さの性質は tone height（単に「音の高さ」，もしくは「音色的高さ」）と呼ばれる。一方，音の高さは周波数に対して“多次元的”な関係にあることも知られている。例えば，1オクターブ隔たった音同士は同じ音名で呼ばれる。すなわち，ド・レ・ミ・ファ……と音階を上昇していくと，1オクターブ上がった時点で再びドの音名に戻る。このことは，1オクターブ上のドの音は，周波数の上では初めのドの音の2倍であるにもかかわらず，心理的には互いに近い関係にあることを示す。このような，オクターブごとに繰り返す循環的な高さの性質は tone chroma（「音楽的高さ」）と呼ばれる。加えて音楽理論では，完全5度（例えばドとソ），完全4度（同じくドとファ）の音程にある2音は，オクターブの次に近い関係であるとされている。この完全5度をもとに音の近親性を示した関係は，一般に「五度圏」として知られている。このような一次元的でない音の高さの関係は，ピタゴラスの時代から知られており，音の周波数そのものではなく，2音の周波数の“比”に対応すると考えられる。すなわち，オクターブ，完全5度，完全4度の音程にある2音の周波数比は，それぞれ2：1，2：3，3：4と，単純な整数比となっているのである。そして，その単純さが心理的な近さに対応すると考えられてきた。

一方，側頭葉にある聴覚野には音の周波数に対応した局在性 (tonotopicity) が存在する。すなわち，呈示された音の周波数が高くなると聴覚野で誘発反応が生じる位置が外側から内側に移行する（ヒトの場合）。動物の聴覚野の tonotopicity については1960年代から知られていたが，ヒトの聴覚野については80年代に入ってから脳磁場を用いて明らかにされた。このような tonotopicity は tone height の知覚の基礎と考えられている。しかしながら，tone chroma の知覚が聴覚情報処理のどの処理段階で生じているのか，これまで検討されていない。我々は，tone chroma に関連した脳部位の検索を脳磁場を用いて行った。14名の被験者から脳磁場を記録し，現在，データの解析中である。

6．ニオイ刺激による嗅覚誘発反応の脳磁界計測

加藤寿彦，白石君男，毛利　毅，原田博文，周防屋祐司，力丸文秀（福岡大・医・耳鼻咽喉科）
柿木隆介（生理研）

脳が自然界に40万種類もあるニオイ分子から，どのようにニオイを識別しているかというメカニズムについて，1991年に Freeman が，動物実験（ネコ）の嗅球に多数電極を配置して脳電位図 (EEG) より 40Hz を中心とした高周波数信号（γ 波）を記録して，その平均振幅の空間的なパターンは，ニオイのかぎわけや学習に関わっていることを明らかにしている。われわれは，

SQUIDを用いてヒト（正常者）のニオイ刺激による脳磁図を測定し，それらの信号を高速フーリエ変換(FFT)することによって，どのような周波数成分がニオイ刺激によって特異的に影響をうけるかを検討した。

対象は嗅覚正常，鼻疾患の既往のない28才から39才の男性5例とした。ニオイ刺激の臭素は酢酸アミルを用いた。コントロールとして空気刺激を提示した。刺激は右鼻腔より行い，左鼻腔からのサーミスタにて呼吸同期式に刺激を与えた。刺激時間はそれぞれ1秒とし，空気・ニオイ刺激とも50％の頻度でランダムに刺激を提示した。脳磁図の記録はBTi社37ch.-2setを使用した。各デュワーを国際式10－20法のF3, F4付近に中心を当て，1刺激につき5秒間脳磁図を記録した。得られた脳磁図をさらに0.1Hzのハイパスフィルタで処理し，これをFFT処理し計10回加算した。空気刺激，ニオイ刺激各々の37ch.のパワーの平方根の平均を周波数帯域別(δ: 0.1-3.9Hz, θ: 4-7.9Hz, α1: 8-9.9Hz, α2: 10-13Hz, β: 14-17.9Hz)に比較検討した。このとき，パワーの平方根の値は対数分布したため，対数変換後の値をpaired t-testで統計的検討を行った。

各周波数帯域においてニオイ刺激と空気刺激のパワーの増減を表1に示した。δ，θ，α2，β波の各周波数帯域の変化は，個人差が大きく，一定の傾向は認められなかった。これはニオイ刺激による快・不快といった高次脳機能を反映していると考えた。しかし，ニオイ刺激により左右半球とも全症例においてα1帯域の増加傾向を認めた。これは意識レベルの上昇などが関与していると思われた。

今後は被験者数を増やして同様な解析をすすめるとともに，また動物で記録された脳電位の高周波数信号（γ波）がヒトからも磁界信号として記録されるか否かを検討する予定である。

7．嗅覚刺激誘発脳磁界のmultiple dipole analysis

佐久間研司（小林病院）
柿木隆介，金桶吉起，小山紗智子，中　大輔，渡辺昌子（生理研）
中島健二（鳥取大）

【はじめに】これまでにわれわれは嗅覚機能の脳磁図による検討を行い，その発生源に関し考察を加えた。単一双極子による検討に加え，BESA (brain electric source analysis)を用いて複数の双極子について位置推定を行い，より詳細な嗅覚情報に関する検討を行った。

【対象】14例の嗅覚正常な健常成人（女性4例，男性10例，平均年齢3歳）

【方法】本研究のために製作したニオイ刺激装置を用いて右鼻腔入口部に取り付けたサーミスタ呼吸ピックアップにより吸気相に変わる瞬間と同期して，ニオイ刺激または無臭空気刺激をランダムに発生した。ニオイ刺激物質はアミルアセテートを用いた。脳磁図記録に2台のBTi社製37チャンネル脳磁計(Magnes)を使用した。

【結果1】単一双極子推定第1のComponent (1M) が9例，2Mが5例にみられた。1Mの潜時は322 ± 69 ms (255-406 ms), 2Mの潜時は626 ± 57 ms (540-685 ms) に認められ，サブトラクションを行うことでより明瞭となった (Fig. 1)。1MのECDsは9例中5例ではSylvius裂上部の頭頂葉に見られ，残りの4例では側頭葉上部皮質に左右対称に認められた。2MのECDsもまた，Sylvius裂上面に位置していたが，1Mと比較するとやや深部に位置していた。

【結果2】BESAを用いた解析1Mの成分について単一双極子モデルにおいて，Sylvius裂をはさんで頭頂葉と側頭葉と分散した結果になった。以上の結果をふまえて，BESAを用いて複数の双極子を求めた。対象は単一双極子による検討で1Mおよび2Mの明瞭な波形とECDsのCorrelationで低値を示した5例とした。その結果，両側のSIIおよび顔面の領域に近いSIにおいて反応がみられた。また辺縁系（扁桃体，海馬）近傍のECDsもみられた (Fig. 2)。

【考察】嗅覚投射系において内側嗅条からは梨状前皮質と扁桃体への入力がある。高次の嗅覚プロセスにおいて扁桃体近傍から前頭葉眼窩面への経路が示唆されている。今回のわれわれの結果より扁桃体近傍での活性はとらえたが，前頭葉眼窩面での活性はとらえられなかった。これはMEGの測定上の限界のためか，あるいは，ＳⅠ，ＳⅡへの活性成分がより大きくなったため相対的にとらえられなかったものと考える。

Sakuma K, Kakigi R, Kaneoke Y, Hoshiyama M, Koyama S, Nagata O, Takeshima Y, Ito Y, Nakashima K: Odorant evoked magnetic fields in humans.. Neurosci Res 1997 Feb, 27 (2): 115-22, 1997

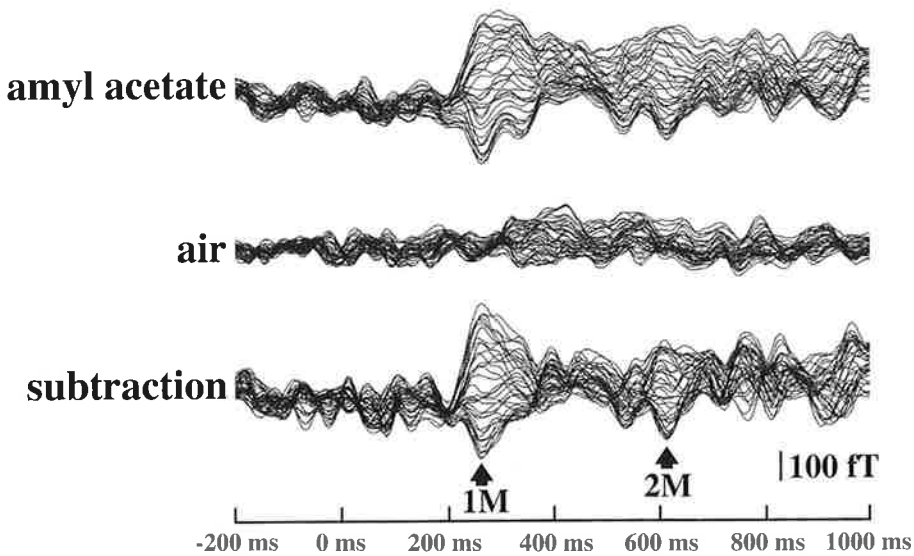


Fig. 1　アミルアセテートおよび無臭空気刺激で鼻腔刺激をした後の嗅覚刺激大脳磁気反応（37チャンネルの重畳波形)。アミルアセテートで刺激したときには1Mおよび2MがdetectⅠ可能だが，無臭空気刺激でははっきりしない。サブトラクションした波形では1M, 2Mがよりはっきりdetectできる。

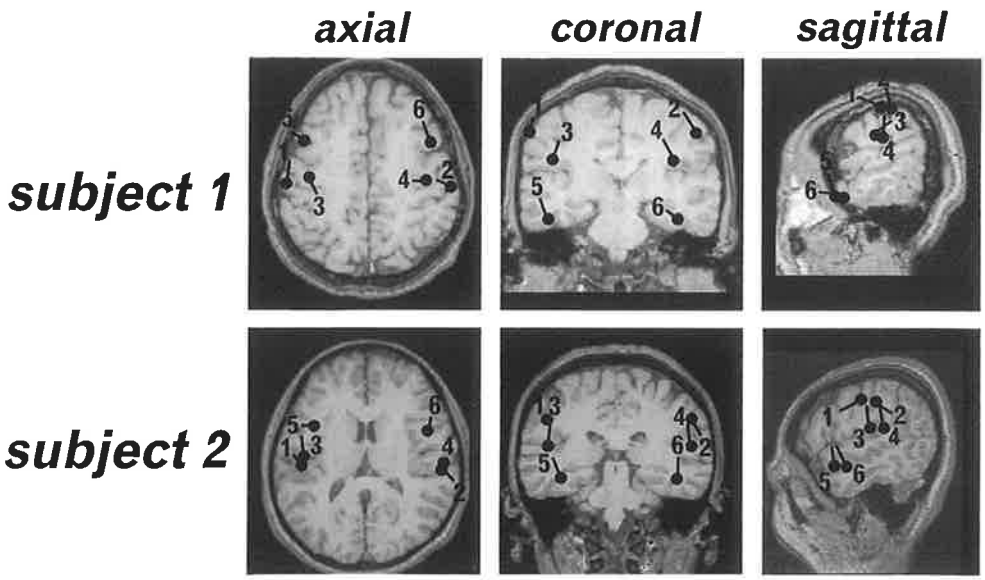


Fig. 2　嗅覚刺激誘発脳磁界の BESA を用いた検討：両側の SII に反応がみられる（3，4），S I においても両側で反応がみられ（1，2），顔面の領域に近い。辺縁系（扁桃体，海馬）近傍の ECDs も見られるが（5，6），subject 2 では subject 1 と同様に両側の SII に活性がみられた（3，4）。subject 1 に比較し，SI 領域の活性（1，2）が顕著であった。扁桃体のやや外側部での活性が顕著であった（5，6）。

【研　究　会　報　告】

研究会報告

〔目　　次〕

1．マルチニューロン活動と脳内情報処理
（代表者：櫻井芳雄）
（1997．6．5～6．6）　…… 259

2．遺伝子導入による中枢神経系の正常および病態の機能解析と治療
（代表者：清水恵司）
（1997．7．4～7．5）　…… 266

3．インスリン分泌と糖・脂質代謝の組織間クロストークによる制御
（代表者：嶋津　孝）
（1997．8．25～8．26）　…… 278

4．ATP 受容体の生理機能と分子機構に関する総合的基礎研究
（代表者：桂木　猛）
（1997．8．29～8．30）　…… 296

5．運動性神経回路の機能特性：大脳皮質，脳幹，脊髄の機能の統合
（代表者：中村泰尚）
（1997．9．18～9．19）　…… 311

6．情動・記憶・意欲をいかにとらえるか
（代表者：川村光毅）
（1997．9．19～9．20）　…… 317

7．神経発生研究会
（代表者：小幡邦彦）
（1997．9．26）　…… 329

8．シナプス伝達機構に関する細胞生理学的研究
（代表者：小澤瀞司）
（1997.10．2～10．3）　…… 334

9．細胞機構制御とカルシウムシグナル
（代表者：飯野正光）
（1997.11.13～11.14）　…… 343

10．シナプス機能の発達と制御の分子機構
（代表者：熊倉鴻之助）
（1997.11．6～11．8）　…… 351

11. ABC 蛋白の多機能性と生命維持機構
（代表者：植田和光）
（1997.12.1～12.2） …… 360
12. 脳磁図計測によるヒト脳機能の解析
（代表者：柿木隆介）
（1997.12.2～12.4） …… 372
13. 第3回「予測制御の生理学」研究会
（代表者：森田啓之）
（1997.12.5～12.6） …… 393
14. シナプス機能の発達と変化
（代表者：関野祐子）
（1997.12.9～12.10） …… 403
15. ニューロン・グリア細胞死の病態－その形態と機能の相関－
（代表者：西野仁雄）
（1998.1.8～1.9） …… 412
16. 脳の情報統合と行動発現のメカニズム－感覚認知から生体反応形成まで－
（代表者：福田　淳）
（1998.1.8～1.9） …… 423
17. イオンチャネル異常に起因する心臓疾患に関する研究
（代表者：倉智嘉久）
（1998.1.26～1.27） …… 435
18. 脳研究の展開
（代表者：佐々木和夫）
（1998.3.19） …… 446

1．マルチニューロン活動と脳内情報処理

1997．6．5－6．6

代表者：櫻井芳雄（京都大・霊長研）

世話人：小松英彦（生理研）

(1) 多点同時記録及び刺激電極の問題点

篠田義一（東京医歯大・医）

(2) 多細胞スパイクデータの時空間解析法の現状　－Joint PSTH を中心に－

伊藤浩之（京都産大・工）

(3) UWE THOMAS のマルチエレクトロードシステムを使ってみて

泰羅雅登（日本大・医）

(4) 多点電極を用いた近接ニューロン群のスパイク分類法

鈴木慎也（生命工学工業技術研究所・生体情報）

(5) 多細胞活動の同時記録によって明らかにされる大脳基底核の機能

木村　實（大阪大・健康体育）

(6) 相関解析法の問題点およびスパイク時間パターンによる情報表現の可能性

田中啓治（理研・情報科学）

(7) マルチニューロン活動記録が目指すもの　－記憶課題を例として－

櫻井芳雄（京都大・霊長研）

(8) マトリックスアレイ電極を用いたマルチニューロン活動同時記録

宮下英三（生理研）

(9) 2点連続皮質内微小刺激法による両側前頭眼野からの誘発眼球運動

虫明　元（東北大・医）

(10) 前頭連合野ニューロン間にみられる相互作用

船橋新太郎（京都大・総合人間）

参加者名簿

篠田義一（東京医歯大・医・第一生理），伊藤浩之（京都産大・工），鈴木慎也，田村　弘（生命工学工業技術研究所），木村　實，佐藤宏道（大阪大・健康体育），田中啓治（理化研），櫻井芳雄（京都大・霊長研・行動神経），宮下英三，伊佐　正，相澤　寛，小林　康，石井宏幸，小松英彦，花澤明俊，木下正治，村上郁也，杉原弘記（生理研），船橋新太郎（京都大・総合人間），入来篤史（東邦大・医），渡辺正孝（東京都神経研），篠本　滋（京都大・理），中村清彦（東京工業大・総合理学），泰羅雅登（日本大・医），松田広則，塚田　稔，相原　威，斉藤秀昭，大野裕史，内田康弘（玉川大・工），山本　純，高橋宗良，高橋　晋（慶応義塾大・理工），坂上雅道

（順天堂大・医），市瀬夏洋（東京大・工），小林恒之（電総研・超分子），宮崎勝彦（筑波大・工），富田兵衛，佐藤　隆（東京大・医），藤田一郎，畠　義郎（大阪大・医），佐藤暢哉（広島大・生物圏科学研究科），岡田真人，銅谷賢治（科学技術振興事業団），村越一支，大出訓史，角田吉昭（東京工業大・総合理工），杉原　忠，谷藤　学（理化研・脳統合機能研究チーム），松本　元（理化研・国際フロンティア研究システム），田中昌司（上智大・理工），藤井　宏（京都産大），吉田幸市（財団法人　新機能素子研究開発協会），深井朋樹（東海大・工），戸田尚宏，臼井支朗（豊橋技科大），井上雅仁，三上章允，中村克樹（京都大・霊長研），勝山成美（大阪バイオサイエンス研究所）

研究会概要

脳独特のダイナミックな情報処理においては，ニューロン間の機能的結合とその変化に基づくダイナミックな神経回路が，情報の基本単位として機能しているはずである。本研究会の目的は，そのような神経回路の実験的解明を目指す国内の研究者が集まり，情報処理を行っている動物から多数ニューロン（マルチニューロン）の活動を同時記録し，さらにそれを解析するための技術的な方法論や，背景となる理論的モデルなどについて，広く情報を交換し議論を重ねることであった。

１日目は，マルチニューロン活動記録の技術的問題や，解析方法の理論的背景に関する講演が中 心となり，議論もその方面に集中した。２日目は，これまでの実験データや今 後の実験計画に関する講演が中心となり，議論もより具体的な問題に集まった。今回みられた多数の参加者と，そこでの極めて活発な議論から，マルチニューロン活動の記録と解析を目指す実験者が多く存在し，今後この方面が急速に進展していくであろうことが予測された。

(1)　多点同時記録及び刺激電極の問題点

篠田義一（東京医歯大・医・第一生理）

哺乳類を用いた中枢神経系の電気生理学的研究，特に霊長類をもちいた慢性実験において神経活動の記録のため種々の電極が開発されてきた。しかしながら，多くの場合，単一微小電極を用いて単一細胞活動を細胞外から記録することが一般的に行われており，極めて実験効率が悪いのが実状である。さらに脳の機能を理解するためには，単一細胞の活動ではなく多数の細胞の活動の相互関係を明らかにする必要が求められている。このような実験の効率面と理論的側面から，多数の細胞から同時に活動を記録できるマルチ電極の開発が求められている。他方，記録している神経細胞への入力又は，その出力がいずれであるかを決定する手段として電気刺激による電気生理学的方法が有用であるが，そのためにも多点同時刺激可能な電極が望まれる。現在まで，研

究者は，様々な工夫を試み，多点同時記録又は，刺激のための電極を使用してきた。従来の電極は，主に硬質の金属電極であるが，シリコンを材料としIC技術を利用したマルチ電極が，徐々に出現している。これらの電極は，主に受動型電極であるが，近年，電極に増幅器が組み込まれた能動型電極が開発されている。現在まで使われてきた電極の持つ利点と欠点を検討し，マルチ電極の開発にあたり必要とされる種々の条件を考察した。

(2) 多細胞スパイクデータの時空間解析法の現状 ―Joint-PSTH法を中心に―

伊藤浩之（京都産大・工）

多細胞活動同時測定法の登場は，脳での情報処理機構における関係性コードの概念の認識をもたらした。これでは，情報が単一細胞に局在せず，多くの細胞の活動の時空間的関係性にコードされているとする。多細胞同時記録研究の発展のためには，多細胞スパイクデータからニューラルネットワークの時空間構造を解析する「強力な時空間解析法」および，解析結果をニューラルネットワークの情報処理メカニズムと対応付けて理解するための「情報コードに関する説明仮説」の構築が不可欠である。今回の発表では，時空間解析法の例としてJoint-PSTH法を取り上げ，構成法，解析の立場，解析例，コンピューターシミュレーションにより示された問題点などを概説した。この方法は現時点では最強なものであるが，その解析結果の評価においては十分の注意が必要であることを強調した。

(3) UWE THOMASのマルチエレクトロードシステムを使ってみて

泰羅雅登（日本大・医・第一生理）

Minneapolis の VA Hospital にある Brain Sciences Center の Prof. Georgopoulos の元で，UWE THOMAS のマルチエレクトロードシステムを使った実験室をセットアップし，実際に使用する機会に恵まれたのでその体験をまとめてみる。

1．システム自体が大きく，サルの頭蓋には直接固定できない。位置決めのための装置が必要である。安定した記録のためにはサルの頭部をかなりしっかり固定する必要がある。

2．電極の装着はOpe用のMicroscope下で行うが，時間がかかる。

3．電極は細い（80ミクロン）が，硬膜さえ貫通できれば破損は少ない。そのために，装置先端を硬膜に密着させる必要がある。電極は2～3回使用できる。使用済み電極は研磨して再使用可能である。活動電位の分離はよく，ノイズも少ない。

4．1セットの試行数が多い課題で記録するときには効率がよい。平均で3～4個のニューロンから記録している。

5．記録したニューロンの位置の再構成が難しい。また，バンクのような深い部分からの記録には適していないかもしれない。

6．アンプ，ディスクリミネータ，オシロが最低各電極に1台づつ必要であり，コンピュータへの取り込みも考えたシステムが必要である。

(4) 多点電極を用いた近接ニューロン群のスパイク分離法

鈴木慎也（生命工学工業技術研究所）

従来の単一微小電極法では，神経細胞の密集する脳部位における複数の神経細胞の発生するスパイクの正確な分離が困難であった。

本研究では近接する複数の記録点を持つ多点電極を用いて，複数の神経細胞の活動を同時期録し，分離する新しい方法について報告する。7芯電極を用いてラットの海馬錐体細胞層より同時記録したスパイク群から，スパイクテンプレートとの相関によりスパイクを検出し，共分散ベクトルの階層的クラスタリングによるスパイク群分類法を試みた。重み付き相関及び重畳スパイク分離法の導入により，スパイク検出感度が増大した。複雑スパイク・バーストを自動検出し，最初のスパイクのみをクラスタリングに使用することにより，クラスタリング精度が高められた。1カ所の記録から平均約10個のクラスター（別々のニューロンに対応すると考えられる）が分離できた。今後の主要課題は，多ニューロン活動相関の解析・表示法の開発である。

(5) マルチニューロン記録によって明らかにされる大脳基底核の機能

木村　實（大阪大・健康体育）

行動課題を行っている動物の脳に微小電極を刺入して，単一ニューロンが行動課題にどのように関係するかを調べる研究手法は1950年後半に開発されて以来，脳の機能局在とりわけ高次脳機能に関与する脳部位を明らかにする上で大きな貢献をしてきた。大脳基底核の関与する運動機能，学習・記憶機能が明らかにされつつあるのもこの研究手法に負うところが大きい。一方，脳の働きのしくみを明らかにするためには，個々のニューロンの振舞いを知るだけでなく，お互いに接続を持つニューロン同士がどのような情報処理をするかを知らなければならない。大脳基底核では，大脳皮質や視床から線条体への主要な入力が斑点状の部位にクラスターをなして終止するこ

と，各クラスターの境界部毎に点在するニューロンには共通入力があることが判明している。線条体の機能単位である可能性を示唆する。今後，大脳基底核の運動，学習・記憶機能の機序を明らかにする上で，クラスターへの共通入力源とその拡がり，クラスターを構成するニューロン間の情報伝達様式を知ることが重要である。マルチニューロン記録法がその有力な武器となることを期待している。

(6) 相関解析法の問題点およびスパイク時間パターンによる情報表現の可能性

田中啓治（理研・情報科学）

大脳皮質ではたくさんのEPSPの重畳で初めてスパイクが引き起こされる。そこでシナプス前から後への結合を検出する場合には，相関解析法の感度には限界がある。多シナプス性の結合は特に困難である。しかし，記録中のシナプス前の細胞と多くの他の入力細胞が同期してスパイクを発射している場合には，大きなピークが現われる。逆に考えれば，相関解析法は他の入力細胞の発火との同期の程度を観測する道具と考えることができる。

状況依存的に相互相関の中のピークの大きさが変わるとの報告があり，神経回路はダイナミックな特性を持つとの指摘があったが，ほとんどの報告は共通入力を観察している。入力細胞群がある状況でよく活動し別な状況であまり活動しなければ，そのような結果が得られる。これは特に新しいことではない。シナプス前後の結合に対応する相関活動を記録して初めてダイナミックの指摘は新しい。

(7) マルチニューロン活動記録が目指すもの —記憶課題を例として—

櫻井芳雄（京都大・霊長研）

脳の情報処理の基本単位は未だ謎である。しかし最近の実験事実や理論的考察から，何らかの協調的なニューロン集団である可能性が高い。個性的な多数のニューロンによる機能的回路が，情報処理に応じてダイナミックに形成され働いているらしい。それはかつてHebbが唱えたセルアセンブリ(cell assembly)そのものである。マルチニューロンの記録は，まさにそのセルアセンブリの検出にこそ用いることが出来る。しかし，そのようなダイナミックに変化する機能的回路の全体を，直接検出することは難しいであろう。そこでその主な特徴である，異なる回路間でのニューロンの重複(neurons overlapping)と，回路を作る機能的シナプス結合のダイナミックな変化(connection dynamics)の2点に着目することで，記憶情報処理におけるセルアセンブリの存在

を間接的に示唆した実験について解説する。

(8) マトリックスアレイ電極を用いたマルチニューロン活動同時記録

宮下英三（生理研）

束ねたワイヤー電極をラットの運動野，感覚野および上丘各々に埋め込み，次のような2つの異なる行動状態において各々の領野のニューロン活動を同時記録した。1）触覚刺激を与えられ，受動的にヒゲを動かした時。2）探索行動中，能動的にヒゲを動かしている時。各々の領野から同時記録した3個のニューロン活動をもとに time dependent scatter diagrams を作成し，3個のニューロン間の発火タイミングの時間的関連性を評価した。その結果，発火タイミングの時間的関連性は行動状態に応じて変化すること，および，同一の行動状態においても時間的に変化することが判明した。今後は，束ねたワイヤー電極を格子状（4×4；1.5 mm 間隔）に配置したマトリックスアレイ電極と time dependent scatter diagrams を併用することにより，サル視覚誘導性上肢運動の運動学習過程におけるダイナミックな脳内情報処理過程を抽出していきたい。

(9) 2点連続皮質内微小刺激法による両側前頭眼野からの誘発眼球運動

虫明　元（東北大・医）

皮質内の微小刺激法は，神経活動記録用の電極から小さい電流を皮質のある領野に加えて応答を調べるもので，運動関連領野であれば，対応した部位の運動が誘発できる。一般的には，微小刺激によってみられる効果は，神経回路に依存した hardwire で決った効果と考えられるが，課題遂行中の覚醒動物で微小刺激を行うと，其の効果は課題依存性に変化することが，我々の前頭眼野と補足眼野の微小刺激で明らかになってきた。この度，固視課題遂行中のサルの左右前頭眼野を遅延期間をおいて微小刺激し，誘発された2つのサッカードを調べた。すると，誘発されたサッカードは，単純な2つのベクトルが誘発されるのでなく，2番目の誘発眼球運動は，1番目の刺激に依存してサッカードの方向が変化し，しかも固視課題の点からみて一定の位置へ収束するサッカードを誘発する事がわかった。多点の皮質内微小刺激法も脳機能解明の有用な手段になりうると考えられる。

⑽　前頭連合野ニューロン間にみられる相互作用

船橋新太郎（京都大・総合人間・自然環境）

作業記憶は，ある活動に必要な情報を必要な期間能動的に貯蔵する機構と説明されているが，貯蔵している情報の統合や操作を含む動的な情報処理機構でもある。情報の統合や操作にはニューロン間の相互作用が不可欠であると同時に，その課題文脈に対応した動的な変化が存在すると思われる。作業記憶課題をサルに行わせ，前頭連合野に刺入した単一電極から記録したマルチニューロン活動をもとに，同時記録した単一ニューロン対の活動の相互相関分析，ならびに，ニューロン間の活動相関の時間変化をとらえることができる Coincidence time histogram による分析結果の一部を示した。Coincidence time histogram で観察される活動相関の時間変化，ニューロンの示す課題関連活動の特徴，相互相関分析で得られる入出力関係より，前頭連合野における情報の統合や操作のメカニズムを明らかにしてゆきたいと考えている。

2．遺伝子導入による中枢神経系の正常および病態の機能解析と治療

1997．7．4－7．5

代表者：清水恵司（大阪大・医・脳神経外科）

世話人：池中一裕（生理研）

(1) 交感神経の分化に関わる転写制御因子 NDF1 の機能解析

樋口宗史，中野浩一，牛三　勇，三木直正（大阪大・医）

(2) 中枢神経系における RNA 結合蛋白質の発現

榊原伸一，岡野栄之（大阪大・医）

(3) 抗体/DNA 複合体（イムノジーン）を用いる遺伝子導入法の開発

清水信義（慶應大・医）

(4) アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの特徴とその応用：パーキンソン病に対する遺伝子治療法の開発

卜部匡司，小澤敬也（自治医大・血液研）

(5) アデノウイルスベクターによる ON/OFF 発現制御系および強力な細胞特異的発現系の開発

斎藤　泉，鐘ヶ江裕美，佐藤友美，田中啓二（東京大・医科研）

(6) 病態解析と疾病治療のための人工ウイルスベクターの開発

金田安史（大阪大・細胞生体工学センター）

(7) アデノ随伴ウイルスベクターを用いた脳腫瘍細胞への遺伝子導入と治療への応用

水野正明，吉田　純（名古屋大・脳神経外科）

(8) 不死化された神経前駆細胞株の分化における bHLH 転写因子の発現

寳子丸稔，大塚俊之（京都大・脳神経外科）

(9) Recombinant Herpes Simplex Virus を用いた悪性神経膠腫治療の試み

峯田寿裕（佐賀医大・脳神経外科）

(10) 悪性グリオーマ細胞における脳特異的プロモーター活性とそれを用いたグリオーマ特異的遺伝子治療法の検討

宮尾泰慶，清水恵司，田村雅一，馬淵英一郎，貴島晴彦，早川　徹（大阪大・脳神経科）

池中一裕，吉松忠憲（生理研）

金田安史（大阪大・細胞工学センター）

(11) アデノウイルスベクターを用いた神経細胞への遺伝子導入法の開発とその応用

橋本光広（理化研）

御子柴克彦（東京大・医科研）

参加者名

清水恵司，榊原伸一，中村由紀，田村和義，樋口宗史，宮尾泰慶（大阪大・医），金田安史（大阪大・細胞生体工学センター），蒲生　忍（慶應大・医），斎藤　泉（東京大・医科研），橋本光広（理化研），卜部匡司（自治医大・血液研），寶子丸稔（京都大・脳神経外科），水野正明（名古屋大・脳外科），中屋敷典久（名古屋大・脳神経外科），吉川和宏，仲川嘉紀（愛知医大・第2生理），峯田寿裕（佐賀医大・脳外科），小幡邦彦，松川　浩（生理研）

研究会概要

脳神経系は，発生学的には一層の外胚葉の一部が肥厚した神経板の周囲に作られた神経ひだが相互に融合して形成された一層の細胞から構成された神経管が原基となり，そこから秩序立った細胞分裂と細胞移動を繰り返すことにより，きれいな層構造を有する脳実質が形成される。この形成過程で，ニューロンそしてグリア細胞が順次産出されていく。この産出された個々の細胞が，どうのようにして決められた場所に移動し配置するのか，また突起を伸ばして標的細胞と神経回路網を形成するのかなどを明らかにすることは非常に有意義である。そして，この神経回路網間を埋めているオリゴデンドロサイト，アストロサイト，ミクログリアなどのグリア細胞がニューロンの機能発現に如何に関与するか解明する事は，脳神経系の発生・分化のメカニズムを研究する上で非常に重要であり，ミエリン形成不全，パーキンソン氏病やグリオーマの治療の糸口を見出すのに是非とも必要と思われる。一方，最近の分子生物学的技術の進歩により，ニューロンやグリア（グリオーマ）細胞に容易に目的とする遺伝子を導入できるようになった。このような現状を踏まえ，今回は各種遺伝子導入システムの利点と欠点について基礎的見地から検討すると共に，遺伝子導入による脳神経系の発生・分化メカニズムや脳疾患の病態解明と治療法の可能性について相補的に検討した。

(1)　交感神経の分化に関わる転写制御因子 NDF1 の機能解析

樋口宗史，中野浩一，牛三　勇，三木直正（大阪大・医）

【目的】Neural crest 由来の交感神経は，ventral pathway を移動中に交感神経の分化因子 (GDNF や FGF) で Sympathoadrenal (SA) progenitor に分化し，最終的には glucocorticoid でクロマフィン細胞に，神経成長因子 (NGF) で交感神経細胞に終末分化する。私達は交感神経の cotransmitter である Neuropeptide Y (NPY) 遺伝子発現が，PC12 細胞の神経分化に伴って誘導されること，つまり，NGF で著しく誘導され，glucocorticoid で抑制されることを報告した。さらにこの現象が転写レベルでおこり，NPY 遺伝子プロモーター部の NGF 反応エレメント (NGFRE) に依存することと，現在まで少なくとも3つの NGFRE 結合蛋白質を見いだしている。そのうち，

AP1 結合様部位に結合する 26kDa の NDF1 は NGF 処理で結合活性が増加するので，交感神経の終末分化に何らかの機能を持っていると考えられた。そこでクローニングした NDF1 を PC12 細胞に一過性発現することで，NPY 遺伝子転写に対する作用を調べた。さらに stable transformant を作成することで，NGF による PC12 細胞の交感神経様細胞への分化に対する作用を，また，In situ hybridization により胎生および発育時期における副腎での NDF1 の発現を調べた。

【結果】NDF1 の一過性発現による NPY 遺伝子転写活性への影響を CAT アッセイで調べると，NDF1 は repressor の作用を持っていることが明らかとなった。direct repression の機構で転写抑制するらしい。PC12 細胞には殆ど内在性の NDF1 を持たないが，NGF 処理で遺伝子発現レベルで NDF1mRNA が増加する。NDF1 の PC12 細胞の permanent transformant を作成すると NGF による terminal differentiation が完全に抑制された。ISH によって胎生期，出生直後にはラット副腎における NDF1mRNA の発現が強く，2 週以降は発現が弱くなることが解った。

【考察】以上の結果は，NDF1 は生理的には交感神経の NGF による terminal differentiation を抑制する転写抑制因子として働いていることを示唆する。NGF による PC12 細胞の分化時に NDF1 が誘導されるメカニズムはまだ不明だが，分化誘導に対する抑制機構として働いている可能性があると考えられる。

(2) 中枢神経系における RNA 結合蛋白質の発現

榊原伸一，岡野栄之（大阪大・医）

遺伝子発現の転写後調節は，複雑な神経系の発生過程と可塑性等において重要な役割を果していることが予想される。ショウジョウバエの d-msi 遺伝子産物は，RNA 結合蛋白質として転写後レベル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，特に細胞系譜の形成を制御していると考えられる。そこで更に，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，d-msi 遺伝子のマウス相同分子 mouse-musashi-1 (m-msi-1) を単離した。

ノーザンブロット解析・免疫組織化学および低密度の初代培養細胞の免疫組織化学的手法により検討したところ，m-Msi-1 は胎生期においては中枢神経系の未分化幹細胞において強く発現する一方，分化していく神経細胞においては発現量が極めて低いことが明かとなった。一方，生後から成獣においては，m-Msi-1 は，側脳室周辺の subventricular zone (SVZ) の分裂能を有するグリア前駆細胞，およびアストロサイトにおいて発現が持続し，PDGFR 或いは NG2 陽性の O-2A やオリゴデンドロサイトでは発現が消失していた。m-Msi-1 蛋白質はこのような発現パターンとショウジョウバエの相同分子 (d-msi) との類似性により，哺乳類神経発生過程における細胞の運命決定，細胞系譜の形成を転写後レベルで制御している可能性が考えられる。一方，他の神経細

胞特異的RNA結合蛋白質としてショウジョウバエelavの哺乳類相同分子Hu蛋白質が知られている。Huおよびm-Msi-1抗体を用いて，それぞれの局在を組織切片，神経上皮細胞（幹細胞）の低密度初代培養で解析した結果，興味深いことにHu蛋白質は，m-Msi-1蛋白質とは逆に，神経細胞への分化に伴い発現が急速に上昇するという互いに相補的な発現パターンを示すことが明かとなった。またHu蛋白質はin vitroでU塩基に富むRNA配列に強く結合するが，m-Msi-1蛋白質はG塩基に富むRNA配列に結合するため，下流標的配列も互いに異なることが示唆された。このような発現パターンとショウジョウバエ相同分子(d-msiとelav)との類似性により，神経発生過程においてm-Msi-1とHu蛋白質は幹細胞分裂時の非対称的分布あるいは，その後の発現細胞を異にすることで，細胞の運命決定を転写後レベルで制御している可能性が考えられる。さらに，現在，m-msi-1遺伝子産物の生体内での役割を明らかにするために，相同組み換え法を用いてm-msi-1遺伝子欠損マウスを作製しており，その表現型の解析を行っている。

(3) 抗体／DNA複合体（イムノジーン）を用いる遺伝子導入法の開発

清水信義（慶應大）

我々はin vitroだけでなく生体内でもターゲティングが可能な遺伝子導入法として，“イムノジーン法”を開発した1-3)。イムノジーンとは，モノクローナル抗体IgG分子にポリリジンを架橋結合させたもの（イムノポーターと呼ぶ）に遺伝子DNAをアフィニティ結合させた抗体／DNA複合体のことである。我々はヒトEGFレセプターに対するモノクローナル抗体をモデルとしてイムノポーターを作製し，βGALやCATなどのレポーター遺伝子のヒト細胞への導入と発現を報告してきた。さらに，改良を加えたFabイムノポーターは，HSV-TK遺伝子をヌードマウス移植癌に効率よく搬入し発現させ，ガンシクロビル処理によって著しい腫瘍増殖の抑制効果を示すことも観察した。

イムノジーン法による遺伝子導入はウイルスベクター以外の系としては最も導入効率が高いだけでなくいくつかの特徴を備えている。すなわち，ｉ）イムノジーンは細胞がもつレセプターを介したエンドサイトーシスの機構を利用するので細胞に傷害を与えない。ii）エンドサイトーシスは増殖期の細胞では最も活発で静止期の正常細胞ではあまり起きていない。従って，癌細胞への特異的な標的が可能となる。iii）ベクター由来の病原性ウイルスの発現の心配がない。iv）EGFレセプターに対する抗体を用いる場合レセプターを過剰発現している扁平上皮癌を標的できる。過剰発現しているEGFレセプターは低アフィニティータイプであり特に我々が作製した抗体はそれと優先的に結合する。ｖ）イムノポーターとDNAの結合はアフィニティー結合であるからどんな遺伝子でも容易に導入できる。vi）イムノジーンの手法はどのような抗体にも適用できる。

イムノジーン法は特異性の高いモノクローナル抗体を利用して細胞を標的する新しい遺伝子導入法であり，ウイルスベクターでは叶えられない生体内ターゲティング遺伝子デリバリーが期待できる。導入遺伝子の発現を組織特異的なプロモーターで制御すればより安全な生体内ターゲティング遺伝子治療への応用も可能となろう。現在，我々は組換えDNA技術を応用して，人工一本鎖抗体からなるイムノポーターを作製し第二世代イムノジーン法としての改良を進めているのでその進捗状況についても述べる。

1）Chen, J. et al., FEBS Letter, 338 (2): 167-169 (1994)
2）Shimizu, N. et al., Cancer Gene Therapy, 3: 113-120 (1996)
3）Shimizu, N. et al., Cellular Pharmacol AIDS Sci. 3: 263-267 (1996)

(4) アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターの特徴とその応用：パーキンソン病に対する遺伝子治療法の開発

卜部匡司，小澤敬也（自治医大・血液研）

遺伝子治療用ウイルスベクターとしてアデノ随伴ウイルス(Adeno-associated virus: AAV)が注目されてきている。ヒトに対する明確な病原性を持たないこと，ウイルスゲノムが第19番染色体長腕のAAVS1領域(19q13.3-qter)に特異的に組み込まれることなどから，安全性の高い遺伝子治療用ベクターへの応用が期待されている。AAVベクターの作製にはアデノウイルスを用いるものが一般的であったが，最近アデノウイルスそのものを使用しないシステムが開発され，作製法が簡略化されつつあり，より使用しやすくなってきている。

パーキンソン病(Parkinsons disease: PD)は黒質線状体のドーパミン作働性ニューロンの変性による疾患であるが，従来よりL-DOPAの全身投与が行われている。しかし長期投与に伴い，副作用の発生，効果の減弱が高頻度で認められ，新たな治療法の開発が待たれている。AAVベクターはニューロンの様な非分裂細胞にも遺伝子導入が可能であり，長期発現が期待できることから，我々はPDの遺伝子治療法開発を目的として，PDモデルラットを作成し，dopamine合成系酵素遺伝子を持つAAVベクターをステレオ装置を用いて線状体に直接注入する試みを行っている。その結果，dopamine合成の律速酵素であるtyrosine hydroxylase (TH)遺伝子単独でも有効であったが，さらにaromatic L-amino acid decarboxylase (AADC)遺伝子を併用することにより，より症状の改善が得られた。注入部位の免疫組織学的解析により，THとAADCを共発現しているニューロンが多く認められたことから，異なるAAVベクターで同一の細胞に複数の遺伝子を導入することが可能であることが示された。これらのことから，AAVベクターは神経系をターゲットとした遺伝治療に恰好のベクターに成り得ると考えられる。

既存のAAVベクターでは，最大の特徴の一つであるAAVS1領域への部位特異性が失われ，

染色体DNAへの組込みはランダム起こる。この原因は非構造調節蛋白質をコードするrep遺伝子を欠くことによると想定されている。Rep蛋白質はAAVゲノムが染色体DNAのAAVS1領域に特異的に組み込まれる際，中心的な役割を果たしている。即ち，Rep蛋白質はAAVゲノムの両末端のITR (inverted terminal repeat)配列とAAVS1領域にあるGCTCの繰り返し配列を認識し，両者の間に介在し，組換え反応が起こるものと考えられている。このことから目的の遺伝子にITR配列を付加し，さらにRepを一過性に作用させることにより，AAVS1領域に特異的に効率よく組み込ませることが可能になると考えられる。このシステムは，安全性の面でより優れていること，大きなサイズの遺伝子にも適用可能であることなどの特徴を有している。このユニークな部位特異的遺伝子組込み法についても，その開発状況を併せて紹介したい。

(5) アデノウイルスベクターによるON/OFF発現制御系および強力な細胞特異的発現系の開発

斎藤　泉，鐘ケ江裕美，佐藤友美，田中啓二（東京大・医科研）

アデノウイルスベクターは各種細胞へ高い効率で遺伝子を導入することが可能であり，しかも実験動物個体での発現実験が行えるため，遺伝子治療用のベクターとして遺伝病や癌の実験治療に用いられ始めている。またこのベクターは，特に神経系・筋系・肝細胞など高度に分化した組織でも高い発現効率を示すことから，基礎研究の分野でもその有用性が広く認められるに至った。日本では高効率の組換えアデノウイルス作製法（COS-TPC法）が広く普及した結果，アデノウイルスベクターを用いた組織培養および動物個体での発現研究は質的にも量的にも欧米を凌いでいるのではないかと思われる。

われわれはさらに，アデノウイルスベクターを遺伝子発現のスイッチとして用いる発現ON/OFF制御系を開発した。この方法は部位特異的組換え酵素Creを高発現する組換えアデノウイルスを用いて，既に染色体上あるいは細胞核内に導入した遺伝子上でプロモーターとcDNAの間にある発現阻止配列（stuffer配列）を除去する等の手段により，遺伝子発現を厳密に制御するものである。予め導入した遺伝子の発現を必要に応じてONやOFFに制御する技術の確立は，今後の実効性と安全性に優れた遺伝子治療を開発する基盤を提供したと考えられる。さらにこの技術は，細胞増殖に阻害的に働く蛋白を培養細胞あるいは動物個体で高率・同期的に発現させその効果を検討するタイプのこれまで不可能であった研究を可能とする技術であり，アポトーシス・細胞周期・細胞癌化・細胞分化等において各々のステップを司る遺伝子の機能を継時的に検討できる結果，これらの分野の研究に新しい局面を開く可能性が高いと考えられる。このようなアプローチの例としてノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを用いた仕事を紹介する。

また最近われわれは上記のCre/loxP系を応用して，特異的プロモーターの特異性を保ちなが

らその発現強度を数十倍高める「アデノウイルス二重感染発現法」を開発した。本法は特異的プロモーターからCre遺伝子を発現する「組織特異的スイッチウイルス」とCAGプロモーターからCre制御下に目的遺伝子を強力に発現させる「発現標的ウイルス」の二重感染を行うものである。この方法を用いて肝癌細胞特異的に強力な発現を行う実験例（動物実験を含む）を紹介したい。またこの方法は，標的をウイルス上ではなく細胞染色体上へ置くことにより，部位特異的かつ細胞特異的な遺伝子ノックアウト法についても応用が可能であると考えられ，中枢神経系の機能解析および治療に利用できると期待される。

(6) 病態解析と疾病治療のための人工ウイルスベクターの開発

金田安史（大阪大・細胞生体工学センター）

私達は細胞融合による遺伝子導入をめざし細胞融合をおこすウイルスであるHVJ (Hemmagglutinating Virus of Japan; Sendai virus) 利用することと導入遺伝子の発現を高めるための核蛋白質の共導入の考えから最終的にHVJ-リポソーム法を開発した。これは非ウイルスベクターであるがウイルスとリポソームの融合ベクターであることからハイブリッドベクターの草分けと言える。この方法によるとリポソームに封入された遺伝子はエンドゾームやリソゾームによって破壊されることなく細胞質に導入され，核蛋白質の働きでその発現を高めることができる。HVJの細胞表面のレセプターはシアル酸の付いた糖脂質，糖蛋白質であり，リンパ球以外の殆どの細胞に融合し遺伝子の導入が可能であり，約10分のインキュベーションでほぼ融合，導入が完成する。細胞の分裂，非分裂を問わず遺伝子の導入，発現が可能であり，連続投与も可能である。DNAサイズは100kbまでなら10－20％の率でリポソームに封入できる。アンチセンスオリゴヌクレオチド (AS-ODN) の導入に極めて有効である。またこのベクターは負電荷を帯びており培養細胞系での細胞との接着は弱いが，組織への滲透性に優れ血管内皮をすりぬけ組織内部へ拡がり様々な細胞に遺伝子導入が可能である。これらの特質を生かし多くの動物臓器への遺伝子導入により，遺伝子治療の研究のみならず遺伝子レベルでの病態解析に成功している。

しかし，遺伝子の発現が一過性である，アデノウイルスベクターより発現が弱い，など欠点も多い。そこでHVJ-リポソームによる遺伝子導入効率を更に高めるため最近私達は正電荷脂質DC-Chol esterolを加えた新たなHVJ-カチオニックリポソームを開発した。DC-Cholを加えPSを除いたリポソームはDNAの封入率が5－6倍上昇し，HVJと融合させることにより培養細胞での遺伝子発現が数十～数百倍強力になった。しかし，正電荷が強すぎると特に生体組織での遺伝子発現が激減し毒性も高まる。実際に肝臓や骨格筋でのHVJ-カチオニックリポソームによる遺伝子発現はHVJ-アニオニックリポソームの10分の1以下であった。私達はさらに脂質組成の検討を重ねており，その過程でわかったことは正電荷脂質の量を増すにつれ培養細胞での成績とは

異なり組織中での遺伝子発現効率が低下するという事実であり，恐らく組織中での滲透性，拡散して多くの細胞と接触できる機会が正荷電が強いと逆に阻害されるためであろうと推定している。最近の我々の研究から生体組織での遺伝子導入と発現を最大に高めることのできるリポソーム組成はエイズウイルス (HIV) のエンベロープや赤血球膜の脂質に酷似しており私達はこのリポソームを AVE (Artificial Viral Envelope)-liposome と称している。肝臓，骨格筋での遺伝子発現は現行の HVJ-liposome による遺伝子発現の 5 －10倍であった。

一方，導入遺伝子の長期発現のためには効率よく宿主ゲノム内に遺伝子を組み込む方法と染色体外で安定に維持する方法が考えられる。ここでは Epstein-Barr Virus (EBV) の潜伏感染装置を利用して導入遺伝子の核内保持を試みた。chick-beta actin promotor の下流に luciferase gene を持つプラスミドに P205 の EBNA-1 と oriP の配列をクローニングした pEBActluc を作製しこれを HVJ-カチオニックリポソームを用いて培養細胞へ，HVJ-アニオニックリポソームによりマウス肝臓に導入した。HEK293 細胞に pEBActluc の導入すると導入16時間でルシフェラーゼ遺伝子発現が上昇し低下は見られなかったのに対して，EB の配列を持たない pActluc の導入群では１日目をピークに低下し pEBActluc 導入群の1/4以下となった。さらに長期に培養した時にプラスミド DNA は自律増殖していることがわかった。神経に分化させ非分裂のラット PC12 細胞における導入遺伝子発現の変化を調べると，pActluc 導入群ではルシフェラーゼ活性が徐々に低下したのに対して pEBActluc 導入群では酵素活性は全く変化せず維持された。マウスの肝臓に pEBActluc を導入すると導入２週間は高い発現が得られ２－３週間で約1/10に低下したが，それ以降もその発現値が維持され１ヶ月以上にわたって安定な遺伝子発現を認めた。潜伏感染装置を持たないと１週間で発現がなくなった。染色体外にあっても安定に存在できる機構があって EBV の配列がそれを促進できる。EBV の核内保持機構について現在解析をすすめており，核マトリックスを介した導入遺伝子の安定化の可能性を考えている。遺伝子の長期発現の研究は核内でのクロマチン DNA の安定保持の観点から染色体構造の研究を抜きにしては語れないのではないか，と考えている。

(7) アデノ随伴ウイルスベクターを用いた脳腫瘍細胞への遺伝子導入と治療への応用

水野正明，吉田　純（名古屋大・脳神経外科）

【目的】アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは病原性を持たないことから，レトロウイルスベクターやアデノウイルスベクターに比べ安全性が高いと言われている。しかし in vivo での発現効率は移植脳腫瘍モデルにおいて20％前後と満足できるものではない。そこでその遺伝子発現効率を高めるため，rep 遺伝子やヘルパーウイルスあるいはその一部の遺伝子とのコンビネーション効果について検討を加えた。

【結果】rep 遺伝子は AAV ベクターの遺伝子発現効率を 2 － 3 倍高めた。またアデノウイルス由来の E1 及び E4 遺伝子は，AAV ベクターの遺伝子発現効率を数十から数千倍に増強した。またヘルペスウイルスでも同様の増強効果が観察された。

【結論】rep 遺伝子あるいはヘルパーウイルスには AAV ベクターの遺伝子発現を著明に増強させる効果が認められた。現在この事実を liposomal transfection に応用し，検討している。

(8) 不死化された神経前駆細胞株の分化における bHLH 転写因子の発現

寶子丸稔，大塚俊之（京都大・脳神経外科）

【目的】テトラサイクリンにより v-myc の発現が抑制できる LINXv-myc retrovirus を用い成人ラット海馬の培養細胞を不死化した細胞株 HC2S2 は，テトラサイクリン投与後に成熟した神経細胞に分化することが認められている (M Hoshimaru et al, Proc Natl Acad Sci USA 93: 1518-1523, 1996)。ところで，Mash-1, NeuroD などの basic helix-loop-helix (bHLH) 転写因子は神経細胞への分化を調節する因子として考えられているが，今回，成人大脳での神経分化のメカニズムを検討する目的で，HC2S2 細胞の分化過程における bHLH 転写因子の発現を検討した。

【方法】HC2S2 細胞の分化にともなう bHLH 転写因子 (Mash-1, neurogenin, NeuroD, NDRF, MATH-1, MATH-2, HES-1, HES-3, HES-5) 及び neuronal marker (GAP-43, MAP-5) の発現を RNA ブロット解析により検討した。また，蛍光抗体法により HC2S2 細胞および成人ラット海馬における GAP-43, nestin および Mash-1 の発現を検討した。

【結果】テトラサイクリン投与24時間以内に HC2S2 細胞は細胞分裂を停止し，突起を伸長し始める。3 日目には細胞が集合し cluster を形成し始め，5 日目には cluster 間に長い直線上の神経線維が形成される。MAP-5 はテトラサイクリン投与12時間後に，GAP-43 は48時間後に発現が誘導された。検索した bHLH 転写因子の中で，HC2S2 細胞には，Mash-1, NeuroD, NDRF, HES-1 が発現していた。Mash-1 は神経細胞への分化を促進する因子として考えられている。分化前の細胞に大量の発現が認められたが，神経細胞への分化後には発現が減少した。NeuroD, NDRF は神経細胞の分化および形質の維持に関与していると考えられているが，分化前の細胞に大量の発現が認められるとともに，神経細胞への分化後も発現は維持されていた。一方，HES-1 は神経分化を抑制する因子として考えられているが，テトラサイクリン投与数時間以内に発現が誘導され，神経分化が達成されると同時に発現が減少した。

【考察】HC2S2 細胞には，複数の bHLH 転写因子が存在することが示され，複数の bHLH 転写因子が共同して神経分化を調節していることが示唆された。Mash-1 は神経分化達成時には発現が減少し，NeuroD, NDRF は神経分化達成後もそのまま発現が維持され，Mash-1 ⇒ NeuroD, NDRF の順番で働くことが示唆された。HES-1 はテトラサイクリン投与後に発現が paradoxical

に増加する。HES-1 の transcription initiation site には myc による転写抑制のための consensus sequence が存在し，テトラサイクリン投与前には v-myc により発現が抑制されているが，テトラサイクリン投与後に v-myc による発現抑制が解除されるために一時的に発現が亢進するものと考えられた。

(9) Recombinant Herpes Simplex Virus を用いた悪性神経膠腫治療の試み

峯田寿裕（佐賀医大・脳神経外科）

悪性神経膠腫は現在の外科的治療に加え，放射線療法，化学療法などの集学的治療にも抵抗性を示し，未だ5年生存率が10%以下であるのが現状である。この疾患に対する新しい治療法として，retrovirus や adenovirus をベクターとして herpes simplex virus (HSV) の thymidine kinase (tk) 遺伝子を腫瘍細胞に導入し，ganciclovir を投与することにより腫瘍細胞を破壊する研究が行われている。一方，HSV-1 は，神経親和性を示し，高い遺伝子導入効率を有することから神経系への遺伝子導入の応用が試みられているが，その強い神経毒性が問題となっている。われわれは，逆にこの強い神経毒性に着目し，HSV-1 の複製増殖能力が，感染した宿主細胞の増殖能力に依存した遺伝子組換え型の HSV-1 が，正常神経細胞を障害することなく腫瘍細胞のみを選択的に破壊する可能性を検討している。これまでに HSV-1 遺伝子内に存在する tk 遺伝子や ribonucleotide reductase 遺伝子が欠失した HSV Mutants (dlsptk, hrR3) が悪性脳腫瘍細胞に対し殺細胞効果を有することを報告してきた。現在，この治療法の臨床応用の可能性により近づくことを目的とし，double mutant 型の組換え型 HSV-1 を作製し，その臨床応用の可能性を検討している。この組換え型 HSV-1 は神経毒性に関与すると考えられる遺伝子（γ34.5 遺伝子）に欠失があり，ICP6 (ribonucleotide reductase) 遺伝子 内に lac Z 遺伝子を挿入されている。この組換え型 HSV-1 は高い増殖能力を有する腫瘍細胞内では複製増殖し，腫瘍細胞を破壊することが可能であるが，増殖能力のない細胞においては増殖することが困難であると考えられる。またこの組換え型 HSV-1 が有する特性として，この組換え型 HSV-1 は，温度感受性を示し，39℃の状態では増殖が抑制される。また抗ヘルペス剤である，acyclovir や ganciclovir に対し過敏性を示し，低濃度で増殖が抑制されることが知られている。この二つの特性により，実際の臨床応用の段階で，予期できないような，ウイルス脳炎へと進行した場合でも，併発する発熱により増殖が不可能となり，また抗ヘルペス剤で容易にその増殖を抑えることが可能と考えられる。一方，この組換え型 HSV-1 の悪性神経膠腫細胞への傷害活性を検討したところ，in vitro においては multiplicity of infection: 0.1 の感染によりヒト神経膠芽腫細胞株 (U-87MG, U-373MG, U-138M, T98G) は5日以内にほぼ100%の細胞障害活性を認めた。また Balb/c (nu/nu) を用いた U-87MG 腫瘍モデルにおいて，この組換え型 HSV-1 を局所投与することにより腫瘍の増殖が有意に抑制された。以上の

ことより，この組換え型 HSV-1 は悪性神経膠腫の治療に向けて，種々の利点を持つと考えられ，より臨床応用の可能性に近い 組換え型 HSV-1 であると考えられる。

(10) 悪性グリオーマ細胞における脳特異的プロモーター活性とそれを用いたグリオーマ特異的遺伝子治療法の検討

宮尾泰慶，清水恵司，田村雅一，馬淵英一郎，貴島晴彦，早川　徹（大阪大・脳神経科）
池中一裕，吉松忠憲（生理研）
金田安史（大阪大・細胞工学センター）

中枢神経系で特異的に発現する遺伝子のプロモーターで殺細胞遺伝子を制御し悪性グリオーマ細胞を死滅させることは，安全で効率の良い遺伝子治療をめざす上で必要なことと考えられる。そこで，アストロサイト特異的発現をするグリア線維性酸性蛋白 (GFAP)，オリドデンドロサイト特異的発現をするミエリン塩基性蛋白 (MBP) およびミエリンプロテオ脂質蛋白 (PLP) 遺伝子の各プロモーターで lacZ 遺伝子を制御したレトロウイルスベクターを作製し，RSV-M マウスグリオーマ細胞と NIH-3T3 線維芽細胞に感染させたところグリア特異的プロモーターはグリオーマ細胞のみで lacZ 遺伝子を発現させ，中でも MBP プロモーターが予想に反して一番高い活性を示した。また，ヘルペス単純ウイルスのチミジンキナーゼ (HTK) 遺伝子を MBP プロモーターで制御したレトロウイルスベクターはガンシクロビル (GCV) 投与にてグリオーマ細胞特異的な細胞障害性も示せた。同様の結果が各種ヒトグリオーマ細胞株を用いた場合にも得られた。さらにマウス脳腫瘍モデルに同じレトロウイルスベクターを用いた治療実験を行ったところ，移植グリオーマ細胞の25％に HTK 遺伝子を導入発現できれば GCV 投与により担癌マウスを治癒させることができることが明らかとなり，この bystander 効果における宿主免疫能の役割について考察を加える。一方，レトロウイルスの直接あるいはレトロウイルス産生細胞の脳腫瘍モデルへの投与では未だマウスの治癒は得られていないが，in vivo での遺伝子導入効率の高いセンダイウイルス (HVJ) 膜融合リポソームで lacZ 遺伝子および HTK 遺伝子を持った上記ベクターを投与した際に，グリオーマ細胞特異的 lacZ 遺伝子発現と GCV 投与による担癌マウスの治癒がそれぞれ確認された。現在，レトロウイルスベクターの構造改変により感染効率向上と HTK 遺伝子／GCV 系に新たにサイトカイン遺伝子を加えることで宿主免疫能を賦活しより強い bystander 効果を誘導することを目指しているところである。

(11) アデノウイルスベクターを用いた神経細胞への遺伝子導入法の開発とその応用

橋本光広（理化研）
御子柴克彦（東京大・医科研）

神経細胞に発現している分子の生体内での機能を，神経回路網という高次構造と対応させながら解析するためには，in vivo における神経細胞への効率良い遺伝子導入法の確立が不可欠である。そこで，いくつかの神経細胞型特異的プロモーターを用い，小脳プルキンエ細胞特異的，オリゴデンドロサイト特異的，そしてグリア細胞特異的に遺伝子を発現させるアデノウイルスベクター（それぞれ，AdexL7-NL-LacZ, AdexMBP-NL-LacZ, AdexGFAP-NL-LacZ）を作製した。パーキンソン病の遺伝子治療を目的とし，グリア細胞特異的にチロシン水酸化酵素を発現させるアデノウイルスベクター（AdexGFAPhTH1）を作製し，パーキンソン病モデルラットへの遺伝子導入実験を行った。

また，Cre/loxP の系を用いて，神経細胞型特異的に Cre タンパク質の発現させることにより，遺伝子の発現を制御する系についても報告する。

3．インスリン分泌と糖・脂質代謝の組織間クロストークによる制御

1997．8．25-8．26

代表者：嶋津　孝（愛媛大・医・医化学第一）

世話人：矢田俊彦（生理研）

(1) 中枢神経ヒスタミンによるエネルギー代謝調節

坂田利家（大分医大・医・第一内科）

(2) 神経によるグルコース輸送の制御とその機構

嶋津　孝，箕越靖彦（愛媛大・医・医化学第一）

(3) 糖代謝とカリウム/カルシウム代謝の脳・消化管クロストーク

粟生修司（九州大・医・第一生理）

(4) 摂食抑制による視床下部－下垂体－副腎系の活性化

大村　裕（日本臓器製薬・生物活性科学研）

(5) 糖尿病発症に伴う糖とアミノ酸に対する嗜好性およびインスリンとグルカゴン投与後のMRIによる脳機能の経時的変化

鳥居邦夫（味の素・中央研・基礎研）

(6) 膵β細胞量の減少とNIDDM

島　健二（徳島大・医・臨床検査医学）

(7) ミトコンドリア・グリセロール－3リン酸脱水素欠損マウスのインスリン分泌と糖代謝

江藤一弘，門脇　孝（東京大・医・第三内科）

(8) GLP-1の神経性インクレチン作用

中林　肇（金沢大・大学院自然科学研究科・生命科学）

新島　旭（新潟大・医・生理）

(9) 新しい膵島ホルモンPACAP: autocrine作用によるインスリン分泌の増幅

矢田俊彦（生理研）

(10) 肥満遺伝子産物（レプチン）の新しいエネルギー代謝調節因子としての意義

小川佳宏，益崎裕章，細田公則，中尾一和（京都大・大学院医学研・臨床病態科学）

(11) 肥満とインスリン分泌－膵β細胞レプチン受容体とインスリン分泌－

奥屋　茂，谷澤幸生，岡　芳知（山口大・医・第三内科）

(12) 末梢性／中枢性糖・脂質調節機構における新しいエネルギー代謝情報の担い手としてのレプチンの役割

白石武昌（東海大・医・生体機能構造系神経生理）

佐々木和男（富山大・工・生体情報）

新島　旭（新潟大・医・生理）

大村　裕（日本臓器製薬・生物活性科学研）

⑬　レプチン受容体の脳内における分布・局在と単離神経細胞に対するレプチンの作用

塩田清二（昭和大・医・第一解剖）

室屋真二，瀧川守国（鹿児島大・医・精神科）

矢田俊彦（生理研）

⑭　脳内コリン作動性神経とレプチン発現制御

三浦久幸，井口昭久（名古屋大・医・老年科学）

⑮　脂肪細胞の発生・分化の制御

河田照雄（京都大・大学院・応用生命科学）

⑯　PACAP による脂肪細胞分化

中田正範（鹿児島大・医・臨床検査医学）

塩田清二（昭和大・医・第一解剖）

矢田俊彦（生理研）

⑰　脂肪細胞での遺伝子発現の交感神経性調節

斎藤昌之（北海道大・大学院獣医学研・生化学）

⑱　褐色脂肪細胞における細胞内カルシウム濃度の調節

尾松万里子（滋賀医大・医・第二生理）

⑲　分泌細胞としての脂肪細胞と病態への関与

松沢佑次（大阪大・医・第二内科）

参加者名

嶋津　孝，箕越靖彦（愛媛大・医・医化学第一），坂田利家（大分医大・医・第一内科），粟生修司，高木厚司，水口洋子（九州大・医・第一生理），大村　裕（日本臓器製薬・生物活性科学研），鳥居邦夫，森　将人（味の素・中央研・基礎研），島　健二（徳島大・医・臨床検査医学），江藤一弘，門脇　孝（東京大・医・第三内科），井口昭久，三浦久幸，上田　宗，玉谷典華（名古屋大・医・老年科学），奥屋　茂（山口大・医・第三内科），河田照雄，井上和生（京都大・大学院・農研），松沢佑次（大阪大・医・第二内科），斎藤昌之，浅野　淳（北海道大・大学院獣医学研・生化学），尾松万里子（滋賀医大・医・第二生理），小川佳宏（京都大・大学院医学研・臨床病態科学），白石武昌（東海大・医・生体機能構造系神経生理），塩田清二（昭和大・医・第一解剖），中条茂男（昭和大・薬），中林　肇（金沢大・医・保健管理センター），室屋真二（鹿児島大・医・臨床検査医学），矢田俊彦（生理研）

研究会概要

糖・脂質代謝の過程は，食欲に基づく摂食，栄養素吸収，インスリン分泌，グルコース輸送，

グリコーゲン・脂肪の合成と分解などの各種代謝を含んでおり，これらの過程は脳の制御下に巧みに調節されている。この際，腸・膵・脂肪・筋・肝・脳・自律神経は相互に密接にクロストークしながら機能し，その結果生体として合目的的な糖・脂肪代謝が営まれている。本研究会では，神経性代謝調節，インスリン分泌，脂肪細胞機能，中枢性摂食調節，糖・脂質代謝異常疾患などの分野において，優れた成果を挙げている研究者が集まり，最新の研究成果の発表と討論を行った。幅広い生体組織と機能を包含する内容に関し，各分野のエキスパートが一同に会し，相互にきわめて活発な質問・討論を行う場を持つことが出来たことは画期的であった。各々の参加者は，自分の専門以外の組織における研究の展開を学び，自分の研究を全体の代謝制御の中でより良く位置づけることが出来た。種々の組織における Cellular & Molecullar Biology に終わることなく，それらの成果を統合して生体機能を理解する Integrated Physiology の重要性と面白さを改めて認識し確認した会でもあった。懇親会・2次会は 11PM を過ぎても続けられ，参加者の人間レベルのクロストークも大いに盛り上がった。

(1) 脳内ヒスタミン神経系によるエネルギー代謝調節

坂田利家（大分医大・医・第一内科）

脳内ヒスタミンは神経系中枢と末端のエネルギー代謝調節を協調的に且つ統合的に制御し，生体を恒常的に維持している。生体が低血糖などのエネルギー枯渇状態に陥ると，脳内ヒスタミン神経系が賦活化される。この賦活化はグリア細胞内のグリコーゲンを分解し，脳内のグルコース濃度を上昇させる。血糖値も同時に上昇させるが，GLUT1mRNA の発現を亢進させると共に，インスリン分泌を抑制することで脳内のエネルギー保持に当たる。レプチンによって賦活化された視床下部のヒスタミン神経系は，その情報を交感神経系経由で脂肪組織に投射し，脂肪分解を促進する。一方，この賦活化されたヒスタミン神経系は，acylCoA synthetase mRNA や GLUT4mRNA の発現を抑制することによって，脂肪合成には抑制性に作動していることも明らかになった。

(2) 神経によるグルコース輸送の制御とその機構

嶋津　孝，箕越靖彦，矢野　元（愛媛大・医・医化学第一）

末梢組織でのグルコースの取り込み・利用を促進する生体調節系としては，これまでインスリンが唯一のものと考えられてきたが，私共は視床下部の代謝制御作用を追究する研究過程で，意

外にも視床下部腹内側核 (VMH) の刺激が，褐色脂肪，心筋ならびに骨格筋の 3 組織におけるグルコースの取り込みを選択的に促進させる作用を持つことを見出した。その作用発現にはインスリンを必要とせず，これらの組織に分布する交感神経の直接作用によること，ならびにグルコースの取り込みを促進する交感神経の特異作用は β3-アドレナリン受容体を介して発現することを in vivo の実験から明らかにした。

そこで交感神経の作用機構を解析するため，褐色脂肪細胞の初代培養条件を検討し，培養細胞をデキサメサゾン処理によって分化させることにより，2 種類のグルコース輸送体 (GLUT1 および GLUT4) の発現と，交感神経伝達物質であるノルエピネフリン (NE) ならびにインスリンの両者に応答する細胞系を確立した。この培養細胞を用いてグルコース輸送に及ぼす NE の作用をインスリンの作用と対比させながら追究し，以下の結果を得た。(1)インスリンを作用させた場合にはインスリン受容体の β-サブユニット，インスリン受容体基質 IRS-1，および 60kDa のリン酸化蛋白質のチロシン残基が速やかにリン酸化されるのに反し，NE を作用させた場合にはこれらの蛋白質のチロシンリン酸化反応は認められない。(2) PI3-キナーゼの阻害剤であるワートマンニンはインスリンのグルコース輸送促進作用を完全に抑制するが，NE の作用に対しては無効である。(3)インスリンは GLUT4 の細胞内プールから細胞膜への動員・移行を引き起こすのに反し，NE の作用時には GLUT4 ならびに GLUT1 の細胞内移動は認められない。(4)インスリンを作用させた場合には GLUT4 の細胞膜上への移行を反映してグルコースの最大輸送活性 (Vmax) が増大するのに対し，NE を作用させた場合には Vmax は変化せず，グルコースに対する Km 値の著明な低下が認められる。(5) NE の作用は cAMP の拮抗剤である Rp-cAMP の事前添加によってほぼ完全に阻止される。これらの実験成績は，NE とインスリンが全く異なったシグナル伝達系を介してグルコース輸送を促進させることを示している。NE の作用は GLUT の細胞移行によるものでなく，β3-受容体，次いで cAMP の働きを介して細胞膜にもともと存在する GLUT の活性化に基づくと考えられる。

NE によって活性化される GLUT の分子種を決定するため，GLUT のグルコース認識部位と結合する膜非透過性のビスマンノース誘導体 (ATB-[3H]BMPA) を用い，細胞表面に表出した GLUT を光標識した後，免疫沈降法によって，GLUT1 と GLUT4 を別個に回収し，どちらのアイソフォームが影響を受けるかを解析した。その結果，培養細胞に NE を作用させると，ATB-BMPA で標識される GLUT4 の量は全く変わらないのに，GLUT1 との結合量は 2 倍強に増加し，この増加は細胞膜上の GLUT1 含量の増量を伴わないことから，既存の GLUT1 の立体配置が変化して活性化されたためと考えられる。さらに，この活性化は Rp-cAMP の添加によって阻止されるので，cAMP 依存性の機構によることが明確になった。他方，インスリンの作用時には，ATB-BMPA によって標識される GLUT1 の量は変化しないが，GLUT4 との結合量が著明に増加した。以上の実験成績から，インスリンの作用機構と異なり，NE の作用は cAMP を介して細胞膜上の GLUT1 のグルコース認識部位を表出させ，GLUT1 の輸送活性を特異的に増大させることが結論させる。

(3) ブドウ糖代謝およびCa/K代謝の脳・消化管クロストーク

粟生修司（九州大・医・第一生理）

視床下部外側野には糖代謝調節機構だけでなく，カルシウム(Ca)およびカリウム(K)代謝の中枢性調節機構が存在する。ブドウ糖代謝が迷走神経肝臓枝および膵臓枝による調節を受けているのに対して，Ca代謝は迷走神経胃枝を介して，またK代謝調節は標的臓器は不明であるが，交感神経－β受容体を介して調節されている。さらにCaおよびK代謝調節にはヒスタミンH2受容体も重要な役割を果たしている。カルシトニンは末梢でのみCa調節ホルモンとして作動しているわけでなく，脳室内投与でも血液カルシウム低下作用を示すが，視床下部外側野ブドウ糖感受性ニューロンはカルシトニンで抑制される。

視床下部腹内側核や室傍核にもブドウ糖センサーが存在し，摂食や糖代謝の調節に重要な役割を果たしている。これらの中枢部位もCa/K代謝に関係している。視床下部腹内側核にはPTH2受容体が存在し，PTHでニューロン活動が抑制される。PTHの脳室内投与はウレタン誘発性低カルシウム血症の発生を抑制する。腹内側核を破壊するストレス低カルシウム血症や低K食による筋肉電解室異常の発生が抑えられる。室傍核にはPTH産生細胞が存在し，迷走神経副甲状腺枝を介するCa調節機構が存在している。また内因性Na-Kポンプ阻害物質による筋肉電解質調節にも関与している。

消化器系では肝細胞にPTH/PTHrPtypeI受容体が存在し，PTHによりブドウ糖放出が促される。膵臓内分泌系にはPTH/PTHrPtypeII受容体が存在し，PTHによりインスリン分泌が抑制される。消化管平滑筋や粘膜上皮にはPTH/PTHrPtypeI受容体が存在し，平滑筋の弛緩作用が認められている。

糖代謝だけでなく，Ca/K代謝も中枢性の制御を受けており，中枢および末梢で多様なブドウ糖-Ca/K代謝系のクロストークが存在する。

(4) 摂食による視床下部－下垂体－副腎系および交感神経系の活性化

大村　裕（日本臓器製薬・生物活性科学研）
松本逸郎（長崎大・医）
佐々木和男（富山大・工）
新島　旭（新潟大・医）

[緒言] 摂食でラット上衣細胞から放出されるaFGFはCSF中に0.7pMから15分後0.7nM，45分で7.5nMと増加し，摂食中枢ニューロンに取り込まれて摂食抑制し，海馬ニューロンに取り

込まれて学習・記憶を促進する。aFGF はまた室傍核ニューロンが取り込むので，aFGF と視床下部－下垂体－副腎系と交感神経系との関係につき検討した。

［結果］1-10ng aFGF icv 投与（0.23-2.3nM, CSF300μl として）で１時間後にラット血中コルチコステロン (CS) は 10μg/100ml からそれぞれ 23 および 28μg/100ml に，アドレナリン (Ad) は 1.4 および 1.8ng/ml に用量一反応的に増加した。同量の iv 投与（6.3-63pM，血液 11ml として）で両者は icv 投与の0.5および0.7倍増加した。抗 CRF 抗体の icv 前投与で，CS 増加は aFGFicv 投与で有意に62％の，iv 投与で有意でない抑制であった。同様に Ad 増加は，aFGFicv 投与で約20％の，iv 投与で約60％の減少であった。室傍核 CRF ニューロン60個中60％は aFGF で活動上昇し，13％は抑制されたので同ニューロンの大部分は aFGF により CRF を放出すると考えられる。aFGFiv 投与で副腎，脾，褐色脂肪組織へ行く交感神経活動は増加するが，求心性迷走神経肝臓枝の切断でこれは抑制される。Ad 増加もこの切断で40％に減少する。aFGF の iv 投与で血中 ACTH は著明に増加し，CS も増加するので aFGF は血液脳関門のない下垂体を活性化している。

［考察］icv 投与 aFGF や，図１に示す上衣細胞から遊離した aFGF は中枢性に室傍核に作用し CRF 放出→下垂体 ACTH 分泌→ CS 放出となる。また室傍核の活動上昇は交感神経活動を上昇させる。一方図２のように iv 投与 aFGF は下垂体に作用→ ACTH 分泌→ CS 分泌に働き，肝門

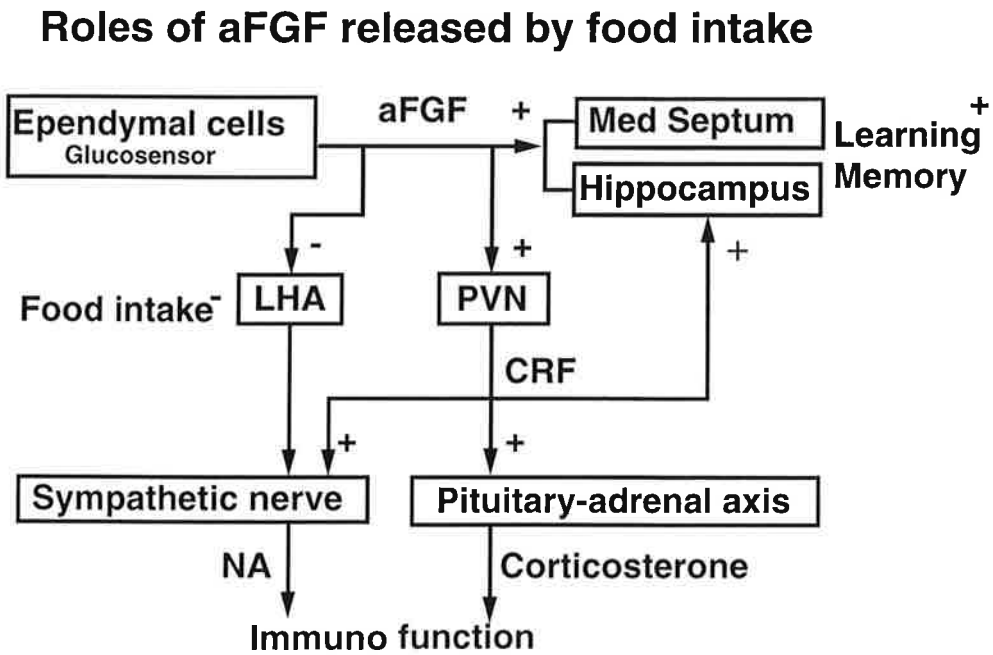


図１．icvFGF 投与の室傍核－下垂体－副腎系及び交感神経系への効果。摂食中枢 (LHA) に作用して摂食抑制。海馬 (Hippocampus) 及び内側中隔 (Med. Septum) に作用して学習・記憶促進。図では上衣細胞から放出された aFGF の作用としている。

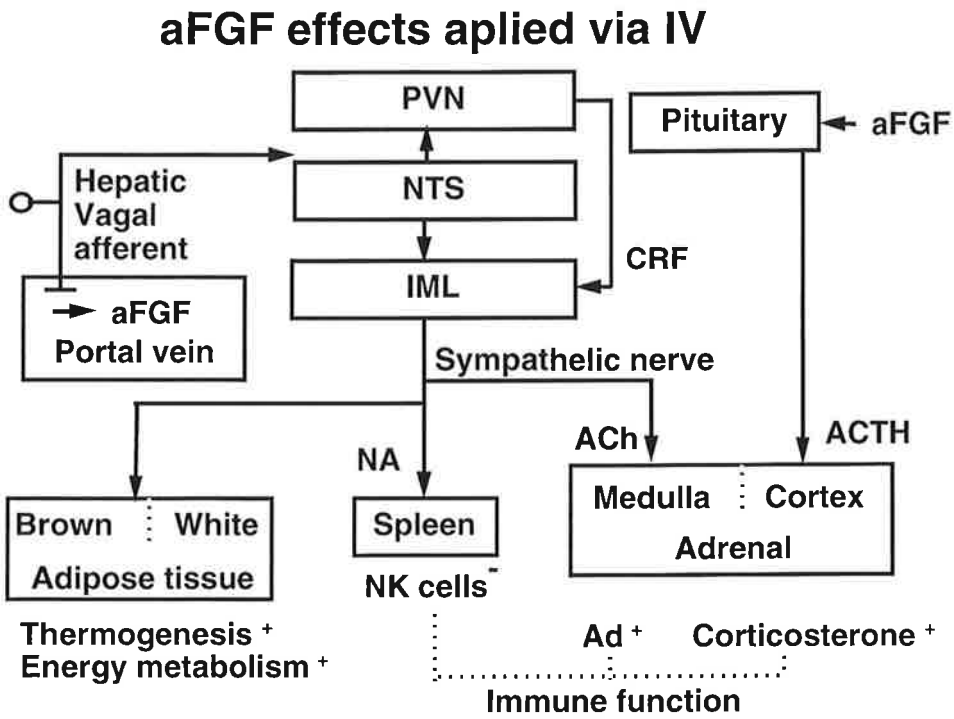


図２．iv 投与 aFGF の下垂体－副腎系および交感神経系への効果。aFGF は血液脳関門のない下垂体に作用して ACTH を分泌。また，門脈にある求心性迷走神経終末に作用→孤束核 (NTS) →交感神経下位中枢（IML，中間外側細胞柱）に作用して交感神経を活動させる。

脈に入って求心性迷走神経活動を促進させこれが孤束核に働きこれから交感神経系 (IML) を活動させる。これにより副腎の Ad 分泌促進，脾臓 NK 細胞活性抑制，褐色脂肪織熱産生促進となる。また Ad による生体エネルギー代謝促進が起こる。こうして aFGF は多彩な生理作用を発揮する。

［結論］ラットに aFGF を icv あるいは iv 投与すると用量一反応的に血中 CS および Ad が増加する。icv 投与での CS 及び Ad 増加は室傍核に作用して CRF 放出によるが，iv 投与での増加は下垂体に作用して ACTH 放出による。iv 投与による Ad 放出は，肝門脈の求心性迷走神経終末に作用して，反射的に交感神経を活動させることによる。また脾臓，褐色脂肪組織などへの交感神経も活性化される。こうして aFGF は視床下部－下垂体－副腎系および交感神経系を活性化し，免疫，発熱，エネルギー代謝など関与する。

(5) 糖尿病発症に伴う糖とアミノ酸に対する嗜好性およびインスリンとグルコース投与後のMRIによる脳機能の経時的変化

鳥居邦夫（味の素・中央研・基礎研）

視床下部は摂食行動の発現と抑制に深く関わっていることがよく知られているが，実際に血液中のグルコースを監視し処理する機構やそれらが実際の摂食行動に関与するしくみについては，多くの部分が未解明のままである。これらの機構を検討する目的で，糖尿病動物すなわちグルコース飢餓に陥っている動物にインスリンを与え，大量の血中にあるグルコースを速やかに筋等の末梢組織で利用させWistar系ラットにストレプトゾトシン（STZ, 60mg/kg体重）を投与し，1～2日後に高血糖値を確認し，ラットの脳の活動をインスリン投与（40U/kg体重）前と投与直後から10分ごとに1時間計測を行った。インスリン投与50分後に視床下部の信号強度が約15％上昇した。血糖値はインスリンを投与してから10分後に急激に低下し，50分後には正常値に低下していた。信号の変化部位が海馬（15分後）から室傍核（30分後），背内側核（40分後），腹内側核（50分後）へと連続的に移動し，空腹状態から満腹状態に移行する際に応答する脳の各部位と良い一致をみたことにより，末梢からの糖利用性改善の信号がインスリン分泌，エネルギー代謝，体温調節，満腹感などの摂食行動における恒常性維持機構に寄与していることが示唆された。この現象が正常動物で観察させるか否かを検討する目的で，2日間絶食させた飢餓ラットにグルコース投与（50mg/kg体重）し，視床下部の同部位で10分後と50分後に二峰性の信号の増加がみられた。腹内側核には血中グルコース濃度の上昇に反応する神経細胞が存在し，これが10分後の一過的な信号の上昇に関与した可能性が考えられる。またインスリン分泌のパターンはグルコース投与後10分後に最初のピークがありその後持続的分泌をすることともよい一致をみる。50分後の信号の連続的な上昇は，都尿病動物の実験とは異なり，末梢でのグルコース代謝が連続的に行われていることを示唆している。以上の様に従来困難とされた糖尿病動物へのインスリン投与に伴うエネルギー代謝の正常化における脳内機序が明らかになった。

Sprague-Dawley系ラット（4週令）をアクリル製大型ケージに5匹ずつ収容して，15％全卵蛋白質を与え，飲料水として蒸留水および0.1M, 0.5M, 2.0Mのグルコース水溶液を自由に選択摂取させた。8週時にSTZを経静脈投与（25mgあるいは50mg/kg体重）し，引き続き選択摂取行動を観察した。25mg投与郡の血糖値，摂食量，溶液摂取量および選択摂取行動には，STZ投与による影響はなかった。50mg投与群では，投与後，空腹時血糖値の上昇とともに摂食量，溶液摂取量およびグルコース摂取量の著しい増加が認められた。糖尿病発症に伴い，ラットにおいても糖尿病患者と同様の食行動を示すことが確認された。次に，グルコースに対する選択摂取行動実験と同様の条件で，飲料水として蒸留水とともに食塩および15種類のアミノ酸水溶液を与え自由に選択摂取させた。25mg投与群では，空腹時血糖値やアミノ酸に対する選択摂取行動においてストレプトゾトシン投与による変化は認められなかった。一方，50mg投与群では空腹時の血

糖値が上昇するとともに，溶液摂取量が著しく増加し，特にアルギニンでは摂取量および総飲水量に対する割合がともに増加する傾向が認められた。アルギニンについては，インスリン分泌作用が知られているが，アルギニンを投与した場合にも空腹時血糖値の上昇や成長抑制などの病態は全く改善されず，その効果は非常に弱いと考えられた。糖尿病を発症した動物では，尿素回路に関連する酵素活性が著しく上昇することが知られている。実際，血中アルギニン濃度が低下する傾向が認められることから，アルギニンは体蛋白の異化や糖新生で生じるアンモニアの処理に優先的に利用され，相対的なアルギニン欠乏状態になっていると考えられている。したがって，ラットは尿素回路の基質としてアルギニンを積極的に選択摂取したと考えられた。以上より糖尿病発症に伴う糖，アミノ酸嗜好性は脳によるエネルギー代謝を中心として，生体恒常維持機構にそった合理的な行動と言える。

(6) 膵β細胞量の減少とNIDDM

島　健二（徳島大・医・臨床検査医学）

膵β細胞増殖能傷害，それに起因するβ細胞量の減少が，NIDDMの病因に関係しているか否かを明らかにすべく，NIDDMモデルラットOLETFを対象に検討した。OLETFラット膵を70%切除(Px)し，遺残膵β細胞に負荷をかけた際のβ細胞の代償的増殖能，血糖の変化を正常対照PxLETOと比較した。PxOLETFは術3日後より高血糖となり，実験終了時（術91日後）まで持続したが，PxLETOはその間正常血糖値を維持した。

BrdU取り込み率を指標にしたβ細胞増殖能はPxOLETFはPxLETOの1/6に減弱していた。実験終了時のβ細胞はPxOLETFでは1.5倍に増加していた。両群のインスリン含量もほぼ類似の変化を示した。PxOLETFに連日ニコチナマイドを投与すると，β細胞はPxLETOのそれ以上に増加し，術後の高血糖も解消された。NIDDMの病因にβ細胞増殖能障害が重要な役割を果たしていることが示唆された。

(7) ミトコンドリア・グリセロール－3リン酸脱水素酵素欠損マウスのインスリン分泌と糖代謝

江藤一弘，門脇　孝（東京大・医・第三内科）

［目的］膵β細胞からのグルコース応答性インスリン分泌の際に必要とされる代謝シグナルのうち主要なものは，最終的にはATPとして作用する。ATP産生効率を決定する因子のひとつと

して，解糖系の回転を促進すると同時に，還元電子を細胞質よりミトコンドリア内へと運搬するグリセロールリン酸(GP)シャトルの重要性が指摘されている。なかでもミトコンドリア内膜に存在しFADを補酵素とするglycerol-3 phosphate dehydrogenase (m GPDH)がこのシャトルの律速酵素と考えられ，mGPDHの異常によりシャトル機能が大幅に阻害され，グルコース応答性インスリン分泌が低下することが予想される。mGPDHは膵β細胞で高発現しているが，実際にGkラットを含めた各種の糖尿病モデル動物やヒトNIDDM患者でその活性低下が指摘されている。今回，mGPDH遺伝子を欠損させたマウスを樹立し，解析を試みたので報告する。

［成績］ 1．F2にmGPDH欠損ホモ接合マウスが存在することをSouthern解析で確認した。ホモマウスはメンデル律に合成する割合で誕生，成長し，雌雄とも生殖能を有した。

2．膵島，骨格筋を用いた検討により，ホモマウスにmGPDH蛋白の発現はなく，mGPDH活性も全く欠損していた。ヘテロマウスでは蛋白量，活性とも約半分に低下していた。

3．出生時の体重は，ワイルド，ヘテロ，ホモマウス間で差がなかったが，3週齢を過ぎる頃からホモマウスの体重増加不良がみられた。(雄性で10～15%，雌性で10%弱，ワイルドおよびヘテロより少ない)。

4．腹腔内ブドウ糖負荷テストでは，3群間に有意な血糖値の差は認めなかった。この際の血中IRIにも有意差を認めなかった。ホモマウス膵島のバッチインキュベーション，ペリフュージョンでもグルコース応答性インスリン分泌は正常であった。腹腔内インスリン負荷テストではインスリン抵抗性は存在しなかった。

5．もう一つのシャトルシステムであるMalate-Aspartate (MA)シャトルの阻害剤aminooxyacetate (AOA)の存在下ではホモマウス膵島のグルコース応答性インスリン分泌は廃絶した。しかし，methyl pyruvateによるインスリン分泌は良好であった。

6．AOA存在下でのホモマウス膵島のグルコースutilizationに大きな障害は認められないことが示唆された。

［考察］ GPシャトルの単独欠損のみではグルコース応答性インスリン分泌は正常であり，MAシャトルの阻害のみでも軽度の低下にとどまったが，両方のシャトルが停止すると分泌は廃絶した。シャトルシステムがグルコース応答性インスリン分泌に必須であることが初めて示された。一方，ミトコンドリアのみで代謝されるsecretagogueによるインスリン分泌にシャトルシステムは必要ないことが示唆された。

AOA存在下でのホモマウス膵島のグルコース利用はほぼ正常であると思われ，この際，解糖系の回転にとって必要なNAD＋の再酸化は乳酸脱水素酵素によりおこなわれていると考えられる。この嫌気的解糖下ではピルビン酸がTCAサイクルに入っていくことはできない。これが実際にそうであるかはグルコース酸化の検討結果を待たなければならない。

［結論］ グルコース応答性インスリン分泌の代謝シグナルのうち主要なものはATPとされるが，その産生部位である解糖系，シャトルシステム，ミトコンドリアでの好気的酸化それぞれの果たす役割の詳細は不明である。mGPDH欠損マウスの解析により，これらの3者をある程度分別し

て検討することが可能となった。

(8) GLP-1 の神経インクレチン作用

中林　肇（金沢大・大学院自然科学研究科・生命科学）
新島　旭（新潟大・医・生理）

栄養素の経口摂取時には，インスリンを中心とする膵ホルモン分泌促進機構が作動する（インクレチン作用）。この機構には，消化管からの栄養素吸収に伴って門脈血中に放出される種々の消化管ホルモン（液性因子）が関与する。今日，液性インクレチン作用を示す代表的ホルモンとして，glucagon-like peptide-1 (7-36) amide (tGLP-1) と glucose dependent insulinotropin (GIP) が知られている。しかし，我々はラットを用い麻酔下に，(1)門脈内に生理学的及び薬理学的量の tGLP-1 （各々 0.2 及び 4.0pmol）を注入すると迷走神経肝臓枝の求心性電気活動は有意に増加する。(2)同様の tGLP-1 注入により迷走神経膵臓枝の遠心性活動は有意に増加するが，同神経肝臓枝切断状態ではこの現象は見られない，(3) vehicle, GLP-1 (1-37) （インスリン分泌作用のない），及び GIP 注入時には肝臓枝活動は変化しない，ことなどを見出した。以上の成績は，消化管由来の液性情報 (tGLP-1) が，その構造特異的に肝門脈領域で神経性情報は変換され，さらに神経反射性に膵島機能に影響を与える（神経性インクレチン作用）という，ユニークな消化管・膵島間の内分泌・神経連関を成立させることを示唆する。

(9) 新しい膵島ホルモン PACAP: autocrine 作用によるインスリン分泌増強

矢田俊彦（生理研）

Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) は膵島ホルモンであるのか，そして膵島インスリン分泌の内在性増強因子であるのかを検討した。高グルコースと Incubate したラット膵島からのインスリン分泌は，PACAP 抗体の共存により抑制された。膵島を高グルコースと Incubate した液には，単一β細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を増加させる活性があり，その活性は PACAP 抗体により中和された。用いた PACAP 抗体は，合成 PACAP による $[Ca^{2+}]_i$ 増加も抑制したが，VIP, glucagon による $[Ca^{2+}]_i$ 増加には影響せず，抗体の PACAP 選択性が示された。従って，膵島から放出され PACAP 抗体により中和されるインスリン分泌促進因子は PACAP であると考えられた。次に，PACAP は免疫組織化学的にラット膵島に局在した。膵島とインスリノーマβ細胞株に PACAPmRNA の発現が RT-PCR で認められ，PACAP38 の合成

と局在が蛋白生合成実験と western blot により認められた。従って，PACAP は膵島物質であると考えられた。次に，膵島の全ての細胞に PACAP 受容体の局在が見られた。画像解析と免疫組織化学的細胞同定を組み合わせた解析により，β細胞の中にはグルコース刺激に対して$[Ca^{2+}]_i$増加を示さない細胞が約20％存在すること，このグルコース不応答性β細胞に PACAP38 が作用して$[Ca^{2+}]_i$増加を誘発することが観測された。以上の結果より，PACAP38 は新しい膵島ホルモンであり，グルコース刺激により分泌され，autocrine 作用を発揮してβ細胞のグルコース応答を増強し，さらにグルコース不応答性β細胞に応答を誘導して，グルコースによるインスリン分泌の膵島内増幅因子として機能すると結論される。

(10) 肥満遺伝子産物（レプチン）の新しいエネルギー代謝調節因子としての意義

小川佳宏，中尾一和（京都大・大学院医学研・臨床病態科学）

肥満遺伝子産物（レプチン）は，脂肪組織に由来する新しいホルモンであり，主に，視床下部を介してエネルギー代謝調節に関与すると考えられている。レプチンの摂食抑制作用は視床下部弓状核を，交感神経活動亢進作用は腹内側核を介することが証明させており，レプチンの視床下部作用は複数の異なる経路によるものと考えられている。脂肪組織におけるレプチン遺伝子発現と血中レプチン濃度は，肥満の程度あるいは体脂肪率に比例して変動し，肥満あるいは関連疾患における病態生理的意義が注目されている。我々は最近，肝臓においてレプチンを過剰発現させることにより，血中レプチン濃度が著しく上昇するトランスジェニックマウスの作製に成功した。このマウスは全身の脂肪組織が消失した脂肪組織欠損マウスであり，インスリン感受性の亢進とエネルギー消費率の増大が認められた。以上より，レプチン及びその産生臓器である脂肪組織のエネルギー代謝調節における意義が示唆される。

(11) 肥満とインスリン分泌ー膵β細胞のレプチン受容体とインスリン分泌

奥屋　茂（山口大・医・第三内科）

［目的］肥満は高インスリン血症を惹起するとされている。一方血中レプチンレベルは，肥満度，空腹時インスリンレベルと高い相関を示している。我々はレプチンによるインスリン分泌促進の可能性を考え，膵β細胞のレプチン受容体 (Ob-R) の発現様式ならびに同細胞へのレプチンの効果を検討した。さらに，レプチンのシグナルの伝達機構についても検討した。［方法］MIN6 細胞・RINm5 細胞・膵ラ氏島を培養し，インスリン分泌量，インスリン mRNA 発現量ならびにインス

リン含量を測定した。MIN 細胞を 5nM レプチンと培養し，STAT 蛋白チロシンリン酸化の有無の検討，および MAPK 活性の測定を施行した。[結果] RT-PCR により，MIN6 細胞，RINm5 細胞・膵ラ氏島に Ob-Ra・Ob-Rb 両アイソフォームの発現が認められた。Western blot により，Ob-R の蛋白レベルでの発現が確認された。1nM レプチンは，MIN6 細胞・膵ラ氏島において 5mM グルコース存在下でのインスリン分泌を有意に約40％促進した。膵ラ氏島のインスリン mRNA 発現量・インスリン含量に対しては有意な影響を及ぼさなかった。一方，高濃度 (10-100nM) レプチンは，16.7nM グルコースによるインスリン分泌を10％抑制した。5nM レプチンは，STAT-1 および STAT-3 のチロシンリン酸化を増加させたが，STAT-5 のリン酸化には有意な変化を認めなかった。また，同時に MAPK の活性化も引き起こした。[結論] 肥満者の血中レベルである 1nM レプチンは膵β細胞に直接作用し，インスリン基礎分泌を促進した。肥満によって惹起される空腹時高インスリン血症に，膵β細胞に対するレプチンの直接作用も関わっている可能性が示唆させた。また膵β細胞において，JAK-STAT および MAPK の両シグナル伝達系がレプチンにより活性化されることが示唆させるが，細胞機能への効果については今後の検討課題である。

⑿ 末梢性／中枢性糖・脂質調節機構における新しいエネルギー代謝情報の担い手としてのレプチンの役割

白石武昌（東海大・医・生体機能構造系神経生理）
佐々木和男（富山大・工・生態情報）
新島　旭（新潟大・医・生理）

肥満遺伝子 ob gene が白色脂肪細胞に 16kDa，147個のアミノ酸からなる抗肥満蛋白 leptin (ob protein) を発現させる。Leptin は fat feedback hormone として組織内脂肪蓄積情報を中枢神経系・視床下部に送ることにより摂食制御に関与し，一方で自律神経系を介し末梢での代謝や膵臓細胞への分泌調節を行う（negative-feedback 機構）。しかしながら標的部位である視床下部，とくにニューロンレベルでの作用や，末梢での情報伝達への作用は明らかにされていない。

Wistar-SPF-VAF 雄性ラット (350-450g) ならびに Zucker-obese 雌雄ラット (500-800g) を用い，生体エネルギー代謝を統御する視床下部諸核の神経活動並びに求心性迷走神経肝臓枝，褐色／白色脂肪組織への遠心性交感神経活動に対する leptin の影響を麻酔下，slice 標本及び whole-cell パッチクランプ法で検討した。低濃度 (1-10pg) の leptin （肝門脈投与）はブドウ糖感受性迷走神経肝臓枝求心性活動を用量－依存性に抑制した。このことは摂食抑制機序の一つを裏付けた。褐色及び白色脂肪組織への遠心性交感神経活動に対しては›100pg （静注）で興奮性を増加させた。これらは摂食による血中ブドウ糖・インスリン濃度上昇に依って，末梢のエネルギー代謝情報を修飾することを直接示す成績である。

一方，視床下部弓状核 (ACN) の slice 標本ではブドウ糖感受性細胞の活動は leptin (10pM-0.1nM) により抑制された。摂食中枢 (LHA) 内のブドウ糖感受性・非感受性細胞の39％・48％のニューロン活動が leptin により抑制され，満腹中枢内 (VMH) のブドウ糖受容性細胞 (GRN) の78％，非受容性細胞の37％が促進された。VMH 内の GRN の促進のイオン機構を Whole-cell パッチクランプ法で解析した。leptin による脱分極は膜コンダクタンスの上昇に起因し，その逆転電位は -10 から -15mV であった。すなわち非選択的カチオンチャネルの閉口である。室旁核 (PVN) の小細胞は促進される傾向であった。Zucker-obese ラットではいずれの部位でも明らかな反応低下が認められ，leptin 受容体機能不全が示唆された。

以上の成績から，leptin は，末梢情報修飾作用と，末梢の脂肪蓄積情報などの信号を自律神経系へと feedback すること。同時に摂食調節に直接関わる LHA・VMH・ACN・PVN 等の視床下部諸核の活動を修飾する事である。すなわち leptin は末梢と中枢神経系での信号転換機構の一員として cross-talk することにより feedback hormone としてエネルギー代謝調節に関わっていることが示された。

⑬ レプチン受容体の脳内における分布・局在と単離神経細胞に対するレプチンの作用

塩田清二（昭和大・医・第一解剖）
室屋真二，瀧川守国（鹿児島大・医・精神科）
矢田俊彦（生理研）

レプチン受容体のC末端側のアミノ酸17個に対する抗体を用いてラット脳内のレプチン受容体の分布・局在を免疫組織化学的に観察した。また，ニューロペプチド Y (NPY) は弓状核に発現し，摂食量を増加させ，エネルギー消費を減少させ，高インスリン血症と高コルチコステロン血症を招くことが知られている。NPY 含量神経細胞体とその突起は弓状核に多数存在することから，レプチンによる弓状核の単離神経細胞に対する作用を機能形態学的にしらべた。さらに，弓状核には GABA 含有神経終末も多数みられることから，NPY 含有ニューロンの GABA 性神経支配を，二重免疫電顕法を用いて観察した。

レプチン受容体免疫陽性神経細胞体は，視床下部の弓状核，腹内側核，室旁核，外側視床下部にみられる。その他，免疫陽性神経細胞体は，海馬の GA1-3 領域，扁桃体，新皮質などにみられる。NPY 含有神経細胞体とその突起は弓状核に豊富にみられ，多数の性質不明の神経終末がシナプスを形成している。さらに，GABA 含有神経終末が NPY 含有神経細胞体とその突起にシナプスを形成している。

弓状核のニューロンを単離し，fura-2 を用いた蛍光画像解析により細胞内 Ca^{2+} 濃度を測定し，Ca^{2+} 測定後抗 NPY 抗体を用い免疫組織化学的に細胞同定した。弓状核 NPY ニューロンは細胞

外液のグルコース濃度を低下させると細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) が上昇し，グルコース濃度を上昇させると $[Ca^{2+}]_i$ が低下する。グルコース濃度低下による上昇反応は Leptin1nM および GABA1μM により抑制させる。GABA の作用については agonist, antagonist 実験の結果により，GABA-A および -B レセプターが関与し，A レセプターを介する作用がより強力であると示唆される。

(14) 脳内コリン作動性神経とレプチン発現制御

三浦久幸，井口昭久（名古屋大・医・老年科学）

（目的）脳内コリン作動性神経を賦活する目的でコリンエステラーゼを阻害剤ラットの脳内に投与し，各脂肪組織の肥満遺伝子発現量を検討し，中枢性コリン作動性神経系の肥満に及ぼす影響を検討した。一方，アルツハイマー病患者（以下 AD）の血中レプチン濃度と血中ホルモン濃度との相関を検討した。

（方法）雄 Wistar 系ラットの第三脳室へコリンエステラーゼ阻害剤であるネオスチグミン (50nmol) を微量注入した。2 ないし 4 時間後に脂肪組織を取りだし，ノーザンブロット解析を行った。また，福祉村病院に入院中の AD を対象に血中レプチンと血糖，血中インスリン，血中コーチゾール，血中カテコールアミン濃度の相関を検討した。

（結果）ラット脳内へネオスチグミン投与後の 4 時間の皮下脂肪組織に obmRNA 発現量の著明な減少を認めたが，他の脂肪組織では有意な変化はなかった。一方，一般検診受診者では，BMI と血中レプチン濃度は有意な正の相関を示したが，AD のうち血中レプチン濃度のばらつきが大きく，BMI との一定の相関を示さなかった。AD のうち血中レプチン濃度が低い病例では，血中ノルアドレナリン値が高い傾向が認められた。

（考察）ラットでは，脳内コリン作動性神経系を賦活し，末梢の交感神経系を亢進させた状態では，皮下脂肪組織の肥満遺伝子発現のみ影響され，脂肪組織の部位特異性が示された。また，ヒト AD では，血中レプチン濃度が，BMI との相関を示さず，脳内コリン作動性神経レプチン発現および血中濃度の制御に重要な役割をしていると考えられた。

(15) 脂肪細胞の発生・分化の制御

河田照雄（京都大・大学院農学研・応用生命科学）

脂肪細胞は，筋細胞などと細胞起源を同じくするが，胚発生（個体発生）とは全く連動しない

独自の発生・発達過程を辿る。脂肪細胞は，自発的に終末分化が決定されるわけではなく，少なくともその始動には，栄養条件などの「代謝的環境因子」がスイッチ（シグナル）になっていることが明らかとなってきた。つまり脂肪酸や脂溶性ホルモンの関与するリガンド要求性の受容体型核内転写因子（PPAR: peroxisome prolirator-activated receptor，ペルオキシソーム増殖剤応答性レセプター）が脂肪細胞で発現調節されるとともに，分化に関与するC/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) などのリガンド非要求性の転写因子とクロストークしネットワークを形成する事によって一連の脂肪細胞分化関連遺伝子群の発現が進行していくものと推察される。脂肪細胞の分化がリガンド要求性であるという特性は，筋細胞の分化とは根本的に異なるところであり，脂肪細胞が『代謝依存的』な存在であることと深く関連するとともに，極めて生理的合目性があるものと思われる。

(16) PACAPによる脂肪細胞分化とグルコース取り込み促進

中田正範（鹿児島大・医・臨床検査医学）
矢田俊彦（生理研）
塩田清二（昭和大・医・第一解剖）

Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) はラット膵を支配する神経繊維に存在し，また膵島細胞はPACAPを合成・分泌している。ラットの膵周辺の脂肪組織にはPACAP受容体が豊富に局在することが免疫組織化学的に認められる。そこで，PACAPの脂肪細胞に対する作用を検討した。繊維芽細胞株3T3-L1はインスリンによって脂肪細胞へと分化することが知られるが，3T3-L1にPACAP受容体の発現が観察された。10^{-8} M PACAP38による脂肪細胞分化が形態的に観察された。PACAPによるPKC活性化が観察された。次に，分化した3T3-L1脂肪細胞を用いて，グルコース取り込みに対するPACAPの作用を検討した。インスリンはグルコース取り込みを刺激し，一方10^{-7}M PACAP38は単独では無効であったがインスリンによるグルコース取り込みを増強した。PACAPはインスリン受容体およびインスリン受容体基質1 (IRS-1) の燐酸化には影響しなかったが，インスリンによるPI3-kinaseの活性化を約2倍に増強した。以上の結果により，PACAPはインスリン分泌刺激ホルモンであるのみならず，インスリン作用標的である脂肪組織に働いてインスリンによる脂肪細胞分化とグルコース取り込みを増強することが明らかとなった。PACAPは糖代謝調節に重要な役割を担うものと示唆される。

(17) 脂肪細胞での遺伝子発現の交感神経調節

斎藤昌之（北海道大・大学院獣医学研究科・生化学）

脂肪細胞での遺伝子発現は，インスリンやカテコールアミン，甲状腺ホルモン，グルココルチコイドなど，様々な因子によって調節されているが，特に，ノルアドレナリンの作用は，交感神経による豊富な支配を受けている褐色脂肪細胞で重要である。例えば，動物を寒冷暴露すると，交感神経活動の上昇に伴い，褐色脂肪細胞 (BAT) の様々な遺伝子（UCP, GLUT4, VEGF など）の発現が変化し，最終的には，組織増生が起こって熱産生能が増加する。これらの変化はイソプロテレノールの慢性投与によってほぼ再現できるので，主にノルアドレナリンのβ作用に起因しており，BAT の 3 種のβ受容体のうち脂肪細胞に特異的なβ3 受容体が関与していると思われる。事実，β3 受容体作動薬は，全身の脂肪細胞での脂肪動員と UCP 発現を誘発し抗肥満効果を発揮する。

(18) 褐色脂肪細胞における細胞内カルシウム濃度の調節

尾松万里子（滋賀医大・第二生理）

褐色脂肪組織は哺乳類における熱産生器であり，交感神経末端から放出されるノルアドレナリン (NA) によって支配されている。単離細胞への短時間の NA 投与が細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を上昇させることが報告されているが，その詳細は明らかではない。今回，幼若ラットから得た培養成熱褐色脂肪細胞を用いて単一細胞の $[Ca^{2+}]_i$ を蛍光指示薬 Fura-2 を用いて顕微分光測定した。褐色脂肪細胞に NA を与えると $[Ca^{2+}]_i$ は徐々に上昇し，NA を取り去るまで一定の値を維持した。この反応は主にα1-アドレナリン受容体を介するものであった。一方，細胞外に ATP を与えると $[Ca^{2+}]_i$ は直ちに上昇してピーク値に達した後，緩やかに静止状態に戻るという一過性の反応を示し，これはアドレナリン受容体を介するものではなかった。これらことから，褐色脂肪細胞におけるノルアドレナリンと ATP による細胞内カルシウム濃度の調節は，それぞれ独立の機構によるものと考えられた。

⑲ 分泌細胞としての脂肪細胞と病態への関与

松沢佑次（大阪大・医・第二内科）

脂肪細胞が従来考えられて来たように，単なるエネルギー備蓄細胞ではなく，多くの生理活性物資を合成，分泌する分泌細胞であることが明らかとなってきた。私達が行っている脂肪細胞の大規模ランダムシークエンスによる遺伝子マッピングの結果，皮下脂肪では全遺伝子の20％，内蔵脂肪では30％が分泌蛋白をコードする遺伝子であることが明らかになった。その中で plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) は，内蔵脂肪の蓄積と共にその mRNA の発現が亢進し，ヒト症例でも，血中レベルは内蔵脂肪量と相関することが明らかになり，内蔵脂肪型肥満に多い血管合併症の要因となり得ることが明らかとなった。また新しい分泌蛋白として，脂肪細胞に特異的に最も強く発現する遺伝子 apM-1 が同定され，その遺伝子産物アデイポネクチンは，動脈硬化の防御作用のあることも明らかとなった。以上より肥満に伴う合併症，とくに血管合併症の分子機構に脂肪細胞から分泌される生理活性物質（アデイポサイトカイン）の分泌異常が重要であることを示した。

4．ATP 受容体の生理機能と分子機構に関する総合的基礎研究（ATP 受容体研究会）

1997．8．29－8．30

代表者：桂木　猛（福岡大・医・薬理）

世話人：山岸　俊一（生理研）

(1) Overview

井上和秀（国立衛研・薬理）

(2) C6BU-1 細胞に強制発現した P2X 受容体を介する Ca^{2+} 流入の特徴

上野伸哉，井上和秀（国立衛研・薬理）

(3) 神経発生期での ATP 受容体による Ca 動員

山下勝幸，杉岡美保（大阪大・医・第二生理）

(4) ヒト顎下腺由来培養細胞 HSG cell のカルシウム流入に関与するプリン受容体サブクラスの検討

栗原琴二，上羽隆夫（明海大・歯・口腔生理）

(5) 副腎皮質細胞及びグリア細胞に ATP が引き起こすカルシウム信号

太田善浩（東京農工大・工・生命工学）

(6) 網膜ミクログリアの活性化機構と ATP 受容体の関与

森際克子（大阪大・医・第二生理）

(7) ATP 受容体 ($P2X_1$) の分布：*in situ* hybridization と免疫組織化学

岩永敏彦（北海道大・獣医・解剖）

(8) アフリカツメガエル卵母細胞 follicle cell 上の ATP 受容体

木村真吾，藤田玲子（岩手医大・医・第一生理）

松本光比古（弘前大・医技短）

新貝鉚蔵（岩手大・工・情報工学）

藤田典久（立命館大・理工・生物工学）

(9) 腎上皮細胞株 (A6) における ATP 受容体

森　正弘（神戸大・医・第一生理）

(10) P3 受容体様アデノシン結合タンパク質の同定と機能

中田裕康（都神経研・神経生化）

(11) NG108-15 細胞のアデニル酸シクラーゼと連関する ATP 受容体

松岡　功，大久保聡子，中西弘則（福島医大・薬理）

(12) NG108-15 細胞の P2Z 受容体について

海宝裕美，木村純子，松岡　功，中西弘則（福島医大・薬理）

⑬ 副腎皮質ホルモン産生に連関した ATP 受容体

川村将弘，西　晴久，堀　誠治（慈恵医大・薬理第一）

⑭ 脊髄ニューロンにおけるグリシン性 IPSCs の ATP による修飾

赤池紀扶（九大・医・第二生理）

⑮ P_2-プリン受容体による心筋イオンチャネルの調節

松浦　博，顕原嗣尚（佐賀医大・医・生理）

⑯ 大腸 Na 吸収に対する管腔側 ATP の効果

鈴木裕一，山本　武（静岡県立大・食品栄養・生理）

⑰ 血管平滑筋における P2 受容体シグナリング

多久和陽，張　京浩（東大・医・細胞分子生理）

⑱ ラット胃輪走筋における ATP の作用とその受容体

乙黒兼一，太田利男，伊藤茂男，中里幸和（北海道大・獣医・薬理）

⑲ Diadenosine Polyphosphates (APnA) の血管作用

住吉理絵子，平野勝也，金出英夫（九州大・医・心研）

⑳ アゴニスト誘発 ATP 放出に関与する諸因子

桂木　猛，藤木　園，為末　敏（福岡大・医・薬理）

佐藤千江美，薄根貞治（機能研）

㉑ ATP 受容体刺激による血管組織からの ATP 遊離について

篠塚和正（武庫川女子大・薬・第二薬理）

㉒ 上皮細胞からの ATP 分泌機構

挾間章博，三好毅志，林　誠治，三輪晃子，山本友美，清水貴浩，上坂敏弘，岡田泰伸（生理研）

㉓ 乳腺細胞間相互作用に果たす ATP 受容体の役割

古家喜四夫（京都工繊大・応用生物）

中野春男，山岸俊一（生理研）

榎本浩一（島根医大・生理）

参加者名

井上和秀，上野伸哉（国立医薬品食品衛生研究所・薬理部），岩永敏彦（北大院・獣医学・解剖），太田善浩（東京農工大・工・生命工学），尾松万里子（滋賀医大・第二生理），桂木　猛（福岡大・医・薬理），柴田和彦，佐藤千江美，薄根貞治（福岡大・医・病態機能系総研），平野勝也，住吉理絵子，井原栄吉（九州大・医・心臓血管研究施設・分子細胞情報），川村将弘，堀　誠治，西晴久（慈恵医大・薬理第一），栗原琴二（明海大・歯・口腔生理），篠塚和正（武庫川女子大・薬・第二薬理），鈴木裕一，山本　武（静岡県立大・食品栄養科・生理），多久和陽，張　京浩（東京大・医・細胞分子生理），中里幸和，乙黒兼一（北大・獣医学・比較形態機能学・薬理），中田裕康（都神経研・神経生化学），挾間章博（生理研），藤田典久（立命館大・理工・生物工学），新

貝鋤蔵（岩手大・工・情報工学），古家喜四夫（京都工繊大・応用生物），中野春男（生理研），松浦　博（佐賀医大・生理），木村純子，松岡　功，大久保聡子（福島県立医大・薬理），森　正弘（神戸大・医・第一生理），山下勝幸，森際克子（大阪大・医・第二生理），関根章博（富士レビオ・中研），村松郁延（福井医大・薬理），山岸俊一（生理研）

研究会概要

近年，ATP は細胞膜上の P_2-プリン受容体（ATP 受容体）を介して，広く細胞間のシグナル伝播を担う重要な役割をもつ可能性が明らかにされてきた。しかし ATP 受容体の研究に関しては，これまで明確なアゴニスト，アンタゴニストを欠くなどの理由により，そのサブタイプの分類および命名の上で多くの混乱が生じていた。そこで，最近の ATP 受容体蛋白のクローニング研究の著しい成果に基いて，Burnstock らはこれをイオンチャネル型の P2X-受容体と G-蛋白共役型の P2Y-受容体に大別し，さらにこれらをそれぞれ 7 種類のサブタイプに分けることを提唱した。我国の ATP 研究がようやく盛んになりつつあるこの時期に，生理，薬理，解剖，生化学，理工などの各分野の研究者が一堂に会した「ATP 受容体研究会」が開かれたことは，新しい受容体の概念を確認し合い，相互理解を深める上で，非常に時宜を得たものであったと思われる。発表内容は，P2X-受容体の種々の遺伝子発現株細胞や心筋細胞における機能解析，P2Y-受容体サブタイプのクローニング，Gq に加え Gs を介する細胞内シグナリングの存在，細胞の発生，増殖，分化の過程での役割，平滑筋など非神経細胞からの ATP 放出機構，細胞間 Ca^{2+} 波の伝播と ATP 放出との相関，P_3-受容体の存在の可能性，AP4A の生理的役割など多方面にわたるものであり，興味深い報告が 2 日間にわたって行われた。これにより，universal substance としての ATP の生命現象への関わりの奥深さや複雑さをあらためて認識させられた研究会であった。

(1) Overview

井上和秀（国立衛研・薬理）

ATP 受容体は，イオンチャネル内蔵型 (P2Xn) と G 蛋白共役型 (P2Yn) の 2 つに大別される。P2Xn は膜 2 回貫通型ファミリーに属し，いくつかがホモあるいはヘテロに会合し非選択性のカチオンチャネルを形成し，早いシナプス伝達を担うと考えられている。現在 7 種類のサブタイプが知られている。P2Yn は膜 7 回貫通型ファミリーに属し，いずれも Gq/11 と共役し，PLCβ 活性化，イノシトールリン脂質代謝亢進による細胞内 Ca 動員ならびに蛋白質キナーゼ C 活性化に関与する。現在 7 種類のサブタイプが知られている。いずれのサブタイプに関して，特異的なアゴニストおよびアンタゴニストは現在見つかっていない。ATP 受容体研究の歴史を概観し，受容体分類の混乱とそこからの収束，今後の問題点についてふれる。

(2) C6BU-1 細胞に強制発現した P2X 受容体を介する Ca^{2+} 流入の特徴

上野伸哉，井上和秀（国立衛研・薬理）

我々はグリオーマ由来の C6BU-1 細胞に P2X 受容体のサブタイプである P2X2, P2X3 の cDNA を単独，及びヘテロタイプに導入し発現させた。導入前の C6BU-1 細胞は，細胞外 ATP 投与に反応を示さず P2X 受容体の性質をみるのに最適と考えられた。これら P2X 受容体発現細胞における ATP 投与に対する細胞内 Ca 変化を Fura2 を細胞に負荷し観察した。P2X2, P2X3, P2X2 & P2X3 の各タイプで ATP によりそれぞれ 10μM, 100μM, 1mM から Ca の上昇がみられた。P2X3 単独発現ではその Ca 上昇は小さくまた高濃度必要であった。しかしながら，P2X2 と P2X3 のヘテロ発現では，P2X3 の発現が促進され，P2X2 単独発現時より ATP 投与により大きな Ca 上昇が見られ，その閾値も低濃度へと変化した。また P2X3 の持つ α, β-methyleneATP への感受性は維持しつつも，P2X3 に著明なランダウン現象は改善された。これらより P2X2, P2X3 サブタイプはヘテロにチャンネルを作り，新たな性質を獲得することが示唆された。

(3) 神経発生期での ATP 受容体による Ca 動員

山下勝幸，杉岡美保（大阪大・医・第二生理）

アデノシン三リン酸 (ATP) は，成体の神経系では神経伝達物質として作用する。一方，発生過程においては，未分化な細胞や増殖期の細胞で細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることが報告されている。しかしながら，ATP による Ca^{2+} 応答が発生過程に伴ってどのように変化するのかを系統的に調べた研究はない。本研究では，細胞分裂，細胞分化及びシナプス形成などの発生過程が明確にされている鶏胚の網膜神経層を用い，ATP が P2U 型プリノセプターを介して細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることを明らかにした。また，この Ca^{2+} 応答は神経発生の初期で顕著に生じるが，細胞増殖が終了しシナプスが形成される以前に激減した。この事実から，発生初期の網膜神経層では，ATP はシナプスを介して神経伝達物質として作用するよりむしろ，Ca イオン濃度を調節することで，細胞増殖や細胞分化を制御する因子 (Growth Regulator) として機能するものと思われる。

(4) ヒト顎下腺由来培養細胞 HSG cell のカルシウム流入に関与するプリン受容体サブクラスの検討

栗原琴二，上羽隆夫（明海大・歯・口腔生理）

【目的】ヒト顎下腺由来 HSG 細胞のカルシウムの流入を調節する P_2 プリン受容体を検討した。
【方法】細胞内への $^{45}Ca^{2+}$ 流入量の測定：$^{45}Ca^{2+}$ を含む MEM 培地で細胞をインキュベートし，洗浄後，取り込まれた放射活性を測定した。イノシトール 1,4,5-3 リン酸 (IP_3) 生成量の測定：[^{3}H]IP_3 を用いたラジオレセプターアッセイ法によって測定した。プリン受容体のフォトラベル：細胞膜を [α-32P]3'-O-(4-benzoylbenzoic) adenosine 5'-triphosphate (Bz-ATP) とインキュベートした後，UV 照射によって共有結合でプリン受容体をラベルした。
【結果と考察】プリン受容体に対するリガンド特異性を調べた結果，IP_3 生成は ATP, UTP および ATPγS によって著しく促進された。この特異性は P_2U プリン受容体のそれとよく一致した。これに反し，$^{45}Ca^{2+}$ の流入は ATP, UTP›ATPγS, ADP, UDP›ADPβS›AMPPNP, GTP, TTP›CTP, GDP, TDP, AMPPCP, AMPCPP によって促進され，IP_3 生成に比べてブロードな特異性を示し，IP_3 生成を誘導しないリガンドによっても誘導された。また，$^{45}Ca^{2+}$ の流入する経路は百日咳毒素非感受性であった。これらのことから，$^{45}Ca^{2+}$ の流入は P_2U プリン受容体によって活性化された PLC の下流に位置するものではなく，他のプリン受容体チャネルのサブクラスによる可能性が考えられた。また，[α-32P]Bz-ATP によって 53kDa プリン受容体と考えられる膜蛋白質がフォトラベルされ，このラベル強度は $^{45}Ca^{2+}$ 流入を促進したリガンドによって著しく阻害されたこと，および Bz-ATP によって $^{45}Ca^{2+}$ 流入は著しく促進されたが，IP_3 生成はほとんど誘導されなかったことから，53kDa のプリン受容体は $^{45}Ca^{2+}$ 流入に関与する P_2X 様の受容体チャネルと考えられる。

(5) 副腎皮質細胞及びグリア細胞に ATP が引き起こすカルシウム信号

太田善浩（東京農工大・工・生命工学）

私達の研究室では，蛍光イメージング装置を用いて細胞内情報伝達の研究を行っている。今回の研究会では，以下の３つの内容に関して発表する。

(1) 副腎皮質束状層細胞のカルシウム信号

ACTH と ATP は，副腎皮質細胞にカルシウム信号（細胞内カルシウム濃度の変動）とステロイドホルモン合成を引き起こす。両者によるカルシウム信号を単一細胞レベルで調べると，引き起こされるカルシウム信号に差が認められた。

(2) グリア細胞のカルシウム信号

アストロサイトを神経伝達物質やATPで刺激するとカルシウム信号を発した。このカルシウム信号は刺激物質によって異なっていた。

(3) 単一ミトコンドリアにおけるATP合成過程可視化の試み

ATPはミトコンドリア内部で，クエン酸回路の駆動→NADHの生成→電子伝達→膜電位の形成→ATPの合成・放出の順で合成される。このうち，単一ミトコンドリアでNADHの生成と膜電位の変動を捉えた。

(6) 網膜ミクログリアの活性化機構とATP受容体の関与

森際克子（大阪大・医・第二生理）

中枢神経系の免疫細胞であるミクログリアは，侵入バクテリア毒性物質(LPS)やインターフェロンγ(IFNγ)等を介し，感染，炎症等の強度に応じて活性化される。それに伴ってイオンチャンネル・受容体などの発現も変化し，それらの変化が，ミクログリアの増殖・分化，NO・サイトカインの分泌に関与している可能性がある。本研究では，単離培養したラット網膜ミクログリアの活性化によるATP受容体の変化を調べた。その結果，非活性化状態では，ATPに対して，細胞外からのCa^{2+}流入によるCa^{2+}上昇と，Ca^{2+}-free外液下で細胞内Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}放出が記録された。それに対し，IFNγまたはLPSによる活性化状態では，ATPに対する細胞外からのCa^{2+}流入が増大し，かつCa^{2+}-free外液下でCa^{2+}ストアからのCa^{2+}放出応答が消失した。アゴニストへの応答から，代謝型P2U，及び，イオンチャンネル型P2Zと思われるATP受容体の発現が，ミクログリアの活性化に伴い，P2Z型優位に移行する可能性が示唆された。

(7) ATP受容体($P2X_4$)レセプターの分布：*in situ* hybridizationと免疫組織化学

岩永敏彦（北海道大・獣医・解剖）

ATP作動系の存在意義については現在でも不明な点が多いが，特異的な組織化学的証明法がないことも原因のひとつである。本研究の目的は，最も広く分布する特性があるATP受容体$P2X_1$の分布をオリゴヌクレオチドプローブを用いた*in situ* hybridization法とC端抗体を用いた免疫組織化学によりラットの各組織で検索することである。

中枢神経系では小脳の顆粒層細胞とプルキンエ細胞に特に強い$P2X_1$ mRNAの発現が認められた。末梢組織では精巣と腸粘膜に強い陽性反応が得られた。精巣では特定のステージの精子細胞

が，大腸では陰窩の全体が特異的に mRNA を発現しており，ATP が精子形成と腸分泌に関与することが示唆された。この他，下垂体前葉，副腎皮質にも $P2X_4$ mRNA のシグナルがみられ，ATP のもつホルモン分泌刺激作用の形態学的裏づけがなされた。

ATP はアミン／ペプチド系の内分泌細胞に共有されるほか，purinergic neuron の伝達物質として広範囲に分布するが，標的細胞の解析はまったくなされていなかった。レセプター分子の分布・発現を調べることにより，標的についての解答が得られる。

(8) アフリカツメガエル卵母細胞 follicle cell 上の ATP 受容体

木村真吾，藤田玲子（岩手医大・医・第一生理）
松本光比古（弘前大・医技短）
新貝鉊蔵（岩手大・工・情報工学）
藤田典久（立命館大・理工・生物工学）

アフリカツメガエル卵母細胞は follicle cell 層に包まれ，両者の間にはギャップジャンクションが存在する。Follicle cell 上には多種類の受容体が存在しており，卵母細胞の状態を制御している。この内，ATP 受容体およびアデノシン受容体の応答の性質を電位固定法で調べた。細胞内電位を -60mV に固定した follicle cell 付き卵母細胞に対して，アデノシンは外向き電流を，一方 ATP, UTP は内向き電流を，濃度依存的に誘起した。これらの電流の性質を調べる事により次の結論を得た。(1)アフリカツメガエル卵母細胞 follicle cell 上の ATP 受容体は，P_2X 受容体ではなく，P_2Y または P_2U 受容体である。(2) Follicle cell 上のアデノシン受容体を介して誘起される外向きカリウム電流は，細胞外液中のテオフィリンにより抑制された。これはテオフィリンがアデノシン受容体に直接作用して生じたと予想される。(3) ATP （または UTP）受容体を刺激すると，おそらく細胞内情報伝達系を介してアデノシン受容体の応答が抑制される，細胞内経路が存在する。

(9) 腎上皮細胞株 (A6) における ATP 受容体

森　正弘（神戸大・医・第一生理）

パッチクランプ法及び fura-2 による細胞内カルシウム濃度測定法を用いて腎上皮細胞株 (A6) における細胞外 ATP の作用を検討した。ATP (0.1μM-1mM) により膜電流が惹起された。プリン受容体アゴニストの電流惹起の順位は 2-methylthio ATP › ADP › ATP › α, β-methylene ATP ›

adenosine › UTP であった。ATP により惹起される電流は細胞内への EGTA (10mM) 投与により抑制された。細胞外カルシウムの有無にかかわらず，ATP は細胞内カルシウム濃度を増加した。ATP により惹起される電流は細胞内への GDPβs (0.1mM)，ネオマイシン (1-10mM)，ヘパリン (10mg/ml) の投与により抑制された。

以上の結果より，腎上皮細胞株 (A6) において，細胞外 ATP は，G 蛋白の共役した ATP 受容体 (P2Y) を介し，フォスフォリパーゼ C 活性化による 1,4,5-イノシトール三燐酸の産生，1,4,5-イノシトール三燐酸感受性細胞内ストアーからのカルシウム遊離，更に，カルシウム依存性に膜透過性の増加を促すことが明らかとなった。

(10) P3 受容体様アデノシン結合タンパク質の同定と機能

中田裕康（都神経研・神経生化）

プリン受容体は，薬理学的な性質，およびクローニングより得たアミノ酸配列をもとに，P1 プリン受容体と P2 プリン受容体の 2 種に大別され，それぞれに研究が進んでいる。更にアデノシンと ATP の両者に応答する薬理学的性質を持つ上記の分類にあてはまらないプリン受容体（P3 プリン受容体）の存在も血管系で示されているが (Westfall et al., Chinellato et al.,)，その生化学的性質はほとんどわかっていない。

我々は P1 プリン受容体の精製の際，既知のものとは異なるアデノシン結合タンパク質をラット脳の膜画分に見出し，このタンパク質の精製および特異性の検討を行ったところ，アデノシンのみならず ATP 類にも親和性を持つ P3 プリン受容体と似た特異性を持つことがわかったので本会で紹介する。

このタンパク質は 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA) に最も強い親和性を持つ (Kd = 40nM)。様々の関連化合物との親和性を [^{3}H]NECA 結合活性の阻害度を指標に詳細に調べたところ，NECA やアデノシンのみならず ATP, AMP などのアデニンヌクレオチドに親和性があることが示された。このタンパク質の同定を行うため，ラット脳膜画分より部分精製を行った後 8-azidoadenosine-5'-[γ-32P]triphosphate をプローブとして光親和性標識をおこなったところ，約 54kDa のタンパクバンドが特異的にラベルされた。この 54kDa の大きさを持つタンパク質は臓器分布では脳に多く，細胞内ではシナプトゾーム画分に最も多く存在しており，これは [^{3}H]NECA 結合法より得た分布と一致していた。この結果は P3 受容体と類似の特異性をもつこのタンパク質が脳のシナプス活動に関与している新しいプリン受容体であることを示唆する。

(11) NG108-15 細胞のアデニル酸シクラーゼと連関する ATP 受容体

松岡　功，大久保聡子，中西弘則（福島医大・薬理）

ATP が作用する P2 受容体は，イオンチャネル型の P2X と G 蛋白共役型の P2Y のサブクラスに分類されているが，細胞内情報伝達機構としてアデニル酸シクラーゼと連関する受容体は知られていない。我々は，NG108-15 細胞において ATP が cyclic AMP を上昇させることを見い出し，この受容体の性質について検討した。NG108-15 細胞に種々の P2 受容体アゴニストを作用させると，用量依存的に cyclic AMP の上昇がみられ，効力比は βγMeATP ≧ 2-ClATP ≧ ATP = ADP = ATPγS = AppNHp › ADPβS › AMP › ATPαS で 2-MeSATP, α, β Me ATP は作用せず，UTP や GTP も無効であった。このようにアゴニストに対する選択性は，これまでに同定された P2 受容体の性質と大きく異なっていた。さらに，このような刺激薬の作用は P2 受容体アンタゴニストとして知られるスラミンで影響されず，P1 受容体アンタゴニストのキサンチン誘導体で抑制された。この受容体を介した cyclic AMP の上昇は，細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇とは無関係であったが，刺激薬と受容体の相互作用において細胞外の Ca^{2+} が重要な役割を果たすことが認められた。さらに，この受容体の刺激効果は細胞を百日咳毒素で処理しても影響されなかったが，コレラ毒素の処理によって抑制されたことから，Gs を介してアデニル酸シクラーゼを活性化すると考えられた。最近，ATP にもアデノシンにも反応する P3 受容体の存在が提唱されている。NG108-15 細胞は種々のアデノシン誘導体の刺激でも cyclic AMP の上昇が見られるが，高濃度の reactive blue-2 や PPADS が ATP の反応を抑制するのに対し，アデノシン誘導体の反応を遮断しなかったことからアデノシン誘導体の作用は NG108-15 細胞に存在するアデノシン A_2A 受容体を介するものでこの ATP 受容体の関与は少ないと考えられた。

(12) NG108-15 細胞の P2Z 受容体について

海宝裕美，木村純子，松岡　功，中西弘則（福島医大・薬理）

NG108-15 細胞 (neuroblastoma × glioma) に細胞外から ATP 1 mM を与えると，細胞内 Ca 濃度が一過性の高い上昇の後，低い上昇を持続する。一過性上昇は U73122 で抑制されるので，PLC (phospholipase C) 活性化による細胞内貯蔵部位からの Ca 放出によると思われる。一方持続的上昇は細胞外 Ca を除くと抑制されるので外からの Ca 流入によることが示唆された。

ホールセルクランプ下で ATP 1 mM を細胞に作用させると，Tyrode 外液，Ca 内液の条件で 12.5 ± 0.8 mV (n = 10) に逆転電位を持つほぼ直線的な電流が表れた。電流の大きさは細胞外 ATP 濃度依存性で，EC_{50} 値は 0.75 mM であった。この電流は外液 Na を Li, K, Rb, Cs, N-

methyl-D-glutamine 等に置換しても出現したので，非選択性陽イオン電流であることが解った。外液を 90 mM $CaCl_2$ に置換して ATP を作用させると，小さいが先と同様の電流が活性化されたので，この電流を介して ATP による持続的 Ca 上昇が起こると考えられる。

ATP アナログの電流誘発作用は benzoyl-benzoic-ATP › ATP › 2-methylthio-ATP › ATPγS の順で，adenosine, ADP, α, β-methylene ATP, β, γ-methylene-ATP, UTP は作用がなかった。これらの結果から，この電流は P2Z 受容体を介することが示唆された。

最近，$P2X_7$ 受容体がクローニングされ，その性質が P2Z 受容体と類似していることが報告された。そこで NG108-15 細胞と，その親株の N18TG-2 と C6Bu-1 細胞に $P2X_7$ 受容体が発現しているかを RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 法で調べた。$P2X_7$ 受容体の発現は，NG108-15 と N18TG-2 細胞には見られたが，C6Bu-1 細胞には見られなかった。そこで電流を調べると ATP は N18TG-2 細胞に NG108-15 細胞と類似した電流を発生させたが，C6Bu-1 細胞では電流が発生しなかった。これらの結果は NG108-15 細胞には $P2X_7$ 受容体が発現しており，それが従来の P2Z 受容体であること，親株の N18TG-2 由来であり C6Bu-1 細胞には由来しないこと等を示唆する。

(13) 副腎皮質ホルモン産生に連関した ATP 受容体

川村将弘，西　晴久，堀　誠治（慈恵医大・薬理第一）

ウシ副腎皮質細胞を ATP とその誘導体および UTP で刺激すると糖質コルチコイド (GC) 産生が促進される。この作用は metabotropic receptor （P2Y 受容体）を介して発現する。GC 産生刺激作用および副腎皮質細胞への ATPγs 結合に対する置換反応の強さの比較から，ウシ副腎皮質細胞には，GC 産生に連関した，ATP および UTP に各々親和性の高い少なくとも 2 つの P2Y 受容体サブタイプが存在することが示唆された。そして P2 阻害薬による抑制効果を調べたところ，スラミンは ATP および UTP の作用を抑制せず，RB-2 および PPADS は両者の作用に対して非常に弱い抑制作用を示したことから，これまで報告されている受容体とは異なったサブタイプの存在の可能性がある。また ATP および UTP の GC 産生促進作用発現の細胞内情報伝達物質は Ca^{2+} であり，C キナーゼを介して作用が発現する。一方，ATP はその受容体を介して副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の GC 産生促進作用を強く増強する。この ATP の作用は低濃度でも発現することから，ATP は ACTH の作用に対して許容効果を発現すると考えられる。

(14) 脊髄ニューロンにおけるグリシン性 IPSCs の ATP による修飾

赤池紀扶（九州大・医・第二生理）

(15) P_2-プリン受容体による心筋イオンチャネルの調節

松浦　博，顕原嗣尚（佐賀医大・医・生理）

酵素処理により得られたモルモット心房筋細胞にパッチクランプ法を適用し，P^2-プリン受容体（P_2-受容体）によるイオンチャネルの調節機構について検討を行った。ATP (> 1μM) はモルモット心房筋細胞の活動電位持続時間を短縮し，また静止膜電位に対しては最初に過分極，続いて脱分極を引き起こした。ATP および ADP は遅延活性型の遅延整流性カリウムチャネル電流 (I_{Ks}) を濃度依存性に増大させた (ATP, EC_{50} = 0.95μM; ADP, EC_{50} = 3.65μM)。この増大反応に百日咳感受性G蛋白，protein kinase A, protein kinace C および細胞内 Ca^{2+} は関与していないようであった。また，ATP はムスカリン性カリウムチャネル ($I_{K,ACh}$) に対しては活性化 (EC_{50} = 1.84μM) と抑制 (IC_{50} = 5.5μM) の二面作用を示した。それぞれの作用に関与する細胞内情報伝達機構について検討を行った結果，活性化機構は細胞膜内での P_2-受容体－百日咳毒素感受性G蛋白 (GK) －ムスカリン性Kチャネルの連関によるものであった。一方，抑制機構は百日咳非感受性G蛋白および何らかの細胞内二次伝達物質を介するものと思われた。以上の実験結果から，P_2-受容体刺激による活動電位持続時間の短縮は I_{Ks} および $I_{K,ACh}$ の活性化により惹起され，一方，静止膜電位の過分極は $I_{K,ACh}$ の活性化により，脱分極は $I_{K,ACh}$ の抑制により引き起こされていると考えられた。

(16) 大腸 Na 吸収に対する管腔側 ATP の効果

鈴木裕一，山本　武（静岡県立大・食品栄養・生理）

モルモット大腸起電性 Na 吸収に対する ATP の効果を Ussing-Chamber を用いた短絡電流測定により検討した。その結果

（1）管腔側 ATP は，大腸起電性 Na 吸収を抑制した。

（2）Na 吸収抑制効果の強さは，ATP ≧ UTP > ADP > Adenosine の順であった。

（3）ATP^{4-}がより効力が強いことが示された。

以上より，ATP は大腸起電性 Na 吸収を抑制し，その抑制効果は P_2U レセプターが関与していることが明らかになった。

(17) 血管平滑筋における P2 受容体シグナリング

多久和陽，張　京浩（東京大・医・細胞分子生理）

血管平滑筋に発現する $P2Y_2$, $P2Y_6$ は，ホスホリパーゼ C (PLC)-Ca^{2+}動員系に共役し，血管収縮反応を惹起する。一方，我々は最近，血管平滑筋の機械力に対する応答に，血管平滑筋から機械的刺激によって放出される ATP による平滑筋 P2 受容体の活性化が関与することをみいだしている。機械力は血管平滑筋において種々の遺伝子発現を誘導することから，P2 受容体は PLC-Ca^{2+}系の他に核内遺伝子発現制御に関わる種々の情報伝達経路も賦活すると考えられる。血管平滑筋を用いてこの可能性を追及したところ，遺伝子発現制御に関わることが知られている MAP キナーゼ (MAPK) カスケードのうち，P2Y2 は ERK 経路のみを，$P2Y_6$ は ERK, JNK, p38 の 3 経路をすべて強く活性化することがわかった。さらに，$P2Y_2$ と $P2Y_6$ では，ERK 活性化機構に重要な差異のあること，すなわち，$P2Y_2$ の場合には ERK 活性化は低分子量 G 蛋白 Ras に依存するが，$P2Y_6$ は全く依存しないことがわかった。

(18) ラット胃輪走筋における ATP の作用とその受容体

乙黒兼一，太田利男，伊藤茂男，中里幸和（北海道大・獣医・薬理）

消化管平滑筋のプリン受容体の分類は，古くから ATP が抑制性伝達物質として提唱されていたにもかかわらずあまり進んでいない。我々はラットの胃輪走筋を用いて，ATP による収縮，弛緩とその受容体について検討した。ATP とその類似物質の力価順は，収縮は 2-methylthioATP (MeSATP) ›› ATP ≧ UTP ›› α, β-methyleneATP (α, βmeATP), 弛緩では，α, βmeATP が最も強かった。Suramin 及び reactive blue2 は ATP, UTP の収縮及び ATP, α, βmeATP の弛緩を抑制し，PPADS は UTP の収縮及び α, βmeATP の弛緩は抑制したが，ATP の収縮，弛緩には影響を与えなかった。ATP の収縮は MeSATP の脱感作によって消失したが，UTP の反応は影響を受けなかった。これより ATP は P2Y 受容体を，UTP はピリミジン受容体を介して収縮を起こすこと，また α, βmeATP は ATP とは異なる受容体を介して弛緩を起こすことが示唆された。

(19) Diadenosine Polyphosphates (AP_nA) の血管作用

住吉理絵子，平野勝也，金出英夫（九州大・医・心研）

血小板由来の生理活性物質である AP_nA [diadenosine tetraphosphate (AP_4A) および diadenosine pentaphosphate (AP_5A)] は，血管緊張調節作用をもつことが知られている。作用機序を明らかにするため，フラ2法を用いて，①大動脈弁内皮細胞，②ブタ冠動脈中膜条片および，③内皮付き中膜条片の，細胞質 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) に対する APnA の作用を検討した。AP_4A は，①内皮細胞の P_2Y および P_2U 受容体を介して $[Ca^{2+}]_i$ を上昇させ，NO を産生して，平滑筋を弛緩させた。AP_5A にはこの作用はなかった。② AP_4A 及び AP_5A はともに，平滑筋に直接作用して，cyclic AMP 濃度上昇，Kチャンネルの活性化，$[Ca^{2+}]_i$ 低下と弛緩を引き起こした。この弛緩には収縮装置の Ca^{2+} 感受性低下も関与していた。③等濃度で比べた場合，AP_4A は内皮細胞による弛緩作用が加わる分だけ，内皮を除去した場合と比較して，さらに強い弛緩を引き起こすことが明らかとなった。

(20) アゴニスト誘発 ATP 放出に関与する諸因子

桂木　猛，藤木　園，為末　敏（福岡大・医・薬理）
佐藤千江美，薄根貞治（機能研）

本グループは平滑筋において "ATP-induced ATP release" の存在を明らかにし，その放出機構に関与する細胞内シグナリングおよび放出 ATP の source について検討を行ってきたので，報告する。

α, β-methylene ATP による平滑筋および一部その培養細胞からの ATP 放出は，ネオマイシン，スペルミン，LiCl で拮抗され，W-7, BAPTA-AM の前処理によっても抑制された。また，アゴニストにより IP_3 の生成が促進され，これは LiCl によって拮抗された。ATP 放出はロテノンなどのミトコンドリア阻害薬で抑制され，チトクロームCでは逆に促進された。さらに，このアゴニストは，NADH の蛍光シグナルを増大させ，これは CCCP 前処理によって消失した。

以上のことから，α, β-methylene ATP による P2Y 受容体刺激の結果，多分，小胞体からの Ca^{2+} 遊離のシグナルがミトコンドリアに達し，ATP 産生が促進され，これが，ATP 放出の source となるものと考えられる。

(21) ATP 受容体刺激による血管組織からの ATP 遊離について

篠塚和正（武庫川女子大・薬・第二薬理）

ATP やアデノシンなどのプリン関連物質が心臓・血管系において様々な薬理作用を示すことはよく知られている。私はこれまでにラット尾動脈を用いて，1）交感神経刺激ならびに α_1 受容体刺激により内皮細胞から ATP を初めとするプリン物質が遊離されることを明らかにした。また，2）このプリン物質の遊離は外液 Ca^{2+} 除去により消失すること，一酸化窒素合成阻害薬の L-ニトロアルギニンはノルアドレナリンの収縮反応に影響しないこと，アセチルコリンやブラジキニンはプリン物質遊離作用を示さないことから，内皮細胞における ATP 遊離機構と一酸化窒素産生放出機構は共に Ca^{2+} 依存性でありながら，異なる Ca^{2+} 動員機構に連関している可能性が示唆された。さらにこの ATP 遊離機構の詳細を明らかにするために 3）ルシフェリン・ルシフェラーゼを用いて ATP 遊離の可視化を試み，細胞外 ATP による ATP の遊離機構 (ATP-Induced ATP Release) が内皮細胞に存在することを明らかにした。

(22) 上皮細胞からの ATP 分泌機構

挾間章博，三好毅志，林誠治，三輪晃子，
山本友美，清水貴浩，上坂敏弘，岡田泰伸（生理研）

上皮細胞の管腔側膜に存在する CFTR は，それ自体が cAMP 賦活性 Cl^- チャネルであるばかりでなく他のイオンチャネルを制御しているレギュレータとしての機能が注目されている。私達は，CFTR の強制発現細胞である C127/CFTR と無発現細胞である C127I を用いて，CFTR の ATP 分泌に対する制御機構を調べた。低浸透圧刺激による ATP 放出は，C127/CFTR のみで著明な増大が見られた。この ATP 放出は glibenclamide (0.5 mM) で抑制されず，DPC (0.5 mM) および NPPB (0.5 mM) で部分的に抑制された。また，ATP 放出は，小腸培養上皮細胞の膜蛋白に対して作製したモノクローナル抗体により抑制された。この抗体は，C127/CFTR における容積感受性 Cl^- 電流も cAMP 賦活性 Cl^- 電流も抑制しなかった。これらの結果から，CFTR は容積感受性 Cl^- チャネルや cAMP 賦活性 Cl^- チャネルと異なった ATP 輸送経路を活性化するものと考えられる。

⑵3) 乳腺細胞間相互作用に果たすATP受容体の役割

古家喜四夫（京都工繊大・応用生物）
中野春男，山岸俊一（生理研）
榎本浩一（島根医大・生理）

培養乳腺上皮細胞は機械的刺激によって細胞間を伝わる Ca^{2+} 波を発生する。これは刺激を受けた細胞からヌクレオチド(ATP, UTP, UDP)が放出され，周りの細胞の P_2U 受容体を活性化することによっている。生体内においては分泌上皮を取り囲んでいる筋上皮細胞がオキシトシンによって収縮することが分泌上皮細胞への機械的刺激となることが考えられ，そのことを筋上皮細胞と分泌上皮細胞の混合培養系によって明らかにした。すなわちオキシトシン投与によって筋上皮細胞の収縮に続き分泌上皮細胞上に Ca^{2+} 波が発生した。さらに，筋上皮細胞には P_2Y 型のATP受容体が存在し，Ca^{2+} 波（放出されたATP）によって Ca^{2+} 増大と筋収縮を引き起こした。このように分泌上皮細胞と筋上皮細胞はヌクレオチドを介してオートクラインあるいはパラクライン的に相互作用しており，ATP受容体は乳腺における細胞間情報伝達機構のかなめとして働いていることが明らかとなった。

5．運動性神経回路の機能特性：大脳皮質，脳幹，脊髄の機能の統合

1997．9．18－19

代表者：中村泰尚（東医歯大・医・解剖）

世話人：松山清治（生理研）

(1) 小脳－視床－大脳皮質投射の種特異性

山本哲朗，西村嘉洋，浅原俊弘，北川洋史（三重大・医・生理）

(2) 大脳皮質運動野錐体細胞に対する抑制性入力の機能的役割

姜　英男（京都大・医・生理）

(3) 運動野ニューロンの脳梁性入力の薬理学的性質

松波謙一（岐阜大・医・生理）

(4) 線条体コリン作動性介在細胞のKチャネル

宋　文杰（大阪大・基礎工・生物工学）

(5) 基底核・視床の運動制御系：視床網様核の関与

中村泰尚，佐藤二美（東医歯大・医・解剖）

(6) サル視床下核の活動ブロックと手足の異常運動の発現

浜田生馬，長谷川有美（都神経研・神経生理）

(7) 皮質網様体投射系の構成と歩行リズム制御に関わる網様体－脊髄系の構築

松山清治（生理研）

(8) 指向運動における頚の運動制御の神経機構

佐々木成人（都神経研・神経生理）

(9) 上丘局所神経回路の構造とサッケード運動の制御機構

伊佐　正，相澤　寛，小林　康，斎藤康彦，遠藤利朗，山本　優（生理研）

参加者名

金子武嗣（京都大・医・高次脳形態），姜　英男（京都大・医・生理），三上　章允（京都大・霊長研），川口泰雄（理研・名古屋），佐々木成人，浜田生馬，（都神経研・神経生理），南部　篤（都神経研・病態神経生理），内藤公郷，吉村和也（都神経研），陣内皓之祐（滋賀医大・生理），宋文杰（大阪大・基礎工・生物工学），中村泰尚（東医歯大・医・解剖），松波謙一（岐阜大・医・反射研），安井幸彦（島根医大・解剖），山口峻司（山形大・工学研究科），山本哲朗，西村嘉洋，北川洋史（三重大・医・生理），吉田　薫（筑波大・医・生理），松山清治，伊佐　正，森　茂美，中隣克己，宮下英三，松井利浩，久世文也，奥村　哲，J. Czarcowska-Bauch，相澤　寛，小林康，斎藤康彦，遠藤利朗，山本　優，B. Alstermark，納家勇治（生理研）

研究会概要

大脳皮質の運動制御，基底核・視床の運動制御，脳幹・脊髄の運動制御のセッションに分けて発表，質問，討論を上記参加者に生理研研究者若干名を加えて行った。

大脳皮質のセッションでは運動野ニューロンを対象にした生理学実験の結果が三題発表された。小脳－視床－大脳皮質投射による皮質ニューロンの賦活様式に動物種差が見られること，ネコ皮質運動野ニューロンに対するGABA性抑制入力の応答がGABAの受容体の違いによって区別できること，運動野ニューロンへの脳梁性入力が局所のGABA，ドーパミンの注入で変化が起こることから推測される局所回路の性質などが明らかにされた。基底核・視床のセッションでは，線条体から単離されたコリン作動性ニューロンの性質からA電流発生に関与する遺伝子にいたる発表，小脳と基底核から入力を受ける視床運動核群への視床網様核投射様式の違い，実験的視床下核障害が淡蒼球ニューロンに及ぼすスパイク発射活動の影響など多様な所見が示された。脳幹・脊髄のセッションでは皮質網様体投射の終止部位の詳細と歩行誘発時に発射活動をする網様体ニューロンの脊髄内終末分布，移動する物体の視覚性追跡時に，眼球運動と関連して起こる二種類の頚部運動の性質，眼球のサッケード運動に関与する神経連絡を上丘のスライス標本と覚醒サルを用いて，浅層と中間層の役割分担とその関連を明らかにした研究などが発表された。一題に一時間を割り当て，発表の途中にも自由に質疑応答を取り入れ，実り多い討論と結果を得た。

(1) 小脳－視床－大脳皮質投射の種特異性

山本哲朗，西村嘉洋，浅原俊弘，北川洋史（三重大・医・生理）

視床－皮質投射は大脳皮質への重要な入力を形成しているが，このうち小脳性誘発電位は皮質領野の違いのみならず，一次運動野に限っても系統発生学的な違いが知られている。このことは，体性感覚誘発電位が種差が少ないことと対照的であり，運動機能の発達を反映していると考えられる。小脳－大脳皮質応答は皮質誘発電位および視床－皮質投射線維終末の分布の解析はネコ，サル，ラットで報告されてきたが，最近解析を行ったモルモットを加えて比較すると，ネコ型（ネコとモルモット），サル型，中間型（ラット）に分けられることが明らかになった。このような視床－皮質投射の違いが，一次運動野を中心とした皮質構成細胞の賦活様式にどの様に影響するかを比較，検討した。

(2) 大脳皮質運動野錐体細胞に対する抑制性入力の機能的役割

姜　英男（京都大・医・生理）

大脳皮質各層の錐体細胞より細胞内記録を行い，APV 及び CNQX の存在下で記録細胞の近傍に格子状に微小刺激を与え，GABA(A) 及び GABA(B)IPSPs を誘発し，それぞれの時空間パターンの解析を行った。その結果，GABA(A) 及び GABA(B) 型の応答は，それぞれ，皮質層構造に対して水平方向及び垂直方向に広がりをもつ入力線維（細胞）群の活性化により誘発された。また，GABA(B) 型の応答は，GABA(A) 型の応答に比べて，時空間的により分散したシナプス入力により発生していることも示唆された。これらのことは，皮質内分布を異にする二群の抑制性介在細胞による GABA(A) 及び GABA(B) 受容体の選択的支配を示唆する。一方，錐体細胞の興奮性は，カルシウム依存性カチオン電流により担われた脱分極性スパイク後電位 (DAP) の増強により飛躍的に上昇する。この DAP は，GABA(A) 及び GABA(B) 抑制系による修飾作用を受けている。

(3) 運動野ニューロンの脳梁性入力の薬理学的性質

松波謙一（岐阜大・医・生理）

脳梁性線維の薬理学的性質，特に，GABA とドーパミンの効果に付いて発表した。GABA の結果から述べる。CGP35348, phaclofen, bicuculline はスパイク数を上昇させ，潜時を短縮した。GABA はスパイク数を減少させ潜時を延長させた。そして，以前の実験事実を考慮して，CGP35348 と phaclofen では前シナプス性に，bicuculline は後シナプス性に働いた結果と結論した。ドーパミン (DA) の初回投与は半数のニューロンでスパイク数の減少をもたらし（減少群），残りの半数では増加をもたらした（増加群）。減少群では SCH23390, sulpiride, haloperidol はスパイク数を増加させた。潜時には変化がなかった。増加群については明瞭な効果がみられなかった。こうしたことから，DA は脳梁性応答にたいしては，抑制性に働くと結論した。

(4) 線状体コリン作動性介在細胞のＫチャネル

宋　文杰（大阪大・基礎工・生物工学）

線状体のアセチルコリンはコリン作動性介在細胞に由来し，線状体出力細胞の活動をムスカリン受容体を介して修飾する。コリン作動性介在細胞は 5Hz 前後の低頻度で，周期的ではないが，

持続活動をする。このような活動パタンはシナプス入力に依存すると共に，細胞膜の性質にも影響を与えると思われる。今回は脱分極で活性化するKチャネルの役割について検討した。その結果，コリン作動性介在細胞において脱分極で活性化するK電流の殆どはA電流であった。このA電流の活性化と不活性化は閾値以下の電位で起こるので，コリン作動性介在細胞活動の低頻度を説明する一つの要因だと考えられる。

(5) 基底核・視床の運動制御系：視床網様核の関与

中村泰尚，佐藤二美（東医歯大・医・解剖）

視床網様核に順行性標識物質を注入して，ネコの視床運動核群(VLとVA)を観察した。VLで標識されたのは多形性シナプス小胞を含み，対称型シナプスを作る終末であって，すでに存在が明らかになっている小脳核由来や大脳皮質由来の終末，介在ニューロンのシナプス前樹状突起(PSD)ではなかった。この終末は他の終末に対して，シナプス関係をもつことはなかった。一方VAでは，すでに同定されているのは脚内核由来の終末（LP型），大脳皮質由来の終末とPSDであるが，LP型と類似した，VLの場合と同様の終末が標識された。VAではこの標識終末がしばしばシナプス後要素となっていた。この際のシナプス前要素の多くはLP型終末であって，脚内核由来の可能性が高い。VLとVAでこのようにシナプス構築の違いが見られるのは，視床への主入力が前者が興奮性，後者が抑制性であることに関係しているのかもしれない。

(6) サル視床下核の活動ブロックと手足の異常の発現

浜田生馬，長谷川有美（都神経研・神経生理）

不随意運動疾患のバリスムは視床下核の病変をともなう。この異常運動の発現メカニズムを検討するため，無麻酔のサルで視床下核ニューロンの活動をムシモル微量注入により一時的に抑え，行動の変化を観察すると同時に，淡蒼球ニューロンの活動を調べた。視床下核へのムシモル注入後，淡蒼球ニューロンの活動にはスパイク発射頻度の低下とともに，正常時にはない長いスパイク発射休止期間が観察された。ムシモル注入後10分－20分でサルの手足には異常運動が発現し始めた。一部の淡蒼球ニューロンではスパイク発射の休止期間と異常運動の発現が時間的に良く一致した。以上の結果は，視床下核の出力が強い興奮性の作用により，淡蒼球ニューロンの高頻度のスパイク発射活動を維持していることを示唆する。正常時には，淡蒼球ニューロンの活動は，手足のよけいな運動を抑える働きをしていると考えられる。

(7) 皮質網様体投射系の構成と歩行リズム制御に関わる網様体ー脊髄系の構築

松山清治（生理研）

1）ネコの一次運動野，および運動前野の特定部位に PHA-L を注入し，順行性標識された終末の網様体内分布を定量的に解析した。運動前野は一次運動野に比較して極めて多くの網様体投射を示した。また運動前野の背側領域は網様体の腹内側部を中心に終止したが，腹側領域は広範な分布を示した。

2）除脳・無動化ネコの歩行リズム誘発時における網様体脊髄路細胞および脊髄介在細胞の発射活動を腰髄前索内で軸索内記録した。記録後に neruobiotin を記録電極より電気泳動的に注入し軸索とその側枝を標識した。網様体脊髄路細胞は歩行リズム誘発時に様々な発射活動を示すとともに，標識軸索の多くは腰髄内で広範な領域にわたり複数の軸索側枝を分枝した。一方，脊髄介在細胞の大部分は歩行リズムに対応してリズム様発射を示すとともに，標識軸索の多くは髄節内の特定領域に多くの側枝を分枝する傾向を示した。

(8) 指向運動における頚の運動制御の神経機構

佐々木成人（都神経研・神経生理）

動物は視野内で動く対象物の移動速度に応じて指向運動の速度等を動的に変化させ対象物を網膜の中心でとらえている。この神経機構を調べるために，前方のパネル上に投射された光点を注視した状態から，光点を種々の移動速度で動かし，誘発される指向運動の速度依存性と橋延髄網様体の細胞の活動様式を調べた。頭の運動を制御する経路には，head pursuit pathway と head saccade pathway の 2 種類がある。Head pursuit pathway は橋・延髄網様体の phasic sustained neuron に仲介され，短潜時の視覚入力を受け頭を眼球に先行させて動かすこと，fovea から強い入力を受け，対象物を頭で追跡するのに関係する経路であり，視覚刺激速度に強く依存する。Head saccade pathway は，視野周辺が刺激されるほど強く発火し，対象物に頭と，眼球を急速に向ける経路で，脳幹の phasic neuron に仲介され，あまり刺激速度に依存しない。

(9) 上丘局所神経回路の構造とサッケード運動の制御機構

伊佐　正，相澤　寛，小林　康，斎藤康彦，遠藤利朗，山本　優（生理研）

ラット上丘スライスでホールセルパッチクランプ法による記録を行ない，視神経束を電気刺激すると，浅層，視神経層ニューロンでは単シナプス性EPSPが，中間層ニューロンでは多シナプス性EPSPが記録された。後者はニコチンの投与で著明に増大した。従って中間層ニューロンのニコチン受容体の活性化は視神経－浅層・視神経層－中間層という短絡的経路の伝達を促通させることが明らかになった。また，覚醒サルの上丘中間層にニコチンを投与すると，投与部位を刺激して誘発されるのと同じベクトルの自発性サッケードの頻度が増大した。また，視覚誘導性サッケード課題におけるexpress saccadeの頻度も，著明に増大した。この場合ニコチン投与の効果はサッケードの反応時間に対してだけであった。以上の結果は，コリン作動性入力が浅層－中間層という経路を促通することがexpress saccadeの誘因となり得ることを示している。

6．情動・記憶・意欲をいかにとらえるか

1997．9．19-9．20

代表者：川村光毅（慶應大・医・解剖）

世話人：小幡邦彦（生理研）

(1) Introduction, GABA と情動

小幡邦彦（生理研）

(2) ラット脳GABAニューロンと無機リン酸トランスポーター

久野節二（徳島大・医・解剖）

(3) 情動障害を示す遺伝子ノックアウトマウスの神経構築と発生の異常

湯浅茂樹（千葉大・医・解剖）

(4) 情動に関わる遺伝子について

八木　健（生理研）

(5) Motivation に関連したタスクで視覚的キューの意味をコードする猿の臆側線条体のニューロン活動について

設楽宗孝（電総研・情報科学）

(6) Phencyclidine による意欲低下動物モデル

鍋島俊隆（名古屋大・医療薬学・薬剤部）

(7) ストレスと気分障害

神庭重信（山梨医大・精神神経医学）

(8) 感情障害と細胞内情報伝達機構

山脇成人，加賀谷有行（広島大・医・神経精神医学）

(9) 日常の精神科臨床のための簡易精神生理テスト・バッテリー

臺　　弘（坂本病院）

(10) 脳の構成的研究から見た心

松本　元（理研・国際フロンティア高次機能）

(11) 扁桃体と情動記憶

小野武年，西条寿夫，田村了以，上野照子（富山医薬大・医・生理）

(11a) 辺縁談論

小野武年（富山医薬大・医・生理）

(12) 海馬領域における視床入力系回路の形態解析

石塚典生，本多祥子（東京都神経研・神経細胞生物学）

(13) ウィルスベクターを用いたグルタミン酸受容体の研究

小澤瀞司（群馬大・医・第二生理）

⑭ 大脳皮質連合野および大脳辺縁系の回路網を中心とした機能解剖学

川村光毅（慶應大・医・解剖）

⑮ 覚せい剤精神病脆弱性に関する研究

伊豫雅臣（浜松医大・精神神経医学）

⑯ 分裂病の分子異常へのアプローチ

西川　徹（精神神経センター神経研・疾病研究第３部）

⑰ 匂いの記憶のシナプス・分子機構

椛　秀人（鹿児島大・農・家畜生理）

⑱ アデノシンによる長期増強(LTP)様現象

岡田安弘（神戸大・医・生理）

⑲ LTPがなくても学習・記憶は成立する：生体アミンのシナプス形成維持機能とストレス

岡戸信男（筑波大・医・解剖）

⑳ 感情障害亜型における病態生理学ならびに神経発達学的差異

三國雅彦（群馬大・医・神経精神医学）

参加者名

川村光毅，福田哲也，野上晴雄，大山恭司（慶應大・医・解剖），設楽宗孝（電総研・情報科学），三國雅彦（群馬大・医・神経精神医学），小澤瀞司（群馬大・医・第二生理），山脇成人，加賀谷有行，小鶴俊郎，日域広昭（広島大・医・神経精神医学），伊豫雅臣，関根吉統（浜松医大・精神神経医学），小野武年，西条寿夫，田村了以，上野照子（富山医薬大・生理），岡田安弘（神戸大・医・生理），石塚典生（東京都神経研・神経細胞生物学），岡戸信男（筑波大・医・解剖），佐原和子（放送大），湯浅茂樹，佐藤甫夫，服部巧太郎（千葉大・医・解剖），久野節二（徳島大・医・解剖），神庭重信（山梨医大・精神神経医学），鍋島俊隆（名古屋大・医療薬学・薬剤部），西川　徹（精神神経センター神経研・疾病研究第3部），本多祥子（東京女子医大・第二生理），臺　弘（坂本病院），八木　健，小幡邦彦（生理研）

研究会概要

感覚運動系の上位にある知・情・意の心理複合体である“心”の問題は現在の重要な研究課題である。それを高次神経活動の所産として捉えることが基本とならねばならない。そして，その異常として精神病の発症機構を究明していく必要がある。本研究会では，異なる分野を専門領域とする広い視野をもった神経科学者が一堂に会し，連携を保ちながら，いろいろな角度から，情動を中心とする辺縁系の構造と病態について，自己の所見を基盤にした考えを提示し研究方向を示し，討議し，集団的に検討を加える。

近年，神経科学は大いに進展し，“心”の問題を科学的に研究の対象とすることができるようになった。大胆に割り切って言うと，「知」は大脳新皮質・海馬，「情」は扁桃体・視床下部，「意」

は帯状回・辺縁系に大きく関連する。そのほかに，前頭前野を中心とする皮質連合野，視床下部・下垂体を主座とする液性調節系，ドーパミン，セロトニンを含む汎性投射など考察の視野を広げたうえで精神活動という研究課題を追求することが現在求められている。以上，情動・意欲を中心に，神経解剖学，発生神経生物学，神経生理学，神経生化学，神経精神薬理学，および臨床精神医学などの研究者が多方面から討議し問題点を明らかにすることが是非とも必要と考え，本研究会を開催した。なお，この成果を「脳の科学」第20巻7号（1998年）に特集「情動・意欲の神経機構とその病態」（総説11編）としてまとめて公表した。

(1) Introduction, GABA と情動

小幡邦彦（生理研）

GABA は脳のあらゆる部位で抑制性神経伝達物質として働いているが，このほかに最近，神経発生過程での役割が注目され，また間脳の意識レベル調節や視交差上核の概日リズム形成への関与が示されている。ベンゾジアゼピン系薬物の作用点は GABA レセプターとされているが，その抗不安作用はたとえば扁桃体や青斑核など特定の脳部位での作用が前面に出たのかもしれない。GABA 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスを使ってしらべたい。

(2) ラット脳 GABA ニューロンと無機リン酸トランスポーター

久野節二（徳島大・医・解剖）

ラット脳において腎臓型無機リン酸トランスポーター (NaPi-2) の発現を解析した。まず，RT-PCR により脳の全 RNA 分画で NaPi-2mRNA の存在を確かめた。NaPi-2 のC末端ペプチド（12アミノ酸）に対する抗体を用いた免疫染色では，陽性反応が新皮質の非錐体細胞，海馬の介在細胞，扁桃体基底核および外側核の小型神経細胞に認められた。扁桃体中心核および視床下部視交叉上核においては陽性細胞体は認められず，陽性線維終末だけが観察された。CABA および合成酵素 (GAD67) 含有ニューロンと比較した結果，新皮質では全ての GABA ニューロンが NaPi-2 陽性であり，海馬と扁桃体基底核・外側核では多くの GABA ニューロンが陽性反応を示すものの，一部の細胞は NaPi-2 陰性であることが解った。以上の結果からラット脳 GABA ニューロンは NaPi-2 の局在により少なくとも2つのグループに区別される。

(3) 情動障害を示す遺伝子ノックアウトマウスの神経構築の発生の異常

湯浅茂樹（千葉大・医・解剖）

Src ファミリーの tyrosine kinase に属する fyn 遺伝子のノックアウトマウスは情動障害を示す (Yagi, T., Develop. Growth & Differ., 36, 543-550, 1994)。この Fyn 欠損マウスを一つのモデルとして，特定の遺伝子欠損と情動障害がどのように結びつくかを解析するため，正常マウス脳における Fyn 蛋白の局在，Fyn 欠損マウスの神経構築・神経発生過程について大脳辺縁系を中心に形態学的に検討した。Fyn は海馬，帯状回，梨状葉，扁桃体，視床下部の一部に強い免疫陽性反応を示し，免疫電顕的には樹状突起，postaynaptic density に強い反応性が認められた。成体 Fyn 欠損マウス脳の構築を calbindin 免疫染色により調べると，大脳新皮質，海馬，梨状葉の層の構造の異常が認められた。さらに，発生過程においては神経細胞の移動障害が認められ，大脳新皮質の層形成異常とともに扁桃体の神経核形成過程にも異常が認められた。以上の所見から，Fyn 欠損マウスの大脳辺縁系には神経構築の異常が認められ，これは Fyn 欠損による発生障害によると考えられる。Fyn 欠損マウスの情動障害が神経構築の異常によるものか，あるいは Fyn 欠損によるシナプスの機能的障害によるものか，今後更に検討を要する重要な問題である。

(4) 情動に関わる遺伝子について

八木　健（生理研）

現在までの遺伝学的及び遺伝子ターゲティング法による解析により，情動形成に関わる遺伝子が同定されてきた。その中で，我々は哺乳類脳神経で高発現する Fyn チロシンリン酸化酵素が情動形成過程で重要な役割をもつことを明らかにしてきた。しかし，この Fyn 分子が情動形成とどの様に関連しているかについては未だ明らかでない。我々はその中で，Fyn 分子と関連する新たな分子の探索を通して情動形成をもたらす分子機構の解明を試みている。

(5) Motivation に関連したタスクで視覚的キューの意味をコードする猿の腹側線条体のニューロン活動について

設楽宗孝（電子技術総合研究所・情報科学部脳機能ラボ）

motivation の程度が定量的にわかるよう，次のようなタスクをサルにトレーニングした。サル

は，指標の色が赤から緑に変わったときにバーから手を離すと報酬がもらえるのだが，この時にこのトライアルを最高3回まで続けて正解しないと報酬がもらえない。トライアルの報酬までの距離は，視覚的キューの明るさで示す。すると，猿は報酬がもらえるトライアルに近づくほど早くバーから手を離し，正解率も高かった。この時の腹側線条体のニューロン活動を記録すると，報酬が投与される時に反応するもののほかに，タスクの進行状況を示す視覚的キューに対して反応するものがあり，その反応様式から，視覚的キューの意味をコードしていると考えられた。更に，このニューロン群の発火活動にタスクのスケジュールに関する情報がどのくらい含まれているかを情報理論を使って解析したところ，平均で10個程度の独立な情報を持つニューロンがあればスケジュールを区別できることがわかった。

(6) 精神異常発現薬 Phencyclidine (PCP) による意欲低下動物モデル

鍋島俊隆（名古屋大・医療薬学・薬剤部）

PCP は麻酔薬として開発されたが，治療の段階で患者の約 3 割に幻覚・妄想が観察され臨床適用が認められた。しかし，幻覚作用や解離作用を求めて薬物乱用者が使用している。PCP を乱用すると PCP 精神病になり情動変化，記憶障害，うつ症状等種々の精神作用が現れる。この精神病は精神分裂病の陰性症状様症状も示し，定型抗精神病薬に反応しにくい。

われわれは意欲低下モデルとして抗うつ薬のスクリーニングに使用されている強制水泳時の無動状態に注目してこの行動が PCP の投与によりどのように変化するのか検討した。PCP を 1 日 1 回14日間投与し，1 日休薬後，強制水泳させたところ，生理食塩水を投与していたマウスに比べて著しく無動時間が延長していた。この無動時間の延長作用は定型抗精神病薬 hal operi dol では拮抗されなかったが，非定型抗精神病薬 clozapine, risperidone などで拮抗された。また抗うつ薬にも抵抗性であった。これらの結果から，PCP の連続投与によりマウスに惹起される無動状態は精神分裂病患者の意欲低下のモデルとして利用できるのではないかと考えている。

(7) ストレスと気分障害

神庭重信（山梨医大・精神神経医学）

かつて内因性うつ病と呼ばれたうつ病は，原義から言えば，心理的ストレスとは無縁に発症する事になろう。しかるに，その多くに先行する心理的ストレスが認められることから，内因も誘発される性質を備えているものらしい。そしてストレス反応の破綻として注目されるのが，

HPA 系のフィートバック制御の障害である。次に再発に目を向けるならば，再発は再発を呼ぶ体験構造の変化，つまりうつ病が回復した後にも患者の体験構造になんらかの変化が刻まれ，そのため状況的変化の影響に対して過敏に反応しやすくなっているのではないか，とする考えがある。このようなモデル動物を対象とした神経化学的研究が進められている。うつ病患者の死後脳やモデル動物で神経細胞の脱落が認められているが，これらの器質的影響は一部のうつ病でみられる遷延化と関連するのかも知れない。近年，抗うつ薬には神経維持因子を増加する作用が見いだされていることを考え合わせても興味に近い可能性と言えるだろう。

(8) 感情障害と細胞内情報伝達機構

山脇成人，加賀谷有行（広島大・医・神経精神）

感情障害の成因としてモノアミンの量や受容体の変化が論じられてきており，モノアミン再取り込み阻害する薬物が抗うつ薬として開発されつつある。しかし，現時点では，難治性感情障害の存在や抗うつ薬の副作用の問題など，まだ解決すべき部分が多く残されている。われわれは細胞内情報伝達機構に着目し，感情障害患者の血小板におけるセロトニン刺激性細胞内カルシウム動員が健常群に比較して有意に亢進していることを明らかにした。また，難治性感情障害の増悪因子として脳血管障害が重要であることを見い出している。一方，ストレス負荷による免疫機能の変化がうつ病の病態にとって重要であるという可能性に関しても検討している。このような神経系の病態にとって重要であるという可能性に関しても検討している。このような神経系と脳血管系，免疫系の相互作用を明らかにして行くことにより，感情障害の理解が可能になると考えている。

(9) 日常診療のための簡易精神生理テスト・バッテリー―特に精神分裂病について―

臺　　弘（坂本病院）

知・情・意の３次元をまとめて理解することは，心の科学の実践として精神科の診療にとって必須である。しかし分裂病の診断は患者の主観的な体験の質的記述に依存している。ハイテク技術は分裂病者脳の形態と機能の異常をある程度まで明らかにしたけれども，それは診療現場での症状や機能障害の把握に結びつかない。誰にも何処でも何時でも簡単にできる客観的計量的指標を求めて，乱数発生テスト（選択の自由度），血圧測定時の心拍増加（ストレス反応），物差し落としを止めるまでの距離（単純反応時間）３つ組テストを考案した。このロウテク技術は知・情・

意の末端を3角測量しているもので，患者の体験の参照なしにその85％に異常を判別することができた。

⑽ 脳をつくる―脳型コンピューター研究開発を通して脳の理解―

松本　元（理研・国際フロンティア高次機能）

脳は情報処理の仕方（アルゴリズム）を自動獲得するシステムである。アルゴリズムの自動獲得の戦略（ブレインウェア）は学習性と学習制御性である。脳は情報検索型のメモリーベースアーキテクチャ・非ノイマン型コンピューターである，と工学的に見做すことができるので，脳型コンピューターを工学創出する為の原理としての学習性と学習制御性の脳での表現とその基本過程を明らかにする。学習性は神経細胞に出力依存型時系列学習列として備えられていると考えられる。学習制御性は，脳の二重構造として備えられていると考えられる。前者の学習則をとり入れた大規模ニューロンネットシュミレーション可能の人口神経回路チップをシリコン半導体技術で作成した。後者は視床・扁桃体などの古皮質が中心的役割を果たし，情動・意欲などが学習・記憶の制御に関与する，と考える。

⑾ 扁桃体と情動記憶

小野武年，西条寿夫，田村了以，上野照子（富山医薬大・医・第二生理）

ラットでもサルと同様に，扁桃体には単一種および多種感覚刺激の生物学的価値評価および意味認知ニューロンが存在する。これらのニューロンは情動の発現および情動記憶に関与する。

(11a) 辺縁談話

小野武年（富山医薬大・医・第二生理）

大脳辺縁系（辺縁系）は，Papez や MacLean らの先駆的な研究により，情動発現に中心的な役割を果たしていることが示唆されている。近年では，動物を用いた破壊・刺激実験，ヒトの臨床病理学的研究，さらには PET や fMRI を用いた非侵襲的方法により扁桃体，前部帯状回，前頭葉眼窩皮質，側頭葉前部，島皮質，および視床背内側核などが情動発現に重要な領域であるこ

とが示されている。これらの領域は基底外側辺縁回路として相互に密接な線維連絡を有し，情動のニューラルネットワークとして機能している。とくに扁桃体は種々の感覚領野から入力を受け，その感覚刺激の生物学的価値評価を行っている。さらに，扁桃体は視床下部および下位脳幹と密接な線維結合を有しており，この下位性経路により情動表出（情動行動，自律反応，内分泌反応）がなされる。したがって，これら扁桃体を中心とした感覚情報処理経路のいずれの部位が障害されても，最終的には情動表出が阻害され，情動性の低下あるいは異常（Kluver-Bucy 症候群）として観察される。本研究会では，扁桃体を中心として，辺縁系各領域の情動発現における役割について考察したい。

(12) 海馬における視床入力系回路の形態解析—前海馬台外固有層の皮質連合結合—

石塚典生（東京都神経研・神経細胞生物学）
本多祥子（東京女子医大・第二生理）

海馬台－脳弓－乳頭体－視床前核－帯状回皮質と続く Papez 回路は記憶の想起やエピソードの形成など，記憶情報処理への関与が考えられるが，その回路の詳細は未だ明確でない。前海馬台外固有層 (PreE) は視床前核（AV・AD 核）から多量の入力線維を受ける部位である。本研究では，PHA-L 法，WGA-HRP 法を用い，ラット PreE の大脳皮質結合を調べた。PreE の出力では，深層の中型細胞は専ら内側嗅内野の□層へ両側性に投射し，浅層の小型細胞は PreE 内の長軸方向の連合性（両側性）に関与するこよが判った。他に，顆粒性脳梁後部皮質（両側），アンモン角への投射も少量見られたが，歯状回への投射は無かった。PreE への皮質性入力は，主に同側遠位半の海馬台錐体細胞，内側嗅内野の□層細胞（両側性）から見られた。加えて，嗅脳溝周囲皮質（同側），外側嗅内野（同側），顆粒性脳梁後部皮質（両側），無顆粒性脳梁後部皮質，前障などに逆行性標識細胞が見られた。他方，アンモン角，歯状回から前海馬台への入力は全く見られなかった。本研究により，AV・AD 核からの入力は PreE を経由して，嗅内野に投射することが判った。また，AD 核は VI 層に，AM 核は V-VI 層に直接投射し，視床前核群の入力が直接，間接に嗅内野に収斂することが明らかとなった。

(13) ウイルスベクターを用いたグルタミン酸受容体の研究

小澤瀞司（群馬大・医・第二生理）

中枢シナプスにおける機能分子の発現の変化が，情動・記憶など脳の高次機能にどのような影

響を与えるかを解析する研究は，標的遺伝子ノックアウト法を中心に進められてきた。しかし，さらに機能分子の発現をより微細に調節する実験法が開発されれば，この分野の研究は一層の進展をとげるはずである。最近，発表者らはアデノウイルスベクターを用いて，高い Ca^{2+} 透過性をもつ AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニットの遺伝子を中枢ニューロンに導入し，きわめて高い効率で機能発現させることに成功した。また，興奮性シナプス伝達が，この導入遺伝子により発現させられた変異型受容体により担われるようになることも見い出した。このような外来遺伝子の導入によりシナプス伝達機能を変容させる実験法は，受容体遺伝子がすでにクローン化されているあらゆるシナプス部位で，動物種を選ばず，脳の発達段階に任意の時期に適用可能なはずであり，脳疾患の病態モデルの作製法としても活用できると思われる。

(14) 大脳皮質連合野および大脳辺縁系の回路網を中心とした機能解剖学

川村光毅（慶應大・医・解剖）

ネコやサルの所見から腹側側頭皮質，前頭葉眼窩面皮質，帯状回から嗅内野（entorhinal，28野）や嗅周野（perorhinal，35野）にさらに28野と35野から海馬領野に投射することが明らかにされている。また，眼窩面皮質や嗅内野を含む側頭葉皮質と扁桃体との間にも相互間の結合がみられる。種々の感覚性の海馬への入力は嗅内野などの海馬周辺皮質を介してみられるが扁桃体への入力は間脳，中脳のいくつかの神経核（視床亜核，視床下部の腹内側核，黒質，縫線核など）や脳幹内の結合腕傍核，青斑核などからの直接投射がみられる。海馬と扁桃体は発生学的にも機能学的にも異なる構造物とみなされているが，この辺縁系の両雄間における線維連絡の存在はサルで報告されている。現在，連合野を含む大脳皮質・海馬・扁桃体の特定領域と視床下部亜核との間の連絡についてのより詳細な形態学的研究が望まれる。脳内で処理された環境刺激情報の結果は，次のステップとして，液性伝達の主座である視床下部・下垂体系にも手渡される。今後の研究の視点としては，基礎と臨床がかみ合うような総合的考察を意図して行い，その上に立って情動・記憶・意欲の発現機構およびその異常の問題を捉える努力していきたい。

(15) 覚せい剤精神病脆弱性に関する研究

伊豫雅臣（浜松医大・精神神経医学）

覚せい剤は強い報酬効果を有し，乱用者に「渇望」を形成する。また，反復使用により精神分裂病に類似した覚せい剤精神病が生ずる。この精神病は，覚せい剤の再使用や飲酒，ストレスな

どで容易に再熱する。このような易再燃性は逆耐性現象と呼ばれている。これから，覚せい剤精神病は精神分裂病モデルと考えられる。

我々は覚せい剤乱用者に対し，SPECT や PET, MRI などの画像検査を行ってきた。覚せい剤乱用者では，長期に継続する，大脳皮質領域の脳血流の部分的低下が認められた。また，精神病既往者では，脳内ドパミン D2 受容体数とセロトニン S2 受容体数のバランスが健常者とは異なっていることが示唆されている。

更にラットを用いた行動薬理学的研究より，cAMP 分解阻害剤が覚せい剤及びコカインの急性効果を抑制し，逆耐性形成も抑制することを明らかとし，逆耐性形成には細胞内神経伝達が重要な役割をおっていることが示唆された。

(16) 精神分裂病の分子異常へのアプローチ

西川　徹（精神神経センター神経研・疾病研究第 3 部）

精神分裂病（分裂病）が思春期以降に発症し，ヒトや実験動物の分裂様症状発現薬に対する反応が発達に伴って変化することから，分裂病で異常となる脳内情報処理システムは，特定の発達段階に成熟して機能を開始すると推察される。このようなシステム中の分裂病関連候補因子を見い出す目的で，ラット脳において，分裂病様症状発現薬に対する応答が生後発達に伴って変化し，ある段階から一定となる脳部位，細胞，遺伝子などを検索している。各発達段階のラットに，methamphetamine (MAP), phencyclidine (PCP) などの分裂病様症状を引き起こす薬物を投与し，神経活動の変化の指標となる c-fos 遺伝子の発現パターンを解析したところ，大脳新皮質または線条体で発達による変動が最も著名であり，生後21～25日頃に成熟期のパターンになることがわかった。そこで，RNA arbitrarily primed PCR 法を用い，これらの脳部位において，MAP または PCP に対して幼若期から成熟期にかけて応答性を変化させる遺伝子の cDNA クローニングを試みている。

(17) 匂いの記憶のシナプス・分子機構

椛　秀人（鹿児島大・農・家畜生理）

学習記憶という高次の脳機能が，脳のどこのどういうメカニズムによって担われているのかという問題は，脳科学の重要問題である。われわれが解析してきた交尾刺激を引き金として雌マウスに形成される雄の匂いの記憶は，妊娠の成立に不可欠な，生存価の高い記憶であるとともに，

学習記憶のモデルシステムとして有用である。なぜなら，記憶の座が判明したため，記憶の形成・維持のシステム・分子メカニズムの解析が可能になったからである。この記憶は，嗅覚系の最初の中断所である副嗅球で形成される。交尾刺激により活性化されたノルアドレナリン神経の働きを引き金として，種々の情報分子が関わり，副嗅球の僧帽細胞から顆粒細胞への興奮性シナプスに形態変化が生じる。このシナプスを刺激する交尾相手の匂い情報は選択的に抑制されて，妊娠は保障されると考えられる。一方，なじみのない雄の匂い情報は，可塑的変化が生じていないシナプスを刺激するため，視床下部へ伝達され，妊娠阻止を引き起こすと考えられる。

(18) アデノシンによる長期増強 (LTP)

岡田安弘（神戸大・医・生理）

海馬における長期増強 (LTP) は，記憶・学習の神経機構の基礎過程として注目されている。我々は，海馬以外に上丘においても顕著な LTP の存在することを見出した。一方海馬や上丘において，生体内物質であるアデノシンおよびその関連物質が，LTP 様現象を惹起することを明らかにし，その発現の諸性質を追求してきた。すなわちアデノシンおよびその関連物質は海馬の神経伝達においては，濃度依存性に低濃度 (10^{-8} ～ 10^{-6}M) で緩徐な時間経過の興奮作用，高濃度 (›10^{-5}M) で強い抑制作用を示し，上丘では濃度に関わらず興奮作用のみをもつ。このアデノシンによる興奮作用の発現様式は，デタヌス刺激による LTP 発現様式にきわめて類似している。

本研究会では，海馬と上丘における LTP の発現機序とアデノシンによる LTP 様興奮作用について討論したい。また上述のように海馬の LTP は記憶・学習に関与すると一般に考えられているが，今後上丘の LTP が眼球運動や上丘の機能にどのように関与するか，すなわち上丘 LTP によるシナプスの可塑性と上丘を中心とした行動との相関を追求し，上丘における LTP の意識を海馬の場合と比較しながら検討して行きたい。

(19) LTP がなくても学習・記憶は成立する：生体アミンのシナプス形機能維持とストレス

岡戸信男（筑波大・基礎医学系・解剖）

6 週齢ラット海馬のセロトニン (5HT) とアセチルコリンを 1 週間，薬物によってなくすと，海馬内主要回路がシナプスを作る部位で最大58％シナプス密度が低下した。水迷路試験を行うと，シナプス密度の低下したラットは生理的食塩水投与の対照群にくらべ，訓練最終日に約 2 倍の回

避時間を必要とした。シナプス密度の低下したラットの訓練初日と最終日をくらべれば，学習は成立していたが，CAIでのLTPは記録されなかった。過密環境・疼痛ストレスを与えらた妊娠ラットから産まれた仔ラットが5週齢になると，海馬内5HT濃度（約－20％）とシナプス密度（約－35％）が低下した。またこのラットは水迷路試験による学習記憶能力が低下していた。学習記憶の成立に必要なものはLTPではなく，生体アミンによって維持されるシナプス数であり，それは環境要因(epigenetic factor)によって，修飾を受けることが明らかになった。

⑳　感情障害亜型における病態生理学的ならびに神経発達学的差異

三國雅彦（群馬大・医・神経精神医学）

これまでの脳画像学的研究では躁うつ病などの感情障害の前頭葉や側頭葉における脳血流や糖代謝の低下が示唆されてきたが，責任脳部位はなお不明であった。第一度親族に複数の躁うつ病者のいる家系のみを検索した報告で始めて，脳梁膝下の前頭前野が責任脳部位の一つであり，同脳部位には形成不全ないし損傷が存在することが本年のNATUREに報告された。したがって，感情障害の病態解明には感情障害のうち特徴ある一群についての臨床的研究の重要さが示唆されている。感情障害の病態形成には遺伝的要因と神経発達的要因が関与することが知られている。1944から1945年の冬期の飢餓状態や1957年のインフルエンザ流行を胎生期に経験した後出生した子供が成長後に感情障害を起こした割合を研究した報告では，男子でのみ感情障害の発生頻度が有意に高く，性差が認められている。われわれが検討した，胎生期にストレス負荷した仔ラットの成熟後のストレスに対する副腎皮質ホルモン反応性も雄性仔ラットはデキサメサゾン脱抑制で，行動学的にもうつ病態動物モデルの可能性が示唆されたが，雌性仔ラットはデキサメサゾン過剰抑制でもあり，明らかな性差が見い出された。胎生期ストレスに関しては疫学調査でも動物実験でも性差が明らかとなっており，感情障害の亜型や性別にわけた病態研究が重要であることが示唆されている。最近検討している感情障害の亜型別の脳画像学的データを供覧した。

7．神経発生研究会

1997．9．26

代表者：小幡邦彦（生理研）

(1) Eph 受容体型チロシンキナーゼと神経回路形成

田中英明（熊本大・医学研究科・神経分化）

(2) ドレブリンと神経突起形成

白尾智明（群馬大・医・行動分析）

(3) 一部の神経上皮細胞に発現するガングリオシド抗原

藤田　忍（三菱生命研）

(4) アルツハイマー病アミロイド蛋白質の代謝

丸山　敬（生理研）

(5) 平滑筋の収縮制御

小濱一弘（群馬大・医・薬理）

(6) GABA シナプスの記憶

小西史朗（三菱生命研）

(7) 神経科学と脳外科

井上　洋（群馬大・医・脳外科）

(8) 開口放出関連蛋白質 HPC-1/SYNTAXIN 1A の機能とその欠損症

赤川公朗（杏林大・医・生理）

(9) GABA の作用－ネコからノックアウトマウスへ

小幡邦彦（生理研）

参加者名

藤田　忍，小西史郎（三菱生命研），田中英明（熊本大・医学研究科），井上　洋，小濱一弘，白尾智明，関野祐子，木村光宏（群馬大・医），西江　弘（順天堂大・医），橋本隆紀（東京大・医），櫻井　孝（神戸大・医），佐治真理（鳥取大・医），山本亘彦（大阪大・基工），赤川公朗（杏林大・医），川村勇樹（長寿研），渡辺栄治（基生研），山岸俊一，古家園子，丸山　敬，児島伸彦，山肩葉子，小幡邦彦（生理研）

研究会概要

神経組織発生，神経機能調節の分子機構の研究は，20年前には関与する未知物質をクロマトグラフィーによって分離することが主流であったが，やがて２次元電気泳動，さらにはモノクローナル抗体法の導入によっておおきく展開した。近年は分子クローニングの枠組みのなかでモノク

ローナル抗体の利用，PCR 等による簡便化，ショウジョウバエ関連遺伝子の検索等により，つぎつぎと新規分子が発見され，それらの生体内での機能も遺伝子ノックアウトマウスの解析で明らかになりつつあり，神経発生機構等の分子的理解が可能となる日も遠くないように思われる。本会ではこの流れで研究してきた研究者が成果を発表し，これからの展望を討議した。

(1) Eph 受容体型チロシンキナーゼと神経回路形成

田中英明（熊本大・医学研究科・神経分化）

Eph 受容体型チロシンキナーゼのサブタイプである EphA3, EphA4 がニワトリ胚運動ニューロンのサブタイプに一過性に発現し，そのリガンド Ephrin-A2, Ephrin-A5 は培養運動ニューロンからの神経突起成長を阻害する。これらの結果から，Eph 受容体型チロシンキナーゼとリガンドは運動ニューロンにおいても神経回路形成の最も重要なステップである軸索成長に阻害的に働くガイダンス因子として機能する可能性が有ること，さらに胚内での機能を解析するためにそれぞれの機能阻害抗体を開発したことを報告した。

(2) ドレブリンと神経突起形成

白尾智明（群馬大・医・行動分析）

ドレブリンは神経細胞に豊富に存在するアクチン結合蛋白である。ドレブリンを線維芽細胞に遺伝子導入により発現させると，突起を形成することがわかっているが，その詳細なメカニズムはわかっていない。そこで我々は，（1）タイムラプスビデオレコーディングシステムを用いて，ドレブリン遺伝子を導入した線維芽細胞が突起を形成する様子を観察した。ドレブリン発現細胞は，最初はコントロールの線維芽細胞に比べて，フィロポディアの形成はむしろ少なかった。また細胞体は厚みのある円形または紡錘形をしていた。その後時間経過とともに多数の細い突起を細胞体からだし，やがてその突起が太く長くなっていった。次に，我々は初代培養大脳神経細胞を用いて，その発生過程におけるドレブリンの細胞内局在について解析した。ラット胎仔20日齢の大脳より神経細胞を取り出し培養したところ，培養１日の神経細胞では，細胞体とその近傍の比較的太い突起にドレブリンが豊富に存在することがわかった。ところが，培養14日では，細胞体や太い突起中のドレブリンは減少し，代わりに樹状突起スパインと突起遠位部の細い部分にドレブリンが豊富に存在するようになっていた。以上より，ドレブリンは神経突起が形成されるために重要な役割を果たしていると考えられた。また，突起形成後の細胞体や樹状突起近位部から

のドレブリンの消失は形態の安定と関連している可能性が考えられた。

(3) 一部の神経上皮細胞に発現するガングリオシド抗原

藤田　忍（三菱生命研）

神経上皮細胞は形態的な分化が始まる前から何らかの分化が進行していると考えられるが，転写制御タンパク以外にはその分子レベルでの多様性はほとんど知られていない。我々はニワトリ胚脳において，分化したニューロン以外に一部の神経上皮細胞を染色するモノクローナル抗体を発見した。この抗体はたとえば4日胚の間脳でZLIなど形態形成上注目される部位の神経上皮細胞を染色する。この抗体が認識する抗原分子を9日胚中脳視蓋部抽出物を用いて解析したところ，O-アセチル基をもつガングリオシドであることが明らかになった。その意義について討論した。

(4) アルツハイマー病アミロイド蛋白質の代謝

丸山　敬（生理研）

アルツハイマー病の病因として，アミロイド蛋白質Aβによる神経変性仮説が有力である。Aβはその前駆体（アミロイド前駆体APP）から生成され，アミノ酸数40個のAβ40と42個のAβ42が存在する。Aβ42はより凝集しやすく神経毒性が強い。どちらも，正常状態でも生成されているが，アミロイド仮説では，なんらかの要因でAβ42の比率が上昇すると神経変性を引き起こし痴呆を誘引するとされている。

実際に家族制アルツハイマー病で見いだされた変異を持ったAPPや新たな原因遺伝子とされるプレセニリンの変異はAβ42の比率を上昇させることが培養細胞で確認することができた。

培養細胞系におけるAPPの代謝の研究はアルツハイマー病の病因や進行を抑制する治療法の確立に貢献できることが期待される。

(5) 平滑筋の収縮制御

小濱一弘（群馬大・医・薬理）

平滑筋の収縮がCa^{2+}より制御されていることに関しては，現在，まず異論はないと考えられ

ている。この制御に関しては，ミオシン軽鎖キナーゼ(MLCK)によるミオシン軽鎖のリン酸化を介しているとのリン酸化説が主流的である。最近の先端技術のとり入れにより平滑筋収縮制御に関する生理・薬理学的知識は増大し，この明快なミオシン連関制御のみでは説明できなくなって来た。一方，MLCKにはキナーゼ能と共にアクチン結合能が知られているが，私どもは，アクチンに連関した強力な制御作用のあることを明らかにした。さらにアクチン結合断片のみならずミオシン結合にもキナーゼ能を介さない制御効果のあることが明らかになった。キナーゼ能，アクチン結合能，ミオシン結合能がどのように関連しあって制御しているかにつき考察を加えた。

(6) GABAシナプスの記憶

小西史朗（三菱生命研）

興奮性グルタミン酸シナプスの可塑性はこれまでよく研究されているが，抑制性GABAシナプスの長期的修飾機構についてはほとんど不明であった。最近われわれはラット小脳のバスケット細胞－プルキンエ細胞間GABAシナプにおいて，抑制性シナプスも著明な可塑性を示すことを明らかにした。小脳への求心性入力線維から放出されたモノアミン（ノルアドレナリン・セロトニン）が，このシナプスにおける抑制性神経伝達の効率を長期的に増強することを示す証拠について紹介した。また登上線維から放出されたグルタミン酸は，モノアミンとは逆にGABAシナプスの伝達効率を抑制することも示した。したがって小脳GABAシナプスには正負の両方向へ調節される相反性修飾機構が存在しており，このような異シナプス間相互作用は小脳機能に重要な役割を果たしていることを推論した。

(7) 神経科学と脳外科

井上　洋（群馬大・医・脳外科）

神経科学（発生，分化，再生，変性）は，脳外科の臨床研究および治療と深い関係がある。中枢神経系の発生異常（奇形）の代表的疾患として二分脊椎があり，病態解明のために実験モデルが解析され，治療（手術）には発生過程を考慮した脊髄形成と癒着予防が行われている。神経系細胞の分化の知見は興味深く，腫瘍細胞分化の研究や移植治療に役立っている。近年中枢神経の再生能力が明らかとなり，脊髄損傷や変性疾患に対して神経移植，栄養因子治療，遺伝子治療などが試みられている。神経変性（損傷）は一次と二次に区別でき，手術では一次損傷をなくす機能保存が大切で，二次変性には機序解明と予防治療が必要である。21世紀の脳外科では，神経科

学の進歩をもとに損傷後の機能回復をめざす治療（手術）が可能になるであろう。

(8) 開口放出関連蛋白質 HPC-1/SYNTAXIN 1A の機能とその欠損症

赤川公朗（杏林大・医・生理）

我々は HPC-1/syntaxin 1A の機能解析を試み，これが一般に分泌顆粒，シナプス小胞の形質膜の融合過程の negative regulator であることを示した。また in vitro における機能阻害実験から HPC-1 が神経軸索の分岐形成（神経発芽）にも深く関与することを見出した。さらに神経疾患との関連を検討する目的で，ヒト HPC-1 遺伝子の染色体マッピングを行った結果，7 番染色体上にあることがわかった。この領域は精神発達遅帯を示しながら記憶能力が昂進するという特異な臨床症状で知られる Williams 症候群患者で報告されていた染色体微小欠失領域と一致した。そこで日本人患者を検討したところ，全例（46例）で HPC-1 遺伝子に関して hemizygous deletion となっている事が明らかとなり，HPC-1 遺伝子発現の異常と精神神経症状の関連が示唆された。

(9) GABA の作用ーネコからノックアウトマウスへ

小幡邦彦（生理研）

GABA は哺乳動物では脳にのみ存在することが1950年代初頭に発見され，けいれん抑制作用が見いだされた。1960年代後半になりその生理的役割としては抑制性神経伝達物質であることが，電気生理学的研究が進んでいたネコの小脳遠心系での研究で決定された。まもなく神経細胞の培養が可能になり，それでしらべると GABA は逆に興奮作用を示すことがみいだされた。これはながらく注目されなかったが，近年，脳スライスでの電気生理学が繁用されるようになり，幼若動物についてしらべると GABA は一般的に脱分極，細胞内カルシウム上昇を起こすことが判明して，GABA は神経発生，発達にも関与していると考えられるが実験的証明はない。また GABA の合成酵素 GAD には 2 種のアイソフォームが存在するがそれぞれの役割は不明である。これらの問題を明らかにするために，GAD の遺伝子ノックアウトマウスを作成して解析することが有効と考えられる。

本研究会ではわれわれが最近作成した 2 系統のマウスについて報告した。

8．シナプス伝達機構に関する細胞生理学的研究

1997.10．2－10．3

代表者：小澤瀞司（群馬大・医）

世話人：伊佐　正（生理研）

(1) グルタミン酸受容体の発現制御機構の解析

岡戸晴生，三輪昭子，近藤真啓（東京都神経研，病態神経生理）

(2) 内部標準物質を用いたAMPA型受容体サブユニットmRNAの発現量の定量的測定

都筑馨介，小澤瀞司（群馬大・医・生理第二）

(3) 全く異なる2種の生理的アゴニストにより活性化される代謝型受容体のクローニングと機能解析

久保義弘，宮下知之，村田喜理（東京都神経研神経生理）

窪川かおる（東京都神経研神経生理，東大海洋研・分子生物）

(4) シナプス前終末の細胞内Ca^{2+}と伝達物質放出

久場健司，陸芳民，秋田天平（名古屋大・医・第一生理）

成田和彦（川崎医大・生理）

小山内実（杏林大・医・生理）

木島博正（名古屋大・理・物理）

(5) 前シナプス修飾メカニズム

高橋智幸（東京大学大学院・医学系研究科・機能生物学専攻・神経生理）

(6) プロテインキナーゼCによる伝達物質放出制御

立花政夫，坂場武史，南　尚利，バーグランド健（東京大院・人文社会・心理）

(7) 伝達物質放出長期増強のメカニズム

八尾　寛（東北大・医・生体情報）

(8) ショウジョウバエ・シナプトブレビン欠失変異体におけるシナプス電流

吉原基二郎・城所良明（群馬大・医・行動生理）

(9) シナプス活動に伴うグリア細胞のグルタミン酸トランスポーター電位の光学的計測

工藤佳久，宮川博義，中村　健（東薬大・生命）

小島　哲（北海道大・理）

(10) 大脳中隔核ニューロンにおけるモノアミンの作用の電気生理学的，光学的検討

赤須　崇，蓮尾　博（久留米大・医・第二生理）

(11) 上丘ニューロンの発火特性とその基礎となるイオンコンダクタンスについて

斎藤康彦，伊佐　正（生理研）

⑿ 痛覚受容二次ニューロンにおけるシナプス可塑性と wind-up 現象

小野寺加代子，高橋智幸（東京大院・医・神経生理）
半場道子（昭和大・歯・生理）

⒀ 培養系における小脳長期抑圧機構

平野丈夫（京都大・理・生物物理）

⒁ 海馬錐体細胞における NMDA 受容体サブユニットの細胞内ソーティグ

伊藤　功（九州大・理・生物）

参加者名

○小澤瀞司，吉原基二郎，都築馨介，神谷温之，須藤　亮，小池真紀，小保方　馨，山田伸明，板澤俊一（群馬大・医），平野丈夫（京都大・理），久保義弘，岡戸晴生（東京都神経研），高橋智幸，小野寺加代子，辻本哲宏，梶川是直，堀　哲也（東京大・医），立花政夫，坂場武史（東京大・文），工藤佳久，中村　健，森田光洋（東京薬科大），赤須　崇，蓮尾　寛（久留米大・医），久場　健司，中山晋介，藤田浩二，徳納博幸，秋田天平，隙　芳民，黄　樹明，高井　章（名古屋大・医），八尾　寛（東北大院・医），伊藤　功（九州大・理），半場道子（昭和大・医），成田和彦（川崎医大・生理），伊佐　正，斎藤康彦，遠藤利朗（生理研）

研究会概要

平成９年度生理学研究所研究会「シナプス伝達機構に関する細胞生理学的研究」は平成９年10月２，３日の２日間にわたり開催された。中枢シナプス機能解明を目指す最新の電気生理学的，分子生物学的研究に関する14演題（１演題30分）の発表が行われ，密度の高い情報交換が行われた。主要な研究成果は以下の通りである。

１）グルタミン酸受容体に関する分子生物学的研究：単一ニューロンレベルでの AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット mRNA の発現量の定量的測定法の確立，Ca^{2+}による代謝調節型グルタミン酸受容体 mRNA の活性化の発見など。

２）伝達物質放出の修飾機構に関する研究：ラット台形体内側核巨大シナプスにおけるＧ蛋白質共役型受容体を解する伝達物質放出調節機構の解明，海馬ニューロンのオータプスのシナプス前終末における Ca^{2+}誘起性 Ca^{2+}遊離 (CICR) の機能的意義の解明など。

３）シナプス可塑性に関する研究：痛覚受容２次ニューロンにおける wind-up 現象及び小脳長期抑圧の発現機構の解明，海馬錐体細胞内における NMDA 受容体の sorting と長期増強の関連の解析など。

(1) グルタミン酸受容体の発現制御機構の解析

岡戸晴生，三輪昭子，近藤真啓（東京都神経研，病態神経生理）

ラット大脳皮質のAMPA型グルタミン酸受容体の発現を細胞レベルで解析し，GluR2が発現しないことからカルシウム透過性型AMPA受容体を有すると推定されるGluR1＋/GluR2-細胞はparvalbuminと，GluR2を発現することからカルシウム非透過型AMPA受容体を有すると推定されるGluR1＋/GluR2＋細胞はcalbindinD28Kと共存することを，3重染色法によって明らかにした。これはAMPA受容体チャネルからのカルシウム透過と細胞内カルシウム結合蛋白の発現が特異的に相関することを示しており，機能的な意義が示唆される。

このような細胞内カルシウム動態に関与している可能性のあるAMPA型グルタミン酸受容体の特異的発現制御機構を明らかにするために，初代培養神経細胞への一過性トランスフェクション法によって，とくにGluR2遺伝子の上流ゲノム領域500bpが神経細胞では繊維芽細胞株NIH3T3においてよりも10倍以上強く機能することを見い出した。さらに，転写開始領域を含む100bpが主な機能部位である可能性を明らかにした。さらにトランスジェニックマウス，アデノウイルスベクターを用いて個体レベルでの解析をおこなっている。

(2) 内部標準物質を用いたAMPA型受容体サブユニットmRNAの発現量の定量的測定

都筑馨介，小澤瀞司（群馬大・医・生理第二）

競合的逆転写-遺伝子増幅(RT-PCR)法によって単一ニューロンに発現するAMPA型受容体サブユニット遺伝子GluR2mRNAを定量的に測定することを試みた。まず，GluR2に点変異を導入したR2 (B/S)を作製した。R2 (B/S)はGluR2のもつBsp1286I制限酵素部位を，StuI部位に置換したものである。そして，内部標準物質となるR2 (B/S) cRNAをin vitro合成した。これはGluR2と差のない効率で逆転写され，かつ共通のPCRプライマー を用いてGluR2と差のない効率で遺伝子増幅された。未知量のGluR2 mRNAを含む脳RRNAに，正しく定量したR2 (B/S)のcRNAを加えてRTを行い，32P標識されたプライマーを用いてPCRを行った。標識PCR産物に制限酵素解析を行い，GluR2成分とR2 (B/S)成分を分離し，それぞれの32P量をBAS2000を用いて解析した。その結果，前脳RNA 1ng中に100,000分子のGluR2 mRNAの存在することがわかった。

(3) 全く異なる2種の生理的アゴニストにより活性化される代謝型受容体のクローニングと機能解析

久保義弘，宮下知之，村田喜理（東京都神経研神経生理）
窪川かおる（東京都神経研神経生理，東大海洋研・分子生物）

カエル卵母細胞を用いた，Ca^{2+}-Cl^-電流の増加を指標とする機能発現法により，サケ科魚類脳のある代謝型受容体のクローニングを進めていた際，「Ca^{2+}-Cl^-チャネルが開きやすい脱分極電位へのパルスを与えると，何のリガンドをも投与することなくbasalにCa^{2+}-Cl^-電流を示す」プールの存在に気付き，その原因となるクローンを単離した。得られたクローンは，ラット代謝型グルタミン酸受容体(mGluR1)と69%，ヒト副甲状腺の細胞外Ca^{2+}受容体(CaR)と24%のidentityを示した。basalにCa^{2+}-Cl^-電流を示す性質は，（グルタミン酸を全く投与していないので）mGluR1としての性質では説明ができない。そこで，このクローンが，細胞外Ca^{2+}の受容体としての機能を有しており，bath溶液中に含まれているCa^{2+}によって刺激されて，Ca^{2+}-Cl^-電流を示したのではないかと考え，種々の実験を行なった。その結果，単離したクローンが，確かに細胞外Ca^{2+}によって活性化されること，また，グルタミン酸によっても活性化されることが明らかになり，sBimR (salmon Bi-functional Metabotropic Receptor)と名付けた。さらに，rat mGluR1についても同様の実験を行ない，mGluR1が細胞外Ca^{2+}によっても活性化されることを初めて観察し，その構造基盤の決定へ向けて研究を続けている。

(4) シナプス前終末の細胞内Ca^{2+}と伝達物質放出

久場健司，陸　芳民，秋田天平（名古屋大・医・第一生理）
成田和彦（川崎医大・生理）
小山内実（杏林大・医・生理）
木島博正（名古屋大・理・物理）

シナプス前終末での短期及び長期の可塑性や修飾作用等の多彩な伝達物質放出制御作用に関与すると考えられるCa^{2+}誘起性Ca^{2+}遊離機序(CICR)について報告する。カエル運動神経終末で，インパルスの繰り返しによるCa^{2+}流入により，サプシガーギン感受性のCa^{2+}貯蔵オルガネラに存在しライアノジン受容体を介するCICRが，数分の経過で脱不活化後直ちに活性化され，非同期的開口放出が促進され，Ca^{2+}流入がなくなると，数十分の経過で不活化される。一方，ラット培養海馬ニューロンのオータプスのシナプス前終末では，細胞体からの持続的脱分極により非ライアノジン受容体を介するCICRが活性化され得る状態になり，パルス状の高K^+（正常2.5

mM から 5-40 mM へ）液による更なる脱分極により活性化され，非同期的開口放出が促進される。この高 K^+ 液により活性化された CICR による開口放出の促進は，静止膜電位へ再分極後も発生し，次第に消失する。

(5) 前シナプス修飾メカニズム

高橋智幸（東京大院・医・機能生物・神経生理）

シナプス修飾は，記憶を初めとする様々な脳機能を司ると考えられる。前シナプス修飾においては代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR), $GABA_B$ 受容体などのGタンパク共役型受容体を介する伝達物質放出の調節が重要な役割を果たすが，これら受容体の標的は明らかでない。ラット延髄スライス巨大シナプス前末端および後シナプス細胞よりホールセル同時記録を行い，この問題を検討した。mGluR アゴニスト L-AP4, $GABA_B$ 受容体アゴニスト baclofen はいずれもシナプス前末端の Ca 電流を抑制したが，K電流には作用しなかった。これらアゴニストによる EPSC の抑制効果の程度は Ca 電流の抑制で量的に説明されることから，開口放出機構への直接作用は前シナプス抑制に寄与しないと推論された。シナプス前末端内に GDPβS, GTPγS を投与したところ，アゴニストによる Ca 電流抑制作用および EPSC 抑制作用がブロックされた。前シナプス受容体はGタンパクを介して Ca 電流を抑制することにより伝達物質の放出を調節すると結論される。

(6) プロテインキナーゼCによる伝達物質放出制御

立花政夫，坂場武史，南　尚利，バーグランド健（東京大院・人文社会・心理）

キンギョ網膜の ON 型双極細胞の軸索終末部には protein kinase C (PKC) が特異的に発現しているが，その機能に関しては不明であった。そこで，双極細胞における伝達物質（グルタミン酸）放出機構に PKC が関与しているか否かを検討した。単離した双極細胞を膜電位固定し，伝達物質の放出はバイオアッセイ法によってモニターした。PKC を活性化する phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) を細胞外から投与すると，双極細胞からの伝達物質放出量が有意に増加した。PMA は Ca 電流の振幅をやや増大させたが，伝達物質放出量の増加を説明するほどではなかった。また，PKC の阻害剤を PMA と同時投与した場合，PMA の効果は認められなかった。同様に，PKC を活性化しない 4α-phorbol-12,13-didecanoate や protein kinase A を活性化する薬物ではこのような現象は観察されなかった。以上の結果から，双極細胞の PKC は伝達物質放出機構の制御に関与していることが明らかになった。

(7) 伝達物質放出長期増強のメカニズム

八尾　寛（東北大・医・生体情報）

中枢および末梢神経系において，シナプス前終末からの伝達物質放出の長増強にC-キナーゼ(PKC)が関与していることが知られている。しかし，PKCがどのようなメカニズムにより伝達物質放出を増強するのかはよく知られていない。今回，ニワトリ胚毛様体神経節巨大シナプス前終末を用いてPKCの作用機序を解析した。フォルボルエステル phorbol 12-myristate13-acetate (PMA)は，シナプス前終末における伝達物質の素量放出を増強した。しかし，PMAは活動電位にともなうシナプス前終末へのCa^{2+}流入を促進しなかった。細胞外Ca^{2+}濃度が高いとき，PMAによる伝達増強は，わずかしか認められなかった。PMAは，細胞外Ca^{2+}-EPSC関係を，その最大値を変えずに低濃度側へシフトした。すなわち，PKCは，活動電位にともなうCa^{2+}流入，開口放出部位の数，放出部位にあるシナプス小胞の数などを変化させることなく，シナプス小胞と形質膜の融合確率のCa^{2+}感受性を亢進させることにより，伝達物質放出を増強するものと結論される。細胞内Ca^{2+}センサーまたはその近傍の分子がPKCによりリン酸化されることが示唆される。

(8) ショウジョウバエ・シナプトブレビン欠失変異体におけるシナプス電流

吉原基二郎・城所良明（群馬大・医・行動生理）

神経型シナプトブレビンを全く持たない突然変異体に関して，ショウジョウバエ神経筋接合部における whole cell voltage clamp 法によって解析したところ，この突然変異をホモに持つ変異体は，miniature synaptic currents (mSCs) は見られるが，神経刺激による evoked synaptic currents は全く起こらないことがわかった。mSCs の頻度は Ca 濃度に依存して変化するが，変異体では control に比べて頻度が低かった。Caionophore である A23187 及び BWSV を作用させると，mSCs の頻度は増加したが，この場合も，変異体の方が効果が低かった。このことは，この変異体の症状が Ca 流入の異常によるよりむしろ，Ca sensing 以降の step によるものであることを示唆する。さらに，変異体において連発刺激を与えると asynchronous な放出が起こることを見いだした。シナプトブレビンは Ca 流入に同調した速い放出に必須であると考えられる。

(9) シナプス活動に伴うグリア細胞のグルタミン酸トランスポーター電位の光学的計測

工藤佳久，宮川博義，中村　健（東薬大・生命）
小島　哲（北海道大・理）

電位感受性色素 RH482 で染色した海馬スライス標本において計測できるシナプス電位の成分を解析することを目的として，様々な伝達物質受容体遮断薬を投与した。その結果，大半の反応は CNQX と APV の適用により消失し，海馬におけるシナプス伝達が主にグルタミン酸の ionotropic 受容体を介していることを確認した。しかし，CNQX と APV 処置後にもゆっくりとした成分が残存しており，シナプス電位にはさらに別の成分があることを予測させた。そこで，G-蛋白質連動型グルタミン酸受容体，アセチルコリン，ノルアドレナリン，ドーパミン，セロトニンなどおもな伝達物質受容体の遮断薬を適用してみたが，この電位にはまったく影響はなかった。ところが，グリア細胞のグルタミン酸トランスポーターの遮断薬である DHK を適用すると，この電位はほとんど消失した。従って，この電位はグリア細胞におけるグルタミン酸トランスポーター電位を反映しているものと考えられる。とすると，この電位の大きさは遊離された伝達物質としてのグルタミン酸の遊離量と比例するはずである。実際に 100Hz で刺激した場合，5 パルスまでは直線的に電位差は大きくなり，少なくとも単発刺激時のトランスポーター電位は遊離されたグルタミン酸量の指標とすることができることを確かめた。この事実を基礎として単発刺激時の興奮性シナプス電位とシナプス周辺のグルタミン酸量の消長との関係を考察した。

(10) 大脳中隔核ニューロンにおけるモノアミンの作用の電気生理学的，光学的検討

赤須　崇，蓮尾　博（久留米大・医・第二生理）

中隔核は大脳辺縁系に属し，自律神経の中枢である視床下部の上位の中枢として本能や情動の形成に関与している。特に外背側中隔核 (DLSN) は海馬からの出力を受け，これを視床や脳幹に出力線維を送っているが，多数 GABA 介在ニューロンが存在していることから抑制性に働いているとも考えられる。また中隔核には縫線核からセロトニン (5-HT) ニューロンを，青斑核から NA ニューロン，腹側被蓋から DA ニューロンを受けている。我々はこれまで 5-HT は DLSN ニューロンで過分極電位が発生することを報告している。今回，5-HT 誘起過分極電位の発生機構を調べ，5-HT は内向き整流性 K^+ 電流と膜電位に非依存性の K^+ 電流の活性化によって発生することがわかった。また，5-HT は興奮性シナプス後電位 (EPSP) を増強し，抑制性シナプス後電位 (IPSP と LHP) を抑制した。この 5-HT が海馬からの興奮性入力に対して抑制性の作用を持

つかどうかについて細胞外電位記録法と電位感受性色素 (RH-482) を用いて検討した。

(11) 上丘ニューロンの発火特性とその基礎となるイオンコンダクタンスについて

斎藤康彦，伊佐　正（生理研）

上丘は視覚対象を注視する際に行われる衝動性眼球運動を制御する中枢として知られている。この上丘の局所神経回路の構造を明らかにするために，生後３週齢のラット上丘スライスの中間層ニューロンからホールセル記録を行ない，電流通電に対する発火特性を調べたところ，上丘中間層の細胞は７種類のニューロン群に分類された。そのうち major population を占める (1) regular spiking neuron (2) fastspikingneuron (3) late spiking neuron について，一過性外向き電流（A電流）の性質を調べたところ，(1) fast spiking neuron に発現するA電流は他２種のニューロン群に発現するものより活性化に閾値が高い，(2) late spiking neuron に発現するA電流は不活性化の時間経過がより長いかもしくは膜表面積あたりの電流量が多い，という違いが見られた。以上のことから，発現するA電流の質的，量的な違いがニューロン間の発火特性の違いに関与していることが明らかになった。

(12) 痛覚受容二次ニューロンにおけるシナプス可塑性と wind-up 現象

小野寺加代子，高橋智幸（東京大院・医・神経生理）
半場道子（昭和大・歯・生理）

痛覚における可塑性を解明する目的で，三叉神経脊髄路核尾側亜核ニューロンのシナプス応答を whole-cell パッチクランプ法で記録した。strychnine, bicuculline 存在下で，三叉神経下顎枝を刺激にすると，Aδ-および C-fiber 由来の monosynaptic な成分と，大きな polysynaptic な成分を含む EPSP または EPSC を発生する。このシナプス応答は APV と CNQX の投与により完全に block する。EPSP は 1Hz，20回の条件刺激を与えることにより，次第に spike 発射頻度を増大し，痛覚２次ニューロン特有の wind-up 現象を起こす。さらに，100Hz，10発，１秒間隔で10回の tetanus 刺激により，EPSC に LTP が発現する。この LTP は APV, CNQX, kynurenic acid 存在下で tetanus を与えても発現するので，induction には ionotropic-Glu レセプターは関与せず，presynaptic に誘導されることが示唆される。

(13) 培養系における小脳長期抑圧機構

平野丈夫（京都大・理・生物物理）

小脳の顆粒細胞・プルキンエ細胞間シナプスは，顆粒細胞刺激またはグルタミン酸投与と脱分極の組み合わせにより，長期抑圧を起す。この長期抑圧は，運動学習の細胞レベルでの一基礎過程と考えられている。私たちは長期抑圧の発現機構を主として培養系を用いて，細胞・分子レベルで解析してきた。これまでにメタボトロピックグルタミン酸受容体の mGluR1 やイオノトロピックグルタミン酸受容体 δ2 サブユニットが長期抑圧に関与していること等を示してきた。今回私たちは，MAP キナーゼが長期抑圧に関与していることを示唆する結果を得たので報告する。また，これまでの In Vitro での長期抑圧測定は 2 時間程度が限界であったが，私たちは培養系において 1 日以上にわたって長期抑圧を測定する方法を新たに開発したので，その点も報告する。

(14) 海馬錐体細胞における NMDA 受容体サブユニットの細胞内ソーティング

伊藤　功（九州大・理・生物）

海馬 CA3 錐体細胞には NMDA 受容体依存型の長期増強 (LTP) を示す二つのシナプスが知られている。これらは，commissural/associational(C/A)-CA3 シナプス，および fimbria(Fim)-CA3 シナプスと呼ばれている。我々は，海馬 CA3 錐体細胞のこれら二つのシナプスにおける NMDA 受容体応答および LTP に対する，NMDA 受容体 ε1 および ε2 サブユニット遺伝子のノックアウト効果を比較解析した。その結果，ε1 サブユニットのノックアウトにより，C/A-CA3 シナプスの NMDA 受容体応答および LTP は強く抑制されるのに対して，Fim-CA3 シナプスのこれらの機能は，ほとんど影響を受けなかった。一方，ε2 サブユニットノックアウトマウスでは，Fim-CA3 シナプスの NMDA 受容体応答および LTP は強く抑制されるのに対して，C/A-CA3 シナプスのこれらの機能はほとんど影響を受けないことが明らかになった。これら結果は，現在明らかでないシナプス直下で実際に機能している NMDA 受容体分子のサブユニット構造を示唆するのみならず，シナプスの可塑的性質と密接に関連した受容体分子が，入力特異的ないしは細胞の極性に基づいて，個々の神経細胞内の特定の部位にソーティングされている可能性を示唆している。

9．細胞機能制御とカルシウムシグナル

1997.11.13－11.14

代表者：飯野正光（東京大・医・薬理）
世話人：宮崎俊一（生理研）

(1) mGluR1 カスケードと小脳シナプス可塑性

狩野方伸（理研・細胞神経生理）

(2) シナプス伝達調節とカルシウムチャネル

小作隆子，沢田さつき（金沢大・医・第二生理）

(3) 網膜グリアのミュラー細胞に発現する内向き整流Kチャネル，KAB-2/Kir4.1

堀尾嘉幸，倉智嘉久（大阪大・医・第二薬理）

(4) ATP 感受性Kチャネルの構造と機能

稲垣暢也（秋田大・医・第一生理）
五ノ井　透（千葉大・真菌医学研究センター）
清野　進（千葉大・医・高次機能制御研究センター）

(5) 抗原受容体を介するカルシウムシグナル：遺伝学的手法による解析

黒崎知博（関西医大・肝研・分子遺伝）

(6) 細胞増殖調節に関与するカルシウム透過性チャネル

神崎　展，小島　至（群馬大・生体調節研）
佐藤主税（電総研）
飯田秀利（学芸大・生物）

(7) カルポニン遺伝子の構造と機能

高橋克仁，吉川秀樹，菅谷陽一，山村倫子（大阪府立成人病センター研究所）

(8) IP_3 受容体の構造機能と IP_3 誘導カルシウムシグナル伝達

古市貞一，平嶋千恵，水野秀昭，安富大祐，吉川文生，廣田順二，
道川貴章，御子柴克彦（東京大・医科研・化学研究部）

(9) 卵活性化と卵細胞 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の空間分布

宮崎俊一，尾田正二（東京女医大・第二生理）
毛利達磨，出口竜作（生理研）

(10) IP_3 受容体による Ca^{2+} 放出の機能解析と血管における生理機能

飯野正光（東京大・医・薬理）

(11) 興奮収縮連関とリアノジン受容体

中井淳一（生理研）

⑿　腎尿細管の細胞内，核内カルシウムシグナル

河原克雅，須甲陽二郎（北里大・医・生理）

⒀　筋上皮細胞 ATP 受容体の細胞間相互作用に果す役割

中野春男（生理研）

古家喜四夫（京都工繊大・応用生物）

参加者名

飯野正光，山澤徳志子，宮川知也，斉藤直人，橋本彰子，浅田行紀（東京大・医・薬理），尾田正二，白川英樹，淡路健雄（東京女医大・第二生理），小島　至，神崎　展，張　有青，聶　　琳，李　　鹿，前島明人，長澤雅裕（群馬大・生体調節研），古市貞一，廣田順二，水野秀昭（東京大・医科研・化学），狩野方伸（理研・細胞神経生理），稲垣暢也（秋田大・医・第一生理），五ノ井透（千葉大・真菌医学研究センター），黒崎知博（西医大・肝研・分子遺伝），高橋克仁，山村倫子，菅谷陽一（大阪府立成人病センター），河原克雅（北里大医・生理），堀尾嘉幸（大阪大・医・第二薬理），少作隆子，沢田さつき，中西千明（金沢大・医・第二生理），古屋喜四夫（京都工繊大・応用生物），宮崎俊一，毛利達磨，出口竜作，松川　浩，中野春男，中井淳一（生理研）

研究会概要

カルシウムは，収縮・分泌・免疫・発生から神経可塑性まで広範な細胞機能を制御している。本研究会は，日頃顔を合わせることの少ない，異なる分野で異なる研究手法を用いている研究者を，カルシウムシグナリングという切り口で横断的に集めるという特徴を有している。しかも，発表および討論時間をゆったりととり，discussion 主体の会合となるよう配慮されている。また，研究を開始したばかりの若い研究者にも参加の機会を与え，ホットな議論の中に身を置くことにより研究への意欲を更に高める機会とする狙いもある。研究会では，プログラムに示すように各分野の第一線の研究者に参加してもらったことにより，活発な討論が行われ，インターディシプリナリーな啓発的効果が得られた。

⑴　mGluR1 カスケードと小脳シナプス可塑性

狩野方伸（理化研・細胞神経生理）

小脳皮質プルキンエ細胞は平行線維と登上線維からの性質の異なる興奮性入力を受ける。両者を同時に組み合わせ刺激を行なうと，平行線維－プルキンエ細胞シナプスに長期抑圧 (LTD) が起こる。代謝型グルタミン酸受容体 1 型 (mGluR1) はプルキンエ細胞の樹状突起スパインの平行線維シナプス後部に強く発現しており，LTD 誘発に関係すると報告されている。mGluR1 は Gq

ファミリー三量体G蛋白(GqまたはG11)を介してフォスフォリパーゼCβを活性化し，IP_3を産生すると考えられる。私たちは，mGluR1カスケードと小脳LTDに関して調べるため，プルキンエ細胞に強く発現しているmGluR, Gqのαサブユニット(Gαq)，およびフォスフォリパーゼCβ4 (PLCβ4)のノックアウトマウスと，プルキンエ細胞樹状突起スパインに滑面小包体とIP_3受容体が存在しない自然発生のdilute-opisthotonus (dop) ratを用いた。いずれの動物も，小脳，プルキンエ細胞および平行線維シナプスの形態に異常は認められず，電気生理学的にも，平行線維および 登上線維からプルキンエ細胞への興奮性シナプス伝達の基本的性質や電位依存性Ca^{2+}チャネルは正常であった。しかし，いずれにおいてもLTDは欠如していた。これらの結果から，mGluR1-Gαq-PLCβ4を介して，プルキンエ細胞樹状突起スパイン内部でIP_3受容体を介するCa^{2+}遊離が起こることがLTD誘発に必要であることが示唆された。

(2) シナプス伝達調節とカルシウムシグナル

少作隆子，沢田さつき（金沢大・医・第二生理）

海馬スライス標本において，錐体細胞の脱分極によりそのニューロンへの抑制性入力が一過性に抑制されることが報告されている。我々は，培養海馬ニューロンの単一ニューロン・ペアという最もシンプルな実験系を用いて，そのメカニズムの解明を試みた。得られた実験結果より，次のようなモデルを考えた。シナプス後ニューロンの脱分極により，電位依存性カルシウムチャネルが開き，細胞外のカルシウムイオンが細胞内に流入する。次に，このカルシウムシグナルが何らかの逆行性シグナルを発生し，そのニューロン上あるいはその周囲の抑制性シナプス前終末部に作用し，PK-C感受性の機構により抑制性伝達物質の放出を抑制する。逆行性シグナルの実体については今後の課題である。

(3) 網膜グリアのミュラー細胞に発現する内向き整流Kチャネル，KAB-2/Kir4.1

堀尾嘉幸，倉智嘉久（大阪大・医・第二薬理）

私達が脳よりクローン化した内向き整流KチャネルKAB-2/Kir4.1は脳グリアに発現している。そこで，網膜の主要なグリア細胞であるミュラー細胞を用いてこのチャネルの発現と機能を検討した。ミュラー細胞の内向き整流KチャネルがKAB-2/Kir4.1であること，その発現は細胞全体に広く分布しているが細胞膜上で点状に集積して存在していること，この集積にはSAP97というPSD-95アンカー蛋白質のファミリーがKAB-2/Kir4.1のC末端に結合して起きているこ

と，単離したミュラー細胞を培養化するとKAB-2/Kir4.1の発現は速やかに消失するが，細胞をラミニン上で培養し，培地にインスリンを加えるとKAB-2/Kir4.1が膜上に集積して発現することを見い出した。KAB-2/Kir4.1はグリア細胞において細胞外のK^+濃度を一定に保つ機能(spatial buffering)をおこなっていると考えられた。また，その発現と局在はアンカー蛋白質やホルモン，接着因子によって厳密にコントロールされている可能性が高いことが判明した。

(4) ATP感受性Kチャネルの構造と機能

稲垣暢也（秋田大・医・第一生理）
五ノ井透（千葉大・真菌医学研究センター）
清野　進（千葉大・医・高次機能制御研究センター）

ATP感受性K(K_{ATP})チャネルは，細胞内ATPによって開閉が調節されるKチャネルであり，膵β細胞ではグルコース刺激によるインスリンの分泌調節に，心筋・骨格筋では収縮や虚血時の細胞保護に重要な役割をはたしている。同時に，K_{ATP}チャネルは血糖降下剤であるスルホニル尿素(SU)剤の作用部位でもある。最近，Aguilar-Bryanらにより ABC スーパーファミリーに属するSU剤の受容体(SUR1)の構造が明らかにされた。我々は膵β細胞に発現する内向き整流性Kチャネルの新たなメンバー Kir6.2 を単離し，膵β細胞のK_{ATP}チャネルがKir6.2とSUR1の2つのサブユニットからなる複合体であることを初めて明らかにした。また，心筋や骨格筋に発現する新たなSURのイソフォーム SUR2 を単離し，心筋・骨格筋のK_{ATP}チャネルがSUR2とKir6.2の複合体であることを明らかにした。さらに，最近我々はK_{ATP}チャネルがKir6.2の4量体とSURの4量体からなるヘテロ8量体の構造をとる可能性を示した。

(5) 抗原受容体を介するカルシウムシグナル：遺伝学的手法による解析

黒崎知博（関西医大・肝研・分子遺伝）

B細胞抗原受容体(BCR)複合体を介してのシグナル伝達は，Igα/Igβの細胞内領域に存在するチロシン残基を含むITAMにより一連の生化学反応が展開され最終的に細胞の活性化・細胞増殖・細胞死等の生物反応が誘起される。私達は，系統的シグナル分子欠損B細胞を樹立解析することにより，BCR，及びBCRシグナルを負に調節するレセプターであるFcγRIIB, PIR-Bを介するシグナル伝達の理解に努めている。

BCR刺激により少なくとも3種類のPTKが活性化され，その下流の重要なターゲットとして

PLC-γ が存在する。PLC-γ, IP_3R 欠損B細胞の解析より，BCR → PTK → PLC-γ → IP_3 → IP_3R → Ca という経路が直接的に証明された。又 Ca は BCR 依存性細胞死にも重要な役割を担っている。

一方 FcγRIIB を介する負のシグナルには，SH2 を含む脂質代謝酵素である SHIP が関与しており，この分子が抑制性レセプター FcγRIIB にリクルートされることにより，BCR 依存性の Ca 動員を制御していることが明らかになった。

(6) 細胞増殖調節に関与するカルシウム透過性チャネル

神崎　展，小島　至（群馬大・生体調節研）
佐藤主税（電総研）
飯田秀利（学芸大・生物）

出芽酵母 (Saccharomyces cerevisae) の mating pheromone による分化・接合過程において細胞内カルシウム濃度の上昇は必須である。mid1 はこの mating pheromone-induced Ca^{2+} influx に必須の役割を果たすカルシウム透過性チャネルと推定される。mid1 cDNA を発現ベクターに組み込み COS7, CHO 細胞など哺乳類動物細胞に強制発現させ，mid1 蛋白がチャネルとして機能する可能性について電気生理学的に検討した。その結果，1）酵母の mid1 cDNA を哺乳類動物細胞に発現させるとイオン透過性が大きく変化し，チャネルを構成していると考えられた。2）mid1 はカルシウム透過性 non-selective cation channel として機能し，その透過性は Ca ＝ Ba›› Cs ＝ ›Na ＝ K であった。また，このチャネルは低濃度のガドリニウムでは抑制されないが，比較的高濃度のガドリニウムにてブロックされた。3）このチャネルは mechanosensitive channel としての特徴を持ち，Single channel ではパッチに陰圧（5-40cm 静水圧）をかけることによりその開口確率は著名に増大した。Whole-cell patch では細胞が swelling している状態で電流量が増大した。4）このチャネルは出芽酵母の接合子伸長部位でのメカニカルな変化によって活性化され，局所でのカルシウム流量に関与しているものと推察された。

(7) カルポニン遺伝子の構造と機能

高橋克仁，吉川秀樹，菅谷陽一，山村倫子（大阪府立成人病センター研究所）

カルポニン遺伝子は basic (h1), neutral (h2), acidic の各アイソフォームをコードする 3 つの異なった遺伝子によって構成されている。カルポニン h1 遺伝子は 7 個のエクソンからなる。分化した血管平滑筋に特異的に発現し，その収縮，遊走を抑制するアクチン結合蛋白をコードしてい

る。in vivo でのカルポニン遺伝子の作用を明確にするためにカルポニン h1 遺伝子を過剰発現するトランスジェニックラットと同遺伝子を欠失するマウスを作成した。これらの解析から，カルポニン遺伝子が平滑筋の増殖や分化に関与し，動脈硬化や血管内皮傷害後の内膜肥厚の形成過程において重要な役割を担っている可能性が明らかになった。また，カルポニン h1 遺伝子のホモ型欠失マウスの解析によって，この遺伝子が骨形成因子 (BMP) によって誘導される骨芽細胞の分化を抑制し，骨形成を抑制することを見出した。

(8) IP_3 受容体の構造機能と IP_3 誘導カルシウムシグナル伝達

古市貞一，平嶋千恵，水野秀昭，安富大裕，吉川文生，廣田順二，
道川貴章，御子柴克彦（東京大・医科研・化学研究部）

IP_3 受容体 (IP_3R) を介した Ca^{2+} シグナル伝達の多様性のメカニズムには，1) multiplegenes, 2) alternative splicing, 3) heterotetramerization, 4) modification (phosphorylation, ATP, Ca^{2+} , etc), 5) protein-protein interaction (calmodulin, etc), 6) differential expression, 7) subcellular localization の要因の関与が挙げられる。今回は，IP_3R の各タイプの IP_3 誘導 Ca^{2+} 放出 (IICR) について考えてみた。Sf9 細胞で発現させた type 3 IP_3R は type 1 よりも IP_3 感受性が低かった (EC_{50} = ～ 358 vs ～ 226 nM)。肝臓 IP_3R は type 1 と type 2 からなり，type 1 ノックアウトマウスの肝臓ではほとんどが type 2 であった。type 2 はこれまで high affinity と考えられていたが，その IICR 活性の IP_3 感受性は高くなかった (EC_{50} = ～ 260 nM)。これらのことから IP_3/Ca^{2+} シグナルの多様性と細胞機能について考察する。

(9) 卵活性化と卵細胞 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇の空間分布

宮崎俊一，毛利達磨，出口竜作（生理研）
尾田正二（東京女医大・第二生理）

受精時に卵 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を誘発する精子因子を検索するためウニ，ホヤ，マウス卵で受精時あるいは精子抽出物注入時に高速共焦点レーザー顕微鏡 Ca^{2+} 画像解析を行った。卵－精子融合を阻害する jaspisin 存在下でウニ卵に一時接着した精子は十数秒で離れるが，精子誘発性の局所的な $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が分離された。ホヤ精子抽出物の卵内注入により，受精時と極めて類似した減数分裂対応性の Ca^{2+} オシレーションが誘発された。最初の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇は，卵表層に注入した場合はそこから発生する Ca^{2+} 波を形成し，中心部に注入した場合は遅れをもって任意の表層部か

らCa^{2+}波が発生した。ハムスター精子抽出物のマウス卵内注入においても，表層部で精子因子に対する感受性が高いことが示唆された。またマウス精子1個を卵中心部に注入した場合，15～30分後に卵全体で同期したCa^{2+}増加反応と，それに続くCa^{2+}オシレーションが発生した。これらの現象を基盤に，精子細胞質のCa^{2+}増加誘発性卵活性化因子の精製を試みる。

(10) IP$_3$受容体によるCa^{2+}放出の機能解析と血管における生理機能

飯野正光（東京大・医・薬理）

Ca^{2+}シグナル機構の生理的意義を解明するには，細胞分子レベルでの研究だけでなく，生体内細胞構築を維持した状態での解析が重要である。この観点のもとに，細胞内Ca^{2+}シグナル機構を内皮・血管平滑筋・交感神経からなる動脈壁において，共焦点顕微鏡法を用いた可視化解析を行った。ラット尾動脈では，交感神経刺激により，個々の平滑筋細胞でCa^{2+}ウエーブとCa^{2+}オシレーションが観測された。更に，ピエゾモーターにより対物レンズを急速に上下させ，内皮細胞と血管平滑筋細胞を交互に観測して相互作用を解析した。内皮細胞でも，アゴニスト刺激により細胞内でCa^{2+}ウエーブとCa^{2+}オシレーションが観測された。この時，平滑筋細胞では交感神経刺激によるCa^{2+}オシレーションの頻度が低下していることが明らかになった。この反応は一酸化窒素(NO)を介した反応と考えられ，NO合成酵素阻害薬で遮断することができ，NOドナーによって同じ効果を得ることができた。このように平滑筋弛緩因子としてのNOは，血管平滑筋細胞のCa^{2+}オシレーション頻度を下げることが重要な作用機序であることが示された。

(11) 興奮収縮連関とリアノジン受容体

中井淳一（生理研）

骨格筋の興奮収縮連関において，T管に存在する電位依存性L型カルシウムチャネル（ジヒドロピロジン受容体）と筋小胞体に存在するリアノジン受容体（カルシウム放出チャネル）は蛋白蛋白の直接結合により情報伝達を行っていると考えられているが，その分子メカニズムは明らかになっていない。我々は興奮収縮連関のメカニズムを明らかにするため，電位依存性L型カルシウムチャネルcDNAおよびリアノジン受容体cDNA，さらにこれらcDNAの夫々について骨格筋型と心筋型isoformをもちいてキメラcDNAを作製し，電位依存性L型カルシウムチャネルを先天的に欠損するdysgenic mouseまたはリアノジン受容体(RyR-1)を人工的に欠損したdyspedic mouseから単離培養した骨格筋細胞に発現させ，蛋白蛋白結合部位の検討を行った。

(12) 腎尿細管の細胞内，核内カルシウムシグナル

河原克雅（北里大・医・生理）
須甲陽二郎（千葉大・医・第三内科）

新生児ラット腎髄質内層集合管細胞において細胞外ATPに応答する細胞内（細胞質内，核内）Ca^{2+}増加を共焦点レーザー顕微鏡を使って空間的，時間的に解析した。細胞質内と核内Ca^{2+}の蛍光強度(Fluo-3 or Indo-1)は，静止時において有意の差はなかった。細胞外ATP (2-100μM)投与時は，数秒の潜時後同時に増加し，核内Ca^{2+}の強度の方が細胞質内Ca^{2+}の強度を1.5－1.7倍上まわった（ピーク時）。この細胞内Ca^{2+}増加は一過性で約60秒で静止時のレベルに復帰した。細胞外0 Ca^{2+}においてもほぼ同様の結果が得られた。Ionomycin (10μM)存在下で細胞外Ca^{2+}濃度を10^{-9}-10^{-3}M変化させると，細胞外（内）Ca^{2+}依存性にFluo-3蛍光強度比（核内／細胞質内）が1.1から1.4に増加した。核内Ca^{2+}増加は，細胞質と共通の細胞内セカンドメッセンジャー(IP_3)により増加すること（細胞質Ca^{2+}増加による拡散効果ではないこと）と核内効果（Ca^{2+}蛍光強度の非線形増加）の存在を強く示唆した。

(13) 筋上皮細胞ATP受容体の細胞間相互作用に果たす役割

中野春男（生理研）
古家喜四夫（京都工繊大・応用生物）

乳腺筋上皮細胞は収縮によって腺胞内に溜まったミルクを排出する機能をもっている。筋上皮細胞の単離培養法を確立したところ，筋上皮細胞は形態的には平滑筋様の構造を有していた。Fura-2を用いた蛍光測光法により，筋上皮細胞の収縮は細胞内Ca^{2+}ストアからのCa^{2+}遊離によって起こることが明らかとなった。また，筋上皮細胞はP2Y型のATP受容体を持っており，その活性化によって細胞内Ca^{2+}濃度の増加と収縮が起こった。筋上皮細胞の収縮によって分泌上皮細胞にATPを介したCa^{2+}波が生じ，逆にCa^{2+}波によって筋上皮細胞の収縮が起こった。これらの結果は乳腺において筋上皮細胞と分泌上皮細胞がATP受容体とCa^{2+}波を介してポジティブな相互作用をしていることを示している。

10. シナプス機能の発達と制御の分子機構

1997.11.6－11.8

代表者：熊倉鴻之助（上智大）

世話人：池中一裕（生理研）

(1) ニューロトロフィンによる培養中枢ニューロンからの神経伝達物質放出

沼川忠広（大阪大・蛋白研）

(2) 中枢ニューロン間のシナプス形成に関与する分子群

黒田洋一郎（東京都神経研）

(3) シナプス機能調節における CaM キナーゼの役割

宮本英七（熊本大・ 医）

(4) 培養大脳皮質ニューロンを用いたニューロトロフィンによるチロシンリン酸化シグナルの解析

山田雅司（大阪大・蛋白研）

(5) 痛み情報伝達と ATP 受容体

上野伸哉（国立医薬品食品衛生研究所）

(6) シナプス可塑性における新規 PDZ タンパク質 Vesl/Verg ファミリーの役割

井ノ口馨（三菱化学生命研）

(7) ヨーロッパモノアラガイの連合学習

榊原　学（東海大・開発工）

(8) クロマフィン細胞のマルチモードエキソサイトーシス

寺川　進（浜松医大・光量子医学研究センター）

(9) 発達期小脳顆粒細胞における電位依存性 K^+ チャンネルの発現変化

柴田理一（生理研）

(10) LDCV の開口分泌における protein-protein interaction

御園生裕明（上智大・生命研）

(11) 微小電極基板上に形成した神経回路の刺激応答特性

川名明夫（NTT 基礎研）

(12) 海馬特異的エンハンサートラップマウスのゲノム解析とシナプス可塑性研究への応用

小島正己（PRESTO）

(13) 小脳プルキンエ細胞への共刺激により誘導される遺伝子の解析

山森哲雄（基生研）

(14) 変異型単純ヘルペスウイルスベクターを用いた L1 蛋白の機能解析

中井陽子（慶應大・医）

参加者名

山田雅司，沼川忠広（大阪大・蛋白研），井ノ口馨，小島正己（三菱化学生命研），村本和世，黒田洋一郎（東京都神経研），御園生裕明，熊倉鴻之助（上智大・生命研），上野伸哉，井上和秀（国立医薬品食品衛生研究所），櫻井孝司，寺川　進，菊田敏樹，坪井貴司，渡辺　昭，正畠まさ子（浜松医大・光量子医学研究センター），榊原　学，川合　亮（東海大・開発工），中井陽子（慶應大・生理学），宮本英七（熊本大学・医），山森哲雄（基生研），川名明夫（NTT 基礎研），柴田理一（生理研）

研究会概要

脳の高次機能を分子レベルで解明する上で，シナプス機能の発達と，機能制御の分子機構解明は必須である。この分子機構は，分子生物学的手法による分子レベルの解析から，光学的測定や電気生理学的手法を用いた細胞レベルの解析まで，異なった角度から研究が発展している。

本研究会では，特にシナプス形成と伝達物質放出の分子機構に関する理解の現状を明確にして，さらに解明を進める基盤を作り上げることを目的として，分子生物学，細胞生理学など異なる領域からの研究者がそれぞれの最新の成果に基づいて発表討議を行った。

(1) ニューロトロフィンによる培養中枢ニューロンからの神経伝達物質放出

沼川忠広（大阪大・蛋白研）

ニューロトロフィンは，ニューロンの分化，成熟を導く因子として知られており，また，様々なストレスによって引き起こされるニューロン死を抑制することが多くの研究により明らかになっている。しかし，ネットワーク形成後の成熟したニューロンにおいてもニューロトロフィンの発現は高く，最近では，ニューロトロフィンが短期間での作用，いわゆるシナプス可塑性へ関与している可能性が示唆され始めている。そこで我々は，記憶・学習に重要である中枢ニューロンのシナプス可塑性に及ぼすニューロトロフィンの作用解析を試みた。シナプス可塑性におけるシナプス増強作用の最初のステップは，神経伝達物質の放出である。我々はニューロンにより放出される神経伝達物質として興奮性アミノ酸であるグルタミン酸を HPLC で直接定量することでニューロトロフィンの効果を解析した。また，共焦点レーザー顕微鏡を用いて，神経活動変化の有効な指標である細胞内カルシウムの変動を追跡し，ニューロトロフィンの効果の解析を行った。これまでの解析でラット培養中枢ニューロン（大脳皮質，海馬，線条体及び小脳）より，BDNF, NGF 及び NT-3 等のニューロトロフィンの作用でグルタミン酸放出が 1 分以内でみられることを見出した。

BDNF 及び NT-3 による放出は，それらのレセプターである Trk の特異的阻害剤である K252a により抑えられた。つまり，BDNF 及び NT-3 による放出は，Trk レセプターを介したものであることが示唆された。

(2) 中枢ニューロン間のシナプス形成に関与する分子群

村本和世，黒田洋一郎（東京都神経研）

細胞膜非透過性のプロテインキナーゼ阻害剤の添加により，ラット大脳皮質培養細胞間の突起伸展には影響なしに，シナプス形成が阻害され，同時に細胞外ドメインと考えられる蛋白質リン酸化反応も阻害された。エクトプロテインキナーゼによる細胞外ドメインのリン酸化であることは，ビオチン化ラベルとアビジン・アガロースビーズによる沈降との組合わせによっても支持された。リン酸化反応の基質蛋白質の一つとして，MAP1B を同定し，さらに MAP1B が大きな細胞外ドメインを持つ膜蛋白質である証拠も得られた。マススペクトロメトリーを用いた解析から，MAP1B 上の30以上のリン酸化部位が同定され，その多くはプロリン指向性プロテインキナーゼによるものだった。また，発生段階を追って調べたところ，シナプス形成終了前後に特異的に脱リン酸化される部位が 2 ヶ所のみ見出された。シナプス結合の形成そのものに膜蛋白質のリン酸化が関っていることが示唆された。一方，ニューロン内での局在を光学および電子顕微鏡で調べたところ，MAP1B は約半数のシナプスでのみ，後シナプス肥厚部に局在していた。

(3) シナプス機能調節における CaM キナーゼⅡの役割

宮本英七（熊本大・医学）

神経伝達物質の放出はミリ秒単位の早い反応として知られている。一方，ホルモン 分泌はもっと時間的経過の長い反応としておこる。しかし，いずれの反応にも細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が必須である。最近，神経伝達物質の放出に必要な，前シナプス領域に存在している多くの蛋白質が，ホルモン分泌細胞にも存在することが明らかにされてきた。本研究では，インスリノーマ細胞である MIN6 細胞からのインスリン分泌に CaM キナーゼⅡ活性化反応とシナプシンⅠ燐酸化反応が相関することを示す知見を得たので，報告する。神経伝達物質放出とホルモン分泌の間には，時間的経過などの相違が存在する一方，共通した機作も持っていることを示唆している。

(4) 培養大脳皮質ニューロンを用いたニューロトロフィンによるチロシンリン酸化シグナルの解析

山田雅司（大阪大・蛋白研）

神経成長因子 (NGF)，脳由来神経栄養因子 (BDNF)，ニューロトロフィン -3 (NT-3) といったニューロトロフィンは，レセプター型チロシンキナーゼである Trk ファミリータンパク質に結合し活性化することにより細胞内にシグナルを伝達する。その結果，ニューロトロフィンは神経細胞の分化促進や生存維持，シナプス機能の調節といった様々な作用を発揮している。そして，ニューロトロフィンによる細胞内シグナル伝達においては，タンパク質のチロシンリン酸化，およびチロシンリン酸化されたタンパク質と SH2 (src homology 2) ドメインあるいは PTB (phosphotyrosine-binding) ドメインを持つタンパク質との結合，即ちチロシンリン酸化を介したタンパク質－タンパク質相互作用が重要な役割果たしていることがわかっている。現在，我々はニューロトロフィンにより引き起こされるタンパク質-タンパク質相互作用に注目して，ニューロトロフィンの作用分子機構の解析を行っている。今回は特に，ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3-K) と相互作用しうるタンパク質について解析を行った結果を紹介する。PI3-K は，それ自身が持つ SH2 ドメインを介してチロシンリン酸化タンパク質に結合することにより活性化されることが知られている。また最近，PI3-K は，ニューロトロフィンによる生存維持作用において重要な働きを持つことが示されている。

我々は，ニューロトロフィン刺激にともないどのようなタンパク質が PI3-K に結合しうるかを，初代培養ラット大脳皮質ニューロンを用いて解析を行った。その結果，PI3-K 免疫沈降物中において，BDNF あるいは NT-3 添加に伴いチロシンリン酸化の亢進が見られる少なくとも 4 種のタンパク質 (180, 120, 90, 70 kDa) を観察した。このうち，180 kDa チロシンリン酸化タンパク質の候補として IRS (insulin receptor substrate)-1 および -2 を考え，その可能性を調べた結果，IRS-1 および -2 共に，BDNF, NT-3 刺激にともないチロシンリン酸されること，そして PI3-K と結合しうることを見出した。さらに，BDNF, NT-3 刺激にともない，SH2 ドメインを持つチロシンホスファターゼであることが知られる SHP-2，および Ras の活性化に関わるアダプタータンパク質として知られる GRB-2 の量が PI3-K 免疫沈降物中において増加することを見出した。以上の結果は，ニューロトロフィン刺激にともない PI3-K は IRS-1, IRS-2, SHP-2, GRB-2 そして未同定のチロシンリン酸化タンパク質と相互作用しうること，そしてこれらの相互作用が PI3-K の活性化に関与しうる可能性を示している。

(5) 痛み情報伝達と ATP 受容体

上野伸哉，井上和秀（国立医薬品食品衛生研究所）

細胞外 ATP によって開く受容体結合型カチオンチャンネルが，近年クローニングさ れ，現在 P2X1 から P2X7 までのサブタイプが明らかとなった。一方，これらの受容体や ATP 関連物質が痛み伝達に関与している可能性も示唆されてきている。今回，痛み伝達の一次経路である，DRG 神経細胞における ATP による反応を，パッチクランプ法と Fura2 による細胞内カルシウム測定を用い明らかとした。また，DRG で発現していると考えられる P2X 受容体サブタイプの cDNA を哺乳細胞に発現させ，その ATP 惹起反応を比較検討した。

(6) シナプス可塑性における新規 PDZ タンパク質 Vesl/Verg ファミリーの役割

井ノ口馨，小澤史子，斎藤喜人，松尾亮太，加藤明彦（三菱化学生命研）

LTP に伴い発現が誘導される新規タンパク質 VeslS (Homer) は，代謝調節型グルタミン酸受容体 mGluR1/5 と相互作用する PDZ ドメインタンパク質であった。VeslS の splicing variant である VeslL は構成的に発現していた。VeslL には，異なる遺伝子由来の相同なタンパク質 Verg があった。これらのタンパク質は互いに相互作用し，mGluR のシナプス部位への clustering に関与していることが示唆された。長期のシナプス可塑性におけるこれらタンパク質の役割について議論したい。

(7) ヨーロッパモノアラガイの連合学習

榊原　学（東海大・開発工）

ヨロッパモノアラガイ (Lymnaea stagnalis) に対して光りを条件刺激 (CS)，体動揺を無条件刺激 (UCS) として条件付けした。1日30回，３日間 CS と UCS を組み合わせて訓練すると，その後 CS の提示のみで無条件応答 (UCR) が誘発され，この行動は２週間程度持続した。対照群は無刺激群 (naive)，光刺激のみ (light)，光と動揺が重ならずそれぞれ時間的にランダムに提示される群 (pseudo-random) とし，この対照群では CS による著明な応答は誘発されなかった。30回／日，２日間の条件付けでは条件応答は安定に再現されなかった。45回／日，２日間，90回／日，１日間の訓練では条件付けは獲得されなかった。30回／日，３日間の訓練で獲得した記憶は行動の面か

ら20日程度で完全に消去されるが，21日目に数回の条件付け訓練で記憶は再現された。これらの研究からヨロッパモノアラガイは基本的な連合学習モデルであることが確認された。

(8) クロマフィン細胞のマルチモードエキソサイトーシス

寺川　進，櫻井孝司（浜松医大・光量子医学研究センター）
熊倉鴻之助（上智大・生命学）

リアルタイムコンフォーカル顕微鏡を用いて，キナクリン染色した培養クロマフィン細胞を観察した。分泌顆粒が選択的に染まり，蛍光強度の大きいスポットとして見えた。電気刺激やK脱分極刺激をすると，細胞膜近傍の顆粒が多数消失する反応が起こった。その時の顆粒の蛍光強度の時間変化を解析したところ，開口放出によって顆粒内容の全か無の放出が起こるだけでなく，様々な割合の部分的な放出も起こることがわかった。

(9) 発達期小脳顆粒細胞における電位依存性 K^+ チャネルの発現変化

柴田理一（生理研）

我々は神経細胞の分化成熟機構，特に神経細胞が活動電位を獲得するに至るメカニズムと細胞の興奮性が分化成熟に及ぼす影響を解明するため，電位依存性イオンチャネルの発現変化に着目し解析を進めている。

活動電位は神経細胞の分化成熟に従いその発火頻度，amplitude, kinetics を変化させていくことが知られている。このような，活動電位の変化は電位依存性のイオンチャネルの発現パターンが変化することにより生じると考えられるが，その詳細については不明な点が多い。Xenopus の spinal neuron では，Na^+ チャネルの発現に加え，K^+ チャネルの発現が活動電位の制御に大きく寄与していることが報告されている。そこで我々は分化成熟のモデルとして生後から発達する小脳顆粒細胞を用い，顆粒細胞に発現している電位依存性 K^+ チャネル遺伝子 (Kv1.1, kv3.1 及び kv4.2) の発現変化を in situ hybridization により解析した。その結果，kv3.1-mRNA は生後初期から外顆粒層，内顆粒層共にその発現が認められた。また，kv4.2-mRNA は外顆粒層内の pre-migratory zone 及び内顆粒層に発現が見られた。一方 kv1.1-mRNA の発現は生後 7 日以降の内顆粒層から検出できた。これらの結果は，小脳顆粒細胞の発達過程において，異なる K^+ チャネル遺伝子の発現が時期特異的に制御されていることを示している。特に，速い不活性化成分を持つ A-type チャネルを形成する kv4.2 は，顆粒細胞の細胞移動や形態変化の初期過程から発現しは

じめることから，顆粒細胞の分化成熟過程に関与している可能性が考えられる。

次に，顆粒細胞おける K^+チャネルの電流変化をホールセルパッチクランプ法により電気生理学的に解析した。今回我々が用いた小脳の microexplant culture では，顆粒細胞が培養日数に伴い explant から放射状に移動し，形態を bipolar から T-shape へと変化させる。このような移動と形態変化は in vivo での顆粒細胞の分化とよく対応している。そこでパッチ電極内に蛍光色素を加えて細胞を標識し，形態変化と電気活動を同時に記録したところ，顆粒細胞の形態的成熟に伴い速い不活性化成分を伴う A-type 電流が増大してくることを見出した。この時期は in vivo における kv4.2-mRNA の発現時期に相当する。この A-type 電流の増加と kv4.2-mRNA の発現との関連は現在検討中であるが，顆粒細胞の分化成熟過程において A-type 電流が担う役割を考察したい。

(10) LDCV の開口分泌における protein-protein interaction

御園生裕明，今泉美佳，熊倉鴻之助（上智大・生命研）

神経伝達物質はシナプス小胞に貯蔵され，細胞膜近傍まで輸送された後，細胞膜とドッキングし，Ca^{2+}の流入を引き金として細胞膜と融合する開口放出によって内容物を放出する。この小胞と細胞膜のドッキングと融合に関与するタンパク質として，細胞質の NSF, SNAPs，細胞膜の SNAP レセプター (SNARE) SNAP-25, syntaxin，小胞膜の VAMP-2 が同定されている。これらの SNARE は NSF, SNAP と複合体を形成し，NSF が ATP を加水分解すると複合体は解離する。現在この複合体の会合と解離が小胞のドッキングと融合に重要であると考えられている。内分泌細胞クロマフィン細胞ではシナプス小胞よりも大きい Large dense core vesicle (LDCV) の開口放出によってカテコールアミンが放出される。この開口放出は SNARE を特異的に切断するボツリヌス毒素によって阻害されるため，SNAP-25, syntaxin, VAMP-2 はこの LDCV の開口放出にも機能して いると考えられる。酵母においても SNARE のホモログが同定されており，SNARE は小胞輸送に普遍的に働いていると考えられている。しかしシナプス小胞の開口放出は LDCV の開口放出に比べて非常に早く，また Ca^{2+}依存性も異なることから，両者の開口放出のメカニズムには異なる点があると考えられる。我々はクロマフィン細胞において，神経細胞での SNARE 複合体とは異なった複合体が形成されており，またこの複合体が開口放出に関わっていることを示唆する結果を得た。

(11) 培養神経回路における高頻度刺激の効果

川名明夫，神保恭彦，前田栄作，館野　高（NTT 基礎研究所）

神経細胞の電気的活動が，神経回路形成に重要な役割を果たしていることはよく知られているが，その詳細な機構は明らかではない。我々は，神経回路の発生やその機能の発達と，自発的電気活動との関連を明らかにするため，胎生17日のラット大脳皮質由来の細胞を微小電極アレイ基板上に培養し，その電気的活動を継続的に測定した。その結果，神経回路が，未成熟期，発達期，成熟期と移行するにしたがい，自発的電気活動が，時空間的にランダムな状態から，系全体に同期した非周期的状態へと移行することが明らかとなった。その発生のダイナミクスの検討から，発達期の電気活動の発生は確率的であり，成熟期にはカオス的であることが明らかとなった。これは，自発的電気活動の発生の機構が異なることを示唆している。

この様な，異なる電気的活動を示す神経回路に，LTP を生じさせるような高頻度刺激を与え，神経回路の機能にどの様な変化が生じるかを検討することは，LTP の神経回路における機能的役割を考える上で非常に興味深い。そこで，発達期，成熟期にある神経回路に高頻度刺激を与え，その神経回路の電気活動に与える影響を見た。その結果，発達期にある神経回路に高頻度刺激を与えると，テスト刺激に対する発火頻度が上昇し，バースト様の電気活動が起こりやすくなることがわかった。一方，成熟期にある神経回路に同様の刺激を与えると，テスト刺激に対する発火頻度の上昇とともに，刺激応答時間の短縮，発火時刻の再現性の上昇，異なる細胞間での同時発火確率の上昇が見られた。この様な，高頻度刺激が発達期，成熟期の神経回路機能に与える効果の違いは，LTP の役割が，発達期には神経回路形成にあり，成熟期には情報処理にあることとよく対応している。

(12) 海馬特異的エンハンサートラップマウスのゲノム解析とシナプス可塑性研究への応用

小島正己，松井慶子（PRESTO）
井ノ口馨（三菱化学生命研）

zfp40 の promoter 領域と lacZ の融合遺伝子 (zfp40/lacZ) を導入して得られたトランスジェニックマウスの 1 ライン HXZ3-13 は，lacZ 陽性細胞が成体の海馬の Ca1 から Dentate Gyrus の神経細胞層に局在していた。つまり，HXZ3-13 マウスは海馬特異的エンハンサートラップマウスであると思われた。海馬特異的 lacZ 発現のメカニズムを知る目的で，まず最初にトランスジーン (zfp40/lacZ) のゲノム上への挿入領域の DNA 約 140kb を単離した。Zoo Blot 解析によってこ

のDNA断片中の転写ユニットの位置を決定したところ，トランスジーンの近傍には新規遺伝子(C1-5)が存在することがわかった。また，HXZ 3-13マウスはC1-5遺伝子のジーントラップマウスになっていた。データを紹介するとともに，領域特異的に行われる脳機能の分子生物学的研究にこのようなエンハンサートラップマウスが貢献できることを述べたい。

⑬ 小脳プルキンエ細胞への共刺激により誘導される遺伝子の解析

山森哲雄（基生研）

小脳プルキンエ細胞にLTDを引き起こす，平行線維と登上線維の共刺激により活性化される遺伝子群の探索と機能の解明を行っている。これまでの研究により，（1）スライス下における小脳プルキンエ細胞での共刺激特異的な最初期遺伝子c-Fos/JunBの遺伝子発現を観察しているが，これを実際の生体内で検証し，平行線維をAMPAで代替したもの，更に，平行線維と登上線維との共刺激で確認した。（2）次に，共刺激条件下で培養小脳プルキンエ細胞に於いて最初期遺伝子に引き続いて発現する遺伝子群の探索を理化学研究所の矢野良治のグループと共同研究として行った。得られたものの幾つかについて，その遺伝子構造と脳組織における発現様式，及び，上記の共刺激条件下での発現を調べた。このうちの一つは，新しいタイプのRNAであることが判明した。（3）現在，共刺激特異的に発現し，かつ，より後期の長期記憶にかかわっていると考えられる遺伝子をスクリーニング，解析している。

⑭ 変異型単純ヘルペスウイルスベクターを用いたL1蛋白の機能解析

中井陽子，矢崎貴仁，植村慶一（慶應大・医）

神経細胞の軸索再生メカニズムを探る目的で，末梢神経系グリア細胞では発現されているが中枢神経系グリア細胞では発現されていない接着蛋白L1の突起伸展効果を検討した。L1蛋白を強制発現させる手段として，変異型単純ヘルペスウイルスベクターによる外来遺伝子導入を試みた。ヘルペスウイルスベクターは，神経系細胞への親和性が高く，非増殖細胞にも感染可能で，またサイズの大きな外来遺伝子を組み込み可能であるという特性を持つ。本研究では，ベロ細胞及びシュワン細胞に，ヘルペスウイルスベクターを用いてL1蛋白を強制発現させ，その上に生後4日目のラットより採取した後根神経節細胞を培養し，突起伸展の様子を定量化した。その結果，発現されたL1が，神経細胞の突起伸展を促進することが確認され，その作用機序について，情報伝達系を含め現在検討中である。

11. ABC 蛋白の多機能性と生命維持機構

1997.12.1－12.2

代表者：植田和光（京都大・農・応用生命）
世話人：岡田泰伸（生理研）

(1) ラット心筋虚血再灌流モデルにおける心筋 ATP 感受性Kチャネル遺伝子の転写調節
赤尾昌治，堀江　稔（京都大・医・循環病態学第3内科）

(2) SUR/Kir6.0 チャネルの細胞内ヌクレオチドによる活性調節機構
倉智嘉久（大阪大・医・薬理学第2）

(3) ATP 感受性Kチャネルの構造と機能
五ノ井　透（千葉大・真菌医学研究センター）
稲垣暢也，清野　進（千葉大・医・高次研・発達生理）

(4) SU 受容体を介した K_{ATP} チャネル活性調節機構－膵β細胞内糖代謝障害時の異常について
石田　均（京都大・医・病態代謝栄養学）

(5) MDR1 と SUR1 の ATP との相互作用
植田和光（京都大・農・応用生命科学）

(6) Molecular evolution and biological function of GS-X pump family
石川智久（ファイザー中研）

(7) グルタチオン抱合体排出ポンプと抗癌剤耐性
陳　哲生，秋山伸一（鹿児島大・腫瘍研究施設）

(8) ヒト MDR1 遺伝子領域のゲノム編成と，ヒト cMOAT 遺伝子の関連疾病および癌への関与
和田守正，桑野信彦（九州大・医・生化学第1）

(9) 排出輸送系による異物排除機構
鈴木洋史，杉山雄一（東京大・薬・薬剤設計学）

(10) 植物におけるアルカロイドトランスポータとその役割
矢崎一史（京都大・農・応用生命科学）

(11) ペルオキシソーム膜 ABC トランスポータのアセンブリーと機能
今中常雄（帝京大・薬・微生物）

(12) 容積感受性 ATP 遊離チャネルと CFTR
挾間章博（生理研）

(13) 心筋小胞体 Cl チャネルのアデニンヌクレオチド透過性に関する検討
川野誠子，平岡昌和（東京医歯大・難治疾患研・循環器病）

参加者氏名

植田和光，松尾道憲，高田裕子，西谷真人，小峰　淳（京都大・農・応用生命），岡田泰伸，老木成稔，狭間章博，森島　繁，Sabirov Ravshan，三好毅志，上坂敏弘，清水貴浩，范　海天（生理研），桑野信彦，和田守正（九州大・医・生化学第1），石川智久，水谷真由美（ファイザー中研），鈴木洋史，杉山雄一（東京大・薬・薬剤設計学），堀江　稔，赤尾昌治（京都大・医・循環病態学第3内科），五ノ井　透（千葉大・真菌医学研究センター），倉智嘉久（大阪大・医・薬理学第2），石田　均（京都大・医・病態代謝栄養学），平岡昌和，川野誠子（東京医歯大・難治疾患研・循環器病），矢崎一史（京都大・農），秋山伸一，陳　哲生（鹿児島大・腫瘍研究施設），今中常雄，相原一敏（帝京大・薬・微生物），國安明彦，奥田祥士（熊本大・薬・放射薬品）

研究会概要

ABC蛋白は，細胞内ATPをエネルギーとして利用するだけでなく，細胞環境をモニターするシグナル分子として利用し，細胞の生命維持に重要な役割を果たしている。たとえば膵β細胞では，ABC蛋白であるSURが細胞内ATP/ADP濃度をモニターし，Kチャネルを開閉することによって，結果としてインスリン分泌を制御している。同じくABC蛋白であるCFTRは生理的に重要なクロライドチャネルであり，MDR1やMRPは抗癌剤耐性にかかわる薬剤排出ポンプである。このようにABC蛋白の機能はポンプ，チャネル，レセプターと多様であるとともに，1つのタンパク質が2つ以上の機能を持つという報告が次々に出されている。本研究会では，それぞれのABC蛋白の機能と生理的重要性について発表があった。それぞれのABC蛋白の研究がさらに深まるとともに，相互に比較されることによって，ABC蛋白がポンプ，チャネル，レセプターという多様性および多機能性を持ち得る秘密と，ABC蛋白による生命維持機構についての理解が深まることが期待できる。

(1)ラット心筋虚血再灌流モデルにおける心筋ATP感受性Kチャネル遺伝子の転写調節

赤尾昌治，村上知行，大谷秀夫，堀江　稔，
胡内一郎，篠山重威（京都大・医学研究科・循環病態）
鷹野　誠（京都大・医・生理）

【目的】心筋ATP感受性Kチャネルは内向き整流性Kチャネル(Kir6.1, Kir6.2)とsulfonylurea receptor (SUR2)から構成される複合体であると考えられている。このチャネルは心筋虚血に際して開口し，心筋保護作用を有することが知られている。本研究ではラット心筋虚血再灌流モデルを用いてKir6.1, Kir6.2, SUR2の転写発現を検討した。【方法】ラットの左冠動脈を結紮して虚血を作成した後に再灌流を行った。血行動態を記録した後に，心臓を虚血，非虚血域に分け，

Kir6.1, Kir6.2, SUR2 の発現経過をノザンブロット法にて検討した。また，膜蛋白分画を調整しウェスタンブロット法にて Kir6.1 蛋白の変化を検討した。【結果】60分虚血24－72時間再灌流群では，sham 群に比して，虚血，非虚血域の両方において Kir6.1mRNA のみが特異的に増加しており（虚血域2.7－3.1倍，非虚血域2.0－2.6倍），24時間連続虚血群でも Kir6.1 が同様に増加したが，60分虚血３－６時間再灌流群や３－６時間連続虚血群では増加していなかった。15－30分間虚血では24時間再灌流後でも増加が見られなかった。一方，Kir6.2, SUR2mRNA はどの群においても有意の変化が見られなかった。60分虚血24時間再灌流群では Kir6.1 蛋白レベルは sham 群より増加していた（虚血域2.4倍，非虚血域2.2倍）。60分虚血を施したラットは再灌流直後から血圧の低下，LVEDP の上昇を認めた。【総括】60分以上の心筋虚血により，心筋 KATP チャネル構成遺伝子は異なる転写調節を受け，この変化は非虚血域にも見られることが明らかとなった。この転写調節は持続的な血行動態の変化が関与する可能性が示唆された。

(2) SUR/Kir6.0 チャネルの細胞内ヌクレオチドによる制御機構

倉智嘉久（大阪大・医・薬理学第２）

ATP 感受性カリウムチャネルは SUR と Kir6.2 からなるヘテロオクタマーと推定されている。われわれは SUR2 の新しいスプライス変異体を単離した (SUR2B)。SUR2B は SUR2A とはＣ末端の42個のアミノ酸が異なっているだけであった。SUR2B のこの42個のアミノ酸はむしろ SUR1 の相同部位にホモロジーが高かった。SUR2B は Kir6.2 と共発現すると diazoxide, pinacidil の両方により活性化される ATP 感受性カリウムチャネルを形成し，薬理学的には血管平滑筋細胞型の SUR と推定された。また SUR2B/Kir6.2 に対する細胞内 ATP の抑制効果は Mg^{2+} に影響されなかったが，SUR2B/Kir6.2 では Mg^{2+} free-ATP のほうがより有効であった。このように SUR2B のＣ末端は薬剤作用や細胞内 ATP の作用にかかわっていると推定された。

SUR2B を Kir6.1 と共発現させると古典的な ATP 感受性カリウムチャネルとは全く違ったゲイト機構を示すＫチャネルが形成された。SUR2B/Kir6.1 チャネルは細胞内 ATP がなくても自然開口せず，ヌクレオチド２リン酸や３リン酸によりチャネルが活性化された。KCO はこの細胞内ヌクレオチドによる活性化を増強した。SUR2B/Kir6.1 のこれらの特性は血管平滑筋細胞での NDP-感受性Ｋチャネルと全く一致するものであった。一方，SUR2B/Kir6.2 では KCO は細胞内 ATP によるチャネル活性の抑制効果を弱める作用を示した。このように Kir6.0 サブニットは SUR/Kir6.0 チャネルの細胞内ヌクレオチドによるゲート機構を決定している。現在，Kir6.2 と Kir6.1 のキメラの検討により Kir6.0 によるヌクレオチドによるゲート決定の分子機構を明らかにしている。

(3) K_{ATP} チャネルの構造と機能

五ノ井　透（千葉大・真菌医学研究センター）
稲垣暢也（秋田大・医）
清野　進（千葉大・医）

ATP 感受性 K^+ チャネル（K_{ATP} チャネル）は，細胞内の ATP 濃度に応じて膜の K^+ イオン透過性を変化させ，細胞のエネルギー状態を膜電位や膜興奮性に変換する。このチャネルは，膵 β 細胞においてはグルコース濃度に応じたインスリンの分泌を制御し，心臓においては虚血時の心筋細胞の保護に役立っていると考えられる。遺伝子のクローニングとその発現，電気生理学的な解析を用いて K_{ATP} チャネルの分子構造を明らかにした。膵臓および心筋・骨格筋の K_{ATP} チャネルは，それぞれ ABC トランスポーター・スーパーファミリーに属する SUR1 または SUR2A 分子と，内向き整流性 K^+ チャネルの仲間の Kir6.2 分子から構成される。また SUR1 分子と Kir6.2 を縦に繋いだ人工的な蛋白分子の発現実験から SUR1 と Kir6.2 はそれぞれが 4 分子づつ集まってヘテロ・オクタマーを構成すると考えられた。Kir6.2 分子の機能発現を膵 β 細胞でドミナント・ネガティブに抑制するトランス・ジェニック (TG)・マウスを作成すると，マウスは出生直後には高インスリン血性低血糖を示し，ヒトの Familial Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia of Infancy に似た症状を呈した。しかし成長とともに TG マウスの β 細胞の数は減少し，成熟 TG マウスは糖尿病様のインスリンの分泌障害をともなう高血糖の病態を呈した。以上の TG マウスの実験は K_{ATP} チャネルが，インスリンの分泌とともに β 細胞の成熟にも重要な役割を持つことを示唆する。

(4) SU 受容体を介した K_{ATP} チャネル活性調節機構 —膵 β 細胞内糖代謝障害時の異常について

石田　均（京都大院・医学研究科・病態代謝栄養）

糖尿病状態下では膵 β 細胞からのブドウ糖刺激に対するインスリン分泌不全が認められるが，その成因として細胞内糖代謝機構の障害が存在する。一方糖尿病患者に対する経口血糖降下剤である SU 剤は，高親和性の SU レセプター (SUR) に結合して K_{ATP} チャネルを閉鎖し細胞膜の脱分極をきたしてインスリン分泌を促進するが，多くの症例で糖尿病の重症化にともない血糖降下作用が消失する（二次無効と呼ばれる）。そこで膵 β 細胞内へ人為的に糖代謝障害を導入したところ，活性化された K_{ATP} チャネルに対する SU 剤の glibenclamide の抑制能に著明な低下が認められた。したがって糖尿病状態下に存在する膵 β 細胞内でのブドウ糖代謝機構の障害により，

SURとK^+チャネル蛋白(Kir6.2)間の連関に破綻が生じSU剤に対するK_{ATP}チャネル活性抑制の感受性が低下し，インスリン分泌促進能が消失する事実が明らかとなった。さらにVaughamWilliams分類のIa群に属するcibenzolineがSURを介することなく直接Kir6.2に結合し，K_{ATP}チャネル活性を抑制する可能性があり，この薬剤の骨格をもとに，Kir6.2に対し親和性ならびに特異性の高いアナログを作製することにより，膵β細胞内での糖代謝障害時おいてもチャネル活性を抑制し得る薬剤が開発されることが期待される。

(5) MDR1とSUR1のATPとの相互作用

植田和光（京都大・農）

ABC蛋白の機能の多様性の謎を解明する鍵は，それぞれの機能とATP結合あるいはATP加水分解との共役性にあるだろう。トランスポータにおいてはATP加水分解による構造変化と物質輸送とが共役しているはずであり，レセプターとチャネルにおいては共役している必要はない。トランスポータであるMDR1, MRPと，Kチャネル制御に関与しているSURのATPとの相互作用の相違を検討した。

MDR1やMRPはATP加水分解活性を持つ[1,2]。基質を濃度勾配に逆らって細胞外へ排出する（あるいは細胞膜の外層に転送する）際，MDR1はこのATP加水分解のエネルギーを用いて構造変化し，その構造変化と輸送が共役しているはずである。MDR1のATP加水分解メカニズムは，F型，V型，P型ATPaseなど他のATP駆動型トランスポータとは非常に異なっている。たとえば，MDR1はATPに対しては非常に弱い結合活性(Km＝0.5～1mM)しかもたず，E-P複合体も形成しない。MDR1の前後半それぞれ半分は，切り離すとATP加水分解活性を持っている。しかし，前後半がつながった本来の状態ではどちらか一方にでも変異を導入するとMDR1のATP加水分解活性は失活する。つまり，2つのATP結合領域は，独立にATPを加水分解するのではなく，厳密に協調しあっている。片方が常に加水分解反応をし，もう片方が常に制御部位として働いているわけではなく，反応と制御を順番に行っているらしい（投稿中）。

同じくABC蛋白であり経口糖尿病薬であるスルホニル尿素のレセプターSURは細胞内のATPとADPの濃度の比をモニターすることによって，物理的に連動している内向き整流性Kチャネルの開閉を制御しているが，SURのATPとの相互作用はMDR1とは大きく異なった。SURのNBF1はMg非依存的にATPを強く結合するのに対し，NBF2はMgADPを結合し，NBF1のATP結合を制御している[3]。

これらの蛋白のATPとの相互作用の相違をさらに調べることによって，ABC蛋白がなぜトランスポーター，チャネル，チャネルレギュレーターという多様な機能を発揮できるのか，多機能性を発揮できるのか，その謎を解明できると考えている。

参考文献

1. Shimabuku, A. M., Nishimoto, T., Ueda, K. & Komano, T. (1992) P-glycoprotein: ATP hydrolysis by the N-terminal nucleotide-binding domain. *J. Biol. Chem.*, 267, 4308-4311
2. Taguchi, Y., Yoshida, A., Takada, Y., Komano, T. & Ueda, K. (1997) Anti-cancer drugs and glutathione stimulate vanadate-induced trapping of nucleotide in multidrug resistance-associated protein (MRP). *FEBS Lett.*, 401, 11-14.
3. Ueda, K., Inagaki, N. & Seino, S. (1997) MgADP antagonism to the Mg-independent ATP binding of the sulfonylurea receptor SUR1. *J. Biol. Chem.*, 272, 22983-22986.

(6) Molecular Evolution and Biological Function of *GS-X* pump Family

Toshihisa Ishikawa (Medicinal Biology Laboratory, Pfizer Inc. Central Research)

During past five years, there was a remarkable progress in our understanding of the molecular nature of the *GS-X* Pump. Overexpression of the multidrug resistanceassociated protein (*MRP1*) gene in human cancer cells has been first reported to result in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport, thus demonstrating that the *MRP1* gene encodes a human *GS-X* Pump. A liver specific *GS-X* pump, named *cMOAT*, has also been cloned from rat liver cDNA libraries and it exhibited an extensive homology with human *MRP1*. Mutation of the *cMOAT* gene is implicated to be a cause of hereditary hyperbilirubinemia associated with defective function of the hepatic *GS-X* pump. The yeast cadmium factor (*YCF1*) gene from *Saccharomyces cerevisiae* has been identified on the basis of its ability to confer cadmium resistance. The *YCF1* gene encodes an ATP-binding cassette (ABC) protein homologous to human *MRP1*, and the protein has recently been identified as a vacuolar *GS-X* pump in yeast cells. Furthermore, *AtMRP1* gene in a plant, *Arabidopsis thaliana*, has most recently been cloned. *AtMRP1* also demonstrates *GS-X* pump activity and extensive sequence homology to *MRP1*, *cMOAT* and *YCF1*. Thus, evidence supports the idea that the *GS-X* pumps comprise a multigene family existing in both the animal and plant kingdoms.

Gene expression and biological functions of the *GS-X* pump are closely related with cellular glutathione (GSH) metabolism. Indeed, the *GS-X* pump exhibits high affinities toward glutathione S-conjugates carring a long aliphatic carbon chain, indicating its physiological role in the trasport of naturally occurring glutathione S-conjugates. The present study shows that the *GS-X* pump encoded by the *MRP1* gene may play a pivotal role in modulating the biological action of anticancer prostaglandins. The A and J series of prostaglandins (PGA and PGJ) suppress proliferation of

cancer cells without affecting intracellular cAMP levels. These PGs are actively transported into cells and accumulated in their nuclei. This accumulation is closely correlated with cell growth inhibition. Δ^7-PGA_1 methyl ester strongly inhibited the proliferation of human myelocytic leukemia HL-60 cells. The inhibition of cell growth by Δ^7-PGA_1 methyl ester was closely linked to the suppression of c-*myc* gene expression and cell-cycle arrest in the G_1-phase. Furthermore, Δ^7-PGA_1 methyl ester specifically induced p21 (*Sdi1/CIP1/WAF1*), a cycline-dependent kinase inhibitor, without any effect on the expression of p27, p18, p16, or p14. The induction of p21 resulted in a remarkable accumulation of hypophosphorylated pRB. Since the p53 gene is completely deleted in HL-60 cells, the induction of p21 by Δ^7-PGA_1 methyl ester is mediated via a novel pathway independent of the p53 gene.

Unlike in HL-60 cells, growth inhibition and cell cycle arrest by Δ^7-PGA_1 methyl ester were minimal in HL-60/R-CP cells which overexpress the *MRP/GS-X* pump. This could be ascribed to GSH conjugation of the anticancer PG and *MRP/GS-X* pump-mediated active extrusion of GS-Δ^7-PGA_1 conjugate from HL-60/R-CP cells. To examine this hypothesis, we have chemically synthesized an *MRP/GS-X* pump-specific inhibitor, GIF-0017. This compound inhibited *GS-X* pump activity with an IC_{50} value of 0.3 μM in plasma membrane vesicles form HL-60/R-CP cells. GIF-0019, methyl ester of GIF-0017, dose-dependently enhanced the cellular sensitivity of HL-60/R-CP cells to Δ^7-PGA_1 methyl ester and induced G1 arrest. Inhibition of the *MRP/GS-X* pump is considered to elicit the accumulation of the anticancer PG in the cell. The *MRP/GS-X* pump may be a novel target for sensitization of drug-resistant human cancer cells.

Part of this study has been made by collaboration with Dr. Ryoji Noyori (Nagoya University) as well as Drs. Masaaki Suzuki and Kyoji Furuta (Gifu University).

(7)グルタチオン抱合体排出ポンプと抗癌剤耐性

陳　哲生，秋山伸一（鹿児島大・医・腫瘍研）

ヒト癌 KB 細胞より分離したシスプラチン耐性細胞 KCP-4 は，シスプラチンを ATP 依存性に排出するポンプを発現し，そのポンプはグルタチオン抱合体排出ポンプであることが示唆された。しかし KCP-4 細胞には MRP, cMOAT 両タンパク質の発現は認められなかった。

同じ KB 細胞親株より分離した MRP を過剰発現した C-A120 細胞と MRP を発現していない KCP-4 細胞は，いずれも重金属 (Antimony, Arsenite), CPT-11, SN-38 に交差耐性を示した。いずれの細胞においても Antimony, CPT-11, SN-38 の細胞内蓄積が減少し，ATP 依存性排出が亢

進していた。KCP-4 より調製した membrane vesicle は C-A120 の membrane vesicle 同様 LTC4 を ATP 依存性に輸送したが，KCP-4 細胞のシスプラチン耐性は PAK-104P で克服されなかった。

重金属の耐性にはメタロチオネインの関与が報告されているが，KCP-4 細胞でのシスプラチン耐性はメタロチオネインの細胞内レベルの上昇によるものではなかった。また，KCP-4 細胞における DNA 修復能は亢進していたが，DNA 修復を aphidicolin で阻害しても，シスプラチンに対する耐性は一部しか克服されなかった。KCP-4 細胞内のグルタチオンレベルは上昇していたが，グルタチオンレベルを親株のレベルまで低下させてもシスプラチン耐性は克服出来ず，シスプラチンの細胞内蓄積もあまり変化しなかった。しかし，グルタチオンレベルをさらに低下させると KCP-4 細胞のシスプラチンに対する感受性が有意に上昇することから，グルタチオンは KCP-4 細胞からのシスプラチンの放出に関与している可能性が示唆された。

以上の結果から，未知の薬剤排出ポンプがシスプラチン耐性と関係していると考え，その本体を解明しようとしている。

(8)ヒト MDR1 遺伝子領域のゲノム編成と，ヒト cMOAT 遺伝子の関連疾病および癌への関与

和田守正，桑野信彦（九州大・医・生化）

ABC トランスポーターのうち MDR1 と MRP は，多くの抗がん剤を排出することにより薬剤耐性の獲得に関与していると同時に，腸などにおいて解毒抱合された異物を排出する。すなわち，共通のトランスポーターが細胞レベルと個体レベル双方の生体防御機構を担っている。我々は，２つのアプローチにより，さらに新しい ABC トランスポーターを同定し，がんおよび疾病への関与を明らかにすることを試みた。

【１】ABC トランスポーター遺伝子群のゲノム編成と発現制御：MDR1 遺伝子領域の新しい耐性関連遺伝子の単離，耐性機能を相補する遺伝子の同定，耐性形質獲得に至るゲノム再編成の検出をするために，周辺のゲノム構造と関連遺伝子の構成を包括的に把握することを試みた。このために先ず，数百キロベースのゲノム DNA を細胞に導入するシステムを確立した。この YAC 導入による発現クローニング法を用いて，新規耐性関連遺伝子の探索を試みた結果，この領域の新規耐性関連遺伝子の存在が示唆された。さらに，エクソントラップ法により単離された60エクソンのうち膜タンパク質をコードする遺伝子が６種類存在し，すでに同定されている MDR1, 3，グルタミン酸レセプターなども含めて，この領域にチャネル，トランスポーター関連遺伝子が局在することが示された。

【２】ABC トランスポーター遺伝子群の単離とがん，疾病への関与：ABC ファミリー遺伝子の間でよく保存されている領域に対して混合プライマーを作製し RT-PCR を行う方法によ

り，新しいABCトランスポーター遺伝子を単離した。塩基配列の相同性と組織発現パターンから，ラットcMOATのヒトホモログであることを結論した。翻訳開始点を含むcDNAのアンチセンス強制発現株を樹立し解析することによって，ヒトcMOATがシスプラチン，ビンクリスチンなどに対する感受性と細胞内蓄積に関与することを示した。一方，このcMOAT遺伝子は(1)肝臓に特異的に発現していること，(2)cMOATに近縁のMRPはグルタチオンおよびグルクロン酸抱合体を排出すること，(3)ビリルビンはグルクロン酸抱合をうけて肝臓より排出されるが，その排出傷害がDubin-Johnson症の原因であると考えられていることより，cMOAT遺伝子がDubin-Johnson症の責任遺伝子であると想定し，患者で変異の同定を試みた。4人の患者および家族の全血あるいは肝臓検体を用いて変異を検索した結果，発症と相関する点変異1種類と欠失変異2種類を同定し，cMOAT遺伝子がDubin-Johnson症候群の責任遺伝子であることを明らかにした。また，変異はいずれもがN端側のヌクレオチド結合ドメイン内あるいはその近傍に同定され，ABCトランスポーターの機能におけるこのドメインの重要性が示された。

(9)排出輸送系による異物排除機構

鈴木洋史（東京大院・薬学系研究科）

我々はラット肝臓よりcMOATcDNAをクローン化したが，その機能解析，homologueのcDNAクローニング，並びに血液脳関門・血液脳脊髄液関門におけるMRP活性について報告する。

(i) cMOAT機能解析

cMOATをNIH3T3細胞にtransfectし，膜ベシクルを調製することによりグルタチオン抱合体輸送能を検出できた。またcMOATをMDCK細胞にtransfectすることにより，cMOAT機能がapical側に発現されることを示すことができた。

(ii) cMOAT homologueのcDNAクローニング

cMOAT機能を欠損する変異ラットEHBRにおいてもグルクロン酸抱合体に対する一次性能動輸送機能が存在する。EHBR肝に対してRT-PCRを行い，増幅された2種のcDNAをプローブとしてcDNA全長をクローニングすることができた（MLP-1, 2と定義)。MLP-1は主として肝に発現されるが，MLP-2は消化管に発現される。またMLP-2はEHBR肝で誘導されているが，ビリルビンおよびそのグルクロン酸抱合体がその原因と示唆された。

(iii)血液脳関門・血液脳脊髄液関門におけるMRP活性

血液脳関門を形成する脳毛細血管内皮細胞より膜ベシクルを調製したところ，MRP活性が検出され，また分子レベルでもMRPが検出されたため，血液脳関門における有機アニオン排出に一部MRPが関与することが示唆された。血液脳脊髄液関門を形成する脈絡叢上皮細胞の血管側

膜にも排出輸送担体が存在することが示唆され，MRP が高発現されることから，MRP がその実体であるものと推察された。

⑽植物におけるアルカロイド・トランスポータとその役割

矢崎一史（京都大・農学研究科）

植物は，多様な細胞毒性を有する二次代謝産物を数多く生産する。その多くはバクテリアや真菌等外敵の侵入や，昆虫等による食害から植物個体を保護する役割を担っているとされるが，これらの化合物は，それを生産している植物自身にとっても有害である。そのため，植物の生存は，これら生理活性物質の解毒機構の発達に大きく依存している。その解毒機構の中で最も重要な部分を占めるのが，植物特有のオルガネラである液胞の形成と，液胞への物質輸送機能の獲得であり，また細胞外への物質分泌機能の発達である。

我々は，植物の細胞毒生産のモデルとして，オウレンとアキカラマツのアルカロイド（ベルベリン）生産系を用いている。前者の培養細胞は生産したベルベリン全てを液胞内に蓄積し，後者はそのほぼ全てを細胞外に分泌することで細胞質からのベルベリンの排出を行っている。これまでに，この輸送が ABC 蛋白質によるものであることを突き止めているが，この輸送体がベルベリン誘導体に広い特異性を持つこと，しかし骨格の異なる四級アミンは基質としないことが認められている。また，上記 2 種の細胞が投与されたベルベリンに高い耐性を示すのに対し，アルカロイドを生産していない他植物の細胞は非耐性であることから，この輸送体蛋白質に植物種特異性が見い出された。両植物からの輸送体蛋白質のクローニングを行ったところ，mdr1 様遺伝子の一部が複数得られたが，前者の細胞で発現している ABC 蛋白質遺伝子はほぼ 1 種類で，後者では複数のメンバーが発現していることが明らかとなった。

⑾ペルオキシソーム膜 ABC トランスポータのアセンブリーと機能

今中常雄（帝京大・薬・微生物／病態生化）

ペルオキシソームは脂肪酸の β 酸化，コレステロールの胆汁酸への異化，プラスマローゲンの生合成などに関与しているが，膜上の輸送担体が重要な役割を果たしていると推測される。ABC 蛋白に属する 70kDa ペルオキシソーム膜タンパク質 (PMP70) はペルオキシソーム膜の主要構成タンパク質で，脂肪酸 β 酸化系酵素ならびにペルオキシソーム顆粒の増加する条件下，顕著に誘導される特性をもつ。今回，PMP70 のペルオキシソーム膜への局在化機構ならびにその

構造と機能について検討したので報告する。ラット肝癌細胞 H4IIE を用いたパルス-チェイス，ラット PMP70 及び一部を欠失した cDNA を用いた *in vitro* タンパク質輸送実験により，PMP70 は processing を受けずペルオキシソーム膜に移行すること，その移行シグナルはN末端より 3 番目の膜貫通領域に存在することが示唆された。また PMP70 はペルオキシソーム膜上で ATP 結合ドメインを細胞質側に露出し，ホモダイマー構造をとることが示された。さらに PMP70 過剰発現 CHO 細胞を作製し，PMP70 と脂肪酸 β 酸化の関連性を検討すると，過剰発現細胞では palmitate の β 酸化が亢進したが，lignocerate の β 酸化は抑制された。PMP70 は posttranslational にペルオキシソーム膜にアセンブルし，長鎖 acyl-CoA に特異性を示す輸送担体と考えられる。

(12)容積感受性 ATP 遊離チャネルと CFTR

挾間章博，三輪晃子，三好毅志，清水貴浩，岡田泰伸（生理研）

細胞には，低浸透圧刺激により一旦膨張した後次第に元の体積へと回復する細胞容積調節機構 (Regulatory Volume Decrease: RVD) が存在する。この過程で，K^+ イオンや Cl^- イオンが細胞内から細胞外へと流出することは良く知られているが，イオンのみならず，アミノ酸や ATP の放出も起ることが最近報告されている。私達は，この ATP 放出がどの経路を介して行われるか調べる目的で，培養小腸上皮細胞 Intestine407 に低浸透圧刺激を与え，放出される ATP をルシフェリン・ルシフェラーゼ法を用いて測定した。低浸透圧刺激により，細胞外 ATP 濃度の増大が認められたが，容積調節性 Cl^- チャネルの阻害剤である SITS やアラキドン酸を投与しても ATP 放出は抑制されなかった。また，この細胞の膜蛋白に対して作成したモノクローナル抗体より，ATP 放出を抑制する抗体をスクリーニングした。その結果得られた抗体は低浸透圧刺激による ATP 放出を抑制したが，容積調節性 Cl^- チャネルは抑制しなかった。この細胞には CFTR の発現は認められないので ATP 放出経路が CFTR とは異なることは明らかだが，CFTR の強制発現細胞 C127/CFTR と未発現細胞の C127i における低浸透圧刺激による ATP 放出を比較すると C127/CFTR で ATP 放出の著明な増大が認められた。また，この ATP 放出も抗体により抑制された。このことから，CFTR は ATP 放出経路自体ではないが，ATP 経路を制御していると考えられる。

⑬心筋小胞体の Cl^-チャネルのアデニンヌクレオチド通過性に関する検討

川野誠子，来馬明規，平山悦之，平岡昌和
（東京医歯大・難治疾患研究所・成人疾患）

細胞内オルガネラには数多くのイオンチャネルが存在し細胞機能に重要な役割を果たしていると推測されるもその生理機能や細胞内調節機構に関しては不明なものが多い。我々は筋小胞体にcAMP依存性燐酸化によって活性化されるCl^-チャネルが存在し，またCa/Calmodulinによってその活性が調節されていることを明らかにしてきた。しかし，このチャネルの実体及び生理的機能や意義に関しては全く解明されていない。本研究ではこのCl^-チャネルを人工脂質膜に再構成し単一チャネル電流記録により電気生理学的特性と機能解明の検討を行った。Cis/Trans (500/50 mM)のCl^-を全て各々Br^-, NO_3^-, I^-, F^-に置換した時，これらの逆転電位(E_{rev})は何れも＋60 mVを示し陰イオンに対して強い選択性を有することが示された。またこのチャネルの陰イオンに対する透過性の順序は$Br^- > Cl^- > I^- > NO_3^- > F^-$であることが判明し，これは気管上皮に存在するアニオンチャネル(CFTR)のものと類似していた。そこでこの標本でCFTRに対するモノクローナル抗体を用いたWestern blotを行った結果，C末端とRドメインに対する抗体に反応が認められるも，特異的反応か否かの確認は困難であった。Cis液の陰イオン全てATPに置換した時もチャネルの開口は持続して認められ，且つTrisATP 83 mMと200 mM時のE_{rev}は約＋30 mVから＋40 mVへと右へシフトしATPが本チャネルを通過することが確認された。また，Cis液のアニオン全てをADP又はAMP (100 mM)に置換した時も陰イオン電流が記録され，このクロライドチャネルはAMP, ADP, ATPいづれのアデニンヌクレオチドを通過させることが判明した。以上の結果，小胞体のCl^-チャネルは細胞質と小胞体内腔間のアデニンヌクレオチドの輸送に寄与していることが判明した。

12. 脳磁図計測によるヒト脳機能の解析

1997.12. 2 －12. 4

世話人：柿木隆介，橋本　勲（生理研），栗城真也（北海道大　電子研）

(1) MEG による電流源推定：非侵襲的方法との対比

飛松省三（九州大・医・臨床神経生理）

(2) 脳磁図と覚醒下脳表電気刺激による機能マッピング腫瘍摘出術への応用

中里信和，隈部俊宏，鈴木匡子，佐藤清貴，吉本高志（東北大・医・脳神経外科）

(3) てんかん発作の進展に伴う MEG の変化

白石秀明（静岡東病院）

(4) 両側性に出現するてんかん棘波の EEG と MEG 所見の差の検討

山田康一朗（静岡東病院）

(5) 島回を発作焦点とするてんかんの一症例

西川将巳（東京大・医・神経内科）

(6) 嗅覚刺激による事象関連脳磁図の解析

外池光雄，山口雅彦（電総研・大阪）

(7) 嗅覚刺激による誘発脳磁図

佐久間研司，中島健二（鳥取大・医・脳神経内科）

柿木隆介（生理研）

(8) 味覚における脳磁場計測

斎藤幸子（生命研・人間情報）

(9) 運動イメージにおける MEG

小木曽徹也，杉下守弘（東京大・医・認知言語）

(10) 随意運動の脳内メカニズム，脳磁場計測および術後症状の解析

吉峰俊樹，谷口理章，二宮宏智，平田雅之，早川　徹（大阪大・医・脳神経外科）

(11) 視覚呈示された言語処理に関する脳磁界反応

砂盃尚子，竹内文也，平田恵啓，栗城真也（北海道大・電子研）

(12) 単語認知に伴う誘発脳磁場：左側頭部の活動におよぼす予期の効果

小山紗智子，渡辺昌子，中　大輔，柿木隆介（生理研）

(13) 日本語単語音声の聴取に伴う脳磁界反応

加藤和美（NTT 基礎研）

(14) 発話に伴う脳活動の計測

森　　健，竹内文也，平田恵啓，栗城真也（北海道大・電子研）

(15) 純音の offset に対する聴覚誘発反応

渡辺昌洋（NTT 基礎研）

(16) 背景脳活動の解析

長峯　隆（京都大・医・臨床脳生理）

(17) α 波の発生源について

井上　健（大阪大・医・精神医）

(18) 脛骨神経刺激体性感覚誘発脳磁場に対する触覚干渉刺激

中　大輔，Lam Khanh，Jing Xiang，小山紗智子，金桶吉起，柿木隆介（生理研）

(19) 体性感覚誘発脳磁界に対する視覚及び聴覚刺激の影響

Lam Khanh，柿木隆介（生理研）

(20) 脳磁図による聴覚及び体性感覚における interaction の検討

福島達臣，橋本　勲（生理研）

(21) 皮質性ミオクローヌスの MEG による分析

宇川義一（東京大・医・神経内科）

(22) 格子点移動法による磁場源推定

梶原茂樹（京都府医大・神経内科）

(23) 格子点移動法による SEF の磁場源推定

岩本一秀，大嶋英之（京都府医大・神経内科）

(24) 生理学研究所における micro-SQUID の現況

永田　治，金桶吉起，柿木隆介（生理研）

(25) Toward a theoretical understanding of the genesis of MEG signals

Y. Okada （Dept. Neurology & Physiology, New Mexico Univ.）

(26) 右第二趾受動運動による体性感覚誘発脳磁場

向　　敬（Xiang Jing）

柿木隆介（生理研）

(27) ヒト一次体性感覚野の同側入力と手の姿勢による modulation

中村昭範，山田孝子，阿部祐士，加藤隆司，伊藤健吾，加知輝彦，井形昭弘（長寿研・生体機能）

(28) ポップアウト刺激呈示における脳磁界計測

山口佳子（生命研・人間情報）

(29) 焦点調節関連 MEG

武田常広，遠藤博史，橋本佳三（東京大・工・計数工学）

(30) 色刺激と動き刺激による視覚誘発脳磁界

重藤憲史（九州大・医・臨床神経生理）

(31) 仮現運動刺激に対するヒト運動視中枢 (MT/V5) の反応特性

金桶吉起，文堂昌彦，柿木隆介（生理研）

参加者名

今田俊明（NTT 基礎研），湯本真人（東大病院・中検），外池光雄，山口雅彦，大嶋英之（電総研・大阪 LERC），岡村昇一（島津製作所），徳久愛花（京都大・文），加藤和美（NTT 基礎研），二宮宏智，平田雅之，谷口理章，加藤天美（大阪大・医），町井克行（東京大・医），木原泰三（アロカ㈱），中里信和（東北大・医），白石秀明（国療静岡東病院），山田康一朗，渡辺裕貴（国療静岡東病院），佐久間研司（小林病院），大原信司，國枝武治，大賀辰秀，当間圭一郎，長峯　隆（京都大・医），井上　健，水野由子，篠崎和弘，石井良平（大阪大・医），宇川義一，花島律子，寺尾安生，古林俊晃（東京大・医），西川將巳（国立精神神経センター），小早川達，斉藤幸子，山口佳子（生命研），武田常広（東京大・工），飛松省三（九州大・医），今井　真（京都大・医），森　　健（北海道大・電子研），川上　治（名古屋大・医），中村昭範（長寿研究），三輪隆子（国立療養者リハセンター），杉本　亨（豊橋成田記念病院），吉峰俊樹（大阪大・医），小木曽徹也（東京大・医），砂盃尚子（北海道大・電子研），高梨芳彰（京都府立医大），岩本一秀（大阪鉄道病院），重藤寛史，緒方勝也（九州大・医），渡辺昌洋（NTT 基礎研），梶原茂樹（島津製作所），内藤泰（京都大・医），阿部祐士（長寿医療研究センター），平野哲雄，山本孝徳，牧野雅弘（京都府立医大），江島義道（京都大院・人間・環境学），吉田佳一（島津製作所），苧阪満里子（大阪外大），中川和美（杏林大・医），加藤武司，峯山陽次郎（長寿研）

研究会概要

1991年に当時としては世界で最も大型かつ最新鋭の脳磁計が生理学研究所に設置された。それ以後，生理学研究所は本邦における脳磁図研究のパイオニアとして研究を展開してきた。1995年までは文部省科研費新プロの一環として，研究会あるいは国際シンポジウムを開催してきたが，その後は途絶えていた。しかし，本邦における脳磁図研究はその後確実な進歩をとげ，現在は世界で最も脳磁計保有台数の多い国となった。脳磁図を研究している各研究室の強い要請のもとに，今年度より生理学研究所研究会を行うこととなった。研究会には31題の演題が寄せられ，体性感覚，視覚，聴覚，味覚，嗅覚などの各種刺激に対する誘発脳磁場の基礎，高次脳機能，てんかん，臨床応用など幅広い分野の研究発表が行われた。通常の学会とは異なり，１題30分という十分な発表時間があり，極めて活発な討議が行われた。

(1)　MEG による電流源推定：非侵襲的方法との対比

飛松省三（九州大・医・臨床神経生理）

「目的」脳磁図 (MEG) は非侵襲的に脳内の電流源を推定する方法であり，その誤差は数 mm 以

内とされている。本研究では，1）MEG と皮質脳波 (ECoG) を同時記録して，てんかん棘波の位置，振幅，拡がりの程度と MEG の検出率との関連，2）脳外科疾患における術前評価としての MEG の有用性を検討した。

「方法」1）難治性側頭葉てんかん患者に硬膜下電極を置いて，発作間欠 ECoG と MEG を同時記録し，内側型と外側型での MEG の棘波検出率を検討した。2）脳外科手術時に視索近傍や後頭葉，頭頂葉から視覚および体性感覚誘発電を記録し，術前の誘発脳磁界と比較した。

「結果」1）側頭葉内側部のてんかん棘波は，MEG で検出できなかった。外側部の棘波の約60％は検出できたが，ECoG 棘波の振幅と皮質上分布の拡がりが重要な因子であった。2）MEG は一次視覚野や体性感覚野の電流源の位置推定には優れており，retinotopy, somatotopy が認められた。

「考察，結論」1）側頭葉内側部のてんかん焦点は MEG で記録されない場合がある。これは電流源が深部にあるか電流双極子が放線方向のためかもしれない。外側部のてんかん焦点は MEG で検出されるが，ECoG 棘波の振幅の大きさと皮質上分布に依存している。2）脳外科手術時の一次視覚野や体性感覚野の電流源の位置推定には優れており，MEG は術前評価検査として有用である。

(2) 脳磁図と覚醒下脳表電気刺激による機能マッピング腫瘍摘出術への応用

中里信和，隈部俊宏，鈴木匡子，佐藤清貴，吉本高志（東北大・医・脳神経外科）

脳腫瘍の摘出に際しては，eloquent cortex と呼ばれる一次運動野，体性感覚野，言語野などと，腫瘍との位置関係を正確に把握することが必要である。特に神経膠腫は浸潤度が高いため，術後の機能障害を最小限に抑えつつ，再発防止のため可能な限り拡大摘出するという難しい判断が要求される。

覚醒開頭下の脳表電気刺激による脳機能マッピングは，てんかんの外科手術に際して Penfield らが1940年代に開発した手法であり，高い信頼性をもつ。本法は一部施設において神経膠腫摘出術にも応用されているが，患者の協力が不可欠であり，意識障害を有する場合や小児での応用は困難である。さらに手術時のマッピング作業には時間的限界もある。あらかじめ術前に大脳機能を局在診断できれば，脳表電気刺激への依存度が減ると期待される。

今回は，まず MRI を用いた脳表在静脈と脳回・脳溝・腫瘍位置の重像画像による術野の simulation と，覚醒開頭下の脳表電気刺激による脳機能マッピングの実際を紹介する。その上で，脳磁図を用いた機能マッピングについて紹介し，脳磁図による術前の非侵襲的機能マッピングの有用性と現時点での限界について考察する。

(3) てんかん発作の進展に伴う MEG の変化

白石秀明（静岡東病院）

＜はじめに＞

てんかん患者における脳内の異常活動を評価する上で，日常我々は頭皮上脳波，特に発作時の脳波所見を重要な評価の材料としている。殊にてんかん原性焦点が想定される症候性部分てんかんの診断においてその発作起始部を特定することは，その治療法の選択の上で重要な情報となる。今回我々は，発作時における脳磁場活動を測定することにより，脳内の異常活動を表出することを試みた。

＜方法と結果＞

MEG の測定と解析は BTi 社製 Magnes（37チャンネル一次微分型 SQUID センサー）を用いた。あらかじめ想定されているてんかん原性焦点上に SQUID センサーを起き，その発作発現様式，進展過程を測定した。52名の症候性部分てんかん患者において，発作起始部からの脳磁場活動が捉えられ，その内訳は前頭葉てんかん (FLE)35名，側頭葉てんかん (TLE) 9 名，後頭／頭頂葉てんかん (O/PLE) 8 名であった。磁気発生源の局在化 (magnetic source localization: MSL) を行い，てんかん発作の始まりより磁場活動の変化を評価した。発作間けつ時の MSL に比し，その活動焦点が発作起始部において集積傾向を示したものは27例で，主に大脳皮質表層にてんかん原性焦点を持つものに多く，その発作起始部の集積位置は，硬膜外脳波所見やてんかん原性が予想される器質病変とよく相関した。逆に発作起始部においてむしろ MSL が拡散する傾向にあったものは 9 例で，側頭葉の内側構造を起始とする内側型側頭葉てんかんをはじめとして，深部にてんかん原性焦点が予想されるものであった。

＜結論＞

症候性部分てんかん患者においてでんかん原性を決定する上で，発作時の MEG 測定による MSL は有効な情報源となり得，積極的に施行すべきと考えられた。

(4) 両側性に出現するてんかん棘波の EEG と MEG 所見の差の検討

山田康一朗（静岡東病院）

症候性部分てんかん（以下 SPE）は成人のてんかんの大部分をしめるものであり，我々の日常的な臨床場面において，脳波・脳磁図同時記録を施行する対象となる患者の多くがこれにあたる。その定義は脳の一部のてんかん原性を有する異常がひきおこすてんかんとされるものであるが，これらの患者の一部には脳波でも脳磁図でも両側性のてんかん性異常波が示されることがし

ばしば認められる。これらの患者群におけるてんかん波の出現の特徴について検討したので報告する。

対象は当院入院あるいは通院中に脳波・脳磁図同時記録を施行したSPEの患者で，その内訳は前頭葉てんかん5名，側頭葉てんかん5名であった。てんかん原性局在の判定は臨床症状および画像診断，脳波などの所見ををふまえておこなった。これらの症例について，脳波および脳磁図それぞれの発作間歇時てんかん波（以下IID，主として棘波）出現の左右のlatencyを，また，焦点側の脳磁図と脳波のIIDのlatencyをそれぞれ計測した。その結果，前頭葉てんかんにおいては，焦点側に遅れて対側に出現するIIDは脳波とほぼ等しいlatencyをもって出現する傾向があった。また，側頭葉てんかんにおいては，焦点側の対側では波形上は焦点側と同様の棘波を呈するものの有意なdipoleは得られないか，もしくは，dipoleは得られるものの焦点側と全くindependentに活動性を有しているという傾向があった。これらの特徴はそれぞれの部位における解剖学的な違いから生じていることが推測された。

(5) 島回を発作焦点とするてんかんの一症例

西川将巳（東京大・医・神経内科）

症例：22歳女性。咽喉頭部異常感を主診に来院。当初，身体症状を伴う適応障害（心身症）が疑われ，治療されていたが，その後，EEGにおいて，右側頭部誘導に限局する棘波が認められた。MRI, CT所見は正常であり，特発性右側頭葉てんかんと診断された。carbamazepine投与による治療の後，現在症状は消失し，EEG所見も改善している。

機能画像解析結果：MEGにより，この症例における棘波の発生源は，右大脳半球の島回に推定された。さらに，PETにより，発作間欠時における同部位でのグルコース代謝率の低下が認められた。

考察：MEG, PETの結果より，本症例は，島回を責任病巣とするてんかん発作であると考えられた。内臓知覚の中枢が島回であるというPenfieldらの結果と抗てんかん薬が有効であったことを考え合わせると，本症例の症状はてんかん発作によるものと考えられた。

(6) 嗅覚刺激による事象関連脳磁図の解析

外池光雄，山口雅彦（電総研・大阪）

人間の嗅覚や味覚の機能に関する脳内情報処理は，刺激の難しさなどが原因で研究が遅れ現在

も未解明の状態にある。我々はこれまでに，ニオイガスを被験者の鼻腔内に注入刺激し，頭皮上から嗅覚誘発電位を記録しその解析を行ってきた。しかし計測された嗅覚誘発電位からそれらの起源や脳内の活動部位を正確に求めることは困難であった。そこで，122チャンネル全頭型脳磁計 (Neuromag-122) を用いて嗅覚刺激に対する脳磁界応答を計測し脳磁図の解析を行った。この実験では誘発電位計測と同様に呼吸同期式の吹き付け (blast method) による嗅覚刺激法を用いて，一種類のニオイをランダムな提示で左右どちらかの片側鼻腔に 300msec 間パルス刺激し，計測された脳磁図から脳内の活動部位を求めた。一方，無臭空気刺激に対する応答を記録し，ニオイ刺激に対する脳磁界応答との比較・弁別を行った。また，二種類のニオイを用いたオドボール課題による脳磁図実験を新たに実施し，被験者がターゲットのニオイに注目して刺激回数を数えた時の脳磁界応答を計側解析した。これら一連の実験と解析の結果，無臭空気刺激やニオイの吹き付けにより対側の側頭部体性感覚野に推定され三叉神経活動と思われる応答（潜時：約270msec)，左右の前頭部眼窩野に推定され嗅覚神経活動と思われる応答（潜時： 350msec)，更に上側頭部の前後２ケ所に新たに推定されニオイの認知に関与すると思われる応答 (latency: 約570msec) を時系列に添って求めることができた。嗅覚刺激によるこれらの事象関連脳磁図実験と解析結果から，人間の嗅覚の知覚・認知機構と脳内情報処理について論ずる。

(7) 嗅覚刺激による誘発脳磁図

佐久間研司，中島健二（鳥取大・医・脳神経内科）
柿木隆介（生理研）

対象は14例の嗅覚正常な健常成人（女性４例，男性10例)。吸気相と同して，ニオイ刺激または無臭空気刺激をランダムに発生した。刺激は左鼻前庭り約 1cm 挿入した内径 1mm のプラスティックチューブを介して以下の条件下で提示した。ニオイ刺激物質はアミルアセテートを用い，刺激持続時間は 100ms，解析時間は刺激開始後 1000ms，加算回数はニオイ刺激および無臭空気刺激を各々50回，脳磁図記録は２台の BTi 社製37チャンネル脳磁計 (Magnes) を使用した。単一双極子推定では第１の Component (1M) が９例全例に見られ，第２の Component (2M) は５例にみられた。1M の潜時は 322 ± 69ms (255-406ms), 2M の潜時は 626 ± 57ms (540-685ms) に認められた。1M の ECDs は９例中５例では Sylvius 裂上部の頭頂葉に見られ，残りの４例では側頭葉上部皮質に左右対称に認められた。2M の ECDs もまた，Sylvius 裂上面に位置していたが，1M と比較するとやや深部に位置していた。BESA を用いた解析では両側のＳⅠおよびⅡに反応がみられ扁桃体のやや外側部での活性もみられ，嗅覚の解剖学的特徴との関連が見られた。

(8) 味覚における脳磁場計測

斎藤幸子（生命研・人間情報）

我々は刺激の立ち上がり俊敏な味覚刺激装置を開発し，味刺激で誘発される脳磁場 (MEG) を計測し，次のことを検討してきた。

1）人間の第一次味覚野 (Area G) が弁蓋部の内側と島の移行部に存在した。これはマカク猿で得られている領野に類似しているが，詳細にはそれより後方にあり，マカク猿では前頭弁蓋部と島の移行部であるのに対し，人間では頭頂弁蓋部と島の移行部であった。

2）舌の1側を刺激して，Area G における味再現の laterality について検討した。例数が少ないが，両側性に GEM が記録された。

3）異なる濃度及び味質（甘味と塩味）に対する味覚誘発磁場と反応時間 (RT) の計測に基づいて，受容器から大脳に至る味覚受容の時間的過程について検討を行った。その結果，NaCl 濃度が 0.1, 0.3, 1M と増大するにつれて，RT は短くなるが，Area G に於ける GEM onset latency は変わらない（但し，推定された Area G の振幅は濃度増大に伴って増加する）ことを観察した。また，等しい強度の甘味と塩味とでは，RT は甘味の方が長い傾向がみられ，GEM onset latency は甘味の方が有意に長かった。RT-GEM onset latency は Area G の活動以降，皮質間連絡による高次過程後の運動の実行には異なる味刺激に対して同じ時間を要すると仮定すると，異なる味刺激に対する RT-GEM onset latency の時間の相違は高次過程における皮質間連絡の時間的相違を反映すると考えられる。高次過程における皮質間連絡に要する時間が濃度や味質で変わるかについて更なる実験を行っている。

(9) 運動イメージにおける MEG

小木曽徹也，杉下守弘（東京大・医・認知言語）

（目的）スポーツ選手らによって行われる運動イメージは，運動スキルの向上に効果があると言われている。これまで，運動イメージ中の脳内活動の研究の多くは，脳内血流変化を測定する陽電子放射断層法 (PET) などの装置を用いて行われてきたが，これらの装置は時間分解能が不十分である。そこで本研究では，時間分解能に優れた脳磁図 (MEG) を用い，運動イメージ中の頭頂連合野および補足運動野の皮質活動を，その時間的変化とともに解析した。これらの部位に注目した理由は，PET などを用いた研究で，運動イメージ中には補足運動野の活動が認められており，また，頭頂連合野は運動計画の空間的側面への関与が指摘されているからである。

（方法）被験者は6名で，そのうち1名は2度測定を行った。被験者は，磁気遮断した部屋の

中で開眼・腹臥位となり，運動イメージ・コントロールの各条件で課題を遂行した。運動イメージ条件において，被験者は聴覚刺激の開始後，直ちに自らがハードルを跳ぶイメージを，実際の運動感覚を持ち自己中心野で行った。コントロール条件において，被験者はイメージを行わなかった。37チャンネルのMEGを用いて記録された脳磁場は，加算平均された。電流双極子の位置は，各被験者の磁気共鳴画像(MRI)に投影し，正確な場所を特定した。

（結果と考察）運動イメージ条件の刺激開始後200msまでは，聴覚刺激のみのコントロール条件との波形の比較より，その大部分が聴覚反応であると考えられた。運動イメージ条件において，潜時約220msで頭頂連合野内側部の前楔部に，相関係数0.95以上の電流双極子が認められたが，コントロール条件では観察されなかった。以上のことから，約220msでの頭頂連合野内側部の電流双極子は，運動イメージに関する脳の活動を示していると考えられる。ある被験者では，前楔部の活動後，補足運動野の活動が認められた。この被験者は2度測定を行ったが，2度とも同様の結果を得た。サルにおいては，頭頂連合野内側部が，補足運動野・運動前野上部と相互に神経線維で結ばれているという報告もある。これらの結果より，頭頂連合野内側部は運動イメージ開始に必要な空間情報を提供することが示唆された。

(10) 随意運動の脳内メカニズム，脳磁場計測および術後症状の解析

吉峰俊樹，谷口理章，二宮宏智，平田雅之，早川　徹（大阪大・医・脳神経外科）

浸潤性腫瘍摘出のため，一側の補足運動野(SMA)や運動前野(PM)の一部が切除された患者について術後の運動機能ならびに運動関連磁界を解析した。健常被験者および上記患者において手指伸展運動により発生する運動関連磁界を64チャンネル全頭型MEGシステム(CTF Systems)により計測した。約3秒以上の間隔をあけて任意のペースで行った100回の示指伸展運動時の脳磁界を筋電図ないしLEDスイッチによるトリガーを用いて記録し，平均加算した[1]。健常被験者では運動開始約500ms前より運動準備磁界(RF)が出現し，49.2 ± 16.0ms前に運動磁界(MF)のピークがみられた[1]。MFを2 dipole modelで解析すると両側大脳半球にそれぞれ1個の信号源が推定された。一側SMAないしSMA + PM切除患者では術直後には純粋な運動麻痺とは異なった手指巧緻運動の障害がみられたが[2]，1－2週後にはこの症状は消失し日常生活に支障がみられなくなった。しかし，急速変換運動の拙劣，系列運動の障害などの興味ある運動症状が残存した。これらの患者の運動関連磁界を計測すると等磁界図は健常被験者のそれと大きく異なり，RF出現から運動開始までの時間は約800msと延長し，MFは明らかなピークを示さなかった。2 dipole modelでは信号源の推定ができなかった。一側のSMAないしPM切除患者では術直後の随意運動障害はほとんどが速やかに回復したが，主に時間軸上の障害が長期にわたって残存し，運動磁界も健常者とは大きく異なった。前頭葉運動関連領野切除後の随意運動の障害とそ

の部分的機能代償機序について考察する。

(11) 視覚呈示された言語処理に関する脳磁界反応

砂盃尚子，竹内文也，平田恵啓，栗城真也（北海道大・電子研）

視覚呈示された言語の脳内処理，特に「単語としての意味理解 (lexicosemantic)」過程に関わる活動を抽出することを目的として，時空間分解能に優れた SQUID 磁束計を用いて脳神経活動を計測し，MR 画像に重ねて検討した。被験者は右利きの 9 名である。被験者は，新聞雑誌の頻出語から選出したかな3文字の単語が，具象語であるか抽象語であるかをすばやく判断し，左手のボタン押し分けによって回答した。左右側頭上で脳磁界応答を計測し，単語呈示とボタン押しのそれぞれに同期させて加算平均した。その結果，言語処理に関わると思われる活動と運動に関わると思われる活動を別個に捉えることができた。言語処理に関すると思われる活動は単語呈示後 200 ～ 550msec で観察された。今までの研究から，3 文字単語の「視覚認知」過程は単語呈示後 150 ～ 250ms で行われ，高次視覚野に属する脳底部に活動源が推定された。本研究では，単語呈示後 350-550msec において，被験者によって異なるが平均 2 ～ 3 のピークが観察された。さらに，これらのピークのなかで，被験者に共通する活動源は左上側頭溝中部～後部付近であった。これは言語の「音韻変換」過程や「単語としての意味理解」過程を反映していると推察する。

(12) 単語認知に伴う誘発脳磁場：左側頭部の活動におよぼす予期の効果

小山紗智子，渡辺昌子，中　大輔，柿木隆介（生理研）

単語認知に関与する脳部位を検索するために正常被験者（右手利き11名）の両側の側頭部から誘発脳磁場を記録した。各試行，四字熟語を前半 (S1) と後半 (S2) に分けて提示し，その組み合わせが正しい True 条件（例，二束－三文，110組），誤っている False 条件（例，二束－方正，110組）を設けた。被験者には S1 が提示されたら四字熟語全体を想起するように教示した。左側では，8 名の被験者において，S1 および False S2 に対して刺激提示後 350-450ms に明確な成分が認められた。この成分は True S2 に対しては認められなかった。活動源推定を行った結果，シルビウス裂周辺に推定された。右側からの記録では被験者間で一貫した条件差は認められなかった。被験者は True S2 を予期することは可能だか，S1 および False S2 を予期することはできない。従って，被験者の予期との一致によって単語認知に伴うシルビウス裂周辺活動が減少することが示唆された。

(13) 日本語単語音声の聴取に伴う脳磁界反応

加藤和美（NTT 基礎研）

122チャンネル全頭型脳磁界計測システムを用いて，日本語３モーラ音声を聴取した時に誘発する脳磁界を計測した。被験者は６名で，右耳に音声を呈示し音声が有意味単語であるか，無意味単語であるかを判断する語彙判断課題（左手人差し指によるキーの押し下げによる反応）と，刺激に注意を向けない読書課題を与えた。１モーラ目の立ち上がり時点をトリガーとした平均加算では，読書課題では６名とも左側頭部では１モーラ目の立ち上がり後平均 112.9ms で N1m が見られたが，３モーラ目以降には大きな反応は見られなかった。

一方，語彙判断課題では６名とも１モーラ目の立ち上がり後に，平均 111.4ms で N1m および２モーラ以降にも大きな反応が見られた。平均正答率は97％，平均反応時間は３モーラ目の立ち上がり時点から 389ms であった。さらに，語彙判断課題においては３モーラ目の立ち上がり時点をトリガーとした平均加算波形の解析を行った。音声の３モーラ目後，平均 109.5ms で N1m ピークが被験者全員に見られ，この反応は反応時間まで持続した。この３モーラ目以降の反応について，単一ダイポールモデルによって左側頭部の活動部位を推定した。その結果，６名中５名について活動部位が側頭葉ヘッシェル回に推定された。

(14) 発話に伴う脳活動の計測

森　　健，竹内文也，平田恵啓，栗城真也（北海道大・電子研）

人間の発話プロセスを調べる目的で，発話に伴う脳活動の計測を行った。計測には 19ch SQUID 磁束計を用いて，時間的な脳磁界の変化について検討した。発話の指示手段に，３色の LED （赤黄青）を用いた。LED は１～1.5秒間隔で，いずれかが点灯する。被験者には，どの LED が点灯しても「あかい」と発話する一単語課題と，点灯した LED の色（「あかい」「きいろ」「あおい」）を発話する三単語課題を行わせた。マイクで発話音を取り込み，その立ち上がりを発話開始時とした。左前側頭部に磁束計を配置して脳磁界反応を計測した。発話開始時を基準として150回の加算平均を行った。その結果として，一単語課題と三単語課題の双方において発話開始前 100ms から開始後 500ms 付近に反応（脳磁界振幅のピーク）が得られた。４人中１人の被験者で，三単語課題の開始前 300ms 付近に一単語課題にはない反応が見られた。この被験者に対して，加算回数を300回に増やして同様の実験を行ったところ，前頭葉後下部に推定された。そこで，この反応に着目し，次の実験を行った。発話させる単語として，４から８までの５つの数を用いた。被験者に，900ms おきの黄色の LED の点滅にあわせて数を暗唱で数えさせ，３

色同時に点灯すると，その時点の数を発話するように指示した。発話開始時を基準として200回の加算平均を行った。その結果として，発話開始前 300ms から開始後 500ms 付近に反応が得られた。開始前 200ms 付近の反応について信号源推定を行ったところ，これまで 2 人の被験者において前頭葉後下部に推定された。

(15) 純音の offset に対する聴覚誘発反応

渡辺昌洋（NTT 基礎研）

呈示時間の異なる刺激純音A，B（周波数 1 kHz, 78 dB SPL）を 4 人の被験者の左耳にランダムな順番で呈示した。刺激音 A の呈示時間，直前の interstimulus interval は一定とし，刺激音 B の呈示時間を変えて，122チャネル全頭型脳磁界測定装置を用いて誘発磁界反応を計測した。刺激音 B に続いて呈示された刺激音Aの offset に対する N1m 反応の右側頭部での最大ピーク振幅は，直前の刺激音 B の呈示時間が長くなるほど有意に大きくなった ($F(2,9) = 13.2$, $p<0.003$) が，ピーク潜時には有意差はなかった。

(16) 背景脳活動の解析

長峯　隆（京都大・医・臨床脳生理）

運動野にみられるα波帯域の活動は，連続記録において優位な律動性を持たない場合でも，周波数を絞った TSE (Temporal Spectral Evolution) 解析をすることにより，運動準備状態において脱同期化することが明らかにされる。α波帯域の脱同期化は，自発運動の開始時点に約 3 秒先行して両側運動野と後頭部にみられるが，20 Hz 帯域では運動野に限局する。この脱同期化は，随意的筋収縮時のみでなく随意的筋弛緩時にもみられ，その部位は，被験者間の変動は多いが，同一被験者においては筋収縮，弛緩時ともに同じ部位にみられる。反応を課す CNV 課題においては，S1 選択，S2 選択課題のいずれにおいても，運動の直接遂行のない S1 に関連して，運動野に脱同期化がみられる。背景脳活動の解析により，運動の準備，遂行における運動野の役割の推定が可能である。

(17) α波の発生源について

井上　健（大阪大・医・精神医学）

アルファア活動にはいくつかの成分があり，それぞれ周波数，分布，ふるまいなどが異なると考えられている。脳波の電位分布の時間的動きを速度ベクトルでとらえる“ポテンシャル・フロー“を用い，「周波数の遅い」，「中間の」，「速い」アルファア活動で電位分布の移動に，それぞれ特徴的なパターンがあることを，われわれは報告した。脳磁図でも2ー3種類のアルファア活動が指摘されている。そのような活動の電流双極子のより的確な推定には動態を調べ先見的な知識を増やすことが必要であろう。アルファア活動の磁場分布の時間的な動きをポテンシャル・フローで検討した。正常被検者10名で，64チャンネルのヘルメット型脳磁計にて安静閉眼時の脳磁図を測定した。各チャンネルでパワースペクトルを求め，全チャンネルを重ね合わせると，アルファア帯域には，8-9（遅い），10（中間），11-12Hz（速い）に合計3つのピークが認められた。被検者ごとにそれぞれのピーク周波数，帯域幅に合致する帯域通過フイルタを設計した。各帯域において各時点ごとに磁場分布を推定し，30×30の格子点からなる2次元平面上で速度ベクトルを求めた。一つ一つの波の頂点・谷間振幅を計測し作成した磁場分布のパターンは帯域によりことなり，多くは後方領野で左右に振幅の高い領域が数ケ所みられた。全チャンネルにおける磁場の相関行列ではそれらの左右の部位で負の高い相関係数がえられた。ポテンシャル・フローで，らせん状，前後，左右の方向に磁場分布が時間的に移動し，それに対応して電流双極子も継時的に方向を変えると想定された。以上勘案すると，各帯域において複数の電流双極子が考えられ，それらの固定，移動，回転を考慮する双極子モデルが適当であろう。

(18) 脛骨神経刺激体性感覚誘発脳磁場に対する触覚干渉刺激

中　大輔，Lam Khanh，Jing Xiang，小山紗智子，金桶吉起，柿木隆介（生理研）

【目的】脛骨神経刺激による体性感覚誘発脳磁場(SEF)に対する触覚刺激の干渉作用について検討した。【方法】11名の健康成人を対象に，次の4条件下でSEFを記録した。（1）Control（触覚刺激なし），（2）電気刺激と同側の足底に触覚刺激，（3）対側の足底に触覚刺激，（4）同側の手掌に触覚刺激。【結果】刺激同側の足底に触覚刺激を与えた際，1M（潜時37ms）・2M(45ms)・4M(75ms)成分に有意な振幅の減少が，また刺激対側の足底に触覚刺激を与えた際，3M(50ms)成分にのみ有意な振幅の増大が認められた。【考察】これらの現象は第一次感覚野（3b野）での末梢神経刺激と触覚刺激の相殺作用，およびposteriorparietal cortexなどのintercerebral interactionが関与しているものと考えられた。また脛骨神経刺激による信号は主として

皮膚触覚線維を上行することが示唆された。

(19) 体性感覚誘発脳磁界に対する視覚及び聴覚刺激の影響

Lam Khanh，柿木隆介（生理研）

サルでは感覚連合野（5野，7野）の1部の細胞は，体性感覚刺激のみなず，視覚，聴覚刺激に対しても反応する。脳磁図を用いてヒトにおける体性感覚視覚，聴覚間の相互作用について検討した。正中神経を刺激し，Cartoon, Dot（スクリーンに映写されるアニメーションあるいはランダムドット運動をる）Music（ショパンのピアノ曲を聞く）の3条件での波形をコントロール（眼前の1点を凝視）と比較した。初期成分には変化は無かったが，中潜時成分はCartoonとDot条件で振幅の増大が見られ，前者で顕著であった。また刺激同側の中潜時成分（SII起源）はいずれの条件でも消失あるいは振幅が低下した。以上の結果より，相互干渉作用の存在が示唆された。

(20) 脳磁図による聴覚及び体性感覚における interaction の検討

福島達臣，橋本　勲（生理研）

目的：脳磁図の利点は時間的な分解能に優れることである。体性感覚情報処理過程における聴覚刺激の interaction について，聴覚刺激を先行させ，体性感覚誘発磁界 (SEF) への影響を検討した。
方法：右利き健常者12例を対象とした。右正中神経を手首にて電気刺激すると共に，右耳をclick 音にて刺激した。Click 音を同時刺激または 50ms, 100ms, 200ms, 300ms 体性感覚刺激に対し先行刺激し，37channel 脳磁図記録装置2基（Bti 社，MagnesTM）を用い，体性感覚誘発磁界を記録し，統計的に検討した。
結果：SEF のすべての成分に変化がみられたが，click 音同時刺激より，click 音先行刺激の方が変化が大きく，4M, 5M，及び同側 4M 振幅に有意な差がみられた。
考察：体性感覚と聴覚の interaction は SEF への影響から明らかであるが，そのメカニズムの1つとして先行刺激に対する注意の set や reset が関連している可能性が考えられる。

(21) 皮質性ミオクローヌスのMEGによる分析

宇川義一（東京大・医・神経内科）

目的：皮質性ミオクローヌスの病態生理を解明するために，脳磁図(MEG)を用いて，ミオクローヌスに先行する棘波(pre-myoclonus spike: PMS)の発生源の分析を試みた。

対象・方法：皮質性ミオクローヌス患者8例（ミオクローヌスてんかん5例，低酸素脳症1例，シアリドーシス1例，ロシア春夏脳炎1例）を対象とし，jerk-locked averaging法により分析した。

結果：巨大SEPを呈しlong loop reflex (LLR)が認められた6例中5例ではPMSが感覚野起源であり，ミオクローヌスは感覚野の異常発火に引続いて出現していると考えられた(sensory cortical reflex myoclonus)。残りの1例ではPMSは感覚野，運動野の両者から発生した活動の合成と考えられた(sensori-motor cortical reflex myoclonus)。巨大SEPを呈さずLLRが認められた1例では，LLRがあるにも関わらず，PMSは運動野起源であった(motor cortical reflex myoclonus)。spontaneous myoclonusのみを呈した1例ではPMSは運動野より発生した(spontaneous motor cortical myoclonus)。

結論：皮質性ミオクローヌスには，その発生機序から考えると上述の4種類またはそれ以上のタイプがある。

(22) 格子点移動法による磁場源推定

梶原茂樹（京都府医大・神経内科）

格子点移動法(Moving Mesh Method: MMM)では，数値計算上の技法として制限付き最小自乗法(Constrained Least Squares Method: CLSM)を使い，設定磁場の位置（格子位置）を移動しながらマルチダイポールの推定を行う。CLSMは，劣化した観測画像から元画像を復元する画像復元の分野において研究されてきた正則化法の1手法で，観測データへの忠実度と元信号の滑らかさを適切なランスの元で最小化することにより，雑音による復元の不安定性を緩和できる手法である。しかし，CLSMによる推定結果は，画像復元問題においては輪郭のボケを生じ，生体磁気逆問題においては推定磁場源の局在性が弱いという欠点を生じる。この欠点を除く工夫として，MMMでは，スプライン関数のあてはめにおける節点決定に関して提案された逐次分割法を参考に，マルチダイポールの位置を段階的に変化させていく。すなわち，まず粗いメッシュ分割CLSM解を求める。その解の中で大きいモーメント強度をもつダイポールに対応するメッシュ点の近傍をより細かく分割するため，小さいモーメント強度のダイポールに対応するメッシュ点を移動する。次に，その新たなメッシュ点分割に対して，再びCLSM解を求める。以後，計測磁

場と推定磁場の自乗誤差が最小になるまで同様の操作を繰り返す。格子点移動法により得られる結果からは，磁場源の広がりを把握することが可能である。また，磁場源の数に関する事前情報がなくても，複数の磁場源を分離して推定することができる。

(23) 格子点移動法による SEF の磁場源推定

岩本一秀，大嶋英之（京都府医大・神経内科）

脳磁計の誘発脳磁場への応用により，感覚刺激により活性化された大脳皮質の位置を推定出来るようになった。しかし，従来のダイポール推定を行っても活動している大脳皮質の拡がりはわからない。梶原らは拡がりのある電源を推定する方法として格子点移動法を提案し，その有効性をファントムを用いた実験やシミュレーションにより示してきた。生体より得られた体性感覚誘発磁場 (SEF) のデータ解析に格子点移動法を用い，1 推定位置，2 N20 の拡がり，3 モーメントの大きさと拡がりの関連について検討した。SEF は正中神経を手関節部で刺激し，対側の側頭部より記録した。刺激法等は従来の方法に準じて行った。格子点移動法についての詳細は省略。1 推定位置についてはダイポール推定で得た位置とほぼ一致した。2 N20 のピークについてその拡がりの推定されたものすべてを表示すると，"感覚的"な評価としては広すぎる結果となった。N20 のモーメントは 7.9 ～ 21.0nAm であった。そこで，推定された結果の表示に閾値を設定したところ，体積は 250 から 7740mm^3 となり，従来のデータと比較するために面積に換算すると 40 ～ 391mm^2 となった。モーメントが 5nAm の場合 25mm^2 の面積（Hari らの試算）や 4nAm の場合 10 ～ 100mm^2 の面積 (Okada のデータから久宝らが試算) にほぼ一致する値となった。3 被験者の左右で比較すると必ずしもモーメントの大きさと拡がりは一定の関係がなかった。

(24) 生理学研究所における micro-SQUID の現況

永田　治，金桶吉起，柿木隆介（生理研）

我々は，ヒトから動物，組織標本まで幅広い分野に応用できる高分解能生体磁場計測装置を導入した。現在機器の最終調整中であり，年内にも実験に使用される予定である。主な仕様は以下のとおりである。

センサーは12個の SQUID と一次微分型のピックアップコイルからなる。FLL は 50kHz で DC バイアスを使用している。コイルの直径は約 3.3mm で，中心間距離 6mm にて 3 × 4 の行列に配置されている。ベースラインは 19mm である。ピックアップコイルの底部とデュワーの外側面

までの距離は約 5mm である。

(25) Toward a theoretical understanding of the genesis of MEG signal

Y. Okada (Dept. Neurology & Physiology, New Mexico Univ.)

The contributions of various types of currents in the soma and dendrites of the pyramidal cells to MEG and EEG signals are examined in light of modern concepts of the dendritic and somatic eletrophysiology. The discoveries of active, voltage-and calcium-dependent conductances and the existence of various types of ligand-gated conductances in the past twenty years necessitate a re-examination of the physiological basis of EEG signals.

The genesis of MEG signals must also be examined in the same framework.

We have evaluated the contributions of two ligand-gated channels (AMPA-and NMDA-channels) and six voltage-sensitive conductances (gNa, gK(DR), gk(A), gca, gK(C), and gK(AHP)), as well as the excitatory connections to MEG and EEG signals in a longitudinal CA3 slice preparation. Various channel blockers were bath-applied and their effects on the MEG and EEG (field potential) were measured.Both poly-and mono-synaptic excitatory connections play important roles in shaping the MEG and EEG waveforms of evoked and spontaneous responses. AMPA-channels, but not NMDA-channels, are important in synchronization of population spikes. NMDA-channels affect the slowly varying responses lasting 100-1000ms. gNa is important in initiating well-synchronized population spikes. The slower waves corresponding to the frequency range 2-50 Hz are due, in large part, to gca and various potassium currents. These conclusions from experimental results are supported by comparisons of empirical data with theoretical waveforms calculated with a realistic neuro-network model of Roger Traub.The program of research summarized here is making a steady increae in our understanding of the genesis of MEG and EEG signals in the framework of the modern concepts of CNS neurons and neuronal network.

(26) 右第二趾受動運動による体性感覚誘発脳磁場

向　　敬（Xiang Jing）
柿木隆介（生理研）

筋・関節線維を上行する成分の脳内受容過程を検索するために，10名の正常者を対象として，右第二趾受動運動による体性感覚誘発脳磁場 (SEF) を記録した。SEF では潜時 100ms 以内に 1M, 2M, 3M, 4M という 4 つの成分が記録された。3M と 4M は 2 つの頂点を有する大きな電位として記録され，3M-4M の振幅は 1M と 2M よりも有意に大きかった。いずれの成分も刺激対側の足の感覚野付近に双極子が推定されたが，1M と 2M の位置は 3M と 4M に比し有意に下位に推定された。したがって，1M と 2M は筋・関節線維の受容野である 2a 野あるいは 4 野が起源で，3M と 4M はその活動が 3b 野あるいは 4 野に伝搬して出現したと考えた。

(27) ヒト一次体性感覚野の同側入力と手の姿勢による modulation

中村昭範，山田孝子，阿部祐士，加藤隆司，伊藤健吾，
加知輝彦，井形昭弘（長寿研・生体機能）

左右の手を交差させ，手を捻った状態で胸の前で指を組むと（捻り手），指の左右の同定が困難になることは子供の頃の遊びで体験している。この一種の錯覚現象は，目を閉じても生じることより，手の姿勢が体性感覚の情報処理，特に左右の情報の統合に何らかの影響を及ぼしているのではないかと考え，手の姿勢が対側及び同側の体性感覚誘発磁界 (SEF) に及ぼす影響を検討した。対象は健常成人14名（男10，女 4，19－37才，全員右利き）。右示指を air-puff による tactile stimulator を用いて刺激し，C3 及び C4 （国際10－20法）を中心にセンサーをあて (BTi, 74-channel dual head system) 手の姿勢を様々に変えながら SEF を記録した。刺激対側では，手の姿勢に関係なく頂点潜時約 45ms の誘発磁界 45Mc が誘発され，対側の手の一次体性感覚野が発生源と考えられた。刺激同側では，両手を離した状態では潜時 80ms 以内の反応は認められなかったが，「捻り手」の状態にすると，ほとんどの被検者で潜時約 60ms をピークとする 60Mi が明瞭に誘発された。右手刺激により誘発される 60Mi の発生源は，左手刺激により誘発される 45Mc の発生源と非常に近接した位置に推定され，同側の手の一次体性感覚野が発生源と考えられた。60Mi の導出率，及び振幅は，手の姿勢によって大きく変化し，両側の手掌が離れているとほとんど誘発されず，接触していると効率よく導出された。60Mi の潜時は 45Mc 潜時より約 17ms 遅延しており，Cross-stimulation の可能性は完全に否定できないものの，脳梁を介しての連絡による同側反応の可能性が示唆された。

(28) ポップアウト刺激呈示における脳磁界計測

山口佳子（生命研・人間情報）

同じ属性を持った多数の視覚刺激の中で，１つだけそれらと属性の異なる刺激が含まれていると，その刺激要素は非常に目立つ。このような現象はポップアウト(pop-out)と呼ばれ，並列処理と逐次処理の2過程を有すると考えられている視覚情報処理のメカニズムを理解する上で，また，受動的・能動的の２つの側面を持つと言われている視覚的注意過程を理解する上で重要な現象の一つである。本研究では，全頭型SQUIDシステムを用いた脳磁界解析によってポップアウト現象の脳内過程の検討を試みた。実験には３つの刺激：色ポップアウト刺激，方向ポップアウト刺激，一様刺激を用いた。ポップアウト刺激と一様刺激とを比較すると，刺激提示後200ms～270msの潜時で，誘発脳磁界に差が見られた。また，差の見られた潜時は色条件よりも方向条件の方が約30ms遅かった。差の見られた潜時での等磁界線図から脳活動源を推定した結果，一様刺激の場合は側頭葉下部に活動が見られたのに対し，ポップアウト刺激の場合は側頭葉下部に加えて頭頂葉後部あたりの活動も推定された。頭頂葉後部は，ポップアウト刺激が引き起こす空間的注意に関わる処理を行っていると考えられる。

(29) 焦点調節関連 MEG

武田常広，遠藤博史，橋本佳三（東京大・工・計数工学）

全頭型MEG装置と眼の焦点調節を刺激し反応を記録する装置を用いて，人間の焦点調節制御に関連する脳磁図を計測した。焦点調節反応は刺激開始後0.3sより始まったが，それに対して，それぞれ0.1および0.2s先行して同期性の良い特徴的な大きな反応を見つけた。種々の対照実験から，第2の同期反応である視覚刺激後0.2sの反応が，焦点調節に関連する反応であることを確認し，その２つの発生源を頭頂後頭溝底部近傍に同定した。

(30) 色刺激と動き刺激による視覚誘発脳磁界

重藤憲史（九州大・医・臨床神経生理）

目的：色覚と動きの情報は並列的に処理されている。そこで，大脳皮質において（A）色に特異的な反応を示す電流源の有無を検討するために黄－黒および赤－緑の格子縞提示刺激を，また

（B）動き刺激に反応する電流源の有無を検討するために仮現運動刺激を行い誘発脳磁界を測定した。方法：（A）正常視力の健常者5名を対象とした。半側の視野（8度）に視角50分の黄－黒（コントラスト81%）および赤－緑（コントラスト12%）の格子縞を200 msec提示した。また2名でコントラススストの影響を検討した。（B）正常視力の健常者9名を対象とした。視角50分の格子縞を1 Hzで反転させる刺激と視角1度の正方形を対角線上に1 Hzで交互に表示する仮現運動刺激を行い比較した。視覚誘発脳磁界(VEFs)および視覚誘発電位(VEP)を同時記録し，得られたVEFsから電流源を推定し，信用度の高いものをMR1上に重畳させた。結果：（A）110-170msecの間にみられるN120m成分は赤－緑刺激の方が黄－黒刺激より潜時は遅かったが，電流強度は大きかった。電流源は前額断でみて外向きで，一次視覚野に推定された。低コントラスト（黄－黒）ではN120mは記録されにくくなった。（B）1）格子縞反転刺激ではVEPでP100が記録されVEFのP100m成分は前額面でみて内向きの電流源であり，一次視覚野に推定された。2）仮現運動刺激ではVEPでP1が記録され，VEFでは18半球中6半球にP1m成分が得られた，P1mの電流源は前額面でみて内向きでP100mの電流源よりやや外側に推定された。考察：格子提示刺激でのN120m成分は外向きでコントラストよりも色の情報をより反映すると思われた。格子反転刺激でのP100m成分および仮現運動刺激でのP1m成分は内向きで動きに反応する要素が強いと思われた。

(31) 仮現運動刺激に対するヒト運動視中枢(MT/V5)の反応特性

金桶吉起，文堂昌彦，　柿木隆介（生理研）

二つの線分を交互に場所を変えて2－3秒ごとに提示すると，ヒトは仮現運動を知覚する。このような視覚刺激に同期して，ヒト運動視中枢(MT/V5)に特異的に反応が現れることが脳磁場測定にて確かめられた(Neuroreport 8, 677, 1997)。今回我々は，二つの線分間の距離と反応潜時を比較することにより，それが視覚刺激に対する単純な反応と考えるよりはむしろ，運動感覚を生成している過程を反映するらしいことを見出した。対象と方法：3人の健康成人を対象に，上記の仮現運動視覚刺激に対する脳磁場反応を前回と同様の方法で記録した.線分間の距離は，0.05，0.1，0.2，1.0，3.0，5.0度の6種を用いてそれらに対する反応潜時を測定した。結果と考察：線分間の距離が大きくなると反応潜時は単調に短くなった。しかし仮現運動の方向には寄らなかった。また潜時の違いに関わらず脳磁場反応は同じ運動視中枢から起こっていると推定された。これらの結果は，記録された脳磁場反応が線分のonまたはoffに対する線形的な反応ではなく,脳内で両刺激が非線形的に相互作用することにより作り出されるものであることを示す。また，ヒト運動視中枢は視覚刺激の網膜上位置に対する感受性が乏しいことから，線分間の距離による潜時差はその感受性のより高い下位中枢(V1/V2)との何らかの情報交換によっておこる

ことが推測される。

13. 第3回「予測制御の生理学」研究会

1997.12.5－12.6

代表者：森田啓之（岐阜大・医・生理）

世話人：村上政隆（生理研）

(1) 運動開始時の R-R 間隔と予測制御

高柳清美（広島大・医・保健）

(2) 運動に対する心拍数応答を考慮した一定心拍数運動負荷システム

川田　徹（国立循環器病センター・循環動態）

(3) 時間医学：クロノスとカオス

大塚邦明（東京女医大・第二病院・内科）

(4) 随意動作に先行する Silent Period の役割と出現機構

青木　久（愛知県心身障害者コロニー）

(5) 人工システムによる生体の制御

福井康裕（東京電機大・理工）

(6) 制御工学から見た生体制御－むだ時間に対する予測制御－

吉澤　誠（東北大院・工）

(7) 指向運動制御の神経機構：頚の運動制御を中心にして

佐々木成人（都神経研）

(8) 小脳半球部サッケード関連プルキンエ細胞のニューロン活動

真野範一（都神経研・神経生理）

(9) 唾液分泌から‘情動’をみる

玄番央恵（関西医大・生理）

(10) NMR を用いた脳血流調節の研究

西丸直子（大分医大・生理）

(11) 体温調節と自律分散系

彼末一之（大阪大・医・保健）

(12) 一日一定時間帯に固定した暑熱負荷への馴化－体温調節系は暑熱負荷を予測できる？

紫藤　治（金沢大・医・生理）

(13) 自律神経系の反射制御と予測制御

間野忠明（名古屋大・環境研・高次神経統御）

参加者名

吉澤　誠（東北大院・工），福井康裕（東京電気大・理工），大塚邦明（東京女医大・第2病院内

科），真野範一，佐々木成人（東京都神経研），紫藤　治（金沢大・医・生理），間野忠明，岩瀬敏，杉山由樹，斎藤　満，北澤大樹，崔　　建（名古屋大・環境研），玄番央恵（関西医大・生理），彼末一之（大阪大・医・保健），砂川賢二，川田　徹，西中知博（国立循環器病センター），松川寛二，高柳清美，前島　洋（広島大・医・保健），井街　宏，鎮西恒雄，阿部祐輔，斎藤逸郎，鈴木隆文（東京大・医・医用電子），國武孝人（宮崎医大・生理），勢井宏義（徳島大・医・生理），青木　久，塚原玲子，久野裕子（愛知県心身障害者コロニー），西丸直子（大分医大・生理），松波謙一（岐阜大・医・反射研），森田啓之，角岡　潔，萩池昌信，山口　修，宮原太郎（岐阜大・医・生理），村上政隆，尾崎　毅（生理研）

研究会概要

ネガティブ・フィードバック調節機構は，これまで生体の恒常性維持機構の主役として理解されてきた。しかし，変量の変化を感知し，その変化を打ち消すように働くため，生体は一旦危機に曝される。一方，予測制御あるいは広義のネガティブ・フィードフォワード調節機構は外乱により引き起こされるであろう変量の変化を予測し，予測した変化を打ち消すように予め生体を制御する。従って，予測制御機構が健在であれば，生体の恒常性は真に維持される。この意味で，予測制御は生体にとって重要な調節機構であり，さらなる研究が待たれる。第１回研究会は平成７年香川医科大学において開催。本会は第３回目を迎え，運動系，自律系，循環系，人工臓器・工学系および臨床医学の研究者が会し，各々の立場から，予測制御的調節機構について最新の研究成果を発表した。他に同種の研究会がなく，また種々の研究分野の人が集ったため，新しい考え方を他分野に見出そうとする積極的興味で盛り上がり，ざっくばらんで活発な討論が行われ，多くの参加者は有意義であったとの印象を持った。

(1)運動開始時のＲ－Ｒ間隔と予測制御

高柳清美・吉村　理・松川寛二（広島大・医・保健）
二宮石雄（摂南大）

人を対象に，(1)動的運動の運動強度が心周期過渡応答に及ぼす影響と，(2)運動強度と運動変化時期が既知か未知による心周期過渡応答の差異について検討した。

(1)運動開始の合図後４～５心拍までは急激に心周期が短縮し，運動強度の違いによる差異は認められなかった。６～７心拍以降では運動強度の違いに応じて緩やかに運動定常状態に移行していった。最初の４～５心拍は運動強度に影響されなかったことより，この時期は「見込み制御」の作用による結果で，以後はフィードバック制御が加わった制御系により調節された可能性が考えられた。心周期の拍動毎変動をみると，低い運動負荷では大きく変動しながら短縮したが，高

い負荷では変動が小さくなる傾向が認められた。

(2)運動負荷増加の予告によって負荷の増加前に心周期は短縮したが，予告なしでは増加直後より心周期は短縮した。また呼吸周期は負荷増減の予告の有無により影響されなかった。このことより，予告による心周期の早期からの応答は，呼吸との同調あるいは呼吸の影響とは考えにくく，独自の神経性調節によって制御されている可能性が示唆された。運動負荷の増加が予知できると「見込み制御」により，心拍数が円滑でより早く運動定常状態に移行できることが判った。一方，運動負荷の減少では特に予告による影響は認められず，「見込み制御」は作動しないことが示唆された。

(2)運動に対する心拍数応答を考慮した一定心拍数運動負荷システム

川田　徹（国立循環器病センター・循環動態）

【背景】心臓リハビリテーションにおいて，安全かつ効率的な運動療法を行うために，心拍数をもとに負荷強度が処方される。しかしながら，実際の運動中の心拍数を目標値に保つことは容易でない。これは次のような問題に起因すると考えられる。①運動負荷に対する心拍数の応答が予測できていない。②心拍数の履歴が負荷量の設定に反映されていない③連続的な調節が難しい。

【目的】運動負荷に対する心拍数の応答特性を考慮して，ネガティブ・フィードバックを用いた自転車エルゴメータによる一定心拍数負荷システムを開発する。

【方法】健常者にランダム運動負荷を行い，運動負荷に対する心拍数の応答特性を伝達関数として定量化した。伝達関数を使えば，運動負荷に対する心拍数の応答を予測できる。平均の伝達関数を用いてシミュレーションを行い，最適な制御係数を決定した。次に，実際に制御装置を組み込んだ自転車エルゴメータ運動負荷システムを作成した。運動負荷システムの動作を確認するために，健常者および心筋梗塞回復期患者に一定心拍数運動負荷を行った。健常者では年齢予測最高心拍数の60％および75％の負荷強度を用いた。患者では安静時心拍数＋20～40bpm を目標心拍数とした。

【結果】健常者ではいずれの負荷強度とも約２分30秒で目標値に達し，その後の目標値との差の標準偏差は５bpm であった。急性心筋梗塞回復期患者においても約２分で目標値に達し，その後の目標値との差の標準偏差は３bpm と良好であった。

【結論】心拍数の応答特性を伝達関数として定量化して，運動負荷に対する心拍数の応答を予測することにより，最適なフィードバック制御システムを作成することができた。

(3)時間医学：クロノスとカオス

大塚邦明（東京女医大・第二病院・内科）

心拍変動と血圧変動はいずれも24時間の周期で変動を繰り返している。3歳から92歳までの健常男性218名を対象にして，24時間の心拍変動を高速フーリエ変換（FFT）で解析すると，HF成分のパワーは夜間睡眠中に頂点位相を示す明瞭なサーカデイアンリズムが観察され，一方，交感神経の機能に関連すると考えられているLF/HF比のサーカデイアンリズムはHF成分とは相反的に，昼間に頂点位相を示す余弦曲線があてはめられる。HF成分もLF/HF比も40－50歳頃までは線形に変化する。HF成分のパワーは加齢とともに減少し，その昼夜の差（日内変動幅）も加齢とともに小さくなる。しかし，それは線形に減少して行くのではなく，60歳頃を極小値としその後さらに加齢が進んで行くと，少しながら増大する傾向を示す。心拍変動の著しい低下は心疾患の疾病予後あるいは生命予後の優れた指標であると考えられている。慢性心不全の拡張型心筋症例の心拍変動FFTスペクトルアレイを用いた検討では，VLF成分（0.003－0.04Hz）のパワーも小であった。著しく低下したこの心拍変動のことを，時間生物学の立場から，「CAHRV, (Chronome Alteration of Heart Rate Variability)」と呼んでいる。

血圧日内変動の立場からの降圧の指標として，血圧・心拍の日内変動（swinging）のover-swinging現象に注目している。この現象が6年間の前向き研究で，脳梗塞と高血圧性腎症の発症を高頻度にもたらす知見を得たからである。睡眠に伴う著しい血圧の低下（extreme sleeping dipping）と起床に伴う著しい血圧の上昇（excessive morning rise）を反映した変動様式である。この現象を，時間生物学の立場からCHAT（circadian hyper-amplitude tension）と呼んでいる。

心拍変動と血圧変動にはフラクタル構造が存在する。そこで血圧・心拍変動のフラクタル解析を行った。15分毎の変化度（ΔHRとΔBP）を4象限に順次プロットし，そのプロットをBox Counting法でフラクタル次元の解析を行い，降圧効果の影響を検討した。Δ血圧-Δ心拍数のフラクタル次元に及ぼす降圧剤の影響は，ニフェデイピンで増大，アムロジピンで減少，その他の降圧剤では不変であった。この臨床的意義に関しては今後の研究にゆだねられなければならないが，血圧変動と心拍変動とは，いずれもクロノスとカオスの2つの顔を持つ「ヤヌス医学」の一端であると言えそうである。

遺伝子医学が急速に進歩しつつある現在，敢えて，生体全体を眺める立場からの新しい医学，「時間医学」を志している。遺伝子医学と時間医学は互いに手を携えて，今後の新しい医学として発展して行くことが望ましいと考えている。

文献

(1) Otsuka K et al.: Circadian rhythmic fractal scaling of heart rate variability in health and coronary artery disease. Clin Cardiol 20:631-638, 1997.

(2) Otsuka K et al.: Age, gender and fractal scaling in heart rate variability. Cli Sci 93:299-308, 1997.

(4)随意動作に先行するSilent Periodの役割と出現機構

青木　久（愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所）

あらかじめ筋に軽度の持続的緊張を加えた状態から，随意的に急激な動作を行うと，動作に先行した筋放電の休止期（premotion silent period: PMSP）が観察される。このPMSPは，電気刺激や反射による不随意動作には出現しないことから，随意動作に伴う現象であると理解されているが，その役割や出現機構の詳細は明らかとなっていない。

本研究ではPMSPの役割と出現機構を検討するために，光刺激に応じた肘関節伸展動作を実施した。その結果，PMSPは反応動作を行えば必ず出現するものではなく，10名の被検者の平均出現率は40％であった。同一被検者のPMSPの出現した動作と出現しない動作の加算平均した筋力曲線を比較すると，10名中9名の被験者で5％水準で有意に大きい筋力の増強が，PMSPの出現した動作の初期に認められた。一方，反応時間はPMSPの出現した方が，出現しないときよりも遅くなる傾向がみられた。PMSPの筋力増強は，筋の弾性要素のrecoil効果や運動ユニットの発射の同期性の高まりによるものと推察された。

PMSPの出現機構については，経頭蓋的磁気刺激による運動誘発電位（ＭＥＰ）とＨ波とをPMSP中に誘導して，皮質・脊髄レベルの興奮性を調べた。PMSP中のMEPの振幅は，バックグラウンド（20％ MVC）のMEPの10％であり，MSPの出現しない動作より低い値であった。これに対して，PMSP中のＨ波の振幅は，バックグラウンドの90％までしか減少せず，出現しない動作との差は小さかった。運動野を介して得られるMEPへのPMSPの影響は大きく，脊髄レベルの反射によるＨ波への影響は小さいことから，PMSPの出現は脊髄より上位の中枢の関与の大きい現象と推察された。さらに，小脳や基底核の障害がPMSPの出現に影響を与えることから，それらの領域であらかじめプログラムされて発現する動作と関連することが推察された。

(5)人工システムによる生体の制御

福井康裕（東京電機大・理工）

1．はじめに

生体はきわめて複雑で巧妙なフィードバック・システムであるといわれている。このようなフィードバックによる生体内部環境の調節系は，生体のホメオステーシス（恒常性維持）機構と呼ばれている。しかし，このホメオステーシス機能に相当な狂いが出て，生活に支障が出るようになったのが「病気」である。医師の診断・治療過程は，ホメオステーシスが乱れている病的状態の情報処理・判断にあたる診断・意志決定，そして操作にあたる治療行為，さらに治療の結果

を知るための検査というフィードバック・ループを外部から形成してやることになる。さらに一歩進んで，医師の診療にとって代わって，人工的システムによる自動治療が考えられる。

2.生体制御の例

人工的な生体制御による具体ケースを3例示す。

●「ICU患者の輸液制御による体液ホメオステーシスの維持」

この研究開発は，姫路循環器病センター河村剛史医師との共同研究で，日本光電工業㈱の協力を得て10年弱に渡って推進してきたものである。開心術後のICUの患者の体液バランスをコンピュータ制御する。患者の尿量に従って，輸液管理をする。極端に尿量が少なくなった場合は利尿剤を自動投与する。この制御の方法に「ファジイ制御」を用いている。

●「開心術中の人工心肺制御による循環ホメオステーシスの維持」

この研究開発は東京女子医大今井康晴教授，早稲田大学土屋喜一教授と我々の共同研究であり，過去20年に渡って推進してきた。開心術中の，人工心肺開始から離脱までをコンピュータ制御するものです。制御アルゴリズムとしてはシーケンス制御を用いている。

●「トレッドミル運動負荷制御」

運動時の応答心拍数に応じて，運動負荷強度の増減を制御することにより，個人の運動能力に合わせた適切な運動負荷制御を行うことを目的とする。制御アルゴリズムの獲得は，ニューラルネットワークと遺伝的アルゴリズムを用いて学習により行う。

(6)制御工学から見た生体制御　―むだ時間に対する予測制御―

吉澤　誠（東北大・工）

生体制御系にとってむだ時間は避け難い要素である．すなわち，神経経路の伝達遅れ，中枢における演算遅れをはじめ，循環系には血管を伝わる脈波や血液の伝達遅れが存在する．このような時間遅れ(むだ時間)を含む制御系は，一般に発振しやすく制御しにくい．

制御工学において，むだ時間を含む制御対象をうまく制御するための方法として，状態予測制御法の最も簡単な場合であるスミスの補償法と呼ばれるものがある．これは，制御対象の予測値を生成し，むだ時間までの過去から由来する影響をキャンセルするものである．

手動制御系における人間オペレータは，自らのむだ時間や制御対象のむだ時間を補償するためこのスミスの補償法と同様な制御動作をしている可能性がある．すなわち，スミスの補償法の開ループ周波数特性のゲインにはある周波数ごとにピークを作るが，人間オペレータの場合にも同様なピークが見られる．また，人間オペレータは，目標入力発生系の内部モデルを自らに生成し，目標値の予測をもしながら制御することを行っているようである．

一方，循環系の血圧反射弓のむだ時間は，神経系での情報処理時間に比較してかなり大きいた

め，やはり循環中枢は，その補償，すなわち予測制御を行なっている可能性がある．さらに，このむだ時間は心拍数変動等に見られる低周波揺らぎ(Mayer wave)やカオスの源である可能性もあり，循環系においてもむだ時間を中心とした解析が重要であると考えられる．

(7)指向運動制御の神経機構：頚の運動制御を中心にして

佐々木成人（都神経研）

前方のパネル上の中央に点灯した光点を注視した状態から，光点を色々なスピードで動かし追跡させ，惹起される指向運動と光刺激速度の関係をネコで系統的に調べた。速い刺激（400－900°/s）に対し，まず小振幅の頭の運動（潜時 65 ms），続いて潜時約 80 ms の eye saccades と headsaccade で対象物を追跡したが，光点の移動速度を更に速く（step 刺激）又は遅くすると，眼球，頭の運動の潜時は共に延長（120－150ms）し，両者の差は減少した。頭の最大角速度は刺激速度に対し釣り鐘状のカーブを呈したが，眼球角速度は刺激速度によらずほぼ一定であった。この結果は頭の指向運動は刺激速度に依存，非依存性の 2 経路で，眼球運動は非依存性経路で，制御されていることを示唆した。指向運動に関係して活動する橋・延髄網様体の細胞は phasic neuron (PN) と phasic sustained neuron (PSN) に大別される。これらの細胞の視覚刺激速度依存性を調べた。PSN は400－900°/s の刺激に対して，短潜時（約 41 ms）で活動し，head saccades の終了と共に発火を停止した。一方速い step 刺激のときには，PSN の多くは 発火をほぼ完全に停止した。これは頸運動の潜時延長と運動速度の低下とよく対応することから，PSN は視覚刺激速度依存性の頸運動の制御に関与すると考えた。PN は saccades に約 10 ms 先行して burst 発火し，刺激速度を変更してスパイク頻度はあまり変化しなかったことから，眼球運動と視覚刺激速度非依存性の頭運動に関与すると考えた。

(8)小脳半球部サッケード関連プルキンエ細胞のニューロン活動

真野範一，伊東由美，渋谷英敏（都神経研・神経生理）

サルの小脳半球部後葉，第(3)脚 a にはサッケード（急速眼球運動）に関連して発射頻度を変化するプルキンエ細胞が局在している。これらの細胞には，急速眼球運動に伴ってのみ発射活動を変化する運動性プルキンエ細胞（motor saccade P-cell）と，それと同様な運動性発射活動に加えて視標の視覚刺激にも応答する発射活動を示す視覚－運動性プルキンエ細胞（visuo-motor saccade P-cell)の 2 型がある。

運動性プルキンエ細胞はサッケード開始に20－80ミリ秒先行して発射活動を変化し，上下左右どちらの方向への眼球運動でも，定性的には同じように頻度が増大または減少する。又，視覚誘導性急速眼球運動に伴う発射頻度の変化は自発性急速眼球運動に伴う変化よりも強い。

視覚－運動性プルキンエ細胞では，注視光点が中心から20度上下左右へジャンプする時に潜時60ミリ秒で視覚応答性の発射活動を示し，それに続いてサッケード開始に先行して変化する運動性発射活動を示す。 視覚応答性発射頻度変化の方向性はプルキンエ細胞によって異なり，運動性発射頻度変化と同様にどの方向への注視光点変化にも同様に応答する細胞も，ある特定の方向にのみ応答する細胞もある。

これらの２型の細胞は同じ第Ⅱ脚ａに混在しており，運動性細胞が大多数で，視覚－運動性細胞は少数であり，視覚－運動性細胞は第Ⅱ脚ａの後方部にある。

以上のように，小脳半球部の眼球運動関連細胞は，急速眼球運動に数十ミリ秒先行して発射頻度を変化すること，運動の方向性との関係が貧弱なこと，自発性眼球運動よりも視覚誘導性眼球運動でより著明に発射頻度を変化をすること，視覚刺激に応答して変化する細胞もあること等を考察すると，眼球運動の制御中枢としてはかなり高次の中枢であると考えられる。

(9)唾液分泌から‘情動’をみる

玄番央恵（関西医大・生理）

感情，気分，情動の直接的表出は主として顔の表情或いは音声言語によってなされるが，手話やパントマイムから明らかなように四肢および軀幹の筋肉も感情表出に有用である。一方自律神経の制御下にある手掌発汗が情動に影響されると言われているので，唾液分泌及び発汗，心拍数と情動の関係を検討した。健常者における長時間連続測定を睡眠中と起床から就眠までの覚醒時に行い，唾液或いは汗の平均分泌速度及び平均心拍数を計算した。感覚刺激，計算，運動などのテストを情動状態の誘発に用いた。睡眠時はREMとnon-REM睡眠の別なく少量の断続的唾液分泌，一方覚醒時の唾液分泌は極めて不規則であり，唾液分泌にDawsの言う日周リズムは認められなかった。唾液分泌速度は情動の影響を強く受け，怒り，感動，精神集中時に最高であり，次いでリラックス時，その次にストレス時，最低は無関心，無感動時であり，睡眠時とほぼ同様の分泌速度であった。発汗は手掌発汗と非手掌発汗に分けて検討したが，一般に覚醒時は手掌発汗がみられ，非手掌発汗は殆どみられなかった。一方睡眠時は手掌発汗が殆どみられず非手掌発汗が盛んになったが，REMとnon-REM睡眠で差はなかった。睡眠時の心拍数は覚醒時より減少したが，REM睡眠ではnon-REM睡眠に比べて変動性が増した。手掌発汗及び心拍数は同期して変動することが多く，怒り，感動，精神集中時のみならずストレス時にはリラックス時より増大したが，無関心，無感動時はリラックス時より減少した。唾液分泌と手掌発汗は個人差が著明で

あり，唾液分泌の盛んな被検者は手掌発汗が少なかった。

唾液分泌，手掌発汗及び心拍数は顔の表情或いは音声言語に比べると情動表出の精度は悪いが，真実度は良いと考えられる。唾液分泌と手掌発汗或いは心拍数の同時測定は簡便，安価且つ非侵襲性の，ヒトの感情評価に有用な方法であろう。

⑾体温調節と自律分散系

彼末一之，細野剛良，陳　小明，依田珠江（大阪大・医・保健）

我々が暑熱に暴露されると行動性体温調節が先ず起こる．それが出来ぬ状況下では皮膚血管が拡張して熱放散を盛んにし，それでも不十分であれば発汗が起こる．一度快適な温熱環境が得られればそれ以上体温調節のためには何もする必要がない．その意味で行動性調節は効率的である．また発汗は強力な熱放散手段だが，大切な資源の水を消費する．そこで行動性調節，皮膚血管拡張，発汗という動員順序は合目的的である．寒冷暴露時にも先ず起こるのは行動性調節で，それがだめな場合には非ふるえ熱産生，そして最後にふるえが起こる．ふるえは骨格筋を使うので行動が制約され，出来る限り起こさぬのが得策である．このような“適切な”効果器の動員順序はどのような機構によるのであろうか．これまでは，すべての効果器の活動を調節する“統合機能”を持った視束前野がそれを行うと漠然と考えられていた．しかし我々の最近の研究では視索前野はそれぞれの効果器を独立に調節する機能モジュールの集まりである．各効果器反応は体温がある閾値に達すると発動するが，その閾値は長い進化の歴史で生存に有利なように決まって来た．そこで体温への種々の因子の影響を解析するには，単に体温がそれにより上がった，下がったではなく，各効果器反応がどのように修飾されるか，そしてそれが生体の生存にとってどのような意味を持つのかを検討することが重要であろう．

⑿一日一定時間帯に固定した暑熱負荷への馴化ー体温調節系は暑熱負荷を予測できる？

紫藤　治（金沢大・医・生理）

一日のうち一定時間帯に限り（例えば活動期後半の４－５時間）ラットやヒトを高温環境に置く暑熱負荷を10日間程度繰り返すと，これに馴化した動物では深部体温の日内変動パターンが変化し，かつての暑熱暴露時間帯に一致して深部体温が下降するようになる。この特徴的な深部体温下降は暑熱暴露期間終了後，３－４日間観察される。さらに，かつての暑熱暴露時間帯では自律性体温調節反応発現閾値温の低下や暑熱負荷に対する体温調節反応強度の亢進，自律性および

行動性の熱産生量抑制などが起こる。これら体温調節機能の変化は暑熱負荷に備える手段として有効と考えられる。したがって，ラットやヒトに一日のうち一定時間帯に限る様式で暑熱負荷を与えると，暑熱負荷時間帯に対する記憶が形成され，その結果，かつての暑熱暴露期間において暑熱負荷に対処するよう自律性・行動性の体温調節機能が実際の暑熱負荷がないにも拘らず変化してしまうものと推察される。体温調節機構には温熱負荷に対する時間記憶を介した予測制御機構があるのであろうか。

⑬自律神経系の反射制御と予測制御

間野忠明（名古屋大・環境研・高次神経統御）

生命の維持に重要な器官の活動を調節する自律神経系の働きをヒトで検索する方法としては，従来，自律神経が支配する効果器の活動（瞳孔反応，心拍，血圧，末梢血流，発汗，消化管活動など）や，血漿ノルアドレナリン濃度を測定する方法がしばしば用いられてきた．最近では心拍変動や血圧変動のパワースペクトル解析がヒトの自律神経検査法として盛んに用いられるようになった．これらのいわば間接的な方法に対して，ヒトの末梢神経から交感神経活動を直接的に測定するマイクロニューログラフィーも自律神経研究法としてきわめて有用である．われわれの研究室では主にこの方法を用いて，ヒトの環境適応の自律神経性機序の解析を行っている．マイクロニューログラフィーにより骨格筋支配の交感神経活動（筋交感神経活動）と皮膚支配の交感神経活動（皮膚交感神経活動）を測定することができる．前者は骨格筋内の血管抵抗を制御し，全身血圧の調節に，後者は皮膚血流と発汗を制御して体温調節に重要な役割を担う．筋交感神経活動は圧受容器，化学受容器，代謝受容器，侵害受容器などからの入力によって反射性に制御されるが，中枢性制御をも受ける．例えば，この活動はnonREM睡眠時には睡眠深度に応じて抑制され，REM睡眠時にはREMと共に促進される．しかし覚醒時における筋交感神経活動の中枢性制御と予測制御については，まだよく分かっていない．これに対して，皮膚交感神経活動は覚醒時にも上位中枢からの下行性影響を筋交感神経活動よりも強く受ける．心理的ストレスに対して，皮膚交感神経活動は筋交感神経活動よりも強く反応する．随意運動負荷により筋交感神経活動は緊張力や筋疲労感覚に応じて，筋代謝受容器を介して反射性に促進されるが，運動に先行して促進されることはない．これに対して，皮膚交感神経活動は運動の開始に先行して促進され，心臓交感神経活動などと共に運動の予測制御に関与する可能性が示唆される．

14. シナプス機能の発達と変化

1997.12.9－12.10

代表者：関野祐子（群馬大・医・行動分析学）
世話人：丸山　敬（生理研）

(1) 大脳皮質の局所回路

金子武嗣（京都大・大学院・医・高次脳形態）

(2) 機能的神経回路形成に関わる分子メカニズムの探索

八木　健（生理研）

(3) 脳障害後のシナプスの再生機構

山田光則（新潟大・脳研・病理学）

(4) PIMT（イソ体アスパラギン酸化蛋白をメチル化する酸素）欠損マウスでの神経変性とLTPの消失

白澤卓二（東京都老人研・神経生理）

(5) ミクログリアとシナプス可塑性

澤田　誠（藤田保衛大・総合医科学研・病態生化学）

(6) グリア型グルタミン酸トランスポーターによるシナプス伝達の制御

田中光一（精神神経センター神経研究所・疾病研究第4部）

参加者名

金子武嗣（京都大・大学院・医・高次脳形態），山田光則（新潟大・脳研），真鍋俊也（東京大・医・脳研脳生理学），白澤卓二，内田洋子，五味不二也（東京都老人研），田中光一，森本高子（精神神経センター），渡辺雅彦（北海道大・医・解剖第1），小田洋一，山本亘彦（大阪大・基礎工・生物工学科），中村振一郎，花村健次（大阪大・大学院・基礎工学科），畠　義郎（大阪大・医・神経生理），黒谷　亨（京都府立医大・第2生理），今村一之，小林真之，Peter Kaub（大阪バイオサイエンス研），俣賀宣子，Takao Hensh（理研・脳科学センター），玉巻伸章（福井医大），武内恒成（奈良先端科学技術大），澤田　誠（藤田保衛大），平田たつみ，須藤文和，川崎能彦（名古屋大・理），吉村由美子（名古屋大・環研），時田義人，浦本　勲（愛知県コロニー・発達障害研），石田信幸（長寿研），中原大一郎（浜松医大），白尾智明，関野祐子，林　謙介，田中聡一，山崎博幸（群馬大・医・行動分析），吉原基二郎（群馬大・医・行動生理），五十嵐道弘（群馬大・医・分子病態），馬場広子，八木　健，小幡邦彦，丸山　敬，山肩葉子，児島伸彦（生理研）

研究会概要

この研究会は，これまで，シナプスの形成や可塑性に注目してきた過去3回の研究会の流れを

汲み，これまでテーマとして扱われてこなかった，神経発生・成熟後における神経回路機能の維持に焦点を当て企画した。福井医科大・玉巻先生，東京都老人研・内田先生，生理学研究所・馬場先生に座長をお願いしたところ，「シナプス結合とその形成」「シナプス変性・再生」および「グリアによるシナプス可塑性調節」の３つのセッションが企画され，それぞれ２演題，６人の演者の方に講演を依頼した。それぞれのセッションは，シナプス形成，シナプス変性，シナプス機能とグリアというテーマの基調となる問題点提起の演題と，それに関わるトピックス性の高い話題という構成を基本とした。そのため，演題に関しては，座長と演者で事前の打ち合わせを密に行っていただいた。また，今回の研究会の特色は，発表時間30分，討論40分と討論時間の方を長く設定した点である。すべての参加者が積極的に討論し，演者からの情報を一方的に持って帰るのではなく，むしろフロアーからの討論で演者の方が何か新しい発展のきっかけを得られるようにと配慮した。この試みは，当初多少不安の声があったものの，結果的には，好評であった。話の途中での質問を受けていただいた点も，議論に拍車をかける結果となった。討論時間がなおも不足したというほど盛んな議論がなされたこと，討論参加者が40名を越したことなどから，今回の研究会は大成功であったと考えている。

(1) 大脳皮質の局所神経回路

金子武嗣（京都大大学院・医・高次脳形態）

1）脳機能を解明する戦略： Bottom-up の方法論

Top-down vs. Bottom-up

2）大脳皮質の構成要素（ニューロン）：化学的分類

Glutamatergic... Spiny cell

Pyramidal cell

Subpopulation; Cholecystokinin (layer II/III & VI), Calbindin (layer II/III)

NK3 receptor (layer V)

Spiny stellate cell (layer IV)

GABAergic ...Aspiny/smooth non-pyramidal cell

Group I: Parvalbumin

Small subgroup; Preprotachykinin A, Cortistatin, NK1 receptor(＋)

[Basket cell, Chandelier cell]

Group II: Somatostatin, Preprodynorphin, mGluR1a

Small subgroup; Neuropeptide Y, NO synthase, NK1 receptor(＋＋)

[Martinotti cell, Double bouquet cell]

Group III:

Acetylcholine, Catecholamine, Calretinin

Vasoactive intestinal popypeptide, Corticotropin reseasing factor

Preproenkephalin, Preprotachykinin B, μ-Opioid receptor

Small subgroup; Cholecystokinin

[Bipolar cell, Double bouquet cell, Chandelier cell]

2'）錐体細胞等の多様性

2種類のVI層錐体細胞の存在。

Layer VI spiny stellate cell の存在。

3）局所神経回路の研究

3－1）各層の錐体細胞と皮質の入出力

皮質内の軸索側枝の豊富さは局所回路の存在を意味する。

cf. 視床の投射ニューロンは局所の軸索側枝を持たない。

3－2）ネコ大脳皮質運動野の局所神経回路の例

最近，我々の研究室では運動野を含む大脳皮質の局所回路を形態学的に解析する仕事を進めている。今回は運動野浅層の錐体細胞から深層の錐体細胞への結合に的を絞って報告した。

1）大脳皮質体性感覚野を破壊すると，運動障害は認められないが，分節的（技能的）運動学習の能力が低下することが知られている。一方，体性感覚野から運動野への入力と運動野浅層の神経細胞との単シナプス結合において，テタヌス刺激後に興奮性シナプス後反応の長期増強が認められる。この可塑的神経入力がさらにどのように運動野内で情報処理されるのか，細胞内記録・染色法と免疫組織化学法を組み合わせることにより，生理学的及び形態学的に解析した。

麻酔下でネコの体性感覚野 (Area 2) に7本の刺激電極を刺入し，Area 2 を微小刺激する。3％の Biocytin と 1.5 M の KCl を詰めた細胞内記録用のガラス微小電極を運動野 (Area 4) に刺入し，Area 4 浅層から細胞内記録を取った。Area 2 の微小刺激に対する細胞内反応を Type I から III までの3種類に分類した。7本の刺激部位のうちに1カ所強く反応する部位 (Dominant site) があり，反応の潜時が一定であったものを Type I とした。Type I の反応は潜時が短く単シナプス性であると考えられる。Dominant site を有するが，反応潜時が一定でなかったものを Type II, Dominant site が認められず反応潜時も一定でなかったものを Type III とした。Type II/III 反応は潜時も遅く多シナプス性の反応であると考えられる。以下，Biocytin を注入して細胞内染色したニューロンのうち錐体細胞の所見に限って述べる。Type II 反応を示した錐体細胞は Type I および Type III の錐体細胞よりも浅層に見いだされたことから，以下のような神経連絡が体性感覚野と運動野の間，およびそれぞれの皮質内に存在すると考えられる：体性感覚野からの単シナプス性の入力 (Type I) は，運動野内でより浅層に連絡されて Type II 反応をつくる。Type III 反応に必要な神経線維の収斂は体性感覚野内あるいは運動野内に存在するであろう。

上記の Type I ～ III の錐体細胞の軸索側枝が運動皮質内でどのような神経要素に連絡するか調

べるために，Biocytin を細胞内注入した錐体細胞の軸索を青黒色に染色し，シナプスを受ける運動皮質の錐体細胞の樹上突起を，Non-phosphorylated neurofilament protein (npNFP) の免疫組織化学法で赤色に可視化した。npNFP 陽性細胞は運動皮質の III 層と V 層に分布し，そのほとんどが錐体細胞で樹状突起をよく染める。特に第 V 層の Betz 細胞を含む運動出力ニューロンが強陽性に染色される。Type I 錐体細胞の皮質内軸索側枝は II/III 層と V 層の 2 カ所に集まり，それらの部位で npNFP 陽性樹状突起にシナプス様接触をしていた。一方，Type II 錐体細胞の皮質内軸索側枝は Type I より貧弱で，第 II/III 層を中心に分布していた。したがって，Type II 錐体細胞から第 V 層の運動出力ニューロンへの入力は少ないと考えられる。Type III 錐体細胞の軸索側枝は Type I とほぼ同一の分布を示した。

以上の結果より，次のような神経回路が運動皮質内に存在するものと考えられる。体性感覚野および視床から可塑的な単シナプス性入力をうける運動皮質 II/III 層の Type I 錐体細胞は，より表層に存在する Type II の錐体細胞および V 層の錐体細胞に出力する。運動皮質において V 層錐体細胞の運動出力は視床入力により強く駆動されるが，この主神経回路に対し，上記の可塑的神経回路（体性感覚野－›Type I 錐体細胞－›V 層の運動出力ニューロン）が制御的に働き，例えば分節的運動学習に関与すると推測される。

4）最近の知見から

4－1）Chemically specific connection

ex.) GABA afferents from basal forebrain to neocortex CB(＋) interneuron

[Freund &Guly..., J Comp Neurol 314: 187, 1991]

5HT afferents from median raphe to neocortex CB(＋) interneuron

[Hornung & Celio, J Comp Neurol 320: 457, 1992]

Target-cell-specific concentration of a metabotropic glutamate receptor in the presynaptic active zone.

[Shigemoto et al., Nature 381: 523, 1996]

錐体細胞から Substance P Receptor 陽性非錐体細胞への連絡

4－2）最近の私達の仕事（時間が余れば）

逆行性の Golgi 様標識法と細胞内染色法の組合わせで大脳皮質内の錐体細胞間の連絡を調べる。「1 対多の戦略」さらに，内在性の非錐体細胞を Golgi 染色する工夫を探している。

(2) 機能的神経回路形成に関わる分子メカニズムの探索

八木　健（生理研）

機能的神経回路はどの様な分子メカニズムにより形成され機能しているのだろうか？発生プロ

グラムにあらわされた正確な神経回路が重要であるのか？神経活動依存的な回路形成が重要なのであろうか？私の興味の中心は動物行動制御を司る機能的神経回路形成がどの様な分子メカニズムによりもたらされているかにある。動物の行動が，進化により生み出されたものであり，自己の生命維持や種の保存につながりながら多種多様でありなおかつ精巧に形成されていることに深い関心を持つからである。その過程の中で発生プログラムにより裏付けられた正確な神経回路形成や神経活動依存的なシナプスでの長期増強は機能的神経回路形成に重要なイベントであると推測されている。しかし，動物の行動を制御する機能神経回路の形成は個体レベルでの問題であり，個体レベルでの行動を制御する要因を得なければ本質的な問題に至ることはできない。遺伝子ターゲティング法はこの研究においてその要因を遺伝子に求める手段であり，遺伝子の欠損が機能神経回路形成のどの様な要素を変更させているのかはともかくとして，少なくとも個体レベルでの行動形成に関与する遺伝子を特定することができる。この方法には批判も多く，何を見ているのか分からないといった議論もあるが，動物の行動を制御する遺伝子が実際に存在することを示している結果は非常に大きな研究のブレイクスルーとなると確信している。何故なら，現在に至る動物の進化の過程で脳の機能は著しく多様化し，高次化してきた経緯があるが，その進化の原動力は遺伝情報の進化によるものであると考えているからである。この観点より，以上の遺伝子ターゲティングで特定された遺伝子を見直したとき，特定された遺伝子は少なくとも現在まで進化の過程の中で生き残ってきた遺伝子であり，この遺伝子が欠損するような状況になれば動物の行動に変化を生じることを示しているからである。では，実際にこの遺伝子が欠損した動物種がいるか？いたならばその様な動物はどの様な行動を行うものであるか？これらの答えを求めて行けば脳の機能の進化を偶然にせよ必然にせよもたらした要因が特定できる。私は現在，この様な立場より脳の機能を司る遺伝子の探索を行っている。我々は現在まで，チロシンリン酸化酵素の１つ Fyn がマウスの学習，情動行動を制御する遺伝子の１つであることを明らかにしてきた。この Fyn は脊椎動物と脊椎動物にもっとも近いとされる棘皮動物に存在しているが，ヒトに至るまで非常に良く遺伝子配列が保存されている。すなわち，管状神経系をもつ動物において良く保存されている遺伝子であり，この遺伝子欠損はマウスにおいて学習・情動に関わる遺伝子であることが明らかとなっているのである。我々はこの行動制御に重要な Fyn と神経回路形成過程で関連する分子は，１）Fyn と同様に行動制御に重要に関わる分子であろう，２）動物種により結合する分子が異なれば，この分子が脳の機能の変化をもたらした遺伝子であるかもしれない，といった立場より Fyn と結合する分子の解析を試みた。その結果，実際に Fyn と結合する分子が多種存在することが他の研究室より明らかとなり，神経軸索伸長 (NCAM140)，哺乳類大脳皮質形成 (mdab1)，シナプス可塑性（NMDA レセプター）で重要な働きを持つ分子であることが明らかとなってきた。

我々はその中で，Fyn とマウス脳で結合している分子の同定を独自に行い，新たに p130 及び cadherin-related neural receptor (CNR) 分子群の単離に成功した。p130 は Fyn とともにシナプス肥厚部に濃縮するタンパク質であり，興味深いことに C57BL/6 と DBA/2 マウスの系統間で分

子量の差が認められ，マウス亜種分化の過程で変異してきた遺伝子産物であることが明らかとなった。このDBA/2マウスではC57BL/6マウスに較べ，空間学習障害，情動異常，アルコールに対する感受性が高い，聴覚性痙攣発作が起こりやすいなどが認められている。Fyn欠損マウスでは我々が現在までに同様の傾向の行動障害を認めており，Fynと結合するp130の種分化における変化がDBA/2マウスにおける行動異常をもたらした原因遺伝子であることも考えられる。また，我々が酵母でのFyn結合タンパク質検出系で見いだしたcadherin-related neural receptor (CNR)分子は，細胞外にカドヘリンモチーフを持つ膜タンパク質の構造を持つものであり，マウスで約20種から成る新たな遺伝子ファミリーであることが明らかとなった。このタンパク質は生後10－20日で発現量のピークを持ち，特異抗体作製によりシナプス肥厚部に存在していることが明らかとなった。また，このファミリーはzoo blotの結果，脊椎動物の進化と共に遺伝子の数が徐々に増加してきたものであることから，哺乳動物の高次な脳に至る過程で遺伝子重複を起こした遺伝子群であり，脳の高次機能獲得との関連性が考えられる。

(3) 脳障害後のシナプス再生機構

山田光則（新潟大・脳研）

成熟した中枢神経系で機能再建はどの程度可能か？　成熟脳をもちいたin vivoの実験系で脳障害を再現した場合，病巣では組織破壊と修復が互いに関連しつつ同時に進行するため，シナプス再生を解析するのは必ずしも容易ではない。さらに，シナプスという微小構造を研究対象とするため，電顕的観察が不可欠となるが，電顕の観察可能領域の極端な制約にもかかわらず，多数の固体間での経時的観察を要し，このため，再現性のある結果を得るには解析部位を限定する必要性も生ずる。我々は成熟脳に一定の凍結脳外傷を与えた実験動物を作成し，脳浮腫と反応性アストロサイトの機能的役割など，中枢神経系の病巣修復機構の特異性を解析してきた。この外傷モデルでは，大脳皮質病巣辺縁部の極めて限局した領域でシナプスが活発に再生する現象が見いだされた。Pre-およびpostsynapseのマーカーを用いた免疫組織化学的観察から，同部では神経終末の再生が先行し，これに遅れてシナプス後領域が形成されることが明らかになった。これらの反応に伴い，病巣作成5日目に正常の43%にまで減少したシナプス数が，わずか3週目には86%にまで急速に回復した。興味深いことに，このシナプス数の変化は棘シナプスの減少と再生によるものであった。

(4) 蛋白質メチル化欠損と神経変性

白澤卓二（東京都老人研・神経生理）

蛋白質イソ体アスパラギン酸メチル転移酵素(PIMT)は，蛋白老化に伴い蓄積するイソ体アスパラギン酸化蛋白の修復に関与している酵素であるとin vitroのメチル化実験から推測されている。実際，in vitroではイソ体アスパラギン酸化修飾を受けたペプチドがメチル化を受けた後に，L体アスパラギン酸に修復される事が証明されている。しかしながら，in vivoにおける修復機能および生物学的意義に関しては不明であった。我々はPIMTの生体内における役割を明らかにする目的で遺伝子標的組換えの手法を用いてPIMT欠損マウスを作製した。PIMT欠損マウスはメンデルの法則に従って生まれたが，生後4週から12週の間にてんかん発作で全例死亡した。臨床的には，大発作，ミオクローヌス型発作が高頻度で観察された。抗けいれん剤であるDPA（デパケン）の投与により生存曲線が約4週間延長したが，致死的予後を変えることはできなかった。PIMTの基質であるイソ体アスパラギン酸化蛋白は欠損マウス脳で9倍に増加し，生後4週間以降脳重量は増大した。形態学的検索では，大脳皮質第II-III層の錐体細胞の樹状突起の異常樹状化と異常発芽を認め，電顕では微少管の高密度化・束化を認めた。行動学習テストでは空間学習能の低下を認め，電気生理学的には海馬CA3領域で部位特異的に長期増強が消失していた。以上の結果よりイソ体アスパラギン酸化蛋白質のメチル化は脳の機能維持に必須である事，その欠損は進行性のてんかんおよび学習・記憶障害をもたらすことを明らかにした。

(5) ミクログリアとシナプス可塑性

澤田　誠（藤田保衛大・総合医科研・病態生化学，さきがけ21）

記憶や学習といった高次脳機能の研究において神経細胞を調べるだけで本当に理解できるのだろうか，という疑問が今回の私の研究の出発点である。 現在LTPやLTDに見られる神経伝達の効率の変化が神経の可塑性の基本メカニズムと考えられているため，神経細胞でのイオンチャンネルや細胞内伝達系の変化が多く調べられている。しかしこのような神経伝達の効率の変化はシナプスの形態変化を伴うことも報告されており，分解再構築にかかわるプロテアーゼの役割も重要であると考えられている。脳内でのプロテアーゼ活性の多くはミクログリアやアストロサイトによって産生されるため，LTPやLTDの形成に大きく関わっていると考えられるが，これまでの電気生理学的手法ではアプローチがむずかしくほとんど調べられてこなかった。私はミクログリアを研究する過程でミクログリア細胞株を樹立することに成功し，これをラット新生児由来大脳皮質スライス培養に添加するだけで持続的なevoked potentialの増大が見られることを見い

だした。この系ではテタヌス刺激を加えることなく300－400％のLTP形成が生じる。現在，このex vivoシステムの利点を生かして，ミクログリアの何がその責任物質であるかを調べている。最近，ミクログリアに発現するプロテアーゼをgene targeting法で不活性化するとカイニン酸誘導性のけいれんや神経細胞死が消失することが示された。カイニン酸誘導のけいれんはその発生の分子メカニズムがLTP形成と類似した部分があり，神経の可塑性形成にミクログリアのプロテアーゼ活性が関わっている可能性が予想できる。したがってミクログリアは記憶学習といった高次機能まで調節しているかもしれない。

これまでミクログリアはマクロファージの一種と考えられ，マクロファージ特異抗体を用いて同定されてきた結果，ミクログリアが脳に出現するのは出生直後と考えられていた。しかし，私はマクロファージ特異抗体では検出されないミクログリアのサブタイプを見いだし，その特異抗体で発生途上の脳を検索して，ミクログリアが発生のかなりはやい時期から（マウスのe12-13day）ですでに脳内に存在していることを見いだした。こんなにはやい時期から脳に存在する細胞であるからにはきっと何か重要な役割をしているに違いないと考えて，現在実験を行っている。そのひとつのアプローチ法として，ミクログリア細胞株が末梢血管投与によって脳に高親和性を持って移入することができることを利用して，遺伝子操作により機能をデフォルメしたミクログリアを生体脳に導入し，その影響を調べるという試みを行っている。現在までに脳循環動脈だけでなく末梢静脈（尾静脈）経由でも脳に細胞が移入できること，成功率がまだ低いもののexouteroでの胎児脳への細胞導入がシステムとしては実用に耐えることがわかった。この方法論の特徴としてとくにexouteroでの細胞導入－遺伝子発現は発生の途中の任意の時点で細胞を経由して調べたい遺伝子の導入を局所的に行うため，従来おこなわれているトランスジェニックやジーンターゲッティングの手法では致死性や他の組織への影響によって解析できなかった遺伝子でさえも解析が可能になるという利点も持つ。

(6) グリア型グルタミン酸トランスポーターによるシナプス伝達の制御

田中光一（精神神経センター・疾病研究第4部）

グルタミン酸トランスポーターは，神経終末から放出されたグルタミン酸を除去し，細胞外濃度を低下させることを主な役割としている。従って，シナプス伝達の終結に関る他，シナプスの形成・神経細胞のグルタミン酸興奮毒性からの保護にも重要な役割をはたしていることが示唆されている。現在までグルタミン酸トランスポーターには，グリア型2種類(GLT1, GLAST)と神経型2種類(EAAC1, EAAT4)の計4種類のサブタイプが知られている。しかし，それぞれのサブタイプを特異的に抑制するアンタゴニストはなく，個々のサブタイプの役割は不明であった。我々は，最近グリア型グルタミン酸トランスポーター欠損マウスの作成に成功し，GLT1・

GLAST のシナプス伝達における役割を解析したのでその結果を報告する。GLT1 は海馬のグリア優位に存在するので，海馬スライスを用い CA1 錐体細胞における興奮性シナプス後電流 (EPSC) を解析した。EPSC の kinetics は変化ないが，L-AP5 （NMDA 受容体の弱いアンタゴニスト）の抑制作用が GLT1 ノックアウトマウスでは低下していた。この結果は，GLT1 は EPSC の kinetics 決定に関与していないが，シナプス間隙からのグルタミン酸クリアランスには重要な役割を果たしていることを示している。また，最近になって Kullmann らは，海馬 CA1 領域の長期増強 (LTP) のメカニズムとして，「silent シナプス仮説」に対して「spillover 仮説」を主張した。海馬において，グルタミン酸の spillover を制御する最も重要な機能分子は GLT1 であり，GLT1 ノックアウトマウス海馬 CA1 領域でシナプスの可塑性を調べたところ，LTD は起こるが LTP は起こらないことがわかった。この現象のメカニズム解明の作業仮説として，「GLT1 ノックアウトマウスでは spillover が常に起きているため LTP が飽和している」と考えて，現在解析中である。GLAST は小脳のバーグマングリア優位に存在するので，小脳スライスを用いプルキンエ細胞の EPSC を解析した。EPSC の kinetics · PDA （AMPA 受容体の弱いアンタゴニスト）の抑制作用に変化はみられなかった。この結果から，GLAST はプルキンエ細胞の EPSC の kinetics 決定・グルタミン酸のシナプス間隙からの除去に重要な役割を果たしていないことがわかった（小脳の可塑性（長期抑圧）における GLAST の関与に関してはまだ解析をしていない)。グルタミン酸の spillover が，長期増強などの可塑的状態だけでなく通常のシナプス伝達でも起きているかどうかはまだ確定していないが，もし起きているとしたらシナプス伝達の入力特異性などいままでの脳における情報処理概念の変更を余儀なくするものである。グリア細胞は神経伝達物質の spillover を制御することにより，シナプス伝達・可塑性において重要な役割を果たしていると考えられる。また，小脳と海馬におけるグリア型グルタミン酸トランスポーターの役割の違いについても討論した。

15. ニューロン・グリア細胞死の病態：その形態と機能の相関

1998．1．8－1．9

代表者：西野仁雄（名古屋市大・医・生理）

世話人：岡田泰伸（生理研）

(1) 脳梗塞に伴う遠隔部の神経細胞死

田村　晃（帝京大・医・脳神経外科）

(2) 脳虚血に対する低体温療法後の機能変化と神経細胞死

宮本　修，中村丈洋，板野俊文（香川医大・生物，脳神経外科）

(3) 霊長類に特異的な虚血性神経細胞死の病態と治療：カルパイン・カテプシン仮説

山嶋哲盛（金沢大・医・脳神経外科）

(4) 神経細胞死とリソソームカテプシン群

内山安男（大阪大・医・解剖）

(5) 神経系細胞におけるカルシニューリン依存性アポトーシス

浅井昭雄（東京大・医・脳神経外科）

(6) 細胞内 Ca^{2+} 上昇と虚血耐性

島崎久仁子，川合述史（自治医大・生理）

(7) 虚血性神経細胞死のカルシウム依存性機構

工藤佳久（東京薬大・生命科学研）

(8) ラットにおける一過性前脳虚血の場所学習および海馬体内興奮伝播様式への影響

田村了以，栗本博昭，中田恭司，村本健一郎，小野武年

（富山医薬大・医・生理，金沢大・工・電気情報）

(9) アミロイド-β ペプタイドによるミクログリアからのグルタミン酸放出の増強

野田百美（九州大・医・生理）

(10) 脳虚血と Na, K-pump

山本悟史（久留米大・医・生理）

(11) グリア細胞由来の低酸素ストレス蛋白のクローニングとその機能

小川　智，小澤健太郎，遠山正弥（大阪大・医学研究科・機能形態）

(12) ミエリンプロテオリピッド遺伝子異常とオリゴデンドロサイト変性

池中一裕（生理研）

(13) NO を介するニューロン死を抑制する内因性保護因子

赤池昭紀（京都大・薬・薬理）

(14) ミトコンドリア toxin による線条体特異細胞死

西野仁雄，熊崎路子，飛田秀樹，島野泰暢（名古屋市大・医・生理）

⑮ 細胞容積調節機構と細胞死：序論

岡田泰伸，森島　繁，挾間章博，老木成稔（生理研）

参加者氏名

野田百美，鍋倉淳一（九州大・医），山本悟史（久留米大・医），内山安男，小川　智，遠山正弥（大阪大・医），赤池昭紀（京都大・薬），山嶋哲盛，土屋勝裕，良田雅紀，趙　　亮（金沢大・医），田村了以（富山医薬大・医），中村　健，工藤佳久（東京薬大），島崎久仁子（自治医大），浅井昭雄（東京大・医），田村　晃（帝京大・医），浅野孝雄，松居　徹，谷口民樹（埼玉医大），板野俊文，宮本　修，中村丈洋（香川医大），岡田泰伸，森島　繁，清水貴浩，范　海天，池中一裕，濵　　清（生理研），西野仁雄，飛田秀樹，島野泰暢（名古屋市大・医）

研究会概要

細胞死に興味をもつ研究者が集まり，中枢神経細胞，末梢神経細胞及びグリア細胞が toxin，虚血，過興奮，外傷，栄養因子／グルコース／O_2 不足など種々の条件下で死に至る過程を in vitro, in vivo の両系で解析し，その成果を発表し討論した。ニューロン及びグリア細胞死の病態，形態異常，機能不全が多面的に明らかにされ有意義な会であった。

(1)脳梗塞に伴う遠隔部の神経細胞死

田村　晃（帝京大・医・脳神経外科）

虚血による神経細胞病変は通常は急速に進行してゆくが，短時間の虚血負荷後に緩徐に進行する遅発性神経細胞死の発見以後，ゆっくりと進行する神経細胞死が注目され始めた。これらの細胞死は，いずれも虚血負荷のかかった部位での細胞死であるが，脳梗塞で直接虚血にさらされない遠隔部においても二次的な細胞死が起こる。このような神経細胞死は retrograde degeneration, anterograde degeneration, transsynaptic degeneration によって生じる。ラット中大脳動脈閉塞モデルにおける長期間の組織学的観察では，中大脳動脈の灌流領域外で非虚血部である閉塞側の視床や黒質に遅発性の神経細胞死が起こり，これらの組織は徐々に萎縮してゆく。中大脳動脈閉塞側の視床では閉塞１週間後にわずかな神経細胞傷害が認められ，その後，神経細胞の脱落・グリオーシスが生じ萎縮へと進行してゆく。この視床の遅発性の神経細胞死，組織萎縮は臨床例でも CT や MRI により観察される。同側の黒質では，中大脳動脈閉塞直後より局所脳血流量の増加やグルコース代謝の亢進がみられ，１週間から２週間後に神経細胞の脱落・組織の萎縮が起こる。その機序としては線状体の梗塞による線状体―黒質路を介しての脱抑制による trans-synaptic degeneration によるものと推定される。この黒質の変性も臨床例で認められ，線状体を含む梗塞

例のMRIでは，発症1～2週間後よりT_2強調画像で同側黒質の高信号病変として描出される。

(2)脳虚血に対する低体温療法後の機能変化と神経細胞死

宮本　修，板野俊文（香川医大・生物）
中村丈洋（香川医大・脳神経外科）

低体温療法は，虚血性神経障害に対して有効な治療法であるが，虚血後の低体温療法は，長期的にはその保護効果が減弱することが最近報告されている。そこで本研究では，低体温療法後の海馬神経細胞死の過程と学習・記憶機能の変化について検討した。砂ネズミの両側総頸動脈を5分間結紮し，その直後に32℃，4時間の低体温を導入した。低体温終了後，1週間と1ケ月後にそれぞれ免疫組織化学（抗NMDAR1，抗GluR2/4，抗GFAP，抗MAP-2の各抗体），TUNEL染色，アガロースゲル電気泳動，学習・記憶機能（八方向迷路試験，海馬スライスでの長期増強形成）の検討を行った。低体温を行うと虚血1週間では海馬神経細胞は形態学的には正常であったが，1ケ月後では，CA1領域の約3割程度の神経細胞が消失または強い好酸性の染色性を示した。これらの細胞の一部はTUNEL染色陽性を示し，また，電気泳動ではDNAの断片化を示した。八方向迷路ではエラー数，合計時間共に，1週間では正常群と差はなかったが，1ケ月経つと成績が有為に悪くなった。一方，長期増強の形成においては1週間の時点ですでに抑制傾向がみられた。以上のことから，虚血後に低体温療法を施した場合，一時的には神経細胞死を防ぐが，慢性期になると約3割程度の海馬CA1の神経細胞が障害され，その内の一部はアポトーシスの過程をとって死ぬ可能性がある。また，形態的には変化がでていない低体温後1週間の時点においても，シナプスレベルでの機能低下がすでに生じていると思われる。

(3)霊長類に特異的な虚血性神経細胞死の病態と治療：カルパイン・カテプシン仮説

山嶋哲盛（金沢大・医・脳神経外科）

ニホンザルの20分全脳虚血後に海馬CA1に生じる虚血性神経細胞死の成因に関して，システイン・プロテアーゼに着目して検索した結果，カルパインとカテプシンが重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかも，カテプシンの特異的なインヒビターであるCA-074を用いて虚血性神経細胞死の発生を抑えることに成功した。虚血性神経細胞死の最初のトリガーとなるのは，一過性脳虚血中に海馬のCA1ニューロンに選択的にカルシウムイオンの著しい上昇が生じることである。このカルシウムイオンは血流再開後の超早期（おそらく1時間以内）にμカルパイン

を活性化する結果，活性型μカルパインはリソソーム膜を空胞化しカテプシンBを細胞の内外に放出させる。このカテプシンBの放出は虚血直後より3日目まで持続的におきるが，この間，カテプシンBは構成蛋白を緩徐に破壊してゆくため，CA1ニューロンは虚血3日目より細胞死をきたし始め，5日目には全滅するものと思われる。エポキシコハク酸の誘導体であるCA-074はリソソーム外に放出されたカテプシンBを特異的にブロックするために，細胞構成蛋白の分解はおきず，虚血負荷後の投与でも遅発性神経細胞死を抑制し，約67％のCA1ニューロンが虚血性神経細胞死を免れた。

(4)神経細胞死とリソソームカテプシン群

内山安男（大阪大・医・解剖第一）

私達は，神経細胞のアポトーシスに際してリソソームカテプシン群が活性化されることを見い出した。そこで，細胞死の過程でリソゾームが果たす役割を解析するため，ラット褐色細胞腫由来のPC12細胞を用いて検討した。同細胞は，無血清培地で低密度培養すると24時間以内にほとんどの細胞はアポトーシスに陥ることが知られている。この細胞死では，caspase-3が活性化され，そのインヒビターとして知られるacetyl-DEVD-cho (DEVD)の添加で細胞死は抑制されることが分かった。さらに，リソゾームカテプシン群が如何に関与するかを同定するため，システインプロテアーゼやアスパル銀酸プロテアーゼのインヒビターであるE64，ロイペプチンおよびペプスタチンAを各々培地に添加したが生存率に変化はなかった。しかし，DEVD存在下でE64やロイペプチンを添加すると生存率は有意に低下した。さらに，ペプスタチンAを添加すると生存率は上昇した。そこで，細胞死に陥る系でカテプシンB, L, Dの活性を調べたところ，LとDは培養開始後3時間ですでに上昇するが，Bは1／5に活性が低下した。このことから，カテプシンBの特異的インヒビターであるCA074をこの系に用いた結果，DEVD存在下で生存率が低下し，ペプスタチンAで元に戻ることがわかった。さらに，カテプシンBとDによって制御される細胞死の経路をさらに確かめるためにこれら酵素のアンチセンスオリゴヌクレオチドを作成したところ，これら酵素の蛋白合成を抑制する配列を見い出すことができ，これらのアンチセンスの実験から，カテプシンDが細胞死惹起因子として，また，Bがそれを抑制することがわかった。

(5)神経系細胞におけるカルシニューリン依存性アポトーシス

浅井昭雄（東京大・医・脳神経外科）

【背景および目的】我々は以前，グリア由来細胞（グリオーマ細胞）にc-myc遺伝子を高発現させたときにアポトーシスが誘導されることを報告した。その分子機序を解析する目的でdifferential display PCR法を用いてこのアポトーシスの過程で変動してくる遺伝子をクローニングしたところ，複数の分子種が得られたが，そのうちの一つがcalmodulinであった。calmodulinはcalcineurin活性を調節すること，および，cyclosporin A, FK506等，calcineurinの阻害剤が虚血による神経細胞死抑制に効果があることを考え併せて，神経系細胞の細胞死にはcalciumを介したシグナル伝達系が関与しているという仮説を立て，それを検証することを本研究の目的とした。

【方法】遺伝子導入株も含む各種グリオーマ細胞株およびその他astrocyte初代培養細胞，NGF処理後のPC12細胞等をCaNの阻害剤であるcyclosporin A (CsA)で処理したもの，あるいはinducible promoterを有する哺乳動物発現ベクターに組み込んだCaNcDNAをT98Gヒトグリオーマ細胞に導入して得られたCaNの高発現クローンに対して，抗Fas抗体，温熱，抗がん剤等によりアポトーシスの刺激を加えたときに誘導されるアポトーシスの程度をCPP32活性，LDH release assay等で定量化し，コントロールと比較した。

【結果】CsAで処理した細胞では各種刺激によるアポトーシスはいずれも濃度依存性に軽減された。また，CaNを強制発現させると20%程度の細胞にアポトーシスが誘導され，強制発現させていないコントロールと比較して，各種アポトーシス誘導刺激に対してCPP32活性，%LDH release等が数倍に上昇した。レトロウイルスベクターにCaN cDNAを組み込んだin vitroでの追試でも同様のアポトーシス増強効果が認められた。

【結論】CaNは，それ自体は致死効果は大きくないが，神経系細胞でのアポトーシスを著明に増強する。

(6)細胞内 Ca^{2+} 上昇と虚血耐性

島崎久仁子，川合述史（自治医大・生理1）

海馬は脳虚血に対して最も脆弱な部位であり一過性虚血後に起る海馬錐体細胞死は記憶喪失や痴呆につながるため臨床面からも問題になっている。スナネズミを用いた虚血実験で2分の非致死的虚血負荷後の海馬CA1錐体細胞が2次虚血への耐性を獲得することを報告している。この耐性獲得は可逆的で2分虚血後2週後には消失し，1分の虚血負荷では耐性獲得は起こらない。

我々はスナネズミ海馬スライスでrhod-2を用いたカルシウム・イメージング法を用い，虚血耐性海馬の虚血負荷時の細胞内カルシウム濃度変化を調べた。通常，海馬スライスに無酸素／無血糖を負荷すると数分後に急激な細胞内カルシウム増加が起こるが，虚血耐性を獲得した海馬では無酸素／無血糖負荷による細胞内カルシウム上昇が有意に抑制されていた。この細胞内カルシウム上昇抑制は2分の虚血負荷2週間以内でのみ観察され，1分の虚血負荷や2分の虚血負荷2週間以降では無処理の海馬と有意差は見られなかった。このことより，虚血耐性を獲得した海馬では虚血負荷時の細胞内カルシウム濃度上昇の抑制が起こっており，これが虚血性神経細胞死抑制につながると考えられる。脳虚血後はグルタミン酸受容体などを介する細胞内カルシウム流入が起こり細胞死の引金となると考えられているが，虚血耐性を獲得した海馬では細胞内カルシウム上昇を抑制し，死のカスケードの最初のスイッチが入るのを抑えている。

(7)虚血性神経細胞死のカルシウム依存性機構

工藤佳久（東京薬大・生命科学・生体高次機能）

脳は激しいエネルギーを要求する組織であり，エネルギー供給が絶たれたときに神経細胞が激しい障害を受ける。しかし，脳血流障害時の神経細胞障害には著しい部位特異性があり，特に可塑性が高いと考えられる海馬領域，大脳皮質および小脳の神経細胞に障害が生じやすい。これらの部位の中にもさらに障害を受けやすい部位が認められる。我々は，虚血性細胞死の初期段階に著しく高まる細胞内カルシウム濃度が急性および遅延性神経細胞死の主な原因と考えており，スライス標本においてカルシウム濃度の画像処理による計測を重ねてきた。本研究ではさらに麻酔動物において海馬CA1領域の細胞内カルシウム濃度の計測を行い，短期の大きなカルシウム濃度の上昇が一週間後までに徐々に生ずる遅延性神経細胞死の原因であることを証明するための実験を行った。すなわち，ラットまたはスナネズミにおいて海馬CA1レベル神経細胞を蛍光カルシウム指示薬，fura-2/AMで染色し，前脳に入る血流を一時的（約10分間）に停止することにより虚血を生じさせたときの神経細胞のカルシウム濃度の変動を光ファイバー蛍光計測装置によって測定した。さらに，この動物を覚醒させて，一週間まで飼育した後，海馬を摘出して，その組織像とカルシウム濃度上昇の程度と関係を検討した。その結果，一週間後の神経細胞死の程度は虚血時のカルシウム濃度上昇の程度と極めてよく一致していることが判明した。現時点では虚血に対する脆弱性の部位差の原因は不明であるが，我々はカルシウム濃度の恒常性に関わる機構との関連性が高いと考えている。

(8)ラットにおける一過性前脳虚血の場所学習および海馬体内興奮伝播様式への影響

田村了以，栗本博昭，中田恭司，小野武年（富山医薬大・医・第２生理）
村本健一郎（金沢大・工・電気情報）

海馬体CA1領域は虚血負荷に対する感受性が高く，一過性前脳虚血により遅発性神経細胞壊死の起こることが知られている。本研究では，ラットに15分間の一過性前脳虚血を負荷してCA1領域に選択的神経細胞壊死を起こし，１）ラットの空間認知機能，および，２）海馬体内興奮伝播様式への影響を，行動学的（場所学習行動課題）および神経生理学的（電位感受性色素で染色した海馬体スライス標本による光学的計測）に調べた。その結果，１）場所学習行動課題では，正常ラットは報酬のある場所を学習・記憶し効率的に報酬を獲得できるようになったが，脳虚血負荷ラットはこの課題の習得が有意に遅れた；２）正常海馬体スライス標本では，苔状線維刺激により神経興奮がCA3領域を経てCA1領域へと伝播し，また，Schaffer側枝刺激によりCA1領域内を海馬台方向へと伝播したが，脳虚血負荷海馬体スライス標本では，苔状線維刺激によりCA3領域まで伝播した興奮はその後消失してCA1領域には到達せず，また，Schaffer側枝刺激はCA1領域内に興奮伝播をほとんど誘発しなかった。以上の結果より，ラットに一過性前脳虚血を負荷すると海馬体内神経回路の一部が損傷され，興奮伝播障害およびそれによる空間認知機能障害の起こることが示唆された。

(9)アミロイドーβペプタイドによるミクログリアからのグルタミン酸放出の増強

野田百美（九州大・医・第二生理）

アルツハイマー病患者の脳にみられる老人斑はアミロイドーβペプタイド(Ab)の凝集とそれを取りまくミクログリアおよびアストロサイトより構成され，ミクログリアが異常に活性化されて有害な分子(サイトカインやタンパク質分解酵素, NOや活性酸素類)を放出することが，ニューロンの死と痴呆を招く一因と考えられている。一方，虚血や障害時には，グリア細胞から放出されるグルタミン酸が神経毒になっている可能性があり，アルツハイマー病の脳では高濃度のグルタミン酸がミクログリアから放出される可能性も示唆されている。そこで，我々はグルタミン酸放出の機序として逆向きグルタミン酸トランスポーターを想定し，グルタミン酸トランスポーターを電気生理学的に測定して，それに及ぼすAbの影響を検討した。その結果，ラット大脳皮質より単離した後にAb 25-35存在下で数日間培養したミクログリアでは，非存在下に比べて，細胞外Kイオンによって惹起されるグルタミン酸（及びNaイオン）の放出（外向き電流）が約３倍に増強された。このことは，Abによってミクログリアが活性化され，脱分極によって放出

される大量のグルタミン酸が神経毒になっていることを示唆している。

⑽脳虚血と Na, K-pump

山本悟史（久留米大・医・生理学第一）

実験的脳虚血により，ラット海馬 CA1 錐体細胞は約1.5分後一過性の過分極電位を発生した後，約 6 分後急峻な脱分極電位を発生し，非可逆的に死に至る。Na, K-pump の選択的阻害薬である ouabain 投与によって同様の膜電位変化が生じることから，虚血性神経細胞死の発生に Na, K-pump が関与することが考えられる。虚血初期に発生する ATP 依存性 K^+チャネルと Ca 依存性 K^+チャネルの開口による過分極電位をそれぞれ tolbutamide と低 Ca^{2+}液で抑制すると，虚血開始約 1 分後より脱分極電位が観察されるようになった。この脱分極電位はその ATP 依存性，電流—電圧関係，及び ouabain 感受性より Na, K-pump の抑制によって発生していることがわかった。そこで Na, K-pump 機能を直接測定しようとパッチクランプ法で Na, K-pump 電流 (Ip) の記録を試みたが，スライス標本を用いた海馬 CA1 錐体細胞では急速な Ip の減衰と run-down 現象により詳しい解析は困難であった。次に虚血病態におけるグリア細胞の Na, K-pump 機能を調べるために，培養アストロサイトを用いて Ip を測定したところ，通常状態において Ip は細胞内 Na^+と細胞外 K^+に依存して活性化され，細胞内への Na^+流入が Ip 活性に影響を与えていることがわかった。今後，虚血時におけるアストロサイトの Na, K-pump 機能について解析を進める予定である。

⑾グリア細胞由来の低酸素ストレス蛋白のクローニングとその機能

小川　智，小澤健太郎，遠山正彌（大阪大院・医学研究科・機能形態学第 2 解剖）

アストログリアは中枢において虚血や感染などの環境変化にきわめて強いだけでなく，このような環境下にあっても神経保護機作を発動する。アストログリアがこのような環境で神経保護機作を発揮できるためには，アストログリア内に環境変化に耐え抜くための何らかのツールが発現しているはずである。このような発想に基づき我々は，ラットのアストログリア培養細胞より新規ストレス蛋白 ORP150 (150kDa Oxygen Regulated Protein) の単離・クローニングを行った。低酸素環境における ORP150 の細胞保護機作を明確とするため，我々は HEK (human embrio kidney) 細胞を用いて，ORP150 の sense および antisense stable transformat cell line を作成した。この ORP150 permanent antisense transformat (ORP150 (-) cell) では，正常酸素分圧下の細胞増

殖，過酸化水素や熱ショックなどの環境ストレスには wild type と同様の抵抗性を示すのに反して，遷遠した低酸素環境に対する抵抗性が著しく低下する。以上の事実は，ORP150 が低酸素ストレスに対する必須の細胞内ツールであることを示している。

(12)ミエリンプロテオリピド遺伝子異常とオリゴデンドロサイト変性

池中一裕（生理研）

ミエリンプロテオリピド蛋白質 (PLP) は中枢ミエリンの主要な蛋白質である。PLP 遺伝子突然変異体の神経系では中枢ミエリン膜が不安定になるだけでなく，その産生細胞であるオリゴデンドロサイトが未分化なまま変性脱落する。このことより PLP 遺伝子はミエリン膜の安定化とオリゴデンドロサイトの分化因子として機能していることが示唆された。われわれは，この点について検討し，PLP 遺伝子産物（PLP および DM-20）のC末端の断片が直接細胞外に放出され，オリゴデンドロサイトの分化を促進することを示した。さらに，この分化活性はその一部分である18アミノ酸残基からなるペプチドでも発現されることも見いだした（Nakao, et al., J. Neurochem., 64, 2396-2403, 1995; Yamada, et al., 投稿準備中)。

PLP 由来の分化因子の不足だけが PLP 突然変異体の病因であれば，正常 PLP 遺伝子を導入することによって，PLP 突然変異体の症状は回復するはずである。しかしながら，PLP トランスジェニックマウスと突然変異体の交配によってもその症状がほとんど回復しないばかりか，突然変異を持たないマウスにおいてさえ，PLP 遺伝子が数コピー増えるだけでミエリン形成異常が生じた (Kagawa, et al., Neuron, 13, 427-442, 1994)。この PLP トランスジェニックマウスにおける PLP の局在を検討したところ，オリゴデンドロサイトの粗面小胞体およびゴルジ装置に貯留しており，そのミエリンへの輸送経路に障害の生じていることが明らかとなった（Macklin, et al., 投稿準備中)。この結果，オリゴデンドロサイトのゴルジ装置は膨潤しており，細胞変性の主な原因となっていると考えられた。PLP 突然変異体でも基本的には同じ現象が起こっていると思われる。

イノシトール6リン酸結合蛋白質は細胞内輸送系の調節に深く関与しているが，われわれは PLP にイノシトール6リン酸結合活性の存在することを見いだし，上記仮説の正当性を裏付けた (Yamaguchi, et al., J. Biol. Chem., 271, 27838-27846, 1996)。すなわち，PLP はミエリン膜の安定化とオリゴデンドロサイトの分化因子として働く他，PLP などの蛋白質のミエリン膜への輸送系にも関与している。PLP の突然変異体や遺伝子過剰発現マウスにおいては PLP のミエリン膜への輸送が正常に行われず，オリゴデンドロサイトが変性すると考えられる。

現在，PLP の膜輸送系に対する役割を検討しており，これを理解することにより，PLP 突然変異体治療法の確立を目指したい。

⑬ NO を介するニューロン死を抑制する内因性保護因子

赤池昭紀（京都大・薬・薬理）

グルタミン酸— NO 系により誘発されるニューロン死を抑制する内在性物質を探索する目的で，培養線条体細胞条件培地 (CM) および牛胎仔血清 (FCS) に含まれる神経保護活性物質の探索を行った。はじめに，ラット新生仔より黒質を含む中脳切片および線条体切片を摘出し共培養を行い，培養線条体細胞に由来する神経保護活性を検討した。共培養により中脳切片から線条体切片へのドーパミンニューロン投射が確認され，NMDA により誘発される神経毒性は，中脳切片単独培養で顕著に現れ，中脳と線条体の共培養により有意に減弱した。このような共培養による保護作用は中脳と小脳の共培養では観察されなかった。そこで，実験の容易なラット胎仔由来ニューロンの単離培養系を用い，線条体に由来する神経保護活性を検討した。ラット胎仔由来培養線条体細胞はグルタミン酸神経毒性に対して抵抗性を示した。培養大脳皮質細胞のグルタミン酸神経毒性に対する CM の作用を検討したところ，CM およびその凍結乾燥物がグルタミン酸神経毒性を抑制し，その神経保護活性成分はエーテル等の有機溶媒により抽出された。CM 中に10％含まれる FCS のエーテル抽出物にも弱いグルタミン酸神経毒性抑制作用が認められた。FCS エーテル抽出物は NO ドナーの神経毒性も抑制した。これらの結果は，CM および FCS に含まれる非蛋白性の疎水性化合物が NO を介するグルタミン酸神経毒性を抑制することを示す。

⑭ミトコンドリア toxin による線条体特異細胞死

西野仁雄，熊崎路子，飛田秀樹，島野泰暢（名古屋市大・医・生理）

コハク酸脱水素酵素を非可逆的に阻害する 3 -ニトロプロピオン酸 (3-NPA) をラットに全身投与（20mg/kg, i, p., 1 日 1 回，2 ～ 3 日間）すると，両側の線条体への水，アルブミン，IgG の漏出がおこり，rolling, paddling などの運動過多症状を示した。これらの動物では外側線条体動脈領域における Factor Ⅷ関連因子免疫活性の増大，アストログリア（GFAP 陽性細胞）の膨化，破裂，消失，そして MAP-2 免疫反応の低下が認められた。皮質除去によりグルタミン酸入力を欠如した動物あるいは黒質・線条体ドパミン路の破壊によりドパミン入力を欠如した動物では 3-NPA によるこれらの線条体傷害は抑制された。

⑮ 細胞容積調節機構と細胞死：序論

岡田泰伸，森島　繁，挾間章博，老木成稔（生理研）

細胞は，生理的条件下においても病理的条件下においても内外の浸透圧バランスの乱れに常に面している。しかし，細胞は容積を一定の正常レベルに回復・維持する能力を持っており，浸透圧性膨張後の容積調節能は regulatory volume decrease (RVD)，収縮後のそれは regulatory volume increase (RVI) と呼ばれている。上皮細胞や脳神経・グリア細胞の RVD は K^+チャネルと Cl^-チャネルの活性化による KCl 流出が水流出を駆動することによってもたらされることが知られている。私達は，RVD に関与する容積感受性 Cl^-チャネルは，細胞内 ATP 存在に強く依存し，細胞内遊離 Mg^{2+}に対する感受性も示すことを明らかにした。虚血・低酸素条件下においては，Na ポンプの働きの低下による細胞内カチオン蓄積や，代謝過程における合成・分解反応バランスの分解側傾斜による細胞内小分子蓄積によって細胞は膨張を強いられることが知られているが，これに加えて虚血に伴われる ATP 低下，遊離 Mg^{2+}増による容積感受性 Cl^-チャネルの働きの阻害によって RVD 能も失われることが推定された。これによる持続性膨張は，虚血性細胞死（ネクローゼ）の原因の一つとなるものと考えられる。

16. 脳の情報統合と行動発現のメカニズム
—感覚認知から生体反応形成まで—

1998.1.8－9

代表者：福田　淳（大阪大・医・生理）
世話人：森　　茂美（生理研）

(1) 空間学習における海馬体の役割

西条寿夫（富山医薬大・生理）

(2) 網膜と皮質視覚野から視索核／副視索核へのシナプス結合

車田正男（新潟大・医・解剖）

(3) 一次視覚野の特徴抽出の文脈依存性

佐藤宏道（大阪大・健康体育）

(4) 視覚野抑制性シナプスの長期増強の誘発機構

小松由紀夫（名古屋大・医・生理）

(5) 大脳皮質の局所回路

金子武嗣（京都大・医・解剖）

(6) 神経細胞傷害修復にともなうアミノ酸受容体応答の変化

鍋倉淳一（九州大・医・生理）

(7) 脳スライスを用いた細胞内 Cl^- 濃度の光学的測定法の開発と応用

福田敦夫（名古屋市大・医・生理）

(8) 滑動性眼球運動に関連した弓状溝後部の神経活動

田中真樹（北海道大・医・生理）

(9) 上丘へのアセチルコリン作動性入力による視線制御の修飾機構

伊佐　正（生理研）

(10) 「一般像抽出原則」と三次元表面構造の脳内表現

藤田一郎（大阪大・医・認知脳）

(11) ヒトの手指による grip 運動と皮膚感覚

大木　紫（杏林大・医・生理）

(12) How system の中の What system

泰羅雅登（日本大・医・生理）

(13) 操作された身体映像に対するニホンザルの視覚反応

入来篤史（東邦大・医・生理）

(14) 「刷り込み」記銘内容と痕跡

松島俊也（名古屋大・理・動物）

⑮　淡水カタツムリの味覚条件付と咀嚼リズム CPG への修飾性入力の可塑性

藤戸　裕（札幌医大・生理）

⑯　妊娠中の母体ストレスによる脳の発達の影響

富士岡隆（山口大・医・生理）

⑰　聴覚入力と発声運動発現

坂本尚志（旭川医大・生理）

⑱　膀胱に尿が溜まるとどうして目が覚めるのだろうか

小山純正（福島県立医大・生理）

⑲　感覚の非特殊系入力と行動

玉井靖彦（和歌山県立医大・生理）

⑳　除脳ネコ歩行標本の小脳に同定できた歩行誘発野

森　茂美（生理研）

参加者名

坂本尚志（旭川医大・生理），山口和彦，大木　紫（杏林大・医・生理），金子武嗣（京都大大学院医学研究科・高次脳科学），鍋倉淳一（九州大・医・生理），藤戸　裕（札幌医大・生理），富士岡隆（山口大・医・生理），車田正男（新潟大・医・解剖），藤田一郎（大阪大・医・バイオメディカル教育研究センター），佐藤宏道（大阪大・健康体育・運動生理），大塚曜一郎（筑波大・基礎医学系），入来篤史（東邦大・医・生理），泰羅雅登（日本大・医・生理），西条寿夫（富山医薬大・医・生理），小山純正（福島県立医大・生理），田中真樹（北海道大・医・生理），西野仁雄（名古屋市大・医・生理），福田敦夫（名古屋市大・医・生理），吉村由美子，小松由紀夫（名古屋大・環研・視覚神経科学），松島俊也（名古屋大・農・資源生物環境），玉井靖彦，堂西倫弘，木村晃久（和歌山県立医大・生理），遠藤利朗，斎藤康彦，山本　優，小林　康，相澤　寛，松山清治，宮下英三，森　大志，伊佐　正，森　茂美（生理研），福田　淳（大阪大・医・生理）

研究会概要

平成10年１月８日午後１時から１月９日午後３時30分まで１泊２日で，生理学研究所一階会議室で，20題の口演，35名の参加者をえて，平成９年度生理学研究会『脳の情報統合と行動発現のメカニズム－感覚認知から生体反応形成まで－』を開催した。特に脳の生理学，機能形態学の分野で情報統合と行動発現のメカニズムに関して精力的に研究を展開している，全国の中堅，若手研究者が集まり，最新の研究成果をお互いに披露しあい，感覚，運動，行動に係わる研究上の諸問題について討議を深めた。一般に，日本生理学会総会や日本神経科学会総会などの大型の学会では，感覚，運動，行動などのセッションは違った会場で並列に口演発表が行われるため，お互いに意見交換や討論を深める機会が少ない。それに対して，本研究会のような小規模で的を絞った研究会では，異なった分野の中堅，若手研究者が一会場に集まり，全ての演題に十分な討論が

でき，活発な学問的・人的交流が出来た。

(1) 場所学習における海馬体の役割

西条寿夫，田村了以，小野武年（富山医薬大・医・第一生理，第二生理）

海馬体は，外界の空間的手掛かり刺激や歩行移動時のスピード，方向，回転角度に基づく内的な感覚(前庭感覚および筋肉や関節からの深部感覚など)を統合し，空間情報処理に重要な役割を果たしている。本研究では，自由行動下のラット海馬体よりニューロン活動を記録し，1）小型自動車にラットを載せ，ラットの動き（歩行運動）を制限した状態でラットの居場所を変化させたとき（受動的移動），および2）ラットに能動的に歩行移動させたときの海馬体ニューロンの場所応答性を比較・解析した。その結果，受動的移動ではテストしたすべてのニューロンで場所応答性が低下することが判明した。さらに，サル用自動車を用いてサル海馬体場所ニューロンの応答性を同様に比較・解析した結果，ラットと同様の結果が得られた。以上の結果は，能動的な感覚情報処理が海馬体で行われていることを強く示唆する。

(2) 網膜と皮質視覚野から視索核・副視索核へのシナプス結合

車田正男（新潟大・医・解剖）

網膜と皮質視覚域から視覚入力を受ける視蓋前域視索核 (NOT)，副視索核 (AON) は視運動性反応を調節する部位として知られている。NOT/AON での視覚情報処理過程を解明するため，これらへの入力と NOT/AON ニューロン間の神経連鎖をトレーサー・免疫電顕法により分析した。（1）NOT の網膜終末 (RTs) は大型で，通常の樹状突起およびシナプス糸球体形成に関わる小胞を含む F2 樹状突起 [GABA(＋)] とシナプス結合していた。（2）AON 内の RTs は小型で GABA(-) あるいは GABA(＋) 樹状突起とシナプス結合するが，シナプス糸球体に参加することは稀であった。（3）皮質終末 (CTs) は NOT/AON で同様な形態を示した。CTs は GABA(＋) 樹状突起とシナプス結合することはなかった。以上の結果から以下を示唆する：RTs と CTs はシナプス結合の態度が異なり，NOT/AON の視覚情報処理過程で質的に異なった機能を反映している；RTs は NOT と AON で異なる形態を示し，視覚情報処理における特異な役割を反映している。

(3) 一次視覚野における特徴抽出性の刺激文脈依存性

赤崎孝文，佐藤宏道（大阪大・健康体育）
吉村由美子（名古屋大・環研）

麻酔・非動化したネコの視覚野でニューロン活動を記録し，受容野とその背景に，様々の傾きおよび運動方向の視覚刺激を組み合わせて呈示したときの反応が，受容野のみを刺激したときの反応とどのように異なるのかを調べた。背景刺激は受容野刺激への反応に対して抑制性の効果をもたらすことが多かったが，その効果の強さは受容野と背景刺激の傾きの関係(orientation contrast)に依存して変化した。即ち，傾きがそろって一様になるときに反応は強く抑えられ，傾きの差が大きくなるにつれて抑制効果が弱まった。これは受容野刺激と背景刺激の orientation contrast に依存して図と地の違いを表現するように応答するメカニズムと考えられる。また，かなり明瞭な orientation tuning 特性を示すことから，周囲の方位選択的細胞の活動がこのような反応の修飾作用のもとになっている，と考えられる。

(4) 視覚野抑制性シナプスの長期増強の誘発機構

小松由紀夫（名古屋大・環研・視覚神経科学）

大脳皮質視覚野の GABA 作動性抑制性シナプスには海馬 CA1 領域のグルタミン酸作動性興奮性シナプスに見られるものと同様な連合性の長期増強が生じる。この長期増強は，CA1 の長期増強と異なりシナプス後細胞の膜電位依存性チャンネルの活性化をその誘発に必要としない。その代わり，Gタンパク質に共役する $GABA_B$，アドレナリン性 α1，セロトニン 5-HT2 受容体の活性化と，シナプス後細胞における IP_3 受容体を介する細胞内ストアーからの Ca^{2+} の放出が必要である。α1 と 5-HT2 受容体は phospholipase C の活性化を通して IP_3 を生成し，$GABA_B$ 受容体は α1 受容体を介した IP_3 生成を促進することが知られているので，$GABA_B$ 受容体の活性化により，α1 受容体による IP_3 生成が促進され，シナプス後細胞内に閾値以上の IP_3 が生成されると IP_3 受容体を介して細胞内ストアーから Ca^{2+} が放出されて長期増強が生じるものと思われる。

(5) 大脳皮質の局所回路

金子武嗣（京都大・大学院医学研究科・高次脳形態）

ラットの大脳皮質運動野のスライス標本を用い，Tetrametylrhodamine-Dextran Amine の逆行性標識法・細胞内記録・Biocytin による細胞内標識・多重免疫染色法を組み合せて大脳皮質の局所回路を解析した。皮質第Ⅲ層のグルタミン酸作働性錐体細胞からⅤ層の皮質脊髄投射ニューロンへの入力は豊富であるが，Ⅵ層の皮質視床投射ニューロンへの入力は少ないことが分かった。

次に皮質浅層からの入力の少なかったⅥ層錐体細胞への入力を知るために，体性感覚野Ⅵ層の皮質視床投射ニューロンに逆行性色素を注入し，皮質各層の錐体細胞を細胞内染色した。Ⅳ層とⅥ層の錐体細胞からの入力に比べて，Ⅱ／Ⅲ層とⅤ層の錐体細胞からⅥ層皮質視床投射ニューロンへの入力は少なかった。Ⅵ層の錐体細胞は，皮質浅層からⅤ層の出力ニューロンへの情報処理の流れから比較的に独立していると考えられた。

(6) 神経細胞傷害による NMDA 受容体応答の経時的変化

鍋倉淳一（九州大・医・第二生理）

ラットの延髄迷走神経背側核 (DMV) 運動細胞の軸索を頚部において傷害し，傷害部位に Di-I を付着させた。数日後に DMV 領域から急性単離した Di-I 陽性細胞にパッチクランプ法を適用し NMDA 受容体応答の変化を検討した。傷害後 3 日目に NMDA 応答の膜電位依存性 Mg^{2+} ブロックは最も減弱し10日目には回復した。傷害後10日目には軸索再生はまだ観察されず，また頚部軸索へのコルヒチン投与は Mg^{2+} ブロックを減弱しなかったため，この現象は軸索輸送の障害ではなく細胞傷害によるものと考えられる。受容体レベルでのメカニズムとしては PKC 活性修飾薬投与によっても Mg^{2+} ブロックは減弱したままであった。一方，傷害細胞において NMDA 惹起電流のうち NR2B サブユニットブロッカー感受性電流の割合の変化が観察された。この結果から Mg^{2+} ブロックの減弱は NMDA 受容体構成サブユニットの変化に起因する可能性が示唆される。

(7) 脳スライスを用いた細胞内 Cl —濃度の光学的測定法の開発と応用—

福田敦夫（名古屋市大・医・第一生理）

脳の発達過程や障害時におこる [Cl]i の変化が GABA の作用を変化させ，神経回路機能を変化

させる事が示唆されている。しかしながら，それらに関与する細胞内 Cl^- 濃度調節機構の種類・機能・局在にについてはよくわかっていない。神経回路機能の発達や障害の過程における GABA と細胞内 Cl^- 濃度調節機構の役割を明らかにするため，Cl^- 感受性蛍光指示薬の MEQ を用い，光学的測定法により，脳スライス標本中の神経細胞から同時に $[Cl^-]i$ を測定する方法を開発した。幾つかの問題点も認められたが，空間情報を得られる点で有用な方法であった。大脳皮質体性感覚野では GABA による Cl^- の出入りが発達の過程で逆転すること，無酸素－無グルコースを負荷すると $[Cl^-]i$ は二相性の変化を示すことが明らかになり，これらの部位では生後発達過程や脳虚血中に Cl^- 平衡電位のシフトが起きることが示唆された。

(8) 滑動性眼球運動に関連した弓状溝後部の神経活動

田中真樹，福島菊郎（北海道大・医学系大学院・統合生理・認知行動）

滑動性眼球運動の制御に弓状溝後部が関与することが知られている。サル弓状溝後壁を中心に滑動性眼球運動に関連した神経活動を調べた。眼球運動の最中に視標を短時間点滅または眼球位置信号で動かすと多くの細胞では固視時に較べて高い活動を維持し，これらが視覚外情報をもつことが示唆された。約70％の細胞はステップ・ランプ刺激による滑動性眼球運動に先行して発射した。至適方向と反対方向への眼球運動の最中に視標の動く方向を反転させると，約半数では眼球が加速されるのに遅れて活動を変化させ，至適方向への初期加速度成分には関与しえないことがわかった。さらに約20％は，視標が動く前に徐々に活動を増加させ，固視点に対する注意あるいは要求される眼球運動の準備状態を反映していると考えられた。この領域の電気刺激により緩徐な眼球運動が誘発され，また，滑動性眼球運動の速度が変化した。これらの神経活動は滑動性眼球運動の制御に使われうる。

(9) アセチルコリン作動性システムによるサッケード運動の修飾機構

伊佐　正（生理研）

ラット上丘スライスにおいて中間層ニューロンから whole cell 記録を行い，視神経束を電気刺激すると，浅層や視神経層ニューロンを介する多シナプス性 EPSP が記録できた。こうして上丘浅層―中間層間の結合関係を証明できた。さらにこの経路の伝達は 1 mM の nicotine により顕著に増強された。このことから，上丘へのアセチルコリン作動性入力はニコチン受容体を活性化して浅層－中間層への信号伝達を促通し得ることが明らかになった。さらにサルの上丘中間層にニ

コチンを注入すると反応時間が70－90ミリ秒の express saccade の頻度が増加すること，また，上丘へのアセチルコリン作動性入力の起源である脚橋被蓋核のニューロンはサルが注視点の消灯後，視標が現れるまでに設定された数百ミリ秒間のギャップ期間中に注意を周辺に移動させるのにともなって活動を増加させた。従って脚橋被蓋核から上丘中間層へのアセチルコリン作動性線維は注意の状態を反映する活動を示し，浅層－中間層の信号伝達を促通して express saccade を発現させることが明らかになった。

(10) 「一般像抽出原則」と三次元表面構造の脳内表現

藤田一郎（大阪大・医・認知脳科学）

脳の情報処理の多くが，本来，答が一意に定まらない問題（不良設定問題）の解決である。脳は，何らかの拘束条件を用いて解を定めている。脳の情報処理において，どんな拘束条件が用いられ，それがなぜ動物にとって適応的なのか，その拘束条件が物理世界の構造といかに整合的であるか，その拘束条件を組み込んだ計算アルゴリズムは何であり，脳はそれをどう実現しているのか，を問うことは，脳の高次機能メカニズムを調べる際の重要な視点である。ものを見ることも，その根本において，不良設定問題である。それは，脳が行っていることが，網膜２次元像から，世界の３次元構造を再構成することだからである。人は，２次元網膜像から３次元表面構造を復元する際に，「一般像抽出原則」に従う。十字の水平腕の両端に両眼視差をつけた時に重なり合う２本の棒を知覚したり，Redies-Spillmann 図形にネオン色拡散を知覚することがその証拠とされている。われわれは，サルにおいても，これらの知覚現象が成立している心理物理学的証拠を得た。さらに，下側頭葉皮質細胞の中に，一般像抽出原則に従って形成された知覚に相関する活動を示す細胞を見いだした。

(11) ヒトの手指による grip 運動と皮膚感覚

大木　紫（杏林大・医・第一生理）

ヒトが物体を把握するときの手指運動は，感覚入力による影響を受ける。特に指が物体に触れた後は，物体との接触面の状態を報せる皮膚感覚入力が主にその役目を担い，自動的，随意的両面の運動調節に影響を及ぼすことが知られている。我々は正常被験者において，皮膚感覚入力で引き起こされる自動的な手指運動を更に詳しく解析した結果，複数の指からの入力，更に対側の指からの入力でも引き起こしうることを確認した。しかしこのような複数の指からの影響は同定

したものではなく，被験者が物体の動きを予期することで変化した。またこの運動は幾つかの成分を含み，同側や対側からの入力，予期の影響の受け方が各成分で異なることが示された。従って皮膚感覚入力による自動的手指運動には皮質下，大脳皮質等の異なった神経機構が関与し，このうち一部は被験者の予期による影響を受け，把握の形態等で協同する指を暫時変えるときに働く可能性が示された。

(12) How system の中の What System

泰羅雅登（日本大・医・第一生理）

これまでの研究の結果から，一次視覚野から頭頂連合野に至る背側視覚経路が空間知覚に関連した Where system と呼ばれるのに対して，側頭連合野へ至る腹側視覚経路は物体の認知に関連した What system と呼ばれている。近年 Goodale 達はこの背側視覚経路が手の運動のための視覚情報処理に重要であることを見いだしこれを How System と呼んだ。これまでの我々の研究でも，サルの頭頂連合野で手操作運動に関連して活動するニューロン群が見つかっている。しかし，この中には操作対象に視覚的に，しかも選択的に応答するニューロンがあり，操作対象の認知に関与していると考えられる。David Marr の三次元形態を認識するための理論によれば，二次元情報から三次元モデルを再構成するには，まず物体表面の三次元的な形状（軸や面の傾き）を認識することが重要であり，その情報の統合によって三次元モデルが形成されるとされている。頭頂連合野からは三次元的な軸や面の傾きに選択的に反応する視覚ニューロンも見つかっており，さらに最近，Marr が指摘するように視差勾配から面の傾きを識別するニューロンも見つかった。また，少数例ではあるが，円柱，あるいは角柱といった三次元的な構造に選択的に反応するニューロンも見つかっている。以上の結果は，頭頂連合野が単に Where や How にとどまらず，Marr が言うように，対象の三次元形態を階層的に処理する「三次元形態の What system」とでも言うべき視覚情報処理システムの一部である可能性を示唆している。

(13) 操作された身体映像に対するニホンザルの視覚反応

入来篤史（東邦大・医・第一生理）

頭頂葉後方下部領域近傍では，体性感覚，視覚，聴覚，の複数の感覚が統合され，ヒトではその損傷によって失象徴症が引き起こされる。熊手状の道具を使って遠くの餌をとるよう訓練したニホンザルのこの領域のニューロン群は，道具使用に伴って意図的に変化する身体像をコードし，

モニタ上に写された自分の手の映像を見ながら餌をとるよう訓練するとモニタ内の手を自己と見なすがごとく反応した。さらに上記脳領域のニューロンは，映像効果技術を使って変化させたり，実際には見えない想像上の身体像に対しても同様に活動した。したがって，この領域のニューロンは，多種感覚の統合によって手の機能的意味を象徴的にコードし，それを意図的に自由に操作する能力が獲得されたものと考えられる。サルのこの脳領域で行われる情報処理は，言語機能の進化・発達への橋頭堡となる，「象徴的思考 (symbolism)」のはじまりの一端を担うものと想定される。

(14) 「刷り込み」の記銘内容と痕跡

松島俊也（名古屋大・大学院・生命農学）

鳥類の雛の「刷り込み」と摂食忌避学習は，動的な記憶痕跡を残す。一次的な痕跡は IMHV 領域（皮質連合野に相同）に形成されるが，この痕跡は数時間を経て，Arch 領域（扁桃体）を介し LPO 領域（基底核）に転座すると考えられている。これと並行して，学習後１ないし24時間の内に記憶の内容は急速に般化し，初期の「スナップショット」型の記憶から後期の「手がかり」型の記憶に変容する。この転座と変容の機構を基底核 LPO ニューロンへのシナプス可塑性に求めた。LPO ニューロンには，局所興奮性入力(1)と Arch を介した投射性入力(2)が収束する。dopamine D1 受容体活性化の下で，(1)と(2)の同期した theta-tetanus は，(1)に長期増強を(2)に長期抑圧を交換的に誘導した。両者の時間的一致がなければ，いずれの可塑的変化も生じなかった。シナプス入力の時間構造を不変量として局所介在性ニューロン群の選択が生じ，これが転座をもたらす可能性が考えられる。

(15) 淡水カタツムリの味覚条件付と咀嚼リズム CPG への修飾性入力の可塑性

藤戸　裕（札幌医大・医・第二生理）

ヨーロッパモノアラガイで各種の味覚条件付学習の獲得が示された。振動刺激とショ糖溶液刺激を組合わせた味覚嗜好学習及びショ糖刺激と KCl 刺激を組合わせた味覚嫌悪学習が成立した。味覚嫌悪学習は短時間に成立し，１ヵ月は保持された。より高次の条件付とされる感性予備条件付及びオペラント条件付の獲得も示された。味覚嗜好学習，感性予備条件付及びオペラント条件付の保持期間は数日以内と短く，オペラント条件付では１時間程度であった。味覚嫌悪学習ではショ糖に対する咀嚼回数の減少を学習成立の指標としたが，この学習が成立した個体において，

咀嚼リズム CPG 内の N1M 細胞への咀嚼リズム調節ニューロンである CGC 細胞由来の IPSP の増強が確認された。CGC 細胞はショ糖及び KCl の両者の味覚刺激に対して応答し，かつ感覚一次ニューロンではないことが組織学的に示された。CGC 細胞は味覚嫌悪連合学習における中心的要素であることが示唆された。

(16) 妊娠中の母体ストレスによる仔の脳の発達に及ぼす影響

富士岡隆（山口大・医・第二生理）

妊娠中の母体のストレスが胎児の脳の発達に及ぼす影響を調べる目的で，妊娠ラットに１日30分と240分の拘束ストレスを３日間負荷した後，胎仔脳の視床下部室傍核における CRF 細胞，BDNF 細胞，アポトーシスを組織学的に検討した。30分ストレス群では，CRF 免疫反応陽性細胞は対照群に比べ有意に突起の数が多く，CRFmRNA の発現が増加し，CRF 線維の varicosity の密度が高くなった。このことは30分ストレスにより視床下部室傍核の CRF 細胞の分化が促進したことを意味する。BDNF 免疫反応陽性細胞は対照群に比べ30分ストレス群で有意にその数が増加した。アポトーシスは対照群と30分ストレス群ではほとんどみられなかったが，240分ストレス群では多く観察された。以上の結果は，妊娠中の母体ストレスは胎仔の脳の発達に影響を与え，ストレス時間の長さにより影響が異なることを示唆する。

(17) 聴覚入力と発声運動発現―感覚認知から生体反応形成までの視点から―

坂本尚志（旭川医大・第二生理）

聴覚入力が音声生成において重要な役割を果たすことは，言語の獲得に聴覚入力が必要であるから容易に理解される。大脳皮質を除去した除脳ネコにおいて発声を誘発可能な中脳発声誘発部位からの下行路が，聴覚中継核に終末を持つことから，脳幹レベルにおいても，聴覚入力と発声運動発現が相互に関連しあう可能性を示唆してきた。聴性刺激下に発声運動を誘発すると，発声に必要な声門閉鎖筋および呼気筋の活動が増大し，それにともなって声の大きさも増大することを紹介し，聴性入力が脳幹内の発声中枢神経機構に影響し，発声中の筋活動や音声を変化させうることを示した。今後，中脳発声誘発部位からの下行路の聴覚中継核への機能的接続様式を明らかにできれば，聴覚伝導路と発声運動発現の遠心路が互いに双方向に関係すること，すなわち感覚認知と生体反応形成機構が大脳皮質のみならず，脳幹レベルにおいて，関連していることを解析可能であることを報告した。

⑱ 膀胱に尿が溜まるとどうして目が覚めるのだろうか

小山純正（福島県立医大・第二生理）

脳幹では，ノルアドレナリン作動性の青斑核 (LC) ニューロンやアセチルコリン作動性の外背側被蓋核 (LDT) ニューロンなどが睡眠・覚醒の調節に重要な役割を果たしている。これらは，種々の感覚刺激に対しても反応することから，今実験では，これらのニューロンの活動と膀胱の伸展および自発的な膀胱収縮との関係を調べた。ウレタン麻酔下のラットは，膀胱に約 0.5ml の生理食塩水を注入すると，麻酔の深度が深い時のみ，LC 約80％と LDT の約半数が興奮性応答を示した。これらの反応は，麻酔が浅くなると消失した。これに対して，バーリントン核と考えられるニューロンは，麻酔の深度に関係なく興奮性応答を示した。このニューロン群は，自発的な膀胱収縮に先行して，顕著な活動上昇を示した。LC, LDT は，睡眠中の膀胱の伸展に応答して眠りを浅くする作用があると推定される。

⑲ 非特殊感覚入力と行動

玉井靖彦（和歌山県立医大・第一生理）

非特殊系に属すると思われる脳の各部（５ヶ所）に微小電極を慢性に挿入してスパイクを記録し，その感覚入力および出力に関係したスパイクの解析から，大脳皮質の機能，および新しい脳のモデルを提案した。大脳皮質は，合目的なイメージの形成と遂行に関与する系とそのイメージの形成と遂行を補助する系とがあり，それぞれの系が独立した感覚入力と運動出力を持つと考える。入力でいえば，前者は主に普遍的な概念の解析とその情報の蓄積を行う場所（非特殊系）であり，後者は感覚器に特有の情報の解析と蓄積を行う（特殊系）。出力からいえば，前者はイメージによる合目的な運動を主に出力し，後者はその行動をイメージが完成するまで微細に補正する出力をだす。これは，大脳皮質を感覚野，運動野，連合野に分ける従来の考え方とは著しく異なり，それぞれの概念は実証を必要とするのは言うまでもないが，今後の脳実験の作業仮設になればと思う。

⑳ ネコ歩行標本の小脳白質正中部に新しく同定できた歩行運動誘発野

森　茂美（生理研）

ネコ歩行標本の小脳白質正中部に微小連続刺激を加えると，流れベルト上での四足歩行運動が誘発できた。その歩行は同一ネコの中脳歩行誘発野刺激で誘発される四足歩行運動の特徴と類似していた。効果的な刺激部位およびその部位に対応する神経構築様式を明らかにする目的で，微小電気刺激用および微小注入用の二重ガラス管パイペットを小脳白質の歩行誘発部位に刺入しその部位を微小破壊した。次に神経標識物質であるCTb-HRPを破壊部位に微小圧注入した。適当な生存期間後に組織学的検索を進めた。CTb-HRPによって順行性に標識された神経細胞は左右両側の室頂核内に限局して存在した。順行性に標識された線維のトラジェクトリーは室頂核遠心路線維のそれらとほぼ同じであった。これらの研究成績から歩行運動を誘発する部位は交叉性室頂核遠心路が通過するhook bundleの正中部に相当していることが解明できた。

17. イオンチャネル異常に起因する心臓疾患に関する研究

1998. 1 .26- 1 .27

代表者：倉智嘉久（大阪大・医・第二薬理）

世話人：岡田泰伸（生理研）

共催：財団法人・日本心臓財団

(1) QT 延長症候群患者の遺伝子スクリーニングと hERG チャネル異常

吉田秀忠，堀江　稔，篠山重威（京都大・医・臨床器官病態・循環病態）

(2) HERG mutation の電気生理学的性質について

関　明子，綱代洋一，萩原誠久，笠貫　宏（東京女医大・日本心臓血圧研究所・循環器内科）

(3) LQT2 における新たな HERG 電流抑制機構

中島　忠，古川哲史，平岡昌和（東京医歯大・難治疾患研・成人疾患研究部門・循環器病）

(4) Herg 電流に対する抗不整脈薬の作用の検討

石井邦明（山形大・医・薬理）

(5) モルモット心室筋 I_{Kr} チャネルに対するオープンチャネルブロッカーと非オープンチャネルブロッカー

森島　繁，岡田泰伸（生理研）

(6) Heterogeneity of the delayed rectifier K + current components (IKr and IKs) in myocytes isolated from apex and base of rabbit ventricle: an underlying mechanism of the proarrhythmic effects of class III antiarrhythmic agents

Jianhua Cheng，外山淳治（名古屋大・環境医学研・器官系機能調節・循環器）

(7) アミオダロンによる心筋Kチャネルの修飾

阿部　晃，相澤義房（新潟大・医・第一内科）

(8) ブタ洞房結節細胞のペースメーカ電流

飯島俊彦（秋田大・医・薬理）

(9) ヒト心筋Kチャネル mRNA の定量的 PCR

永井良三（群馬大・医・第二内科）

(10) Romano Ward 症候群における運動負荷前後の再分極異常について－体表面電位図による QRST isointegral departure map を用いての検討－

塚原喜美雄，矢野捷介（長崎大・医・第三内科）

(11) Burgada 症候群の病態の検討

福島研吾，森田　宏，中村一文，難波経豊，大江　透（岡山大・医・循環器内科）

(12) 先天性 QT 延長症候群の新たな変異 (R1623Q) が示す Na^+ チャネル機能異常の多様性

蒔田直昌，北畠　顕（北海道大・医・循環器内科）

(13) 心筋CFTRのMg^{2+}とフォスファターゼによる制御

岡田泰伸，周　士勝（生理研）
高井　章（名古屋大・医）

(14) Caチャネルβサブユニットアンチセンスの心筋L型Ca電流への影響

立山充博，増宮晴子，大地陸男（順天堂大・医・第二生理）

(15) 心筋Caチャネルの活動維持に関与する細胞内因子

亀山正樹（鹿児島大・医・第二生理）

(16) Kir 6.1/Kir6.2 キメラチャネルのゲート機構

鷹野　誠，謝　来華，野間昭典（京都大・医・生体制御医学・細胞機能制御学）

(17) SUR/Kir6.0 複合体カリウムチャネルの細胞内ヌクレオチドによるゲーティングとピナシジルによるその調節機構

佐藤栄作，堀尾嘉幸，倉智嘉久（大阪大・医・第二薬理）

参加者氏名

吉田秀忠，堀江　稔（京都大），関　明子，綱代洋一，萩原誠久（東京女医大），中島　忠，古川哲史，平岡昌和（東京医歯大），石井邦明（山形大），森島　繁，三好毅志，笵　海天，岡田泰伸（生理研），Jianhua Cheng，外山淳治（名古屋大），阿部　晃，相澤義房（新潟大），飯島俊彦（秋田大），永井良三（群馬大），塚原喜美雄，矢野捷介（長崎大），福島研吾，森田　宏，中村一文，難波経豊，大江　透（岡山大），蒔田直昌（北海道大），立山充博，大地陸男（順天堂大），亀山正樹（鹿児島大），鷹野　誠，謝　来華，野間昭典（京都大），佐藤栄作，堀尾嘉幸，倉智嘉久（大阪大），中谷晴昭，小倉武彦（千葉大）

研究会概要

今年度の研究会は心臓に発現している各種チャネルについて，単離した細胞からのチャネル活動の測定とそのチャネルの生理的意義の検討，各種薬物がチャネル活性にどのような作用を持っているか，また，その薬物の作用からチャネルの性質の解明についての試み，また，QT延長症候群の原因遺伝子であるHERGチャネルやNa^{+}チャネルについて，異常のチャネルの検索とその性質についての検討が報告された。心臓疾患についての臨床的な心電図解析やコンピューターシュミレーションによるモデル化の試み，単離した心臓細胞の電気生理学的検討，また，心臓カルシウムチャネル，クロライドチャネル，ATP感受性カリウムチャネルなどの制御機構の分子レベルの検討なども報告された。特に今回は率直で活発な討論が展開され，臨床と基礎の両面から心臓イオンチャネルについての理解が深まったと同時に，これから解明されなければならない点が明らかとされた。

(1) QT 延長症候群患者の遺伝子スクリーニングと HERG チャネル異常

吉田秀忠，堀江　稔，大谷秀夫，篠山重威（京都大院・医学研究科・循環病態）
鷹野　誠（京都大院・医学研究科・第二生理）
福並正剛（大阪府立病院・心臓内科）

我々は，QT 延長症候群患者について SCN5A, HERG, KvLQT1 遺伝子異常の有無を PCR-SSCP 法にてスクリーニング検査を行ない，Torsade de Pointes を来たし，心電図にて QTc 610 msec と延長みられた30歳女性の 1 症例において HERG 遺伝子の変異をみとめた。HERG 遺伝子の PCR-SSCP 法にて異常がみられ，塩基配列を決定したところ629番目のアミノ酸 Asparagine が Lysine への変異をきたす点突然変異 (N629K) であることがわかった。この症例は正常と mutant HERG をもつヘテロと考えられた。この突然変異の機能評価のために正常 HERG と mutant HERG とを発現する vector を作成し COS7 へ transient transfection し，whole cell patch clamp 法をおこなった。mutant HERG のみの導入では，時間依存性の電流がみられず，IKr と考えられると正常 HERG 電流の消失がみられた。

(2) HER mutation の電気生理学的性質

関　明子，萩原誠久，古谷美智子，松岡瑠美子，笠貫　宏（東京女医大・心研内科）

LQT2 では，染色体 7 番に起因する HERGgene の変異が報告されている。我々の施設の LQT2 の患者さんから得られた HERG の変異型 G601S の mRNA を HEK293cell に発現させ，その電気生理学的性質をパッチクランプ法を用いて野生型と比較検討した。野生型の半最大活性化電位は約-18 mV, Slope factor は 8.5 mV であり，変異型でも近似した値を示し，両者とも内向き整流性を示した。G601S の-40 mV における末尾電流の電流密度は，野生型の約15.5％の大きさであった。-40 mV における脱活性化の時定数は，野生型と G601S の間では有意差を認めなかった。以上より，G 601S の発現電流は野生型と比較して，電流密度は15％に減少し，電位依存性と kinetics は変化しないことが確認された。

(3) LQT2 における新たな *HERG* 電流抑制メカニズム

中島　忠，平岡昌和（東京医歯大・難治疾患研究所・循環器病）
古川哲史（同自律生理）
田中敏博，中村祐輔（東京大・医科学研究所・ヒトゲノム解析センター）
永井良三（群馬大・医・第二内科）

【目的・方法】LQT2 で認める HERG のミスセンス変異 3 タイプ (S2-S3 間：T474I, P 領域：A614V, V630L) の電流特性を，アフリカツメガエル卵母細胞発現系で検討した。【結果】野生型 (WT) と変異 cRNA を混合し注入すると dominant-negative (DN) suppression を認め (WT ＞ T474I/WT ＞ A614V/WT ＞ V630L/WT) いずれも slop conductance (SC) は小さかった。*HERG* チャネルはその速い不活性化により内向き整流性 (IR) を呈することを特徴とする。Rectification factor (R) を Boltzmann 式に fit させ $V_{1/2}$, slop factor (K) をもとめ比較した。A614V/WT, V630L/WT では $V_{1/2}$ の negative shift を認めその程度は V630L/WT で大きく，また V630L/WT では K の増大も認め IR 増強していた。IR の増強は不活性化の促進に起因していた。【総括】今回検討した 3 変異はいずれも DN 型の抑制を示し T474I/WT では SC の減少に起因していた。P 領域に変異を認める A614V/WT, V630L/WT では SC の減少に加え新たな *HERG* 電流抑制機構である不活性化の促進を認め IR が増強しており外向き電流抑制を更に増大していた。

(4) Herg 電流に対する抗不整脈薬の作用の検討

石井邦明（山形大・医・薬理）

Herg 電流に対する各種抗不整脈薬の作用を卵母細胞の発現系を用いて検討した。今回検討した抗不整脈薬のうち第 1 群の quinidine，第 3 群に属する MS-551，および第 4 群の verapamil は Herg 電流を濃度依存的に抑制したが，その程度は quinidine, verapamil, MS-551 の順であった。また MS-551, verapamil による Herg 電流の抑制は 1 回目のパルスよりも繰り返しのパルスによって，わずかにではあるが，その程度が増大した。このことは両薬物が open channel blocker としての性質を持つことを表していると考えられる。一方 quinidine はほぼ純粋な closed channel block を示した。さらに，第 6 膜貫通領域の変異体を作製して抗不整脈薬の作用に対する影響を検討し，中間領域 (647-652) のアミノ酸の点変異によって各種抗不整脈薬の作用が減弱する事を明らかにした。

(5) モルモット心室筋 I_{Kr} チャネルに対するオープンチャンネルブロッカーと非オープンチャネルブロッカー

森島　繁，岡田泰伸（生理研）

昨年，我々は向精神薬類フェノチアジン (PHN) が心筋細胞で I_{Kr} を選択的に抑制することを報告した。PHN は I_{Kr} の tail 電流成分には強い抑制効果を示したが，脱分極パルスにより活性化される電流成分（isochronal 電流成分）にはほとんど効果を示さなかった。このことは，本薬剤が I_{Kr} の脱活性化機構を促進するためと考えられた。一方，同じく I_{Kr} を抑制することが知られている抗生剤エリスロマイシン (EM) は，tail 電流成分同様，isochronal 電流成分も抑制する。我々はまず，EM により抑制される電流が I_{Kr} に特異的であることを E-4031 により，および envelope test を用いて検証した。また，脱分極パルスを延長していくことにより，EM により抑制される電流の割合が増大していくこと，double step パルスを用いて見られる一過性電流に対する EM の抑制効果が電位依存性であることから，EM は開チャネルブロッカであることが示唆された。これら薬剤の抑制メカニズムの違いは，本チャネルの構造機能解析に役立つことが期待される。

(6) Heterogeneity of the delayed rectifier K^+ current components (I_{Kr} and I_{Ks}) in myocytes isolated from apex and base of rabbit ventricle: an underlying mechanism of the proarrhythmic effects of class III antiarrhythmic agents

Jianhua Cheng，外山淳治（名古屋大・環境医学研・器官系機能調節・循環器）

Abstrat　The regional differences of the delayed rectifier K^+ current components (I_{Kr} and I_{Ks}) were investigated in myocytes isolated from the apical and basal regions of rabbit ventricle by using whole-cell clamp technique. At a 3-sec depolarization pulse to +40 mV from a holding potential of -50mV, the total tail density (I_K) and the I_{Ks} density (measured as the E-4031-insensitive tail current) were significantly smaller in apical than in basal myocytes (I_K: 1.558±0.129 vs. 2.088±0.208 pA/pF, $p < 0.05$: I_{Ks}: 0.404±0.153 vs. 1.432±0.228, $p < 0.01$) , whereas the I_{Kr} density (measured as the E-4031-sensitive tail current) was significantly greater in apex than in base (1.153 ± 0.127vs. 0.655 ± 0.113pA/pF, $p < 0.01$). No statistical difference was observed in the time course of activation and deactivation of each component between the apex and base. Application of 1 μmol/L isoproterenol increased the time-dependent outward current of I_K^s by 111±8% during the 3-sec depolarizing step at +40

mV and its tail current by 120±9% on repolarization to the holding potential of -50mV, whereas it induced no appreciable effects on I_{Kr}. At 1 Hz stimulation, the action potential duration (APD) was significantly longer in apex than in base (223.1±10.6 vs. 182.7±14.5 ms, $p < 0.05$) ; application of 1μmol/L E-4031 caused more significant APD prolongation in apex than in base myocytes (32.5±6.4% vs, 21.0±8.8%, $p < 0.05$), resulting in increased regional dispersion of APD. These results suggest that the regional difference in I_K and its components may underlie the regional disparity in APD, and that methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agents such as E-4031 may cause a greater spatial inhomogenieity of ventricular repolarization, thus, causing re-entrant arrhythmias.

Key words・ rabbit ventricular myocytes・ delayed rectifier K^+ current・ regional difference・ action potential duration・ E-4031.

(7) アミオダロン慢性投与によるK^+チャネル遺伝子発現と甲状腺ホルモンの関わり

阿倍　晃，馬　梅蕾，相澤義房（新潟大・医・第一内科）
山本　格（新潟大・医・腎研究施設・構造病理）

【目的】アミオダロン慢性投与と甲状腺機能低下が心室筋のK^+チャネル遺伝子発現に及ぼす影響を検討する。【方法】ラットをコントロール群（C群），アミオダロン群（A群），PTU群（P群）に分け4週連日経口投与後心室筋からRNAを抽出し，Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5, Kv2.1, Kv4.2, r-ERGをプローブとしてRNase Protection AssayでmRNAを定量し比較検討した。【結果】血清T3値は，C群よりA群で，A群よりP群で有意に小であった。mRNA発現量は，A群ではKv4.2が軽度減少するのみであった。P群ではKv4.2は減少し($P < 0.05$), Kv1.5は著減した($P < 0.01$)。PTU投与で著減したKv1.5はT3の補充により回復した。Kv1.4はC群A群ではほとんど検出されなかったが，P群では有意に検出された($P < 0.01$)。【総括】アミオダロンにより甲状腺機能低下が強く存在すれば，Kv1.5は著減しAPDは延長し，これは不整脈や心機能に影響するものと推察された。

(8) ブタ洞房結節細胞のイオン電流

柴田繁啓，尾野恭一，飯島俊彦（秋田大・医・薬理）

心臼動能の細胞レベルでの研究は，これまで家兎やモルモットを用いて行われてきた。しかし

ながら，これら小動物は心拍数が毎分200以上もありヒトのそれとは大きく異なっている。種固有の心拍数，とりわけヒトのように比較的緩やかな心拍数成立のイオン機序を解明する目的で，ヒトとほぼ同じ心拍数を有するブタより洞房結節細胞を単離し，活動電位及びイオン電流記録を試みた。ブタの洞房結節細胞は，正常タイロード液中で約80回／分の規則正しい律動を示し，家兎と比較してより長いプラトー相と緩やかな緩徐脱分極相を伴った自発性活動電位が認められた。膜電位固定下種々のイオン電流について解析したところ，ブタの遅延整流 K 電流は主として IKs から成っており，家兎が IKr 主体であることと大きく異なっていた。以上のことから種固有の心拍数成立には異なる IK チャネルが関与していることが示唆された。

(9) ヒト心筋Kチャネルの定量的 PCR

永井良三（群馬大・医・第二内科）

【目的】ヒト心筋内 HERG および KLVQTI の mRNA を，多色蛍光ラベルプローブによる PCR 法を用いて定量化を試みた。

【方法】手術時に得た心房筋より RNA を抽出し，ABI PRISM7700 Sequence Detection System により増幅した。本法は検出限界以上の蛍光強度を示す増幅回数 Ct は増幅する mRNA を反映するという原理を用いたものである。internal contol として GAPDH mRNA を増幅し，Kチャネル／GAPDH の比を洞調律例と心房細動例で比較した。

【結果】HERG/GAPDH 比は，洞調律例で 0.65, 0.40, 0.47, 心房細動例で 0.47, 0.65, 0.39, KVLQTI/GAPDH 比は，洞調律例で 0.14, 0.23, 0.16, 心房細動例で 0.39, 0.28, 0.52 であった。

【考察】今回は少数例での検討であるが，心房細動例の心房筋 KVLQTI mRNA の発現が増加していた。本法により各種病態における心筋Kチャネルの発現の変化が解析可能と考えられる。

(10) Romano Ward 症候群における運動負荷前後の再分極異常について —体表面電位図による QRST isointegral departure map を用いての検討—

塚原喜美雄，平田哲也，平田正信，坂本良治，泰　躍武，早野元信，矢野捷介（長崎大・医・第３内科）

【目的】Romano Ward 症候群（RW 群）における再分極異常の程度を定量化し，その分布を明らかにする。【方法】RW 群12例，健常群（C群）19例において，負荷前後で体表面電位図を記録し，QRST departure map より departure index が｜± 2 ｜以上の極点および異常点総数，その

最大偏位値を求めた。
【結果】RW 群では負荷後，極数は0.75→3.50，異常点総数は4.3→21.8，最大偏位絶対値は2.2→5.5と有意に増加したが，C群では不変だった（0.84→0.84，4.8→1.9，1.9→2.8）。失神群では非失神群より負荷後，極数および異常点総数が有意に増加した。負荷後，正の最大偏位値は右上前胸部と右後背部に，負の最大偏位値は左下前胸部と左下後背部に認められた。以上より，QRST departure map により RW 群での再分極異常の分布と異常の程度の定量化が可能となり，重症度判定の指標となりうることが示唆された。

(11) Brugada 症候群の病態の検討

福島研吾，森田　宏，中村一文，難波経豊，大江　透（岡山大・医・循環器内科）

Brugada 症候群は特発性心室細動の一種で，右脚ブロックと右側胸部誘導の ST 上昇を特徴とする。ST 上昇と心室細動発生のメカニズムとして脱分極相の異常と再分極相の異常が考えられている。近年 Ito の増強によってもたらされる心外膜の活動電位 (APD) 第 1 相の notch の増強と 2 相の voltage gradient の発生が ST 上昇と phase 2 reentry と呼ばれるリエントリーが発生することが報告されている。今回コンピュータシミュレーションを用い疑似活動電位と心電図を作成したところ心外膜の APD の短縮と voltage gradient 発生によって ST 上昇と洞調律から心室細動が発生することが確認された。さらにランゲンドルフ潅流心の単相性活動電位 (MAP) を記録したところ Pilsicainide 投与によって心外膜のみ MAP が短縮する所見が得られ，whole heart の MAP 記録によっても再分極相の異常が確認される可能性が考えられた。
【結語】再分極相の異常により ST 上昇と心室細動発生の可能が示唆された。

(12) 先天性 QT 延長症候群の新たな変異 (R1623Q) が示す Na^+チャネル機能異常の多様性

蒔田直昌，北畠　顕（北海道大・医・循環器内科）

心筋 Na チャネル (hH1) は，先天性 QT 延長症候群 (LQT) の病因イオンチャネルの一つであり，現在までに ΔKPQ をはじめとする三種類の変異が報告されている。これらの変異 Na チャネルは不活性化異常を示すが，平均開口時間は延長しておらず，その基本的な病態は modal gating shift で説明された。最近，新生児期より重篤な心室性不整脈発作を繰り返す重症 LQT 症例において，hH1 の電位センサー (D4/S4) 上に新たな変異 (R1623Q) が確認された。今回，oocyte 二電

極膜電位固定法およびinside-outパッチクランプ法を用いてR1623Q Naチャネル特性を検討した。R1623Qチャネルは顕著な不活性化異常を示した。R1623Qのdecayは正常(WT)やΔKPQに比して有意に遅く，不活性化の膜電位依存性も有意に低下していた。平均開口時間はWTやΔKPQよりも有意に延長していた(WT, ΔKPQ: 0.6ms; R1623Q: 1.7ms)。これらの事実から，R1623Qはこれまでにに報告されたLQT3とは異なる，より重篤なチャネル機能異常を示す変異であることが判明した。

(13) 心筋CFTRのMg^{2+}とフォスファターゼによる制御

岡田泰伸，周　士勝（生理研）
高井　章（名古屋大・医）

心筋細胞におけるcAMP依存性Cl^-チャネル(CFTR)は，Aキナーゼによる燐酸化で活性化され，プロティンフォスファターゼ(PP)による脱燐酸化によって脱活性化される。後者反応にはオカダ酸感受性PP (PP2A, PP1)と，オカダ酸非感受性PPが関与することが知られている。私達は，後者PPはアニオンチャネル阻害剤として知られていた9-AC (anthracene-9-carboxylic acid)によって抑制され，それによってこの9-ACはCFTR Cl^-電流をむしろ亢進させることを明らかにした(Cir. Res. 81, 219-228, 1997)。今回私達は，モルモット心室筋のPP活性は細胞内遊離もMg^{2+}濃度に依存して亢進し，その結果，CFTR Cl^-電流もMg^{2+}によって大きく影響をうけることを電気生理学的に明らかにした。更に，そのPPはMg^{2+}感受性のPPとして知られるPP2Cとは全く別のPPであることが生化学に明らかになった。

(14) Caチャネルβサブユニツトアンチセンスの心筋L型Ca電流への影響

立山充博，増宮晴子，大地睦男（順天堂大・医・第二生理）

成獣ウサギ単離心室筋細胞を培養し実験を行った。カルシウムチャネルβサブユニットのアンチセンスオリゴヌクレオチド(2 μmole)を培地中に添加した細胞群では，特に，処置後96時間において，ノンセンス処置群および対照群に比べ電流の活性化・不活性化に有意な遅延が見られ，電流密度の減少傾向が見られた。また，イソプロテレノールの電流増加作用は両者の細胞群で観察されたが，アンチセンス処置群では増強作用が弱く，電流電圧関係の過分極側へのシフトも観察されなかった。

⑮ 心筋 Ca チャネルの活動維持に関与する細胞内因子

亀山正樹，Hao Li-Ying，黒木佐知子，亀山亜砂子（鹿児島大・医・第二生理）

心筋L型 Ca チャネルの活動は，Cell-free pathch で消失する（run-down 現象）。我々は，Ca チャネルの run-down が細胞質蛋白と ATP の喪失により起こることを発見した。そこで，この細胞内因子を検索するため，ウシ心筋細胞質をゲル濾過法で分離し，H分画（見かけの分子量 Mr 30 万以上），P分画（Mr 25-30 万），L1 分画（Mr 18-25 万），L2 分画（Mr 18 万以下）に分け，チャネル活動に対する回復効果を inside-out mode, 3mM ATP 存在下で検討した。P分画は単独で弱い効果（約10%）を示したが，他の分画の回復作用はほとんど無かった。次に，P + H, P + L1, P + L2 の組み合わせの作用を見ると，H分画にP分画の作用を増強する効果が認められた。P分画の代わりに calpastatin をH分画と共に作用させても，チャネル活動の回復が得られた。H分画を熱処理（65℃，15分）またはトリプシン処理すると，効果は減弱した。また，フォスフォリバーゼ処理でも同様であった。以上の結果から，Ca チャネルの活動維持に関与する細胞質因子は複数存在すると思われる。一つはP分画にあり，耐熱性で calpastatin 様蛋白であると考えられる。もう一つはH分画にあって，熱に弱く，脂質と何らかの関連を持つ物質であると考えられる。

⑯ Kir6.1/Kir6.2 キメラチャネルのゲート機構

鷹野　誠，謝　来華，野間昭典（京都大・生体制御医学・細胞機能制御）

内向き整流Kチャネルのうち，Kir6.1 と Kir6.2 はスルフォニル尿素受容体 (SURx) と共に ATP 感受性Kチャネルを構成する。Kir6.x を SURI と共発現させたところ，Kir6.1 はヌクレオチド2燐酸 (NDPs) 存在下でのみ開口するが，Kir6.2 は NDPs 非存在下で自発的に開口し，run-down した場合にのみ低濃度の NDPs により再活化されることが判明した。また Kir6.1 は Kir6.2 よりも低い ATP 感受性を示した。Kir6.x の膜貫通部位の前後でN端，C端を交換したキメラチャネルを作成し，これらのゲート機構の差をもたらす部位を検討したところ，N端とC端の両方を入れかえた場合に限り NDPs による活性化キネティクスおよび ATP 感受性をほぼ逆にすることができた。このことから NDPs による活性化ゲートと ATP による抑制ゲートはN端とC端の両方により構成されることが示唆された。

(17) SUR/Kir6.0 複合体カリウムチャネルの細胞内ヌクレオチドによるゲーティングとピナシジルによるその調節機構

佐藤栄作，堀尾嘉幸，倉智嘉久（大阪大・医・第二薬理）

【目的・方法】SU 受容体 SUR2B と膜二回貫通型 Kir サブユニット Kir6.1 あるいは Kir6.2 を HEK293T 細胞に共発現させ，構成される各カリウムチャネルにおける細胞内ヌクレオチドによるゲーティグとカリウムチャネル開口薬のピナシジルによるその調節機構をパッチクランプ法にて検討した。【結果】Cell-attached patch でピナシジルは，どちらのタイプのカリウムチャネルも開口させた。Inside-out patch では，SUR2B/Kir6.2 チャネルは自然開口し，これは細胞内に添加された ATP によって抑制された。ピナシジルはこの ATP 依存性抑制ゲートを減弱し，チャネルを活性化した。一方，SUR2B/Kir6.1 チャネルの開口には，細胞内ヌクレオシド二燐酸や三燐酸が必要であった。ピナシジルは，これらのヌクレオチド依存性活性化ゲートを亢進することによってその活性化作用を示した。【総括】Kir サブユニットが，SUR/Kir6.0 複合体カリウムチャネルにおける細胞内ヌクレオチド依存性ゲーティングとピナシジルによるその調節機構を決定することがわかった。

18. 脳研究の展開

1998. 3 .19

代表者：佐々木和夫（生理研）
世話人：小幡邦彦（生理研）

(1) 生理学研究所における脳研究の現状

伊佐　正（生理研）

(2) 生理学研究所における脳研究計画

佐々木和夫（生理研）

(3) 脳研究の現状　－分子・遺伝子

岡野栄之（大阪大）

(4) 脳研究の現状　－細胞・シナプス

狩野方伸（理化学研究所）

(5) 脳研究の現状　－神経回路

篠田義一（東京医歯大）

(6) 脳研究の現状　－認知・行動

藤田一郎（大阪大）

(7) 脳研究の現状　－非侵襲・臨床的研究

杉下守弘（東京大）

参加者名

福島菊郎（北海道大），丹治　順（東北大），岡戸信男（筑波大），小澤瀞司（群馬大），狩野方伸，二木宏明（理研），杉下守弘（東京大），篠田義一（東京医歯大），青木　清（上智大），彦坂興秀（順天堂大），那波宏之（新潟大），西野仁雄（名古屋市大），外山敬介，小澤一史，西　真弓（京都府医大），津本忠治，藤田一郎，岡野栄之，高井義美（大阪大・医），村上富士夫（大阪大・基礎工），濵　　清（機構長），野田昌晴，山森哲雄（基生研），佐々木和夫，伊佐　正，小松英彦，八木　健，松山清治，児島伸彦，小幡邦彦（生理研）

研究会概要

現在の脳研究の流れのなかで生理学研究所がどのように研究を進めるべきかについて，全国から各分野の脳研究者に参加を求め，現状と展望について討議した。５名の報告者により各研究領域の総括がすべて周到な準備にもとづいて行われ，重要点が明快に指摘された。各報告後，討論がきわめて活発に行われて，報告への補足，別の見解が加えられ，脳研究の展望を得るのに有効であった。

(1) 生理学研究所における脳研究の現状

伊佐　正（生理研）

研究所創設以来20年の各部門における研究の変遷を述べた。神経研究の比重が増しており，そのなかでも近年は分子・細胞レベルの研究に比しシステムレベルの研究が増加している。大学院，トレーニングコースの役割も述べた。

(2) 生理学研究所における脳研究計画

佐々木和夫（生理研）

来年度の設置が認められた大脳皮質研究系3部門，大脳機能計測センターにつき説明した。岡崎3研究所の協力体制を説明した。国内の脳研究に占める生理研脳研究の位置を述べた。

(3) 脳研究の現状　―分子・遺伝子

岡野栄之（大阪大）

この分野は，（1）チャネル・レセプターの研究と（2）神経発生の研究の大別される。これまで，ショウジョウバエ等無脊椎動物の研究から脊椎動物に当てはまる原理，分子が明らかにされてきた。ノックアウトはマウスで行われてきたが，ヒトも含めて高等動物にはアデノウイルス等を用いた遺伝子改変が期待できる。

参加者より（1）ノックアウトマウスの解析にしても日本では共同研究体制がとりにくい，日本には行動解析の人材が不足。（2）日本の心理学の主流は人間を対象とし，脳を対象としていなかった。neuroscienceとしての心理学が必要。（3）マウスだけでは神経機能解析には不十分等の意見が出された。

(4) 脳研究の現状 —細胞・シナプス

狩野方伸（理化学研究所）

シナプス伝達と神経可塑性が重要課題であるが，２つの問題点がある。

（１）多くの分子の構造がわかったが，その機能解析が追いつかない。その理由として，ａ）神経の研究が困難。例としてLTPのシナプス機構の図式は５年間でほぼ同じ，ｂ）研究者人口が少なく，ノックアウトマウスが作られても，その各相を調べる人は限られる。

（２）ノックアウトマウスの欠陥。今後，１部位特異性，２時期特異性，３ genetic background に期待される。（岡野よりbackcrossを重ねてもgenetic backgroundを十分に変えることは不可能との発言があった）

参加者から，LTPの研究にも大きな進展があった，LTP/LTD以外にもないのか（single-shot memory, short-term, シナプス数の変化など），利根川のノックアウトマウスで海馬place cellをしらべたのは，いままでのLTP —行動への短絡を破ったものとして重要等の発言があった。

(5) 脳研究の現状 —神経回路

篠田義一（東京医歯大）

日本の貢献が大きかった分野であるが，現在停滞しており，その理由としてつぎのようにまとめられる。（１）長期のトレーニングが必要，（２）成果の生産性が低い，（３）分子的研究，スライス，パッチクランプが現在の主流。（４）高次機能の研究が時流にのる（神経回路研究は中次）。（５）動物実験反対運動がある。

重要点として，（１）この分野では研究の継続が必要であり，研究が中絶されると再立ちあげは困難である。

（２）外国製品を購入するのでなく，自前の装置，器具を開発することが必要である。生理研でも開発，投資体制はできないか（multirecording electrodeなど）。

（３）動物供給の確保が緊急課題である。

結論として，機能に根ざした神経回路の研究が重要である。個別のパラダイムをたて，それに合致するニューロンをみつけてもだめ。

参加者から（１）動物供給については，文部省等に要求，申請を続けることが必要，動物実験の必要性を社会にアピールする必要もある。

（２）研究振興には，若手の興味をひきつける方策）や殻にこもることなく視野を拡げることが必要等の発言があった。

(6) 脳研究の現状 ―認知・行動

藤田一郎（大阪大）

1985年頃より認知脳科学がつぎのような点で発展した。

（1）計算論的神経科学，認知心理学との合流。

Marr の３つの条件，逆問題と対等拘束条件が重要であった。

ハードウェアによる実現に固執すると研究の衰退を招く。

（2）いくつかの基本的パラダイムの整理。

（3）さまざまな行動パラダイムの開発。

（4）非侵襲的計測法。

また現在，言語学との連携が重要となっているが，その教育体制が不備である。

参加者から重要点として，オシレーションと情報統合，temporal coding，柱状構造，コンセプトが指摘された。

(7) 脳研究の現状 ―非侵襲・臨床的研究

杉下守弘（東京大）

脳損傷患者での研究は減少している。理由として，例数が少ないので仮説をたてても証明が難しいこと，非侵襲的検査の発達で従来なら検出不能の損傷がたくさんみつかる症例が出て，責任部位の決定が困難なことがある。

fMRI について，４年間の研究経験から以下の結論を得た。

（1）データの信頼性，再現性は高い。

（2）装置の開発は主に外国で行われており，使用法等について国内業者が対応できない。

（3）臨床用装置の性能で十分であるが，研究専用機の設置が望ましい。

（4）肝要なのは研究課題の設定であり，後発でも外国に太刀打ちできる（例として，書字のイメージ，しりとり遊び，つよい感情）。

佐々木所長が生理研で fMRI にどう取り組むか検討中であることを述べた。

【 国際シンポジウム 】

ＣＯＥ国際シンポジウム

COE 国際シンポジウム

COE 国際シンポジウムは平成10年３月21日から25日までの５日間，岡崎コンファレンスセンターで開催された。本年は，国際誘発電位シンポジウム (International Evoked Potentials Symposium, IEPS) との共催という形式で行われた。IEPS は「人の脳波と脳磁図の研究」を主要テーマとしており，第１回が1978年に英国のノッチンガムで開催され，以後は４年毎にクリーブランド，ベルリン，トロント，ミラノで開催されてきた伝統のある会議である。本分野におけるわが国の研究の発展及び生理学研究所における脳磁図研究が高く評価され，第６回 (6th IEPS) が岡崎で開催されることとなった。会長は橋本勲教授で，柿木隆介が事務総長を務めた。海外27カ国から104名，国内から256名，計360名が参加し，国際シンポジウムの名に恥じない規模のものとなった。幸い天候にも恵まれて全スケジュールを予定通りに遂行することができた。紙幅の問題もあり口演発表のみを記載する。他にポスターとして202題の発表があった。

COE International Symposium
(6th International Evoked Potentials Symposium, 6th IEPS)
Okazaki Conference Center, Okazaki, Japan
March 21-25, 1998
Chairperson: Isao Hashimoto, Secretary-General: Ryusuke Kakigi
(National Institute for Physiological Sciences)

Saturday 21 March

16.00 ～ 16.15　Opening Ceremony

16.15 ～ 17.00　Host Lecture　Isao Hahimoto
From Input to Output in the Somatosensory System for Natural Air-Puff Stimulation of the Skin

17.00 ～ 19.00　Welcome Reception

Sunday 22 March

Room A

08.30 ～ 10.00　Plenary Session 1　INTEGRATIVE STUDIES
Chair: R Kakigi

08.30　A Comparison of Intracranial ERPs and Functional MRI in the Investigation of Perceptual and Cognitive Processing in Humans
McCarthy G (New Haven CT, USA)

09.00 An Integrated Neuroimaging Approach to Restorative Neurology
Rossini PM (Rome, Italy)

09.20 Simultaneous ERP and PET Studies in the Recognition of Human Faces
Yaguchi K, Nagata K, Park WM, Tsutsumi K, Terashi H, Sato M, Yokoyama E, Senova MA and Kanno I (Akita, Japan)

09.40 Short and Long Latency Evoked Potentials in Diagnosis and Monitoring of Multiple Sclerosis
Comi G, Leocani L, Medaglini S, Locatelli T, Martinelli V, Rossi P and Sartuccio G (Milan, Italy)

Room A

10:30 ~ 12:30 Minisymposium 1: EVENT-RELATED POTENTIALS (BASIC)
Chairs: G McCarthy, Y Kuroiwa

10.30 Phoneme Representations of the Human Brain as Reflected by Event-Related Potentials
Naatanen R (Helsinki, Finland)

11.00 Topographic Change of ERPs Evoked by Human Consonant-Vowel (Cv) Syllables with Various Vowel Durations
Hosokawa M, Gunji A, Shinoda H and Ozaki H (Ibaraki, Japan)

11.15 Differences in Event-Related Potentials related to Native Language
Rodriguez-Kadota LE, Klaseda Y, Nakano Y, Chunhui J, Nakamura S and Neshige R (Hiroshima, Japan)

11.30 Evoked Magnetic Responses During a Word Recognition Task Brain Activity Related to Silent Translation Detected With fMRI
Netsiri C, Fujimaki N, Miyauchi S, P,tz B and Ueno S (Tokyo, Japan)

11.45 Evoked Magnetic Responses During a Word Recognition Task
Koyama S, Naka D, Watanabe S and Kakigi R (Okazaki, Japan)

12.00 Where Do Perception and Recognition of Words Take Place in the Brain: a Neuromagnetic Approach
Kuriki S, Isahai N, Takeuchi F and Kakigi R (Sapporo & Okazaki, Japan)

Room B

10.30 ~ 12.30 Minisymposium 2: SOMATOSENSORY EPs (1)
Chairs: G Comi, T Kurokawa

10.30 How Much Has Heen Solved Regarding SEP Generators?

Sonoo M (Tokyo, Japan)

10.55 The Palmomental Reflex Can Be Elicited by Electrical Stimulation of the Median Nerve
Yamada T, Shiga Y, KawamuraT, Inoue K, Ofuji A, Hada Y, Cheng M-H, Yeh M, Ross M (Iowa City, USA)

11.10 Subarachnoid Recording of Spinal Cord Evoked Potentials with a Tube-Type Flexible Bipolar Electrode
Tamaki T, Andou M, Nakamoto K, Nakagawa Y, Iwasaki H, Nomura K, Murakami M (Wakayama, Japan)

11.25 Long Latency Reflex Response Recorded in Patients with Central Motor Pathway Impairment
Pereon Y, Nguyen The Tich S, Roger J-C, Bord E, Genet R and GuihEneuc P (Nantes, France)

11.40 Giant Somatosensory Evoked Potentials in Different Clinical Conditions: Scalp Topography and Dipole Source Analysis
Ragazzoni A, Ferri R, Di Russo F, Del Gracco S, Barcaro U and Navona C (Florence, Rome & Pisa, Italy)

11.55 The Latency of Somatosensory Cerebral Evoked Potentials (SCEPs) and Temporal Summation in the Medial Lemniscus
Prevec T S and Beric A (Ljubljana, Slovenia & New York NY, USA)

12.10 Direct Recording Studies of Spinal and Subcortical Somatosensory Evoked Potentials Following Median and Posterior Tibial Nerve Stimulation in Humans
Urasaki E (Kitakyushu, Japan)

Room A

13.15 ~ 15.15 Minisymposium 3: SOMATOSENSORY EPs (2)
Chairs: T Yamada, A Yasuhara

13.15 Perceptual and Behavioural Correlates of Cortical Reorganisation in Man
Elbert T (Konstanz, Germany)

13.40 The Time Course of Recovery of Somatosensory Evoked Potentials and Sympathetic Skin Response After Toe-To-Finger Transplantation
Chu N-S (Taipei, Taiwan)

13.55 Age- and Amplitude-Dependent Attenuation of SEPs by Voluntary Movement
Touge T, Ishibashi T, Nishiyama T, Kamoda M and Takeuchi H (Kagawa, Japan)

14.10 Movement in a Go/No-Go Choice Reaction Time Task

Hoshiyama M and Sheean G (Okazaki, Japan & London, UK)

14.25 Intraoperative Mapping of the Sensorimotor Area with Cortical Recording of Somatosensory Evoked Potentials in Combination with Functional MR Imaging
Okumura A, Takenaka K, Kawaguchi M, Asano Y, Yamakawa H, Shinoda J, Deguti K, Andou T and Sakai N
(Gifu, Japan)

14.40 Modification of Ipsilateral Somatosensory Evoked Magnetic Fields by Hand Posturing
Nakamura A, Yamada T, Abe Y, Kachi T, Kato T, Ito K, Yanagisawa N & Kakigi R
(Aichi, Okazaki, Japan)

14.55 Presurgical Identification of Cortical Somatotopy by Multimodal Evoked Magnetic Fields
Nakasato N, Kumabe T, Kanno A, Ohtomo S, Hatanaka K and Yoshimoto T (Sendai & Tokyo, Japan)

Room B

13.15 ~ 15.15 Minisymposium 4: EVENT-RELATED POTENTIALS (BASIC 2)
Chairs: R Naatanen, K Hirata

13.15 Prefrontal Cortex Contributions in Automatic and Controlled Attention
Yamaguchi S (Izumo, Japan)

13.40 The Role of the Locus Coeruleus in the Production of P300
Katayama Y and Fukaya C (Tokyo, Japan)

13.55 Comparison of Late Components of Visual Event-Related Responses Obtained Simultaneously with EEG and MEG Recordings
Schellart NAM, Giger-Mateeval VI, Riemslag FCC , Reits D and Spekreijse H (Amsterdam, The Netherlands)

14.10 The Duration of the Integrating Window in Sensory Memory Estimated by MMN to Omitted Clicks
Yabe H, Sato Y, Sutoh T, Hiruma T, Shinozaki N, Nashida T, Saito F and Kaneko S (Hirosaki & Akita, Japan)

14.25 Individual Differences in Working Memory Associated with Event- Related Potentials (ERPs)
Osaka M (Osaka, Japan)

14.40 The Rat ERP as A Model to Study Intracranial Generation Mechanisms
Shinba T (Tokyo, Japan)

14.55 Frontal Lobe Activity Associated with Voluntary Blinks in Man

Bodis-Wollner I, Bucher S and Seelos KC (Brooklyn NY, USA & Munchen, Germany)

15.30 ~ 18.00 Poster Presentations

Chairs: R Hari, K Mills, S Tobimatsu

Room A

18.00 ~ 20.00 YOUNG RESEARCHERS' WORKSHOP (1)

Chairs: M Nuwer, R Kakigi

All 10 papers were also presented in the poster session.

Monday 23 March

Room A

8.30 ~ 10.00 Plenary Session 2: AUDITORY EPs

Chair: I Hashimoto

08.30 Neural Mechanisms of the AEP

Moller A R (Dallas TX, USA)

09.00 Middle Latency Auditory Evoked Potentials in Human Temporal Lobes and near the Upper Brainstem

Kadoya C, Henry TR, Beydoun A, Ross DA and Domino EF (Ann Arbor MI, Atlanta GA, USA & Fukuoka, Japan)

09.20 Clinical Application of Simultaneously Recorded Auditory Evoked Potentials: from the Inner Ear to the Primary Auditory Cortex

Ichikawa G (Tokyo, Japan)

09.40 Functional Divisions of the Auditory Cortex Suggested by Evoked Potentials to Synthesised Instrumental Tones

Jones S (London, UK)

Room A

10.30 ~ 12.30 Minisymposium 5: AUDITORY EPs

Chairs: A Moller, Y Koga

10.30 BAEP Changes in Patients with Meniere-like Hearing Loss

Moller MB (Dallas TX, USA)

10.45 A "Neural" Response with 3ms Latency Evoked by Loud Sounds in Profoundly Deaf Patients

Shiraishi K, Kato T, Eura Y, Sueta N, Ohtaguro G and Soda T (Fukuoka, Japan)

11.00 Effects of Tobacco Smoking and Abstinence on Middle Latency Auditory Evoked Potentials

Kishimoto T and Domino EF (Ann Arbor MI, USA & Nara, Japan)

11.15 Two Auditory Stimulation Paradigms to Study Processes of Inhibition, Habituation and Attention in the Rat Auditory Evoked Potential (AEP)

Jongsma MLA, Van Rijn CM, Coenen AML and Dirksen R (Nijmegen, The Netherlands)

11.30 Detection of Stimulus Deviance at Constant and Varying Interstimulus Intervals

Takegata R (Tokyo. Japan)

11.45 The Auditory Evoked N100m Response in Patients with Agenesis of the Corpus Callosum

Kanno A, Nakasato N, Suzuki K and Yoshimoto T (Sendai, Japan)

12.00 Neuromagnetic N1m Responses to Tone Burst Offset Vary Depending on Preceding Tone Burst Duration

Watanabe M and Imada T (Kanagawa, Japan)

12.15 Auditory Evoked Potentials (AEPs) Recorded from the Brainstem in Cat and Man

Wada S-I (Kitakyushu City, Japan)

Room B

10.30 ~ 12.30 Minisymposium 6: HIGH FREQUENCY OSCILLATIONS

Chairs: SJ Jones, S Tsuji

10.30 Physiological Mechanisms and Functional Significance of High-Frequency Oscillations (HFOs) from Human Somatosensory Cortex

Hashimoto I (Tokyo & Okazaki, Japan)

11.00 High Frequency Oscillations in Early Cortical Somatosensory EPs

Ozaki I, Suzuki C, Yaegashi Y, Baba M, Matsunaga M and Hashimoto I (Hirosaki, Oodate & Tokyo, Japan)

11.15 Somatosensory Evoked High-Frequency Oscillation in Parkinson's Disease and Myoclonic Epilepsy

Mochizuki H, Ugawa Y, Machii K, Terao Y, Hanajima R, Furubayashi T, Uesugi H and Kanazawa I (Tokyo, Japan)

11.30 EEG Dipole Source Comparison of Median Nerve N20 and Fast Frequency Subcomponents (FFC)

Gaetz W, Boor R, Pang EW and Taylor MJ (Toronto, Canada & Mainz, Germany)

11.45 Oscillatory Activities in the Visual System
Lopez L (Chieti, Italy)

12.00 High Frequency (600 Hz) Bursts of Spike-Like Activity Generated in the Human Cerebral Somatosensory System
Curio G (Berlin, Germany)

Room A

13.15 ~ 15.15 Minisymposium 7: NEW APPROACHES
Chairs: RQ Cracco, T Tamaki

13.15 ICU Monitoring
Nuwer MR (Los Angeles CA, USA)

13.35 Variation of ERPs Associated with Eye Fixation Determined by a Sliding Average Method
Yagi A and Takeda Y (Nishinomiya, Japan)

13.50 The Time Course of Inter- and Intra-Hemispheric EEG Coherence During a Go/No-Go Task in Man
Shibata T, Shimoyama I, Ito T, Abla D, Iwasa H, Koseki K, Yamanouchi N, Sato T and Nakajima Y (Chiba, Japan)

14.05 The MEG and EEG Inverse Problems for Estimation of Spreading Brain Electrical Activity
Ueno K and Ueno S (Tokyo, Japan)

14.20 Source Modeling of the EEG and MEG Oddball Response in a Subject with a Large P300
Berg P, Kakigi R, Scherg M, Dobel C and Zobel E (Konstanz, Heidelberg, Germany & Okazaki, Japan)

14.35 Renaissance of Human Brain Rhythms: From Description to Functional Significance
Hari R (Helsinki, Finland)

14.55 Waveform Analysis in a Volume Conductor
Kimura J (Kyoto, Japan)

Room B

13.15 ~ 15.15 Minisymposium 8: PAIN-RELATED EPs
Chairs: T Elbert, M Kato

13.15 Pain-Related Brain Activities: Magnetoencephalographic Studies
Kakigi R, Watanabe S, Kitamura Y and Yamasaki H (Okazaki, Japan)

13.35 Laser Evoked Potentials and the P300 Wave

Yarnitsky D, Zaslansky R, Granot M and Sprecher E (Haifa, Israel)

13.55 ERPs to Painful Laser Stimuli: Experimental and Clinical Applications

Arendt-Nielsen L (Aalborg, Denmark)

14.15 A P300-like Component of Pain-Related ERPs

Kanda M (Kyoto, Japan)

14.35 Pain Related Evoked Potentials from Parasylvian Cortex in Humans

Treede R D (Mainz, Germany)

14.55 The Role of Parietal Opercular and Insular Cortex in Pain Sensation in Humans: Data from PET Activation Studies and Intracortical Recordings of CO_2 Laser Evoked Potentials

MauguiEre F, Frot M, Peyron R, Garcia-Larrea L, Laurent B and Michel D (Lyon & Saint-Etienne, France)

15.30 ~ 18.00 Poster Presentations:

Chairs: S Kuriki, F Mauguiere, T Imada

Tuesday 24 March

Room A

8.30 ~ 10.00 Plenary Session 3: VISUAL EPs

Chair: C Barber

08.30 Visual Evoked Potentials: Advances in Clinical and Basic Sciences

Brigell M (Chicago IL, USA)

09.00 Neural Correlate of Motion Perception in the Human Visual System

Kaneoke Y, Bundou M and Kakigi R (Okazaki, Japan)

09.20 Temporal Analysis of the VEP and Parallel Processing

Crewther DP, Crewther SG and Klistorner A (Melbourne & Sydney, Australia)

09.40 Electrophysiological Studies of Parallel Visual Processing in Humans

Tobimatsu S, Shigeto H, Arakawa K, and Kato M (Fukuoka & Tokyo, Japan)

Room A

10.30 ~ 12.30 Minisymposium 9: VISUAL EPs

Chairs: DP Crewther, E Adachi

10.30 Cortical Blindness and Visual Processing

Celesia GG (Chicago IL, USA)

11.00 Detection of Magnocellular and Parvocellular Pathway Deficits of Strabismic and Anisometropic Amblyopia by Multifocal Visually Evoked Cortical Potentials
Kawabata H and Adachi-Usami E (Chiba, Japan)

11.15 Binocular Interaction Measured by Flash Visual Evoked Potentials
Kitano M, Nakano N, Niiyama K and Tameda M (Osaka, Japan)

11.30 Neural Correlates of Motion After-Effect using Evoked Magnetic Fields
Osaka N, Osaka M, Okusa T, Naito T, Koyama S and Kakigi R (Kyoto, Osaka & Okazaki, Japan)

11.45 Delayed or Pseudo-Delayed VEPs and PERG Changes During the Course of Demyelinating Optic Neuritis (ON)
Thomas A, Paci C, Melchionda D, D'Andreamatteo G and Onofrj M (Chieti, Italy)

12.00 Comparison Between Chromatic and Conventional Luminance Checkerboard VEPs in Multiple Sclerosis
Sartucci F, Murri L, Orsini C and Porciatti V (Pisa, Italy)

12.15 Cortical Synchronization and Narrow-Band Oscillatory (18-48 Hz) Responses to Pattern Stimulation in Healthy Subjects and in Visual Pathway Diseases
Sannita WG, Conforto S, Lopez L, Loizo A and Narici L (Genova & Rome, Italy & Stony Brook NY, USA)

Room B

10.30 ~ 12.30 Minisymposium 10: MAGNETIC STIMULATION
Chairs: P Rossini, Y Mano

10.30 The Physiological Basis of Transcranial Magnetic Stimulation
Cracco RQ (New York NY, USA)

10.50 Cortical Motor Regulation during Muscle Relaxation
Nakamura Y, Rothwell JC, Maruyama A and Trompetto C (London, UK, Kagoshima, Japan & Genoa, Italy)

11.10 Corticospinal Volleys Underlying the EMG Responses to Transcranial Stimulation of the Human Motor Cortex
Burke D (Sydney, Australia)

11.30 Magnetic Stimulation of Muscle Evokes Cerebral Potentials
Zhu Y, Starr A, Chu J, Cui L and Weber R (Syracuse NY & Irvine CA, USA)

11.50 Factors Modulating the Excitability of Human Motor Cortex, Studied With Magnetic Sti-

mulation

Ugawa Y (Tokyo, Japan)

12.10 Magnetic Brain Stimulation: A Review After 10 Years Experience

Mills KR (Oxford, UK)

Room A

13.15 ~ 15.15 Minisymposium 11: MOVEMENT-RELATED EPs

Chairs: D Burke, N Yanagisawa

13.15 Movement-Related Cortical Potentials Associated with Voluntary Muscle Contraction and Relaxation

Shibasaki H (Kyoto, Japan)

13.45 Long Loop Reflex and MRCP in Patients with Focal Cerebellar Lesions

Kitamura J-i, Kurusu K, Oya A and Kimura Y (Kanagawa, Japan)

14.00 Subdural Recording of Slow Cortical Potentials from Human Frontal Lobe in the Choice Reaction Paradigm

Ikeda A, Terada K, Yazawa S, Mikuni N, Kunieda T, Taki W, Kimura J and Shibasaki H (Kyoto, Japan)

14.15 Pre-Movement and Mid-Movement Gating of Median Somatosensory Evoked in Health and Disease

Kaji R (Kyoto, Japan)

14.45 Neurophysiology of the Supplementary Sensorimotor Area (SSMA)

Luders H O (Cleveland OH, USA)

Room B

13.15 ~ 15.15 Minisymposium 12: PAEDIATRIC EPs

Chairs: T Elbert, K Nakashima

13.15 ERP Measures of the Development of Early Cognitive Processes

Taylor MJ (Toronto, Canada)

13.45 Mismatch Negativity (MMN) in Patients with Developmental Disabilities

Kaga M, Inagaki M, Uno A, Kon K, Horiguchi T, Yano T and Ozawa H (Chiba, Japan)

14.00 Maturational Changes of MMN to Speech Sounds in Young School-Children

Gyurkocza EE and CsEpe V (Budapest, Hungary)

14.15 Bisensory Interaction of P300s to Language Stimuli and Its Application to the Assessment of Children with Learning Disorders

Miyao M, Nakamoto N, Takegata R, Okamoto K and Koike T (Gakugei University, Japan)

14.30 Development of the Magnocellular VEP in Children
Crewther SG, Crewther DP and Klistorner A (Melbourne & Sydney, Australia)

14.45 Subcortical Median Nerve and Posterior Tibial Nerve Somatosensory Evoked Potentials in Children with Achondroplasia
Boor R, Fricke G and Bru,hl (Mainz, Germany)

15.00 The Influence on Electroencephalography of Transcranial Magnetic Stimulation in Children with Cerebral Palsy
Yasuhara A, Niki T, Ochi A, Araki A and Kobayashi Y (Osaka, Japan)

15.30 ~ 18.00 Poster Presentations:
Chairs: S Yamaguchi, H Shibasaki, M Brigell

Room A

18.00 ~ 20.00 YOUNG RESEARCHERS' WORKSHOP (2)
Chairs: H Luders, Y Ugawa

All 10 papers were also presented in the poster session.

Wednesday 25 March

Room A

08.30 ~ 10.30 Minisymposium 13: EVENT-RELATED POTENTIALS (CLINICAL)
Chairs: MJ Taylor, S Wada

08.30 Event-Related Potentials in Cochlear Implantation
Barber C and Phipps S (Nottingham, UK)

09.00 The Auditory N100 Component in Cochlear Implant Patients
Okusa M and Nageishi Y (Osaka & Gifu, Japan)

09.15 Event-Related Potentials (ERPs) During A Lexical Recognition Task in Healthy Subjects and Patients With and Without Cognitive Dysfunction: Analysis of ERPs in Relation to Reaction Times (RT)
Ito J (Kyoto, Japan)

09.30 Topographic Differences of the Postimperative Negative Variation Between Schizophrenic Patients and Controls
Rockstroh B, Horvath J, Junghfer M, Cohen R and Elbert T (Konstanz, Germany)

09.45 Event-Related Potentials by Word Repetition in Ageing and Parkinson's Disease
Tachibana H, Miyata Y, Takeda M, Sugita M and Okita T (Nishinomiya, Japan)

10.00 Differences in ERPs of MS Patients in Attention Tasks With Interference and Non-Interference
Mende JM and Bennett TL (Fort Collins CO, USA)

10.15 ERPs in Neurodegenerative Diseases
Kuroiwa Y, Wang L and Kamitani T (Yokohama, Japan)

Room A

11.00 ~ 11.30 Closing Lecture: Chair: K Sasaki
New Thoughts on the Genesis of Evoked Potentials and Fields
Okada Y (Albuquerque NM, USA)

11:30 Closing Ceremony

【セミナー報告】

生理研セミナー

昼食セミナー

3. CALCIUM CHANNELS FORMED BY MAMMALIAN TRP HOMOLOGUES

Xi Zhu, Ph.D., Assistant Professor (Dept. of Anesthesiology UCLA School of Medicine, Los Angeles, CA and Dept. of Pharmacology and Neurobiotechnology Center, Ohio State University, Columbus, OH, U.S.A.)

(1997. 9 .26)

Calcium mobilization from internal stores and its entry from extracellular space are two major components of Ca^{2+} signaling following activation of phospholipase C by cell surface receptors. Ca^{2+} release its internal stores is mediated via IP_3 receptors, whereas Ca^{2+} influx occurs via store-operated plasma membrane channels presumably formed by homologues of Drosophila Trp proteins. Six non-allelic trp genes have been identified and they are present on mouse chromosomes 3, 7, 9, and X in an unlinked manner. Although all trp transcripts can be found in brain, they are often found in other tissues with different distribution. Full-length human, bovine, and/or murine cDNAs for trp1, 3, 4, 6 have been cloned. Functional expression of the cloned trp genes in various mammalian cells suggests that Trp proteins form plasma membrane Ca^{2+} permeant channels that can be activated by agonist, IP_3 and/or store-depletion. However, each Trp protein may be regulated differently and has different conductance and ion selectivity. Although some Trp proteins do not appear to form store-operated channels when expressed alone, two or more Trp proteins may coassemble into multimeric store-operated Ca^{2+} influx channels.

(担当：岡田泰伸，老木成稔，井本敬二，森　泰生)

4. MEG studies of language function and dysfunction.

Dr. Riitta Salmelin, Ph.D (Low Temperature Laboratory, Helsinki Unversity of Technology, Finland)

(1997. 9 .29)

Salmelin 博士は，脳磁図研究のメッカであるヘルシンキ工科大学極低温センターの講師で，物理学，工学を専攻する新進気鋭の女性研究者です。特に高次脳機能が専門であり，1994年の Nature に掲載された "Dynamics of brain activation during picture naming" がもたらした大きな反響は，未だ記憶に新しいものです。今回，日本神経心理学会の特別講演の講師として日本に来られた機会を利用して，岡崎にお招きしました。今回は高次脳機能の中でも最も重要かつ興味深いテーマである言語認知についてお話いただく予定です。多数の御来聴を期待致します。

Language is probably the most important manifestation of the cognitive capabilities of the hu-

man brain. Since language can only be studied in humans, the absolute non-invasiveness of magnetoencephalography (MEG) is an important asset. MEG records the normally occurring electric activity of the brain, with no need for radioactive substances or high magnetic fields and, therefore, the same subjects can be safely studied as many times as needed. The sensitivity of MEG to cortical activation is optimal for language studies as the role of the cortical (rather than subcortical) structures seems to be emphasized in cognitive processing. Knowledge of the relative timing of the brain activations is essential in deducing the possible functions of the different brain areas. This is particularly relevant for language, necessarily involving several levels of processing from sensory input to memory. MEG data are analyzed individually, not as group averages, which is very important in studies of cortical representation of language because of the large interindividual variability.

(担当：柿木隆介)

5. THREE COMPARTMENT MODEL OF THE BRAIN, ACTIVE INVOLVEMENT OF GLIAL CELLS IN BRAIN FUNCTION

G. JUHÁSZ (Senior lecturer, Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary)

(1997.10. 1)

1./ Basic findings in the 60th.

Potassium, released by neurons is mainly taken up by astrocytes not by neurons. Spreading depression and epileptic seizures are based on glial uptake deficiency.

2./ Compartmentalization of metabolic processes in the nervous system

Some basic enzymes as glutamate syntheses, glucose phosphorylase etc. are mainly or exclusively localized in glia cells.

Glycogen store is only in astrocytes in the brain, neurons are fed by metabolites of glucose mostly not directly by glucose. Glucose metabolism is under the control of noradrenaline.

Blockade of glucose metabolism with fluoroacetate in the brain induce epileptic activity.

Glutamine synthase is exclusively glial and makes glutamine from glutamate released by neurons. It is called as glutamate-glutamine shuttle.

3./ All receptors for neurotransmitters are expressed by astrocytes

Noradrenaline receptors on astrocytes control glucose metabolism and gluconeogenesis.

Glutamate receptors, GABA receptors are present but their function is not clear yet VIP also regulate gluconeogenesis in astrocytes.

4./ Astrocytes can release neurotransmitters

eventhough the immaturity of the central nervous system and the muscle squeletal structures if a significant external stimulus is present.

(担当：森　茂美)

8. Molecular mechanism of axon guidance.

Dr. Yuling Luo, Ph. D. (Molecular Biology Exelixis Pharmaceuticals, Inc.)

(1997.11.27)

(担当：八木　健)

9. How does the C3-C4 propriospinal system contribute to the control of reaching?

Prof. Bror Alstermark (Department of Physiology, University of Umea, Sweden)

(1997.11.28)

Reaching for an object is a highly complex task which involves the control of a multi-segmented limb moving in three dimensions. Detailed visual information is required about the target location, speed and direction as well as the shape of the target. Furthermore, appropriate balance is necessary for reaching and finally grasping the object. How can such specified commands be effectively executed by the spinal motoneurones? Is the corticospinal tract controlling all of these aspects and if not, how do other descending and afferent systems contribute? These are some of the major topics which will be addressed during the lecture.

A system of propriospinal neurones in the C3 and C4 segments of the cat spinal cord will be described. They are controlled by the cortico-, rubro-, tecto- and reticulospinal racts and from muscle and cutaneous forelimb afferents. The C3-C4 propriospinal neurones project monosynaptically to forelimb motoneurones in the C6-Thi segments in several different combinations. In addition, they also send ascending collaterals to the Lateral Reticular Nucleus, which is a major origin of mossy fibre input to the Cerebellum, Electrophysiological network analysis, morlysis, morphological investigations and behavioural testing of this system suggest that it is of importance in mediating the descending command for visually guided reaching with the forelimb.

(担当：伊佐　正)

10. 躁うつ病の遺伝子解析

吉川武男（東京医科歯科大学・医学部・神経精神医学・助手）

(1998. 2 .13)

躁うつ病は全人口の１％弱に影響を与え，原因の一部に遺伝的要因が考えられている。遺伝様式としては，他の common disease と同じように複雑遺伝形式をとる。我々は病因遺伝子に迫るため，第一段階として家系を用いた連鎖解析を行い，染色体上にいくつかのシグナルを得た。複雑遺伝疾患に対しては，従来のパラメトリック法（Lod Score 法）は有効でないためノンパラメトリック法（Affected Sib Pair 法）を用いるが，染色体上の部位をポジショナルクローニング可能な領域まで絞れないのが，現代分子遺伝学が直面している壁である。我々はポジティブなシグナルのうち染色体18番短腕領域に焦点をあて，病因遺伝子を narrow down することを試みた。

(担当：小幡邦彦)

11. "Protein-Protein Interactions Important in Regulating the Abundance, Distribution and Activity of Neuronal K^+ Channels".

Dr. James S. Trimmer (State University of New York at Stony Brook)（ニューヨーク州立大学ストーニー・ブルック校）

(1998. 3 .18)

"Our research concerns the regulation of electrical excitability in central neurons, and specifically, the molecular mechanisms that control K^+ channel abundance, distribution and activity. While regulation of these channels is known to habe profound effects on the electrical properties of neurons, little is known of the specific molecular and cellular processes involved. Our recent research has been aimed at characterizing the processes that determine the abundance, distribution and functional properties of neuronal K^+ channel polypeptides. Our studies have focused on determining the role of selective protein-protein interactions, specifically with auxiliary subunits and cytoskeletal proteins, in determining the surface abundance and distribution of K^+ channels in central neurons. We have used an approach combining biochemical characterization of isolated brain K^+ channel complexes, and immunohistochemical localization of alpha and beta subunit polypetides to characterize subunit association and colocalization in rat and human brain. We have also used overexpression of cloned wild-type and mutant K^+ channel subunits in mammalian cell lines, as well as primary neuronal cultures and established cell lines expressing endogenous channels, to characterize the molecular bases of the selective interaction of alpha and beta subunit polypeptides. We have also studyied the effects of such interactions on the molecular and cellular

processes that operate during biosynthesis to regulate the abundance of surface K^+ channels, such as biosynthetic efficiency, assembly, posttranslational modification during transit through the endomembrane system, and the stability and turnover of surface channels. We have also investigated the cellular processes that are important in the sorting of channel proteins to specific subcellular membrane domains of neurons, specifically interaction with cytoskeletal proteins, using a combined molecular, genetic and biochemical approach. Together these studies will lead to a clearer understanding of the regulation of electrical excitability in central neurons through the differential expression, localization and activity of voltage-gated Na^+ and K^+ channels."

(担当：中平健祐)

〈昼食セミナー〉

1．神経分泌顆粒形成におけるホスファチジルイノシトール移送タンパク質の役割

大橋正人

(1997．6．9)

神経分泌顆粒はトランスゴルジネットワーク (TGN) から生じるが，これに関与する因子には不明な点が多い。TGN における分泌小胞形成に関わる細胞質因子を同定するため，PC12 細胞を用いた無細胞再構成系における TGN からの分泌小胞の形成を促進する細胞質因子を，牛副腎髄質細胞質分から精製することを試みた。この過程で，促進因子は，2つの活性ピークに分離された (CAST1 と CAST2)。そのうちのひとつ，CAST1 をさらに精製したところ，34, 35kD のタンパク質が得られた。これらはマイクロシークエンシングおよびイムノブロットにより，それぞれ哺乳類ホスファチジルイノシトール移送タンパク質 (PI-TP) の2つのアイソフォームであると同定され，CAST1 活性は PI-TP に由来すると考えられた。実際，牛脳より精製した PI-TP，および，マウスの PI-TP は無細胞分泌小胞形成を促進した。そのうえ，酵母の PI-TP である SEC14p は哺乳類の PI-TP との配列相同性を持たないにもかかわらず，分泌小胞形成促進能を示した。これらの結果は，TGN (late Golgi) からの分泌小胞形成における脂質移送タンパク質の高度に保存された役割を示唆する。

2．マウス精子形成細胞への遺伝子導入

山崎由起子

(1997.10.13)

ほ乳類の精巣は，精細管とその周囲の間質から成り立っていて，精細管内で精子形成が行われる。幹細胞である精原細胞が恒常的に自己再生しながら増殖を伴った分化を開始し，減数分裂過程の精母細胞から半数体の精子細胞を経て，最終的に成熟精子への形態変化といった連続的経過が精子形成過程である。このように複雑な精子形成過程を分子レベルで解明するには，その分化制御を担う遺伝子発現制御機構を知ることが不可欠である。しかし，精子形成細胞には生体内の特異的発現を再現する in vitro 培養系が確立されておらず，細胞・組織レベルで遺伝子解析をする大きな障害となっているのが現状である。

そこで今回，生きた個体の精巣臓器を対象とした遺伝子発現の in vivo assay 系の開発を目指した。すなわち，マウス精細管内への DNA 注入とエレクトロポレーション法を組み合わせた精子形成細胞への遺伝子導入を試みた結果，その有効性を確認したので紹介したい。

3．広塩性魚類（ウナギ）の血液浸透圧の恒常性維持に関与する調節ペプチド

上坂敏弘

(1997.10.27)

川と海の間を往来する広塩性魚類のウナギは，淡水 (0.1-1.0 mOsm/l) でも，海水 (1,000 mOsm/l) においても，その血液浸透圧はほぼ 350 mOsm/l と一定に保っている。この血液浸透圧の恒常性維持には鰓・腸・腎臓が関与していることが知られている (Smith, 1930)。しかしながら，浸透圧調節に関与する調節因子や調節機構についてはまだほとんどわかっていない。鰓や腎臓は構造が複雑で解析が困難なので，まず腸におけるイオンと水輸送の調節機構を明らかにすることを試みた。具体的には，調節因子を腸から実際に単離し，その構造を決定し，腸における作用を明らかにした。この研究は，昨年，広島大学にて学位論文として報告したものである。

4．一酸化窒素合成酵素の機能調節におけるテトラヒドロバイオプテリンの役割と細胞障害

清水俊一

(1998. 2 .23)

一酸化窒素 (NO) は，強い血管拡張作用や免疫系の調節作用を有する重要な生理活性物質である。しかしながら，NO を生成する NO 合成酵素は，補酵素であるテトラヒドロバイオプテリン (BH4) 濃度が低下すると活性酸素を遊離し，細胞障害を増悪することが明らかとなった。また，BH4 はそれ自体に強い活性酸素消去能を有し，活性酸素や大量の NO による細胞障害を抑制することが認められた。BH4 は，活性酸素の関与する疾患，例えば，心虚血や脳虚血の有効な治療薬となりうる可能性が考えられる。

5．脊髄内中枢神経組織移植の実験的研究

森　大志

(1998. 3 .16)

新生仔哺乳動物の脊髄完全病巣部に胎仔脊髄組織を移植すると，後肢運動の機能回復が促進されるが，成熟動物の場合，そのような回復は達成されない。今回，後肢運動の機能脱落と機能回復の１つのメカニズムと考えられている軸索損傷後の逆行性神経細胞死と移植胎仔脊髄組織による細胞死の救済について，成熟ラット赤核脊髄路損傷モデルを作成して検討した。あわせて，成熟ラット脊髄後索内移植モデルでの胎仔脊髄組織の経時的発達様式も紹介する。

6．In situ Biochemistry & Biophysics ―細胞を一個の試験管に見立てた一細胞計測システム開発の試み―

村田昌之

(1998．3．30)

「極性」細胞の小胞輸送過程や細胞内オルガネラ・細胞骨格の相互作用を研究するためには，細胞の形質膜・細胞骨格・オルガネラの「トポロジー」を保ったまま細胞内を「操作でき」「細胞を一個の試験管」に見立てて，その中での蛋白質間相互作用・細胞内の膜動過程・生理反応を定量的に検出し，新規の因子をスクリーニングできる全く新しいアッセイシステムの確立が不可欠である。その為，我々は（1）形質膜を部分的に透過性にした「セミインタクト細胞系」と（2）光学顕微鏡下での定量的蛍光計測を応用した「多重蛍光顕微鏡解析法」などを駆使した「一細胞計測システム」の開発を行っている。本セミナーでは，最近我々が行ったイヌ腎臓上皮由来の培養細胞である MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞のゴルジ体のダイナミクスの研究を例に，この生細胞・セミインタクト細胞を対象とした「in situ biochemistry & biophysics」とも言うべき新しい実験システムを紹介する。

生理学研究所年報　第19巻

発　　行　1998年10月１日

編 集 者　永 山 國 昭

発 行 者　岡崎国立共同研究機構
生 理 学 研 究 所
〒444-8585 岡崎市明大寺町字西郷中38
電話 〈0564〉55-7700
FAX 〈0564〉52-7913